

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS INSTITUTO DE QUÍMICA

ALINE GUADALUPE COELHO

ESTUDO DA DEGRADAÇÃO TÉRMICA DE ANTOCIANINAS DE EXTRATOS DE UVA (*Vitis vinifera L. '*Brasil') E JABUTICABA (*Myrciaria cauliflora*).

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA AO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM QUÍMICA NA ÁREA DE QUÍMICA ANALÍTICA.

ORIENTADOR: Prof.ª Dr.ª ADRIANA VITORINO ROSSI

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA POR ALINE GUADALUPE COELHO, E ORIENTADA PELA Prof.ª Dr.ª ADRIANA VITORINO ROSSI.

Assinatura do Orientador

CAMPINAS, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR SIMONE LUCAS - CRB8/8144 -BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP



Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Study of thermal degradation of anthocyanins extracts of grape (*Vitis vinifera L. ' Brasil '*) and jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*).

Palavras-chave em inglês: Anthocyanins Thermal degradation Grape Jabuticaba

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Mestre em Química na área de Química Analítica

Banca examinadora: Adriana Vitorino Rossi [Orientador] Leonardo Pezza Susanne Rath

Data de defesa: 07/12/2011

Programa de pós-graduação: Química

"Onde você quer chegar? Ir alto? Sonhe alto.

Queira o melhor do melhor,

Se pensamos pequeno, coisas pequenas teremos,

Mas se desejarmos fortemente o melhor.

E, principalmente, lutarmos pelo melhor...

O melhor vai se instalar em nossa vida.

Porque sou do tamanho daquilo que vejo, e não do tamanho da minha altura."

(Carlos Drummond de Andrade)

Dedico esta dissertação aos meus pais: José Guadalupe Coelho e Emídia Joaquina Coelho aos meus irmãos Igor Guadalupe Coelho e Yane Guadalupe Coelho por todo apoio, incentivo, cumplicidade e amor.

Agradecimentos

Agradeço a Profa. Dra Adriana Vitorino Rossi pela orientação desse trabalho.

Aos amigos do GPQUAE: Acácia, Eva, Lilia, Patrícia Castro e Patrícia Tonon, Willian, Nathássia, Juliana, Adriano, Sabir, Suryyia, Martha, pela amizade, companheirismo, brincadeiras, ajuda nas disciplinas, nas discussões e por tudo ao longo desse trabalho, tudo ficou mais fácil graças à presença e amizade de cada um de vocês.

Agradeço a todos os funcionários do IQ-UNICAMP que contribuíram para a realização deste trabalho. Em especial a Isabel (Bel) e ao Miguel, da CPG, à Rita, ao Ricardo e à Fabi, das salas de aparelhos por toda ajuda.

Agradeço também aos queridos amigos do GEM, que contribuíram com muita paciência, incentivo e amizade, para que os momentos mais difíceis fossem superados com alegria: Aline, Richard, Heloisa, Jucélio, Renata, Alexandre, Grazielle, Jaqueline, Débora, Walter, Dosil, Fracassi e Volpe obrigada por todo apoio!

Agradeço aos amigos: Lívia, Dani, Juliana, Laiane, Benedito, Francine, Manu, Marcelo, Bárbara, Samuel, Magale, Euzébio, Pedro, Vinicius e Guilherme, pela amizade, carinho e apoio sempre.

À Dra Tânia e à Marly por todo profissionalismo e seriedade que foram essenciais para vencer os desafios pelo caminho.

Agradeço a minha família querida: Minha Vó Marlene, meus pais meus irmãos, meus tios, tias, primos e amigos de Minas, que entenderam que minha ausência era necessária para que esse sonho fosse realizado.

Cada página dessa dissertação é meu agradecimento a Deus e a todas as pessoas que de alguma forma me ajudaram a alcançar esse objetivo.

Muito obrigada!

vi

Curriculum vitae

Graduação-Licenciatura em Química

Universidade vale do Rio Doce- UNIVALE- Governador Valadares-MG Conclusão: 12/2007

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

Técnica em Química, no Instituto de Química, IQ-UNICAMP, Campinas

Desde: outubro de 2010

TRABALHO DESENVOLVIDO EM INICIAÇÃO CIENTIFICA

Bolsa de Iniciação Científica - BIC FAPEMIG, vinculada ao projeto de pesquisa "Implantação e validação de um sistema de injeção em fluxo aplicado à determinação de nitrato em solos." Período: Março de 2006 a fevereiro de 2007 Orientado pela Profa. Dr.ª Raquel Andrade Donagemma.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

Quantificação de antocianinas em extratos de frutas com medidas colorimétricas em dispositivo portátil. No 16º Encontro Nacional de Química Analítica, Campos do Jordão, 2011.

Ferramentas analíticas no estudo da degradação térmica de antocianinas. Na 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Florianópolis, 2011.

Formação continuada e atividades de extensão em foco: "Comida, vida e Química." Para integrar professores, estudantes e pesquisadores. Na 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Florianópolis, 2011.

Il Escola de inverno de Separações Mini curso 2: Eletroforese capilar. IQ-UNICAMP, 2011.

Comissão organizadora do IV Fórum de Pós Graduação em Química. IQ-UNICAMP, 2010.

Efeito da temperatura de extração e de armazenamento na degradação de extratos de antocianinas de Uva Brasil (*Vitis vinifera L. cv.* "Brasil"). Na 33a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, 2010.

Achilla millefolium L.: marcha fotoquímica e análise espectrométrica no: IV Simpósio de Pesquisa e Iniciação Científica, Goverdador Valadares, 2006.

Implantação e validação de um sistema de injeção em fluxo aplicado a determinação de nitrato em solos no IV Simpósio de Pesquisa e Iniciação Científica, Governador Valadares, 2006,

Perfil espectrométrico no IV Simpósio de Pesquisa e Iniciação Cientifica, Governador Valadares, 2006.

Implantação e validação de um sistema de injeção em fluxo aplicado à determinação de nitrato em solos no: XLVI Congresso Brasileiro de Química, Salvador, 2006.

ATIVIDADES EXTRA-CURRICULARES

Monitora do Programa de Iniciação Cientifica Junior junto ao projeto: "Quantificação de antocianinas em extratos de frutas com medidas fotométricas em dispositivo portátil." Orientado pela Profa. Dra. Adriana Vitorino Rossi. Período: maio de 2010 a abril de 2011.

Monitora no Simpósio de profissionais de Ensino de Química (SIMPEQ), IQ-UNICAMP, 2011.

Monitora no IX Simpósio de profissionais de Ensino de Química (SIMPEQ), IQ-UNICAMP, 2010.

Para maiores detalhes consultar Currículo Lattes

Resumo

"Estudo da degradação térmica de antocianinas de extratos de uva (*Vitis vinifera L.* 'Brasil') e jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*)".

Autora: Aline Guadalupe Coelho

Orientadora: Adriana Vitorino Rossi

Antocianinas (ACYS) são corantes naturais que conferem cor a folhas, flores e frutas, são derivados glicosilados do cátion flavílio, da classe dos flavonóides e apresentam potencial para uso como corante, além de atividade antioxidante e terapêutica. Essas características estimulam buscar formas de viabilizar a utilização desses corantes na indústria de diversos segmentos, além de fomentar pesquisas acerca de sua estabilidade. Nesse trabalho, realizou-se o estudo da degradação térmica de extratos de ACYS, obtidos de uva (Vitis vinifera L. 'Brasil') e jabuticaba (Myrciaria Cauliflora). Os padrões das ACYS majoritárias para cada fruta malvidina-3-glicosídeo e cianidina-3-glicosídeo foram utilizados como referência. Foram realizados ensaios de estabilidade, para extratos obtidos a 25, 55 e 85 °C, com pH ajustado para 3,0 e mantido natural, armazenados sobrefrigeração ou a temperatura ambiente. Além disso, foram realizados ensaios de degradação acelerada a 55 e 85 ºC com monitoramento espectrofotométrico e análises dos extratos e padrões iniciais e degradados por UHPLC-MS. Os ensaios de estabilidade dos extratos foram monitorados por até 170 dias. Foi verificado o efeito da baixa temperatura de armazenamento, para a estabilidade dos extratos de uva, enquanto para os extratos de jabuticaba foram verificados também o efeito da diminuição do pH, e do aumento da concentração. Os estudos da degradação térmica indicaram o aumento da velocidade da degradação das ACYS, com o aumento da temperatura. As análises de UHPLC-MS dos extratos degradados indicaram que a temperatura de degradação não altera a rota de degradação das ACYS nas amostras. As reações de degradação dos padrões seguem ajustes de segunda ordem com energias de ativação de 95,2±0,1 e 89,34±0,05 kJ mol⁻¹, e tempos de meia vida de 78 ± 2 e 4,2± 0,1 e 58,7 e 3,8±0,4 horas para degradação a 55 e 85 ºC da cianidina-3-glicosídeo e malvidina-3-glicosídeo, respectivamente.

Abstract

Study of thermal degradation of anthocyanins of grape (*Vitis vinifera L. 'BRASIL'*) and jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*)".

Author: Aline Guadalupe Coelho

Advisor: Adriana Vitorino Rossi

Anthocyanins (ACYS) are natural dyes that give color to leaves, flowers and fruits, they are glycosylated derivatives of flavylium cation, the class of flavonoids and have potential for use as a dye, as well as antioxidant activity and therapy. These features facilitate finding ways to encourage the use of these dyes in various industry segments, and foster research about its stability. In this work, we carried out the study of thermal degradation of ACYS extracts obtained from grape (Vitis vinifera L. 'Brazil') and jabuticaba (Myrciaria cauliflora). Standards of the ACYS (malvidin-3-glucoside and cyanidin-3-glucoside) present in major quantity in each fruit were used as a reference. Stability tests over time, for extracts obtained at 25, 55 and 85 ° C, with pH adjusted to 3.0 and maintained course, and stored under refrigeration, were performed at room temperature. Further tests were carried out in order to determine accelerated degradation at 55 and 85 °C and were analyzed through spectrophotometry. Initial and degraded standards were analyzed by UHPLC-MS. Monitoring of the extracts was performed for up to 170 days, and the effect of storage temperature for stabilization of grape extracts was verified. In case of jabuticaba extracts, the effect of lower pH, the concentration of the extracts was also verified in addition to storage temperature. The thermal degradation studies indicated that the increased speed of degradation of ACYS with increasing temperature. The UHPLC-MS analysis of degraded extracts to indicate, that the degradation temperature does not change the route of degradation of samples. The standards degradation reaction followed fit second order adjustment with activation energies of 95.2±0.1 and 89.34±0.05 kJ mol-1, half-life of 78±2, 4.2±0.1 and 58.7±0.4 and 3.8 hours to decay to 55 and 85° C of cyanidin-3-glucoside and malvidin-3-glucoside, respectively.

