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

COMPOSIÇÃO DE CAROTENÓIDES E ANTOCIANINAS EM ACEROLA. ESTABILIDADE E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM SISTEMAS-MODELO DE EXTRATOS ANTOCIÂNICOS DE ACEROLA E DE AÇAÍ

Veridiana Vera de Rosso
Engenheira de Alimentos

Profª Dra. Adriana Zerlotti Mercadante
Orientadora

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos

Campinas
2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

Rosso, Veridiana Vera de
R737c Composição de carotenóides e antocianinas em acerola. Estabilidade e atividade antioxidante em sistemas-modelo de extratos antociânicos de acerola e de açaí / Veridiana Vera de Rosso. -- Campinas, SP: [s.n.], 2006.

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

1. Acerola. 2. Carotenóides. 3. Antocianinas. 4. Estabilidade. 5. Atividade antioxidante. I. Mercadante, Adriana Zerlotti. II. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Titulo em inglês: Composition of carotenoids and anthocyanins from acerola. Stability and antioxidant activity of anthocyaninc extracts from acerola and açai in model-systems
Palavras-chave em inglês (Keywords: Acerola, Carotenoids, Anthocyanins, Stability Antioxidant activity)
Titulação: Doutor em Ciências de Alimentos
Banca examinadora: Adriana Zerlotti Mercadante
Florinda Orsatti Bobbio
Maria Inês Genovese
Franco Maria Lajolo
Maria Aparecida Azevedo Pereira da Silva
Paulo Roberto Nogueira Carvalho

BANCA EXAMINADORA

Dra. Adriana Zerlotti Mercadante
DCA/FEA UNICAMP

Dra. Flo rinda Orsatti Bobbio
DCA/FEA UNICAMP

Dra. Maria Inês Genovese
FCF/USP

Dr. Franco Maria Lajolo
FCF/USP

Dra. Maria Aparecida Azevedo Pereira da Silva
DEPAN/FEA UNICAMP

Dr. Paulo Roberto Nogueira Carvalho
ITAL

Dedico esta conquista
aos meus pais Lino e Irene, aos meus irmãos
e ao meu querido Flavio.

AGRADECIMENTOS

À Deus por não deixar que em momento nenhum o desânimo ou as dificuldades superassem a vontade de alcançar esse objetivo;

À Profª Adriana, pela orientação e dedicação incansável durante a realização deste trabalho e para minha formação como pesquisadora;

À FAPESP pela bolsa e estágio concedidos;

À Querida Profª Florinda pelo auxílio nas mais diversas atividades e pelo prazer da convivência diária;

Ao Profº Cláudio Borsarelli pela orientação durante estágio realizado na Universidade Nacional de Santiago del Estero (Argentina);

Aos colegas de laboratório, que se tornaram amigos durante a realização das atividades, especialmente a Itaciara, Alessandro, Cinthia, Mônica, Gisela e Leila;

Aos técnicos e funcionários do departamento de Ciência de Alimentos pela colaboração, auxílio técnico indispensável para a realização deste trabalho;

Aos amigos Tatiane, Lucielen, Márcia, Márcio e Otávio pela convivência diária e inesquecível amizade. Às novas amizades que cultivei durante esse período e tenho certeza que serão eternas;

Ao meu maior incentivador e sempre presente marido Flavio.

OBRIGADA!

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE GERAL ..... **ix**
ÍNDICE DE TABELAS ..... **xiii**
ÍNDICE DE FIGURAS ..... **xv**
RESUMO GERAL **1**
SUMMARY **4**
INTRODUÇÃO GERAL **7**
OBJETIVOS **9**

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Acerola e Açaí…….. **11**
2. Pigmentos em Acerola e Açaí.....……..... **12**
   2.1 Carotenóides e Antocianinas em Acerola……..……..…….. **12**
   2.2 Carotenóides e Antocianinas em Açaí.....……..……..…….. **14**
3. Estabilidade de antocianinas…..……..... **15**
   3.1 Influência da presença de ácido ascórbico..……..……. **19**
   3.2 Estabilidade da cor das antocianinas…..……..... **21**
   3.3 Estabilização de antocianinas..... **23**
4. Antocianinas como anti-oxidantes.……..……..... **24**
   4.1 Espécies reativas de oxigênio e radicais livres..... **24**
   4.2 Desativação de oxigênio singlete..... **25**
      4.2.1 Time-resolved photoacoustics..... **29**
   4.3 Scavenger de radicais livres…….....……..... **30**
5. Referências Bibliográficas.....……..... **32**

CAPÍTULO II

CAROTENOID COMPOSITION OF TWO BRAZILIAN GENOTYPES OF ACEROLA (*MALPIGHIA PUNICIFOLIA* L.) FROM TWO HARVESTS

Abstract ……..…….. **40**
1. Introduction ……..…….. **40**
2. Material and Methods ……..…….. **41**
   2.1 Samples charaterization…….. **41**

2.2 Standards **41**
2.3 Carotenoid analysis **41**
2.4 Statistical analysis **41**
3. Results and discussion **41**
3.1 Genotypes differences **43**
3.2 Weather conditions effects **43**
4. Conclusion **44**
References **44**

CAPÍTULO III

DETERMINATION OF ANTHOCYANINS FROM ACEROLA (*MALPIGHIA EMARGINATA* DC.) AND AÇAÍ (*EUTERPE OLERACEA* MART.) BY HPLC-PDA AND HPLC-MS

Abstract **46**
1. Introduction **47**
2. Material and Methods **48**
2.1 Samples **48**
2.2 Standards **48**
2.3 Total Anthocyanin Determination **49**
2.4 Extraction and Partial Purification of Anthocyanins **49**
2.5 HPLC-PDA and HPLC-MS **49**
2.6 Statistical analysis **50**
3. Results and discussion **51**
3.1 Açaí **51**
3.2 Acerola **55**
4. Conclusion **58**
References **59**

CAPÍTULO IV

THE HIGH ASCORBIC ACID CONTENT IS THE MAIN CAUSE OF LOW ANTHOCYANIN STABILITY IN ACEROLA

Abstract **63**
Introduction **64**
Material and Methods **65**
Materials **65**

Anthocyanin extract…….…….. **65**
Model systems ……..…..…….…….. **65**
Monitoring of the model systems …… **66**
Phytochemical analysis ……..……..……... **67**
Kinetic calculations and statistical analysis ……..... **67**
Results and discussion….…….. **68**
Influence of AA on the anthocyanin extract stability..……..…… **68**
Effect of oxygen and light.....…….....…… **71**
Changes in the relative composition of the anthocyanins ……..… **72**
Changes in the ascorbic acid concentration …….. **73**
Color stability ……..…… **74**
References …….…….. **78**

CAPÍTULO V

ESTABILIDADE DO EXTRATO ANTOCIÂNICO DE ACEROLA E DE AÇAÍ EM SISTEMAS SIMULADOR DE BEBIDA ISOTÔNICA

Abstract …… **82**
1. Introdução……..……..……... **83**
2. Materiais e Métodos....…….. **84**
2.1 Materiais…..……...…... **84**
2.2 Obtenção dos extratos de antocianinas …….. **84**
2.3. Preparação dos sistemas-modelo …….. **85**
2.4 Monitoramento dos sistemas-modelo ….....……..…… **85**
2.5. Análises fito-químicas ……..……...……... **86**
2.6 Cálculos cinéticos e análises estatíticas..... **86**
3. Resultados e discussão….……..…….. **87**
3.1. Estabilidade de antocianinas..... **87**
3.2 Mudanças na composição relativa de antocianinas.....……..... **90**
3.3. Estabilidade da cor **91**
4. Conclusão ……..……..... **94**
Referências…….…….. **95**

CAPÍTULO VI

ATIVIDADE ANTI-RADICAL LIVRE DOS EXTRATOS DE ANTOCIANINAS DE ACEROLA E DE AÇAÍ

Abstract **99**
Introdução..... **100**
Materiais e Métodos..... **101**
Materiais..... **101**
Extratos de antocianinas **102**
Determinação dos Compostos Fenólicos..... **102**
Extração de compostos fenólicos **102**
Determinação de polifenóis totais **102**
Determinação de flavonóides totais..... **103**
Avaliação da atividade anti-radical livre **103**
Determinação da descoloração do radical $ABTS^{\bullet+}$..... **103**
Determinação da atividade $DPPH^{\bullet}$..... **104**
Resultados e discussão..... **105**
Atividade anti-radical livre dos padrões **105**
Atividade anti-radical livre dos extratos..... **107**
Conclusões..... **112**
Referências..... **113**

CAPÍTULO VII

FOTO-OXIDAÇÃO SENSITIZADA DE ANTOCIANINAS: EFEITO PROTETOR DOS EXTRATOS ANTOCIÂNICOS DE AÇAÍ E DE ACEROLA E DESATIVAÇÃO DE OXIGÊNIO SINGLETE

Resumo..... **117**
Introdução **118**
Materiais e Métodos..... **120**
Materiais..... **120**
Extratos de antocianinas **120**
Análises fito-químicas **120**
Experimentos de fotosensitização..... **120**
Time-resolved detection da fosforescência de $O_2(^1\Delta_g)$..... **122**

Time-resolved photoacoustics (TRP)………….................…........................... **122**
Resultados e discussão.……………………………..……………………………..…….. **123**
Efeito protetor dos extratos de antocianinas de açaí e de acerola ....……..… **123**
Desativação de Oxigênio Singlete **125**
Estado triplete das antocianinas …….................................……………………… **129**
References ……………………………………………………………………………….. **132**

Conclusão Geral **135**

INDICE DE TABELAS

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1. Dados cinéticos de degradação de antocianinas em sistemas-modelo líquidos.. **17**

CAPÍTULO II

CAROTENOID COMPOSITION OF TWO BRAZILIAN GENOTYPES OF ACEROLA (*MALPIGHIA PUNICIFOLIA* L.) FROM TWO HARVESTS

Table 1. Main properties, obtained by HPLC, of carotenoids from acerola ………….. **42**
Table 2. Carotenoid composition (µg/100g) and vitamin A value (RE/100g) of two acerola genotypes …………………………………………………………………….….. **43**

CAPÍTULO III

DETERMINATION OF ANTHOCYANINS FROM ACEROLA (*MALPIGHIA EMARGINATA* DC.) AND AÇAÍ (*EUTERPE OLERACEA* MART.) BY HPLC-PDA AND HPLC-MS

Table 1. Chromatographic, UV-Vis and mass spectroscopy characteristics of the anthocyanins from açaí and acerola, obtained by HPLC-PDA and HPLC-MS ……… **53**
Table 2. Total anthocyanin content and relative composition of anthocyanins from açaí…………………………………………………………………………………………… **54**
Table 3. Total anthocyanin content and relative composition of anthocyanins from acerola………………………………………………………………………………………… **58**

CAPÍTULO IV

THE HIGH ASCORBIC ACID CONTENT IS THE MAIN CAUSE OF LOW ANTHOCYANIN STABILITY IN ACEROLA

Table 1. Rate constants (k_{obs}) and half-life times ($t_{1/2}$) for anthocyanin degradation in acerola and açai model systems in citrate-phosphate buffer at pH 2.5 and 20ºC..... **68**

Table 2. Phytochemical characteristics of the acerola and açai pulps and anthocyanin extracts **70**

Table 3. AA degradation in acerola and AA-fortified açai anthocyanin model systems in citrate-phosphate buffer at pH 2.5 ..... **74**

CAPÍTULO V

ESTABILIDADE DO EXTRATO ANTOCIÂNICO DE ACEROLA E DE AÇAÍ EM SISTEMAS SIMULADOR DE BEBIDA ISOTÔNICA

Tabela 1. Constante de velocidade (k_{obs}) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) para a degradação das antocianinas de acerola e de açaí em sistemas tampão fosfato-citrato e simulador de bebida isotônica, em pH 2.5 na presença de ar a 20º C..... **88**

Tabela 2. Características fito-químicas dos extratos brutos concentrados antociânicos (CE) de acerola e de açaí **89**

CAPÍTULO VI

ATIVIDADE ANTI-RADICAL LIVRE DOS EXTRATOS DE ANTOCIANINAS DE ACEROLA E DE AÇAÍ

Tabela 1. Capacidade anti-radical livre dos padrões (0,5 mM) de antocianinas e de antocianidina **105**

Tabela 2. Capacidade anti-radical total medida através do radical $ABTS^{+\bullet}$ (TEAC) e do $DPPH^{\bullet}$ (tempo de meia-vida e k_{obs}) em extratos antociânicos de acerola e de açaí..... **107**

Tabela 3. Características fito-químicas dos extratos antociânicos de acerola e de açaí **108**

CAPÍTULO VII

FOTO-OXIDAÇÃO SENSITIZADA DE ANTOCIANINAS: EFEITO PROTETOR DOS EXTRATOS ANTOCIÂNICOS DE AÇAÍ E DE ACEROLA E DESATIVAÇÃO DE OXIGÊNIO SINGLETE

Tabela 1. Valores de k_{obs} do DMA e efeito protetor dos extratos antociânicos de açaí e de acerola **124**

Tabela 2. Características fito-químicas dos extratos antociânicos de acerola e de açaí..... **125**

Tabela 3. Constantes de desativação física (k_q) de $O_2(^1\Delta_g)$, determinadas por método indireto, dos padrões de antocianinas e antocianidina **127**

Tabela 4. Constantes de desativação k_q de $O_2(^1\Delta_g)$, determinadas pelo método de decaímento da fosforescência, dos padrões de antocianinas e de antocianidina **128**

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Transformações estruturais das antocianinas em solução aquosa ácida.… **16**

Figura 2. Diagrama de energia potencial para a produção de oxigênio singlete, por transferência de energia ( ), relaxamento vibracional (↓);conversão interna ( ) e fosforescência ( ) **26**

Figura 3. Esquema de mecanismos de foto-sensitização tipo I e tipo II **27**

CAPÍTULO II

CAROTENOID COMPOSITION OF TWO BRAZILIAN GENOTYPES OF ACEROLA (*MALPIGHIA PUNICIFOLIA* L.) FROM TWO HARVESTS

Figure 1. Chromatogram, obtained by HPLC, of carotenoids from acerola. Chromatogram 1A- Waldy genotype, chromatogram 2A- Olivier genotype. For better visualization, the chromatograms 1A and 2A were, respectively, amplified in 1B and 2B. Chromatographic conditions: see text. Acquired in maxplot and processed at 450 nm. Peak identification is given in Table 1 ……. **42**

CAPÍTULO III

DETERMINATION OF ANTHOCYANINS FROM ACEROLA (*MALPIGHIA EMARGINATA* DC.) AND AÇAÍ (*EUTERPE OLERACEA* MART.) BY HPLC-PDA AND HPLC-MS

Figure 1. (A) HPLC-PDA chromatogram processed at 520 nm, from the crude extract of anthocyanins from açaí. (B) HPLC-MS TIC chromatogram, from the partially purified extract of anthocyanins from açaí. Chromatographic conditions: see text. Peak identification is given in Table 1..... **51**

Figure 2. (A) HPLC-PDA chromatogram processed at 520 nm from of the crude extract of anthocyanins from acerola Waldy Cati 30 variety. (B) HPLC-MS TIC chromatogram from the partially purified extract of anthocyanins from acerola Waldy Cati 30 variety. Chromatographic conditions: see text. Peak identification is given in Table 1..... **56**

Figure 3. UV-Vis spectra of cyanidin-3-rhamnoside and cyanidin-3,5-di-rhamnoside from acerola **57**

CAPÍTULO IV

THE HIGH ASCORBIC ACID CONTENT IS THE MAIN CAUSE OF LOW ANTHOCYANIN STABILITY IN ACEROLA

Figure 1. Photo-degradation kinetic curves of the anthocyanins of the AA fortified açai and acerola CE model systems in citrate-phosphate buffer at pH 2.5. A) açai-CE fortified with AA at different levels and acerola-CE and B) açai-CE with and without AA fortification..... **69**

Figure 2. Anthocyanin degradation curves under air and nitrogen in citrate-phosphate buffer at pH 2.5. A) acerola and B) açaí **71**

Figure 3. HPLC-PDA chromatograms obtained during the degradation of acerola and açai anthocyanins in phosphate-citrate buffer at pH 2.5 in the presence of light and air. A) acerola, B) açai. See text for chromatographic conditions..... **73**

Figure 4. Changes in the colour parameters: A) ln *L**, B) hue angle (*h*), C) Chroma (*C**) and D) ΔE^* for the anthocyanin model systems of acerola and AA fortified açai, at pH 2.5 in the presence of light and air..... **75**

Figure 5. Changes in the colour parameters: A) hue angle (*h**) and B) *b**, in the anthocyanin model systems for acerola and for açai with and without the addition of AA, at pH 2.5 in the presence of light and air..... **76**

CAPÍTULO V

ESTABILIDADE DO EXTRATO ANTOCIÂNICO DE ACEROLA E DE AÇAÍ EM SISTEMAS SIMULADOR DE BEBIDA ISOTÔNICA

Figura 1. Curvas cinéticas da degradação das antocianinas de açaí e de acerola em sistemas tampão citrato-fosfato e simulador de bebida isotônica, ambos em pH 2.5, na presença de ar e na presença/ausência de luz..... **87**

Figura 2. Cromatogramas, obtidos por HPLC-PDA, durante reação de degradação das antocianinas de acerola e de açaí em sistema-modelo de bebida isotônica, na presença de luz e de ar. A) acerola (pico1- cianidina-3-ramnosídeo, pico 2- pelargonidina-3-ramnosídeo, pico 3- cianidina-3,5-di-ramnosídeo e pico 4- peonidina-3-ramnosídeo), B) açaí (pico 1- cianidina-3-glucosídeo e pico 2- cianidina-3-rutinosídeo). Condições cromatográficas: ver texto **91**

Figura 3. Mudanças no parâmetro de cor CIE *L** para os sistemas-modelo tampão citrato-fosfato e bebida isotônica de antocianinas de acerola e de açaí, pH 2,5 na presença de luz e de ar **92**

Figura 4. Mudanças no parâmetro de cor *h* para os sistemas tampão citrato-fosfato e simulador de bebida isotônica de antocianinas de acerola e de açaí, pH 2,5 na presença de luz e de ar **92**

Figura 5. Mudanças no parâmetro de cor *C** para os sistemas tampão citrato-fosfato e simulador de bebida isotônica de antocianinas de acerola e de açaí, pH 2,5 na presença de luz e de ar **93**

Figura 6. Diferença global de cor (ΔE^*) para os sistemas tampão citrato-fosfato e simulador de bebida isotônica de antocianinas de acerola e de açaí, pH 2,5 na presença de luz e de ar **94**

CAPÍTULO VI

ATIVIDADE ANTI-RADICAL LIVRE DOS EXTRATOS DE ANTOCIANINAS DE ACEROLA E DE AÇAÍ

Figura 1. Estrutura química característica das antocianinas..... **94**

Figura 2. Cinética de reação dos padrões de antocianinas e de antocianidina frente ao radical DPPH$^{\bullet}$. MVD-3,5-DG: malvidina-3,5-diglucosídeo, MVD-3-G: malvidina-3-glucosídeo, MVD: malvidina, CYD-3-G: cianidina-3-glucosídeo, CYD-3-GLT: cianidina-3-galactosídeo e CYD-3-R: cianidina-3-rutinosídeo **98**

Figura 3. Correlação entre os teores de ácido ascórbico dos extratos de acerola e a

atividade anti-radical frente ao $ABTS^{\bullet+}$ (TEAC) **101**
Figura 4. Correlação entre os teores de polifenóis totais e flavonóides com a atividade anti-radical frente ao $ABTS^{\bullet+}$ (TEAC). A) extratos de acerola e B) extratos de açaí..... **102**
Figura 5. Cinéticas de reação dos extratos antociânicos de acerola e de açaí frente o radical $DPPH^{\bullet}$. A) acerola. B) açaí **104**

CAPÍTULO VII

FOTO-OXIDAÇÃO SENSITIZADA DE ANTOCIANINAS: EFEITO PROTETOR DOS EXTRATOS ANTOCIÂNICOS DE AÇAÍ E DE ACEROLA E DESATIVAÇÃO DE OXIGÊNIO SINGLETE

Figura 1. Mudanças no espectro UV-Vis durante a foto-oxidação sensitizada do extrato purificado de açaí utilizando o DMA como actinômetro **123**
Figura 2. Curvas cinéticas de foto-oxidação sensitizada do DMA na presença dos extratos antociânicos de açaí e acerola, monitoradas a 375 nm **124**
Figura 3. Cinética de primeira ordem para o consumo de DMA, em função da concentração da cianidina-3-glucosídeo (CYD3G), cianidina-3-rutinosídeo (CYD3R) e malvidina (MVD)..... **126**
Figura 4. Gráfico de Stern-Volmer para a desativação do $O_2(^1\Delta_g)$ pelas antocianinas cianidina-3-glucosídeo (CYD3G), cianidina-3-rutinosídeo (CYD3R) e pela antocianidina malvidina (MVD) **127**
Figura 5. Gráfico de Stern-Volmer para a desativação do $^1O_2$ ($^1\Delta_g$) pelas antocianinas cianidina-3-rutinosídeo (CYD3R), cianidina-3-glucosídeo (CYD3G) e pela antocianidina malvidina (MVD) **128**
Figura 6. Gráfico da amplitude do sinal foto-acústico em função do percentual da energia do laser para os extratos de açaí sob atmosfera saturada de oxigênio e nitrogênio..... **130**

RESUMO GERAL

Os pigmentos naturais, tais como antocianinas e carotenóides, proporcionam cor aos alimentos, contribuindo para o seu aspecto visual, atributo este de fundamental importância na aceitação e escolha de um alimento por seus consumidores. Concomitante, estes pigmentos possuem importantes funções e ações biológicas, podendo ser considerados promotores da saúde humana. Já é reconhecida a associação entre a ingestão de frutas e vegetais e a diminuição do risco de desenvolvimento de diversas desordens crônico-degenerativas, sendo os pigmentos um dos grupos de compostos bioativos aos quais são atribuídas tais ações. Acerola e açaí são frutas tropicais que contém elevados teores de compostos bioativos, como carotenóides e antocianinas.

Os pigmentos, carotenóides e antocianinas, de duas variedades de acerola (Waldy Cati 30 e Olivier) obtidas em uma plantação brasileira durante as safras de verão de 2003 e 2004 foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As duas variedades apresentaram β-caroteno (265,5 – 1669,4 μg/100g), luteína (37,6 – 100,7 μg/100g), β-criptoxantina (16,3 – 56,5 μg/100g) e α-caroteno (7,8 – 59,3 μg/100g) como carotenóides majoritários. Em ambas safras, os teores de β-caroteno, β-criptoxantina e α-caroteno foram significativamente maiores na variedade Olivier, entretanto o teor de luteína foi maior na variedade Waldy Cati 30. As duas variedades de acerola mostraram composição similar em termos de antocianinas e a cianidina-3-ramnosídeo foi a antocianina majoritária, seguida da pelargonidina-3-ramnosídeo, da cianidina-3,5-di-ramnosídeo e da peonidina-3-ramnosídeo. O teor de antocianinas totais da variedade Waldy variou de 6,5 a 7,6 mg/100g, enquanto para a variedade Olivier os teores variaram entre 7,9 e 8,4 mg/100g, para as safras de 2003 e 2004, respectivamente. Não foi verificada diferença significativa entre os teores de antocianinas totais das diferentes variedades e entre as duas safras.

Dois lotes de polpa de açaí congelado apresentaram teores de antocianinas totais variando entre 282 e 303 mg/100g, apresentando a cianidina-3-glucosídeo e a cianidina-3-rutinosídeo nas proporções médias de 13,2% e 87,5%, respectivamente.

A acerola é considerada uma das melhores fontes naturais de ácido ascórbico (AA) e, por esta razão, foi determinada a influência do AA na estabilidade do extrato de antocianinas de acerola utilizando como comparação o extrato de açaí, que não possui AA. Os experimentos demonstraram que o AA presente ao nível de 276 mg /100mL no

extrato antociânico de acerola foi o principal responsável pela intensa degradação destas antocianinas, pois a adição de AA à solução de antocianinas de açaí na concentração de 276 mg/100mL provocou um aumento de 22 vezes na velocidade de degradação (k_{obs}) quando comparada ao açaí não fortificado. Embora os sistemas-modelo antociânicos das duas frutas apresentassem a mesma concentração de AA (276 mg /100mL), o valor de k_{obs} encontrado no sistema de acerola foi 3 vezes maior do que o k_{obs} da solução de açaí. Essa diferença pode ter ocorrido devido à concentração 10 vezes maior de flavonóides no extrato antociânico de açaí, uma vez que os teores de polifenóis totais foram semelhantes nos dois extratos.

A viabilidade do emprego dos extratos antociânicos de acerola e de açaí como ingrediente funcional foi avaliada em sistema simulador de bebidas isotônicas. Em todas as condições avaliadas, a degradação das antocianinas seguiu cinética de primeira ordem. A estabilidade das antocianinas em sistema simulador de bebida isotônica foi 1,3 e 1,7 vezes menor do que nos sistemas tampão citrato-fosfato para as antocianinas de acerola e de açaí, respectivamente, a pH 2,5, na presença de luz e de oxigênio. Em todos os sistemas, a perda gradual da cor vermelha e aumento da cor amarela foi observada através do incremento do parâmetro CIE L^* (luminosidade) e diminuição dos valores de C^* (intensidade de cor) que podem ser resultado da degradação do cátium flavilium e formação de chalconas, respectivamente.

Utilizando os radicais estáveis $ABTS^{\bullet+}$ e $DPPH^{\bullet}$, a atividade anti-radical dos extratos de antocianinas de acerola e de açaí com diferentes graus de purificação foi avaliada, e comparada com padrões de antocianinas e de uma antocianidina. Os extratos bruto (EB), parcialmente purificado (EPP) e purificado (EP) de acerola apresentaram maior atividade antioxidante do que os respectivos extratos de açaí. A atividade anti-radical dos extratos brutos das duas frutas diminuiu à medida que o extrato bruto foi sendo purificado e, portanto, a presença de polifenóis, flavonóides e ácido ascórbico no extrato antociânico bruto influenciou na atividade anti-radical. Os resultados obtidos com padrões confirmaram que a atividade anti-radical aumenta com o número de grupos OH no anel B das antocianinas e que a atividade antioxidante diminui à medida que o número de açúcares ligados à molecula aumenta.

Foram realizados estudos sobre a reatividade de antocianinas frente ao oxigênio singlete ($O_2(^1\Delta_g)$), através da avaliação do efeito protetor do EB, EPP e EP das antocianinas de acerola e de açaí sobre o actinômetro dimetil-antraceno, utilizando azul de metileno como sensitizador. A constante de desativação física (k_q) foi determinada

através dos métodos de foto-oxidação sensitizada e pela detecção da fosforescência do $O_2(^1\Delta_g)$, e o nível de energia do estado triplete das antocianinas de açaí foi avaliado utilizando a técnica de *time resolved photoacoustics* (TRP). À medida que os extratos foram sendo purificados, a capacidade de desativação do $O_2(^1\Delta_g)$ foi diminuindo. Dentre os padrões avaliados, malvidina, cianidina-3-rutinosídeo e cianidina-3-glucosídeo, a malvidina foi o melhor desativador de $O_2(^1\Delta_g)$, independentemente do método utilizado para cálculo do k_q. Os experimentos de TRP demonstraram que o estado triplete das antocianinas de açaí apresentam tempo de vida muito curto, indicando que a desativação do $O_2(^1\Delta_g)$ não depende da formação do estado triplete das antocianinas.

SUMMARY

Natural pigments, such as anthocyanins and carotenoids, are responsible for the colors found in foods, influencing its visual aspect, which is considered the main attribute for the acceptance and preference of a food product. At the same time, these pigments show important biological functions and actions, being considered human health promoters. The association between the intake of fruits and vegetables and the decreased risk of developing several chronic-degenerated disorders is already recognized, being the pigments one of the bioactive compounds responsible for such actions. Acerola and açaí are tropical fruits that contain high levels of bioactive compounds, such as carotenoids and anthocyanins.

The pigments, carotenoids and anthocyanins, of two acerola varieties (Waldy Cati 30 and Olivier) harvested from a Brazilian plantation during the 2003 and 2004 summer harvests were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). Both varieties presented β-carotene (265.5 – 1669.4 μg/100g), lutein (37.6 – 100.7 μg/100g), β-cryptoxanthin (16.3 – 56.5 μg/100g) and α-carotene (7.8 – 59.3 μg/100g) as the major carotenoids. In both harvests, the β-carotene, β-cryptoxanthin and α-carotene levels were significantly higher in the Olivier variety, whereas the lutein content was higher in the Waldy Cati variety. The two acerola varieties showed similar anthocyanin composition, being cyanidin-3-rhamnoside the major anthocyanin, followed by pelargonidin-3-rhamnoside, cyanidin-3,5-di-rhamnoside and peonidin-3-rhamnoside. The Waldy variety of acerola showed total anthocyanin content of 6.5 and 7.6 mg/100g, whilst 7.9 and 8.4 mg/100g were found in the Olivier variety, for the harvests 2003 and 2004, respectively. No statically differences for the total anthocyanin content were found between varieties and between harvests.

Two brand of frozen pulp of açai presented 282 to 303 mg/100 g of total anthocyanin, with cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-rutinoside being found in average proportions of 13.2% and 87.5%, respectively.

Acerola is considered one of the best natural source of ascorbic acid (AA) and due to this fact, the influence of AA on the stability of the acerola anthocyanin extract was evaluated using as comparison the açai anthocyanin extract which does not have AA. The experiments demonstrated that the 276 mg/100mL AA level present in the acerola anthocyanin extract is the major responsible for the intense anthocyanin degradation, since the degradation rate (k_{obs}) of the anthocyanins in the açai extract fortified with 276

mg/100mL AA, was 22 times higher than the k_{obs} found in the natural açai extract. Although the anthocyanic model-systems from both fruits had the same AA concentration (276 mg /100mL), the k_{obs} value observed in the acerola system was 3 times higher than that found for the açai solutions. This difference can be attributed to the 10 times higher flavonoid content found in the anthocyanin extract from açai, since the total polyphenol levels were similar in the systems from both fruits.

The viability to employ the anthocyanin extracts of acerola and açai as functional ingredient was evaluated in isotonic soft drink model-systems. In all conditions studied, the anthocyanin degradation followed a first order kinetics rate. The anthocyanin stability in the isotonic soft drink system was 1.3 e 1.7 times lower compared to the citrate-phosphate buffer for the acerola and açai extracts, respectively, at pH 2.5, in the presence of light and oxygen. In all systems, the gradual fading of the red color was observed by the incresead *L** values CIE parameter and decreased *C** values, probably resulted respectively from the degradation of the flavillium cation and formation of chalcones.

Using the stable radicals $ABTS^{\bullet+}$ and $DPPH^{\bullet}$, the radical scavenger activities of the acerola and açai anthocyanin extracts with different purification degrees were evaluated and compared to standards of anthocyanins and anthocyanidin. The crude (EB), partially purified (EPP) and purified (EP) extracts of acerola showed higher antioxidant activity than the respective extracts from açai. Since the radical scavenger activity of both crude extracts decreased with the purification process, the presence of polyphenols, flavonoids and AA in the anthocyanic crude extracts affected the antioxidant activity. The results obtained with the standards confirmed that the antioxidant activity increases with the increased number of OH groups in the B ring of the anthocyanins and that the activity decreases with the increased numbers of glycosilated sugars.

Studies concerning the reactivity of anthocyanin extracts towards singlet oxygen ($O_2(^1\Delta_g)$) were carried out using the EB, EPP and EP anthocyanin extracts from acerola and açai, dimethyl-anthracene as actinometer and methylene blue as sensitizer. The physical quenching constant (k_q) was determined by the sensitized photooxidation method and by the $O_2(^1\Delta_g)$ phosphorescence detection. The energy level of the excited triplet state of açai anthocyanins was determined by the time resolved photoacoustics (TRP) technique. It was observed a correlation between the increased purification degree and a decrease in the $O_2(^1\Delta_g)$ quenching. Among the standards evaluated, malvidin, cyanidin-3-rutinoside and cyanidin-3-glucoside, the malvidin was the best $O_2(^1\Delta_g)$ quencher, independently of the method used for k_q calculation. The experiments with TRP

demonstrated that the açai anthocyanin triplet state had a very short life time, indicating that the $O_2(^1\Delta_g)$ quenching does not occur *via* formation of the anthocyanin excited triplet state.

INTRODUÇÃO GERAL

Os pigmentos naturais, tais como antocianinas e carotenóides, presentes naturalmente em alimentos, ou utilizados como aditivos, proporcionam cor, contribuindo para seu aspecto visual, atributo que está diretamente relacionado à aceitação deste alimento pelos consumidores (Clydesdale, 1993). Tanto as antocianinas como os carotenóides têm sido relacionados a importantes funções e ações fisiológicas, podendo ser considerados promotores da saúde humana. A ingestão de frutas e vegetais está sendo associada com a diminuição do desenvolvimento de doenças crônico-degenerativas tais como câncer, inflamações, doenças cardiovasculares, catarata, degeneração macular entre outras (Kong et al., 2003; Krinsky, 1994). De forma geral as propriedades antioxidantes destes compostos parece ser a chave para a elucidação dos mecanismos envolvidos nestas ações.

Além dos danos oxidativos em sistemas biológicos, a exposição de alimentos e bebidas à luz pode levar a diminuição de sua qualidade, produzindo descoloração, formação de “off-flavour”, perda de nutrientes e formação de produtos de oxidação que são potencialmente tóxicos (Bekbölet, 1990). Leite e produtos lácteos em geral são sensíveis a luz devido às reações químicas foto-induzidas que envolvem a ativação do oxigênio com formação de radicais livres e oxigênio singlete, que por sua vez oxidam lipídeos e proteínas levando a formação de compostos voláteis e destruição das vitaminas A e D (Sattar e deMan, 1975; Aurand et al., 1977). Diversos trabalhos têm destacado a escolha de embalagens adequadas e a adição de antioxidantes específicos para evitar os processos oxidativos e manter a qualidade dos alimentos (Luby et al., 1986; Hong et al., 1995).

Tanto a acerola como o açaí possuem carotenóides e antocianinas, sendo que as antocianinas são os pigmentos responsáveis pela cor vermelha da acerola e roxa do açaí. O emprego dos extratos antociânicos de acerola e de açaí como corante e ingrediente funcional em alimentos e bebidas torna-se muito interessante devido ao crescimento do mercado de produtos alimentícios que fazem bem à saúde. Entretanto existem muitas limitações para a aplicação comercial de antocianinas em produtos alimentícios e bebidas, devido à baixa estabilidade desses pigmentos, a qual depende da própria estrutura química, concentração, pH, temperatura, presença de oxigênio, luz, ácido ascórbico, co-fatores e de açúcares, dentre outros fatores.

As antocianinas têm estrutura química adequada para atuar como antioxidante, pois podem doar hidrogênios ou elétrons aos radicais livres. A maior atividade antioxidante está relaciona com a presença de grupos hidroxílicos nas posições 3' e 4' do anel B, os quais conferem uma elevada estabilidade aos radicais formados (Cao et al., 1997). Os grupos hidroxílicos livres nas posições 3 e 5, juntamente com o grupo carbonílico na posição 4' são doadores de elétrons (Rice-Evans et al., 1996). Portanto as antocianinas são importantes *scavengers* de radicais livres. Também devido a sua estrutura química, as antocianinas podem se apresentar como desativadores de oxigênio singlete.

Referências Bibliográficas

Aurand, L. W.; Boone, N. H.; Giddings, G. G. Superoxide and singlet oxygen in milk lipid peroxidation. *J. Dairy Sci*., 60, 363-367, 1977.

Bekbolet, M. Light effects on food. *J. Food Prot*., 53, 430-440, 1990.

Cao, G.; Sofic, E.; Prior, R. L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relations ships. *Free Rad. Biol. Med*., 22, 749-760, 1997.

Clydesdale, F. M. Color as a factor in food choice. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.,* 33, 83-101, 1993.

Hong, C. M.; Wendorff, W. L.; Bradley, Jr. R. L. Factors affecting light-induced pink discoloration of annatto-colored cheese. *J. Food Sci*., 60, 94-97, 1995.

Kong, J. M.; Chia, L. S.; Goh, N. K.; Chia, T. F.; Brouillard, R.Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 64, 92-933, 2003.

Krinsky, N. I. The biological properties of carotenóides. *Pure Appl. Chem*., 66, 1003-1010, 1994.

Luby, J. M.; Gray, J. I.; Harte, B. R.; Ryan, T. C. Photooxidation of cholesterol in butter. *J. Food Sci*., 51, 904-907, 1986.

Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Papaganda, G. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad. Biol. Med*., 20, 933-956, 1996.

Sattar, A.; deMan, J. M. Photooxidation of milk and milk products: A review. *Crit. Rev*. *Food Sci. Nutr*., 7, 13-37, 1975.

OBJETIVOS

Devido as notáveis características da acerola e do açaí como alimentos funcionais e as potencialidades dos extratos antociânicos no que se refere às propriedades anti-oxidantes. Os objetivos do presente trabalho foram:

1. Estabelecer a composição quali e quantitativa dos carotenóides de duas variedades de acerola.

2. Estabelecer a composição quali e quantitativa das antocianinas de duas variedades de acerola e da polpa congelada de açaí.

3. Avaliar a estabilidade do extrato bruto de antocianinas de acerola e de açaí em sistemas-modelo líquido ácido e simulador de bebida isotônica, sob atmosfera de oxigênio e nitrogênio em presença/ausência de luz.

4. Estabelecer a contribuição do ácido ascórbico para a estabilidade das antocianinas de acerola.

5. Avaliar o efeito protetor dos extratos antociânicos de acerola e de açaí frente ao oxigênio singlete.

6. Avaliar as antocianinas como desativador de oxigênio singlete e determinar a energia de seu estado triplete excitado.

7. Determinar a atividade anti-radical livre dos extratos antociânicos de acerola e de açaí frente aos radicais ABTS e DPPH.

CAPÍTULO I

Revisão Bibliográfica

1. Acerola e Açaí

A acerola (*Malpighia emarginata* DC) é uma planta originária da América Central e sua difusão mundial foi iniciada pelos espanhóis durante o período de colonização. Devido a sua coloração atrativa, semelhante à cereja européia foi denominada "West Indian Cherry" (Couceiro, 1985 *apud* São José e Alves, 1995). Foi introduzida no Brasil na década de 50, a partir de Pernambuco, e em virtude da excelente adaptação ao solo e ao clima o cultivo expandiu-se por todo o país.

Existem inúmeros relatos relacionados à acerola, sendo denominada como *Malpighia glabra* e *Malpighia punicifolia*, no entanto segundo Asenjo (1980) estes nomes são sinônimos, mas aplica-se a espécies diferentes da acerola, sendo o nome correto *Malpighia emarginata* DC. Essa denominação foi adotada no Conselho Internacional de Recursos Genéticos Vegetais (IBPGR, 1986).

O cultivo da acerola em escala comercial foi motivado pela descoberta do elevado teor de vitamina C em seus frutos. De acordo com estimativa realizada pela Embrapa Mandioca e Fruticultura, o volume total de acerola produzida entre junho de 1994 e junho de 1997 foi de 150.000 toneladas, sendo 63% do total produzido em estados da região Nordeste (Oliveira & Soares Filho, 1998). Dados do Censo Agropecuário do IBGE indicaram que foram produzidas 32.990 toneladas de acerola em 1996 (www.ibge.gov.br). Existem estimativas que a produção possa aumentar em cinco vezes nos próximos anos devido ao melhoramento genético que vem sendo realizado através de novas variedades (Oliveira & Soares Filho, 1998). O consumo de acerola no mercado brasileiro entre junho de 1996 e junho de 1997 foi de 25.000 toneladas, sendo constituído em sua maioria de polpa congelada e suco pasteurizado (Oliveira & Soares Filho, 1998).

O açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) é uma fruta cuja planta é uma palmeira tropical que se desenvolve no norte do Brasil, mais precisamente na região amazônica. Os frutos são pequenos e roxos, de onde é obtido o extrato com adição de água e agitação, empregado na elaboração de uma polpa (Bobbio *et al*., 2002).

O açaí é um recurso florestal não-madeireiro e os açaizais localizados na região do Estuário Amazônico são utilizados para extração do palmito e produção de frutos. A divulgação das propriedades nutritivas dessa fruta e o novo hábito de consumo de sua polpa em outras regiões do Brasil estão possibilitando a abertura de novos mercados com uma crescente demanda para polpa do açaí (www.mct.gov.br – Programa Piloto para Proteção das Florestas Tropicais do Brasil).

O estado do Pará responde por 95% da produção nacional de açaí, calculada em 130 mil toneladas por ano, segundo a Secretaria da Agricultura do Estado. Apenas na cidade de Belém são consumidas 180 toneladas/dia de açaí. Recentemente, conquistou adeptos em todas as regiões, em função de suas qualidades energéticas. No Rio de Janeiro, o mercado atinge 500 toneladas por mês, principalmente no verão, enquanto que em São Paulo, os números são mais modestos (150 toneladas/mês) (Revista Globo Rural, 2000).

2. Pigmentos em Acerola e Açaí

Tanto a acerola quanto o açaí apresentam carotenóides e antocianinas em sua composição de pigmentos; a acerola apresenta os carotenóides como classe de pigmentos predominante, e no açaí as antocianinas são responsáveis pela cor roxa da fruta.

2.1 Carotenóides e Antocianinas em Acerola

Cavalcante & Rodriguez-Amaya (1992) detectaram, em níveis maiores que 0,04μg/g, somente três carotenóides em acerola no estádio maduro: α-caroteno (traços a 0,1 μg/g), β-caroteno (4,0 a 25,8 μg/g) e β-criptoxantina (0,5 a 3,6 μg/g), sendo que os níveis mais altos foram encontrados em frutas provenientes de Pernambuco, enquanto que os mais baixos foram reportados em frutas cultivadas em São Paulo. Godoy & Rodriguez-Amaya (1994) encontraram estes mesmos carotenóides em acerola *in natura* proveniente do estado de São Paulo, que apresentaram as seguintes concentrações: α-caroteno (traços), β-caroteno (3,4 ± 0,2 μg/g) e β-criptoxantina (0,4 ± 0,1 μg/g).