Х

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURASXIII
LISTA DE TABELASXIV
LISTA DE FIGURAS XV
PREFÁCIO XXII
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO 1
1. INTRODUÇÃO 2
1.1. ANTOCIANINAS
1.2. APLICAÇÃO INDUSTRIAL
1.3.1 DEGRADAÇÃO TÉRMICA DE ANTOCIANINAS7
1.4 COPIGMENTAÇÃO9
1.5 TÉCNICAS ANALÍTICAS UTILIZADAS NO ESTUDO DE ANTOCIANINAS. 11
1.6 FRUTAS UTILIZADAS COMO FONTES DE ANTOCIANINAS 15
1.6.1 UVA BRASIL 15
1.6.2 JABUTICABA 16
1.7 SISTEMA DE AUTORIZAÇÃO E INFORMAÇÃO EM BIODIVERSIDADE (SISBIO)17
CAPÍTULO 2: OBJETIVOS 19
2.1 GERAIS:
2.2 ESPECÍFICOS:
CAPÍTULO 3: PARTE EXPERIMENTAL

xi

3.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS	22
3.2 EQUIPAMENTOS, MATERIAIS E REAGENTES	22
3.2.1 EQUIPAMENTOS	22
3.2.2 MATERIAIS	23
3.2.3 PADRÕES DE ACYS	23
3.2.4 REAGENTES	23
3.3. PROCEDIMENTOS PRELIMINARES	24
3.3.1. OBTENÇÃO DE EXTRATOS	24
3.3.1.1. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS UTILIZADOS NA FASE 1 2	24
3.3.1.2. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS UTILIZADOS NA FASE 2 2	24
3.3.1.3. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS SECOS	24
3.3.1.4 QUANTIFICAÇÃO DAS ACYS TOTAIS	24
3.3.1.5. PURIFICAÇÃO DOS EXTRATOS POR EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA	25
3.3.2. IDENTIFICAÇÃO DE ACYS	25
3.3.2.1. MÉTODO DE GOIFFON <i>ET AL</i>	25
3.3.2.2 IDENTIFICAÇÃO DE ACYS POR UHPLC	26
3.3.3 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA	26
3.4 FASE 1- MONITORAMENTO DA DEGRADAÇÃO	26
3.4.1 MONITORAMENTO DE DEGRADAÇÃO	26
3.5 FASE 2 MONITORAMENTO DA DEGRADAÇÃO ACELERADA 2	27

3.5.1 DEGRADAÇÃO DOS EXTRATOS E PADRÕES
3.5.2 ANÁLISES POR UHPLC-MS
CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO 29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 30
4.1 ESTUDOS PRELIMINARES
4.1.1 QUANTIFICAÇÃO DAS ACYS 30
4.1.2 COMPARAÇÃO DE DOIS MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DE ACYS: MÉTODO GOIFFON E UHPLC-MS
4.1.3 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA
4.2 EXPERIMENTOS DA FASE 1
4.2.1 MONITORAMENTO DA DEGRADAÇÃO EXTRATOS DE JABUTICABA . 37
4.2.2 MONITORAMENTO DA DEGRADAÇÃO EXTRATOS DE UVA
4.3 EXPERIMENTOS DA FASE 2
4.3.1 RESULTADOS FASE 2: SOLUÇÕES DE PADRÕES DE ACYS 40
4.3.2 RESULTADOS FASE 2: EXTRATOS BRUTOS DE ACYS 46
4.3.3 RESULTADOS FASE 2: EXTRATOS PURIFICADOS DE ACYS55
4.3.4 CINÉTICA DA DEGRADAÇÃO DE EXTRATOS E PADRÕES 60
CAPÍTULO 5: CONCLUSÃO 66

LISTA DE ABREVIATURAS

ACYS - Antocianinas

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC - Association of Analytical Communities

CE - Eletroforese capilar

E_a - Energia de ativação

ESI – lonização por eletrospray

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

k- Constante de reação

MS – Espectrometria de massas

PPO - Polifenoloxidase

SISBIO – Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

 $t_{1/2}$ – Tempo de meia vida

UHPLC – Cromatrografia Líquida de Ultra Alta Aficiência

UV-Vís – Ultravioleta- Vísivel

xiv

LISTA DE TABELAS.

Tabela 1: Concentração média de ACYS extraída com água em diferentes
temperaturas
Tabela 2: ACYS identificadas nos extratos de uva e jabuticaba por UHPLC-MS e
pelo método de Goiffon <i>et al.</i>
Tabela 3: Dados padrão de malvidina-3-glicosídeo
Tabela 4: Dados padrão de cianidina-3-glicosídeo
Tabela 5: Dados de espécies presentes em extrato bruto de uva
Tabela 6: Dados de espécies presentes em extrato bruto de jabuticaba
Tabela 7: Constantes de reação, tempo de meia- vida e parâmetros de Arrhenius
para a degradação da Malvidina-3-glicosídeo62
Tabela 8: Constantes de reação, tempo de meia- vida e parâmetros de Arrhenius
para a degradação de cianidina-3-glicosídeo63
Tabela 9: Constantes de reação, tempo de meia- vida e parâmetros de Arrhenius
para a degradação de extrato bruto de uva64
Tabela 10: Constantes de reação, tempo de meia-vida para a degradação de
extrato purificado de jabuticaba64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura cátion flavilio, sendo que antocianinas têm R" = unidade
glicosídica. Se R"= H, têm-se antocianidinas3
Figura 2: Mudanças estruturais das ACYS em função do pH (TERCI e ROSSI,
2002)
Figura 3: Variação da cor de soluções aquosas de ACYS obtidas de uva em
função do pH. ACYS de uva com soluções de pH conhecido variando de 1 a 14 da
esquerda para direita
Figura 4: Possível mecanismo de degradação térmica de ACYS (Original em
Patras <i>et al</i> , 2010)7
Figura 5: Modelo hipotético da copigmentação intramolecular de antocianinas
adaptado de Falcão et al, 2003) 10
Figura 6: Modelos de interações intermoleculares entre delfinidina-3-glicosídeo e
rutina (adaptado de Rein, 2005)11
Figura 7: Espectro eletrônico de ACYS em soluções de pH 1,0 e 4,5 e estrutura
do cátion flavílio (A) e hemiacetal(B). R= H ou substituinte glicosilado (adaptado de
Wrolstad <i>et al</i> , 2005)
Figura 8: Frutos de Vitis vinifera L. A) cv. Itália, B) cv. Rubi, C) cv.Benitaka, D)
Brasil (Oliveira-Collet <i>et al</i> 2005)15
Figura 9: Origem das variedades Rubi e Benitaka a partir da Itália (1972 em Santa
Mariana e 1988 em Floraí, respectivamente) e da variedade Brasil a partir da
Benitaka (1991 na região de Floraí). Original em Oliveira-Collet et al 2005 16
Figura 10: Uva Brasil utilizada no trabalho16
Figura 11: Frutos de jabuticaba
Figura 12: Espectros eletrônicos dos extratos brutos de jabuticaba e uva,
respectivamente, extraído a 55 ºC, tendo água destilada como branco 30
Figura 13: Estrutura genérica das ACYS (Harbone,1994)
Figura 14: Cromatograma do extrato de jabuticaba. Condições cromatográficas:
eluição isocrática em fase reversa, fase móvel: água deionizada: acetonitrila: ácido
fórmico 89:9:10 (v/v/v), volume de injeção 20 $\mu L,$ detecção em 525 nm

equação 3), para extratos de uva com pH natural, armazenado a 8 °C (UN8), com pH ajustado para 3,0, armazenado a 8 °C (U38), com pH ajustado em 3,0 e armazenado a temperatura ambiente (U3A) e com pH natural e armazenado a temperatura ambiente (UNA).

1 % de B, 4 a 8 minutos: 80% de A e 20 % de B, 8 a 10 minutos: 70% de A e 30% Figura 23: Espectro de massas dos padrão de cianidina-3-glicosídeo, injetado no UHPLC-MS, Condições MS: Capilar 0,80 kV, Cone 30 V, Extrator 3 V, RF lentes 0.5 V, temperatura da fonte = 120 °C e temperatura de dessolvatação = 400 °C. 43 Figura 24: Espectro de massas seguencial do padrão de cianidina-3-glicosídeo, injetado no UHPLC-MS/MS, Condições MS: Capilar 3,0 kV, Cone 30 V, Extrator 3 V, RF lentes 0.5 V, temperatura da fonte = 120 °C e temperatura de Figura 25: Monitoramento dos padrões de malvidina-3-glicosideo (preto) e **B:**cianidina-3-glicosideo (vermelho)ostras degradadas a **A:** 55 °C e **B:** 85 °C utilizando água destilada como branco, monitorado por 55 e 11 horas Figura 26: Espectros eletrônicos do padrão de A: malvidina-3-glicosídeo e B: cianidina-3-glicosídeo, amostras degradadas a 55 ºC utilizando água destilada como branco, monitorados por 18,5 horas......45 Figura 27: Espectros eletrônicos do padrão de A: malvidina-3-glicosídeo e B: cianidina-3-glicosídeo amostras degradadas a 85 ºC utilizando água destilada Figura 28: Cromatogramas do A: extrato bruto de uva, B: extrato bruto de uva degradado a 55 °C e C: extrato bruto de uva degradado a 85 °C injetados no UHPLC-MS. Condições: eluição por gradiente A (água:ácido fórmico 0,1%) e B (acetonitrila: ácido fórmico 0,1 %), tempo de eluição 12 minutos, vazão da fase móvel:0,35 mL/min, gradiente inicial: 99 % de A e 1 % de B, 4 a 8 minutos: 80 % de A e 20 % de B, 8 a 10 minutos: 70 % de A e 30 % de B, 10 a 12 minutos: 95 % de A e 5% de B. Volume de injeção 10 µL...... 46 Figura 29: Cromatrogramas do extrato bruto de uva e os picos das ACYS identificadas injetados no UHPLC-MS. Condições cromatográficas: eluição por gradiente A (água: ácido fórmico 0,1%) e B (acetonitrila: ácido fórmico 0,1%), tempo de eluição de 12 minutos, vazão da fase móvel:0,35 mL/min, gradiente inicial: 99 % de A e 1 % de B, 4 a 8 minutos: 80 % de A e 20 % de B, 8 a 10

minutos; 70 % de A e 30 % de B, 10 a 12 minutos; 95 % de A e 5% de B. Volume Figura 30: Espectro de massas da delfinidina-3-glicosídeo, obtida da injeção do extrato bruto de uva no UHPLC-MS, Condições MS: Capilar 0,80 kV, Cone 30 V, Extrator 3 V, RF lentes 0.5 V, temperatura da fonte = 120 °C e temperatura de Figura 31: Espectro de massas da cianidina-3-glicosídeo, obtida da injecão do extrato bruto de uva no UHPLC-MS, Condições MS: Capilar 0,80 KV, Cone 30 V, Extrator 3 V, RF lentes 0,5 V, temperatura da fonte = 120 °C e temperatura de Figura 32: Espectro de massas da peonidina-3-glicosídeo, obtida da injecão do extrato bruto de uva no UHPLC-MS, Condições: Capilar 0,80 kV, Cone 30 V, Extrator 3 V, RF lentes 0,5 V, temperatura da fonte = 120 °C e temperatura de Figura 33: Espectro de massas da malvidina-3-glicosídeo, obtida da injeção do extrato bruto de uva no UHPLC-MS, Condições: Capilar 0,80 kV, Cone 30 V, Extrator 3 V, RF lentes 0,5 V, temperatura da fonte = 120 °C e temperatura de Figura 34: Espectro de massas da petunidina-3-glicosídeo, obtida da injecão do extrato bruto de uva no UHPLC-MS, Condições MS: Capilar 0,80 KV, Cone 30 V, Extrator 3 V, RF lentes 0,5 V, temperatura da fonte = 120 °C e temperatura de Figura 35: Espectro de massas de produtos de degradação dos extratos de uva bruto por UHPLC-MS, Condições: Capilar 0,80 kV, Cone 30 V, Extrator 3 V, RF lentes 0,5 V, temperaturas da fonte: 120 ºC e dessolvatação: 400 ºC 50 Figura 36:Cromatogramas UHPLC-MS de A: extrato bruto de jabuticaba, B: extrato bruto de jabuticaba degradado a 55 °C e C: extrato bruto de jabuticaba degradado a 85 °C. Condições: eluição por gradiente A (água:ácido fórmico 0,1%) e B (acetonitrila: ácido fórmico 0,1%), tempo de eluição: 12 min, vazão da fase móvel:0,35 mL/min, gradiente inicial: 99 % de A e 1 % de B, 4 a 8 minutos: 80 %

de A e 20 % de B, 8 a 10 minutos: 70 % de A e 30 % de B, 10 a 12 minutos: 95 %
de A e 5 % de B. Volume de injeção 10 μL
Figura 37: Cromatrogramas UHPLC-MS do extrato bruto de uva e picos das
ACYS identificadas. Condições: eluição por gradiente A (água:ácido fórmico 0,1%)
e B (acetonitrila:ácido fórmico 0,1 %), eluição: 12 min, vazão da fase
móvel:0,35 mL/min, gradiente inicial: 99 % de A e 1 % de B, 4 a 8 min: 80 % de A
e 20 % de B, 8 a 10 min: 70 % de A e 30 % de B, 10 a 12 min: 95 % de A e 5% de
B. Volume de injeção 10 μL
Figura 38: Espectro de massas da protogucinaldeido, obtida da injeção do extrato
bruto de jabuticaba no UHPLC-MS, Condições MS: Capilar 0,80 kV, Cone 30 V,
Extrator 3 V, RF lentes 0,5 V, temperatura da fonte = 120 $^{\circ}$ C e temperatura de
dessolvatação = 400 $^{\circ}$ C
Figura 39: Espectro de massas da cianidina-3-glicosídeo, obtida da injeção do
extrato bruto de jabuticaba no UHPLC-MS, Condições MS: Capilar 0,80 kV, Cone
30 V, Extrator 3 V, RF lentes 0,5 V, temperatura da fonte = 120 $^{\circ}$ C e temperatura
de dessolvatação = 400 ºC 52
Figura 40: Monitoramento de extratos brutos de A: jabuticaba e B: uva amostras
degradadas a 55 $^{\mathrm{o}}\mathrm{C},$ monitorados por 70 horas com medidas em 525 nm., tendo
água destilada como branco 53
Figura 41: Espectros eletrônicos dos extratos brutos de A: jabuticaba e B: uva
amostras degradadas a 55 ºC utilizando água destilada como branco, monitorados
por 70 horas com medidas em 525 nm53
Figura 42: Monitoramento de extratos brutos de A: jabuticaba e B: uva amostras
degradadas a 85 ºC utilizando água destilada como branco, monitorados por 12
horas com medidas em 525 nm
Figura 43: Espectros eletrônicos dos extratos brutos de A: jabuticaba e B: uva
amostras degradadas a 85 °C utilizando água destilada como branco, monitorados
por 9 horas com medidas em 525 nm54
Figura 44: Espectro de massas de produtos de degradação dos extratos de
jabuticaba , obtida da injeção do extrato bruto de jabuticaba no UHPLC-MS,

Condições MS: Capilar 0,80 kV, Cone 30 V, Extrator 3 V, RF lentes 0,5 V, temperatura da fonte = 120 °C e temperatura de dessolvatação = 400 °C. 55 Figura 45: Cromatogramas do A: extrato purificado de uva, B: extrato purificado de uva degradado a 55 °C e C: extrato purificado de uva degradado a 85 °C. Condições: eluição por gradiente A (água:ácido fórmico 0.1%) e B (acetonitrila: ácido fórmico 0,1 %), tempo de eluição de 12 min, vazão da fase móvel:0,35 mL/min, gradiente inicial: 99 % de A e 1 % de B, 4 a 8 min: 80 % de A e 20 % de B, 8 a 10 min: 70 % de A e 30 % de B, 10 a 12 minutos: 95 % de A e 5 Figura 46: Cromatogramas do A: extrato purificado de jabuticaba, B: extrato purificado de jabuticaba degradado a 55 °C e C: extrato purificado de jabuticaba degradado a 85 °C, injetados no UHPLC-MS. Condições cromatográficas: eluição por gradiente A (água:ácido fórmico 0,1 %) e B (acetonitrila:ácido fórmico 0,1 %), tempo de eluição de 12 minutos, vazão da fase móvel:0,35 mL/min, gradiente inicial: 99 % de A e 1 % de B, 4 a 8 minutos: 80 % de A e 20 % de B, 8 a 10 minutos: 70 % de A e 30 % de B, 10 a 12 minutos: 95 % de A e 5 % de B. Volume Figura 47: Monitoramento dos extratos purificados de A: jabuticaba e B: uva amostras degradadas a 55 °C utilizando água destilada como branco, monitorados Figura 48: Monitoramento dos extratos purificados de A: jabuticaba e B: uva amostras degradadas a 85 ºC utilizando água destilada como branco, monitorados por 18 horas com medidas em 525 nm. 58 Figura 49: Espectros eletrônicos dos extratos purificados de A: jabuticaba e B:uva amostras degradadas a 55 ºC utilizando água destilada como branco, monitorados Figura 50: Espectros eletrônicos dos extratos purificados de A: jabutucaba e B: uva amostra degradada a 85 ºC utilizando água destilada como branco,

xxi

jabuticaba purificados típicos, monitorados em espectrofotômetro por 18 Horas. 64

Prefácio

O interesse dos consumidores e a motivação para a aquisição de vários produtos, como alimentos e cosméticos, estão diretamente relacionados com algumas propriedades como aspecto visual e aroma, dentre outras características. Tendo em vista o interesse por pigmentos versáteis, com vantagens como baixo custo, baixa toxidez e obtenção de fontes naturais, as antocianinas (ACYS) despontam com elevado potencial para utilização em diversas aplicações industriais. O uso de ACYS é limitado por sua instabilidade em algumas condições observadas durante o processamento industrial como temperatura, luz, presenca de oxigênio. O estudo da degradação térmica de ACYS é relevante nesse contexto já que o processamento industrial de alimentos, sucos e outros produtos nos quais ACYS podem ser utilizadas, geralmente envolvem etapas de aquecimento. Mesmo que não haja etapas de aquecimento, a degradação de ACYS ao longo do tempo é outro aspecto relevante para aplicações em cosméticos e nutracêuticos, por exemplo. Nesses produtos, ACYS podem ser utilizadas explorando sua capacidade como corante, bem como por suas propriedades terapêuticas.

Nesse trabalho, estudamos condições comuns para essas aplicações de ACYS em estudos de estabilidade de extratos de ACYS obtidas de uva (*Vitis vinifera L.* Brasil') e jabuticaba (*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg) ao longo do tempo e a degradação térmica acelerada desses extratos. Monitoramento espectrofotométrico foi utilizado para estudos de degradação, inclusive acelerada de extratos de ACYS, sendo que a cromatografia líquida de ultra alta eficiência com detecção por espectrometria de massas (UHPLC-MS) foi aplicada a algumas amostras degradadas para obter informações sobre os produtos formados e a indicação de uma possível rota envolvida no processo.

Investigações preliminares, como identificação e quantificação das ACYS e análise termogravimétrica trouxeram alguns parâmetros de trabalho como a temperatura máxima de extração e de monitoramento nos estudos de degradação.

Os resultados obtidos trazem informações úteis para a utilização de extratos de ACYS. Temperatura é um fator crítico na degradação de ACYS, portanto, estudos para melhorar condições de processamento industrial e

armazenamento desses compostos são relevantes já seu uso vem crescendo em decorrência de pesquisas sobre potenciais benefícios de seu uso em produtos de consumo humano e outras aplicações.

Esta dissertação está dividida em seis capítulos:

O primeiro capítulo introduz uma revisão com informações da literatura sobre ACYS, seus processos de degradação térmica, aplicações industriais e implicações da degradação. Além disso, técnicas analíticas aplicadas para ACYS são apresentadas. Uma breve descrição do SISBIO (Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade) explica o cadastro necessário para a realização das pesquisas com as frutas utilizadas nesse trabalho. Finalizamos com informações gerais sobre as frutas utilizadas no trabalho.

O segundo capítulo apresenta os objetivos gerais e específicos que orientaram a realização da dissertação.

O terceiro capítulo traz a descrição da parte experimental, que foi dividida em duas fases, além de um conjunto de testes preliminares comum a todos os estudos, envolvendo a descrição da obtenção dos extratos, a quantificação e a identificação das ACYS e a análise termogravimétrica que direcionou a escolha de alguns parâmetros experimentais. A primeira fase descreve os procedimentos de monitoramento da estabilidade dos extratos obtidos em diferentes temperaturas de extração e armazenados a temperatura ambiente ou sob refrigeração, em pH natural ou ajustado. A segunda fase trata da degradação acelerada dos extratos e padrões e a análise por UHPLC-MS dos extratos e padrões antes e depois da degradação.

No quarto capítulo os resultados são apresentados e discutidos, seguindo a divisão da parte experimental.

O quinto capítulo apresenta as conclusões, salientando os pontos relevantes e conclusivos do trabalho, além de perspectivas e desdobramentos.

O sexto capítulo traz as referências utilizadas no trabalho.

Capítulo 1: Introdução

1. Introdução

A utilização de corantes naturais que possam substituir corantes artificiais é relevante tendo em vista que corantes artificiais são potencialmente tóxicos e podem causar reações adversas nos consumidores (Ring *et al*, 2001). Desde meados da década de 1970, alguns corantes vermelhos, por exemplo, têm sido banidos devido a seus efeitos toxicológicos (Mazza & Brouillard, 1987).

Corantes são substancias que conferem, intensificam ou restauram a cor de um alimento e são classificados como aditivos alimentares. No Brasil são 13 os corantes orgânicos sintéticos artificiais permitidos em alimentos (ANVISA), sendo alguns, azo compostos, que podem ser metabolizados a aminas aromáticas e causar danos aos tecidos hepático e renal (Amin *et al*,2010).

Por sua vez, corantes naturais, com cores atrativas e possíveis ações benéficas à saúde, despertam o interesse para estudos sobre sua obtenção e conservação. Além disso, o manejo consciente para favorecer a preservação de espécies nativas e exóticas que são fontes desses corantes também torna esses estudos interessantes.

1.1. Antocianinas

Antocianinas (ACYS) são compostos com diversas características interessantes para aplicações industriais como corantes e podem ser obtidas a partir de fontes naturais acessíveis.

ACYS (do grego *anthos* = flor e *kianos* = azul) são corantes que conferem cores que variam de vermelho ao azul a flores, frutos, folhas, raízes e sementes. São compostos solúveis em água, pertencentes à classe dos flavonóides, que são derivados glicosilados do cátion 3,5,7,3'-tetrahidroxiflavilio, ilustrado na Figura 1. ACYS apresentam glicosídeos e grupos OH ligados a sua estrutura geral, sendo muito hidrossolúveis e facilmente extraídas de plantas utilizando solventes polares. Cada molécula de antocianina é constituída por uma aglicona (antocianidina), um ou mais grupos de açúcares e, usualmente, um grupo de ácidos orgânicos (Harbone, 1994). As diferentes substituições nas antocianidinas originam as várias ACYS, como indicado na Figura 1.