Porcu & Rodriguez-Amaya (2003) detectaram os carotenóides neoxantina, violaxantina, luteína, β-criptoxantina, α-caroteno e β-caroteno em acerola madura e semi-madura. Os maiores níveis foram determinados para o β-caroteno em acerola madura com película (12 ± 2 μg/g) e sem película (9 ± 2 μg/g), enquanto na acerola semi-madura os teores de β-caroteno foram significativamente menores (5 ± 1 μg/g). No entanto os teores mais elevados de luteína foram obtidos em frutos semi-maduros (2 ± 1 μg/g), enquanto nos frutos maduros os teores foram menores (1 ± 1 μg/g). Azevedo-Meleiro & Rodriguez-Amaya (2004) identificaram os carotenóides neoxantina, violaxantina, β-criptoxantina, α-caroteno, cis-β-caroteno e β-caroteno em um lote de acerola obtida no comércio de Campinas - São Paulo - Brasil, através de cromatografia líquida de alta

eficiência–detector de arranjo de diodos–detector de espectrometria de massas (CLAE-DAD-EM), características espectrofotométricas no UV-Vis e reações químicas. Em três lotes de acerola proveniente de Itajaí - Santa Catarina - Brasil, os carotenóides majoritários encontrados foram β-caroteno (100,2 – 783,4 μg/100g), β-criptoxantina (16,4 – 417,5 μg/100g), luteína (78,2 – 144,7 μg/100g) e violaxantina (17,6 – 395,3 μg/100g), sendo o menor nível verificado nas frutas imaturas e o maior nível em frutas maduras (Mezadri *et al*., 2005).

Lima *et al.* (2005) determinaram o conteúdo de polifenóis totais e carotenóides totais em acerola em três estágios de maturação em duas estações diferentes. Os polifenóis totais foram quantificados em termos de equivalente de catequina, e os níveis no estágio maduro variaram de 896 a 1888 mg/100g (estação seca) e de 841 a 1653 mg/100g (estação de chuvas). Os teores de carotenóides totais foram quantificados em termos de equivalente de β-caroteno, e variaram entre 9,4 e 30,9 μg/g (estação seca) e de 14,1 a 40,6 μg/g (estação de chuvas), no estágio maduro.

Silva (1999) identificou as agliconas cianidina, pelargonidina e malvidina em diferentes acerolas cultivadas no Brasil; no entanto a presença dos açúcares e ácidos não foi investigada. Santini & Huyke (1956) identificaram malvidina-3,5-diglucosídeo como a antocianina responsável pela cor vermelha da acerola em acerola proveniente de Porto Rico.

Musser (2001) caracterizou vários genótipos de acerola do Banco de Germoplasma da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), quanto às características fito-químicas. Os níveis de ácido ascórbico (AA) variaram entre 1247,10 e 1845,79 mg/100g, o total de antocianinas variou de 3,81 a 47,4 mg/100 g e o total de flavonóides entre 7,0 e 18,5 mg de quercetina/g de polpa.

Vendramini & Trugo (2004) determinaram a composição qualitativa dos compostos fenólicos em acerola proveniente do Rio de Janeiro – Brasil, através de CLAE-UV/Vis, sendo que os compostos separados foram divididos em dois grupos: 1) compostos fenólicos antociânicos identificados como malvidina-3,5-diglicosilada, cianidina-3-monoglicosilada e pelargonidina; 2) compostos fenólicos não antociânicos identificados como ácidos fenólicos (ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido coumárico e ácido ferúlico) e como flavonóides (quercetina e Caempferol).

Hanamura *et al* (2005) estabeleceram a caracterização de polifenóis isolados da acerola proveniente de Recife–Pernambuco-Brasil, empregando a técnica de ressonância magnética nuclear (RMN). Foram identificadas apenas as duas antocianinas majoritárias,

a cianidina-3-α-*O*-ramnosídeo e a pelargonidina-3-α-*O*-ramnosídeo, além de um flavonóide não antociânico, a quercetina-3-α-*O*-ramnosídeo.

2.2 Carotenóides e Antocianinas em Açaí

O β-caroteno (112 – 165 µg/100g), a luteína (86 – 105 µg/100g) e o α-caroteno (25 – 43 µg/100g) foram os carotenóides majoritários identificados em três lotes de polpa de açaí congelada adquirida em São Paulo. Não foi verificada diferença significativa entre os teores dos carotenóides majoritários dos três lotes de polpa de açaí analisadas (De Rosso *et al*., 2005).

Gallori *et al.* (2004) determinaram o total de flavonóides antociânicos e não antociânicos em açaí proveniente do Brasil. Os teores reportados foram 0,5 e 3,5 mg/g em polpa liofilizada, para antocianinas e flavonóides respectivamente. Del Pozo-Insfran *et al.* (2004) reportaram a presença de 16 polifenóis em açaí proveniente da Colômbia, dentre eles foram identificadas e quantificadas duas antocianinas, cianidina-3-glucosídeo (1040 mg/L) e pelargonidina-3-glucosídeo (74,4 mg/L). Lichtenthäler *et al*. (2005) determinaram os teores de antocianinas em polpas não comerciais brasileiras de açaí, sendo que estes variaram entre 13 e 456 mg/L, enquanto Bobbio *et al.* (2000) quantificaram o teor de antocianinas em casca de açaí como sendo 263 mg/100g.

Bobbio *et al*. (2000) identificaram as antocianinas cianidina-3-arabinosídeo e cianidina-3-arabinosil-arabinosídeo em polpa de açaí congelada adquirida no comércio de Campinas–São Paulo-Brasil, através de características espectrofotométricas, provas químicas (hidrólise ácida, co-cromatografia de açúcares, deslocamento batocrômico pela adição de $AlCl_3$) e ordem de eluição cromatográfica (papel e CLAE), enquanto que Del Pozo-Insfran *et al*. (2004) identificaram as antocianinas como sendo cianidina-3-glucosídeo e pelargonidina-3-glucosídeo em polpa de açaí congelada da companhia Amazon Energy LLC da Colômbia, através de CLAE-DAD e hidrólise acida. Por outro lado, Gallori *et al*. (2004) identificaram as antocianinas cianidina-3-glucosídeo e cianidina-3-rutinosídeo através de CLAE-DAD-EM em frutos de açaí despolpados e liofilizados adquiridos no mercado em Belém–Pará-Brasil. Utilizando CLAE-EM Lichtenthäler *et al*. (2005) identificaram as antocianinas cianidina-3-glucosídeo, cianidina-3-rutinosídeo e peonidina-3-rutinosídeo em polpa de açaí congelada não comercial, proveniente de Aura–Pará-Brasil e polpa congelada comercial, obtida em Campinas–São Paulo-Brasil.

3. Estabilidade de antocianinas

As antocianinas pertencem à classe dos flavonóides. Sua unidade estrutural básica é o cátion flavílio que apresenta 15 carbonos, e que se encontra sempre glicosilado. As antocianinas diferem entre si pelo número de grupos hidroxilas e pelo grau de metilação desses grupos presentes na aglicona, pela natureza e número de açúcares e de ácidos ligados nos açúcares. As antocianinas são encontradas em todas as partes das plantas especialmente em flores e frutos sendo responsáveis por sua coloração atrativa (Harborne, 1967).

Existem muitas limitações para o emprego comercial de antocianinas em produtos alimentícios devido à sua baixa estabilidade que está relacionada à complexidade da estrutura química, concentração, composição do meio (pH, formas monoméricas/poliméricas, presença de flavonóides, ácido ascórbico, metais e radicais livres), e condições ambientais (temperatura, oxigênio e luz).

As substituições presentes no íon flavílio tais como grupos hidroxila, metoxila, açúcares e ácidos ligados aos açúcares, têm efeito marcante na intensidade da cor e na estabilidade destes pigmentos. As antocianinas de estruturas mais complexas são relativamente mais resistentes ao efeito do calor e luz, quando comparadas às antocianinas não aciladas (Furtado *et al*., 1993; Houbiers, 1998).

A influência do pH sobre a cor e a estabilidade das antocianinas é bem conhecida, em solução aquosa há uma mistura de diversas estruturas em equilíbrio químico: cátion Flavílio (vermelho), base quinoidal (azul), pseudobase carbinol (incolor) e chalcona (incolor). Em pH inferior a 2 as antocianinas apresentam-se basicamente na forma de cátion e a rápida desprotonação leva à forma quinoidal. A hidratação do cátion flavílio forma o hemiacetal, seguido da all-*trans*-chalcona que lentamente isomeriza para *cis*-chalcona. A quantidade relativa de cada forma do equilíbrio varia em função do pH e estrutura das antocianinas presentes (Houbiers, *et al*., 1998). A Figura 1 apresenta o esquema das transformações estruturais das antocianinas em solução aquosa.

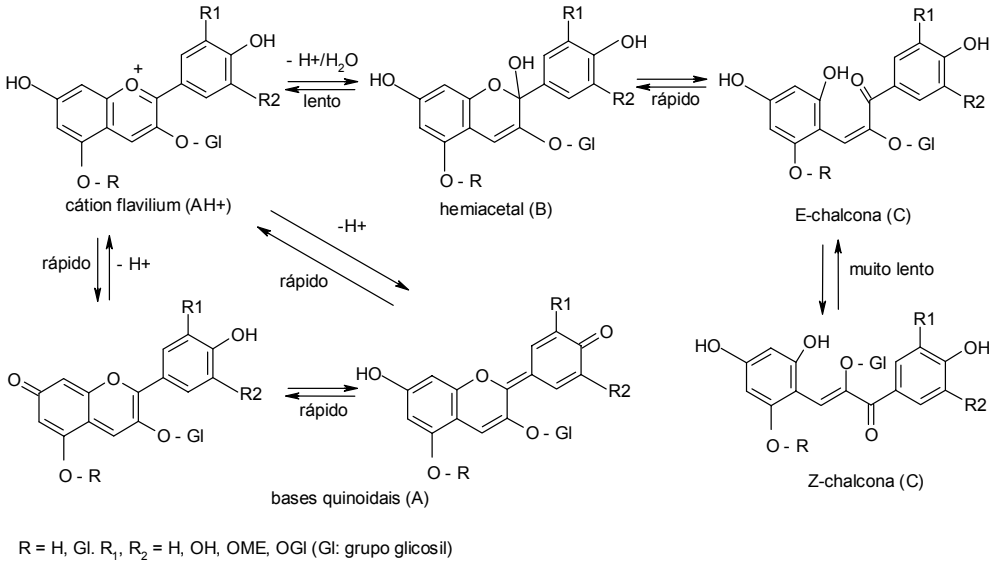


Figura 1. Transformações estruturais das antocianinas em solução aquosa (Houbiers *et al*., 1998).

A Tabela 1 apresenta alguns estudos sobre degradação de antocianinas em sistema-modelo líquido, em todos os estudos citados observou-se cinética de degradação de antocianinas de primeira ordem.

Tabela 1. Dados cinéticos de degradação de antocianinas em sistemas-modelo líquidos.

antocianinas e antocianidinas	sistema-modelo	condições experimentais	constante de velocidade (h^{-1})	referência
delfinidina	água, 25°C, ar	pH 1,0	$9,0 \times 10^{-3}$	Furtado *et al.* (1993)
		pH 2,8	2,4	
malvidina		pH 1,0	$3,6 \times 10^{-3}$	
		pH 3,1	3,0	
laranja vermelha	tampão citrato-fosfato + EPP, 80ºC, ar	pH 2,5	$5,3 \times 10^{-2}$	Katsaboxakis *et al*. (1998)
		pH 3,0	$9,3 \times 10^{-2}$	
		pH 3,5	$1,0 \times 10^{-1}$	
		pH 4,0	$1,1 \times 10^{-1}$	
		pH 4,5	$1,9 \times 10^{-1}$	
folhas de *Acalipha híspida*	tampão citrato–fosfato + EB, 21°C, pH 2,5	escuro com N_2	$0,25 \times 10^{-3}$	Bailoni *et al.* (1999)
		luz com N_2	$0,96 \times 10^{-3}$	
		luz com N_2	$1,56 \times 10^{-3}$	
	EB + ác. tânico, 21ºC, pH 2,5	luz com ar	$0,63 \times 10^{-3}$	
malvidina 3-arabinosídeo de uva	tampão citrato-fosfato + EB, 23°C	pH 2,2 com luz	$5,0 \times 10^{-3}$	Oliveira (2001)
		pH 2,2 sem luz	$5,0 \times 10^{-4}$	
		pH 3,0 com luz	$5,6 \times 10^{-3}$	
		pH 3,0 sem luz	$7,0 \times 10^{-4}$	
	EB + ác. tânico	pH 2,2 com luz	$2,1 \times 10^{-3}$	
		pH 3,0 com luz	$4,6 \times 10^{-3}$	
	EPP	pH 2,2 com luz	$8,5 \times 10^{-3}$	
		pH 2,2 sem luz	$7,0 \times 10^{-4}$	
		pH 3,0 com luz	$6,6 \times 10^{-3}$	
		pH 3,0 sem luz	$1,1 \times 10^{-4}$	
repolho roxo	tampão citrato-fosfato + EB, 25ºC, ar	pH 3,0	$3,6 \times 10^{-3}$	Dyrby *et al.* (2001)
	bebida não carbonatada + EB, 25ºC, ar	pH 3,0	$2,4 \times 10^{-3}$	

EB- Extrato Bruto, EPP- Extrato Parcialmente Purificado

A incidência de luz foi o fator que mais contribuiu para a degradação da cor das antocianinas, e a associação luz-oxigênio favoreceu ainda mais esta degradação (Bailoni *et al.*, 1999; Oliveira, 2001). Como esperado, a constante de velocidade de degradação foi maior para extratos purificados quando comparados com os extratos brutos de antocianinas (Bailoni *et al.* 1999; Oliveira, 2001). Os extratos purificados apresentam velocidade de degradação maior, pois na etapa de purificação, mesmo que parcial, são removidos parte dos flavonóides, além de ácidos orgânicos que atuam como co-pigmentos estabilizando as antocianinas.

A cinética de degradação das antocianinas de suco de acerola foi determinada como de primeira ordem entre 70-90ºC sob atmosfera de O_2 e N_2. A meia-vida das antocianinas do suco de acerola a 90ºC foi de 0,81 horas sob N_2 e de 0,55 horas sob O_2 (Chan & Yamamoto, 1994). Esta taxa de decomposição foi alta quando comparada com sucos de outras fontes, tal como de laranja vermelha (Katsaboxakis *et al.,* 1998) à mesma temperatura. A alta taxa de degradação pode estar relacionada com a instabilidade inata dos pigmentos de acerola ou com a alta concentração de ácido ascórbico, sendo esta última a causa mais provável segundo Chan & Yamamoto (1994).

A estabilidade dos extratos bruto e parcialmente purificado das antocianinas de açaí foi avaliada em sistema-modelo tampão citrato-fosfato a pH 2,2 e 3. Verificou-se que o extrato bruto foi 80 vezes mais estável que o parcialmente purificado em pH 2,2 e 24,3 vezes em pH 3. O tempo de meia-vida do extrato bruto em pH 2,2 foi de 301,2 horas, enquanto em pH 3 foi de 182,4 horas sob luz e atmosfera de ar (Bobbio *et al.*, 2002).

Abdel-Aal & Hucl (2003) estudaram a estabilidade das antocianinas de trigo roxo que apresenta a cianidina-3-glucosídeo como antocianina majoritária (41%). Foram realizados 351 tratamentos para estudar o efeito da temperatura (65, 80 e 95 ºC), pH (1, 3 e 5), concentração de SO_2 (0, 500, 1000, 2000 e 3000 ppm) e tempo (0, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas) e a interação entre estes fatores. Os resultados demonstraram que essas antocianinas são mais termicamente estáveis a pH 1 e sua degradação foi ligeiramente menor em pH 3 do que em pH 5. Verificaram também que o aumento da temperatura de 65 para 95ºC aumentou a degradação destes pigmentos. A adição de SO_2 durante o aquecimento teve o efeito de estabilizar as antocianinas, sendo a concentração ideal entre 500-1000 ppm para o trigo inteiro e 1000-3000 ppm para as antocianinas isoladas.

Kirca & Cemeroglu (2003) verificaram a estabilidade térmica (70, 80 e 90ºC) e sob estocagem (5, 20 e 37ºC) das antocianinas de suco de laranja vermelha na forma diluída e concentrada. Os resultados apontaram que a degradação das antocianinas foi de

primeira ordem. A meia-vida das antocianinas submetidas ao tratamento térmico variou de 6,3 horas (70ºC) a 1,5 horas (90ºC) em sucos com 11,2 º Brix, de 3,4 a 0,7 horas em sucos com 45 ºBrix e de 2,0 a 0,4 horas em sucos com 69 ºBrix. A meia-vida das antocianinas dos sucos estocados foi de 55,7 dias a 5 ºC e 2,1 dias a 37º C em sucos com 45 ºBrix, enquanto que em sucos com 69 ºBrix os tempos de meia-vida foram de 116 a 3,1 dias a 5 e 37ºC, respectivamente. Os autores não discutiram a influência do valor de sólidos solúveis na degradação das antocianinas.

3.1 Influência da presença de ácido ascórbico

A fortificação de sucos com ácido ascórbico (AA) é uma prática comum na indústria de alimentos para proteger contra a oxidação e promover um aumento do valor nutricional. Contudo, a combinação entre antocianinas e AA pode ser mutuamente destrutiva em presença de oxigênio, o que limita a fortificação de alimentos contendo antocianinas (Talcott *et al*., 2003). O mecanismo proposto para a degradação de antocianinas em presença de AA por Jurd (1972) e reforçado mais tarde por Poein-Langston & Wrolstad (1981) consiste na condensação direta, do AA no carbono 4 da antocianina causando perda de ambos. Por outro lado, de acordo com Iacobucci & Sweeny (1983) a perda de cor das antocianinas pelo ácido ascórbico ocorre por clivagem oxidativa do anel pirílio, através de um mecanismo de radicais livres no qual o AA age como ativador do oxigênio molecular produzindo os radicais livres.

Devido à maior degradação de antocianinas de “cranberry” no sistema em que houve adição de AA, Shrinkhande & Francis (1974) sugeriram que a formação de subprodutos do AA e da degradação de carboidratos, como furfurais e outros aldeídos, acelerou a degradação de pigmentos. Neste estudo, o mecanismo de degradação foi proposto como uma reação de condensação entre o furfural e grupos hidroxil do anel B das antocianinas, levando à polimerização e formação de compostos marrons. A presença de flavonol como co-fator exerceu um efeito protetor quanto à degradação de antocianinas em presença de AA, pois provavelmente compete com as antocianinas na preferência pelas reações de condensação (Shrinkhande & Francis, 1974).

A adição de AA ao xarope de morango na mesma concentração encontrada naturalmente no xarope de groselha teve um efeito negativo na estabilidade das antocianinas do xarope de morango durante estocagem no escuro a 20 ºC, que também foi verificada pela diminuição dos parâmetros de cor a* e hue (Skrede *et al*., 1992). Estes autores sugeriram a condensação entre AA e antocianinas como reação inicial.

A degradação de malvidina-3,5-diglicosídeo e de malvidina-3-glucosídeo foi mais rápida nos sistemas contendo AA (33 mg/100 mL) no início do experimento (até o 9º dia), porém após 10 dias a degradação foi semelhante ao sistema sem AA (García-Viguera & Bridle, 1999). Segundo estes autores é mais provável que a degradação de antocianinas induzida por AA seja produzida pelo mecanismo de radicais livres.

Por outro lado, durante a estocagem a 25 ºC de sistema simulador de suco com antocianinas de uva, Brenes *et al*. (2005) também observaram um menor tempo de meia-vida (7 dias) no sistema adicionado de 45 mg/100mL de AA comparado ao controle ($t_{1/2}$= 20 dias). Estes autores verificaram que as perdas de antocianinas foram similares durante os 11 primeiros dias de experimentos nos sistemas com e sem adição de AA, entretanto ocorreu destruição acelerada de antocianinas após este período no sistema com AA.

Del Pozo-Insfran *et al.* (2004) avaliaram a estabilidade das antocianinas de açaí e de outras fontes em sistema-modelo líquido pH 3,5, com adição de AA (45 mg/100 mL) e sacarose (100 g/L) no escuro a 37ºC. A análise de regresso da degradação das antocianinas em sistema-modelo com e sem co-fatores naturais apresentaram cinética de primeira ordem. As antocianinas aciladas mostraram ser mais estáveis que as não aciladas, independentemente do conteúdo de ácido ascórbico. Os autores observaram que a presença de co-fatores é importante para o decréscimo da taxa de degradação das antocianinas. A degradação das antocianinas foi significativamente maior com a presença de AA ($t_{1/2}$=13 dias) quando comparado com o controle não fortificado ($t_{1/2}$ =385 dias).

Diferentemente da maioria dos trabalhos, a degradação de antocianinas no sistema-modelo refrigerado estudado por Choi *et al.* (2002) seguiu um modelo cinético linear de ordem zero. Verificou-se uma taxa de degradação de 3,7% por semana para o suco fortificado com AA e de 3,4% para o suco sem adição. Choi *et al.* (2002) sugeriram que a temperaturas maiores que as de refrigeração, como as utilizadas nos demais trabalhos, a oxidação gradativa do ácido ascórbico pode ser acelerada e os produtos de degradação muito reativos provavelmente também interagem com as antocianinas.

Diferentemente de todos os estudos citados acima, a degradação das antocianinas diminuiu com a adição de AA durante a estocagem de suco de “elderberry” a 40 ºC, na presença e ausência de oxigênio (Kaack & Austed ,1998).

3.2 Estabilidade da cor das antocianinas

A cor é um fenômeno físico-sensorial que está diretamente relacionado ao objeto em questão ou pigmento, à fonte iluminadora e ao observador. Para a descrição detalhada da coloração de um objeto, é necessária a análise de três atributos da cor: a sua tonalidade (vermelha, verde, azul, etc), luminosidade (clara e escura) e saturação (pureza da cor). O acompanhamento das alterações da cor através das medidas colorimétricas torna-se importante porque estão livres de erros inerentes às interpretações visuais, como o efeito da mudança de fonte e de observador.

De acordo com Gonnet (1998), as medidas de cor em escala CIELAB são mais adequadas para se verificar diferenças de cor entre soluções antociânicas com ou sem a presença de co-pigmentos, do que apenas as medidas de diferenças de comprimento de onda de absorção máxima e absorbância. Os valores de L^* correspondem à luminosidade e a^* e b^* são valores de coordenadas de cor, sendo a* referente ao eixo que vai do verde ($-a^*$) ao vermelho ($+a^*$) e b* ao eixo que vai do azul ($-b^*$) ao amarelo ($+b^*$). Os valores de C^* (chroma) se referem à saturação da cor e h (hue angle) ao ângulo de tonalidade da cor que é um valor expresso em graus. O valor de h igual a 0º equivale ao vermelho (a^*), 90º ao amarelo (b^*), 180º ao verde ($-a^*$) e 270º ao azul ($-b^*$). O valor de ΔE^* se refere à diferença total de cor.

Heredia *et al*. (1998) determinaram os parâmetros de cor em soluções dos padrões de delfinidina-3-glucosídeo, cianidina-3-glucosídeo, petunidina-3-glucosídeo, peonidina-3-glucosídeo e malvidina-3-glucosídeo em pH 1,5 e 3,5. Os autores correlacionaram os valores dos parâmetros de cor das diferentes antocianinas com as características estruturais dessas antocianinas. Os valores de a^* e b^* no diagrama indicaram o número de hidroxilas e metoxilas no anel B, ou seja, as antocianinas peonidina e cianidina localizaram-se no quadrante laranja (2 substituintes no anel B), enquanto a delfinidina, petunidina e malvidina localizaram-se no quadrante vermelho-púrpura (3 substituintes no anel B). O valor de h foi influenciado pelo número de metoxilas na estrutura, assim como o valor de C^* indicou o número de grupos hidroxílicos no anel B. Os valores de ΔE^*_{ab} variaram entre 8 e 35 unidades indicando que as diferentes antocianinas podem ser discriminadas visualmente, segundo Melgosa *et al*. (1997).

Torskangerpoll & Andersen (2005) avaliaram a estabilidade da cor de três antocianinas diferentes: cianidina-3-glucosídeo, cianidina-3-(2”-glucosilglucosídeo)-5-glucosídeo e cianidina-3-(2”-(2”-sinapoil-glucosil)-6”-sinapoil-glucosídeo)-5-glucosídeo, nas concentrações de 0,05 mM e 0,15 mM, em diversos valores de pH (entre 1,1 e 10,5),

durante 98 dias a 10 ºC. Os valores dos parâmetros de cor foram influenciados principalmente pelo pH e pela estrutura das antocianinas. As antocianinas com maior número de grupos acilados apresentaram maior estabilidade durante os 98 dias, indicada pelos valores de *L**, *a** e *b**. As soluções com concentração de 0,15 mM foram mais estáveis que as soluções com concentração de 0,05 mM, fato este verificado pelos valores de *C** que tiveram uma menor diminuição nas soluções concentradas. Não foi estabelecida a cinética da estabilidade em termos de absorbância, e não foram reportados os valores de ΔE^* para que se pudesse obter os dados de variação global de cor percebida a olho nu durante os 98 dias.

Stintzing *et al*. (2002) avaliaram o efeito do pH nos parâmetros de cor em diferentes antocianinas isoladas e em extratos de blackberry, elderberry, black carrot, repolho roxo e batata-doce. Os resultados demonstraram que quando o pH variou entre 0,45, 3,5 e 6,6 os valores de *L**, *C** e *h* não apresentaram diferenças significativas. Esses resultados foram diferentes daqueles obtidos por Heredia *et al*. (1998) e Gonnet (2001) que verificaram aumento de *L** e diminuição de *a** à medida que o pH aumentou.

Garzón & Wrolstad (2002) observaram que os parâmetros de cor se alteraram ao longo do tempo de armazenamento (25 dias) de sucos diluídos e concentrados de morango. A perda da cor vermelha foi evidenciada pelo aumento do ângulo hue, indicando a mudança da cor vermelha para laranja. Também foi verificada a diminuição de *C** e o aumento de *L**.

A estabilidade da cor de soluções das antocianinas malvidina-3-glucosídeo e malvidina-3,5-diglucosídeo na ausência e presença de ácido ascórbico (AA) foi determinada por García-Viguera & Bridle (1999). O efeito da adição de AA (33 mg/100mL) nos parâmetros *L**, *a**, *b**, *C** e hue foi menor que o efeito da estrutura química da antocianina estudada, isto é, o aumento de *L** foi mais pronunciado na malvidina-3-glucosídeo do que na malvidina-3,5-diglucosídeo. Houve um incremento de 18° no ângulo hue para a solução de malvidina-3-glucosídeo na presença de AA, que pode ser devido ao aparecimento de compostos de cor amarela e marrom.

Brenes *et al.* (2005) observaram variações significativas nos parâmetros de cor em escala CIE durante o estudo de estabilidade de antocianinas de uva adicionadas de ácido ascórbico. Foi verificado um efeito negativo na cor causado pela fortificação, levando a um incremento em *L** e diminuição da cor vermelha (diminuição de *a**).

A adição de AA ao xarope de morango na mesma concentração encontrada naturalmente no xarope de groselha teve um efeito negativo na estabilidade das

antocianinas do xarope de morango durante a estocagem no escuro a 20°C, que também foi verificada pela diminuição de a^* e aumento do ângulo hue (Skrede *et al*., 1992).

Rababah *et al*. (2005) determinaram os parâmetros de cor *L**, *a** e *b** em extratos de diferentes frutas em ausência e presença de AA (0,1%). A adição de AA levou ao incremento dos valores de *L** e diminuição de *a** e *b** em todos os extratos das frutas analisadas (morango, maça e pêssego).

Choi *et al*. (2002) elaboraram um sistema-modelo constituído por suco de laranja vermelha reconstituído a pH 3,88, 8,3 °Brix, 53,1 mg/L de AA e 78,1 mg/L de antocianinas. Durante estocagem a 4,5°C por 7 semanas foi observada a diminuição da cor vermelha (*a**) e do croma, enquanto que os parâmetros *L**, *b** e ângulo hue tiveram seus valores aumentados.

3.3 Estabilização de Antocianinas

Considerando-se as colorações das antocianinas puras em função do pH, nota-se que somente a diferença entre os substituintes não explica satisfatoriamente a enorme variedade de cores associadas à presença destes pigmentos em tecidos vegetais. Um dos efeitos que explicam a grande variedade de cores das antocianinas é a co-pigmentação, fenômeno no qual a presença de outros compostos provoca deslocamento batocrômico e aumento da absorção da luz no visível (Asen *et al*., 1972; Osawa, 1982) através de interações hidrofóbicas entre os anéis aromáticos (Goto, 1987).

Quando a intensificação da cor ocorre devido à presença de co-pigmentos como flavonóides, polifenóis, aminoácidos e ácidos orgânicos, o fenômeno é conhecido como co-pigmentação intermolecular. Na co-pigmentação intramolecular a cor é estabilizada pela presença de dois ou mais grupos aromáticos acilados ligados à molécula de antocianina (Figueiredo *et al*., 1999).

A auto-associação é outro fenômeno associado com a intensificação da cor e a estabilização das antocianinas. Ocorre entre as formas coloridas das moléculas de antocianinas, o íon Flavílio e a base quinoidal, evitando o ataque nucleofílico da água que leva a degradação (Houbiers, *et al*., 1998). Hoshino (1992) demonstrou a auto-associação entre o cátion Flavílio e a base quinoidal através de medidas de RMN e dicroismo circular, e propôs o modelo de sobreposição vertical destas estruturas através da interação hidrofóbica entre os anéis aromáticos.

Miniati *et al*. (1992) estudaram misturas contendo 3,5-diglucosídeos de cianidina, pelargonidina e malvidina com adição de ácido gálico, quercetina e catequina a pH 2,5,

3,5 e 4,0 para determinar a intensificação da cor e a estabilidade das antocianinas em solução aquosa e em 10% de etanol por 120 dias a 5 e 25 ºC. Os resultados demonstraram que a auto-associação foi influenciada pela natureza do pigmento e ocorreu mais intensamente em pH 2,5, e a co-pigmentação foi afetada pelo tipo e concentração do co-pigmento e pela temperatura. O sistema mais estável foi o que continha quercetina e ácido gálico e o menos estável o que continha catequina.

Malien-Aubert *et al*. (2001) avaliaram o comportamento de algumas antocianinas de diversas fontes em sistema-modelo aquoso com e sem adição de açúcar em três valores de pH diferentes (3, 4 e 5) sob luz ou submetidas a diferentes temperaturas. Foi verificado que independentemente do pH, a estabilidade da cor dependeu das estruturas das antocianinas e da presença de compostos fenólicos sem cor. Extratos ricos em antocianinas aciladas (cenoura vermelha e repolho roxo) mostraram maior estabilidade, devido à co-pigmentação intramolecular, do que extratos ricos em antocianinas não aciladas (uva, groselha preta). Estes autores observaram que a adição de açúcar à solução do sistema-modelo não apresentou efeito significativo na estabilidade térmica e fotoquímica das antocianinas, e que tanto em pH 3 como em 5 apresentaram degradação levando à formação de compostos amarelos. No entanto este efeito foi mais intenso em pH 5.

4. Antocianinas como anti-oxidante

4.1 Espécies Reativas de Oxigênio e Radicais Livres

As espécies reativas de oxigênio incluindo os radicais superóxidos ($O_2^{\bullet -}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais hidroxil ($OH^{\bullet}$) e o oxigênio singlete ($^1O_2$) são gerados como subprodutos normais do metabolismo. O incremento dos níveis dessas espécies reativas de oxigênio ou radicais livres criam o estresse oxidativo, que podem levar a lesões bioquímicas e fisiológicas gerando danos oxidativos nos lipídeos, proteínas, ácidos nucléicos e eventualmente resultam na morte das células (Rice-Evans & Miller, 1996). Os danos oxidativos podem ser uma das causas que desencadeiam doenças degenerativas tais como câncer, doenças cardíacas, doenças inflamatórias, doença do sistema imunológico, disfunções neurológicas e cataratas. O consumo freqüente de frutas e vegetais tem sido associado com a baixa incidência destas doenças degenerativas, e esse efeito protetor tem sido relacionado com a presença de vários compostos antioxidantes presentes nestes alimentos. Dentre estes compostos pode-se destacar os

polifenóis que incluem os flavonóides antociânicos e não antociânicos (flavonóis, flavonas, isoflavonas, flavanonas, flavanóis e chalconas).

Além dos danos oxidativos em sistemas biológicos, a exposição à luz de alimentos e bebidas pode levar a diminuição de sua qualidade, produzindo descoloração, formação de "off-flavour", perda de nutrientes e formação de produtos de oxidação que são potencialmente tóxicos (Bekbölet, 1990). Leite e produtos lácteos em geral são sensíveis a luz devido às reações químicas foto-induzidas que envolvem a ativação do oxigênio com formação de radicais livres e oxigênio singlete, que por sua vez oxidam lipídeos e proteínas levando à formação de compostos voláteis e destruição das vitaminas A e D (Sattar e deMan, 1975; Aurand *et al*., 1977). Diversos trabalhos têm destacado a escolha de embalagens adequadas e a adição de antioxidantes específicos para evitar os processos oxidativos e manter a qualidade dos alimentos (Luby et al., 1986; Hong et al., 1995).

4.2 Desativação de Oxigênio Singlete

O oxigênio molecular em seu estado fundamental tem dois elétrons de valência desemparelhados em cada orbital antiligante π^*. Essa configuração eletrônica corresponde a um estado de multiplicidade de spin triplete, correspondente ao estado de energia fundamental da molécula. Quando os orbitais moleculares antiligantes π^* são ocupados com elétrons de número quântico opostos, são possíveis dois estados singletes de maior energia devido à repulsão eletrônica. Em um deles O_2 ($^1\Sigma_g^+$) os dois elétrons pareados ocupam o mesmo orbital molecular π^* e apresenta 37,5 kcal/mol a mais que o estado triplete fundamental, o outro estado O_2 ($^1\Delta_g$) apresenta os dois elétrons pareados por orbitail π^* e a energia é 22,5 kcal/mol maior que o estado fundamental. Devido à maior energia, o estado O_2 ($^1\Sigma_g^+$) relaxa em poucos nanosegundos ao estado O_2 ($^1\Delta_g$), o qual possui um tempo de vida entre micro a milisegundos dependendo do solvente e da presença de inibidores, já que a transição O_2 ($^1\Delta_g$) $\rightarrow$ O_2 ($^3\Sigma_g^-$) é proibida por spin.

Na figura 2 está apresentado o diagrama de energia potencial para a produção de oxigênio singlete.

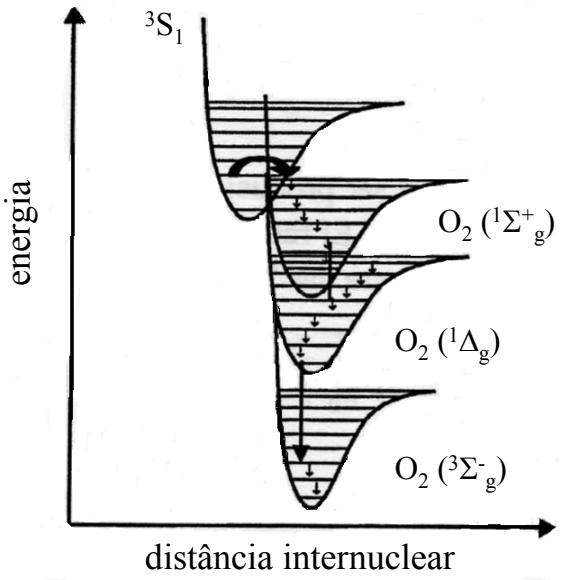


Figura 2. Diagrama de energia potencial para a produção de oxigênio singlete, por transferência de energia ( ), relaxamento vibracional (↓);conversão interna ( ) e fosforescência ( ).

O oxigênio singlete O_2 ($^1\Delta_g$) pode ser gerado de diversas formas, seja por processos físicos, químicos e fotoquímicos. Um destes processos chamado de foto-sensitização pode ocorrer intracelularmente ou em uma solução através de um mecanismo de transferência de energia a partir do estado eletrônico triplete excitado de uma molécula orgânica ou inorgânica, conhecida como sensitizador (S) para o oxigênio molecular O_2 (no estado eletrônico fundamental triplete - O_2 ($^3\Sigma^-_g$)). Este mecanismo, é conhecido como oxidação tipo II (Figura 3). Outro mecanismo, conhecido como tipo I consiste na formação de radicais livres através da desativação do sensitizador no estado eletrônico triplete excitado pela associação direta com outra molécula (Figura 3). Em sistemas biológicos, moléculas como clorofila, hematoporfirinas e riboflavina absorvem luz na região visível e atuam como sensitizadores para a produção de O_2 ($^1\Delta_g$). Vários corantes artificiais, tais como rosa de bengala e azul de metileno (MB), são capazes de cumprir eficientemente a mesma função.

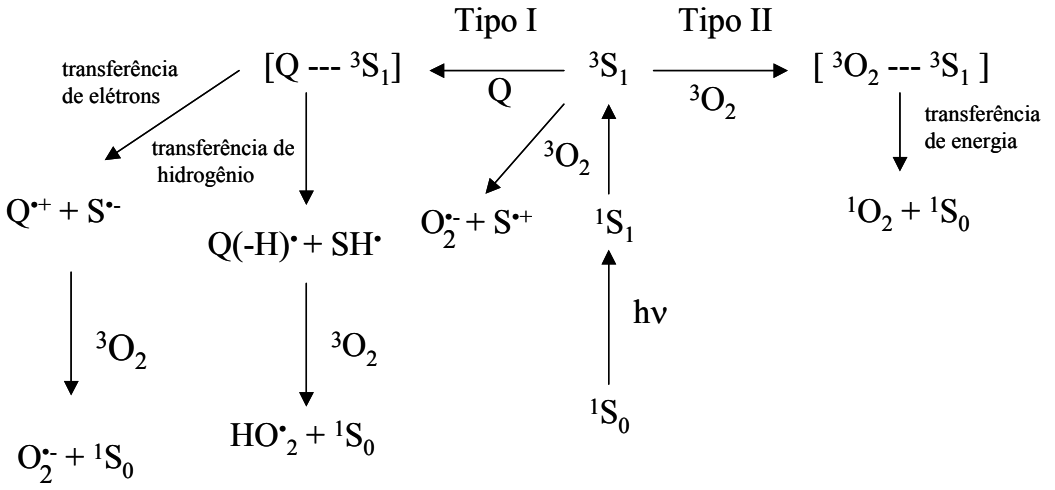


Figura 3. Esquema de mecanismos de foto-sensitização tipo I e tipo II.

A reação do tipo II envolve um processo de interação entre estados tripletes e por isso a reação é permitida por spin. A formação eficiente de O_2 ($^1\Delta_g$) depende da eficiência de formação de estados tripletes e da eficiência da desativação de estados tripletes por $O_2(^3\Sigma^-_g)$.

Na ausência de outros substratos no meio, o O_2 ($^1\Delta_g$) volta ao seu estado fundamental O_2 ($^3\Sigma^-_g$) mediante processos não radiativos e radiativos (esquema 1). Sendo k_d e k_p constantes de desativação física na forma de calor e luz, respectivamente.

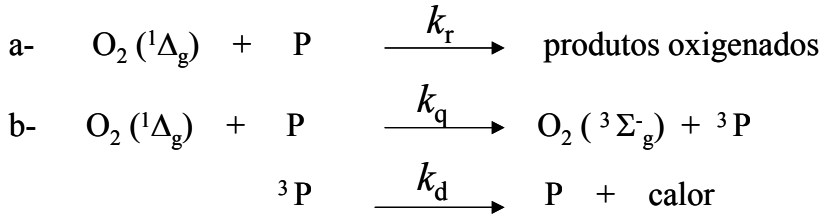
esquema 1:

$$O_2\,(^1\Delta_g) \xrightarrow{k_d} O_2\,(^3\Sigma_g^-) + \text{calor}$$

$$O_2\,(^1\Delta_g) \xrightarrow{k_p} O_2\,(^3\Sigma_g^-) + h\nu\,(1270\ \text{nm})$$

Na presença de algum pigmento (P), o O_2 ($^1\Delta_g$) gerado pode ser desativado via processo químico (esquema 2a), com formação de produtos de oxidação; ou mediante um processo físico de desativação, sem degradação do pigmento (esquema 2b), onde k_r é a contante de desativação química, k_q é a constante de desativação química do oxigênio singlete e k_d é a constante de desativação física do pigmento.

esquema 2:



Existem diversos métodos para a determinação de O_2 ($^1\Delta_g$), seja pela detecção da luz emitida (fosforescência) a 1270 nm quando este retorna ao estado fundamental, seja pela medida da absorção de energia, ou pela detecção de desativadores específicos (azida sódica, carotenóides). A técnica de "laser flash photolysis" é empregada para detectar se o sensitizador é desativado por oxigênio ou por substratos, determinando assim as respectivas velocidades de reação.

Os carotenóides são amplamente conhecidos como excelentes desativadores de O_2 ($^1\Delta_g$) (Mascio *et al*., 1989). O mecanismo de ação antioxidante do β-caroteno foi principalmente através de reações do tipo II (Ferrariliou *et al*., 1993) enquanto que a ação do flavonóide quercetina foi predominantemente do tipo I (Ferrariliou *et al*., 1993).

Os carotenóides apresentaram k_q variando de 5 a 31 x 10^9 M^{-1} s^{-1}, sendo o licopeno considerado o desativador mais eficiente (Mascio *et al.*, 1989). Montenegro *et al.* (2004) estabeleceram o quenching de oxigênio singlete da bixina em acetonitrila/metanol (1:1) como sendo 1,3 x 10^{10} $M^{-1}s^{-1}$.

Os valores da constante de desativação de O_2 ($^1\Delta_g$) (k_q) reportados para carotenóides e flavonóides confirmam que os carotenóides são desativadores de O_2 ($^1\Delta_g$) mais eficientes que os flavonóides. Segundo Tournaire *et al*. (1993), os flavonóides que não possuem a estrutura do catecol no anel B, por ex. Caempferol, naringenina, com k_q variando de 5 x 10^4 M^{-1} s^{-1} a 4,6 x 10^5 M^{-1} s^{-1} foram menos eficientes que catequina, rutina e quercetina (k_q de 1,5 a 5,8 x 10^6 M^{-1} s^{-1}).

Nagai *et al.* (2004) estabeleceram o quenching total do oxigênio singlete (k_t) de 7 flavonóides (flavona, flavonol, crisina, apigenina, rutina, quercetina e miricetina) em etanol a 35ºC. A miricetina e quercetina apresentaram os maiores valores de k_t, de 5,12 x 10^8 e 4,57 x 10^8 $M^{-1}s^{-1}$, respectivamente, seguidas da rutina (1,21 x 10^8 $M^{-1}s^{-1}$), apigenina (2,84 x 10^8 M^{-1} s^{-1}) e crisina (2,01 x 10^7 $M^{-1}s^{-1}$). A flavona e o flavonol apresentaram os menores valores de k_t, 3,0 x 10^5 e 5,3 x 10^6 $M^{-1}s^{-1}$, respectivamente. Esses resultados

demonstraram que o valor da constante de desativação aumentou à medida que aumentou o número de grupos OH presentes na estrutura do flavonóide, indicando que a existência de um grupo catecol ou pirogalol na estrutura do anel B é essencial para o quenching do O_2 ($^1\Delta_g$) dos flavonóides.