O interesse em ACYS está relacionado ao potencial de utilização de ACYS como corantes em diferentes segmentos da indústria e a diversas propriedades benéficas a saúde relacionada a esses compostos (Zhai & Yang, 2010; Pace *et al*, 2009). O interesse pelos corantes naturais: carotenóides, antocianinas e betacianinas teve impulso na década de 1970, quando patentes relacionadas a aplicação de corantes naturais em alimentos cresceram 100% enquanto o número de patentes relacionadas a compostos sintéticos para o mesmo fim, manteve-se constante (Mazza & Brouillard, 1987 *apud* Francis, 1984).



Antocianidina	Grupo R	Grupo R'
Cianidina	OH	Н
Delfinidina	OH	OH
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃
Pelargonidina	Н	Н
Peonidina	OCH ₃	Н
Petunidina	OCH ₃	OH

Figura 1: Estrutura cátion flavilio, sendo que antocianinas têm R" = unidade glicosídica. Se R"= H, têm-se antocianidinas.

Propriedade antioxidante (Pace *et al*, 2009; Patras *et al*,2010; Sendra *et al*, 2010, Wrolstad, 2004; Wang, 2008), atividade redutora de doenças coronárias e cardíacas, redução de riscos de acidente vascular cerebral, atividade anticarcinogênica (Jing *et al*, 2008; Wrolstad, 2004), efeitos anti-inflamatórios, melhora da acuidade visual (Wrolstad, 2004), são alguns efeitos associados a ACYS que vem sendo estudados recentemente com indicativos positivos quanto a bioatividade dos corantes antociânicos.

A estrutura fenólica das ACYS contribui para sua ação antioxidante. A inativação de espécies reativas de oxigênio foi demonstrada por Wang em cultura de células diversas (Wang, 2008), bem como a capacidade de desativar radicais livres (Nagai *et al*, 2005). Resultados dos testes da atividade antioxidante de corantes antociânicos em temperatura ambiente pelo método de descoloração do radical ABTS^{+ 1} (Malacrida, 2006) e da reação com DPPH ² (Sun *et al*, 2009)

¹ 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato

² 1,1-difenil-2- picrilhidrazina

também demonstraram a atividade antioxidante desses compostos. Adicionalmente, algumas ACYS quelam metais, inibindo a peroxidação (Smyk *et al*, 2008) em processo também relacionado com ação antioxidante.

1.2. Aplicação industrial

Corantes naturais despertam o interesse da indústria de diversos segmentos como alimentícia (Giusti & Wrolstad, 2003; Costa *et al*, 2000), de cosmético (Longo *et al*, 2007; Valls *et al*,2009; Yang & Zhai, 2010), cosmecêutica (Ben Amor & Allaf, 2009), nutracêutica (Mauro *et al*, 2002; Bordignon-Luiz *et al*, 2007, Ersus & Yurdagel, 2007) e farmacêutica (Ben Amor & Allaf, 2009; Ersus & Yurdagel, 2007). Cor é um aspecto importante que determina a aceitação de produtos alimentícios, pois os consumidores a associam à qualidade dos produtos. Essa relação estimula os fabricantes incorporarem corantes aos alimentos industrializados, inclusive como indicativo de sua qualidade (Mazza & Brouillard, 1987; Giusti & Wrolstad, 2003). As aplicações de ACYS consideram seu potencial como corante bem como propriedades terapêuticas inerentes a esses compostos.

ACYS podem se adequar a aplicações industriais por apresentarem poder corante e características como alta solubilidade em água e baixa toxicidade (Burin *et al*, 2011; Ersus & Yurdagel, 2007). Entretanto, a despeito desses atrativos, a aplicação desses corantes é reduzida devido a alguns fatores críticos. A baixa estabilidade química, a dificuldade de purificação e, consequentemente, baixa disponibilidade comercial das ACYS e o custo elevado, bem como a pequena capacidade corante em relação a compostos sintéticos, limitam a ampliação das aplicações de ACYS (Mazza & Brouillard, 1987 *apud* Ribon, 1977). Outros fatores limitantes são relacionados ao fato da cor de ACYS ser facilmente afetada por reações comuns em produtos alimentícios, além da foto-sensibilidade, e a susceptibilidade à degradação térmica (Wrolstad, 2004). Diante disso, diversos estudos são realizados buscando condições que mantenham características funcionais, cor e garantam extrações de quantidades significativas de ACYS visando fomentar sua aplicação industrial.

1.3 Degradação de antocianinas

Vários fatores interferem na estabilidade de ACYS, incluindo pH, ação de oxigênio, enzimas, variação de temperatura e incidência de luz (Alighourchi & Barzegar, 2009). Variações do pH do meio, por exemplo, causam alterações de cor, com quebra de suas moléculas em meio fortemente alcalino, com a formação de chalconas como mostra a Figura 2. Em meio ácido, ACYS são mais estáveis na forma predominante do cátion flavílio. Com o aumento do pH para valores em torno de 6 predomina a anidrobase de cor violeta, e com aumentos sucessivos do pH em torno de 14, ocorre a quebra do anel pirílio (Adams, 1973) com a conversão irreversível de ACYS a uma molécula de chalcona de cor amarela. A Figura 3 apresenta as alterações da cor de uma solução aquosa de uva com a variação do pH, obtidas nesse trabalho que ilustra tais alterações.



Figura 2: Mudanças estruturais das ACYS em função do pH (TERCI e ROSSI, 2002).



Figura 3: Variação da cor de soluções aquosas de ACYS obtidas de uva em função do pH. ACYS de uva com soluções de pH conhecido variando de 1 a 14 da esquerda para direita.

A degradação de ACYS pode ocorrer por dois caminhos, formando chalconas e glicosídeos cumarínicos ou aldeídos e derivados do ácido benzóico (Seeram *et al*, 2001). A degradação térmica de ACYS com a formação de aldeídos e derivados do ácido benzóico, representada na Figura 4, inicialmente ocorre uma clivagem com perda dos glicosídeos ligados às ACYS. Em seguida as moléculas passam por outros processos de clivagem que originam os derivados do ácido benzóico e aldeídos. Protoglucinaldeído e ácido *p*-hidroxibenzóico são apresentados como produtos da degradação térmica de ACYS (Adams, 1973; Seeram *et al*, 2001; Patras *et al*, 2010).

Além do pH e da temperatura, outro fator que pode causar rápida oxidação das ACYS é a presença de enzimas, como a polifenoloxidase (PPO) que catalisa a oxidação de ACYS a ácidos derivados de *o*-difénois e *o*-quinonas, de coloração marrom. A estrutura de algumas ACYS pode dificultar a atividade de PPO, os glicosídeos podem servir como impedimento para o ataque dessa enzima, entretanto a atividade da β-glisosidase, que remove os açúcares formando antocianidinas, favorece a atividade da PPO (Shamir, 2009; Buckow *et al*, 2010).



Capítulo 1



1.3.1 Degradação térmica de antocianinas

A degradação das ACYS implica na perda da coloração característica desses compostos e das suas propriedades funcionais, o que compromete sua aplicação como corante.

Os estudos sobre a degradação desses corantes estão relacionados a condições comuns de processamento industrial, tais como, aquecimento, exposição à luz, variações de pH, condições de armazenamento e estocagem. Essas condições influenciam diretamente o tempo de prateleira de extratos e de produtos contendo ACYS. A instabilidade térmica e a susceptibilidade desses compostos e a degradação são fatores que precisam ser investigados para garantir que suas propriedades e funcionalidades possam ser aproveitadas nas aplicações. Processos de degradação de ACYS podem levar a perda de cor e também a formação de compostos marrons insolúveis (Xu *et al*, 2007), o que pode comprometer a qualidade dos produtos.

Diversos estudos sobre a estabilidade de ACYS em diferentes condições já foram realizados. Estudos com sucos, extratos e concentrados de ACYS para avaliar a influência de fatores como: pH, luz, oxigênio, enzimas, açúcares, ácido ascórbico, dióxido de enxofre, sulfitos, metais e copigmentos que são fatores que reconhecidamente afetam a estabilidade de ACYS e podem limitar suas aplicações industriais (Wang & Xu, 2007; Ersus & Yurdagel, 2007; Giusti & Wrolstad, 1999;). Aquecimento normalmente é empregado para extração de ACYS, além disso, tratamentos térmicos são utilizados para esterilizar os extratos e manter suas cores características, inativando enzimas em processos de pasteurização (Harboune *et al*, 2008 apud Lund, 1982) e branqueamento (Sampaio, 2008), por exemplo. Como esses tratamentos chegam a ser indispensáveis, a composição e a concentração dos extratos de ACYS devem ser monitoradas para assegurar sua qualidade e dos produtos finais contendo ACYS.

Estudos envolvendo a degradação de ACYS indicam a estabilidade de sucos de mirtilo (blueberry) a temperaturas de até 60 °C e destacam a aceleração da degradação com o aumento da temperatura. Amostras incubadas a 80, 90, 100, 110, e 115 °C apresentaram perda de 50% das ACYS em intervalos de tempo de 180, 115, 40, 15 e 10 minutos (Buckow *et al*, 2010). Essa fruta contém predominantemente malvidina-3-glicosídeo e delfinidina-3-glicosídeo e pequenas quantidades de peonidina-3-glicosídeo e petunidina-3-glicosídeo. Segundo os autores a estabilidade térmica de diferentes sucos varia com as diferentes ACYS encontradas em cada fruta. A estabilidade térmica tende a diminuir com o número de hidroxilas ligadas a antocianina e com a posição dos glicosídeos, indicando a correlação entre a estrutura química e a estabilidade das ACYS.

Yang *et al* (2008) estudaram a cinética de degradação térmica de ACYS de milho roxo, variedade originalmente cultivada na América Latina e, atualmente, na China. Esse milho contém cianidina-3-glicosídeo, pelargonidina-3-glicosídeo e peonidina-3-glicosídeo. Ajustes indicam que os processos de degradação de extratos aquosos dessas amostras a 70, 80 e 90 °C seguem perfil de primeira ordem. Os autores destacam a maior estabilidade das amostras de ACYS obtidas do milho quando comparadas a ACYS obtidas de amoras silvestres (*blackberry*), indicando que a susceptibilidade térmica das amostras de ACYS depende da composição que apresentam.

Um estudo da estabilidade térmica de ACYS em sucos concentrados de uma variedade de laranja conhecida como *blood oranges* que contém ACYS, foi realizado entre 70 e 90 °C, sendo que os resultados sugerem cinética de primeira ordem para a degradação das ACYS. A degradação nas amostras de sucos concentrados é mais rápida provavelmente devido ao favorecimento das interações entre moléculas de ACYS com o efeito da concentração. Os autores sugerem que devido à instabilidade das ACYS dessa fruta, os sucos só devem ser comercializados após tratamentos de estabilização (Kirca & Cemeroglu, 2003).

Os diversos estudos na literatura apontam que a degradação de ACYS segue processos de primeira ordem (Adams, 1973; Alighourchi & Barzegar, 2009; Wang & Xu, 2007; Kirca & Cemeroglu, 2003). Todos os estudos disponíveis apontam a importância dos estudos de estabilidade de ACYS para viabilizar sua aplicação industrial em diversos segmentos. É consenso o grande efeito da temperatura na degradação desses compostos e a relevância desses estudos para garantir a qualidade dos extratos e ampliar as aplicações das ACYS.

Introduzimos neste trabalho, os estudos da degradação térmica de extratos de uva e jabuticaba, buscando elucidar o efeito da temperatura e a influência na degradação desses extratos e as possíveis consequências do processo de degradação no tempo de prateleiras de extratos e de produtos contendo ACYS.

1.4 Copigmentação

Um fator relevante para estabilizar ACYS é conhecido como copigmentação. Esse fenômeno é decorrente de interações entre ACYS e seus copigmentos, que podem ser compostos fenólicos como flavonoides e flavonas, ou alcaloides, ácidos orgânicos dentre outros, normalmente sem cor, aos quais quando em soluções de ACYS produzem efeito hipercrômico e deslocamento batocrômico no espectro de absorção no UV-Vis (Castañeda-Ovanda *et al*, 2009). Em geral, os complexos formados por copigmentação têm configuração que protege o cátion flavílio de ataques nucleofílicos, reduzindo a formação de carbinol e chalconas (González-Manzano et al,2009). Na copigmentação podem ocorrer quatro diferentes tipos de associações: a auto-associação; a copigmentação

intramolecular e copigmentação intermolecular, associação com metais (Cavalcanti *et al*, 2011).

A auto-associação ocorre quando duas ou mais moléculas de ACYS se associam. O mecanismo de auto-associação é proposto como um empilhamento vertical das ACYS. Essa estrutura é estabilizada através de interações hidrofóbicas criadas entre os núcleos aromáticos (Cavalcanti et al, 2011).

A copigmentação intramolecular (Figura 5) envolve interação do grupo cromóforo da molécula de antocianina e seu copigmento, com ligação covalente a partir de um mesmo glicosídeo. A interação ocorre pelo alinhamento do grupo aromático do glicosídeo com o cátion flavílio, o que desfavorece o processo de hidratação nas posições 2 e 4 do anel pirílio (Brouillard,1983).



Figura 5: Modelo hipotético da copigmentação intramolecular de antocianinas adaptado de Falcão et al, 2003)

A copigmentação intermolecular (Figura 6) é a interação entre a antocianina e um copigmento sem cor que não está ligado covalentemente à molécula de antocianina. Forças de Van der Waals, efeito hidrofóbico e interações iônicas são mecanismos sugeridos como as forças que dirigem a copigmentação intermolecular (Brouillard,1983).



Figura 6: Modelos de interações intermoleculares entre delfinidina-3-glicosídeo e rutina (adaptado de Rein, 2005).

A associação com metais é outro fenômeno de copigmentação que estabiliza ACYS que contêm grupos hidroxila livres no anel B, capazes de quelar metais. Os complexos mais comuns são formados com ferro, magnésio, cálcio, alumínio, estanho (Cavalcanti et al, 2011)

1.5 Técnicas analíticas utilizadas no estudo de antocianinas

Distintas técnicas analíticas são utilizadas para o estudo de ACYS em procedimentos de quantificação, monitoramento e identificação em extratos e amostras contendo ACYS.

Espectrofotometria é uma técnica muito utilizada para obtenção de informações quantitativas de ACYS devido ao perfil espectral desses compostos, a simplicidade e o baixo custo da técnica (Castañeda-Ovando *et al*, 2009). O método oficial da AOAC (Association of Analytical Communities) para quantificação de ACYS monoméricas totais sucos (Lee *et al*, 2005) é realizado com medidas espectrofotométricas e baseia-se nas alterações estruturais das moléculas de ACYS em função do pH do meio. As absorbâncias de soluções contendo ACYS em pH 1,0 e 4,5 são medidas no comprimento de onda de absorção máximo a pH 1,0 e a 700 nm (este último comprimento de onda para correção de eventual absorção de materiais particulados segundo recomendação dos autores). A quantidade de ACYS total é calculada pela equação 1:

$$ACYS_{totais(mg/L)} = A \times M \times FD \times 10^{3} / \epsilon$$
 Equação 1

Onde: A = (A $_{\lambda \text{ máx}}$ - A $_{700\text{ nm}}$) pH $_{1,0}$ – (A $_{\lambda \text{ máx}}$ – A $_{700\text{ nm}}$) pH $_{4,5}$, M = massa molar, FD = fator de diluição, ϵ = absortividade molar da cianidina-3-glicosídeo, considerando-se cela com caminho óptico unitário.

A figura 7 mostra os espectros eletrônicos típicos de soluções de ACYS em pH 1,0 e 4,5 e a variação estrutural de acordo com o pH.



Figura 7: Espectro eletrônico de ACYS em soluções de pH 1,0 e 4,5 e estrutura do cátion flavílio (A) e hemiacetal(B). R= H ou substituinte glicosilado (adaptado de Wrolstad *et al*, 2005)

Técnicas cromatográficas são utilizadas para isolamento, identificação e quantificação de ACYS. Cromatografias em papel e em camada delgada já foram utilizadas para separação desses corantes (Terci, 2004). Atualmente, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é uma das técnicas cromatográficas mais utilizadas no estudo de ACYS, com a aplicação de métodos diretos que utilizam padrão de ACYS e métodos indiretos, que não utilizam esses padrões (Campos, 2006).

Um método de identificação indireta de ACYS foi proposto por Goiffon e colaboradores, 1999, com HPLC em fase reversa e misturas de água, acetonitrila e ácido fórmico como eluente. A identificação indireta de ACYS por esse método é realizada comparando-se tempos de retenção das ACYS presentes na amostra em relação ao tempo morto, com o tempo de retenção da cianidina-3-glicosídeo que é comumente encontrada em frutas vermelhas, também em relação ao tempo morto. O resultado é comparado com valores previamente definidos e representa uma opção acessível para identificação inicial de ACYS (Favaro, 2008).

Outra técnica cromatográfica que vem se destacando no estudo de ACYS é a cromatografia líquida de ultra alta eficiência (UHPLC). A utilização de colunas com partículas de 1,7 µm ao invés de 3,5 µm como em HPLC pode trazer a diminuição da ordem de quatro vezes no tempo de análises, (Serra *et al*, 2011) aliadas a economia significativa de fase móvel e amostras, desde que o preparo de amostras seja adequado. A economia de amostras é importante para estudos com ACYS tendo em vista o alto custo de padrões desses compostos. Outro fator relevante é a aplicação da técnica para monitoramento de ACYS em amostras de fluídos biológicos, em estudos clínicos e farmacocinéticos, para os quais pequenas quantidades de amostras podem estar disponíveis (Ling *et al*, 2009).

Espectrometria de massas (MS) se destaca na identificação de ACYS. Estudos relacionados à elucidação estrutural. transformações durante envelhecimento de vinhos tintos, polimerização e reação com outros flavonóides (Castañeda-Ovando et al, 2009; Villiers et al, 2011) são aplicações desta técnica relacionadas com ACYS. MS apresenta sensibilidade e seletividade adequadas a identificação de amostras, sendo usualmente acoplada a UHPLC, (Gonzalo et al, 2004; Lee et al, 2008; Vidal et al, 2009; Huang et al, 2009). A identificação é satisfatória principalmente com espectrometria de massas seguencial, que permite selecionar íons de interesse para fragmentações adicionais que em geral fornecem mais informações sobre a estrutura das amostras (Steimer & Sjöberg, 2011). Para moléculas termicamente instáveis, como proteínas e ACYS, é adequado aplicar-se ionização por *eletrospray* (ESI) que permite que os íons e fragmentos permanecam intactos para a identificação (Huang et al, 2009;
Castañeda-Ovando *et al*, 2009). Recentemente, métodos LC-ESI/MS-MS foram descritos e vem sendo aplicados para quantificar ACYS em plasma humano e amostras biológicas (Ling *et al*, 2009).

Eletroforese capilar (CE) é uma técnica relativamente nova com caracteristicas como alta resolução, baixo consumo de amostra e de resíduo gerado, que pode ser aplicada para separação, quantificação e identificação de ACYS. Como exemplo, há trabalhos de separação ACYS de blackcurrant por CE utilizando capilar de sílica fundida, tampão fosfato (pH 1,8) e acetronitrila (da Costa et al, 2000; Sáenz-López et al 2003; Castañeda-Ovando et al, 2009). Bridle & Gárcia- Viguera, num dos primeiros trabalhos de análises de ACYS por CE descreveram o uso de tampões de pH ~ 8 e detecão em 560 nm e obtiveram baixa resolução e sensibilidade devido a instabilidade das ACYS nesse pH, só foram obtidos resultados com amostras muito concentradas. Outro método encontrado utilizou tampão fosfato em pH 2,1 e CTAB como surfactante cationico, para revestir a parede do capilar e evitar o contato das ACYS com as paredes do capilar, além de promover a inversão do fluxo eletrosmotico afetando os resultados de separação e quantificação (Castaneda-Ovando, 2009) .A análise de ACYS por CE tem dificuldades e técnicas de inversão de fluxo e recobrimento de capilares representam possibilidades a serem exploradas.

Ressonância magnética nuclear (RMN) é outra técnica que vem sendo utilizada para elucidação estrutural de ACYS e pode ser util também para identificar produtos de reação de ACYS como no caso de derivados dos ácidos cinamico, radicais peróxido, catechinas e flavonóis (Castaneda-Ovando, 2009).

1.6 Frutas utilizadas como fontes de antocianinas 1.6.1 Uva Brasil

A uva Brasil (*Vitis vinifera* L. 'Brasil`) é um tipo ou clone da cultivar Itália (*Vitis vinifera* L.) que surgiu em 1991 na região de Floraí no Paraná. A uva Brasil é derivada da cultivar Benitaka. A Figura 8 apresenta imagem dos frutos de *Vitis vinifera* L. e de diferentes cultivares.



Figura 8: Frutos de Vitis vinifera L. A) cv. Itália, B) cv. Rubi, C) cv.Benitaka, D) Brasil (Oliveira-Collet et al 2005)

As cultivares 'Itália', e variedades 'Rubi', 'Benitaka' e 'Brasil' de *Vitis vinifera* L. são uvas finas de mesa pela qualidade e aparência de seus frutos, cultivadas na região noroeste do estado do Paraná. Sua origem estaria relacionada com mutações somáticas ocorridas em setores da cultivar 'Itália', originando as variedades 'Rubi' e 'Benitaka', e em setores de 'Benitaka', originando a variedade. 'Brasil'. A cultivar 'Itália' e suas mutações apresentam poucas diferenças morfológicas, e, em nível bioquímico e molecular, devido às semelhanças entre essas frutas, não são classificados como cultivares diferentes, são considerados tipos ou clones diferentes da cultivar Itália (Oliveira-Collet *et al* 2005).

A Figura 9 apresenta um esquema com a origem das variedades Rubi, Benitaka e Brasil.



Figura 9: Origem das variedades Rubi e Benitaka a partir da Itália (1972 em Santa Mariana e 1988 em Floraí, respectivamente) e da variedade Brasil a partir da Benitaka (1991 na região de Floraí). Original em Oliveira-Collet *et al* 2005.