A constante de desativação física (k_q) do oxigênio singlete de ácidos hidroxinâmicos foi determinado por Foley *et al*. (1999) em acetonitrila e água deuterada (D_2O). A magnitude de k_q observado dependeu da natureza e número de grupos substituintes do composto e da polaridade do solvente. Em D_2O os valores de k_q variaram entre 4×10^7 e 4×10^6 $M^{-1}s^{-1}$ para o ácido cafeico e cumárico, respectivamente. Em acetonitrila, ocorre uma mudança no nível de transferência de energia, que se torna mais elevado e reflete em menor quenching de oxigênio singlete que foi quantificado como 5×10^6 $M^{-1}s^{-1}$ para o ácido cafeico.

4.2.1 Time-Resolved Photoacoustics

Um ponto crítico no mecanismo de proteção por substâncias anti-oxidantes deve-se ao fato de que a eficiência no processo de transferência de energia depende da energia triplete do composto desativador deve ser menor que a do $O_2(^1\Delta_g)$ que é de 94,2 kJ/mol. Deste modo, a determinação do estado da energia triplete destes compostos anti-oxidantes torna-se muito importante.

A técnica TRP tem sido amplamente empregada para determinação do nível de energia dos estados excitados de diferentes espécies em solução (Braslavsky & Heibel, 1992). Através desta técnica é possível determinar precisamente a geração de calor liberada em todo o processo de desativação não radioativa ocorrido na formação do estado triplete, via transferência de energia entre sistemas após absorção direta de luz ou por um mecanismo de transferência de energia foto-sensitizada, onde uma molécula sensitizada doadora de energia (S) absorve luz.

Uma vez que os carotenóides apresentam reduzido *quantum* de transferência de energia entre sistemas (Nielsen *et al.*, 1996), a formação do estado triplete tem sido somente avaliada através do mecanismo foto-sensitizado (Haley *et al.*, 1992). Haley *et al.* (1992) reportaram para β-caroteno um nível de energia do estado triplete de 85 kJ/mol, valor abaixo ao nível de energia do $O_2(^1\Delta_g)$ (94,2 kJ/mol) e um valor de 170 kJ/mol para o estado singlete do carotenóide.

Montenegro *et al*. (2004) estabeleceram o tempo de vida do estado triplete da bixina em acetonitrila/metanol (1:1) como τ_T = 24 μs. Maçanita *et al.* (2002) estabeleceram o

tempo de vida dos tripletes da malvidina-3-glucosídeo em solução aquosa em diferentes valores de pH, sendo que em pH 2,5 o tempo de vida do triplete foi τ_T = 13,3 ns, em pH 3,0 foi τ_T = 35 ns e em pH 3,5 foi τ_T = 79 ns.

4.3 Seqüestro de radicais livres

Os polifenóis são efetivos doadores de hidrogênio, particularmente os flavonóides. Seu potencial antioxidante é dependente do número e da posição dos grupos hidroxilícos e conjugações, assim como a presença de elétrons doadores do anel B devido à capacidade que esse anel aromático possui de suportar o despareamento de elétrons deslocalizados do sistema de elétrons π (Ramirez-Tortoza *et al*., 2001).

As antocianinas têm estrutura química adequada para atuar como antioxidantes, pois podem doar hidrogênios ou elétrons aos radicais livres. Uma ótima atividade antioxidante se relaciona com a presença de grupos hidroxílicos nas posições 3' e 4' do anel B, os quais conferem uma elevada estabilidade aos radicais formados (Cao *et al*., 1997). Os grupos hidroxílicos livres nas posições 3 e 5, juntamente com o grupo carbonílico na posição 4' são doadores de elétrons (Rice-Evans *et al*., 1996).

Kuskoski *et al*. (2004) determinaram através do método com o radical cátion $ABTS^{+\bullet}$ que a atividade antioxidante de diversos padrões de antocianinas e antocianidinas foi semelhante ou maior que a do Trolox, sendo que para a delfinidina e para a cianidina-3-glucosídeo a atividade antioxidante foi duas vezes superior a do Trolox.

Kahkonen & Heinonen (2003) reportaram que as antocianinas e antocianidinas apresentaram atividade antioxidante similar, quando comparadas com antioxidantes como ácido ascórbico, α-tocoferol e Trolox. Dentre as agliconas testadas, a delfinidina apresentou maior atividade, seguida pela cianidina e peonidina, e com menor atividade a pelargonidina, malvidina e petunidina. Comparando dentre as antocianinas monoglicosiladas, a cianidina, a delfinidina e a malvidina atuaram como suas respectivas agliconas, enquanto a peonidina e a pelargonidina apresentaram atividade menor que as suas respectivas agliconas. Já a petunidina-3-glucosídeo apresentou maior atividade que a petunidina. As antocianinas 3,5-diglicosiladas da cianidina e malvidina apresentaram atividade antioxidante significativamente menor que as correspondentes antocianinas monoglicosiladas.

Brand-Williams *et al*. (1995) e Sang *et al*. (2002) reportaram que os radicais $DPPH^{\bullet}$ reduzidos correspondem ao número de grupos OH livres do composto antioxidante. Contudo para compostos com taxa de reação menor os mecanismos são mais

complexos, devido a reações de dimerização entre os grupos OH dos compostos e a complexação entre radicais OH e $DPPH^{\bullet}$.

Leong & Shui (2002) estabeleceram a atividade antioxidante de 27 frutas procedentes do mercado de Singapura através dos métodos de $ABTS^{+\bullet}$ e $DPPH^{\bullet}$, também determinaram a contribuição do ácido ascórbico (AA) e estabeleceram a correlação entre os resultados obtidos pelos dois métodos. Os resultados foram expressos em termos de AEAC (capacidade antioxidante equivalente a ácido ascórbico) e as frutas foram classificadas em função do seu potencial antioxidante como: 1) extremamente elevado – atividade acima de 600 mg AA_{eq}/100g, 2) elevado – atividade entre 200 e 600 mg AA_{eq}/100g, 3) médio – atividade entre 70 e 200 mg AA_{eq}/100 g e 4) baixo – atividade abaixo de 70 mg AA_{eq}/100g. Os resultados obtidos através dos dois métodos foram muito semelhantes e estabeleceu-se uma correlação linear entre a concentração de $ABTS^{+\bullet}$ e $DPPH^{\bullet}$ reduzidos pela adição de AA. Este estudo demonstrou que 1 mol de AA reage com aproximadamente 2 moles dos radicais $ABTS^{+\bullet}$ e $DPPH^{\bullet}$.

A atividade antioxidante, medida como $ABTS^{+\bullet}$ dos extratos de quatro variedades de bayberry (*Myrica rubra*) foi de 6,49 e 6,52 mM Trolox/100g para as variedades Biji e Hunan, enquanto para as variedades Fenhong e Shuijing foi 1,32 e 1,31 mM Trolox/100g, respectivamente (Bao *et al*., 2005). Esses autores também estabeleceram a cinética de reação do $DPPH^{\bullet}$ na presença dos quatro extratos de bayberry e do Trolox. Todos os extratos apresentaram atividade anti radical, sendo a do $DPPH^{\bullet}$ muito maior que a do Trolox, mas não foram calculados os valores de k_{obs} e nem estabelecida a ordem da reação.

Chun *et al*. (2003) estabeleceram a contribuição individual de cada polifenol na capacidade antioxidante total. Os resultados demonstraram uma regressão linear entre a AEAC e a concentração dos compostos polifenólicos (ácido clorogênico, quercetina, quercetina-3-galactosídeo, quercetina-3-glucosídeo, quercetina-3-rutinosídeo, cianidina, cianidina-3-glucosídeo, cianidina-3-rutinosídeo, peonidina e peonidina-3-glucosídeo). O ácido clorogênico apresentou a menor atividade antioxidante dentre os 10 compostos estudados, enquanto a cianidina apresentou a maior atividade. Os derivados de cianidinas, cianidina-3-glucosídeo e cianidina-3-rutinosídeo mostraram uma diminuição na atividade antioxidante com a glicosilação.

Empregando o método de $DPPH^{\bullet}$, Gil *et al*. (2000) determinaram a atividade antioxidante do suco de “pomegranate” e a contribuição dos principais compostos fenólicos presentes no suco. O ácido gálico, com três grupamentos OH, apresentou

atividade superior à da cianidina-3-glucosídeo e à do ácido elágico, ambos apresentando 4 grupos OH. A maior contribuição para a atividade antioxidante total foi conferida pela punicalagina com 16 grupos OH.

Arena *et al.* (2001) reportaram que o ácido ascórbico presente na laranja vermelha contribuiu com aproximadamente 70% da atividade antioxidante determinada pelo método de $ABTS^{+\bullet}$ expresso em TEAC.

A utilização de soluções padrões (1 mmol/l) de antocianinas, ácido ascórbico, ácido sinápico, ácido ferrúlico e ácido cumárico por Arena *et al*. (2001) possibilitou o estabelecimento da contribuição de cada composto fenólico na atividade antioxidante total da laranja vermelha. A atividade antioxidante das soluções padrões foram 2,47 mmol/l TEAC para as antocianinas, 1,22 mmol/l TEAC para o ácido sinápico, 1,34 mmol/l TEAC para o ácido cafeico, 1,86 mmol/l TEAC para o ácido ferúlico e 1,73 mmol/l TEAC para o ácido cumárico.

5. Referências Bibliográficas

Abdel-Aal, E.; Hucl, P. Composition and stability of anthocyanins in blue-grained wheat. *J. Agric. Food Chem*., 51, 2174-2180, 2003.

Arena, E.; Fallico, B.; Maccarone, E. Evaluation of antioxidant capacity of blood orange juices as influenced by constituintes, concentration process and storage. *Food Chem*., 74, 423-427, 2001.

Asen, S.; Stewart,K. H.; Norris, K. H. Pigmentation of anthocyanins in plant tissues and its effect on color. *Phytochemistry,* 11, 1139-1144, 1972.

Asenjo, C. F. Acerola. In São José, A. B. & Alves, R. E. *Acerola no Brasil: produção e mercado*. Vitória da Conquista, Bahia: Il. Graf. Tab., 1995.

Aurand, L. W.; Boone, N. H.; Giddings, G. G. Superoxide and singlet oxygen in milk lipid peroxidation. *J. Dairy Sci*., 60, 363-367, 1977.

Azevedo-Meleiro, C. H.; Rodriguez-Amaya, D. B. Confirmation of identify of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS. *J. Food Comp. Anal*., 17, 385-396, 2004.

Bailoni, M.; Bobbio, P. A.; Bobbio, F. O. Stability of the anthocyanins from *Acalipha hispida* and copigmentation effects. *Acta Alimentaria* 28, 324-326, 1999.

Bao, J.; Cai, Y.; Sun, M.; Wang, G.; Corke, H. Anthocyanins, flavonols, and free radical scavenging activity of Chinese bayberry (*Myrica rubra*) exctracts and their color properties and stability. *J. Agric. Food Chem*., 53, 2337-2332, 2005.

Bekbolet, M. Light effects on food. *J. Food Prot*., 53, 430-440, 1990.

Bobbio, F. O.; Druzian, J. I.; Abrão, P. A.; Fadelli, S.; Bobbio, P. A. Identificação e quantificação das antocianinas do fruto do açaízeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 20 (3), 388-390, 2000.

Bobbio, F. O.; Bobbio, P. A.; Oliveira, P. A. Fadelli, S. Stability and stabilization of the anthocyanins from *Euterpe oleracea* Mart. *Acta Alimentaria*, 31, 371-377, 2002.

Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.-Wiss. Technol*., 28, 25-30, 1995.

Brenes, C. H.; Del Pozo-Insfran, D.; Talcott, S. T. Stability of copigmented anthocyanins and ascorbic acid in a grapes juice model system. *J. Agric. Food Chem*., 53, 49-56, 2005.

Braslavsky, S. E.; Heibel, G.E. Time-resolved photothermal and photoacoustic methods applied to photoinduced processes in solution. *Chem. Rev*., 92, 1381-1410, 1992.

Cavalcante, M. L.; Rodriguez-Amaya, D. B. Carotenoid composition of the tropical fruits *Eugenia uniflora* and *Malpighia glabra*. In: *Food Science and Human Nutrition*. G. Charalambous (Ed.) Elseiver Sci. Publ., Amsterdan. p. 643-650. 1992.

Cao, G.; Sofic, E.; Prior, R. L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relations ships. *Free Rad. Biol. Med*., 22, 749-760, 1997.

Chan, H. T.; Yamamoto, H. Y. Kinetics of anthocyanin decomposition in acerola juice. *Asean Food J.* 9, 132-135, 1994.

Choi, M. H.; Kim, G. H.; Lee, H. S. Effects of ascorbic acid retention on juice color and pigment stability in blood orange (*Citrus sinensis*) juice during refrigerated storage, *Food. Resear. Inter*., 35, 753-759, 2002.

Chun, O. K.; Kim, D.; Moon, H. Y.; Kang, H. G.; Lee, C. Y. Contribution of individual polyphenolics to total antioxidant capacity of plums. *J. Agric. Food Chem*., 51, 7240-7245, 2003.

Couceiro, E. M. In São José, A. B. & Alves, R. E. *Acerola no Brasil: produção e mercado*. Vitória da Conquista, Bahia: Il. Graf. Tab., 1995.

Dyrby, M.; Westergaard, N.; Stapelfeldt, H. Light and heat sensitivity of red cabbage extract in soft drink model systems. *Food Chem.,* 72, 431-437, 2001.

Del Pozo-Insfran, D. D.; Brenes, C. H.; Talcott, S. T. Phytochemical composition and pigment stability of açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) *J. Agric. Food Chem*. 52, 1539-1545, 2004.

Ferrariliou, R.; Dacylameta, A.; Iliou, J. P.; Thi, A. T. P.; Depaula, F. M.; Dasilva, J. V.; Mazliak, P. In vitro photodynamic lipid-peroxidation of total lipophilic extracts from leaves of bean plants. *Biochim. Biophys. Acta,* 1166, 48-54, 1993.

Figueiredo, P.; George, F.; Tatsuzawa, F.; Toki, K.; Saito, N.; Brouillard, R. New features of intramolecular copigmentation by acylated anthocyanins. *Phytochemistry*, 51, 125-132, 1999.

Foley, S.; Navaratnam, S.; Mcgarvey, D. J.; Land, E. J.; Truscott, T. G.; Rice-Evans, C. A. Singlet oxygen quenching and the redox properties of hydroxycinnamic acids. *Free Rad. Bio. Med*., 26, 1202-1208, 1999.

Furtado, P.; Figueiredo, P.; Neves, H. C. Das; Pina, F. Photochemical and thermal degradation of anthocyanidins. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.,* 75, 113-118, 1993.

Gallori, S.; Bilia, A. R.; Bergonzi, M. C.; Barbosa, W. L. R.; Vincieri, F. F. Polyphenolic constituents of fruit pulp of Euterpe oleracea Mart. (açai palm). *Chromatographia*, 59, 739-743, 2004.

García-Viguera, C.; Bridle, P. Influence of structure on colour stability of anthocyanins and flavylium salts with ascorbic acid. *Food Chem*., 64, 21-26, 1999.

Garzón, G. A.; Wrolstad, R. E. Comparison of the stability of pelargonidin-based anthocyanins in strawberry juice and concentrate. *Food Chem. Tox*., 67, 1288-1299, 2002.

Gil, M. I.; Tomás-Barberán, F. A.; Hess-Pierce, B.; Holcroft, D. M.; Kader, A. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J. Agric. Food Chem*., 48, 4581-4589, 2000.

Globo Rural. Carga de Energia - Alimento básico das populações ribeirinhas da Amazônia, a fruta ganha mercado nas demais regiões brasileiras, em função de suas qualidades nutritivas. *Globo Rural*, novembro, 2000. in www.muana.com.br/materias.

Godoy, H. T.; Rodriguez-Amaya, D. B. Occurrence of *cis*-isomers of provitamin A in Brazilian fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 1306-1313, 1994.

Gonnet, J. F. Colour effects of co-pigmentation of anthocyanin revisited – 3. A further description using CIELAB differences and assessment of matched colours using the CMC model. *Food Chem*., 75, 473-485, 2001.

Goto, T. Structure, stability and color variation of natural anthocyanins. *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.*, 52, 113-158, 1987.

Hanamura, T.; Hagiwara, T.; Kawagishi, H. Structural and functional characterization of polyphenols isolated from acerola (*Malpighia emarginata* DC) fruit. *Biosci. Biotechnol. Biochem*., 69, 280-286, 2005.

Haley, J. L.; Fitch, A. N.; Goyal, R.; Lambert, C.; Truscott, T. G. The S_1 and T_1 energy levels of all-*trans*-β-carotene. *J. Chem. Soc. Chem. Commun*., 17: 1175-1176, 1992.

Harborne, J. B. The Flavonoids, Advances in Research since 1986. Chapman & Hall/CDR Press Company, London, 1993.

Heredia, F. J.; Francia-Aricha, E. M.; Rivas-Gonzalo, J. C.; Vicario, I. M.; Santos-Buelga, C. Chromatic characterization of anthocyanins from red grapes – I. pH effect. *Food Chem*., 63, 491-498, 1998.

Hong, C. M.; Wendorff, W. L.; Bradley, Jr. R. L. Factors affecting light-induced pink discoloration of annatto-colored cheese. *J. Food Sci*., 60, 94-97, 1995.

Hoshino, T. Self-association of flavylium cations of anthocyanidin 3,5-diglucosides studied by circular dichroism and ^{1}H NMR. *Phytochemistry*, 31, 647-653, 1992.

Houbiers, C.; Lima, J. C.; Maçanita, A. L.; Santos, H. Color stabilization of malvidin-3-glucoside: self-aggregation of flavylium cation e copigmentation with the z-chalcone form. *J. Phys. Chem*., 102, 3578-3585, 1998.

Iacobucci, G.; Sweeny, J. G. The chemistry of anthocyanins and related flavylium salts. *Tetrahedron* 23, 1057-1064, 1983.

Jurd, L. Some Advances in the chemistry of anthocyanin-type plant pigments. In *The chemistry of Plant Pigments*, ed. C. O. Chichester, pp. 1231. Academic Press, New York and London, 1972.

Kaack, K.; Austed, T. Interaction of vitamin C and flavonoids in elderberry (*Sambucus nigra* L.) during juice processing. *Plant Foods Human Nutr*., 52, 187-198, 1998.

Kahkonen, M.; Heinonen, M. Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. *J. Agric. Food Chem*., 51, 628-633, 2003.

Katsaboxakis, K.; Papanicolaou, D.; Melanitou, M. Stability of Pigmented Orange Anthocyanins in Model and Real Food Systems. *Ital. J. Food. Sci*., 1, 17-25, 1998.

Kuskoski, E. M.; Asuero, A. G.; García-Parilla, M. C.; Troncoso, A. M.; Fett, R. Actividad antioxidante de pigmentos antociánicos. *Cienc. Tecnol. Aliment.,* 24, 691-693, 2004.

Kirca, A. & Cemeroglu, B. Degradation kinetics of anthocyanins in blood orange juice and concentrate. *Food Chem.*, 81, 583-587, 2003.

Leong, L. P.; Shui, G. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chem*., 76, 69-75, 2002.

Lichtenthäler, R.; Rodrigues, R. B.; Maia, J. G. S.; Papagiannopoulos, M.; Fabricius, H.; Marx, F. Total oxidant scavening capacities of Euterpe oleracea Mart. (Açaí) fruits. *Inter. J. Food Sci. Nut.*, 56, 53-64, 2005.

Lima, V. L. A. G.; Melo, E. A.; Maciel, M. I. S.; Lima, D. E. S. Avaliação do teor de antocianinas em polpa de acerola congelada proveniente de frutos de 12 diferentes aceroleiras (Malpighia emarginata DC.). *Ciênc. Tecnol. Aliment*. 23, 101-103, 2003.

Luby, J. M.; Gray, J. I.; Harte, B. R.; Ryan, T. C. Photooxidation of cholesterol in butter. *J. Food Sci*., 51, 904-907, 1986.

Maçanita, A. L.; Moreira, P. F.; Lima, J. C.; Quina, F. H.; Yihwa, C.; Vautier-Giongo, C. Proton transfer in anthocyanins and related flavylium salts. Determination of ground-state rate constants with nanosecond laser flash photolysis. *J. Phys. Chem*., 106, 1248-1255, 2002.

Mascio, P. D.; Kaiser, S.; Sies, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen desativador. *Arch. Biochem, Biophys*., 274, 532-538, 1989.

Malien-Aubert, C.; Dangles, O.; Amiot, M. J. Color stability of commercial anthocyanin-based extracts in relation to the phenolic composition. Protective Effects by Intra e Intermolecular copigmentation. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 170-176, 2001.

Melgosa, M.; Hita, E.; Poza, A. J.; Alman, D. H.; Berns, R. S. Suprathreshold color-difference ellipsoids for surface colors. *Color Resch. Appl*., 22, 148-155, 1997.

Mezadri, T.; Perez-Galvez, A.; Hornero-Mendez, D. Carotenoid pigments in acerola fruit (Malpighia emarginata DC.) and derived products. *Euro. Food Res. Technol*. 220, 63-69, 2005.

Miniati, E.; Damiani, P.; Mazza, G. Copigmentation and self-association of anthocyanins in food model systems. *Ital. J. Food. Sci.*, 2, 109-116, 1992.

Montenegro, M. A.; Rios, A. O.; Mercadante, A. Z.; Nazareno, M. A.; Borsarelli, C. D. Model studies on the photosensitized isomerization of bixin. *J. Agric. Food Chem*., 52, 367-373, 2004.

Musser, R. S. Caracterização de acessos de aceroleira do banco ativo de germoplasma da UFRPE, Em Pernambuco, Tese De Doutorado, UFRPE, Recife, 2001.

Nagai, S.; Ohara, K.; Mukai, K. Kinetic study of the quenching reaction of singlet oxygen by flavonoids in etanol solution. *J. Phys. Chem*., 109, 4234-4240, 2005.

Nielsen, B. R.; Mortensen, A.; Jørgensen, K.; Skibsted, L. H. Singlet *versus* triplet reactivity in photodegradation of C_{40} carotenoids. *J. Agric. Food Chem*., 44, 2106-2113, 1996.

Oliveira, P. A. Estudo da Estabilidade e Estabilização das Antocianinas do Bagaço de Uva Seibel 2. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, 2001.

Oliveira, J. R. P., Soares Filho, W. S. Situação da cultura da acerola no Brasil e ações da Embrapa Mandioca e Fruticultura em recursos genéticos e melhoramento. *Simpósio de Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste do Brasil*, Embrapa Semi-Árido, Petrolina, PE, 1998.

Osawa, Y. Copigmentação of Anthocyanins. In: MARKAKIS, P. (ed.), Anthocyanins as Food Colors. Academic Press Inc., 209-244, 1982.

Poei-Langston, M. S.; Wrolstad, R. E. Color degradation in an ascorbic acid-anthocyanin-flovonol model system. *J. Food Sci*., 46, 1218-1222, 1981.

Porcu, O. M.; Rodriguez-Amaya, D. Carotenóides de acerola: efeito do estágio de maturação e remoção da película. Publicado em Anais do 5º SLACA, Campinas, 2003.

Rababah, T. M.; Ereifej, K. I.; Howard, L. Effect of ascorbic acid and dehydratation on concentrations of total phenolics, antioxidant capacity, anthocyanins, and color fruits. *J. Agric. Food Chem*., 53, 4444-4447, 2005.

Ramirez-Tortoza, C.; Anderesen, O. M.; Gardner, P. T.; Morrice, P. C.; Wood, S. G.; Duthie, S. J.; Collins, A. R.; Duthie, G. G. Anthocyanin-rich extract decreases indices of lipid peroxidation and DNA damage in vitamin E depleted rats. *Free Rad. Biol. Med*., 46, 1033-1037, 2001.

Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Papaganda, G. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad. Biol. Med*., 20, 933-956, 1996.

Sang, S. M.; Cheng, X. F.; Stark, R. E.; Rosen, R. T.; Yang, C. S.; Ho, C. T. Chemical studies on antioxidant mechanism of tea catechins: Analysis or radical reaction products of catechin and epicatechin with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. *Bioorg. Med. Chem*., 10, 2233-2237, 2002.

Santini, R.; Huyke, A. J. Identification of the anthocyanin present in the acerola which produces color changes in the juice on pasteurization and canning. *J. Agric. Univ. Puerto Rico* 40, 171-156. Apud: Mazza, G., Miniati, E. Anthocyanins in fruits, vegetables and grains. CRC Press Inc., Boca Raton, p. 131, 1993.

Sattar, A.; deMan, J. M. Photooxidation of milk and milk products: A review. *Crit. Rev*. *Food Sci. Nutr*., 7, 13-37, 1975.

Shrikhande, A. J.; Francis, J. Effect of flavonols on ascorbic acid and anthocyanin stability in model systems. *J. Food Sci*., 39, 904-906, 1974.

Silva, M. F. V. Efeito dos diferentes tratamentos e embalagens nas características da polpa de acerola e na determinação dos teores de ácido ascórbico e das antocianinas durante o armazenamento. Tese Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, 1999.

São José, A. B.; Alves, R. E. *Acerola no Brasil: produção e mercado*. Vitória da Conquista, Bahia: Il. Graf. Tab., 1995.

Skrede, G.; Wrolstad, R. E.; Lea, P.; Enersen, G. Color stability of strawberry and blackcurrant syrups. *J. Food Sci*, 57, 172-177, 1992.

Stintzing, F. C.; Stintzing, A. S.; Carle, R.; Frei, B.; Wrolstad, R. E. Color and antioxidant properties of cyaniding-based anthocyanin pigments. *J. Agric. Food Chem*., 50, 6172-6181, 2002.

Talcott, S. T.; Brenes, C. H.; Pires, D. M.; Del Pozo-Insfran, D. D. Phytochemical stability and color retention of copigmented and processed muscadine grape juice. *J. Agric. Food Chem*., 51, 957-963, 2003.

Torskangerpoll, K.; Andersen, O. M. Colour stability of anthocyanins in aqueous solutions at various pH values. *Food Chem*., 89, 427-450, 2005.

Tounaire, C.; Croux, S.; Maurette, M. T., Beck, I.; Hocquaux, M.; Braun, A.M.; Oliveros, E. Antioxidant activity of flavonoids: efficiency of singlet oxygen ($^1\Delta_g$) quenching. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 19: 205-215, 1993.

Vendramini, A. L.; Trugo, L. C. Phenolic compounds in acerola fruit (*Malpighia punicifolia* L.). *J. Braz*. *Chem. Soc.* 15, 664-668, 2004.

http://www.mct.gov.br – Programa Piloto para Proteção das Florestas Tropicais do Brasil.

.

CAPITULO II

Carotenoid composition of two brazilian genotypes of acerola (*Malpighia punicifolia* L.) from two harvests

Publicado no periódico: **Food Research International**

Available online at www.sciencedirect.com
SCIENCE DIRECT®
Food Research International 38 (2005) 1073–1077
FOOD RESEARCH INTERNATIONAL
www.elsevier.com/locate/foodres

Carotenoid composition of two Brazilian genotypes of acerola (*Malpighia punicifolia* L.) from two harvests

V.V. De Rosso, A.Z. Mercadante *

Department of Food Science, Faculty of Food Engineering, State University of Campinas (UNICAMP), P.O. Box 6121, 13083-970 Campinas, Brazil

Received 2 June 2004; accepted 27 February 2005

Abstract

Acerola fruit is native to Central America and adapted very well to Brazil, which in turn became the major worldwide acerola producer, consumer and exporter. Two acerola genotypes were harvested from a Brazilian plantation during the 2003 and 2004 summer harvests. Both genotypes presented β-carotene (265.5–1669.4 μg/100 g), lutein (37.6–100.7 μg/100 g), β-cryptoxanthin (16.3–56.5 μg/100 g) and α-carotene (7.8–59.3 μg/100 g) as the major carotenoids. In both harvests, the β-carotene, β-cryptoxanthin and α-carotene levels were higher in the Olivier genotype, whereas the lutein content was higher in the Waldy Cati 30 genotype. Due to higher sunlight exposure, the fruits harvested in 2004 showed higher total carotenoid contents than those from the 2003 harvest. Acerola, especially the Olivier genotype, with 148–283 RE/100 g, can be considered as a good source of provitamin A.
© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Carotenoids; Acerola fruit; *Malpighia punicifolia*; HPLC; Genotypes; Weather conditions

1. Introduction

Acerola, also known as West Indian cherry or Barbados cherry, originated in Central America and was introduced into Brazil in the 50s decade, due to its good adaptation to the soil and climate. Since it is propagated from the seeds, the fruits from Brazilian plantations show great genetic variability.

Brazil is the major worldwide producer, consumer and exporter of acerola fruits, producing 32,990 tones in 1996 (Oliveira & Soares Filho, 1998). The main reason for the increase in consumption of acerola is on account of its functional food appeal due to its high vitamin C content, 957–1074 mg/100 g (Vendramini & Trugo, 2000; Assis, Lima, & Faria-Oliveira, 2001) and the presence of carotenoids and anthocyanins.

It is known that several agricultural and geographical factors have an influence on the carotenoid composition of foods. In the case of acerola, the carotenoids of non-specified varieties/cultivars produced in two different Brazilian regions were compared by Cavalcante and Rodriguez-Amaya (1992). These authors reported the presence of β-carotene (4.0–25.8 μg/g), β-cryptoxanthin (0.5–3.6 μg/g) and α-carotene (traces to 0.1 μg/g), the lowest levels being found in fruits produced in the colder State of São Paulo and the highest ones from fruits cultivated in a warmer State (Pernambuco).

The effect of ripeness on the major acerola carotenoids was recently evaluated. The ripe fruits presented 12 ± 2 μg/g of β-carotene and 1 ± 1 μg/g of lutein, whereas partially ripe acerola showed, respectively, 5 ± 1 μg/g and 2 ± 1 μg/g (Porcu & Rodriguez-Amaya, 2003). It is worthwhile to note that these fruits were collected in home gardens and the variety was not given.

The aim of this study was to conduct a well controlled study where the influence of genotype and harvest on the carotenoid composition of acerola fruits

* Corresponding author. Fax: +55 19 3788 2153.
E-mail address: azm@fea.unicamp.br (A.Z. Mercadante).

0963-9969/$ - see front matter © 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.foodres.2005.02.023

was investigated, without interference of other effects such as soil and variety/cultivar.

2. Material and methods

2.1. Sample characterization

Two acerola genotypes, named Waldy Cati 30 and Olivier, were collected from a farm situated in Campinas, São Paulo State, Brazil. Three batches, per harvest, each consisting of 2 kg, of both acerola genotypes harvested in February 2003 and 2004 were analyzed. The red color and round shape of the fruits were uniform among the batches of each genotype. However, the Waldy Cati genotype fruits were bigger and heavier (diameter of 2.8 ± 0.4 cm and weight of 12.0 ± 2.4 g) than those from the Olivier genotype, which presented a diameter of 2.4 ± 0.2 cm and weight of 9.8 ± 2.1 g.

Before extraction, the fruits were pulped in a knife pulper. The soluble solids contents (°Brix) of the six batches ranged from 4.4 to 5.6 for the Waldy Cati acerola pulp and from 5.4 to 5.8 for the Olivier one.

2.2. Standards

Standards of lutein, zeaxanthin and β-cryptoxanthin were provided by Dr. Werner Simon from DSM Nutritional Products (Basel, Switzerland), showing purity of 96%, 99% and 99% respectively, by high-performance liquid chromatography (HPLC). The α-carotene and β-carotene were extracted from carrot according to the procedure described below, followed by column separation on MgO/Hyflosupercel (1:2) with petroleum ether as the mobile phase. The fractions were crystallized twice with methanol, achieving purity, as demonstrated by HPLC, of 98% for α-carotene and 99% for β-carotene.

2.3. Carotenoid determination

The carotenoids were exhaustively extracted from acerola pulp with acetone, transferred to petroleum ether/diethyl ether and saponified with 10% methanolic KOH, according to Mercadante, Rodriguez-Amaya, and Britton (1997). Despite the fact that xanthophylls are usually found esterified in fruits, including in acerola, the identity and quantity of their esters was not investigated. The analyses were conducted in duplicate.

The analysis was carried out in a Waters HPLC equipped with a photodiode array detector (PDA) (Waters, model 996). The equipment also included an on line degasser, a Rheodyne injection valve with a 20 μl loop and an external oven. The data acquisition and processing were performed by the Millenium Waters software. For all the samples, carotenoid separation was carried out on a C_{18} Nova-pak column, 300×4.0 mm i.d. (4 μl particle size) using as mobile phase a linear gradient of acetonitrile/EtOAc/H_2O from 88:2:10 to 85:15:0 in 15 min, maintaining this proportion for 30 min. The flow rate was 1 ml/min and column temperature was set at 29 °C. The chromatograms were processed at 450 nm and the spectra were obtained between 250 and 600 nm.

The carotenoids were identified according to the following parameters: chromatographic behaviour on C_{18} HPLC column and TLC on silica-gel and MgO (Mercadante & Rodriguez-Amaya, 1991; Mercadante, 1999), UV/visible spectrum (λ_{max} and shape) compared with data available in the literature (Davies, 1976; Britton, 1995), co-chromatography with authentic standards and derivatization reactions (Davies, 1976). The carotenoids were quantified by HPLC, using external calibration curves for lutein, zeaxanthin, β-cryptoxanthin, α- and β-carotene, with a minimum of five concentration levels. Carotenoid quantification was performed by comparison of the peak area of the sample with that of the standard, injected daily. Neoxanthin, violaxanthin and luteoxanthin were quantified using the area of lutein, the β-cryptoxanthin epoxides and zeinoxanthin using the area of β-cryptoxanthin, and 5,8-epoxy-β-carotene by the area of β-carotene.

The NAS-NRC (1989) conversion factor was used to calculate the vitamin A value.

2.4. Statistical analysis

To evaluate the differences in carotenoid composition between acerola genotypes and between harvests, analyses of variance were conducted using the ANOVA (Microcal Origin 5.0).

3. Results and discussion

The acerola fruits presented the same major carotenoids: lutein, β-cryptoxanthin, α-carotene and β-carotene in different concentrations, according to their genotype and harvest. Fig. 1 shows the carotenoid chromatograms of both acerola genotypes, and Table 1 presents the carotenoid characteristics obtained using HPLC-PDA.

As expected for reversed-phase columns, polar carotenoids with two hydroxy groups, such as violaxanthin (peak 2) and lutein (peak 4), eluted before the monohydroxy carotenoids (β-cryptoxanthin—peak 10). The carotenes, α-carotene (peak 13) and β-carotene (peak 14), were the last to elute under these conditions. Lutein, β-cryptoxanthin, α-carotene and β-carotene co-eluted with their specific standards, showing similar UV–visible spectra characteristics to those presented by Britton (1995) and Davies (1976).

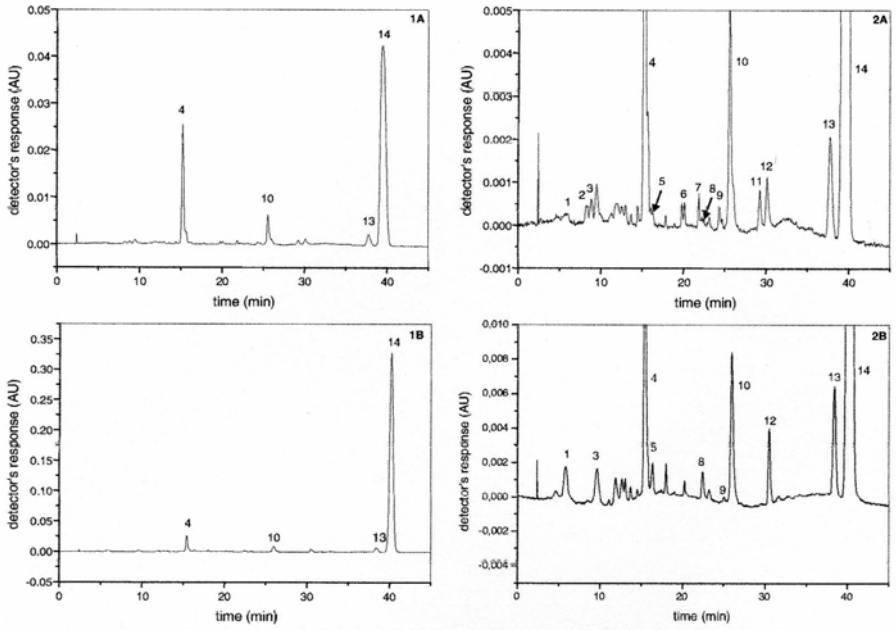


Fig. 1. Chromatogram, obtained by HPLC, of carotenoids from acerola. Chromatogram 1A—Waldy genotype, chromatogram 2A—Olivier genotype. For better visualization, the chromatograms 1A and 2A were, respectively, amplified in 1B and 2B. Chromatographic conditions: see text. Acquired in maxplot and processed at 450 nm. Peak identification is given in Table 1.

Table 1
Main properties, obtained by HPLC, of carotenoids from acerola

Peak[a]	Carotenoid	t_R (min)[b]	λ_{max}(nm)[c,d]	%III/II
1	Neochrome + neoxanthin	5.7–5.9	400, 423, 448	72
			415, 439, 467	85
2	Violaxanthin	8.2–8.4	417, 441, 470	81
3	Luteoxanthin	8.8–9.0	400, 423, 449	96
4	Lutein	15.2–16.7	418, 447, 476	60
5	Zeaxanthin	16.4–17.6	(421), 454, 481	24
6	5,6,5′,6′-diepoxy-β-cryptoxanthin	19.8–20.7	423, 447, 475	58
7	5,6-epoxy-β-cryptoxanthin	21.9	423, 448, 476	53
8	5,8-epoxy-β-cryptoxanthin	19.9–22.7	404, 430, 456	50
9	Zeinoxanthin	23.9–25.1	422, 448, 476	51
10	β-cryptoxanthin	25.5–26.8	(425), 454, 480	17
11	5,6,5′,6′-diepoxy-β-carotene	29.2–30.3	423, 447, 475	43
12	5,8-epoxy-β-carotene	29.0–31.1	404, 429, 454	37
13	α-carotene	36.2–38.7	422, 447, 475	44
14	β-carotene	37.9–40.5	(425), 454, 481	17

[a] Numbered according to the chromatograms shown in Fig. 1.
[b] Range of 24 runs.
[c] Solvente: acetonitrile/EtOAc/H_2O.
[d] Brackets indicate a shoulder instead of a peak.

The identities of 5,6,5′,6′-diepoxy-β-cryptoxanthin (peak 6), 5,6-epoxy-β-cryptoxanthin (peak 7), violaxanthin (peak 2) and luteoxanthin (peak 3) were confirmed by a bathochromic spectral shift, due to the positive result to the epoxy-furanoxide rearrangement test. Because the very low amount of the monohydroxy β, ε-derivative was not enough to perform the methylation test to confirm the hydroxy group at position 3 or 3′, this carotenoid (peak 9) could be either zeinoxanthin or α-cryptoxanthin.

Although there was no separation of the β-carotene *cis* isomers on the C_{18} column used, the presence of

small amounts of 9-*cis*-β-carotene was verified using a C_{30} column.

3.1. Genotype differences

As can be seen in Table 2, the contents of all carotenoids, with the exception of lutein, were higher in the Olivier acerola as compared to those found in the Waldy Cati genotype for both harvests. The total carotenoid content was significantly higher in Olivier than that found in the Waldy Cati genotypes ($P < 0.0001$ for 2003 harvest) and ($P = 0.0226$ for 2004 harvest). This difference was due to the significantly higher levels of α-carotene ($P < 0.0001$ for 2003 harvest and $P = 0.0417$ for 2004 harvest) and mainly of β-carotene ($P < 0.0001$ for 2003 harvest and $P = 0.0106$ for 2004 harvest) in the Olivier genotype. Although the levels of β-cryptoxanthin were also higher in the Olivier acerola from both harvests, compared to the Waldy genotype, the difference was only significant for the 2003 harvest ($P = 0.0137$).

On the other hand, the lutein level was 1.5 times higher in the Waldy genotype harvested in 2003 and 2.6 times higher in 2004, this difference only being significant in the 2004 harvest ($P = 0.0156$).

Small amounts of 5,6,5′,6′-diepoxy-β-cryptoxanthin and 5,6,5′,6′-diepoxy-β-carotene were only detected in the Waldy genotype from both harvests.

Since β-carotene was the major provitamin A carotenoid, the vitamin A value was significantly higher in the Olivier acerola, about 2.6 and 3.2 times higher, respectively for 2004 and 2003 harvests.

The genotype Olivier presented about 2.0–4.1 times more β-carotene than those reported by Cavalcante and Rodriguez-Amaya (1992) and Godoy and Rodriguez-Amaya (1994), in acerola of an unknown variety, collected in São Paulo State, Brazil. The β-carotene contents found in the Waldy genotype were 1.5 times higher in the 2004 harvest and 1.5 times lower in the 2003 harvest than those obtained in the previous studies.

3.2. Weather conditions effects

The total carotenoid contents were about 2.2 times higher in both acerola genotypes produced in the 2004 harvest as compared to those from 2003 harvest. However this difference was only significant in the Olivier genotype ($P = 0.0179$), because of the high value of the coefficient of variation amongst the three batches of Waldy acerola, this difference was not significant ($P = 0.0811$).

The higher contents found in the fruits collected in 2004 were mainly a result of double increased β-carotene levels as compared to the 2003 harvest ($P = 0.0502$ and $P = 0.0094$ for Waldy and Olivier genotypes, respectively). In fact, in Waldy acerola, the levels of lutein ($P = 0.4457$), β-cryptoxanthin ($P = 0.2323$) and α-carotene ($P = 0.2019$) were not significantly different for both harvests. On the other side, in the Olivier genotype, the β-cryptoxanthin ($P = 0.0437$) and α-carotene ($P < 0.0001$) levels were significantly higher in 2004 than in 2003, whilst there was no statistically significant difference for the lutein contents.