A escolha da variedade Brasil para os estudos realizados neste trabalho foi devido à forte coloração da casca desta variedade, que é um forte indicativo de quantidades significativas de ACYS. Além disso, a ausência de dados na literatura sobre essa fruta também foi considerada. A Figura 10 apresenta imagens das frutas utilizadas no trabalho.



Figura 10: Uva Brasil utilizada no trabalho.

1.6.2 Jabuticaba

Jabuticaba (*Myrciaria cauliflora (Mart.) O. Berg*) é uma espécie nativa brasileira pertencente à família das Myrtaceae, encontrada do Pará ao Rio Grande do Sul. Os frutos negros (Figura 11) são bagas globosas cujo epicarpo varia de roxo-escuro a preto. A polpa é macia, branca, suculenta e de sabor ácido (Citadin *et al*, 2005) os frutos crescem fixados ao tronco da árvore. Os frutos podem ser

consumidos in natura ou podem ser utilizados para fabricação de geleias, sucos, chás e licores. (Barros *et al*,1996)



Figura 11: Frutos de jabuticaba

O fato de a jabuticaba ser nativa e a escassez de dados da literatura de estudos relacionados a degradação térmica de ACYS dessa fruta motivaram os estudos dos extratos obtidos da casca da jabuticaba. A utilização industrial dos frutos da jabuticabeira poderá contribuir para o manejo consciente e aumento do cultivo desta espécie.

1.7 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO)

O Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) é um sistema automatizado e simplificado que envolve autorizações e licenças para atividades com finalidade científica e didática que envolva recursos naturais ou o acesso a unidades de conservação federal. O SISBIO foi criado seguindo diretrizes da Instrução Normativa nº. 154/2007 do IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos naturais Renováveis), que regulamenta a coleta e o transporte de material biológico para fins científicos e didáticos, além de unificar os instrumentos legais referentes às atividades de pesquisa. Vale destacar o Cadastro Nacional de Coleções Biológicas que foi criado para facilitar o

intercâmbio científico de espécimes necessários para realizar investigações taxonômicas e sobre a conservação das espécies.

O cadastro no SISBIO foi realizado para obtenção da autorização para atividades com finalidade científica coleta e transporte de material botânico (SISBIO, 2010). O cadastro da Profa. Dra. Adriana Vitorino Rossi e de Aline Guadalupe Coelho foram realizados e os registros são 5092212 e 5111503, respectivamente.

Capítulo 2: Objetivos

2. Objetivos

- 2.1 Gerais:
 - Estudar a degradação térmica de ACYS.

2.2 Específicos:

- Estudar o efeito das temperaturas de extração e armazenamento na estabilidade de extratos de ACYS, obtidos a partir de uva Brasil (Vitis vinifera L. cv. "Brasil") e jabuticaba (Myrciaria cauliflora);
- Estudar a degradação térmica acelerada simulada dos extratos e de padrões de cianidina-3-glicosídeo e malvidina-3-glicosídeo;
- Obter informações cinéticas sobre a degradação térmica e os possíveis produtos formados.
- Avaliar a estabilidade e a degradação dos extratos utilizando-se espectrofotometria, cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas.

Capítulo 3: Parte experimental

3. Parte experimental

3.1 Considerações gerais

Os procedimentos experimentais foram divididos em duas fases além de um conjunto de procedimentos preliminares comum a todos os estudos: a obtenção dos extratos, a quantificação e identificação das ACYS e a análise termogravimétrica dos extratos. A primeira fase envolveu o estudo da estabilidade de extratos de ACYS ao longo do tempo em diferentes condições de pH, temperatura de extração e temperatura de armazenamento. A segunda fase relacionou-se com a simulação de degradação acelerada dos extratos e padrões de ACYS, além de estudos dos produtos de degradação gerados.

3.2 Equipamentos, materiais e reagentes.

3.2.1 Equipamentos

- Refrigerador GE TMNF-E;
- Banho termostático RC6 LAUDA;
- Bomba de vácuo TE-0581 Tecnal;
- Cromatógrafo Shimadzu Prominece, coluna C18 Varian Microsorb MV, tipo ODS2, com 25,0 cm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, com tamanho de partícula = 5 μm e tamanho de poro = 100 Å, com eluição isocrática em fase reversa e detector com arranjo de diodos SPD-M20A;
- Espectrofotômetro Biotech Pharmacia Ultrospech 2000;
- Analisador termogravimétrico TGA 2050 TA Instruments.
- Espectrômetro de massas LC-MS/MS Waters Ultra Performance LC Acquity – ionização por eletrospray (ESI) coluna Acquity UHPLC BEH

C18 1,7 µm com 2,1 mm x 50 mm;e detector Triplo Quadrupolo (TQD) Quattro Micro API, eluição por gradiente.

• Micro centrífuga Centrifuge 5424 Eppendorf

3.2.2 Materiais

- Vidraria de uso comum em laboratório;
- Papel de filtro quantitativo Qualy filtração lenta;
- Cartucho C18 para SPE Varian, 1000 mg;
- Filtros de membrana Millipore 0,45 μm;
- Celas de acrílico, caminho óptico de 1 cm Plastibrand.

3.2.3 Padrões de ACYS

- Cianidina-3-glicosídeo 99,0% (Sigma-Aldrich),
- Malvidina-3-glicosídeo 99,0% (Sigma-Aldrich).

3.2.4 Reagentes

- Ácido clorídrico 36,5-38,0% v/v (Synth);
- Ácido fórmico 85,0% v/v (Synth);
- Ácido cítrico 99% (Synth);
- Acetonitrila grau HPLC (Carlo Erba);
- Água destilada (destilador de vidro);
- Água deionizada (Millipore);
- Cloreto de potássio 99,0% (Synth);
- Fosfato ácido de sódio 99% (Synth);

• Metanol grau HPLC (Synth);

As frutas utilizadas neste trabalho foram *Vitis vinifera L. cv. "Brasil"* (Uva Brasil) e *Myrciaria cauliflora* (Jabuticaba). As uvas foram adquiridas no comércio varejista local em um único lote e armazenadas em congelador doméstico. As jabuticabas foram colhidas na cidade de Casa Branca-SP e fornecidas congeladas pela empresa Anidro do Brasil Extrações Ltda também em um único lote. Para realização dos experimentos, as porções necessárias de frutas eram removidas do congelador e mantidas a temperatura ambiente até degelo.

3.3. Procedimentos preliminares

3.3.1. Obtenção de extratos

3.3.1.1. Obtenção dos extratos brutos utilizados na fase 1

Extratos de uva e de jabuticaba foram preparados separadamente em triplicata, imergindo-se 30 g de cascas das frutas em 90 mL de água destilada, sob termostatização por 30 minutos a 25, 55 e 85 °C, seguindo-se filtração à vácuo em papel quantitativo. Os extratos brutos obtidos nessa extração foram identificados e armazenados em frascos âmbar.

3.3.1.2. Obtenção dos extratos brutos utilizados na fase 2

O mesmo procedimento do item 3.3.1.1 foi seguido, exclusivamente a 55 °C.

3.3.1.3. Obtenção dos extratos secos

Extratos de uva e de jabuticaba foram preparados em triplicata de acordo com o item 3.3.1.2 e transferidos para placas de petri para secagem sob fluxo de ar em capela laboratorial vazão 0,6 m/s com abertura de 28 cm por 24 horas (Favaro, 2008).

3.3.1.4 Quantificação das ACYS totais

A quantificação das ACYS foi realizada pelo método oficial (Lee *et al*, 2005), que envolve a diluição da amostra em soluções de pH 1,0 e 4,5 e medidas de absorbância no comprimento de onda de máxima absorção da solução em pH 1,0 e a 700 nm

Alíquotas de 750 µL de três amostras para cada condição dos extratos aquosos brutos foram diluídos com soluções de pH 1,0 preparados com HCl 0,2 mol/L em KCl 0,2 mol/L e pH 4,5 preparados com fosfato ácido de sódio 0,2 mol/L e ácido cítrico 0,1 mol/L. A absorbância das soluções foi medida em 525 nm e 700 nm em espectrofotômetro com celas de 1,0 cm de caminho ótico.

3.3.1.5. Purificação dos extratos por extração em fase sólida

Os extratos de uva e jabuticaba três amostras de cada fruta, obtidos como descrito no item 3.3.1.2 foram purificados em cartuchos C18 para extração em fase sólida (SPE). Este procedimento foi otimizado anteriormente no GPQUAE (Campos, 2006) e foi utilizado para separar as ACYS de outros constituintes dos extratos. Previamente, o cartucho foi condicionado pela percolação de 10 mL de metanol e 10 mL de água deionizada. A concentração de ACYS dos extratos foi calculada pelo método oficial (Lee *et al*, 2005) e utilizou-se volume de extrato que não ultrapassasse 0,1 % da massa do sorvente seguindo recomendação do fabricante. Sendo assim, 4,3 mL de extrato bruto de uva e 18 mL de extrato bruto de jabuticaba foram percolados pelo cartucho e eluídos com 3 mL de HCI 0,01% (v/v) em metanol(Campos, 2006; Sampaio, 2008; Favaro, 2008). O extrato percolado foi seco sob fluxo de ar para que o metanol evaporasse e o extrato seco obtido foi dissolvido em 5 mL de água e acondicionado em frascos âmbar a 8 °C .

3.3.2. Identificação de ACYS

3.3.2.1. Método de Goiffon et al

A identificação das ACYS nos extratos foi realizada pelo método proposto por Goiffon e colaboradores (1999). Três amostras de 50 mg do extrato seco de uva e e duas amostras de extrato seco de jabuticaba, foram solubilizados em 5 mL de metanol com 0,1 % de HCI (v/v) condições otimizadas por Sampaio (2008). As amostras foram analisadas em cromatógrafo com eluição isocrática em fase reversa e detecção espectrofotométrica. Como fase móvel, foi utilizada a mistura de água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico na proporção 81:9:10 (v/v/v), com vazão da fase móvel de 1,0 mL/min, volume de injeção de 20 µL e tempo de eluição de 40 minutos (Sampaio, 2008; Favaro, 2008).

3.3.2.2 Identificação de ACYS por UHPLC

Os extratos aquosos obtidos como descrito nos itens 3.3.1.2 e 3.3.1.5 foram diluídos e filtrados em filtro de seringa de 0,45 µm. Antes da injeção, as amostras foram centrifugadas por 8 min a 12000 rpm. Posteriormente, foram injetadas 10 µL no UHPLC-MS, com eluição por gradiente A (água:ácido fórmico 0,1%) e B (acetonitrila:ácido fórmico 0,1%)(Adaptado de Goiffon *et al*, 1999 e Favaro, 2008), tempo de eluição de 12 minutos, vazão da fase móvel:0,35 mL/min, gradiente inicial: 99 % de A e 1 % de B, 4 a 8 minutos: 80% de A e 20 % de B, 8 a 10 minutos: 70% de A e 30% de B, 10 a 12 minutos: 95 % de A e 5% de B. Condições MS: Capilar 0,80 KV, Cone 30 V, Extrator 3 V, RF lentes 0,5 V, temperatura da fonte = 120 °C e temperatura de dessolvatação = 400 °C. Os dados obtidos foram tratados no programa de aquisição Mass Lynx V 4.1 em modo off-line.

3.3.3 Análise termogravimétrica

A análise termogravimétrica foi realizada com três amostras de 15 mg de extrato seco de uva e três amostras de 30 mg de extrato seco de jabuticaba. Os termogramas foram obtidos no analisador termogravimétrico com rampa de aquecimento de 20 a 1000 °C, a 10 °C/min.