Table 2
Carotenoid composition (μg/100 g) and vitamin A value (RE/100 g) of two acerola genotypes

Peak	Carotenoid	2003 Harvest[a]		2004 Harvest[a]	
		Waldy Cati 30	Olivier	Waldy Cati 30	Olivier
1	Neoxanthin + neochrome[b]	1.8 ± 0.8	6.7 ± 2.6	5.1 ± 3.9	7.4 ± 3.6
2	Violaxanthin	0.2 ± 0.1	nd	2.9 ± 1.7	nd
3	Luteoxanthin	0.6 ± 0.4	9.3 ± 3.4	3.6 ± 2.1	10.1 ± 2.6
4	Lutein[c]	70.7 ± 49.6	48.0 ± 9.5	100.7 ± 28.4	37.6 ± 13.5
5	Zeaxanthin	0.1 ± 0.1	3.3 ± 0.6	0.2 ± 0.1	2.9 ± 0.3
6	5,6,5′,6′-diepoxy-β-cryptoxanthin	0.1 ± 0.1	nd	1.4 ± 0.4	nd
7	5,6-epoxy-β-cryptoxanthin	0.2 ± 0.1	nd	nd	nd
8	5,8-epoxy-β-cryptoxanthin	1.3 ± 0.9	2.3 ± 0.1	3.7 ± 2.4	2.5 ± 0.4
9	Zeinoxanthin	0.1 ± 0.1	0.3 ± 0.2	1.9 ± 1.2	2.7 ± 0.2
10	β-cryptoxanthin	16.3 ± 4.1	22.1 ± 2.4	49.5 ± 39.1	56.5 ± 25.6
11	5,6,5′,6′-diepoxy-β-carotene	1.0 ± 0.3	nd	2.4 ± 2.6	nd
12	5,8-epoxy-β-carotene	3.3 ± 1.5	4.2 ± 0.3	6.7 ± 2.5	40.1 ± 26.4
13	α-carotene	7.8 ± 3.3	14.1 ± 0.8	24.2 ± 6.4	59.3 ± 41.2
14	β-carotene	265.5 ± 92.5	869.4 ± 41.5	617.4 ± 111.0	1669.4 ± 135.1
	Total carotenoid	370.9 ± 153.1	959.1 ± 23.9	883.9 ± 197.6	1881.3 ± 219.8
	Vitamin A value	46.2 ± 15.9	148.3 ± 7.6	107.0 ± 21.7	282.9 ± 38.7

nd: not detected.
[a] Average and standard deviation of three batches in duplicate.
[b] These carotenoids were only separated in some samples.
[c] Mixture with traces of 13-*cis*-lutein.

The observed variation in carotenoid levels when harvests were compared can be attributed to weather differences between the years 2003 and 2004, since the samples were collected from the same plantation.

In fact, the maximum and minimum average temperatures during the period before each harvest were followed from October to January, being higher for the 2003 harvest, respectively of 35.2 ± 1.5 and 24.0 ± 0.9 °C, than for the 2004 harvest, with, 34.5 ± 1.4 as maximum and minimum of 21.6 ± 2.4 °C. The maximum and minimum temperatures were also higher during the ripening period, i.e. in January 2003 than 2004. Moreover, the rainfall was much higher in January 2003 (323.7 mm) than in the same month of 2004 (242.6 mm), indicating that the fruits were exposed to lower sunlight during the 2003 ripening period. These weather conditions clearly indicate that sunlight exposure was responsible for the higher carotenoid contents in both acerola genotypes harvested in 2004. The positive correlation between sunlight exposure and carotenoid content in apple was previously reported by Merzlyak, Solovchenko, and Chivkunova (2002).

4. Conclusions

The levels of the major carotenoids and the total carotenoid content were significantly higher in the Olivier acerola as compared to the Waldy genotype. Due to higher sunlight exposure, fruits produced in 2004 showed higher carotenoid content, especially β-carotene, than those harvested in 2003.

These results show that the genetic engineering can be considered a powerful tool for prevention of vitamin A deficiency, because when compared to other tropical fruits such as mango (Mercadante & Rodriguez-Amaya, 1998), caja (Hamano & Mercadante, 2001) and cashew-apple (Assunção & Mercadante, 2003), only the acerola Olivier genotype can be considered a good source of provitamin A.

Acknowledgments

The authors thank the Brazilian Funding Agency FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) and DSM Nutritional Products (Switzerland) for financial support.

References

Assis, S. A., Lima, D. C., & Faria-Oliveira, O. M. M. (2001). Activity of pectinmethylesterase, pectin content and vitamin C in acerola fruit at various stages of development. *Food Chemistry, 74*, 133–137.

Assunção, R. B., & Mercadante, A. Z. (2003). Carotenoids and ascorbic acid from cashew-apple (*Anacardium occidentale* L.): Variety and geographic effects. *Food Chemistry, 81*, 495–502.

Britton, G. (1995). UV/visible spectroscopy. In G. Britton, S. Liaaen-Jensen, & H. Pfander (Eds.), *Carotenoids. Spectroscopy* (vol. 1B, pp. 13–62). Basel: Birkhauser.

Cavalcante, M. L., & Rodriguez-Amaya, D. B. (1992). Carotenoid composition of the tropical fruits *Eugenia uniflora* and *Malpighia glabra*. In G. Charalambous (Ed.), *Food science and human nutrition* (pp. 643–650). Amsterdam: Elsevier Sci. Publ.

Davies, B. H. (1976). Carotenoids. In T. W. Goodwin (Ed.). *Chemistry and biochemistry of plant pigments* (vol. 2, pp. 38–165). London: Academic Press.

Godoy, H. T., & Rodriguez-Amaya, D. B. (1994). Occurrence of *cis*-isomers of provitamin A in Brazilian fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 42*, 1306–1313.

Hamano, P. S., & Mercadante, A. Z. (2001). Composition of carotenoids from commercial products of caja (*Spondias lutea*). *Journal of Food Composition and Analysis, 14*, 335–343.

Mercadante, A. Z. (1999). Chromatographic separation of carotenoids. *Archivos Latinoamericanos de Nutrition, 49*, 52–57.

Mercadante, A. Z., & Rodriguez-Amaya, D. B. (1991). Performance of thin-layer chromatography versus HPTLC in the screnning of carotenoids. *Ciência e Tecnologia de Alimentos, 11*, 200–209.

Mercadante, A. Z., & Rodriguez-Amaya, D. B. (1998). Effects of ripening, cultivar differences, and processing on the carotenoid composition of mango. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46*, 128–130.

Mercadante, A. Z., Rodriguez-Amaya, D. B., & Britton, G. (1997). HPLC and mass spectrometric analysis of carotenoids from mango. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45*, 120–123.

Merzlyak, M. N., Solovchenko, A. E., & Chivkunova, O. B. (2002). Patterns of pigment changes in apple fruits during adaptation to high sunlight and sunscald development. *Plant Physiology and Biochemistry, 40*, 679–684.

NAS-NRC (1989). *Recommended dietary allowances* (10th ed.) Washington; National Academy of Science.

Oliveira, J. R. P., & Soares Filho, W. S. (1998). Situação da cultura da acerola no Brasil e ações da Embrapa Mandioca e Fruticultura em recursos genéticos e melhoramento. In *Simpósio de Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste do Brasil* (pp. 1998). Petrolina, PE, Brazil: Embrapa Semi-Árido.

Porcu, O. M., & Rodriguez-Amaya, D. B. (2003). Carotenóides de Acerola: Efeito de Estágio de Maturação e Remoção de Película. In *V Simpósio Latinoamericano de Ciencia de Alimentos*. Campinas, SP, Brazil, 10–14 November 2003.

Vendramini, A. L., & Trugo, L. C. (2000). Chemical composition of acerola fruit (*Malpighia punicifolia* L.) at three stages of maturity. *Food Chemistry, 71*, 195–198.

CAPÍTULO III

Determination of anthocyanins from acerola (*Malpighia emarginata DC.*) and açai (E*uterpe oleracea* mart.) by HPLC-PDA and HPLC-MS

Artigo em preparação para envio ao periódico
Food Chemistry

ABSTRACT

The anthocyanins from acerola and açaí, two tropical fruits important for their bioactive products, were studied. Two varieties of acerola *in natura* and one brand of frozen pulp of açaí were analysed by HPLC-PDA-MS. The pulp of açaí presented 282- 303 mg/100 g of total anthocyanin, with cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-rutinoside, in average proportions of 13.2% and 87.5%, respectively. The two varieties (Waldy Cati 30 and Olivier) of acerola showed similar composition, being cyanidin-3-rhamnoside (76.2 - 78.0%) the major anthocyanin, followed by pelargonidin-3-rhamnoside (12.7 - 15.7%), cyanidin-3,5-di-rhamnoside (5.6 - 7.3%) and peonidin-3-rhamnoside (2.2 - 3.0%). The Waldy variety of acerola showed total anthocyanin content of 6.5 - 7.6 mg/100g, whilst 7.9 - 8.4 mg/100g were found in the Olivier variety, for the harvests 2003 and 2004, respectively. No statiscal differences for the total anthocyanin content were found between varieties and between harvests.

Keywords: anthocyanins; acerola varieties; *Malphigia emarginata* DC.; açaí; *Euterpe oleracea* Mart.; HPLC-PDA-MS.

1. INTRODUCTION

Acerola (*Malpighia emarginata* DC.), originally from Antilhas, was introduced 50 years ago, in Brazil, which is, presently, the major producer, consumer and exporter of the world. In 1996, 32,990 tons were produced, from which around 8,000 tons were exported (Oliveira & Soares Filho, 1998). Acerola is recognized as a functional food due to its high contents of vitamin C, 957 to 1074 mg/100 g (Vendramini & Trugo, 2000; Assis, Lima, & Faria-Oliveira, 2001) and of carotenoids (De Rosso & Mercadante, 2005), besides the presence of anthocyanins (Santini & Huyke, 1993; Hanamura, Hagiwara, & Kawagishi, 2005).

Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) is considered an energetic fruit native to the North part of Brazil, specifically from the Amazonic region. The Pará State is responsible for 95% of the national production of açaí, calculated in 130,000 tons/year. Due to the nutritive qualities of açaí (Rogez, 2000) these fruits are largely consumed all over the country, as well as being exported to USA and Germany in the last years.

The anthocyanins are responsible for the red and violet color of acerola and açaí, respectively. Besides the colorant property, the anthocyanins have been found to exhibit potential therapeutic effect as antinflammatory, radiation-protective, chemoprotective, vasoprotective (Wang, Cao, & Prior, 1997), inhibition of LDL oxidation and decrease the risks of cardiovascular diseases (Seeram & Nair, 2002). Most of these beneficial actions are correlated to its antioxidant activity due to scavenger free radicals, and forming chelates with metal. Since the protective efficiency depends on the chemical structure of the molecule, such as degree of glycosilation and number of hydroxyl groups in the B ring (Kong, Chia, Goh, Chia, & Brouillard, 2003), the determination of the anthocyanin composition in foods is an important issue. However, the results found in the literature for the identification of anthocyanins from acerola and açaí are discrepant.

Santini and Huyke (1993) identified malvidin-3,5-diglucoside in acerola from Puerto Rico, whilst in the fruits from Brazil cyanidin-3-α-*O*-ramnoside, pelargonidin-3-α-*O*-ramnoside, as well as a non anthocyanic flavonoid, quercitin-3-α-*O*-ramnoside , were identified by nuclear magnetic resonance (Hanamura et al., 2005). Also in acerola from Brazil, malvidin-3,5-diglucoside, cyanidin monoglycosilated and pelargonidin were identified by HPLC-UV/Vis (Vendramini & Trugo, 2004). It is worthwhile to mention that in these papers acerola was indiscriminated named *M. glabra* or *M. punicifolia*, however according to São José and Alves (1995), theses names are synonymous and that the most indicated name for all acerola genotypes and varieties is *Malpighia emarginata* DC.

Cyanidin-3-arabinoside and cyanidin-3-arabinosylarabinoside were identified in the açaí frozen pulp from Brazil (Bobbio, Druzian, Abrão, Fadelli, & Bobbio, 2000), whilst cyanidin-3-glucoside and pelargonidin-3-glucoside were found in frozen pulp of açaí from Colômbia (Del Pozo-Insfran, Brenes, & Talcott, 2004). Using HPLC-PDA-MS, Gallori, Bilia, Bergonzi, Barbosa and Vincieri (2004) identified cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-rutinoside in açaí from Brazil. These anthocyanins were also detected in açaí, along with small amounts of peonidin-rutinoside (Lichtenthäler, Rodrigues, Maia, Papagiannopoulos, Fabricius, & Marx, 2005)

Thus, the aim of this work is to study the anthocyanins composition in two varieties of acerola, harvested in two consecutive years, and the anthocyanins from the frozen pulp of açaí, using HPLC-PDA-and HPLC-MS.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Samples

Two acerola varieties, named Waldy Cati 30 and Olivier, were collected from a farm situated in region of Campinas, São Paulo State, Brazil. Three batches per harvest, each consisting of 2 kg of both acerola varieties harvested in February 2003 and 2004 were analyzed. The red color and round shape of the fruits were uniform among the batches of each variety. However, the Waldy Cati variety fruits were bigger and heavier (diameter of 2.8 $\pm$ 0.4 cm and weight of 12.0 $\pm$ 2.4 g) than those from the Olivier variety, which presented a diameter of 2.4 $\pm$ 0.2 cm and weight of 9.8 $\pm$ 2.1 g. Before extraction, the fruits were pulped in a knife pulper. The soluble solids contents (ºBrix) of the six batches ranged from 4.4 to 5.6 for the Waldy Cati acerola pulps and from 5.4 to 5.8 for the Olivier ones.

Two batches of a commercial brand of frozen pulp of açaí were bought in Campinas, São Paulo State, Brazil. Each batch was composed by 4 packages of 250 g each.

2.2. Standards

Standards of cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-rutinoside were obtained from Extrasynthèse (Genay, France), showing purity of 95% and 98%, respectively, demonstrated by HPLC-PDA.

2.3. Total Anthocyanin Determination

The anthocyanins were exhaustively extracted from 100 g of fresh pulp of acerola and from 20 g of frozen pulp of açaí, in duplicate, with 95% ethanol/HCl 1.5N (85:15), according the procedure described by Francis (1982). The absorbance was measured in a UV-Visible spectrophotometer at maximum absorption wavelengths in the visible region (λ_{max}) and the total anthocyanins content was calculated by using the absorption coefficient $A\,^{1\%}_{1cm} = 98.2$ (Fuleki & Francis, 1968).

2.4. Extraction and Partial Purification of Anthocyanins

The anthocyanins were extracted from the fresh pulp of acerola and from the frozen pulp of açaí with 0.5% HCl in methanol, overnight at 5 ºC in darkness. The slurry was filtered, and the solids were washed with additional 0.5% HCl in methanol. The acidic methanol extracts were combined and concentrated in a rotary evaporator (T < 38ºC) to obtain the crude extract. Fifteen grams of each extract were acidified with 10% aqueous formic acid (5 mL), diluted with 50 mL of water, and washed twice with 150 mL of ethyl acetate to eliminate nonpolar compounds. The aqueous phase was applied on an open column chromatography (CC) on an Amberlite XAD-7 resin (60 x 3 cm), and the anthocyanins were eluted with acetic acid/methanol (1:19) according to the procedure described by Degenhardt, Knapp and Winterhalter (2000). After concentration, the extract was lyophilized and the efficiency of removal of non-anthocyanic flavonoids by CC was verified by HPLC-PDA.

2.5. HPLC-PDA and HPLC-MS

The crude extract was diluted in 5% formic acid/methanol (85:15) immediately before analysis by HPLC-PDA to obtain the relative anthocyanin distribution in the samples. The HPLC-PDA was equipped with a model 600 quaternary solvent delivery system (Waters, Milford, USA), and on line degasser, Rheodyne injection valve with a 20 μL loop and an external oven coupled to the model 996 PDA detector (Waters, Milford, USA). The data acquisition and processing were performed by the Millenium Waters software. For all samples, anthocyanins separations were carried out on a 250 x 4.6 i.d. mm, 5 μm C_{18} Shim-pack CLC-ODS column (Shimadzu, Canby, Oregon), using as mobile phase a linear gradient of methanol/5% formic acid (v/v) from 85:15 to 20:80 in 25 min, maintaining this proportion for 15 min. The flow rate was 1 ml/min and column temperature

was set at 25°C. The chromatograms were processed at 280 or 520 nm and the spectra were obtained between 250 and 600 nm.

The liophilized partially purified extract was dissolved in water/formic acid/acetonitrile (87:10:3) (v/v) and analyzed by an HPLC system constituted of a binary pump (Agilent, Palo Alto, CA) equipped with a Rheodyne injection valve with a 20 μL loop, coupled to a UV/Vis detector (Merck, Darmstadt, Germany) set at 520 nm and monitored by a Chromatopac C-R6A integrator (Shimadzu, Canby, Oregon) and to a Bruker Esquire mass spectrometer with electrospray ionization and data processed by Esquire NT 4.0 software (Bruker, Billerica, MA). The MS-MS parameters were as follows: positive mode, capillary voltage – 2500 V, end plate offset -2000 V, capillary exit 110 V, skimmer 1 20V, skimmer 2 10V, dry gas (N2) temperature 325 oC and flow 11 L/min, nebulizer 60 psi, scan range *m/z* 200 to 2500. The separations were performed on a Luna RP-18 column 250 × 4.6 mm, 5 μm (Phenomenex, Germany) with a mobile phase consisted of a mixture of water/formic acid/acetonitrile in the proportion of 87:10:3 (v/v) as solvent A and of 40:10:50 (v/v) as solvent B at a flow rate of 0.5 mL/min. A linear gradient from 6 to 20% B from 0 to 20 min, to 40% B in 15 min, to 60% in 5 min and to 90% B in 5 min was used.

The anthocyanins from both fruits were identified through the following combined information: elution order in the reversed phase HPLC, co-chromatography with standards and UV-visible spectra characteristics (λ_{max} and $A_{440}/A_{\lambda max}$) compared to the literature data (Rodriguez-Saona, Giusti, & Wrolstad, 1999; Hong, & Wrolstad, 1990a, 1990b). The mass spectra were analyzed according to the literature data (Revilla, Pérez-Magariño, González-Sanjosé, & Beltrán, 1999; Degenhardt et al., 2000; Wu & Prior, 2005; Longo & Vasapollo, 2006).

2.6. Statistical analysis

To evaluate the differences in the anthocyanin composition between acerola varieties and harvests, and between açaí batches, analyses of variance were conducted using the ANOVA (Microcal Origin 5.0).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Açaí

The chromatogram obtained by HPLC-PDA of the anthocyanins from açaí is presented in Fig. 1A. Only the numbered peaks in the chromatogram obtained by the total ion current (TIC) from the HPLC-Vis-MS analysis (Fig. 1B) correspond to anthocyanin compounds, since the other peaks were not detected by the UV-visible detector set at 520 nm, being most probably non anthocyanics flavonoids.

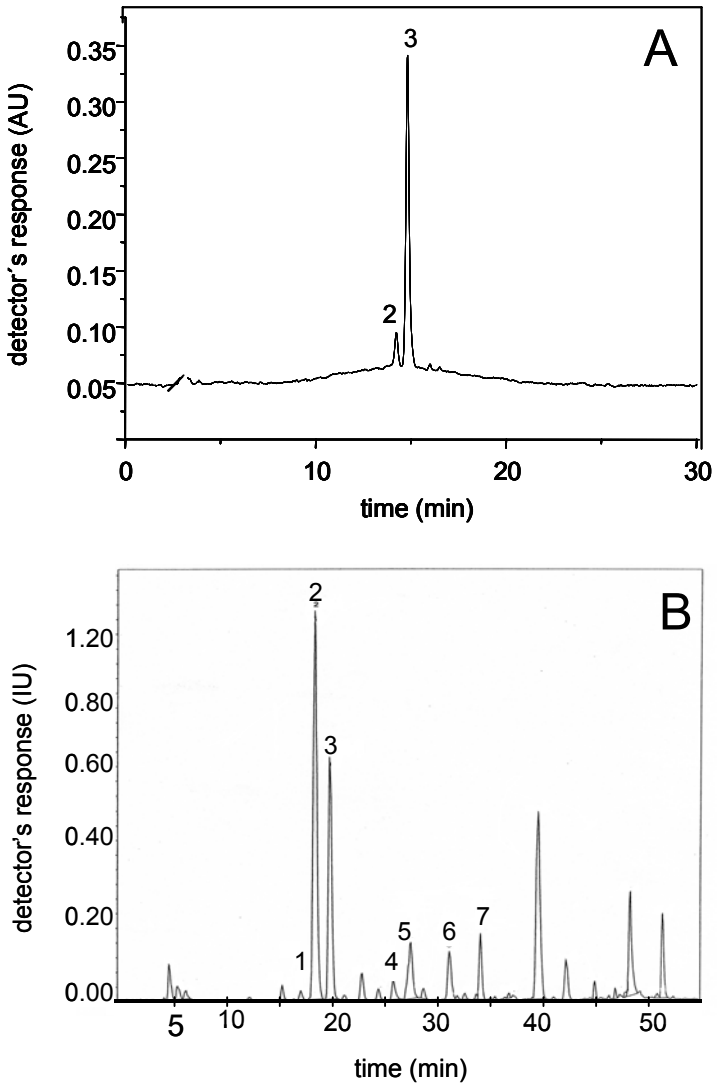


Fig. 1. (A) HPLC-PDA chromatogram processed at 520 nm, from the crude extract of anthocyanins from açaí. (B) HPLC-MS TIC chromatogram, from the partially purified extract of anthocyanins from açaí. Chromatographic conditions: see text. Peak identification is given in Table 1.

The UV-Vis spectra (Table 1) obtained by the PDA for peaks **1** to **7** showed λ_{max} at 518-528 nm, characteristic of cyanidin or peonidin derivatives (Hong & Wrolstad, 1999a). The presence of a shoulder between 420 and 440 nm and the $A_{440}/A_{\lambda max}$ ratio, values (Table 1) confirmed that all anthocynins were glycosilated only at the 3 position (Hong & Wrolstad, 1999a). The lack of a peak in the region of 310 nm excluded the presence of cinnamic acids in these anthocyanins.

Peak **1**, only detected by HPLC-MS, had a molecular ion $[M+H]^+$ at *m/z* 581, a mass fragment at *m/z* 449 related to the loss of a pentose followed by elimination of a hexose, furnishing an ion with 287 amu, which is correspondent to the cyanidin moiety (Table 1). From this fragmentation pattern, the anthocyanin **1** was considered as cyanidin-3-sambubioside. Peak **2** had a molecular ion $[M+H]^+$ at *m/z* 449 and a fragment ion with 287 amu, which corresponds to cyanidin moiety, as a result of the loss of a hexose (162 amu), Table 1. The sugar moiety was confirmed to be glucose by co-elution of peak **2** with the cyanidin-3-glucoside standard.

Peak **3** showed the molecular ion at *m/z* 595 and two mass fragments with 287 and 449 amu, the first fragment corresponds to the cyanidin moiety, as a result of the loss of a rutinose (308 amu) and the fragment at *m/z* 449 corresponds to the cyanidin moiety plus a molecule of hexose, as a result of the loss of a deoxyhexose (146 amu). The anthocyanin **3** was definitively identified as cyanidin-3-rutinoside by its HPLC co-elution with standard.

Peaks **4**, **5**, **6** and **7** were only detected by HPLC-MS. Peak **4** had a molecular ion $[M+H]^+$ at *m/z* 463 and a fragment ion with 301 amu, which corresponds to the $[M+H]^+$ of the anthocyanidin peonidin, as a result of the loss of a hexose (162 amu). Taking in account the elution order, the anthocyanin was tentatively identified as peonidin-3-glucoside. The mass spectrum of peak **5** showed that it was a mixture, whereas in the mass spectrum of peak **6**, only the ion correspondent to the cyanidin aglycon could be observed. Peak **7** had the $[M+H]^+$ at *m/z* 491 and fragment ions with 287 amu, which correspond to the cyanidin moiety, and at *m/z* 433 indicating the presence of a fragment with 58 amu linked to the sugar. In addition, its later elution indicates the presence of an acylated cyanidin derivative. OR Peak **7** had the $[M+H]^+$ at *m/z* 491 and a fragment ion with 287 amu, which corresponds to the cyanidin moiety, as a result of the loss of a acetylhexose (204 amu), being tentatively identified as cyanidin-3-acetylglucoside.

Table 1

Chromatographic, UV-Vis and mass spectroscopy characteristics of the anthocyanins from açaí and acerola, obtained by HPLC-PDA and HPLC-MS.

Peak[a]	t_R HPLC-PDA (min)	λ_{max} (nm)[b]	A_{440}/A_{max} (%)	t_R HPLC-MS (min)	λ_{max} (nm)[c]	$[M + H]^+$ (*m/z*)	MS/MS (*m/z*)	Compounds
açaí (*Euterpe oleracea* Mart)								
1	nd	nd	-	18.9	281, 526	581	287, 449	cyanidin-3-sambubioside
2	14.2	278, 330, 518	33	20.2	279, 518	449	287	cyanidin-3- glucoside
3	14.8	279, 330, 521	30	21.7	281, 522	595	287, 449	cyanidin-3- rutinoside
4	nd	nd	-	28.3	279, 520	463	301	peonidin-hexose
5	nd	nd	-	28.9	279, 522	-	-	not identified
6	nd	nd	-	33.0	279, 522	nd	287	cyanidin-derivative
7	nd	nd	-	35.7	283, 528	491	433, 287	cyanidin-acylated derivative
acerola (*Malpighia emarginata* DC.)								
1	15.8	278, 520	32	17.7	279, 518	433	287	cyanidin-3-rhamnoside
2	16.8	272, 427, 505	48	20.6	279, 508	417	271	pelargonidin-3-rhamnoside
3	18.5	273, 530	24	21.7	277, 526	579	287, 433	cyanidin-3,5-di-rhamnoside
4	20.2	264, 424, 517	41	27.8	271, 419, 514	447	301	peonidin-3-rhamnoside

[a] Numbered according to the chromatograms shown in Figure 1A and 2A.

[b] MP: methanol/5% formic acid (v/v) from 85:15 to 20:80 in 25 min, maintaining this proportion for 15 min.

[c] MP: water/formic acid/acetonitrile 87:10:3 (v/v) as solvent A and of 40:10:50 (v/v) as solvent B, linear gradient from 6 to 20% B from 0 to 20 min, to 40% B in 15 min, to 60% in 5 min and to 90% B in 5 min was used.

nd: not detected.

Cyanidin-3-rutinoside (peak **3**, Fig. 1A) was found as the major anthocyanin, representing in average 87.5%, followed by cyanidin-3-glucoside (peak **2**, Fig. 1A) with 13.2% of the total anthocyanin content in both batches of frozen açai pulp. These results are coincident with those reported by Gallori et al. (2004) and Lichtenthäler et al. (2005). On the other hand, this is the first time that the minor anthocyanins cyanidin-3-sambubioside, peonidin-3-glucoside and cyanidin-3-*O*-acetilglucoside are identified in açaí.

No significant difference on the total anthocyanin content was found between the two bacthes of açaí pulp from the same brand (Table 2). The total anthocyanin levels found in the present study are comparable to that of 263 mg/100g reported by Bobbio et al. (2000) for açaí peel. Cyanidin-3-glucoside was the major anthocyanin found in the range of 80.0 to 98.5% of the total anthocyanin content (30 to 463 mg/L) in samples of frozen açaí pulps obtained in Brazil and in Germany (Lichtenthäler et al., 2005). On the other hand, the total anthocyanin content was reported to be 50 mg/100g of lyophilized pulp from Brazil (Gallori et al., 2004), whereas Del Pozo-Insfran et al. (2004) found 1040 mg/L of cyanidin-3-glucoside and 74.4 mg/L of pelargonidin-3-glucoside in frozen pulp commercialized by a Colombian industry.

Different quantitative results is expected to be found since although all açaí fruits came from the Amazonic region, different amounts of water is allowed to be added to obtain the commercial açaí pulp, and morevover climatic conditions, variety, harvest, maturity stage are well known to influence the anthocyanin contents in foods. In fact, the levels of anthocyanins of açaí pulp made with fruits collected from the same trees in different years ranged from 88 to 211 mg/L (Lichtenthäler et al., 2005).

Table 2

Total anthocyanin content and relative composition of anthocyanins from açaí.

peak[a]	Anthocyanin	Peak area (%)[b]	
		Batch 1	Batch 2
2	cyanidin-3- glucoside	13.2	12.5
3	cyanidin-3- rutinoside	86.8	87.5
	Total Content (mg/100g)	282.5	303.7

[a] Numbered according to the chromatogram shown in Figure 1A.

[b]Average of samples in duplicate.

3.2. Acerola

Fig. 2A presents the chromatogram of the anthocyanin crude extract from acerola obtained by HPLC-PDA. The chromatogram of the partially purified extract analyzed by HPLC-MS can be seen in Fig. 2B. The UV-Vis and mass spectra characteristics of the separated peaks are given in Table 1.

The MS spectrum of peak **1** shows the $[M+H]^+$ at *m/z* 433 and a fragment with 287 amu, indicating the aglycon cyanidin glycosylated with a deoxyhexose due to the loss of 146 amu. Peak **2** showed an apparent molecular ion at *m/z* 417 and a fragment at *m/z* 271 corresponding to the aglycon pelargonidin, by the loss of a molecule of a deoxyhexose. The $[M+H]^+$ of peak **3** was detected at *m/z* 579 with fragments with 433 and 287 amu, due to two consecutive losses of deoxyhexose molecules. Peak **4** had the $[M+H]^+$ with 447 amu and a mass fragment at *m/z* 301 mass units that corresponds to the peonidin moiety from the loss of a deoxyhexose. The deoxyhexose found in all peaks is most probably rhamnose, the only deoxyhexose found, up to now, in anthocyanins (Strack & Wray, 1993).

By comparison of the $A_{440}/A_{\lambda max}$ values obtained from the UV-Vis spectra of peaks **1, 2** and **4** with those from the literature, the glycosilation at C-3 was confirmed, whilst the lower value of this ratio observed for peak **3** clearly indicated that this anthocyanin is glycosilated at both 3 and 5 positions (Hong & Wrolstad, 1990b). Figure 3 illustrates the UV/Vis spectral difference found between cyanidin-3-rhamnoside and cyanidin-3,5-di-rhamnoside. The presence of cinnamic acids was excluded in all compounds by the lack of absorbance in the region of 310 nm.

Combining the information given above, the anthocyanins identified in both acerola varieties were cyanidin-3-rhamnoside (peak **1**), pelargonidin-3-rhamnoside (peak **2**), cyanidin-3,5-di-rhamnoside (peak **3**) and peonidin-3-rhamnoside (peak **4**).

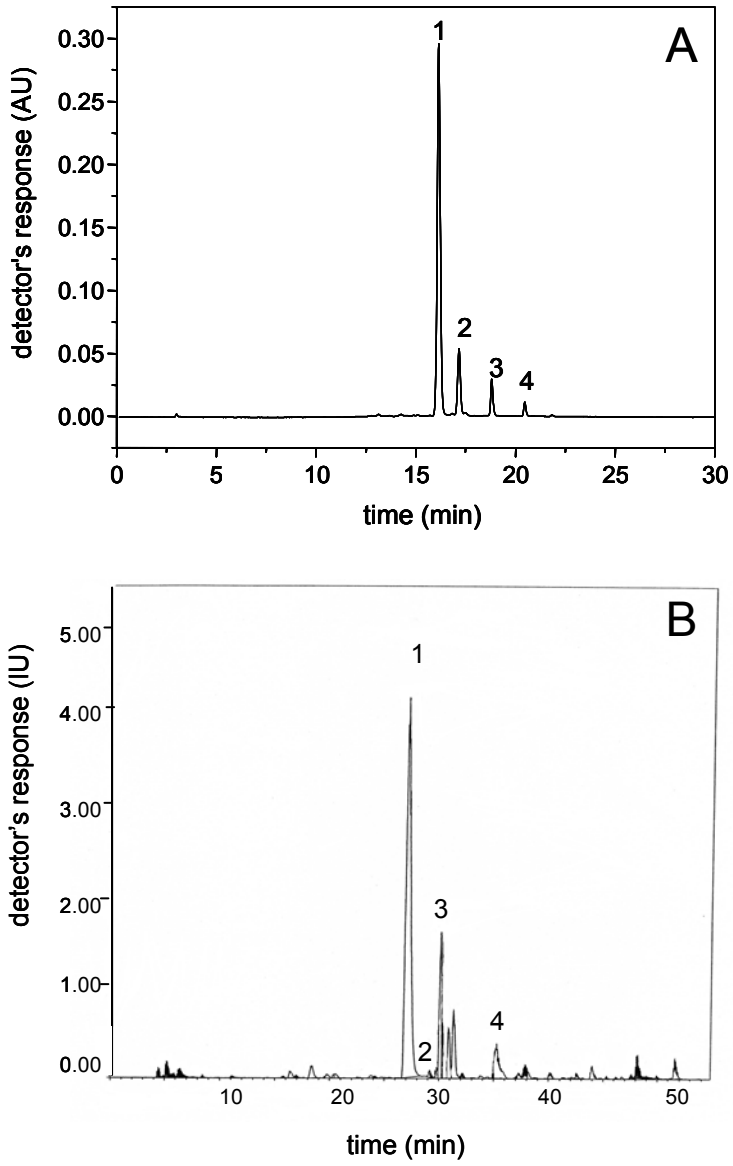


Fig. 2. (A) HPLC-PDA chromatogram processed at 520 nm from of the crude extract of anthocyanins from acerola Waldy Cati 30 variety. (B) HPLC-MS TIC chromatogram from the partially purified extract of anthocyanins from acerola Waldy Cati 30 variety. Chromatographic conditions: see text. Peak identification is given in Table 1.

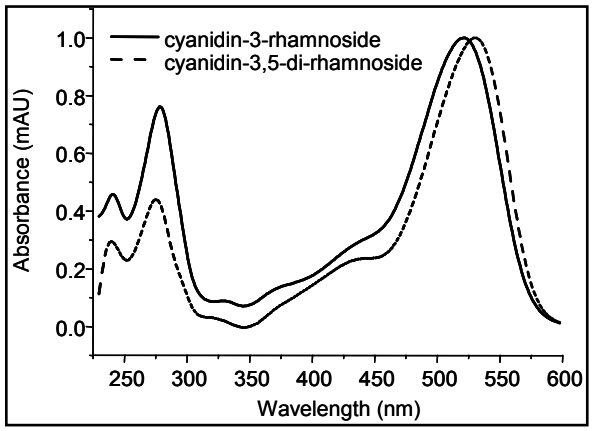


Fig. 3. UV-Vis spectra, obtained of HPLC-PDA, of cyanidin-3-rhamnoside and cyanidin-3,5-di-rhamnoside from acerola. Solvent: methanol/5% formic acid.

Cyanidin-3-α-*O*-rhamnoside (major) and pelargonidin-3-α-*O*-rhamnoside was already been identified by NMR in acerola (Hanamura et al., 2005), whilst using HPLC-MS the presence of cyanidin-3,5-di-rhamnoside and peonidin-3-rhamnoside is being reported for the first time in acerola.

Cyanidin-3-rhamnoside was the major anthocyanin found in both acerola varieties, ranging from 76 to 78% of the total anthocyanin content, followed by 12.7 - 15.7% of pelargonidin-3-rhamnoside, 5.6 - 7.6 % of cyanidin-3,5-di-rhamnoside and 2.2 – 3.0% of peonidin-3-rhamnoside.

As can be seen in Table 3, the differences in the relative amounts of the individual anthocyanins were not significant when both varieties were compared. On the contrary, in six strawberry cultivars the levels of total anthocyanins ranged from 13 to 55 mg/100g (Cordenunsi, Nascimento, Genovese, & Lajolo, 2002). Moreover, in four varieties of black currant the major anthocyanin was cyanidin-3-rutinoside whist delphinidin-3-rutinoside was the principal, in the other five varieties analyzed (Rubinskiene, Viskelis, Jasutiene, Viskeliene and Bobinas, 2005). On the other side, it is interesting to note that in red fruits, such as black current and strawberry, the major pigments are anthocyanins and for acerola the major class of pigments are carotenoids. In fact, remarkable differences in the carotenoid composition were found for the same samples analyzed in the present study (De Rosso & Mercadante, 2005).

The total anthocyanin contents were higher in the harvest of 2004 than in the one collected in 2003, although these differences were not significant for both varieties (Table

3). This fact could be attributed to the similar temperatures occurred in the month preceeding each harvest (January), 29.2 ± 2.8 °C in 2003 and 28.6 ± 2.0 °C in 2004, since all samples were collected from the same plantation. In addition, the rainfall in January of 2003 (323.7 mm) was higher than that of 2004 (242.6 mm), indicating that the highest sunlight exposition of both varieties of acerola in the year 2004 could be responsible for its higher content of anthocyanins.

Table 3

Total anthocyanin content and relative composition of anthocyanins from acerola.

Pk[a]	Anthocyanin	Peak area (%)[b]			
		2003 harvest		2004 harvest	
		Waldy Cati 30	Olivier	Waldy Cati 30	Olivier
1	cyanidin-3-rhamnoside	77.9 ± 1.8	76.2 ± 3.4	78.0 ± 3.4	77.1 ± 1.3
2	pelargonidin-3-rhamnoside	12.7 ± 2.6	15.0 ± 1.4	13.1 ± 1.5	15.7 ± 2.4
3	cyanidin-3,5-di-rhamnoside	7.1 ± 3.1	5.6 ± 2.4	7.3 ± 1.6	6.1 ± 0.8
4	peonidin-3-rhamnoside	2.5 ± 0.4	3.0 ± 0.5	2.2 ± 0.1	2.8 ± 0.2
	Total Content (mg/100g)	6.5 ± 0.7	7.9 ± 1.6	7.6 ± 1.0	8.4 ± 0.5

Pk: peak

[a] Numbered according to the chromatogram shown in Figure 2.

[b] Average and standard deviation of 3 batches in duplicate.

4. CONCLUSION

In conclusion, açaí can be considered a good source of anthocyanins compared to other known red fruits such as strawberry (Cordenunsi et al., 2002), raspberry (Ancos, Ibañez, Reglero, & Cano, 2000) and the tropical berry camu-camu (Zanatta, Cuevas, Bobbio, Winterhalter, & Mercadante, 2005). On the other hand, although the anthocyanins are responsible for the attractive red colour of acerola, the total level of this pigment can be considered low as compared to the fruits mentioned above.

Acknowledgements

The authors thank the Brazilian Funding Agency FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) for financial support.

REFERENCES

Ancos, B., Ibañez, E., Reglero, G., & Cano, P. (2000). Frozen storage effects on anthocyanins and volatile compounds of raspberry fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 873-879.

Assis, S. A., Lima, D. C., & Faria-Oliveira, O. M. M. (2001). Activity of pectinmethylesterase, pectin content and vitamin C in acerola fruit at various stages of development. *Food Chemistry*, 74, 133-137.

Bobbio, F. O., Druzian, J. I., Abrão, P. A., Fadelli, S., & Bobbio, P. A. (2000). Identificação e quantificação das antocianinas do fruto do açaízeiro (*Euterpe oleracea* Mart.). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 20 (3), 388-390.

Cordenunsi, B. R., Nascimento, J. R. O., Genovese, M. I., & Lajolo, F. M. (2002). Influence of cultivar on quality parameters and chemical composition of strawberry fruits grown in Brazil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2581-2586.

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

Del Pozo-Insfran, D. D., Brenes, C. H., & Talcott, S. T. (2004). Phytochemical composition and pigment stability of açaí (Euterpe oleracea Mart.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1539-1545.

De Rosso, V. V., & Mercadante, A. Z. (2005). Carotenoid composition of two Brazilian genotypes of acerola (*Malpighia punicifolia* L.) from two harvests. *Food Research International*, 38 (8-9), 1073-1077.

Francis, F.J. (1982). Analysis of Anthocyanins. In P. Markakis, *Anthocyanins as Food Colors*, (pp. 181-206). London: Academic Press.

Fuleki, T., & Francis, F. J. (1968). Quantitative methods form anthocyanins. 1. Extraction and determination of total anthocyanins in cranberries. *Journal Food Science*, 33, 72-77.

Gallori, S., Bilia, A. R., Bergonzi, M. C., Barbosa, W. L. R., & Vincieri, F. F. (2004). Polyphenolic constituints of fruit pulp of Euterpe oleracea Mart. (açai palm). *Chromatographia*, 59, 739-743.

Hanamura, T., Hagiwara, T., & Kawagishi, H. (2005). Structural and functional characterization of polyphenols isolated from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 69 (2), 280-286.

Hong, V., & Wrolstad, R. (1990a). Characterization of anthocyanin-containing colorants and fruit juices by HPLC/Photodiode Array Detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 698-708.

Hong, V., & Wrolstad, R. (1990b). Use of HPLC/Photodiode Array Detection for characterization of anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 708-715.

Kong, J., Chia, L., Goh, N., Chia, T., & Brouillard, R. (2003) Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 64, 923-933.

Lichtenthäler, R., Rodrigues, R. B., Maia, J. G. S., Papagiannopoulos, M., Fabricius, H., & Marx, F. (2005). Total oxidant scavening capacities of Euterpe oleracea Mart. (Açaí) fruits*. International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 56 (1), 53-64.

Longo, L., & Vasapollo, G. (2006). Extraction and identification of anthocyanins from Smilax aspera L. berries. *Food Chemistry*, 94, 226-231.

Oliveira, J. R. P., & Soares Filho, W. S. (1998). Situação da cultura da acerola no Brasil e ações da Embrapa Mandioca e Fruticultura em recursos genéticos e melhoramento. In *Proceedings of Simpósio de Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste do Brasil*.

Revilla, I., Pérez-Magariño, S., González-Sanjosé, M. L., & Beltrán, S. (1999). Identification of anthocyanin derivatives in grape skin extracts and red wines by liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatographia A*, *847*, 83-90.

Rodriguez-Saona, L. E., Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (1999). Color and pigment stability of red radish anthocyanins and red-fleshed potato anthocyanins in juice model systems. *Journal Food Science*, 61, 688-694.

Rogez, H. (2000). *Açaí: preparo, composição, e melhoramento da conservação*, Belém, Pará: EDUUFPA.

Rubinskiene, M., Viskelis, P., Jasutiene, I., Viskeliene, R., & Bobinas, C. (2005). Impact of various factors on the composition and stability of black currant anthocyanins. *Food Research Internacional*, 38, 867-871.

Santini, R., & Huyke, A. J. (1993). Identification of the anthocyanin present in the acerola which produces color changes in the juice on pasteurization and canning. *Journal*

Agriculture of University of Puerto Rico 40, 171, 156. In G. Mazza, & E. Miniati, *Anthocyanins in fruits, vegetables and grains*, p. 131. CRC Press Inc.

São José, A. B., & Alves, R. E. (1995). *Acerola no Brasil: produção e mercado*. Vitória da Conquista, Bahia: Il. Graf. Tab.