3.4 Fase 1- Monitoramento da degradação

3.4.1 Monitoramento de degradação

Para o estudo da degradação dos extratos de uva e jabuticaba, triplicatas dos extratos de cada fruta foram obtidos a 25, 55 e 85 °C. Algumas amostras tiveram o pH ajustado para 3,0 com solução de HCI 0,2 mol/L em KCI 0,2 mol/L e nas

demais manteve-se o pH natural $(4,5 \pm 0,1$ para os extratos de uva e $3,5 \pm 0,1$ para os de jabuticaba).

Para armazenamento e monitoramento da degradação, metade dos extratos foi mantida à temperatura ambiente e os demais foram armazenados sob refrigeração a 8 °C, por até 170 dias, todos em frascos de vidro âmbar. Quinzenalmente, foram obtidos espectros de 400 a 800 nm dos extratos em celas de acrílico com caminho óptico de 1 cm.

3.5 Fase 2 Monitoramento da degradação acelerada

3.5.1 Degradação dos extratos e padrões

Para simulação de degradação dos extratos de ACYS, três amostras em duplicata dos extratos brutos e purificados separadamente foram diluídos com água destilada na proporção 1:3 (v/v) em tubo de ensaio, fechado com papel alumínio (para evitar perdas por evaporação) e aquecidos a 55 e 85 °C em banho termostatizado. A degradação foi monitorada espectrofotometricamente por 70 horas para os extratos brutos aquecidos a 55 °C, por 10 horas para os aquecidos a 85 °C. Para os extratos purificados, o monitoramento foi de 120 horas para os extratos aquecidos a 55 °C e por 18 horas para os aquecidos a 85 °C.

Os ensaios de degradação de soluções de padrões de ACYS foram realizados em duplicatas, utilizando-se 4 mL de soluções 125 mg/L de malvidina-3-glicosídeo e cianidina-3-glicosídeo. Seguiu-se o mesmo procedimento usado com os extratos, com monitoramento de 55 horas os padrões aquecidos a 55 °C e por 11 horas aqueles mantidos a 85 °C.

Extratos e padrões submetidos a esse processo foram resfriados, filtrados em filtro de membrana de 0,45 µm e acondicionados em frascos âmbar sob refrigeração a 8 ºC para posterior análise por UHPLC-MS.

3.5.2 Análises por UHPLC-MS

Todos os extratos e padrões antes da degradação e os degradados conforme os itens 3.5.1 foram filtrados em filtro de membrana de 0,45 µm diluídos Coelho, A.G.

adequadamente em água deionizada e centrifugadas por 8 min a 12000 rpm. Posteriormente, foram injetados 10 μL de cada amostra no UHPLC-MS, com eluição por gradiente A (água:ácido fórmico 0,1%) e B (acetonitrila:ácido fórmico 0,1%), tempo de eluição de 12 minutos, vazão da fase móvel:0,35 mL/min, gradiente inicial: 99 % de A e 1 % de B, 4 a 8 minutos: 80% de A e 20 % de B, 8 a 10 minutos: 70% de A e 30% de B, 10 a 12 minutos: 95 % de A e 5% de B. Condições: Capilar 0,80 KV, Cone 30 V, Extrator 3 V, RF lentes 0,5 V, temperatura da fonte = 120 °C e temperatura de dessolvatação = 400 °C. Optou-se pala utilização apenas do primeiro quadrupolo para a maioria das amostras. Entretanto na busca de dados mais detalhados, utilizou-se também o segundo quadrupolo para algumas amostras. O intervalo de tempos de retenção e a íon molecular da antocianina de interesse, foram selecionados e as corridas realizadas nas condições apresentadas anteriormente.

Os dados obtidos foram tratados no programa de aquisição Mass Lynx V 4.1 em modo *off-line*.

Capítulo 4: Resultados e discussão

4. Resultados e discussão

4.1 Estudos preliminares

ACYS são compostos fenólicos pertencentes à classe dos flavonóides. Esses compostos apresentam absorção características na região do visível, com máximo de absorção entre 510 e 540 nm, valores relacionados com o padrão de hidroxilação das antocianidinas e a posição de fixação do açúcar nas moléculas (Goiffon *et al*,1999). Esse padrão pode ser observado na Figura 12 que apresenta espectros eletrônicos obtidos a partir dos extratos brutos de jabuticaba e uva, respectivamente. Os espectros eletrônicos são úteis como indicativo da presença de ACYS em uma amostra, entretanto como pode ser observado nos espectros eletrônicos, não é possível distinguir diferentes ACYS apenas com esses dados.





4.1.1 Quantificação das ACYS

A concentração de ACYS nos extratos foi obtida pelo método oficial, com técnica espectrofotométrica, com base nas mudanças estruturais das ACYS em pH 1,0 e 4,5 (Lee *et al*, 2005). Os resultados em termos de concentração de ACYS totais obtidas a partir de extração aquosa realizada em triplicatas e diferentes temperaturas são apresentados na Tabela 1.

Fruta	Temperatura (°C)	Concentração*	Concentração*
		(mg/L)	(mg/100 g de casca)
Jabuticaba	25	1,7 ± 0,2	8,5±0,7
	55	16,5 ± 0,9	160±8
	85	51 ± 5	510±52
Uva	25	49 ± 2	526±14
	55	90 ± 2	934±9
	85	96± 3	982±50

Tabela 1: Concentração média de ACYS extraída com água em diferentes temperaturas.

* Valor médio de triplicatas ± estimativa do desvio padrão

A variação da concentração de ACYS nos extratos em função das diferentes temperaturas de extração indica que o aumento da temperatura de extração aumenta a concentração de ACYS extraídas. A extração é um fenômeno de transporte de massa, onde compostos presentes na estrutura vegetal migram para um solvente até que o equilíbrio seja alcançado. Um aumento no transporte de massa pode ser alcançado pelo aumento da temperatura e mudanças de gradiente de concentração (Corrales et al, 2008). A temperatura tem um efeito importante no processo de extração, pois o aquecimento aumenta a solubilidade de compostos fenólicos e o seu coeficiente de difusão, aumentando a eficiência da extração (Cacace &. Mazza, 2003; Corrales et al, 2009).

O aumento da difusão das ACYS dos vacúolos celulares das frutas com o aumento da temperatura é evidenciado pelo aumento da concentração de ACYS nos extratos obtidos a temperaturas mais altas.

O aumento da concentração de ACYS extraídas é satisfatório para aplicações diversas dos extratos. Entretanto a despeito dessa vantagem, a aplicação de temperaturas elevadas para extração de ACYS deve ser monitorada adequadamente já que o aquecimento pode disparar processos de degradação e comprometer características importantes das amostras de ACYS.

4.1.2 Comparação de dois métodos de Identificação de ACYS: Método Goiffon e UHPLC-MS

A identificação de ACYS nos extratos é um estudo preliminar relevante tendo em vista que diferentes ACYS contidas nos extratos influenciam diretamente a estabilidade dos mesmos. Antocianidinas com substituições na posição 3' e 4' (Figura 13) são oxidadas mais rapidamente do que as antocianidinas que não possuem essa estrutura. Por exemplo, malvidina e peonidina são antocianidinas mais estáveis que cianidina, delfinidina e petunidina. Além disso, o número e a posição dos açúcares conectados às antocianidinas também afetam a estabilidade das ACYS (Huang *et al*, 2009).



Figura 13: Estrutura genérica das ACYS (Harbone, 1994).

Neste trabalho, dois métodos foram utilizados para identificação de ACYS: o método HPLC proposto por Goiffon e colaboradores (1999) e um método UHPLC-MS.

Os resultados do método proposto por Goiffon e colaboradores (1999) são um indicativo satisfatório para identificação indireta de ACYS, entretanto, apresentam limitações inerentes da comparação de tempos de retenção. Esse método dispensa o uso de padrões comerciais de ACYS. O método relaciona os tempos de retenção de ACYS presentes na amostra em relação ao tempo morto, com o tempo de retenção da cianidina-3-glicosídeo que é comumente encontrada em frutas vermelhas, também em relação ao tempo morto (Goiffon *et al*,1999; Favaro, 2008). Para a identificação de ACYS presentes na amostra, o fator α é calculado pela equação 2 e comparado com o valor de α tabelado.

$$\alpha = \frac{t'_r}{t'_{r,cianidia-3, qlicos(deo)}}$$

Equação 2

onde t'_r = $t_r - t_0$, t_r = tempo de retenção do produto e t_0 = tempo morto.

Nas Figuras 14 e 15 estão os cromatogramas de extratos de jabuticaba e uva, respectivamente utilizados para identificação pelo método de Goiffon e colaboradores.



Figura 14: Cromatograma do extrato de jabuticaba. Condições cromatográficas: eluição isocrática em fase reversa, fase móvel: água deionizada: acetonitrila: ácido fórmico 81:9:10 (v/v/v), volume de injeção 20 µL, detecção em 525 nm.



Figura 15: Cromatograma do extrato de uva. Condições cromatográficas: eluição isocrática em fase reversa, fase móvel: água deionizada: acetonitrila: ácido fórmico 81:9:10 (v/v/v), volume de injeção 20 μ L, detecção em 525 nm.

A identificação por UHPLC-MS foi utilizada tendo em vista a necessidade de um comparativo entre a composição dos extratos iniciais e os degradados I

(Estudo apresentado na Fase 2 item 4.3.2 página 46). Essa identificação leva em consideração o potencial intrínseco da espectrometria de massas como técnica de identificação. É importante considerar que UHPLC-MS é uma técnica sofisticada que, certamente, apresenta melhores resultados de identificação em comparação com o método de Goiffon e colaboradores. Entretanto quando um UHPLC-MS não estiver disponível, o método de Goiffon pode ser utilizado como um *screening* com resultados satisfatórios, como aponta o comparativo das ACYS identificadas pelos dois métodos, apresentado na tabela 2. Algumas ACYS identificados pelo método de Goiffon não foram identificados por UHPLC-MS devido a idade dos extratos quando a análise foi realizada. Os dados obtidos por UHPLC-MS são relevantes também devido à ausência de biblioteca de espectros de massa para ACYS o que torna a identificação mais trabalhosa.

Os resultados de identificação mostram que os métodos utilizados são satisfatórios e permitiram o isolamento e a identificação das diferentes ACYS obtidas a partir das amostras de uva e jabuticaba.

Uva	UHPLC-MS	Goiffon <i>et al.</i>
	Cianidina-3-glicosídeo	Cianidina-3-glicosídeo
	Petunidina-3-glicosídeo	Petunidina-3-glicosídeo
	Peonidina-3-glicosídeo	Pelargonidina-3-arobinosídeo
	Malvidina-3-glicosídeo	Malvidina-3-glicosídeo
	Derivado da petunidina	Cianidina
	Derivado da malvidina	-
	Derivado 6 acetil petunidina	-
Jabuticaba	Cianidina-3-glicosídeo	Cianidina-3-glicosídeo
		Pelargonidina-3-glicosídeo
		Cianidina

 Tabela 2: ACYS identificadas nos extratos de uva e jabuticaba por UHPLC-MS e pelo método de Goiffon et al.