Seeram, N., & Nair, M. (2002). Inhibition of lipid peroxidation and structure- activity-related studies of the dietary constituents anthocyanins, anthocyanidins, and catechins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5308-5312.

Strack, D., & Wray, V. (1993). The anthocyanins. In: J. B. Harborne, *The flavonoids – Advances in research since 1986*, (pp.1-19), Boca Raton, Florida: CRC Press LLC.

Vendramini, A. L., & Trugo, L. C. (2000). Chemical composition of acerola fruit (*Malpighia punicifolia* L.) at three stages of maturity. *Food Chemistry,* 71, 195-198.

Vendramini, A. L., & Trugo, L. C. (2004). Phenolic compounds in acerola fruit (*Malpighia punicifolia* L.). *Journal Brazilian Chemical Society,* 15 (5), 664-668.

Zanatta, C. F., Cuevas, E., Bobbio, F. O., Winterhalter, P., & Mercadante, A. Z. (2005). Determination of anthocyanins from camu-camu (Myrciaria dubia) by HPLC-PDA, HPLC-MS and NMR. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 53, 9531-9535.

Wang, H., Cao, G. H., & Prior, R. L. (1997) Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 45 (2), 304-309.

Wrolstad, R. E., Giusti, M. M., Rodriguez-Saona, L. E., & Durst, R. W (2000). Anthocyanins from radishes and red-fleshed potatoes. In: J. M. Ames and T. F. Hofmann, *Chemistry and Physiology of selected food colorants*, (pp. 66-89), Washington: ACS Copyright Office.

Wu, X., & Prior, R. (2005). Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common foods in the United States: fruits and berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2589-2599.

CAPÍTULO IV

The high ascorbic acid content is the main cause of low anthocyanin stability in acerola

Artigo enviado ao periódico

Journal of Agricultural and Food Chemistry

ABSTRACT

Acerola is considered to be one of the best natural sources of ascorbic acid (AA) and, for this reason, the influence of this component on the stability of an extract of the acerola anthocyanins was determined as compared to an extract from açai, which does not possess AA. The addition of three different levels of AA to a solution of açai anthocyanins resulted in a 116-fold increase in the degradation rate (k_{obs}) at the highest fortification level (276 mg/100mL). The absence of light and an inert atmosphere promoted greater stability to the acerola and AA-fortified açai anthocyanin systems. The fact that the flavonoid concentration of the açai anthocyanin extract was 10 times higher than that of the acerola extract, was probably responsible for the higher stability (3 times) of the AA-fortified açai system as compared to the acerola system, both at the same AA concentration and similar total polyphenol levels. The greater the level of AA addition to açai anthocyanin solutions, the greater the increment of L^* and decrease of C^*.

Keywords: anthocyanins; ascorbic acid; stability; acerola; açai

INTRODUCTION

The anthocyanins belong to the flavonoid class of compounds and are especially found in flowers and fruits, being responsible for their attractive colors varying from red to blue (*1*). Due to the great variety of hue colors and their solubility in water, the anthocyanins represent an alternative with good potential to substitute the red-bordeaux artificial dyes in foods. However, many commercial limitations exist for the application of anthocyanin extracts in food products, including their low stability, which is influenced by pH, temperature, oxygen, light, polymeric forms, concentration, the presence of phenolic compounds and the chemical structure.

The low stability of the acerola anthocyanins represents a problem during the storage of the pasteurized juice and frozen pulp of this fruit. Due to the color fade that occurs in these products, dyes such as cochineal, tartrazine yellow and Bordeaux red, have been added to these products in Brazil.

The presence of ascorbic acid (AA) has shown a negative impact on anthocyanin stability, leading to the mutual degradation of these compounds (*2-4*). The mechanism proposed by Jurd (*5*) and later reinforced by Poein-Langston & Wrolstad (*6*) for the degradation of anthocyanins in the presence of AA, consists of the direct condensation of AA on the carbon 4 of the anthocyanin, causing the loss of both. On the other hand, according to Iacobucci & Sweeny (*7*), the loss of anthocyanin color caused by AA occurs due to oxidative cleavage of the pyrylium ring by a free radical mechanism in which the AA acts as a molecular oxygen activator, producing free radicals. Shrinkhande & Francis (*8*) reported that the presence of flavonol exerted a protective effect with respect to the degradation of anthocyanins in the presence of AA, probably competing with the anthocyanins in the preference for condensation reactions. The negative effect on color caused by the AA-fortification of grape anthocyanins was also verified by instrumental color measurement, leading to an increment in lightness (*L**) and decrease in red color (a*) (*3*).

The number of hydroxyl and methoxyl groups, the nature and number of sugars and acids attached to the sugars has a great effect on the anthocyanin stability (*9*). Di-glycosidic substitution confers greater stability to the molecule than a mono-glycosidic substitution (*9, 10*). The presence of sugar residues acylated with acids promotes greater stability, preventing hydration reactions (*11, 12*). It must be mentioned that independent of the amount of naturally present or added AA, the relative stability of the various anthocyanins due to their different structures remains as cited above (*13-15*).

Considering that acerola is recognized as one of the best sources of AA (*16, 17*), the objective of the present study was to evaluate the effect of high levels of AA on the color and stability of acerola anthocyanin solutions as compared to those of açai, another tropical fruit, but one containing no AA in its composition. In addition, the importance of the contribution of co-factors, environmental conditions and the chemical structures of the anthocyanins present in these fruits, were also verified.

MATERIALS AND METHODS

Materials. HPLC grade standards of catechin (Fluka, Steinheim, Germany) and gallic acid (Extrasynthèse, Genay, France) were used, as also the solvents for high performance liquid chromatography (HPLC) obtained from Merck (Darmstadt, Germany). The other reagents used were all of analytical grade, citric acid and sodium phosphate dibasic from Labsynth (Diadema, Brazil), the Folin-Ciocalteau reagent and ascorbic acid from Merck. The water was purified in the Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA) and the samples and solvents were filtered through Millipore membranes (0.22 and 0.45 μm).

Anthocyanin extracts. *In natura* acerola fruits (4 Kg) from the region of Campinas, São Paulo State, Brazil, were pulped in a knife pulper to remove skins and seeds. The açai was obtained in the form of commercial frozen pulp (1 Kg) from a outlet in Campinas. The fruit pulps were exhaustively extracted with 1% HCl in methanol, with agitation provided by a homogenizer (Metabo, Nurtingen, Germany). The solution obtained was then filtered and vacuum concentrated (T < 38 ºC) to complete evaporation of the methanol. This concentrated crude extract of anthocyanins (CE) was stored at –18 ºC under nitrogen.

Model-systems. The anthocyanin solutions were prepared from the acerola and açai CE in pH 2.5 citrate-phosphate buffer plus 0.1% sodium benzoate to prevent microbial growth. Three different AA levels (30, 138 and 276 mg/100 mL) were added to the açai anthocyanin solution. In all the systems the initial absorbance of the anthocyanin solutions was established maintaining the ratio of CE mass to buffer volume constant. The solutions were allowed to rest for 3 hours in the absence of light, to attain the equilibrium among the different forms of anthocyanin, the absorbance being monitored every hour. The initial absorbance of the solutions (A_0) was measured at the maximum absorption wavelength in the visible region (λ_{max}). The solutions were then distributed in screw-capped tubes with a nominal volume of 10 mL. A part of each solution of acerola, açai and the AA fortified açai was aspersed with nitrogen in the tubes, which were then sealed.

These tubes were placed in a support between two 32 W fluorescent lamps, corresponding to 850 lux, in a room free of other light sources at a temperature of 20 ± 1 ºC. Other tubes of each solution were maintained in the same room but in the absence of light, to serve as control.

Monitoring of the model-systems. The stability of the anthocyanins was monitored using a Beckman DU-70 spectrophotometer (Fullerton, CA), measuring the loss of the solution absorbance at λ_{max} up to an approximately 75% loss as compared to the initial absorbance.

Additionally, the change in color of the anthocyanin solutions was measured through the CIELAB *L**, *a** and *b** parameters as determined by the Color Quest XE colorimeter (Hunter Lab., Reston, Virginia) equipped with the light source D_{65} and observer's angle of 10 º. Using the parameters the values for *C** (chroma), h (hue angle) and ΔE^* (total color difference) were calculated using eqs. 1 to 3.

$$C^* = \left[(a^*)^2 + (b^*)^2\right]^{1/2} \quad (1)$$

$$h = \arctan\left(b^*/a^*\right) \quad (2)$$

$$\Delta E^* = \left[(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2\right]^{1/2} \quad (3)$$

The relative losses of each anthocyanin in the various model-systems were evaluated by HPLC, removing aliquots at the beginning, middle and end of the period experiment. The aliquots were dried under nitrogen with the addition of absolute alcohol, removing all the water. The anthocyanins were re-dissolved in acidified methanol immediately before the HPLC analysis. A high efficiency liquid chromatograph (Waters, Milford, MA) was used, consisting of a quaternary solvent pumping system, Rheodyne injector with a 20 μL loop, external oven with temperature control, on-line degasser, diode array detector (PDA) and the Millenium data collection and processing system. The anthocyanins were separated on a (5μm, 250 x 4.6 mm) C_{18} Shim-pak CLC-ODS column (Shimadzu, Canby, Oregon). The mobile phase was a linear gradient of 5% aqueous formic acid/methanol, going from 85:15 (v/v) to 20:80 in 25 minutes, the isocratic proportion being maintained for a further 15 minutes, at a flow rate of 1 mL/min and column temperature maintained at 25 ºC. The chromatograms were processed at 280, 320 and 520 nm, and the spectra acquired between 200 and 600 nm.

Phytochemical analysis. The total anthocyanin contents of the acerola and açai pulps and their respective CE were determined using the differential pH method (*18*) and quantified using the absorption coefficient of $A\ {}^{1\%}_{1cm} = 982$, corresponding to the anthocyanin extract of cranberry (*19*). The total polyphenols and flavonoids were extracted according to Singleton & Rossi (*20*), the polyphenols being quantified using the Folin-Ciocalteau reagent and the flavonoids by the Zhishen et al. method (*21*), the results being respectively expressed in equivalents of gallic acid (GAE) and catechin (CCE). The contribution of AA in the Folin-Ciocalteau reaction was established in the solutions prepared from the acerola CE. AA was determined by HPLC using the equipment and column described above and as mobile phase an isocratic elution of aqueous sulphuric acid solution at pH 2.5, flow rate at 0.7 mL/min, column temperature of 25 ºC and chromatogram processing at 254 nm (*22*). Each sample was analyzed in duplicate and quantified by way of an external calibration curve, the area of the sample peak being compared with that of the ascorbic acid standard.

Kinetic calculations and statistical analysis. The anthocyanin concentration (% residual anthocyanins) was plotted against time (hours) and a linear regression analysis was used to determine the adequacy of the anthocyanin degradation kinetic model. The degradation constant (k_{obs}) was determined from the first derivative of the curves plotted (eq. 4) and the half-life time calculated from eq 5.

$$[anthocyanin] = [anthocyanin]_0 * \exp(k_{obs} \cdot t) \quad (4)$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_{obs}} \quad (5)$$

The ANOVA analyses were carried out using the Student´s *t*-test at a significance level of 95%. The software Microcal Origin 5.0 was used for all the analyses, both statistical and kinetic.

RESULTS AND DISCUSSION

Influence of AA on the anthocyanin extract stability. Since the buffer solutions at pH 2.5 prepared with the acerola CE presented an AA concentration of 276 mg/100mL, the açai model-system solutions were fortified to the same level (276 mg/100mL) and also at half this concentration (138 mg/100mL). A further sample was prepared with an addition of 30 mg/100mL, a value used previously in blood orange juice (*23*).

In all the systems evaluated, the degradation of the anthocyanins in the acerola and açai solutions followed first-order kinetics. The crude anthocyanin extract from açai showed higher stability than that of acerola in all the systems (**Table 1**).

Table 1. Rate constants (k_{obs}) and half-life times ($t_{1/2}$) for anthocyanin degradation in acerola and açai model-systems in citrate-phosphate buffer at pH 2.5 and 20ºC.

model-systems	k_{obs} (h^{-1})[a]	$t_{1/2}$ (h)[a]	r
acerola-CE air/light	5.05×10^{-2}	13.7	0.998
acerola-CE air/dark	3.95×10^{-2}	17.5	0.996
acerola-CE N_2/light	3.70×10^{-2}	18.7	0.991
acerola-CE N_2/dark	3.18×10^{-2}	21.7	0.990
açai-CE air/light	7.64×10^{-4}	909.0	0.987
açai-CE air/dark	1.07×10^{-4}	6456.2	0.926
açai-CE N_2/light	5.43×10^{-4}	1275.6	0.993
açai-CE N_2/dark	8.41×10^{-5}	8235.4	0.914
açai-CE + AA (276 mg/100mL) air/light	1.65×10^{-2}	42.0	0.997
açai-CE + AA (276 mg/100mL) air/dark	1.25×10^{-2}	55.2	0.994
açai-CE + AA (276 mg/100mL) N_2/light	1.04×10^{-2}	66.6	0.971
açai-CE + AA (276 mg/100mL) N_2/dark	9.18×10^{-3}	75.5	0.984
açai-CE + AA (138 mg/100mL) air/light	1.46×10^{-2}	47.6	0.999
açai-CE + AA (138 mg/100mL) air/dark	1.18×10^{-2}	58.4	0.981
açai-CE + AA (30 mg/100mL) air/light	1.03×10^{-2}	66.9	0.991
açai-CE + AA (30 mg/100mL) air/dark	8.87×10^{-3}	78.1	0.989

[a]Average of duplicate experiments.

The addition of 276 mg AA/100mL to the açai anthocyanin solution caused a 109 to 116-fold increase in the degradation rate (k_{obs}) when compared to non-fortified açai, respectively under nitrogen and air, both in the absence of light (**Figure 1A** and **Table 1**). With the decrease in fortification level to 138 and 30 mg/100mL, a non-linear decrease in the k_{obs} values for the degradation of açai anthocyanins occurred (**Figure 1A**); in other words the anthocyanin degradation was not dose-dependent on the AA concentration. Under dark at 37 ºC and pH 3.5, Del Pozo-Insfran et al. (*14*) verified a 30-fold increase in the açai anthocyanin degradation rate after the addition of AA at a concentration of 45 mg/100mL, although a 83-fold increase was verified with 30 mg/100mL AA fortification in the present study. This difference can be either related to the greater AA degradation at higher temperature and pH values or to the different composition of the samples.

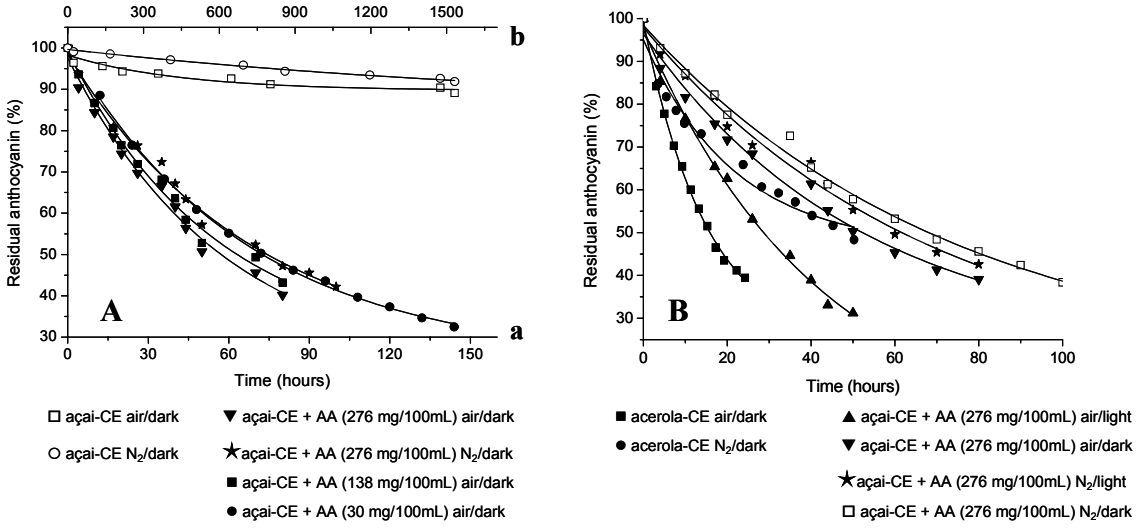


Figure 1. Degradation kinetic curves of the anthocyanins from acerola and açai fortified with AA at different levels model-systems in citrate-phosphate buffer at pH 2.5.
In **Fig. 1A**: scale a: açai-CE + AA, scale b: açai-CE.

The k_{obs} value obtained for the acerola-CE solution was three times higher than that of the açai solution fortified at 276 mg AA/100mL, although the two solutions presented the same AA concentration (**Figure 1B**, **Table 1**). This difference could have been due to the fact that the flavonoid concentration in the açai anthocyanin extract was 10 times higher than in that of acerola, the total polyphenol contents of the two extracts being similar (**Table 2**). The flavonoids can protect the açai anthocyanins by inter-molecular co-

pigmentation, which promotes an increase in the stability of the anthocyanins by reducing the production of the carbinol pseudobase and stabilizing the quinonoidal anhydrobase (*24*). Shrikhande & Francis (*8*) also reported such a protective effect, where the presence of flavonoids, such as quercitin and quercitrin, retarded the degradation of cranberry anthocyanins by 20% in 72 hours, due to the action of AA.

Table 2. Phytochemical characteristics of the pulps and anthocyanin extracts from acerola and açai.

phytochemical characteristics	acerola	açai
total anthocyanins (mg/100g)[a]	7.21	282.5
monomeric anthocyanins (%)[b]	75	62
total polyphenols (mg GAE/100g)[b]	3300.3	3782.6
total flavonoids (mg CCE/100g)[b]	53.3	537.0
ascorbic acid (mg/100g)[b]	1920.8	nd

Average of duplicate analysis.

[a]determined in the acerola and açai pulps

[b]determined in the acerola and açai anthocyanin crude concentrated extract

n.d.- not detected

GAE- gallic acid equivalent

CCE- catechin equivalent

Another factor possibly contributing to the greater stability of the açai anthocyanin extract could be intra-molecular co-pigmentation. However, the differences in chemical structure between the açai and acerola anthocyanins are not significant, acerola presenting cyanidin-3-rhamnoside and pelargonidin-3-rhamnoside as the principle anthocyanins (*25*) and açai cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-rutinoside (*26, 27*). None of the anthocyanins from both sources presented acylated groups which could promote greater stability of the anthocyanins, such as observed in red grape and hibiscus anthocyanins (*14*). In addition, both acerola and açai presented cyanidin as the major aglycone in their composition, and thus the contribution difference of the hydroxyl and methoxyl groups in these structures can be discarded. Both the acerola and açai anthocyanins presented mono-glycosidic substitution and thus, in the same way, there was no difference in the stability due to glycosidic substitution.

Effect of oxygen and light. The degradation found for both the acerola and açai anthocyanin solutions in an inert atmosphere were *ca.* 1.3 to 1.4 times lower than in air, both in the presence and absence of light (**Figure 2, Table 1**). For the AA fortified (276mg/100mL) açai anthocyanin systems, the values for k_{obs} under nitrogen were 1.8 and 1.4 times lower than under air, respectively under light and dark (**Figure 1B**). These results were similar to those reported by Kaack & Austed (*28*) where under oxygen the degradation rate of the cyanidin-3-glucoside, present in an elderberry extract, was 1.6 times higher than under nitrogen. Chan & Yamamoto (*29*) reported that the stability of the anthocyanins in acerola juice was 1.8 times higher when stored under nitrogen than under oxygen.

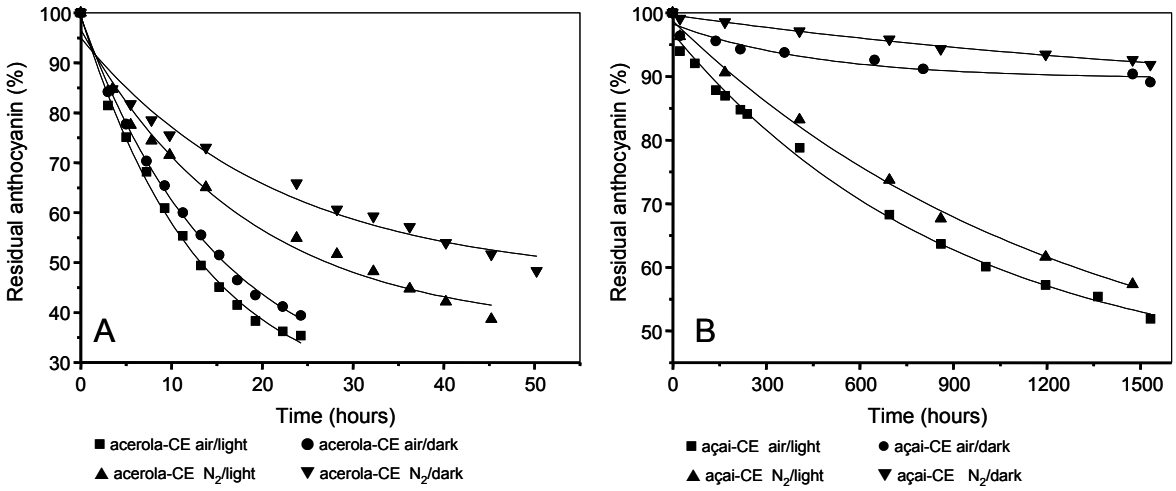


Figure 2. Anthocyanin degradation curves, in citrate-phosphate buffer at pH 2.5, from (**A**) acerola and (**B**) açai.

The deleterious effect of light was more intense for the anthocyanins of açai than for those from acerola (**Figure 2**). The k_{obs} values found for the açai anthocyanin systems in the dark were 7.1 times lower under air and 6.5 times under nitrogen than those found in the presence of light. On the other hand, for the acerola anthocyanin systems, the k_{obs} values found in the dark were only 1.3 and 1.2 times lower than in the light, respectively under air and nitrogen. In addition, the k_{obs} values found for the 276 mg/100 mL AA fortified açai model-systems in the dark were also only about 1.3 times smaller than in the presence of light, both under air and under nitrogen. These results show that the deleterious effect of the AA naturally present or added to anthocyanin solutions is greater

than that of any other factor, such as the presence of light or oxygen. Thus the presence of AA is the main cause of anthocyanin degradation in acerola.

The mutual degradation of anthocyanins and ascorbic acid (AA) has been demonstrated in various systems (*7, 30, 31*), although the reaction mechanism has not been completely elucidated. Since in the absence of light, the k_{obs} value of the açai anthocyanin systems without added AA was 109 times smaller than that obtained for the fortified system under inert atmosphere and 116 times lower in the presence of oxygen, it is thus evident that the main degradation pathway occurred due to the condensation reaction between the AA and anthocyanins, with a small contribution from the free radical reaction. Skrede et al. (*30*) also suggested the direct condensation as the reaction leading to anthocyanin degradation in strawberry syrup after the addition of AA.

Changes in the relative composition of the anthocyanins. During storage of the açai and acerola anthocyanin solutions both in the presence and absence of light and of oxygen, a gradual decrease in the peak areas of each anthocyanin was verified, without the appearance of intermediate degradation compounds absorbing at 520, 320 and 280 nm. Rodríguez-Saona et al. (*2*) did also not detected anthocyanin degradation products in a red radish juice type model system after 26 weeks of storage at 25 ºC, neither in the presence or absence of light.

Independently of the presence of light and air, the acerola anthocyanins cyanidin-3-rhamnoside, pelargonidin-3-rhamnoside and cyanidin-3,5-dirhamnoside, which represented, respectively, 77%, 14% and 7% of the total area at zero time, showed area losses of 70%, 85% and 92% after 24 hours, whilst peonidin-3-rhamnoside, which presented 3% of the relative area at zero time, disappeared in 24 hours (**Figure 3A**).

However, the relative açai anthocyanins degradation was dependent on the condition of the system. For example, cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-rutinoside, which corresponded to respectively 13% and 87% of the relative area, were degraded 63% and 56% under light and oxygen (**Figure 3B**), whereas decreased to 50% and 43% under light and nitrogen, both in 1532 hours. On the other hand, the relative anthocyanin degradation was similar under the different conditions for each level of AA fortification to the açai systems.

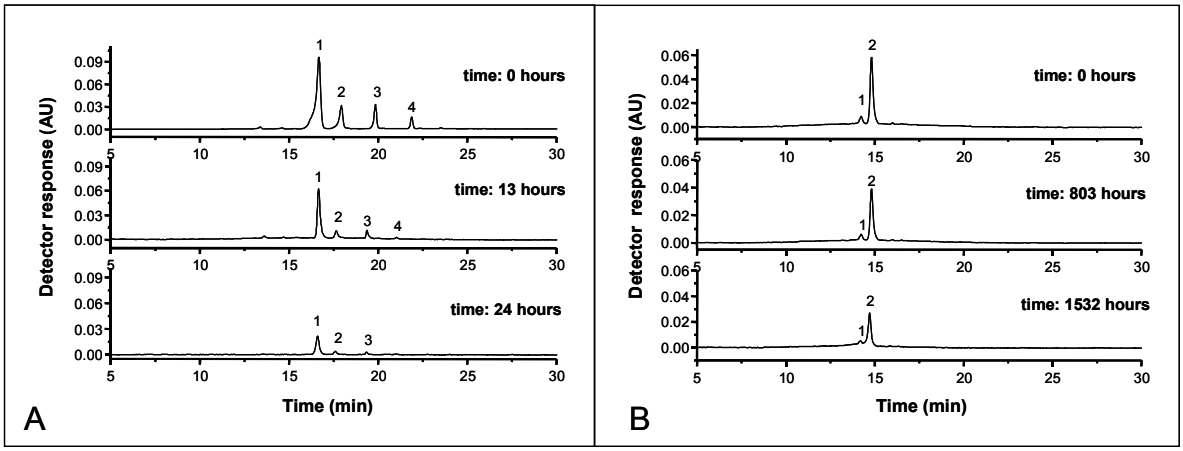


Figure 3. HPLC-PDA chromatograms obtained during the degradation of (**A**) acerola and (**B**) açai anthocyanins in phosphate-citrate buffer at pH 2.5, in the presence of light and air. See text for chromatographic conditions.

Since the structures of the acerola and açai anthocyanins can be considered similar and not complex, the concentration of each anthocyanin present in the systems was the factor most influencing the degradation, considering that the anthocyanin degradation follows first-order kinetic, that is, the greater the anthocyanin concentration the lower the degradation rate.

Changes in the ascorbic acid concentration. The results for AA loss in the various model-systems, both that naturally present and that added, as verified by HPLC at the beginning, middle and end of storage, showed that the presence of light did not influence AA degradation (**Table 3**). The AA degradation was 1.2 and 1.9 times lower under nitrogen than under air, for the acerola and 276 mg/100 mL AA fortified açai, respectively. Iversen (*31*) also verified that the light did not show a significant effect on AA degradation in blackcurrant nectar, however de-aeration of the blackcurrant nectar did not increase the stability of the AA in relation to the nectar stored under oxygen.

Under the same conditions, AA degradation in the acerola system was slightly greater than in the açai system fortified with 276 mg AA/100mL (**Table 3**), probably due to the higher flavonoid concentration in the açai anthocyanin extract. In this type of interaction, the flavonoids can act in two ways: one by competition between the flavonoids and the AA for the condensation reaction with the anthocyanins, and the other by interfering in the free radical formation reaction, which would lead to AA auto-oxidation (*8*). The influence of the ratio between the concentrations of the anthocyanins and flavonoids

would be relevant in both mechanisms, apart from the chemical structures of the anthocyanins and flavonoids.

Table 3. AA degradation in acerola and AA-fortified açai anthocyanin model-systems in citrate-phosphate buffer at pH 2.5.

model-systems	degradation (%)		
	t start	t middle	t end
acerola-CE air/light	0	4.6	8.1
acerola-CE air/dark	0	4.5	8.0
acerola-CE N_2/light	0	3.4	6.9
acerola-CE N_2/dark	0	3.4	6.7
açai-CE + AA (276 mg/100mL) air/light	0	3.9	7.4
açai-CE + AA (276 mg/100mL) air/dark	0	3.9	7.4
açai-CE + AA (138 mg/100mL) air/light	0	6.8	12.6
açai-CE + AA (30 mg/100mL) air/light	0	10.3	18.8
açai-CE + AA (276 mg/100mL) N_2/light	0	2.5	3.9
açai-CE + AA (276 mg/100mL) N_2/dark	0	2.5	3.9

In the açai model-systems, the greater the addition of AA, the lesser its degradation, indicating a first-order kinetic reaction during storage. This result agrees with those of various studies (*30, 31*).

In the present study, the anthocyanin degradation was between 5 and 10 times higher than AA degradation, under the evaluated conditions. Iversen (*31*) also observed this behavior in blackcurrant nectar stored in the light at 20ºC, where the anthocyanin degradation rate was four times higher than that of the ascorbic acid.

Color stability. Differences in the color parameters of the acerola and açai systems can be attributed to various factors, amongst which the different quantitative and qualitative composition of the anthocyanins, the nature of the phenolic compounds and the proportion between these compounds and the anthocyanins in the extracts.

The negative effect on color caused by AA fortification was easily distinguishable, resulting in color fading (increased L^* and decreased C^* values) during storage.

The parameter L^* is associated with the intensity of luminosity that the solution transmits, and the linear behavior of the ln L^* versus time curve (**Figure 4A**) confirmed that

the anthocyanin degradation in all systems followed first-order kinetics. Since the values CIE *a** (red color) and *b** (yellow color) are indicative of colored compounds present in the solution, as *a** values decreased during storage, as a consequence the *L** values increased. The parameter *C** is related to color intensity and hence as degradation occurred, the value for *C** also decreased (**Figure 4C**).

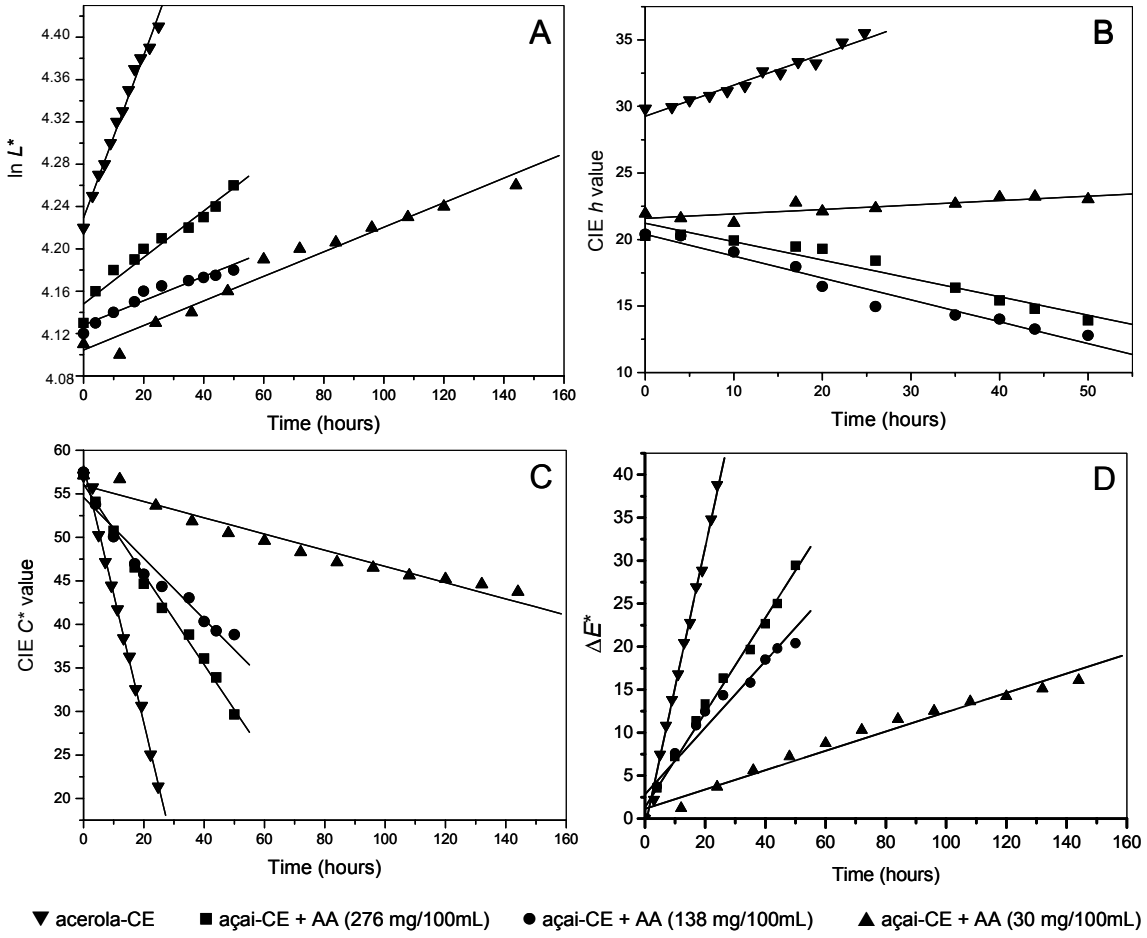


Figure 4. Changes in the color parameters values (**A**) ln *L**, (**B**) hue angle (*h*), (**C**) Chroma (*C**) and (**D**) ΔE^* for the model-systems of acerola and AA fortified açai anthocyanin extracts, in phosphate-citrate buffer at pH 2.5, in the presence of light and air.

The hue angle parameter (*h*) defines the species of color, which can be yellow, red, violet, brown or some other. The *h* values had a different behavior depending on the AA level fortification and anthocyanin source. The *h* values of the açai solutions fortified with AA at 276 and 138 mg/100mL decreased during storage, whilst in the açai solution fortified

at 30 mg AA/100mL and in the acerola model-systems, the *h* values increased (**Figure 4B**). Brenes et al. (*3*) also reported that the *h* values of the anthocyanin solutions fortified with AA at 45 mg/100mL, increased due to the decrease in *a** (flavylium cation) and increase in *b** (chalcone). This effect can also be verified for the açai system without fortification in **Figure 5**.

On the other hand, in the present study the *b** values decreased in all systems with high AA levels (**Figure 5B**), despite the increased *h* value in the AA fortified-açai and decreased *h* value in acerola systems (**Figure 5A**). Since the initial (28.40) and final (12.41) *b** values in the acerola systems were higher than those in the fortified-açai solutions (19.84 and 7.14), the mathematical relationship used to calculate the *h* value led to the different behavior in this parameter found for both extracts. The initial higher *b** value in the acerola systems can be due to the higher carotenoid concentration in this fruit, 370 to 1881 μg/100g (*32*), compared to açai 223 to 307 μg/100g (*33*). In addition, the preferential formation of colorless condensation compounds with AA, as previously discussed, is probably responsible for the decreased *b** values during storage of the systems with high AA levels.

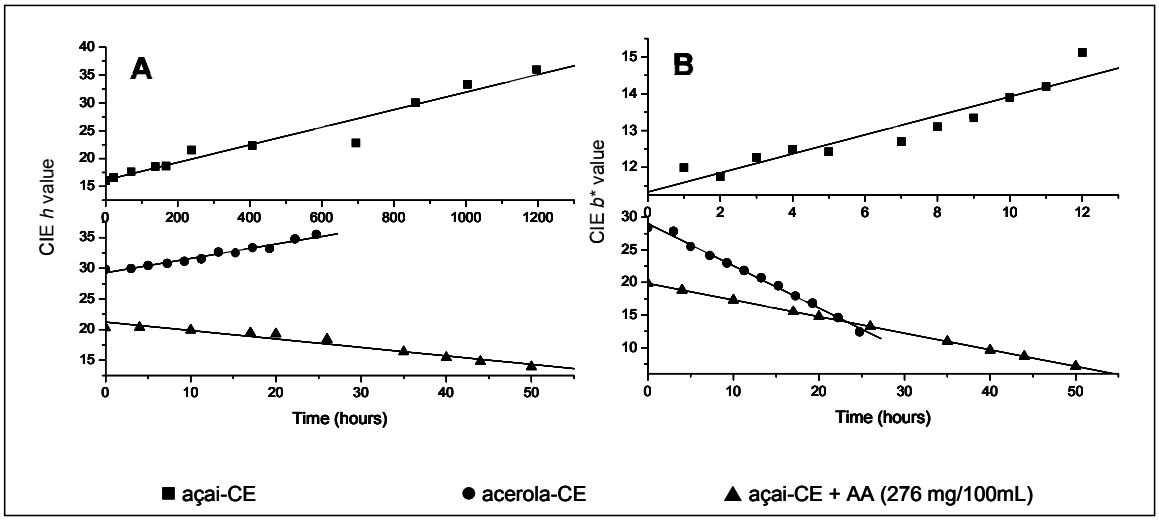


Figure 5. Changes in the color parameters values (**A**) hue angle (*h*) and (**B**) b* for the model-systems of anthocyanin extracts from acerola and from açai with and without the addition of AA, in phosphate-citrate buffer at pH 2.5, in the presence of light and air.

The overall color difference (ΔE^*) was more intense in the acerola systems, followed by the açai in decreasing fortification order (**Figure 4D**). The final values of ΔE^* were 29.4, 20.4 and 16.0 for the açai systems fortified with AA at concentrations of 276, 178 and 30 mg/100mL, respectively, and the value for the acerola system was 38.8, all under light and air.

Since a threshold value of $\Delta E^*=1$ is assumed as a basis for a color difference noticeable by the human eye (*34*) and in the present study the final ΔE^* values were greater than 1, this fact proves that fortification at the higher AA level produced a greater fade. In addition, the final ΔE^* value of the acerola system was greater than that calculated for the açai system fortified with 276 mg AA/100mL, indicating that the presence of other compounds in the anthocyanin extracts also presented a considerable effect on the color (*34*).

In summary, the results of the present study prove that the presence of elevated concentrations of ascorbic acid is the main cause of the low stability of the acerola anthocyanins, which occurs mainly due to the direct condensation of the AA on carbon 4 of the anthocyanin, resulting in losses of both components. Anthocyanin degradation is responsible for the loss in red color of the frozen acerola pulp and processed juice, the main problem occurring during the commercial storage of these products.

Acknowledgements

The authors thank the Brazilian Funding Agency FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) for financial support.

LITERATURE CITED

(1) Strack, D.; Wray, V. The anthocyanins. In *The Flavonoids – Advances in Research since 1986*; Harborne, J. B., Ed.; CRC Press LLC: Boca Raton, Florida, **1993**, pp.1-19.

(2) Rodriguez-Saona, L. E.; Giusti, M. M.; Wrolstad, R. E. Color and pigment stability of red radish and red-fleshed potato anthocyanins in juice model systems. *J. Food Sci*. **1999**, 64, 451-456.

(3) Brenes, C. H.; Del Pozo-Insfran, D.; Talcott, S. Stability of copigmented anthocyanins and ascorbic acid in a grape juice model system. *J. Agric. Food Chem*. **2005**, 53, 49-56.

(4) Garzón, G. A.; Wrolstad, R. E. Comparison of the stability of pelargonidin-based anthocyanins in strawberry juice and concentrate. *J. Food Sci*. **2002**, 67, 1288-1299.

(5) Jurd, L. Some advances in the chemistry of anthocyanins-type plant pigments. In *The Chemistry of Plant Pigments*, ed C. O. Chichester, Academic Press, New York and London, **1972**, pp. 123-142.

(6) Poei-Langston, M. S.; Wrolstad, R. E. Color degradation in an ascorbic acid-anthocyanin-flavonol model system. *J. Food Sci*. **1981**, 46, 1218-1222.

(7) Iacobucci, G. A.; Sweeny, J. G. The chemistry of anthocyanins and related flavylium salts. *Tetrahedron* **1983**, 39, 3005-3038.

(8) Shrikhande, A. J.; Francis, F. J. Effect of flavonols on ascorbic acid and anthocyanin stability in model systems. *J. Food Sci*. **1974**, 39, 904-906.

(9) Mazza, G.; Miniati, E. *Anthocyanins in Fruits, Vegetables and Grains*; Mazza, G.; Miniati, E., Ed.; CRC Press: Boca Raton, **1993**, pp. 120-145.

(10) Markakis, P. Stability of anthocyanins in foods. In *Anthocyanins as Food Colors*. Markakis, P., Ed.; Academic Press: New York, NY, **1982**; pp. 163-180.

(11) Asen, S.; Stewart, R. N.; Norris, K. H. Co-pigmentation of anthocyanins in plant tissue and its effect on color. *Phytochemistry* **1972**, 11, 1139-1145.

(12) Giusti, M. M.; Wrolstad, R. E. Characterization of red radish anthocyanins. *J. Agric. Food Chem*. **1996**, 61, 322-326.

(13) Hrazdina, G.; Franzese, A. J. Oxidation products of acylated anthocyanins in neutral aqueous solution. *Phytochemistry* **1974**, 13, 231-234.

(14) Del Pozo-Insfran, D. D.; Brenes, C. H.; Talcott, S. T. Phytochemical composition and pigment stability of açai (*Euterpe oleracea* Mart.). *J. Agric. Food Chem*. **2004**, 52, 1539-1545.

(15) Garcia-Viguera, C.; Bridle, P. Influence of structure on color stability of anthocyanins and flavylium salts with ascorbic acid. *Food Chem.* **1999**, 64, 21-26.

(16) Vendramini, A. L.; Trugo, L. C. Chemical composition of acerola fruit (*Malpighia punicifolia* L.) at three stages of maturity. *Food Chem.* **2000**, 71, 195-198.

(17) Assis, S. A.; Lima, D. C.; Faria-Oliveira, O. M. M. Activity of pectinmethylesterase, pectin content and vitamin C in acerola fruit at various stages of development. *Food Chem.* **2001**, 74, 133-137.

(18) Lee, J.; Durst, R. W.; Wrolstad, R. E. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juice, beverages, natural colorants and wines by pH differential method: Collaborative study. *J. AOAC Int.* **2005**, 88, 1269-1278.

(19) Francis, F. J. Analysis of Anthocyanins In *Anthocyanins as Food Colors*. Markakis, P., Ed.; Academic Press: New York, NY, **1982**; pp. 181-207.

(20) Singleton, V. L.; Rossi, J. A. Jr. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Viticult.* **1965**, 16, 144-158.

(21) Zhinshen, J.; Mengcheng, T.; Jianming, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem*. **1999**, 64, 555-559.

(22) Souza, M. C. C.; Benassi, M. T.; Meneghel, R. F. A.; Silva, R. S. S. F. Stability of unpasteurizes and refrigerated orange juice. *Braz. Arch. Biol. Technol*. **2004**, 47, 391-397.

(23) Choi, M. H.; Kim, G. H.; Lee, H. S. Effects of ascorbic acid retention on juice color and pigment stability in blood orange (*Citrus sinensis*) juice during refrigerated storage. *Food Res. Int.* **2002**, 35, 753-759.

(24) Mazza, G.; Brouillard, R. The mechanism of co-pigmentation of anthocyanin in aqueous solutions. *Phytochemistry* **1990**, 29, 1097-1102.

(25) Hanamura, T.; Hagiwara, T.; Kawagishi, H. Structural and functional characterization of polyphenols isolated from acerola (*Malpighia emarginata* DC) fruit. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2005**, 69, 280-286.

(26) Gallori, S.; Bilia, A. R.; Bergonzi, M. C.; Barbosa, W. L. R.; Vincieri, F. F. Polyphenolic constituents of fruit pulp of *Euterpe oleracea* Mart. (açai palm). *Chromatographia* **2004** 59, 739-743.

(27) Lichtenthäler, R.; Rodrigues, R. B.; Maia, J. G. S.; Papagiannopoulos, M.; Fabricius, H.; Marx, F. Total oxidant scavenging capacities of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) fruits. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2005**, 56, 53-64.

(28) Kaack, K.; Austed, T. Interaction of vitamin C and flavonoids in elderberry (*Sambucus nigra L*.) during juice processing. *Plant Food Hum. Nutr*. **1998**, 52, 187-198.

(29) Chan, H. T.; Yamamoto, H. Y. Kinetics of anthocyanin decomposition in acerola juice. *ASEAN Food J.* **1994**, 9, 132-135.

(30) Skrede, G.; Wrolstad, R. E.; Lea, P.; Enersen, G. Color stability of strawberry and blackcurrant syrups. *J. Food Sci*. **1992**, 57, 172-177.

(31) Iversen, C. K. Black currant nectar: Effect of processing and storage on anthocyanin and ascorbic acid content. *J. Food Sci*. **1999**, 64, 37-41.

(32) De Rosso, V. V.; Mercadante, A. Z. Carotenoid composition of two Brazilian genotypes of acerola (*Malpighia punicifolia* L.) from two harvests. *Food Res. Int.* **2005**, 1073-1077.

(33) De Rosso, V. V.; Zanatta, C. F.; Silva, S. R.; Mercadante, A. Z. Carotenoids in tropical fruits from Brazil - acerola, camu-camu and açai In *Proceedings of International Carotenoid Symposium*, **2005**, Edinburg.

(34) Gonnet, J-F. Colour effects of co-pigmentation of anthocyanins revisited. 1: A colorimetric definition using the CIELAB scale. *Food Chem*. **1998**, 63, 409-415.

CAPÍTULO V

Estabilidade do extrato antociânico de acerola e de açaí em sistema simulador de bebida isotônica

Artigo em preparação para envio para o periódico

Food Chemistry

Abstract

A viabilidade do emprego dos extratos antociânicos de acerola e de açaí como ingrediente funcional foi avaliada através da determinação da estabilidade das antocianinas destas frutas tropicais em sistema simulador de bebidas isotônicas em comparação com sistema tampão. A degradação das antocianinas seguiu uma cinética de primeira ordem, e a estabilidade em sistema simulador de bebida isotônica foi 1,3 e 1,7 vezes menor do que nos sistemas tampão citrato-fosfato para as antocianinas de acerola e de açaí, respectivamente, na presença de luz e atmosfera de oxigênio. A maior concentração de polifenóis e de flavonóides e a ausência de ácido ascórbico nos extratos antociânicos de açaí estão provavelmente correlacionados com a maior estabilidade destas antocianinas em todos os sistemas. A luz apresentou um efeito deletério na estabilidade das antocianinas, sendo mais intenso para as os sistemas de açaí do que nos de acerola. Em todos os sistemas, a gradual degradação da cor vermelha e aumento da cor amarela foi observada através do incremento do parâmetro CIE L* e diminuição dos valores de C* que podem ter resultado da degradação do cátium flavilium e formação de chalconas.

Palavras chave: acerola, açaí, estabilidade, sistema de bebida isotônica

1. Introdução

As antocianinas são pigmentos responsáveis pelas cores variando do vermelho ao azul de muitas frutas, vegetais, grãos e flores, sendo que os extratos ricos em antocianinas obtidos de frutas e vegetais podem ser utilizados como corantes alimentícios. Nos Estados Unidos, 4 dos 26 corantes que são isentos de certificação e aprovados para adição em alimentos são derivados de extrato de antocianinas de casca de uva, de suco de fruta e de suco de vegetais (Wrolstad, 2004). Uma das fontes mais abundantes é a uva *marc*, cuja produção mundial é de 65 milhões de toneladas (Mazza & Miniati, 1993). Outras frutas, tais como *elderberries, black currants, chokeberries, raspberries* e *blackberries*, e repolho roxo também têm sido utilizadas como corantes de antocianinas para produtos alimentícios e bebidas (Wrolstad, 2004). Além da propriedade corante, as antocianinas possuem potencial terapêutico como anti-inflamatório, como agentes quimiopreventivos, e vaso protetores (Wang, Cao, & Prior, 1997), inibição da oxidação das LDL e diminuição do risco de doenças cardiovasculares (Seeram & Nair, 2002).

A acerola e o açaí são frutas tropicais, sendo que a acerola é reconhecida como alimento funcional devido ao seu alto conteúdo de vitamina C, 957 a 1074 mg/100 g (Vendramini & Trugo, 2000; Assis, Lima, & Faria-Oliveira, 2001) além da presença de carotenóides (De Rosso & Mercadante, 2005), e antocianinas (Santini & Huyke, 1993; Hanamura, Hagiwara, & Kawagishi, 2005). Por outro lado, o açaí é considerado uma fruta energética, rica em antocianinas (Bobbio, Druzian, Abrão, Fadelli, & Bobbio, 2000).

O emprego dos extratos antociânicos de acerola e de açaí como corante e ingrediente funcional em bebidas isotônicas torna-se muito interessante devido ao crescimento do mercado de produtos alimentícios que fazem bem à saúde. Além disso, o mercado brasileiro de bebidas isotônicas movimentou mais de 77 milhões de litros em 1996 e a tendência de crescimento é de 4,8% ao ano entre 2002 e 2006 (López, 2002). Entretanto existem muitas limitações para a aplicação comercial de antocianinas em produtos alimentícios e bebidas, devido à baixa estabilidade desses pigmentos, que é dependente da própria estrutura química, concentração, pH, temperatura, presença de oxigênio, luz, ácido ascórbico, polifenóis e de açúcares, dentre outros fatores.

O efeito da adição de açúcares na estabilidade das antocianinas está diretamente correlacionado com a quantidade e o tipo de açúcar adicionado ao meio. Skrede, Wrolstad, Lea, e Enersen (1990) reportaram um efeito protetor nas antocianinas de morango quando se aumentou em 20% a concentração de açúcares. Por outro lado,

Dyrby, Westergaard, e Stapelfeldt (2001) verificaram que as taxas de degradação dos extratos antociânicos de repolho roxo, casca de uva, *blackcurrant* e *elderberry* nos sistemas-modelo de isotônico (86 g sacarose/L) foram cerca de duas vezes maiores do que no sistema tampão, ambos em pH 3. Malien-Aubert, Dangles, e Amiot (2001) demonstraram que em sistemas líquidos adicionados de açúcar (100 g/L) a degradação de diversas antocianinas, entre elas de uva *marc*, *elderberry* e *blackcurrant*, foi maior do que nos sistemas controle em pH 3,0, 4,0 e 5,0. No entanto, a estabilidade da cor obtida a partir do valor do *Brown Index* ($BI=A_{430nm}/A_{520nm}$) e da $\%A_{520\ nm}$ não foi significativamente influenciada pela adição de açúcar (Malien-Aubert et al., 2001).

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a estabilidade dos extratos de antocianinas de acerola e de açaí em sistema simulador de bebida isotônica, verificando a contribuição da composição dos extratos e das condições ambientais.

2. Materiais e métodos

2.1. Materiais

Os solventes foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Os demais reagentes usados foram de grau analítico, sendo o ácido cítrico, fosfato de sódio bibásico, benzoato de sódio, sacarose, frutose, glucose, citrato de sódio, cloreto de sódio, cloreto de potássio e o fosfato monobásico de potássio da Labsynth (Diadema, São Paulo, Brasil) e o Reagente de Folin-Ciocalteau da Merck. A água foi purificada por um sistema Milli Q (Millipore, Bedford, MA), e as amostras e os solventes foram filtrados utilizando membranas filtrantes (0,22 e 0,45 μm) da Millipore.

2.2. Obtenção dos extratos de antocianinas

A acerola *in natura* obtida na CEAGESP e proveniente da região de Campinas, Estado de São Paulo, foi despolpada para a remoção das cascas e sementes em uma despolpadeira de facas. O açaí foi adquirido sob a forma de polpa congelada comercial. A polpa das frutas foi extraída exaustivamente com uma solução metanólica de HCl 1% sob agitação promovida por um homogeneizador (Metabo, Nürtingen, Alemanha). Em seguida a solução foi filtrada e concentrada a vácuo (T<38º C) até evaporação total do metanol. O extrato bruto concentrado de antocianinas (CE) foi armazenado em freezer sob atmosfera de nitrogênio.

2.3. Preparação dos sistemas-modelo

Foram preparadas soluções de antocianinas a partir dos CE de acerola e de açaí em tampão citrato-fosfato e em um sistema simulador de bebida isotônica contendo, por 1 litro, 0,15 g de benzoato de sódio, 55,0 g de sacarose, 5,5 g de frutose, 5,5 g de glucose, 3,0 g de ácido cítrico, 0,14 g de citrato de sódio, 0,5 g de cloreto de sódio, 0,5 g de cloreto de potássio e 0,4 g de fosfato monobásico de potássio, ambos em pH 2.5. Foi adicionado 0,1% de benzoato de sódio na solução tampão para prevenir o crescimento microbiano. Em todos os sistemas a absorbância inicial das soluções de antocianinas foi estabelecida mantendo constante a relação entre a massa do CE e o volume da solução. As soluções foram deixadas em repouso por 3 horas em ausência de luz, a 20º C para que o equilíbrio entre as diferentes formas antociânicas fosse atingido. As soluções tiveram a absorbância inicial (A_0) medida no comprimento de onda de absorção máxima na região do visível (λ_{max}) e distribuídas em tubos com tampa rosqueável de volume nominal de 10 mL. Os tubos contendo as soluções foram colocados em suporte posicionado entre duas lâmpadas do tipo fluorescente de 32 W, correspondente a 850 lux, em sala livre de outra fonte de luz à temperatura de 20 $\pm$ 1 ºC. Tubos de cada solução também permaneceram como controle na mesma sala, em ausência de luz.

2.4. Monitoramento dos sistemas-modelo

A degradação das antocianinas nos sistemas foi monitorada por espectrofotometria através da perda da absorbância da solução com leituras no λ_{max} na região do visível em determinados intervalos de tempo em espectrofotômetro Beckman DU-70 (Fullerton, CA) até perda de aproximadamente 75% da absorbância inicial.

As mudanças de cor nas soluções de antocianinas foram medidas através dos parâmetros CIELAB *L**, *a** e *b** determinados pelo colorímetro Color Quest XE (Hunter Lab, Reston, Virginía) equipado com um iluminante D_{65} e ângulo do observador de 10º. A leitura das soluções foi realizada em cubetas empregando o modo (TTRAN-transmitância total). Utilizando os parâmetros determinados foram calculados o *C** (croma), *h* (ângulo de tonalidade) e ΔE^* (diferença global de cor), através das equações 1 a 3.

$$C^* = \left[(a^*)^2 + (b^*)^2\right]^{1/2} \quad \text{eq. 1}$$

$$h = \arctan\left(b^*/a^*\right) \quad \text{eq. 2}$$

$$\Delta E^* = \left[(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2\right]^{1/2} \quad \text{eq. 3}$$

A perda relativa de cada antocianina nos diversos sistemas foi avaliada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), retirando alíquotas nos tempos inicial, intermediário e final. As alíquotas foram secas sob nitrogênio com adição de etanol absoluto, para remoção de toda água. Imediatamente antes da análise por HPLC, as antocianinas foram redissolvidas em metanol acidificado. Foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Waters, Milford, MA), constituído de um sistema quaternário de bombeamento de solventes, injetor Rheodyne com loop de 20μL, forno externo com controle de temperatura, desgaseificador *on line*, detector de arranjo de diodos (PDA) e sistema de aquisição e processamento de dados Millenium. As antocianinas foram separadas em uma coluna de fase reversa C_{18} Shim-pak CLC-ODS (5μm, 250 x 4,6 mm, Shimadzu, Canby, Oregon) utilizando como fase móvel um gradiente linear de eluição com 5% ácido fórmico aquoso/metanol de 85:15 (v/v) a 20:80 em 25 minutos, sendo mantida essa proporção isocrática por 15 minutos. O fluxo da fase móvel foi 1,0 mL/min e a temperatura da coluna mantida a 25º C. Os cromatogramas foram processados a 280, 320 e 520 nm, e os espectros foram adquiridos entre 200 e 600 nm.

2.5. Análises fito-químicas

Os polifenóis totais e flavonóides totais foram extraídos de acordo com Singleton e Rossi (1965). Os polifenóis foram quantificados através do método de Folin-Ciocalteau, e os flavonóides quantificados pelo método de Zhinshen, Mengcheng, e Jianming (1999), e os resultados expressos em equivalente de ácido gálico (GAE) e de catequina (CAE), respectivamente. A contribuição do ácido ascórbico (AA) na reação de Folin-Ciocalteu foi estabelecida através da adição de diferentes concentrações de AA aos extratos de acerola (CE). O AA foi determinado por HPLC (Souza, Benassi, Meneghel, & Silva, 2004) utilizando o equipamento e coluna estão descritos no item 2.4, com eluição isocrática de solução aquosa de ácido sulfúrico pH 2,5 como fase móvel a 0,7 mL/min, temperatura da coluna de 25ºC e processamento do cromatograma a 254 nm. Cada amostra foi analisada em duplicata usando uma curva de calibração externa para a quantificação, sendo a área do pico da amostra comparado com a do padrão de ácido L-ascórbico.

2.6. Cálculos cinéticos

Foram plotadas as curvas de concentração de antocianinas (% antocianinas residual) versus tempo (horas) e uma análise de regressão linear foi utilizada para determinar a adequacidade do modelo cinético de degradação das antocianinas. A

constante de degradação (k_{obs}) foi determinada a partir da derivada primeira das curvas plotadas (equação 4) e o tempo de meia-vida foi calculado a partir da equação 5. O estabelecimento do modelo para cinética de degradação e os demais cálculos foram realizados através do software Microcal Origin 5.0.

$$[antocianina] = [antocianina]_0 * \exp(k_{obs} \cdot t) \qquad \text{eq.4}$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_{obs}} \qquad \text{eq. 5}$$

3. Resultados e discussão

3.1. Estabilidade de antocianinas

Em todas as condições avaliadas, a cinética de degradação das antocianinas de acerola e de açaí tanto em meio tamponado como em sistema simulador de bebida isotônica foi de primeira ordem (Fig. 1). Este comportamento já havia sido reportado por Skrede et al. (1992) em xarope de morango e de *blackcurrant* e por Katsaboxakis, Papanicolaou e Melanitou (1998) em bebida etanólica e carbonatada preparada a partir do extrato antociânico de laranja vermelha.

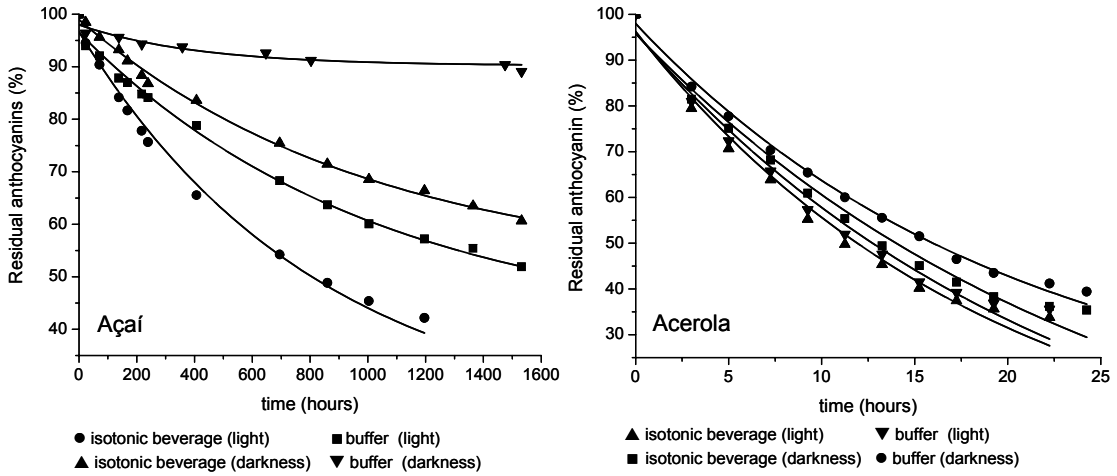


Fig. 1. Curvas cinéticas da degradação das antocianinas de açaí e de acerola em sistemas tampão citrato-fosfato e simulador de bebida isotônica, ambos em pH 2,5, na presença de ar e na presença/ausência de luz.

A presença de açúcares e sais apresentou efeito significativo na estabilidade das antocianinas de acerola e de açaí, tendo em vista que os valores de k_{obs} dos sistemas

simulador de bebida isotônica foram 1,5 e 6,8 vezes maiores que os valores obtidos para o sistema tampão citrato-fosfato de acerola e de açaí, respectivamente, em ausência de luz (Tabela 1). Em presença de luz os valores de k_{obs} dos sistemas simulador de bebida isotônica foram 1,2 e 1,6 vezes maiores que os valores obtidos para o sistema tampão citrato-fosfato de acerola e de açaí. Dyrby et al. (2001) também reportaram que em sistema de *soft drink*, contendo 86 g de sacarose por litro de solução antociânica de *blackcurrant* e de *elderberry*, os valores de k_{obs} foram, respectivamente, 1,8 e 17,8 vezes maiores que os obtidos para as soluções destes extratos antociânicos em tampão citrato-fosfato em pH 3,0 a 25ºC em presença de luz.

Tabela 1. Valores da constante de velocidade (k_{obs}) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) para a degradação das antocianinas de acerola e de açaí em sistemas tampão fosfato-citrato e simulador de bebida isotônica, em pH 2.5 na presença de ar a 20º C.

Sistemas		**k_{obs} (h^{-1})**	**$t_{1/2}$ (h)**
acerola - tampão	luz	$5,0 \times 10^{-2}$	13,7
	escuro	$3,9 \times 10^{-2}$	17,5
acerola - isotônico	luz	$6,6 \times 10^{-2}$	10,6
	escuro	$6,0 \times 10^{-2}$	11,4
açaí - tampão	luz	$7,6 \times 10^{-4}$	909,1
	escuro	$1,1 \times 10^{-4}$	6456,2
açaí - isotônico	luz	$1,3 \times 10^{-3}$	548,2
	escuro	$7,3 \times 10^{-3}$	943,4

Malien-Aubert *et al*. (2001) também verificaram que a degradação de antocianinas foi significativamente maior em sistemas adicionados com 8,6 % de açúcar do que nos sistemas controle em todos os valores de pH avaliados.

A estabilidade das antocianinas de acerola no sistema simulador de bebida isotônica em ausência de luz foi 82 vezes menor que a das antocianinas de açaí nas mesmas condições (Tabela 1). A baixa estabilidade da bebida isotônica de acerola é provavelmente devido à elevada concentração de ácido ascórbico (AA) presente no extrato antociânico empregado na elaboração da bebida (De Rosso & Mercadante, 2006). Skrede et al. (1990) reportaram que a adição de AA (11 mg/100 g de suco) antes da preparação do xarope de morango (51ºBrix) levou à diminuição da estabilidade das

antocianinas do xarope em 1,5 vezes, quando comparado ao xarope sem adição de AA. Outro fator que pode ter contribuído para a diferença de estabilidade verificada entre os extratos antociânicos de acerola e de açaí é o efeito protetor exercido pelos flavonóides e polifenóis presentes nestes extratos. A concentração de flavonóides no extrato antociânico de açaí é 10 vezes maior do que no extrato de acerola, enquanto que os teores de polifenóis totais foram semelhantes nos dois extratos (Tabela 2). Os flavonóides podem proteger as antocianinas de açaí através da co-pigmentação inter-molecular que promove um aumento da estabilidade por reduzir a produção de pseudobase carbinol e estabilizar a base quinoidal (Mazza & Brouillard, 1990). Esse efeito protetor também foi reportado por Shrikhande e Francis (1974) onde a presença de flavonóides como quercetina e quercitrina retardaram em 20% a degradação das antocianinas de *cranberry*.

Tabela 2. Características fito-químicas dos extratos brutos concentrados antociânicos (CE) de acerola e de açaí.

Características fito-químicas	acerola[a]	açaí[a]
fenóis totais (mg GAE/100g)	3300,3	3782,6
flavonóides totais(mg CAE/100g)	53,3	537,0
ácido ascórbico (mg/100g)	1920,8	nd

[a] Média das análises em duplicata.
n.d.- não detectado
GAE- equivalente de ácido gálico
CAE- equivalente de catequina

Diferenças na estabilidade da bebida isotônica das duas frutas não pode ser atribuída a co-pigmentação intra-molecular, pois a estrutura química das antocianinas de açaí e de acerola é muito similar, uma vez que a acerola apresenta as antocianinas cianidina-3-ramnosídeo e a pelargonidina-3-ramnosídeo como antocianinas majoritárias (Hanamura et al., 2005), enquanto o açaí apresenta como antocianinas a cianidina-3-glucosídeo e a cianidina-3-rutinosídeo (Gallori, Bilia, Bergonzi, Barbosa, & Vincieri, 2004; Lichtenthäler, Rodrigues, Maia, Papagiannopoulos, Fabricius, & Marx, 2005). Além disso, nenhuma das antocianinas das duas fontes apresenta grupamentos acilados que podem promover maior estabilidade às antocianinas. tal como foi observado por Malien-Aubert et al. (2001) que verificou que em sistemas-modelo de bebidas com/sem adição de açúcar

as antocianinas aciladas (purple carrot, red radish e repolho roxo) foram mais estáveis que as antocianinas não aciladas (uva-marc, elderberry, black-currant e chokeberry).

O efeito deletério da luz na estabilidade das antocianinas foi mais intenso para as antocianinas de açaí do para as de acerola (Figura 1). Os valores de k_{obs} dos sistemas em tampão citrato-fosfato e em bebida isotônica de antocianinas de açaí no escuro foram, respectivamente, 5,0 e 1,7 vezes menores do que os determinados na presença de luz. Já os valores de k_{obs} dos sistemas das antocianinas de acerola no escuro foram somente 1,3 e 1,1 vezes menores do que na luz, nos sistemas tampão e isotônico, respectivamente.

3.2 Mudanças na composição relativa de antocianinas

A perda individual das antocianinas de açaí e de acerola em sistema simulador de bebida isotônica foi similar à ocorrida no sistema tamponado, na luz sob atmosfera de ar. Não foi detectado o aparecimento de compostos de degradação com absorção em 520, 320 e 280 nm, tanto na presença como na ausência de luz. Rodriguez-Saona, Giusti e Wrolstad (1999) e Martí, Pérez-Vicente e García-Viguera (2001) também não detectaram produtos de degradação das antocianinas de suco de rabanete vermelho e de suco de pomegranate, respectivamente.

A degradação individual de cada antocianina presente em todos os sistemas avaliados foi proporcional a sua concentração na solução, ou seja, quanto maior a concentração da antocianina menor a taxa de degradação, esse resultado era esperado, uma vez que a reação de degradação das antocianinas foi de primeira ordem (Figura 1). No sistema simulador de isotônico as antocianinas de acerola, cianidina-3-ramnosídeo, pelargonidina-3-ramnosídeo e cianidina-3,5-di-ramnosídeo que representavam 77, 14 e 7% da área total no tempo inicial mostraram uma perda de área de 76, 92 e 98% em 20 horas, enquanto a peonidina-3-ramnosídeo que representava 3% da área relativa no tempo inicial desapareceu em 20 horas (Figura 2A). A degradação das antocianinas de açaí, também no sistema simulador de isotônico ocorreu pela perda de área da cianidina-3-glucosídeo e cianidina-3-rutinosídeo, que correspondiam a 13 e 87% da área relativa e degradaram 90 e 76% em 1000 horas em presença de luz e ar (Figura 2B)

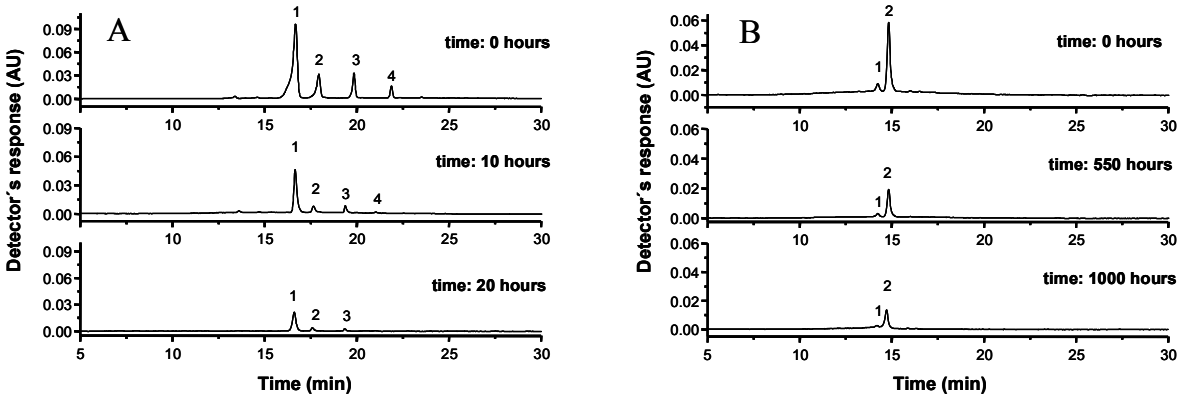


Fig. 2. Cromatogramas, obtidos por HPLC-PDA, durante reação de degradação das antocianinas de acerola e de açaí em sistema-modelo de bebida isotônica, na presença de luz e de ar. A) acerola (pico1- cianidina-3-ramnosídeo, pico 2-pelargonidina-3-ramnosídeo, pico 3- cianidina-3,5-di-ramnosídeo e pico 4- peonidina-3-ramnosídeo), B) açaí (pico 1- cianidina-3-glucosídeo e pico 2- cianidina-3-rutinosídeo). Condições cromatográficas: ver texto.

3.3. Estabilidade da cor

A gradual degradação visual da cor vermelha foi observada em todos os sistemas avaliados ao longo do estabelecimento da cinética de degradação das antocianinas de acerola e de açaí. Verificou-se o incremento dos valores do parâmetro *L** que está associado à intensidade de luminosidade que a solução transmite e o comportamento linear da curva de ln *L** versus tempo (Figura 3) confirma que a degradação das antocianinas de acerola e de açaí nos sistemas tampão citrato-fosfato e simulador de bebida isotônica seguiram uma cinética de primeira ordem (Figura 3).

O incremento dos valores de *h* (Figura 4) e a diminuição dos valores de *C** (Figura 5) estão diretamente relacionados à diminuição da cor vermelha e aumento da cor amarela, que neste caso são provavelmente resultado da degradação do cátium flavilium e formação de chalconas ou compostos de polimerização. Resultados semelhantes foram reportados em xaropes de morango e de *blackcurrant* por Skrede et al. (1992) e em sistema simulador suco de uva por Brenes, Del Pozo-Insfran e Talcott (2005).

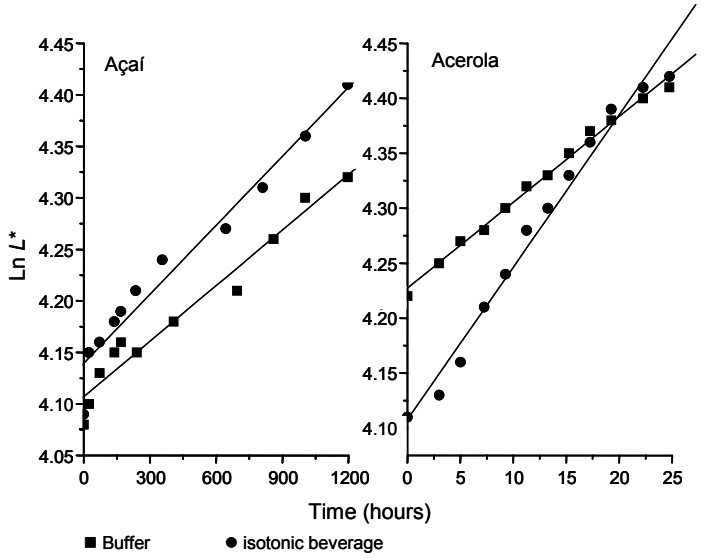


Fig. 3. Mudanças no parâmetro de cor CIE *L** para os sistemas-modelo tampão citrato-fosfato e bebida isotônica de antocianinas de acerola e de açaí, pH 2,5 na presença de luz e de ar.

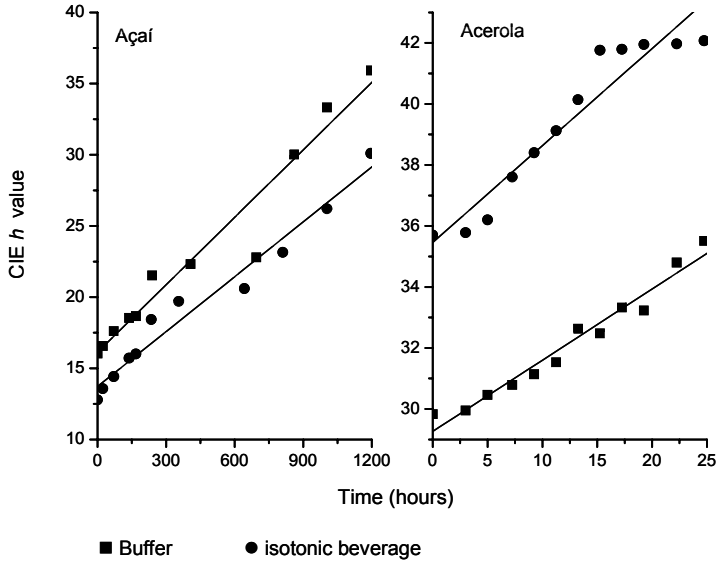


Fig. 4. Mudanças no parâmetro de cor *h* para os sistemas tampão citrato-fosfato e simulador de bebida isotônica de antocianinas de acerola e de açaí, pH 2,5 na presença de luz e de ar.

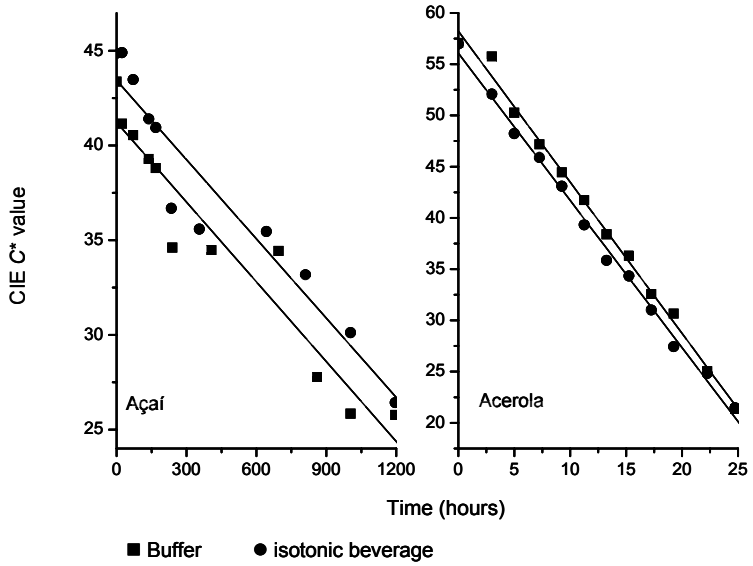


Fig. 5. Mudanças no parâmetro de cor *C** para os sistemas tampão citrato-fosfato e simulador de bebida isotônica de antocianinas de acerola e de açaí, pH 2,5 na presença de luz e de ar.

Como valores de ΔE^* acima de 20 indicam que a degradação das antocianinas tem influência na percepção visual da cor (Gonnet, 1998), as soluções, tanto do sistema tampão como do simulador de bebida isotônica, apresentaram mudança de cor visual após aproximadamente 10 e 800 horas para a acerola e para o açaí, respectivamente. (Fig. 6). Para as duas frutas, os valores finais de ΔE^* foram ligeiramente maiores no sistema simulador de bebida isotônica do que no sistema tampão, indicando que a degradação das antocianinas foi maior no sistema simulador de isotônico, confirmando o resultado obtido através da medida de absorbância.

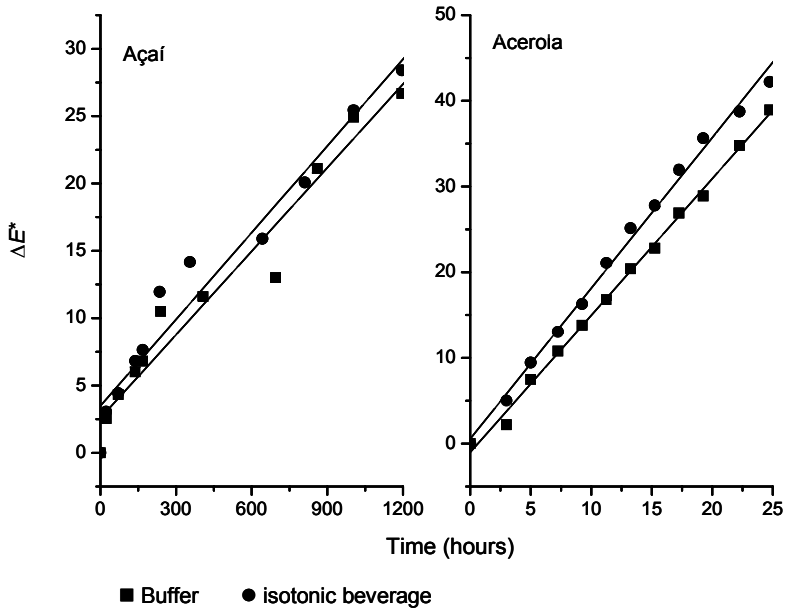


Fig. 6. Diferença global de cor (ΔE^*) para os sistemas tampão citrato-fosfato e simulador de bebida isotônica de antocianinas de acerola e de açaí, pH 2,5 na presença de luz e de ar.

4. Conclusão

A presença de açúcares e sais nas soluções simuladoras de bebida isotônica na ausência de luz levou a uma degradação 1,5 e 6,8 vezes maior das antocianinas de acerola e de açaí, respectivamente, em comparação com sistema tampão citrato-fosfato. O efeito deletério da luz na estabilidade das antocianinas foi mais intenso para os sistemas de açaí do que para os sistemas de acerola. A presença de flavonóides em maior concentração e ausência de AA nos extratos antociânicos de açaí foram os responsáveis pela maior estabilidade destas antocianinas em todos os sistemas. Os resultados demonstram que o emprego de extratos antociânicos em bebidas isotônicas depende da composição do suco ou extrato que será adicionado, a presença de concentrações elevadas de ácido ascórbico pode ser altamente prejudicial, além disso, frutas que apresentam alta concentração de flavonóides podem ser mais promissoras como corante ou ingrediente funcional em meio isotônico.

Agradecimentos

Os autores agradecem a FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo suporte financeiro.

Referências

Assis, S. A., Lima, D. C., & Faria-Oliveira, O. M. M. (2001). Activity of pectinmethylesterase, pectin content and vitamin C in acerola fruit at various stages of development. *Food Chemistry*, 74, 133-137.

Bobbio, F. O., Druzian, J. I., Abrão, P. A., Fadelli, S., & Bobbio, P. A. (2000). Identificação e quantificação das antocianinas do fruto do açaízeiro (*Euterpe oleracea* Mart.). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 20, 388-390.

Brenes, C. H., Del Pozo-Insfran, D., & Talcott, S. (2005). Stability of copigmented anthocyanins and ascorbic acid in a grape juice model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 49-56.

De Rosso, V. V., & Mercadante, A. Z. (2005). Carotenoid composition of two Brazilian genotypes of acerola (*Malpighia punicifolia* L.) from two harvests. *Food Research International*, 38, 1073-1077.

De Rosso, V. V., & Mercadante, A. Z. (2005). Efeito da adição de ácido ascórbico na estabilidade das antocianinas de açaí. In *Proceedings of 6º SLACA-Simpósio Latino-Americano de Ciência de Alimentos – Abrindo Caminhos para o Desenvolvimento Científico, Tecnológico e Industrial.*

Duhard, V., Garnier, J. C., & Megard, D. (1997). Comparison of the stability of selected anthocyanins colorants in drink model systems. *Agro Food Industry Hi-Technology*, 8, 28-34.

Dyrby, M., Westergaard, N., & Stapelfeldt, H. (2001). Light and heat sensitivity of red cabbage extract in soft drink model systems. *Food Chemistry*, 72, 431-437.

Furtado, P., Figueiredo, P., Neves, H. C., & Pina, F. (1993). Photochemical and thermal degradation of anthocyanidins. *Journal Photochemistry Photobiology A: Chemistry*, 75, 113-118.

Gallori, S., Bilia, A. R., Bergonzi, M. C., Barbosa, W. L. R., & Vincieri, F. F. (2004). Polyphenolic constituints of fruit pulp of Euterpe oleracea Mart. (açai palm). *Chromatographia*, 59, 739-743.

Garcia-Viguera, C., & Bridle, P. (1999). Influence of structure on color stability of anthocyanins and flavylium salts with ascorbic acid. *Food Chemistry*, 64, 21-26.

Gonnet, J-F. (1998). Colour effects of co-pigmentation of anthocyanins revisited. 1: a colorimetric definition using the CIELAB scale. *Food Chemistry*, 63, 409-415.

Hanamura, T., Hagiwara, T., & Kawagishi, H. (2005). Structural and functional characterization of polyphenols isolated from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 69, 280-286.

Katsaboxakis, K., Papanicolaou, D., & Melanitou, M. (1998). Stability of Pigmented Orange Anthocyanins in Model and Real Food Systems. *Italian Journal Food Science*, 1, 17-25.

Lichtenthäler, R., Rodrigues, R. B., Maia, J. G. S., Papagiannopoulos, M., Fabricius, H., & Marx, F. (2005). Total oxidant scavening capacities of Euterpe oleracea Mart. (Açaí) fruits*. International Journal Food Science and Nutrition,* 56, 53-64.

López, R. (2002). Energia Potencial – Segmentos de bebidas isotônicas e energéticas apresentam mercados em ascenção no Brasil, com perspectivas de manutenção do crescimento. Revista Engarrafador Moderno, setembro, 12-16.

Mazza, G., & Brouillard, R. (1990). The mecanism of co-pigmentation of anthocyanin in aqueous solutions. *Phytochemistry* , 29, 1097-1102.

Mazza, G., & Miniati, E. (1993). Introduction. In G. Mazza, *Anthocyanins in fruits, vegetables and grains*. (pp. 1 – 23) Boca Raton: CRC Press.

Malien-Aubert, A., Dangles, O., & Amiot, J. (2001). Color stability of commercial anthocyanin-based extracts in relation to the phenolic composition. Protective effects by intra- and intermolecular copigmentation. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 49, 170-176.

Martí, N., Pérez-Vicente, A., & García-Viguera, C. G. (2001). Influence of storage temperature and ascorbic acid addition on pomegranate juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 217-221.

Rodriguez-Saona, L. E., Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (1999). Color and pigment stability of red radish and red-fleshed potato anthocyanins in juice model systems. *Journal Food Science*, 64 (3), 451-456.

Santini, R., & Huyke, A. J. (1993). Identification of the anthocyanin present in the acerola which produces color changes in the juice on pasteurization and canning. *Journal Agriculture of University of Puerto Rico* 40, 171, 156. In G. Mazza, & E. Miniati, *Anthocyanins in fruits, vegetables and grains*, p. 131. CRC Press Inc.

Seeram, N., & Nair, M. (2002). Inhibition of lipid peroxidation and structure- activity-related studies of the dietary constituents anthocyanins, anthocyanidins, and catechins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5308-5312.

Singleton, V. L., & Rossi, J. A. Jr. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents*. American Journal Enology and Viticulture*, 16, 144-158.

Shrikhande, A. J., & Francis, F. J. (1974). Effect of flavonols on ascorbic acid and anthocyanin stability in model systems. *Journal Food Science*, 39, 904-906.

Skrede, G., Wrolstad, R. E., Lea, P., & Enersen, G. (1992). Color stability of strawberry and blackcurrant syrups. *Journal of Food Science*, 57, 172-177.

Souza, M. C. C., Benassi, M. T., Meneghel, R. F. A., & Silva, R. S. S. F. (2004). Stability of unpasteurizes and refrigerated orange juice. *Brazilian Archives of Biology and Techology*, 47, 391-397.

Vendramini, A. L., & Trugo, L. C. (2000). Chemical composition of acerola fruit (*Malpighia punicifolia* L.) at three stages of maturity. *Food Chemistry,* 71, 195-198.

Zhinshen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64, 555-559.

Wang, H., Cao, G. H., & Prior, R. L. (1997) Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 45, 304-309.

Wrolstad, R. E. (2004) Anthocyanin pigments – bioactivity and coloring properties. *Journal of Food Science*, 69 (5), 419-421.

CAPÍTULO VI

Atividade anti-radical livre dos extratos de antocianinas de acerola e de açaí

Artigo em preparação para ser enviado ao periódico
Brazilian Archives of Biology and Technology

ABSTRACT

O efeito protetor dos extratos de frutas e vegetais frente aos radicais livres vem sendo relacionado com a presença de vários compostos antioxidantes, os quais tem sido implicados na baixa incidência de doenças degenerativas. Os extratos bruto, parcialmente purificado e purificado de acerola apresentaram maior atividade anti-radical frente ao $ABTS^{\bullet+}$ e ao $DPPH^{\bullet}$ do que os respectivos extratos de açaí. A atividade anti-radical dos extratos de acerola e de açaí diminuiu à medida que o extrato bruto foi sendo purificado, e portanto, os polifenóis, flavonóides e ácido ascórbico presentes nos extratos antociânicos contribuem para a atividade anti-radical. Utilizando padrões, confirmou-se que as antocianinas com somente um grupo OH no anel B apresentam menor desativação dos radicais $ABTS^{\bullet+}$ e $DPPH^{\bullet}$ do que as antocianinas com dois grupos OH; além disso, a atividade antioxidante diminuiu à medida que o número de açúcares glicosilados aumentou.

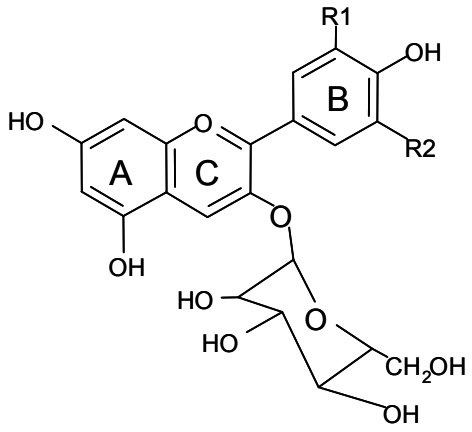
Keywords: acerola, açaí, atividade anti-radical livre, ABTS, DPPH, antocianinas

INTRODUÇÃO

O consumo freqüente de frutas e vegetais tem sido associado à baixa incidência de doenças degenerativas tais como câncer, doenças cardíacas, inflamatórias e do sistema imunológico, além de disfunções neurológicas e de cataratas (Wang et al., 1997; Seeram e Nair, 2002). Acerola e açaí são frutas tropicais, sendo que a acerola é reconhecida como um alimento funcional devido ao seu elevado conteúdo de ácido ascórbico, 957 a 1074 mg/100 g (Vendramini e Trugo, 2000; Assis et al., 2001), à presença de carotenóides (De Rosso e Mercadante, 2005) e de antocianinas (Santini e Huyke, 1993; Hanamura et al., 2005), enquanto o açaí é considerado uma fruta energética, rica em antocianinas (Bobbio et al., 2000).

O efeito protetor frente aos radicais livres está relacionado com a presença de vários compostos antioxidantes presentes em diversos alimentos, especialmente em frutas e vegetais. Dentre estes compostos pode-se destacar os polifenóis que incluem os flavonóides antociânicos e não antociânicos (flavonóis, flavonas, isoflavonas, flavanonas, flavanóis e chalconas). Os polifenóis são efetivos doadores de hidrogênio e seu potencial antioxidante está correlacionado com o número e a posição dos grupos hidroxílicos e conjugações, assim como com a presença de elétrons doadores no anel B devido à capacidade que esse anel aromático possui de suportar o despareamento de elétrons deslocalizados do sistema de elétrons π (Ramirez-Tortoza et al., 2001). Os grupos hidroxílicos livres na posição 3 do anel C e na posição 5 do anel A, juntamente com o grupo carbonílico na posição 4 são doadores de elétrons (Rice-Evans et al., 1996).

As antocianinas apresentam estrutura química (Fig. 1) adequada para atuar como antioxidante, pois podem doar hidrogênios ou elétrons aos radicais livres. A maior atividade antioxidante está correlacionada com a presença de grupos hidroxílicos nas posições 3’ e 4’ do anel B, os quais conferem uma elevada estabilidade aos radicais formados (Cao et al., 1997).



cianidina-3-glicosídeo: R_1= OH, R_2=H
delfinidina-3-glicosídeo: R_1 = R_2 = OH

Figura 1. Estrutura química característica das antocianinas.

O potencial antioxidante individual dos compostos presentes em um extrato nem sempre corresponde à capacidade antioxidante total do extrato, uma vez que pode ocorrer o efeito sinergético entre as diversas substâncias e por conseqüência sua capacidade antioxidante pode ser maior do que a soma das contribuições dos diferentes componentes do extrato (Jia et al., 1998; Saucier e Waterhouse, 1999).

Considerando o grande potencial das antocianinas como sequestrante de radicais livres, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade anti-radical livre dos extratos de antocianinas de acerola e de açaí com diferentes graus de purificação, além de comparar com padrões de antocianinas e de uma antocianidina.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

Todos os padrões, cianidina-3-glucosídeo, cianidina-3-galactosídeo, cianidina-3-rutinosídeo, malvidina, malvidina-3-glucosídeo e malvidina-3,5-diglucosídeo foram obtidos da Extrasynthèse (Genay, França). O padrão de catequina foi obtido da Fluka (Steinheim, Alemanha) e o ácido gálico da Extrasynthèse (Genay, França). Os reagentes $ABTS^{\bullet+}$, $DPPH^{\bullet}$, Trolox e o persulfato de potássio foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Chemie, Germany). O reagente de Folin-Ciocalteau foi fornecido pela Merck (Darmstadt, Alemanha). Os solventes e ácidos grau p.a. utilizados para a extração foram provenientes da Labsynth (Diadema, Brasil).

Extratos de antocianinas

A acerola *in natura* proveniente da região de Campinas foi obtida na CEAGESP, estado de São Paulo, Brasil. Cerca de 2 kg de fruta foram despolpadas para a remoção das cascas e sementes em uma despolpadeira de facas. O açaí foi adquirido em Campinas sob a forma de 1 kg de polpa comercial congelada. A polpa das frutas foi extraída exaustivamente com uma solução metanólica de HCl 1% sob agitação promovida por um homogeneizador (Metabo, Nürtingen, Alemanha), em seguida a solução foi filtrada e concentrada a vácuo (T<38º C) até evaporação total do metanol, obtendo-se o extrato bruto concentrado de antocianinas (EB).

O EB foi dissolvido em 50 mL de água e adicionado de 5 mL de ácido fórmico 10%. Em seguida foram realizadas duas lavagens com acetato de etila em funil de separação para a retirada de lipídeos e outros interferentes lipossolúveis, tais como carotenóides. O extrato foi eluído em coluna de Amberlite XAD-7 (30 x 3 cm), com 1 L de água destilada para a remoção de compostos hidrossolúveis sem carga, e com metanol/ácido acético (19:1) para eluição das antocianinas, de acordo com o procedimento descrito por Degenhardt et al. (2000). A fração antociânica foi concentrada a vácuo (T < 38 ºC) até evaporação total do metanol, obtendo-se o extrato parcialmente purificado (EPP). O EPP proveniente das duas frutas foi re-dissolvido em água e aplicado em papel cromatográfico Whatman Chr nº 3 e eluído com BAW (butanol/ácido acético/água (6:2:1)) como sistema solvente por 48 horas em modo descendente. As zonas obtidas foram recortadas do papel seco e eluídas todas juntas com metanol e concentradas, obtendo-se o extrato purificado (EP) de acerola e de açaí.

Determinação dos Compostos Fenólicos

Extração de compostos fenólicos

Dez gramas de cada extrato concentrado (EB, EPP e EP) foram dissolvidas em 50 mL de metanol, transferidas para um balão volumétrico de 100 mL e o volume completado com água destilada. Os extratos diluídos foram mantidos no freezer por 20 minutos, centrifugados a 2000 rpm por 20 minutos e mantidos em freezer até a análise.

Determinação de polifenóis totais

A determinação de polifenóis totais foi realizada através do método de Folin-Ciocalteau, segundo procedimento de Singleton e Rossi (1965) e os resultados expressos em equivalente de ácido gálico (GAE)/100 g. Uma alíquota de 1 mL, retirada de cada

extrato diluído ou das soluções padrão de ácido gálico (20, 40, 60, 80 e 100 mg/L), foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL, contendo 9 mL de água. O reagente de Folin-Ciocalteau (1 mL) foi adicionado e misturado. Após 5 minutos foram adicionados 10 mL de uma solução de Na_2CO_3 7% e o volume completado com água. Após 90 minutos de incubação a 23 ºC, a absorbância foi determinada a 750 nm.

Determinação de flavonóides totais

Para a quantificação dos flavonóides totais foi empregando o método de Zhishen, Mengcheng e Jianming (1999) e os resultados foram expressos em equivalente de catequina (CE)/100 g. Uma alíquota dos extratos diluídos ou das soluções padrão de catequina (20, 40, 60, 80 e 100 mg/L) foi adicionada a um balão volumétrico de 10 mL contendo 4 mL de água e em seguida foi adicionado 0,3 mL de uma solução de $NaNO_2$ 5%. Após 5 minutos, foi adicionado 0,3 mL de uma solução de $AlCl_3$ 10% e após 6 minutos 2 mL de NaOH 1 M, completando-se o volume com água destilada. A absorbância da solução foi imediatamente determinada a 510 nm.

Avaliação da atividade anti-radical livre

Determinação da descoloração do radical $ABTS^{\bullet+}$

O radical $ABTS^{\bullet+}$ foi formado a partir da reação do ABTS (14 mM) com persulfato de potássio (4,9 mM) ambos em água. As duas soluções foram misturadas e deixadas em repouso no escuro à temperatura ambiente por 12 a 16 h, segundo Re et al. (1999). Esta solução foi diluída até absorbância de 0,7, medida a 734 nm. Os extratos de antocianinas foram diluídos em metanol até absorbância de 1,0 no comprimento de onda máximo na região do visível. As soluções dos padrões de antocianinas foram preparadas em metanol na concentração de 0,5 mM. Cem microlitros dos extratos diluídos ou dos padrões de antocianinas foram adicionados a 3,9 mL de $ABTS^{\bullet+}$ e a leitura da absorbância foi realizada a 750 nm após 1 e 6 minutos. A quantificação da atividade antioxidante total foi realizada a partir de uma curva-padrão de Trolox (0,4 – 7,2 mM) nas mesmas condições das amostras, e os resultados foram expressos em TEAC (capacidade antioxidante equivalente a Trolox).

Determinação da atividade DPPH•

A solução de DPPH• (0,06 mM) foi preparada em metanol e dissolvida em ultra-som por 30 minutos, segundo Brand-Williams et al. (1995). Os extratos de antocianinas foram diluídos com metanol até absorbância de 1,0 no comprimento de onda máximo na região do visível e as soluções dos padrões de antocianinas foram preparadas em metanol na concentração de 0,5 mM. Cem microlitros dos extratos diluídos ou dos padrões de antocianinas foram adicionados a 3,9 mL de DPPH•, e a leitura da absorbância foi realizada a 515 nm em determinados intervalos de tempo. Foi estabelecida a cinética da reação e os valores de k_{obs} foram calculados para cada um dos extratos e para todos os padrões.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atividade anti-radical livre dos padrões

Os resultados da atividade anti-radical dos padrões frente ao $ABTS^{\bullet+}$ (Tabela 1) confirmaram que as antocianinas com somente um grupo OH no anel B apresentam atividade antioxidante menor do que a das antocianinas com dois grupos OH no anel B, a atividade antioxidante da malvidina-3-glucosídeo foi cerca de 3 vezes menor que a da cianidina-3-glucosídeo. Os resultados apresentados na Tabela 1 também mostraram que a atividade antioxidante diminuiu à medida que o número de açúcares glicosilados aumentou. A malvidina-3,5-diglucosídeo apresentou atividade antioxidante 1,6 vezes menor que a malvidina-3-glucosídeo, assim como a cianidina-3-rutinosídeo apresentou atividade antioxidante 1,9 vezes menor que a cianidina-3-glucosídeo. Como era esperado, a antocianidina malvidina apresentou a maior atividade antioxidante, pois não apresenta açúcares ligados à molécula. Kuskoski et al. (2004) também verificaram que os grupos hidroxílicos nas posições 3' e 4' do anel B contribuem para a elevada capacidade antioxidante, uma vez que quanto maior o número de grupos hidroxílicos no anel B, maior a atividade anti-radical, sendo que a delfinidina apresentou a maior atividade, seguida da cianidina-3-glucosídeo, peonidina-3-glucosídeo, pelargonidina-3-glucosídeo e com a menor atividade a malvidina-3-glucosídeo.

Tabela 1. Capacidade anti-radical livre dos padrões (0,5 mM) de antocianinas e de antocianidina.

padrões	$ABTS^{\bullet+}$	$DPPH^{\bullet}$	
	TEAC (mM Trolox)[a]	$t_{1/2}$ (s)[a]	k_{obs} (s^{-1})[a]
cianidina-3-glucosídeo	7,6	34,3	$2,91 \times 10^{-2}$
cianidina-3-galactosídeo	6,5	32,6	$3,06 \times 10^{-2}$
cianidina-3-rutinosídeo	4,0	67,6	$1,48 \times 10^{-2}$
malvidina	8,4	79,9	$1,25 \times 10^{-2}$
malvidina-3-glucosídeo	2,8	152,3	$6,56 \times 10^{-3}$
malvidina-3,5-diglucosídeo	1,7	337,4	$2,96 \times 10^{-3}$

[a] Média das análises realizadas em duplicata.

Os resultados da desativação do radical $DPPH^{\bullet}$ obtidos para os padrões de antocianinas e antocianidina mostraram uma diminuição na constante de velocidade de

reação à medida que o número de açúcares glicosilados aumentou, assim como observado com o $ABTS^{\bullet+}$. A malvidina-3,5-diglucosídeo apresentou valor de k_{obs} 1,9 vezes menor que a malvidina-3-glucosídeo, assim como a cianidina-3-rutinosídeo apresentou valor de k_{obs} 1,9 vezes menor que a cianidina-3-glucosídeo (Tabela 1 e Fig. 2).

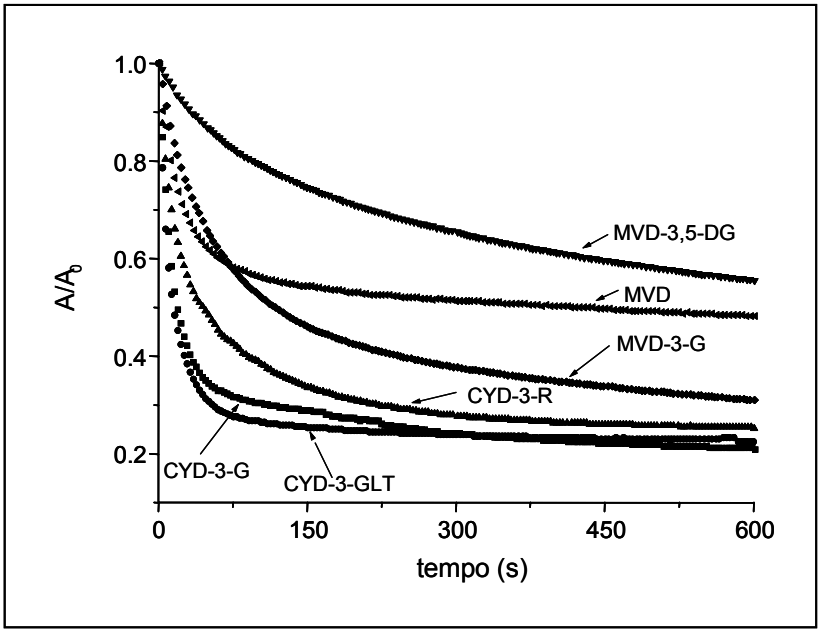


Figura 2. Cinética de reação dos padrões de antocianinas e de antocianidina frente ao radical $DPPH^{\bullet}$. MVD-3,5-DG: malvidina-3,5-diglucosídeo, MVD-3-G: malvidina-3-glucosídeo, MVD: malvidina, CYD-3-G: cianidina-3-glucosídeo, CYD-3-GLT: cianidina-3-galactosídeo e CYD-3-R: cianidina-3-rutinosídeo.

Entretanto, diferentemente do que foi verificado na reação com o $ABTS^{\bullet+}$ onde a malvidina apresentou a maior atividade anti-radical, esta antocianidina apresentou k_{obs} inferior ao determinado para a cianidina-3-glucosídeo, cianidina-3-galactosídeo e para a cianidina-3-rutinosídeo nas reações com o $DPPH^{\bullet}$.

Atividade anti-radical livre dos extratos

Os extratos bruto, parcialmente purificado e purificado de acerola apresentaram atividade anti-radical frente ao $ABTS^{\bullet+}$ 3, 2,3 e 1,7 vezes maior que os respectivos extratos de açaí (Tabela 2). Diversos fatores podem ter contribuído para essa diferença, entre eles a composição quali e quantitativa de antocianinas e a concentração de outros componentes nos extratos antociânicos, tais como polifenóis, flavonóides e ácido ascórbico.

Tabela 2. Capacidade anti-radical total medida através do radical $ABTS^{+\bullet}$ (TEAC) e do $DPPH^{\bullet}$ (tempo de meia-vida e k_{obs}) em extratos antociânicos de acerola e de açaí.

extratos	Açaí			Acerola		
	TEAC (mM Trolox)[a]	$t_{1/2}$ (s)[a]	k_{obs} (s^{-1})[a]	TEAC (mM Trolox)[a]	$t_{1/2}$ (s)[a]	k_{obs} (s^{-1})[a]
EB	6,48	47,4	$2,10 \times 10^{-2}$	18,93	36,6	$2,73 \times 10^{-2}$
EPP	5,40	90,5	$1,10 \times 10^{-2}$	12,62	74,1	$1,35 \times 10^{-2}$
EP	4,52	238,0	$4,20 \times 10^{-3}$	7,74	210,5	$4,75 \times 10^{-3}$

EB: extrato bruto, EPP: extrato parcialmente purificado, EP: extrato purificado.

[a] Média das análises realizadas em duplicata.

A diferença entre as estruturas químicas das antocianinas de açaí e de acerola é pequena, uma vez que a acerola possui cianidina-3-ramnosídeo e pelargonidina-3-ramnosídeo como antocianinas majoritárias (Hanamura et al., 2005), enquanto o açaí apresenta como antocianinas principais cianidina-3-glucosídeo e cianidina-3-rutinosídeo (Gallori et al., 2004; Lichtenthäler et al., 2005). Desta forma, a presença da cianidina como aglicona principal na composição antociânica dos extratos de acerola e de açaí, resultou em diferenças não significativas na atividade anti-radical dos extratos. Tanto as antocianinas de acerola como as de açaí apresentam substituição mono-glicosídica, no entanto os açúcares ligados as antocianidinas apresentam estruturas químicas diferentes, e portanto as antocianinas presentes na acerola devem apresentar uma atividade maior que a das encontradas em açaí.

A Tabela 3 demonstra que a presença de polifenóis, flavonóides e ácido ascórbico nos extratos antociânicos foi o fator que mais influenciou na atividade anti-radical. A maior atividade dos extratos de acerola foi devido à elevada concentração de ácido ascórbico,

uma vez que os extratos de açaí não apresentaram AA em sua composição. Enquanto que os teores de polifenóis foram semelhantes nos extratos brutos das duas frutas, os extratos de açaí apresentaram teores de flavonóides cerca de 10 vezes maior e 2 vezes maior de antocianinas em comparação com os extratos de acerola. Leong e Shui (2002) também verificaram que a elevada concentração de AA em frutas contribuiu significativamente para a atividade antioxidante total, como por exemplo, em goiaba cujo teor de AA (131 mg/100g) contribuiu com 48,3% da atividade antioxidante total.

Os resultados obtidos para a atividade anti-radical dos extratos de acerola e de açaí mostram que à medida que o extrato bruto foi sendo purificado, o potencial anti-radical também foi diminuindo devido à diminuição da concentração de polifenóis, flavonóides e ácido ascórbico nos extratos parcialmente purificado e purificado das duas frutas (Tabela 3).

Tabela 3. **Características fito-químicas dos extratos antociânicos de acerola e de açaí.**

Características fito-químicas	Acerola			Açaí		
	EB	EPP	EP	EB	EPP	EP
Ácido ascórbico (mg/100g)	1920,8	1140,2	796,4	nd	nd	nd
Antocianinas (mg/mL)	7,6	6,9	7,4	13,4	12,6	13,4
Flavonóides totais (mg CE/100g)	53,3	48,0	43,0	537,0	273,1	149,7
Polifenóis totais (mg GAE/100g)	3303,3	1062,5	810,0	3782,6	2614,0	1846,9

EB: extrato bruto, EPP: extrato parcialmente purificado, EP: extrato purificado.

n.d.- não detectado

GAE- equivalente de ácido gálico

CCE- equivalente de catequina

A diminuição da atividade anti-radical à medida que os extratos foram sendo purificados apresentou correlação direta com a diminuição dos teores de polifenóis, flavonóides e ácido ascórbico dos extratos (Figuras 3 e 4). Chun et al. (2003) também verificaram que a capacidade antioxidante dos extratos de ameixa variaram proporcionalmente com os teores de polifenóis e flavonóides, no entanto a soma das atividades antioxidantes de cada constituinte do extrato foi menor que a capacidade antioxidante total. Hassimotto et al. (2005) também relataram que a soma das atividades antioxidantes dos polifenóis totais e do ácido ascórbico presente em diversas frutas não

correspondeu à atividade antioxidante total, caracterizando o efeito sinérgico de diversos constituintes dos extratos que não foram quantificados.

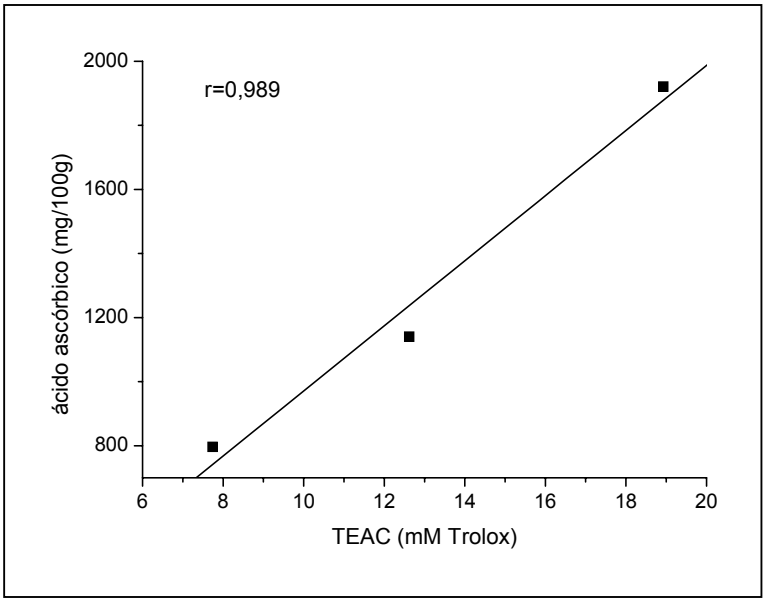


Figura 3. Correlação entre os teores de ácido ascórbico dos extratos de acerola e a atividade anti-radical frente ao $ABTS^{\bullet+}$ (TEAC).

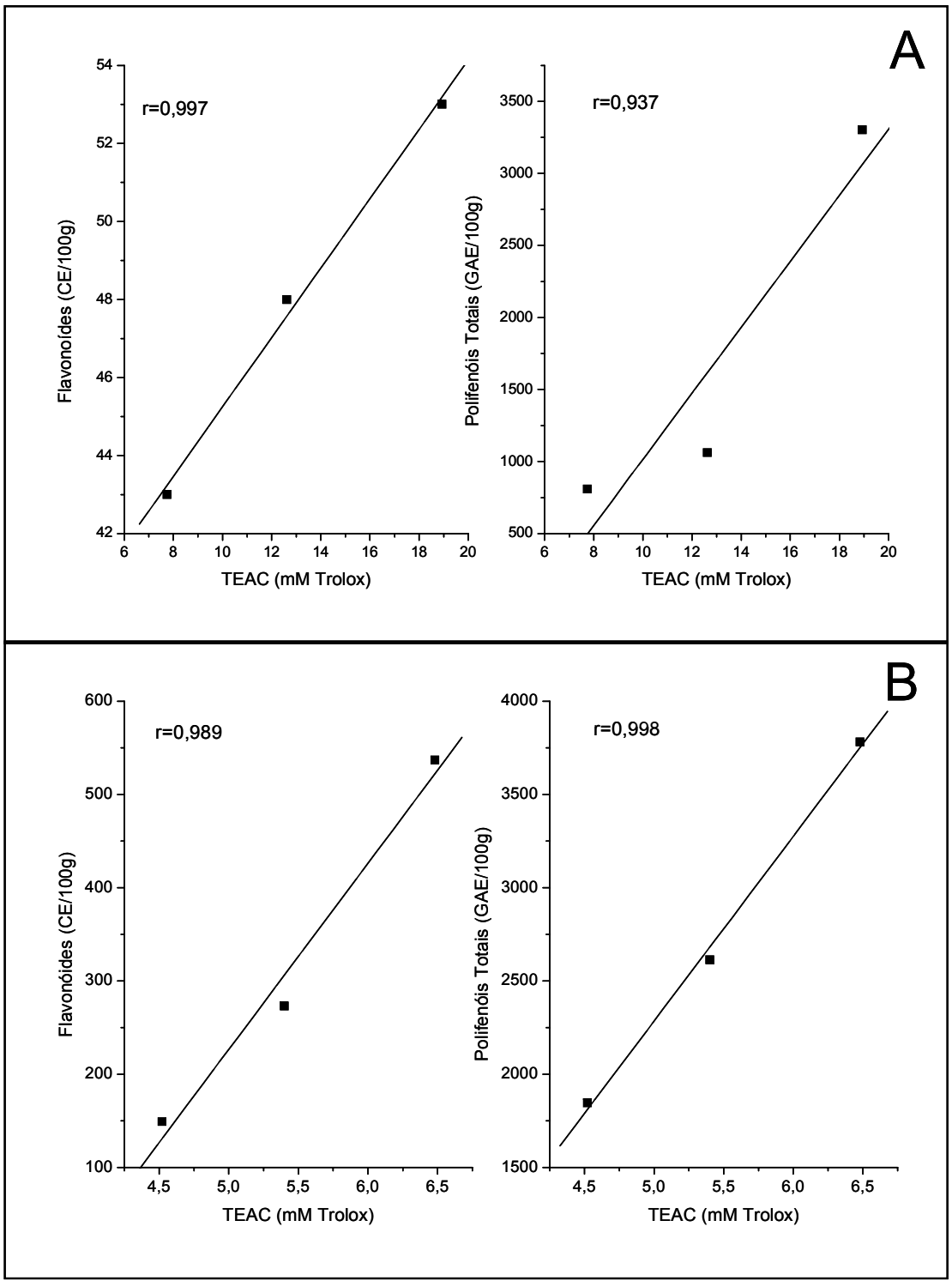


Figura 4. Correlação entre os teores de polifenóis totais e flavonóides com a atividade anti-radical frente ao $ABTS^{\bullet+}$ (TEAC). A) extratos de acerola e B) extratos de açaí.

Os resultados obtidos para a desativação do radical DPPH$^{\bullet}$ seguiram a mesma tendência verificada para a atividade anti-radical medida através do ABTS$^{\bullet+}$, isto é, à medida que o extrato foi sendo purificado, a velocidade de reação do consumo do DPPH$^{\bullet}$ foi diminuindo, caracterizando a contribuição dos outros componentes presentes no extrato e que foram removidos parcialmente na etapa de purificação. Entretanto, a atividade antioxidante determinada através do ABTS$^{\bullet+}$ e do DPPH$^{\bullet}$ do extrato bruto de açaí foi respectivamente 1,4 e 5,0 vezes maior que a observada no extrato purificado. Para acerola esta relação foi respectivamente de 2,4 e 5,8 vezes.

A exemplo do que ocorreu com a atividade anti-radical determinada frente ao ABTS$^{\bullet+}$, quando se empregou o radical DPPH$^{\bullet}$, os extratos bruto, parcialmente purificado e purificado de acerola apresentaram k_{obs} cerca de 1,3, 1,2 e 1,1 vezes maior que nos respectivos extratos de açaí (Tabela 3 e Fig. 3). No entanto, quando se utilizou o radical ABTS$^{\bullet+}$ os extratos de acerola apresentaram atividade cerca de 3, 2,3 e 1,7 vezes maior que os extratos de açaí, ou seja, a diferença entre as atividades anti-radical dos extratos de acerola e de açaí foi menor quando usou-se o DPPH$^{\bullet}$.

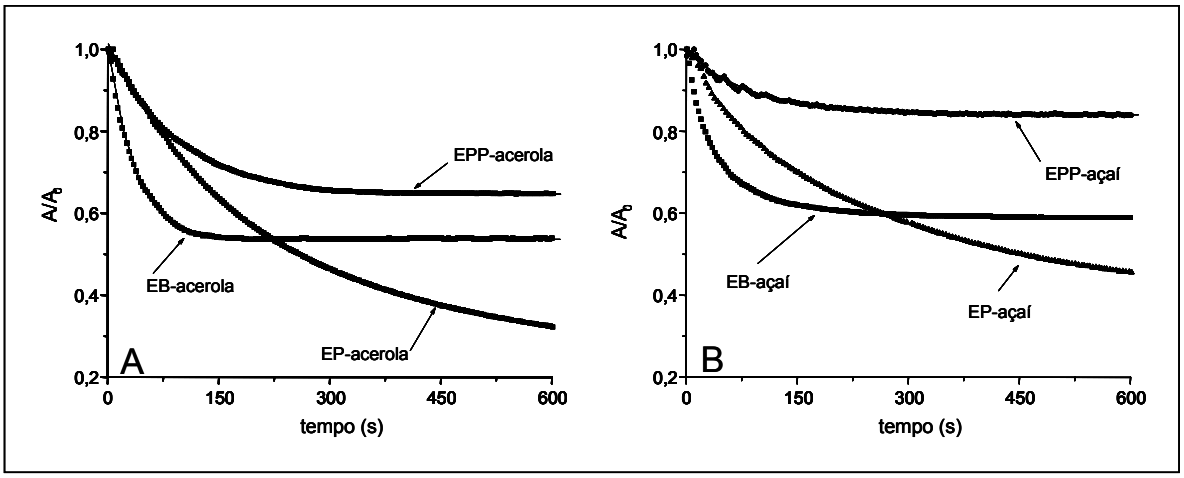


Figura 5. Cinéticas de reação dos extratos antociânicos de acerola e de açaí frente o radical DPPH$^{\bullet}$. A) acerola. B) açaí.

A diferença verificada entre a atividade anti-radical medida pela desativação do radical ABTS$^{\bullet+}$ e DPPH$^{\bullet}$ deve ser analisada sob diversos aspectos, pois alguns autores já reportaram comportamentos semelhantes. Leong e Shui (2002) estabeleceram que a atividade anti-radical medida através dos dois métodos foi muito semelhante para 11 das

27 frutas analisadas, sendo que para 6 frutas a diferença entre os resultados obtidos pelos dois métodos foi menor que 20% e para 9 frutas foi maior que 50%. Cabe destacar que neste trabalho os resultados para os dois radicais foram expressos em equivalente de ácido ascórbico.

A diferença também pode ter ocorrido devido à utilização de diferentes métodos para expressar os resultados da medida, ou seja, a determinação do $ABTS^{\bullet+}$ mediu a quantidade total consumida de um antioxidante padrão (Trolox) enquanto no método de $DPPH^{\bullet}$ foi determinada a velocidade de consumo do radical. Além disso, a resposta da atividade anti-radical dos compostos presentes no extrato pode ser diferente frente aos diferentes radicais, Leong e Shui (2002) verificaram que a estequiometria da reação entre o pirogalol e os radicais $ABTS^{\bullet+}$ e $DPPH^{\bullet}$ foi 1:7 e 1:4, respectivamente. Wang et al. (1998) reportaram que de 10 componentes separados da *Salvia officinalis*, somente 4 apresentaram atividade frente aos radicais $DPPH^{\bullet}$ e $ABTS^{\bullet+}$, enquanto 6 componentes apresentaram somente atividade frente ao radical $DPPH^{\bullet}$.

Os valores da atividade anti-radical dos extratos de açaí frente ao $ABTS^{\bullet+}$ foram semelhantes ao determinado por Berg, Haenen, Berg e Bast (1999) para o suco de grape fruit (5,57 mM TEAC).

CONCLUSÕES

Os extratos bruto (EB), parcialmente purificado (EPP) e purificado (EP) de acerola apresentaram maior atividade antioxidante do que os respectivos extratos de açaí. A atividade anti-radical dos extratos brutos das duas frutas diminuiu à medida que o extrato bruto foi sendo purificado e, portanto, a presença de polifenóis, flavonóides e ácido ascórbico no extrato antociânico bruto influenciou na atividade anti-radical. Os resultados obtidos com padrões confirmaram que a atividade anti-radical aumenta com o número grupos OH no anel B das antocianinas e que a atividade antioxidante diminui à medida que o número de açúcares ligados à molécula aumenta.

REFERÊNCIAS

Arena, E.; Fallico, B. and Maccarone, E. (2001), Evaluation of antioxidant capacity of blood orange juices as influenced by constituents, concentration process and storage. *Food Chemistry*, **74**, 423-427.

Assis, S. A.; Lima, D. C. and Faria-Oliveira, O. M. M. (2001), Activity of pectinmethylesterase, pectin content and vitamin C in acerola fruit at various stages of development. *Food Chemistry*, 74, 133-137.

Bao, J.; Cai, Y.; Sun, M.; Wang, G. and Corke, H. (2005), Anthocyanins, flavonols, and free radical scavenging activity of Chinese bayberry (*Myrica rubra*) extracts and their color properties and stability. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **53**, 2337-2332.

Bobbio, F. O.; Druzian, J. I.; Abrão, P. A.; Fadelli, S. and Bobbio, P. A. (2000), Identificação e quantificação das antocianinas do fruto do açaízeiro (*Euterpe oleracea* Mart.). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **20**, 388-390.

Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E. and Berset, C. (1995), Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie*, **28**, 25-30.

Chun, O. K.; Kim, D.; Moon, H. Y.; Kang, H. G. and Lee, C. Y. (2003), Contribution of individual polyphenolics to total antioxidant capacity of plums. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 7240-7245.

Cao, G.; Sofic, E. and Prior, R. L. (1997), Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relations ships. *Free Radical of Biology and Medicine*, **22**, 749-760, 1997.

Degenhardt, A., Knapp, H., Winterhalter, P. (2000), Separation and Purification of Anthocyanins by High-Speed Countercurrent Chromatography and Screening for Antioxidant Activity. *Journal Agricultural and Food Chemistry* **48**, 338-343.

De Rosso, V. V. and Mercadante, A. Z. (2005), Carotenoid composition of two Brazilian genotypes of acerola (*Malpighia punicifolia* L.) from two harvests. *Food Research International*, **38**, 1073-1077.

Gallori, S.; Bilia, A. R.; Bergonzi, M. C.; Barbosa, W. L. R. and Vincieri, F. F. (2004), Polyphenolic constituents of fruit pulp of Euterpe oleracea Mart. (açai palm). *Chromatographia,* **59**, 739-743.

Gil, M. I.; Tomás-Barberán, F. A.; Hess-Pierce, B.; Holcroft, D. M. and Kader, A. (2000), Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **48**, 4581-4589.

Hanamura, T.; Hagiwara, T. and Kawagishi, H. (2005), Structural and functional characterization of polyphenols isolated from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 69, 280-286.

Jia, Z. S.; Zhou, B.; Yang, L.; Wu, L. M. and Liu, Z. L. (1998), Antioxidant synergism of tea polyphenols and α-tocopherol against free radical induced peroxidation of linoleic acid in solution. *Journal Chemistry Society*, 2, 911-915.

Kahkonen, M. and Heinonen, M. (2003). Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **51**, 628-633.

Kuskoski, E. M.; Asuero, A. G.; García-Parilla, M. C.; Troncoso, A. M. and Fett, R. (2004), Actividad antioxidante de pigmentos antociánicos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos,* **24**, 691-693.

Leong, L. P. and Shui, G. (2002), An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chemistry*, **76**, 69-75.

Lichtenthäler, R.; Rodrigues, R. B.; Maia, J. G. S.; Papagiannopoulos, M.; Fabricius, H. and Marx, F. (2005), Total oxidant scavening capacities of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) fruits*. International Journal Food Science and Nutrition*, **56**, 53-64.

Ramirez-Tortoza, C.; Anderesen, O. M.; Gardner, P. T.; Morrice, P. C.; Wood, S. G.; Duthie, S. J.; Collins, A. R. and Duthie, G. G. (2001), Anthocyanin-rich extract decreases indices of lipid peroxidation and DNA damage in vitamin E depleted rats. *Free Radical Bioogy and Medicine*, **46**, 1033-1037.

Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M. and Rice-Evans, C. (1999), Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, **26**, 1231-1237.

Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J. and Papaganda, G. (1996), Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 933-956.

Sang, S. M.; Cheng, X. F.; Stark, R. E.; Rosen, R. T.; Yang, C. S., and Ho, C. T. (2002), Chemical studies on antioxidant mechanism of tea catechins: Analysis or radical reaction products of catechin and epicatechin with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. *Bioorganisms of Medicine and Chemistry*, **10**, 2233-2237.

Santini, R. and Huyke, A. J. (1993). Identification of the anthocyanin present in the acerola which produces color changes in the juice on pasteurization and canning. *Journal Agriculture of University of Puerto Rico* 40, 171, 156. In G. Mazza and E. Miniati, *Anthocyanins in fruits, vegetables and grains*, p. 131. CRC Press Inc.

Saucier, C. T. and Waterhouse, A. L. (1999), Synergetic activity of catechin and other antioxidants. *Journal of Agricicultural and Food Chemistry*, **47**, 4491-4494.

Seeram, N. and Nair, M. (2002), Inhibition of lipid peroxidation and structure- activity-related studies of the dietary constituents anthocyanins, anthocyanidins, and catechins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* **50**, 5308-5312.

Vendramini, A. L. and Trugo, L. C. (2000), Chemical composition of acerola fruit (*Malpighia punicifolia* L.) at three stages of maturity. *Food Chemistry,* **71**, 195-198.

Wang, H.; Cao, G. H. and Prior, R. L. (1997), Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* **45**, 304-309.

Wang, M. F.; Shao, Y.; Li, J. G.; Zhu, N. Q.; Rangarajan, M.; La Voie, E. J. and Ho, C. T. (1998), Antioxidative phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*). Journal of *Agricultural and Food Chemistry*, **46**, 4869-4873.

Zhinshen, J.; Mengcheng, T. and Jianming, W. (1999), The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry,* **64**, 555-559.

CAPÍTULO VII

Foto-oxidação sensitizada de antocianinas: efeito protetor dos extratos antociânicos de açaí e de acerola e desativação de oxigênio singlete

Artigo em preparação para publicação no periódico
Journal of Agricultural and Food Chemistry

RESUMO

A presença de oxigênio singlete ($O_2(^1\Delta_g)$) em meios biológicos é potencialmente prejudicial, pois esta espécie é responsável pela iniciação de cadeias de oxidação, causando danos aos lipídeos, proteínas e DNA, em nível celular. Os extratos bruto, parcialmente purificado e purificado de acerola e de açaí apresentaram efeito protetor frente ao $O_2(^1\Delta_g)$ e à medida que os extratos foram purificados o efeito protetor frente ao $O_2(^1\Delta_g)$ foi diminuindo, sendo que esta diminuição foi maior nos extratos de açaí. A cianidina-3-glucosídeo, a cianidina-3-rutinosídeo e a malvidina tiveram sua constante de desativação física (k_q) determinada através dos métodos de foto-oxidação sensitizada e pela detecção da fosforescência do $O_2(^1\Delta_g)$. Independentemente do método, a malvidina foi o melhor desativador de $O_2(^1\Delta_g)$ dentre os padrões estudados. Os experimentos de *time-resolved photoacoustics* (TRP) demonstraram que os estados tripletes das antocianinas de açaí apresentam tempo de vida muito curto, indicando que provavelmente a desativação do $O_2(^1\Delta_g)$ não ocorreu via formação destes estados tripletes.

Palavras chave: antocianinas, frutas tropicais, oxigênio singlete, desativação, *time-resolved-photoacoustic* (TRP) e estados tripletes.

INTRODUÇÃO

As antocianinas pertencem à classe dos flavonóides e apresentam estrutura química tipo C_6-C_3-C_6, conhecida como cátium flavílio, que sempre se encontra glicosilado (*1*). A acerola e o açaí são frutas tropicais conhecidas por seus compostos bioativos, tais como os carotenóides e antocianinas (*2-6*), e o elevado conteúdo de vitamina C da acerola, 957 a 1074 mg/100 g (*7, 8*).

Vários estudos têm avaliado a estabilidade das antocianinas em diversos sistemas-modelo (*9*, *10*), assim como a atividade antioxidante de extratos compostos por antocianinas e outros flavonóides (*11-13*). No entanto, informações referentes à foto-oxidação sensitizada e à possibilidade das antocianinas atuarem como desativadores de oxigênio singlete ($O_2(^1\Delta_g)$) são quase inexistentes.

A presença de $O_2(^1\Delta_g)$ em meios biológicos é potencialmente prejudicial e tem-se comprovado que esta espécie é responsável pela iniciação de cadeias de oxidação em nível celular que conduz a danos tais como destruição de DNA e oxidação lipídica (*14*, *15*). Em reações foto-sensitizadas, fótons são absorvidos pelo sensitizador (S), resultando em um estado de energia excitado (estado triplete), eq. 1, assim o $O_2(^1\Delta_g)$ pode ser gerado através de um mecanismo de transferência de energia a partir do estado eletrônico triplete excitado do sensitizador para o oxigênio molecular no estado eletrônico fundamental triplete ($O_2(^3\Sigma^-_g)$), eq. 2. Outro mecanismo que pode levar à formação de $O_2(^1\Delta_g)$ consiste na formação de radicais livres através da desativação do sensitizador no estado eletrônico triplete excitado pela associação direta com outra molécula, eq. 3.

$$\mathbf{S} \xrightarrow{h\nu} {}^1\mathbf{S}^* \xrightarrow{k_{isc}} {}^3\mathbf{S}^* \quad (1)$$

$${}^3\mathbf{S}^* + \mathbf{O_2}\left({}^3\Sigma_g^-\right) \xrightarrow{k^S_{q,\Sigma}} \mathbf{S} + \mathbf{O_2}\left({}^1\Delta_g\right) \quad (2)$$

$${}^3\mathbf{S}^* + \mathbf{P} \xrightarrow{k^S_{q,P}} \mathbf{P}^\bullet \xrightarrow{O_2\left({}^3\Sigma_g^-\right)} \mathbf{POO}^\bullet \quad (3)$$

Na presença de algum substrato, como por exemplo pigmentos (P), o $O_2(^1\Delta_g)$ gerado pode ser desativado via processo químico, eq. 4, com formação de produtos de oxidação; ou mediante um processo físico de desativação, sem degradação do pigmento eq.5.

$$O_2\left(^1\Delta_g\right) + P \xrightarrow{k_r} \text{produtos de oxidação} \quad (4)$$

$$O_2\left(^1\Delta_g\right) + P \xrightarrow{k_q} O_2\left(^3\Sigma_g^-\right) + P^{\bullet} \quad (5)$$

Na ausência de outros substratos no meio, o $O_2(^1\Delta_g)$ volta ao seu estado fundamental ($O_2(^3\Sigma^-_g)$) mediante processos não radiativos e radiativos, eq. 6 e 7.

$$O_2\left(^1\Delta_g\right) \xrightarrow{k_d} O_2\left(^3\Sigma_g^-\right) + \text{calor} \quad (6)$$

$$O_2\left(^1\Delta_g\right) \xrightarrow{k_\rho} O_2\left(^3\Sigma_g^-\right) + hv\ (1270nm) \quad (7)$$

Os carotenóides são amplamente conhecidos como excelentes desativadores de $O_2(^1\Delta_g)$ (*16*), pois uma vez produzido o estado excitado do carotenóide, este pode retornar ao seu estado fundamental dissipando o excesso de energia na forma de calor através de interações rotacionais e vibracionais. Os flavonóides também atuam como desativadores de $O_2(^1\Delta_g)$, sendo que a eficiência de desativação aumenta à medida que aumenta o número de grupos OH presentes na sua estrutura, e a existência de um grupo catecol ou pirogalol na estrutura do anel B é essencial para a desativação do $O_2(^1\Delta_g)$ por flavonóides (*17, 18*). Um ponto crítico no mecanismo de proteção por substâncias anti-oxidantes deve-se ao fato de que a eficiência no processo de transferência de energia depende da energia triplete do composto desativador, a qual deve ser menor que a do $O_2(^1\Delta_g)$ que é de 94,2 kJ/mol.

Estudos sobre a reatividade de antocianinas frente ao $O_2(^1\Delta_g)$, bem como sobre a determinação da energia do estado triplete das antocianinas não foram reportados. Recentemente, Jang et al. (*19*) avaliaram o efeito protetor das antocianinas do extrato de bilberry frente ao $O_2(^1\Delta_g)$, e verificaram uma diminuição entre 30 e 70% das perdas de células A2E do epitélio retinal por foto-oxidação.

Os objetivos do presente estudo foram avaliar o efeito protetor das antocianinas dos extratos de acerola e de açaí e de padrões de antocianinas e de antocianidina em meio foto-sensitizado, determinar a constante de desativação das antocianinas e antocianidina

através da fosforescência do $O_2(^1\Delta_g)$, determinar o nível de energia do estado triplete das antocianinas de açaí utilizando a técnica de *time-resolved photoacoustics* e propor um mecanismo de ação das antocianinas frente à foto-oxidação sensitizada.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

Todos os padrões, cianidina-3-glucosídeo (CYD-3G), cianidina-3-rutinosídeo (CYD-3-R) e malvidina (MVD), foram obtidos da Extrasynthèse (Genay, França). O padrão de catequina foi obtido da Fluka (Steinheim, Alemanha) e o ácido gálico da Extrasynthèse (Genay, França). O reagente de Folin-Ciocalteau e ácido ascórbico foi fornecido pela Merck (Darmstadt, Alemanha). O 9, 10-dimetil-antraceno (DMA), o azul de metileno (MB) e a perinaftenona foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Os solventes e ácidos utilizados para a extração foram grau p.a., provenientes da Labsynth (Diadema, Brasil).

Extratos de antocianinas

Frutas de acerola *in natura* provenientes da região de Campinas foram obtidas na CEAGESP, estado de São Paulo, Brasil. Cerca de 2 kg foram despolpados para a remoção das cascas e sementes em uma despolpadeira de facas. Cerca de 1 kg de polpa comercial congelada de açaí foi adquirida em Campinas. A polpa das frutas foi extraída exaustivamente com uma solução metanólica de HCl 1% sob agitação promovida por um homogeneizador (Metabo, Nürtingen, Alemanha), seguida de filtração e concentração a vácuo (T<38º C) até evaporação total do metanol, obtendo-se o extrato bruto concentrado de antocianinas (EB).

O EB foi dissolvido em 50 mL de água e 5 mL de ácido fórmico 10% foram adicionados. Em seguida foram realizadas duas lavagens com acetato de etila, em funil de separação, para a retirada de lipídeos e outros interferentes lipossolúveis, tais como carotenóides. Os extratos foram eluídos em coluna (30 x 3 cm) de Amberlite XAD-7 (Sigma), com 1 L de água destilada para a remoção de compostos hidrossolúveis sem carga, e com metanol/ácido acético (19:1) para eluição das antocianinas, de acordo com o procedimento descrito por Degenhardt et al. (*20*). A fração antociânica foi concentrada a vácuo (T < 38 ºC) até evaporação total do metanol, obtendo-se o extrato parcialmente purificado (EPP). O EPP proveniente das duas frutas foi re-dissolvido em água e aplicado em papel cromatográfico Whatman Chr nº 3 e eluído com BAW (butanol/ácido

acético/água (6:2:1)) como sistema solvente por 48 horas, em modo descendente. As zonas obtidas foram recortadas do papel seco e eluídas todas juntas com metanol, seguido de concentração para obtenção do extrato purificado (EP) de acerola e de açaí.

Análises fito-químicas

Os polifenóis totais e flavonóides totais foram extraídos conforme Singleton e Rossi (*21*), sendo que os polifenóis foram quantificados através do método de Folin-Ciocalteau, e os flavonóides quantificados pelo método de Zhishen et al. (*22*), e os resultados foram expressos em equivalente de ácido gálico (GAE) e de catequina (CE), respectivamente. A contribuição do AA na reação de Folin-Ciocalteau foi estabelecida nas soluções preparadas a partir do CE de acerola. O AA foi determinado por HPLC utilizando um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Waters, Milford, MA), constituído de um sistema quaternário de bombeamento de solventes, injetor Rheodyne com loop de 20μL, forno externo com controle de temperatura, desgaseificador “on line”, detector de arranjo de diodos (PDA) e sistema de aquisição e processamento de dados Millenium, com eluição isocrática de solução aquosa de ácido sulfúrico pH 2,5 como fase móvel a 0,7 mL/min, temperatura da coluna de 25ºC e processamento do cromatograma a 254 nm (*23*). Cada amostra foi analisada em duplicata e quantificada através de uma curva de calibração externa, sendo a área do pico da amostra comparada com a do padrão de ácido L-ascórbico.

Experimentos de foto-sensitização

As reações foram realizadas utilizando 0,1% HCl em metanol como solvente, DMA como actinômetro e MB como sensitizador, com agitação moderada, atmosfera de ar e temperatura controlada a 20 ± 1 ºC. As soluções de padrões de CYD-3G, CYD-3-R e MVD foram preparadas em concentrações entre 5,6 e 34,1 μM e as soluções dos extratos antociânicos das duas frutas foram preparadas mantendo constante a relação entre a massa dos extratos e o volume do solvente. O sistema foi iluminado com uma lâmpada de xenônio acoplada a um conjunto de filtros laranja e vermelho, permitindo a passagem de luz somente em comprimento de onda maior que 570 nm, excitando somente o sensitizador. O sistema foi monitorado através da medida de absorbância da solução em um sistema integrado de espectrofotômetro de arranjo de diodos (Agilent) e computador comandado pelo Software Ocean Optics, que realizou as leituras entre 190 e 900 nm, em determinados intervalos de tempo.

O efeito protetor que os extratos antociânicos ofereceram ao actinômetro DMA foi calculado através da equação 8.

$$\textbf{\% proteção} = \frac{K_{obs}^{DMA} - K_{obs}^{DMA+ANT}}{K_{obs}^{DMA}} \quad (8)$$

Time-resolved detection da fosforescência de $O_2(^1\Delta_g)$

Os experimentos foram realizados utilizando metanol como solvente, e perinaftenona como sensitizador. As soluções de padrões de CYD-3G, CYD-3-R e MVD foram preparadas em concentrações entre 5,0 e 36 μM. Foi empregado um laser Nd:YAG (Continuum Minilite II) como fonte de excitação com emissão a 355 nm, correspondentes a terceira harmônica, com um pulso de 10 ns. A fosforescência do $O_2(^1\Delta_g)$ a 1270 nm foi detectada em um ângulo reto com um detector de fotodiodos de germânio (Judson J16/8Sp). O sinal elétrico proveniente do detector foi digitalizado por um osciloscópio (Tektronix TDS3032B) e transferido através de uma interface a um computador para análise.

***Time-resolved photoacoustics* (TRP)**

Os experimentos foram realizados utilizando metanol como solvente e as soluções dos extratos antociânicos foram preparadas mantendo constante a relação entre a massa dos extratos e o volume do solvente. O sistema empregado para a medição da energia do estado triplete das antocianinas consiste de um gerador de laser como fonte de excitação, com pulsos de 10 ns a 355 nm (Continnum Minilite II Nd:YAG). A largura do feixe de laser foi modulada por uma fenda retangular (0,5 x 5 mm), seguindo uma resolução em tempo dos experimentos de TRP de 20 ns, elevando para 2 μs utilizando técnicas de *deconvolution*. A energia total do laser após a fenda foi alterada por pulso para 150 μJ, determinada através de um medidor de energia piroelétrico Melles-Griot (modelo 13PEM001). Um detector de cerâmica pieroelétrico colocado em ângulo relativo à direita do feixe de laser foi utilizado para monitorar a onda acústica. Sob condições experimentais idênticas, a hidroxibenzofenona foi utilizada como composto calorimétrico de referência (*24*).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito protetor dos extratos de antocianinas de açaí e de acerola

A Figura 1 apresenta as mudanças no espectro UV-Vis durante a foto-oxidação sensitizada do extrato purificado de açaí, utilizando DMA como actinômetro. Observou-se que, durante o experimento de foto-oxidação, praticamente não houve consumo do extrato purificado de açaí, ou seja, o $O_2(^1\Delta_g)$ formado através da sensitização do MB levou somente à oxidação do DMA.

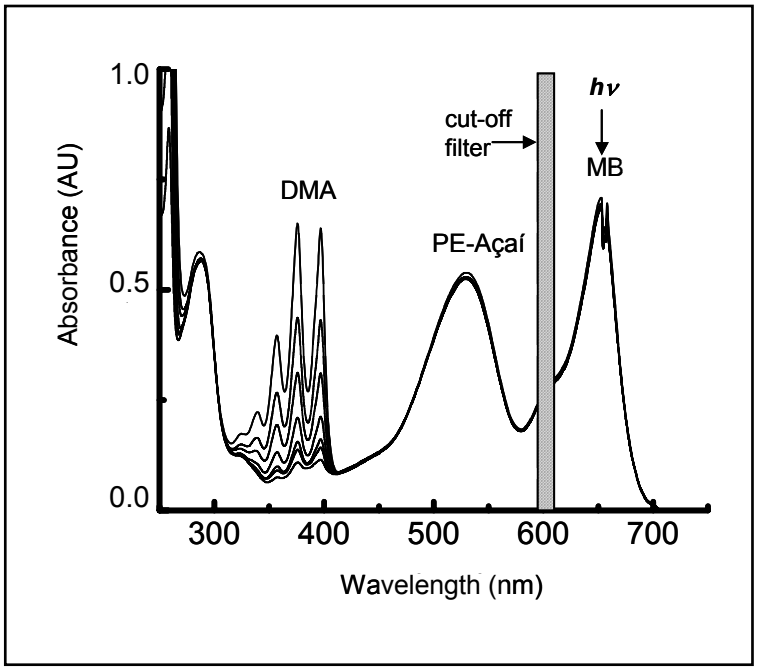


Figura 1. Mudanças no espectro UV-Vis durante a foto-oxidação sensitizada do extrato purificado de açaí, utilizando DMA como actinômetro.

A cinética de degradação foto-sensitizada do DMA, monitorada a 375 nm, foi de primeira ordem na presença dos extratos antociânicos de açaí e de acerola (Figura 2). Como as antocianinas não sofreram degradação significativa, ou seja, k_{obs} (530 nm) foi aproximadamente zero, estes resultados indicam que a via de desativação química pode ser considerada praticamente inexistente.

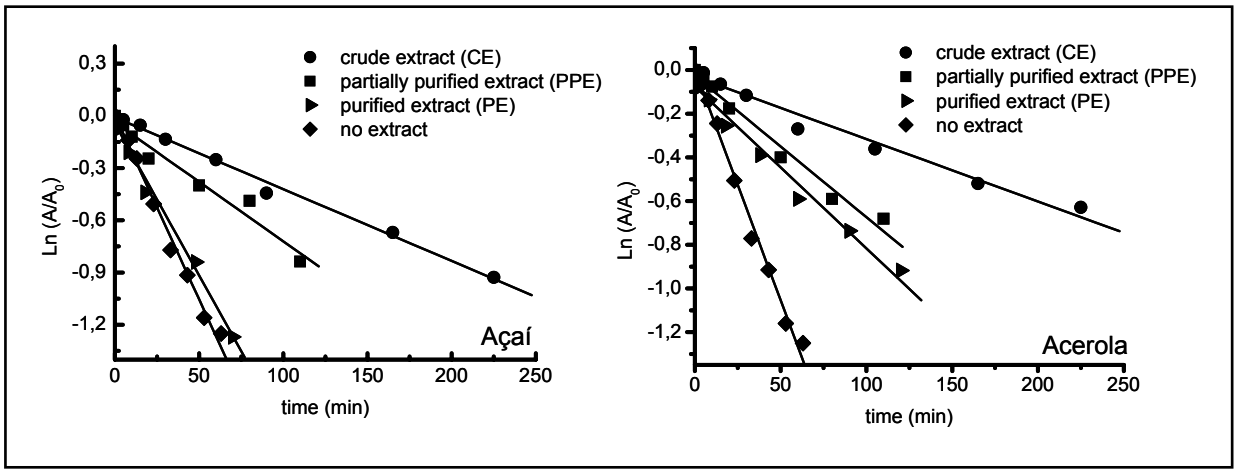


Figura 2. Curvas cinéticas de foto-oxidação sensitizada do DMA na presença de extratos antociânicos de açaí e de acerola, monitoradas a 375 nm.

Os valores da velocidade de degradação do DMA (k_{obs}) e o efeito protetor dos extratos antociânicos foram calculados para o consumo do DMA, que apresentou cinética de primeira ordem (Tabela 1).

Tabela 1. Valores de k_{obs} do DMA e efeito protetor dos extratos antociânicos de açaí e de acerola.

extratos	**açaí**		**acerola**	
	k_{obs} (min^{-1})	% efeito protetor	k_{obs} (min^{-1})	% efeito protetor
bruto	$4{,}1 \times 10^{-3}$	80,5	$2{,}8 \times 10^{-3}$	86,4
parcialmente purificado	$6{,}8 \times 10^{-3}$	67,4	$6{,}5 \times 10^{-3}$	69,1
purificado	$1{,}7 \times 10^{-2}$	17,1	$7{,}4 \times 10^{-3}$	64,7

O efeito protetor frente ao $O_2(^1\Delta_g)$ dos EB e EPP provenientes da acerola e do açaí foi muito similar, enquanto que o EP de acerola apresentou efeito protetor 3,8 vezes maior que o do EP de açaí. Essa diferença pode ter ocorrido em função da presença de outros componentes que foram extraídos juntamente com as antocianinas, tais como flavonóides, compostos fenólicos e ácido ascórbico (Tabela 2), tendo em vista que à medida que os extratos foram purificados o efeito protetor frente ao $O_2(^1\Delta_g)$ foi diminuindo.

Tabela 2. Características fito-químicas dos extratos antociânicos de acerola e de açaí.

Características fito-químicas	acerola			açaí		
	EB	EPP	EP	EB	EPP	EP
Polifenóis totais (mg GAE/100g)	3303,3	1062,5	810,0	3782,6	2614,0	1846,9
Flavonóides totais (mg CE/100g)	53,3	48,0	43,0	537,0	273,1	149,7
Ácido ascórbico (mg/100g)	1920,8	1140,2	796,4	nd	nd	nd

EB: extrato bruto, EPP: extrato parcialmente purificado, EP: extrato purificado.

Em todos os experimentos, o sensitizador MB não degradou como pode ser confirmado pelo espectro UV-Vis (Figura 1), assim como não foi observado consumo de antocianinas quando o sistema foi mantido no escuro em presença e ausência do sensitizador, indicando assim que as antocianinas não reagem diretamente com o sensitizador.

Estes resultados indicam que o $O_2(^1\Delta_g)$ foi gerado através de um mecanismo de transferência de energia a partir do estado eletrônico triplete excitado do MB para o $O_2(^3\Sigma^-_g)$. Na ausência de extratos antociânicos, o $O_2(^1\Delta_g)$ reagiu com o DMA levando à sua degradação, enquanto que na presença desses extratos o $O_2(^1\Delta_g)$ gerado foi desativado mediante um processo físico, sem degradação do pigmento ou outros compostos presentes nos extratos. O esquema 1 apresenta o mecanismo proposto.

esquema 1:

$MB + h\nu \rightarrow {}^1MB \rightarrow {}^3MB$

$^3MB + O_2(^3\Sigma^-_g) \rightarrow O_2(^1\Delta_g) + MB$

$DMA + O_2(^1\Delta_g) \rightarrow DMAO_2$ (k_{obs} (375 nm)) (desativação química)

EB ou EPP ou EP + $O_2(^1\Delta_g) \rightarrow$ EB ou EPP ou EP + $O_2(^3\Sigma^-_g)$ (desativação fisica, k_q)

Desativação de Oxigênio Singlete

O emprego de padrões de antocianinas se fez necessário para a comprovação dos resultados obtidos utilizando os extratos antociânicos de acerola e de açaí. As antocianinas e a antocianidina estudadas são desativadoras de oxigênio singlete, conforme a Figura 3 onde são apresentadas as cinéticas de primeira ordem para o consumo do DMA, obtidas em função das diferentes concentrações de antocianinas e de antocianidina.

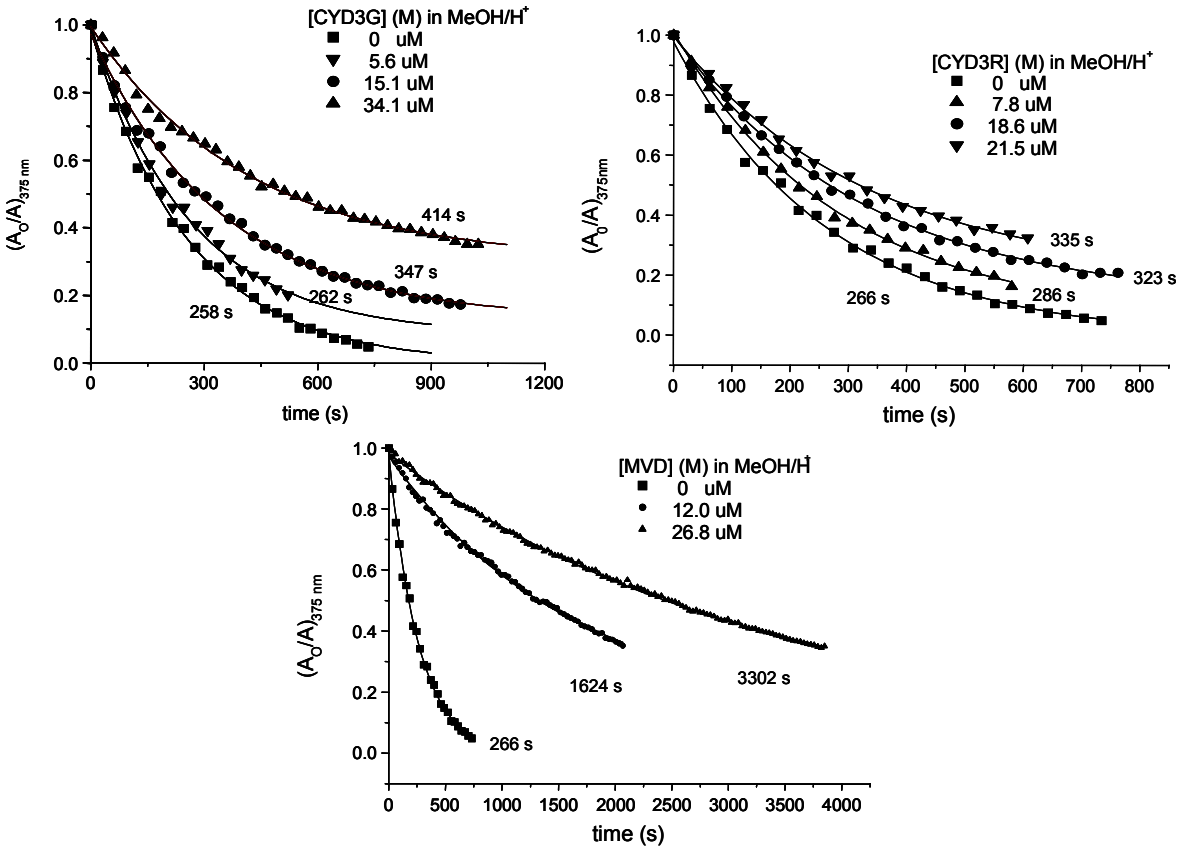


Figura 3. Curvas cinéticas de primeira ordem para o consumo de DMA, em função da concentração da cianidina-3-glucosídeo (CYD3G), cianidina-3-rutinosídeo (CYD3R) e malvidina (MVD).

A constante de desativação bimolecular (k_q, $M^{-1}s^{-1}$) foi calculada a partir do gráfico de Stern-Volmer (Figura 4), cuja inclinação da curva foi associada com a equação 9, utilizando-se o tempo de meia vida do $O_2(^1\Delta_g)$ em metanol, que é em média de $\tau_\Delta \approx 10$ μs.

$$\frac{k_{obs}^{o}}{k_{obs}} = 1 + K_{SV}[\mathbf{ANT}] = 1 + k_q \tau_\Delta [\mathbf{ANT}] \qquad (9)$$

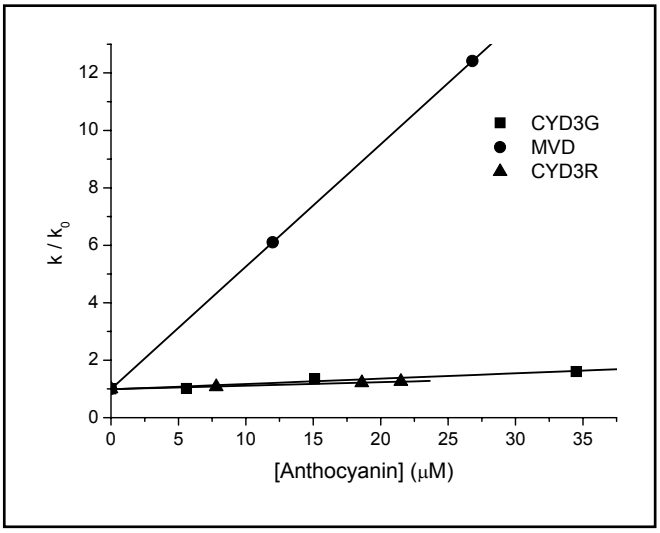


Figura 4. Gráfico de Stern-Volmer para a desativação do $O_2(^1\Delta_g)$ pela cianidina-3-glucosídeo (CYD3G), cianidina-3-rutinosídeo (CYD3R) e malvidina (MVD).

A cianidina-3-glucosídeo, cianidina-3-rutinosídeo e a malvidina apresentaram valores de k_q (Tabela 3) maiores que os determinados previamente para flavonóides (*18*), sendo que o valor de k_q da malvidina foi cerca de 24 vezes maior que o da cianidina-3-glucosídeo e 36 vezes maior que o da cianidina-3-rutinosídeo.

Tabela 3. Constante de desativação física (k_q) de $O_2(^1\Delta_g)$, determinada por método indireto, dos padrões de antocianinas e antocianidina.

Padrão	k_{SV} x 10^5 (M^{-1}).	k_q x 10^{10} $M^{-1}s^{-1}$
malvidina	4,30	4,80
ciandina-3-glucosídeo	0,18	0,20
cianidina-3-rutinosídeo	0,12	0,13

A determinação do k_q de desativação do $O_2(^1\Delta_g)$ também foi realizada de maneira direta, através do detector de fosforescência. Sob atmosfera saturada de ar, o sensitizador (perinaftenona) em seu estado triplete foi desativado pelo $O_2(^3\Sigma^-_g)$ produzindo o $O_2(^1\Delta_g)$, cuja concentração foi medida através do decaimento da fosforescência do a 1270 nm. A formação de $O_2(^1\Delta_g)$ foi medida na presença e na ausência de cianidina-3-glucosídeo, cianidina-3-rutinosídeo e malvidina. Na ausência de antocianinas, o tempo de vida do $O_2(^1\Delta_g)$ foi determinado experimentalmente como $\tau_\Delta^o \approx 9$ μs. Esse valor é muito

similar ao valor mencionado na literatura (*25*), comprovando a confiabilidade dos experimentos. Na presença de antocianinas o decaimento do $O_2(^1\Delta_g)$ foi mais curto, sendo os resultados obtidos plotados no gráfico de Stern-Volmer (Figura 5). A partir da equação 10 foi determinado os valores de k_q, apresentados na Tabela 4.

$$\frac{1}{\tau_\Delta} = \frac{1}{\tau_\Delta^{o}} + k_q[\mathrm{ANT}] \qquad (10)$$

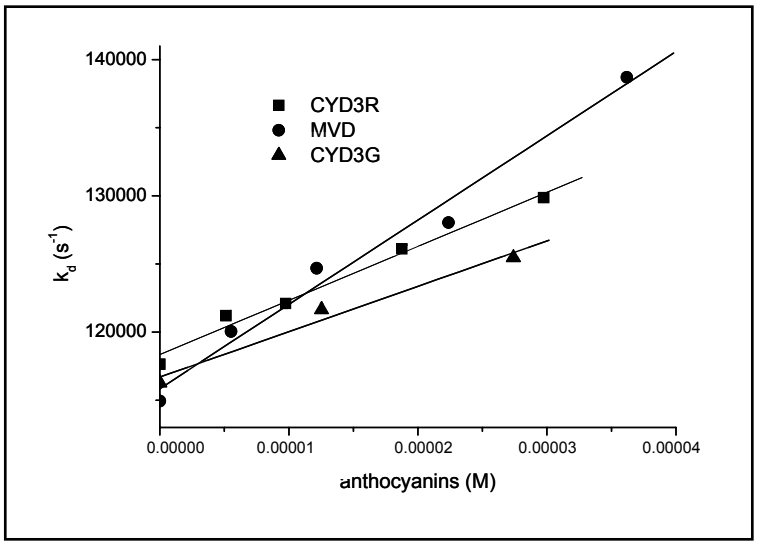


Figura 5. Gráfico de Stern-Volmer para a desativação do $^1O_2$ ($^1\Delta_g$) pela cianidina-3-rutinosídeo (CYD3R), cianidina-3-glucosídeo (CYD3G) e malvidina (MVD).

Tabela 4. Constante de desativação física (k_q) de $O_2(^1\Delta_g)$, determinada pelo método de decaímento da fosforescência, dos padrões de antocianinas e de antocianidina.

Padrão	k_q x 10^8 ($M^{-1}s^{-1}$)
malvidina	6,1
cianidina-3-glucosídeo	3,3
cianidina-3-rutinosídeo	3,9

Média de 2 repetições.

Comparando os resultados obtidos através do método actinométrico (indireto) com os obtidos pelo método direto (decaímento da fosforescência do $O_2(^1\Delta_g)$), verificou-se que os valores de k_q foram uma ordem de magnitude maior quando se utilizou o método indireto.

Os valores de k_q dos flavonóides quercetina, rutina e naringenina determinados por Tournaire et al. (*18*) foram 1,6 x 10^6, 1,5 x 10^6 e 5,0 x 10^4 $M^{-1}s^{-1}$, respectivamente, empregando o metanol como solvente e MB como sensitizador e empregando o método indireto. Assim como no método indireto, os valores de k_q determinados através do decaimento da fosforescência do $O_2(^1\Delta_g)$ para a cianidina-3-glucosídeo, cianidina-3-rutinosídeo e malvidina em metanol foram entre 100 e 400 vezes maiores que os determinados para os flavonóides. Independemente do método aplicado no presente estudo, a malvidina apresentou a maior constante de desativação do $O_2(^1\Delta_g)$ dentre os padrões estudados. Nagai et al. (*19*) reportaram valores para o k_q de diversos flavonóides em etanol, entre eles a quercitina, a rutina e a naringenina como sendo 4,6 x 10^8, 1,2 x 10^8 e 3,7 x 10^6 $M^{-1}s^{-1}$ empregando o etanol como solvente a 35ºC, utilizando o endoperóxido como gerador de oxigênio singlete.

Os resultados obtidos por Tournaire et al. (*18*) e Nagai et al. (*19*) indicam que a desativação do $O_2(^1\Delta_g)$ por flavonóides depende da presença do grupo catecol no anel B dos flavonóides e também do número de grupamentos OH substituídos na estrutura do flavonóide. A quercitina que tem 5 grupamentos OH apresenta k_q maior que a rutina que possui somente 4 grupamentos OH, e por sua vez o valor de k_q da naringenina foi menor que da rutina pois apresenta somente 3 grupamentos OH ligados ao esqueleto carbônico dos flavonóides. A influência da estrutura química das antocianinas também foi verificada no presente trabalho, uma vez que a antocianidina malvidina apresentou k_q (determinado pelo decaímento da fosforescência) cerca de 2 vezes maior que as antocianinas cianidina-3-glucosídeo e cianidina-3-rutinosídeo. Provavelmente essa diferença se deve a glicosilação das antocianinas que diminuiu o valor da constante de desativação do $O_2(^1\Delta_g)$.

Estado triplete das antocianinas

A determinação da energia do estado triplete das antocianinas foi realizada com o intuito de verificar se as antocianinas “armazenavam” a energia recebida do $O_2(^1\Delta_g)$,

passando para o estado triplete e após algum tempo (μs) essa energia seria liberada na forma de calor sem que ocorresse perda da antocianina.

A intensidade das ondas fotoacústicas geradas pelos extratos de açaí em diferentes condições de transmitância do filtro, utilizando a técnica de TRP foram graficadas através da amplitude do sinal foto-acústico dos extratos em função do percentual da energia do laser em metanol sob atmosfera de nitrogênio e de oxigênio (Figura 6).

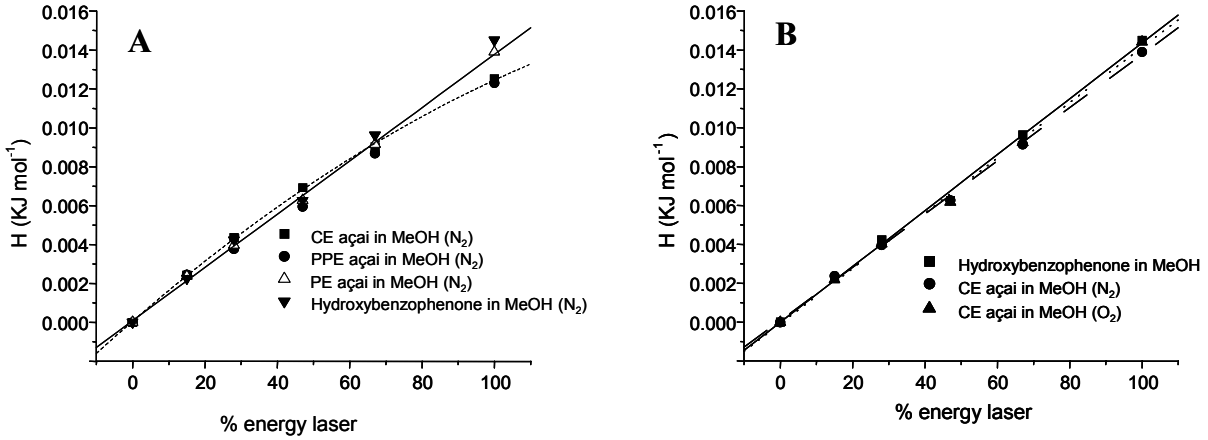


Figura 6. Gráfico da amplitude do sinal foto-acústico em função do percentual da energia do laser para os extratos de açaí sob atmosfera saturada de oxigênio e de nitrogênio.

Como as curvas obtidas foram lineares, provavelmente não ocorreram processos bifotônicos e de saturação. Os valores da inclinação das curvas do extrato bruto, em relação ao valor da curva da hidroxibenzofenona (composto de referência), Figura 6B, foram utilizados para a determinação do percentual de energia retida, que foi 4% sob atmosfera de nitrogênio e de 2% na presença de oxigênio. Parte da energia absorvida é estocada nas espécies transientes com vida relativamente longa. Resultados similares foram obtidos para os extratos parcialmente purificado e purificado de açaí como pode ser verificado na Figura 6A.

Entretanto não foi possível estabelecer o tempo de vida dos estados tripletes dos padrões e dos extratos antociânicos de acerola e açaí. Isso pode ter ocorrido devido ao limite de detecção do equipamento utilizado (10 ns) ser muito próximo do tempo de vida do estado triplete das antocianinas, tornando difícil a obtenção de resultados confiáveis.

O estado triplete dos carotenóides, compostos considerados os melhores desativadores de $O_2(^1\Delta_g)$, possuem tempo de vida na faixa de μs, por exemplo, o tempo

de vida do triplete da bixina em acetonitrila/metanol (1:1) foi determinado como sendo τ_T = 24 μs (*26*). Por outro lado, o tempo de vida das antocianinas é cerca de 10^3 vezes menor que os de carotenóides. O tempo de vida do estado triplete da malvidina-3-glucosídeo em solução aquosa a pH 2,5 foi de τ_T = 13,3 ns, em pH 3,0 foi τ_T = 35 ns e em pH 3,5 foi τ_T = 79 ns (*27*).

Esses resultados confirmam que as espécies que absorvem energia no UV, provavelmente os flavonóides, presentes nos extratos liberaram a energia absorvida na forma de calor muito rapidamente (< 10 ns) e desta forma não produzem espécies excitadas com tempo longo de vida (tripletes), que poderiam reagir com pigmentos como as antocianinas. Por outro lado, após *a* desativação do $O_2(^1\Delta_g)$, as antocianinas liberam prontamente a energia armazenada sob a forma de calor e a desativação do $O_2(^1\Delta_g)$ não depende da formação do estado triplete das antocianinas.

REFERÊNCIAS

(1) Strack. D.; Wray. V. The anthocyanins. In *The flavonoids – Advances in research since 1986*; Harborn. J. B. Ed.; CRC Press LLC: Boca Raton. Florida.**1993**. pp.1-19.

(2) De Rosso, V. V.; Mercadante, A. Z. Carotenoid composition of two Brazilian genotypes of acerola (*Malpighia punicifolia* L.) from two harvests. *Food Res. Inter.* **2005**, 38, 1073-1077.

(3) Santini, R.; Huyke, A. J. Identification of the anthocyanin present in the acerola which produces color changes in the juice on pasteurization and canning. In *Anthocyanins in fruits, vegetables and grains*; Mazza, G., Miniati, E., Eds.; CRC Press Inc.: New York, **1993**. p. 131.

(4) De Rosso, V. V.; Zanatta, C. F.; Silva, S. R.; Mercadante, A. Z. Carotenoids in tropical fruits from Brazil - acerola, camu-camu and açaí In *Proceedings of International Carotenoid Symposium*, **2005**, Edinburg.

(5) Hanamura, T.; Hagiwara, T.; Kawagishi, H. Structural and functional characterization of polyphenols isolated from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit. *Biosci. Biotec. Biochem.* **2005,** 69, 280-286.

(6) Lichtenthäler, R.; Rodrigues, R. B.; Maia, J. G. S.; Papagiannopoulos, M.; Fabricius, H.; Marx, F. Total oxidant scavening capacities of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) fruits. *Inter. J. Food Sci. Nut.* **2005**, 56, 53-64.

(7) Vendramini, A. L.; Trugo, L. C. Chemical composition of acerola fruit (*Malpighia punicifolia* L.) at three stages of maturity. *Food Chem.* **2000**, 71, 195-198.

(8) Assis, S. A., Lima, D. C.; Faria-Oliveira, O. M. M. Activity of pectinmethylesterase, pectin content and vitamin C in acerola fruit at various stages of development. *Food Chem.* **2001**, 74, 133-137.

(9) Brenes, C. H.; Del Pozo-Insfran, D.; Talcott, S. Stability of copigmented anthocyanins and ascorbic acid in a grape juice model system. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 49-56.

(10) Dyrby, M.; Westergaard, N.; Stapelfeldt, H. Light and heat sensitivity of red cabbage extract in soft drink model systems. *Food Chem.* **2001**, 72, 431-437.

(11) Wang, H.; Cao, G. H.; Prior, R. L. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45, 304-309.

(12) Kahkonen, M; Heinonen, M. Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 628-633.

(13) Kuskoski, E. M.; Asuero, A. G.; García-Parilla, M. C.; Troncoso, A. M.; Fett, R. Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. *Ciênc. Tecnol. Alimen.* **2004***,* 24, 691-693.

(14) Elstner, E. F. Oxygen activation and oxygen toxicity. *Annu. Rev. Plant. Physiol*. **1982**, 33, 73-96.

(15) Ravanat, J. L.; Martinez, G. R.; Medeiros, M. H. G.; Di Mascio, P.; Cadet, J. Mechanistic aspects of the oxidation of DNA constituents mediated by singlet molecular oxygen. *Arch. Biochem. Biophys.* **2004***,* 423, 23-30.

(16) Di Mascio, P.; Kaiser, S.; Sies, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch. Biochem, Biophys*, **1989**, 274, 532-538.

(17) Nagai, S.; Ohara, K.; Mukai, K. Kinetic study of the quenching reaction of singlet oxygen by flavonoids in ethanol solution. *J. Phys. Chem*. **2005**, 109, 4234-4240.

(18) Tounaire, C.; Croux, S.; Maurette, M. T.; Beck, I.; Hocquaux, M.; Braun, A. M.; Oliveros, E. Antioxidant activity of flavonoids: efficiency of singlet oxygen ($^1\Delta_g$) quenching. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 1993, 19, 205-215.

(19) Jang, Y. P.; Zhou, S.; Nakanishi, K.; Sparrow, J. R. Anthocyanins protect against A2E photooxidation and membrane permeabilization in retinal pigment epithelial cells. *Photochem. Photobiol.* **2005**, 81, 529-536.

(20) Degenhardt, A.; Knapp, H.; Winterhalter, P. Separation and purification of anthocyanins by high-speed countercurrent chromatography and screening for antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 338-343.

(21) Singleton, V. L.; Rossi, J. A. Jr. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents*. Amerc. J. Enol. Viti*. **1965**, 16, 144-158.

(22) Zhinshen, J.; Mengcheng, T.; Jianming, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem*. **1999**, 64, 555-559.

(23) Souza, M. C. C.; Benassi, M. T.; Meneghel, R. F. A.; Silva, R. S. S. F. Stability of unpasteurizes and refrigerated orange juice. *Braz. Arch. Bio. Tech*. **2004**, 47, 391-397.

(24) Braslavsky, S. E.; Heibel, G.E. Time-resolved photothermal and photoacoustic methods applied to photoinduced processes in solution. *Chem. Rev*. **1992**, 92, 1381-1410.

(25) Wilkinson, F.; Brummer, J. G. Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1981**, 10, 809-999.

(26) Montenegro, M. A.; Rios, A. O.; Mercadante, A. Z.; Nazareno, M. A.; Borsarelli, C. D. Model studies on the photosensitized isomerization of bixin. *J. Agric. Food Chem*. **2004,** 52, 367-373.

(27) Maçanita, A. L.; Moreira, P. F.; Lima, J. C.; Quina, F. H.; Yihwa, C.; Vautier-Giongo, C. Proton transfer in anthocyanins and related flavylium salts. Determination of ground-state rate constants with nanosecond laser flash photolysis. *J. Phys. Chem*. **2002**, 106, 1248-1255.

CONCLUSÂO GERAL

As duas variedades de acerola (Waldy Cati 30 e Olivier) apresentaram β-caroteno (265,5 – 1669,4 μg/100g), luteína (37,6 – 100,7 μg/100g), β-criptoxantina (16,3 – 56,5 μg/100g) e α-caroteno (7,8 – 59,3 μg/100g) como carotenóides majoritários. Em ambas safras, os teores de β-caroteno, β-criptoxantina e α-caroteno foram significativamente maiores na variedade Olivier, entretanto o teor de luteína foi maior na variedade Waldy Cati 30.

As duas variedades de acerola mostraram composição similar em termos de antocianinas e a cianidina-3-ramnosídeo foi a antocianina majoritária, seguida da pelargonidina-3-ramnosídeo, da cianidina-3,5-di-ramnosídeo e da peonidina-3-ramnosídeo. O teor de antocianinas totais da variedade Waldy variou de 6,5 a 7,6 mg/100g, enquanto para a variedade Olivier os teores variaram entre 7,9 e 8,4 mg/100g, para as safras de 2003 e 2004, respectivamente. Não foi verificada diferença significativa entre os teores de antocianinas totais das diferentes variedades e entre as duas safras. A polpa de açaí congelado apresentou teores de antocianinas totais variando entre 282 e 303 mg/100g, e as antocianinas cianidina-3-glucosídeo e a cianidina-3-rutinosídeo foram identificadas como antocianinas majoritárias perfazendo em média 13,2% e 87,5%, respectivamente.

Os experimentos demonstraram que o AA presente ao nível de 276 mg /100mL no extrato antociânico de acerola foi o principal responsável pela intensa degradação destas antocianinas, pois a adição de AA à solução de antocianinas de açaí na concentração de 276 mg/100mL provocou um aumento de 22 vezes na velocidade de degradação (k_{obs}) quando comparada ao açaí não fortificado.

A estabilidade das antocianinas de acerola e de açaí em sistema simulador de bebida isotônica foi 1,3 e 1,7 vezes menor do que nos sistemas tampão citrato-fosfato, respectivamente, na presença de luz e de oxigênio. Em todos os sistemas, a perda gradual da cor vermelha e aumento da cor amarela foi observada através do incremento do parâmetro CIE *L** (luminosidade) e diminuição dos valores de *C** (intensidade de cor) que podem ser resultado da degradação do cátion flavílio e formação de chalconas, respectivamente.

Os extratos bruto (EB), parcialmente purificado (EPP) e purificado (EP) de acerola apresentaram maior atividade antioxidante do que os respectivos extratos de açaí. A atividade anti-radical dos extratos brutos das duas frutas diminuiu à medida que o extrato

bruto foi sendo purificado e, portanto, a presença de polifenóis, flavonóides e ácido ascórbico no extrato antociânico bruto influenciou na atividade anti-radical. Os resultados obtidos com padrões confirmaram que a atividade anti-radical aumenta com o número grupos OH no anel B das antocianinas e que a atividade antioxidante diminui à medida que o número de açúcares glicosilados aumenta.

À medida que os extratos de acerola e de açaí foram sendo purificados, a capacidade de desativação do $O_2(^1\Delta_g)$ foi diminuindo. Dentre os padrões avaliados a malvidina foi o melhor quencher de $O_2(^1\Delta_g)$, independenente do método utilizado para cálculo do k_q. Os experimentos de TRP demonstraram que o estados tripletes das antocianinas de açaí apresentam tempo de vida muito curto, indicando que a desativação do $O_2(^1\Delta_g)$ não depende da formação do estados triplete das antocianinas.