4.1.3 Análise termogravimétrica

Os termogramas apresentados nas Figuras 16 e 17 apontam perdas de massa significativas a partir de 85 °C para os extratos de uva e a partir de 80 °C nos extratos de jabuticaba. A temperatura de 85 °C foi a máxima utilizada para a extração e para os ensaios de degradação acelerada. Nessa temperatura,

começam a ocorrer variações observáveis nos termogramas, que indicam alterações nos extratos. Essas alterações estariam relacionadas inicialmente a perda de água como indicam alguns resultados experimentais (Matsumoto *et al*, 2001), o que é importante já que moléculas de água interagem fortemente com moléculas de ACYS e de outras espécies presentes no extrato, que podem atuar como copigmentos. Essa interação é responsável por fenômenos de copigmentação, que favorecem a estabilização dos extratos, com manutenção da cor. Com perda das moléculas de água envolvidas na copigmentação, a estabilidade pode ser reduzida, o que prejudica aplicações diversas (Mazza & Brouillard, 1991). Sendo assim, em torno de 85 ºC as perdas de água já acarretam alterações que devem ser monitoradas. Entre 100 e 300 ºC perdas de massa são atribuída à decomposição de ACYS (Teixeira-Neto et al, 2007).



Figura 16: Termograma de extrato seco de uva.

36



Figura 17: Termograma de extrato seco de jabuticaba.

4.2 Experimentos da Fase 1.

Amostras de extratos de uva e jabuticaba extraídas em três temperaturas diferentes (25, 55 e 85 °C), em condição de pH ajustado para 3,0 ou mantido natural, armazenados a temperatura ambiente ou sob refrigeração foram monitorados por medidas espectrofotométricas por até 173 dias. Foram considerados os dados de 60 dias de monitoramento para uniformizar os resultados, já que a partir desse período alguns extratos desenvolveram fungos ou perderam toda coloração característica das ACYS.

Para avaliar a degradação dos extratos foi introduzido o parâmetro **D**, em porcentagem, como um fator de degradação calculado a partir da equação 3.

$$D = \left(1 - \frac{A_{\text{final}_{\lambda \max}}}{A_{\text{inicial}_{\lambda \max}}}\right) \times 100 \text{ Equação 3}$$

 $A_{\text{final}_{\lambda \max}}$ é a razão entre as absorbâncias a 525 nm medidas no tempo onde: inicial_{amax}

0 e após 60 dias de monitoramento.

4.2.1 Monitoramento da degradação extratos de jabuticaba

Os resultados médios de triplicatas de **D**, calculados em cada condição estudada para extratos de jabuticaba com tempo de monitoramento de 60 dias são ilustrados na Figura 18. Para os extratos de jabuticaba os valores de **D** aumentam de 20 para 38 % com pH ajustado para 3,0 mantidos à 8 °C. Nos extratos mantidos em pH natural valores de **D** variam de 47 a 26 % com o aumento da temperatura de extração. Nos extratos acidulados armazenados à temperatura ambiente, os valores de **D** são de 40, 29 e 21 % para os extratos extratos a 25, 55 e 85 °C respectivamente.



Figura 18: Representação dos valores de *D* (calculados pela equação 3), para extratos de Jabuticaba com pH natural e armazenado a 8 °C (JN8), com pH ajustado para 3,0 e armazenado a 8 °C (J38), com pH ajustado para 3,0 e armazenado a temperatura ambiente (J3A) e com pH natural e armazenado a temperatura ambiente (JNA).

Fatores como a temperatura de extração, armazenamento e pH do meio têm efeitos diversos na estabilidade de amostras de ACYS. O aumento da temperatura de extração aumenta a concentração de ACYS nos extratos. Concentrações de ACYS mais elevadas nos extratos, intensificam a interação entre ACYS o que favorece a estabilidade dos extratos (Giusti & Wrolstad, 2003, Cavalcanti *et al*, 2011). Isso pode justificar o comportamento observado para a maioria dos extratos de jabuticaba nas condições estudadas, exceto para as amostras extraídas a 85 °C do conjunto J38.

Outro fato relevante para a estabilidade de ACYS é o pH, as amostras de extratos de jabuticaba com pH ajustado para 3,0 apresentam menores valores de **D** do que os extratos mantidos com pH normal. O meio mais ácido contribui para que o cátion flavílio seja a forma predominante das ACYS, sendo essa forma a mais estável (Seeram *et al*, 2001), a maior estabilidade dos extratos em meio ácido é coerente.

Além da temperatura de extração, temperatura de armazenamento, concentração e pH, copigmentação também podem contribuir para a estabilidade dos extratos de ACYS.

Outro fator envolvido na degradação das ACYS é a atividade de enzimas como a polifenoloxidase e a β-glicosidase responsáveis pela oxidação de compostos fenólicos e pela perda de glicosídeos respectivamente (Patras *et al*, 2010) que atuam na degradação das ACYS sendo responsáveis por perdas de glicosídeos e quebra de anéis das ACYS. Isto pode ser responsável pela degradação que descora os extratos de ACYS durante o armazenamento.

4.2.2 Monitoramento da degradação extratos de uva

As médias dos valores de D para triplicas de extrato de uva monitorado por 60 dias em cada condição estudada são apresentadas na Figura 19.

Os valores de **D** para os extratos de uva com pH ajustado para 3,0 mantidos a 8 °C variam entre 29, 45 e 21 % com o aumento da temperatura de extração de 25 para 55 e 85 °C. Nos extratos com pH natural, mantidos a 8 °C variam entre 15, 44 e 54 % e nos extratos acidulados armazenados à temperatura ambiente, variam de 73, 71 e 81 % para os extratos extraídos a 25, 55 e 85 °C, respectivamente.



Figura 19: Gráfico de barras correspondentes aos valores de **D** (calculados pela equação 3), para extratos de uva com pH natural, armazenado a 8 $^{\circ}$ C (UN8), com pH ajustado para 3,0, armazenado a 8 $^{\circ}$ C (U38), com pH ajustado em 3,0 e armazenado a temperatura ambiente (U3A) e com pH natural e armazenado a temperatura ambiente (UNA).

A temperatura de armazenamento pode ter efeito significativo na estabilidade dos extratos de uva, superando o efeito do pH do meio e da temperatura de extração de acordo com os dados obtidos. A menor temperatura de armazenamento diminui a velocidade das reações e, adicionalmente no caso dos extratos, diminui a atividade enzimática da polifenoloxidase e a β -glicosidase (Patras *et al*, 2010) Os menores valores de **D** para os extratos mantidos sob refrigeração sugerem o favorecimento da inativação dessas enzimas à baixa temperatura, como pode ser observado na Figura 19.

4.3 Experimentos da fase 2.

Os experimentos da fase 2 compreendem as análises por UHPLC-MS e os ensaios de degradação acelerada de extratos brutos, extratos purificados e de soluções dos padrões de ACYS. Os estudos de degradação acelerada foram realizados para verificar os efeitos da temperatura na degradação dos extratos e propostas de ajuste cinético para o processo. Os resultados de UHPLC-MS

serviriam para identificar os produtos da degradação térmica de ACYS e inferir algum efeito de outros constituintes do extrato.

Como foi descrito na parte experimental (item 3.5.2), foram realizadas análises por UHPLC-MS dos extratos e de soluções dos padrões de ACYS antes e após aquecimento a 55 e 85 °C, que simulava degradação acelerada. A degradação foi monitorada com medidas espectrofotométricas, com leituras periódicas até perda da coloração típica das ACYS (item 3.5.1).

Os resultados são apresentados e discutidos em grupos:

- Soluções dos padrões de ACYS
- Extratos brutos
- Extratos purificados

4.3.1 Resultados Fase 2: Soluções de Padrões de ACYS

Soluções dos padrões de malvidina-3-glicosídeo (majoritária nos extratos de uva) e cianidina-3-glicosídeo (majoritária nos extratos de jabuticaba) com 99,0% de pureza foram degradados a 55 °C e 85 °C. Essas soluções foram utilizadas como referencial para a degradação dos extratos brutos e purificados. Este comparativo entre padrões, extratos brutos e purificados é relevante já que para aplicações industriais a utilização dos extratos brutos diminui custos, mas é válido avaliar se a purificação favorece a estabilidade desses extratos.

Nas Figuras 20 A a C estão os cromatogramas do padrão malvidina-3glicosídeo inicial, degradado a 55 °C e a 85 °C, respectivamente. A Figura 21 traz o espectro de massas do padrão, com dados destacados na Tabela 3. Os cromatogramas indicam mudanças decorrentes da degradação do padrão: diminuição da altura do pico típico com tempo de retenção em 3 min (Figura 20 A a C).

Tabela 3: Dados padrão de malvidina-3-glicosídeo.

tr (min)	Íon molecular m/z (M ⁺)	Identificação
3,0	493	Malvidina-3-glicosídeo



Figura 20: Cromatogramas do padrão de **A:** malvidina-3-glicosídeo, **B:** malvidina-3-glicosídeo degradado a 55 °C e **C:** malvidina-3-glicosídeo degradado a 85 °C, injetados no UHPLC-MS. Condições cromatográficas: eluição por gradiente A (água:ácido fórmico 0,1%) e B (acetonitrila: ácido fórmico 0,1%), tempo de eluição de 12 minutos, vazão da fase móvel:0,35 mL/min, gradiente inicial: 99 % de A e 1 % de B, 4 a 8 minutos: 80% de A e 20 % de B, 8 a 10 minutos: 70% de A e 30% de B, 10 a 12 minutos: 95 % de A e 5% de B. Volume de injeção 10 μ L



Figura 21: Espectro de massas dos padrão de malvidina-3-gliosídeo, injetado no UHPLC-MS, Condições MS: Capilar 0,80 kV, Cone 30 V, Extrator 3 V, RF lentes 0,5 V, temperatura da fonte = 120 °C e temperatura de dessolvatação = 400 °C.

As Figuras 22 A a C mostram os cromatogramas do padrão cianidina-3glicosídeo, nas condições inicial, degradado a 55 °C e 85 °C respectivamente. Na Figura 23 está espectro de massas do padrão. A Tabela 4 indica o tempo de retenção e a razão massa/ carga referente ao padrão analisado. Os cromatogramas indicaram as mudanças ocorridas com a cianidina-3glicosídeo ao longo da degradação, com a diminuição da altura do pico característico do padrão.



Tabela 4: Dados padrão de cianidina-3-glicosídeo.

Figura 22: Cromatogramas do padrão de **A:** cianidina-3-glicosídeo, **B:** cianidina-3-glicosídeo degradado a 55 °C e **C:** cianidina-3-glicosídeo degradado a 85 °C injetados no UHPLC-MS. Condições cromatográficas: eluição por gradiente A (água:ácido fórmico 0,1%) e B (acetonitrila:ácido fórmico 0,1%), tempo de eluição de 12 minutos, vazão da fase móvel:0,35 mL/min, gradiente inicial: 99 % de A e 1 % de B, 4 a 8 minutos: 80% de A e 20 % de B, 8 a 10 minutos: 70% de A e 30% de B, 10 a 12 minutos: 95 % de A e 5% de B. Volume de injeção 10 μ L.



Figura 23: Espectro de massas dos padrão de cianidina-3-glicosídeo, injetado no UHPLC-MS, Condições MS: Capilar 0,80 kV, Cone 30 V, Extrator 3 V, RF lentes 0,5 V, temperatura da fonte = 120 °C e temperatura de dessolvatação = 400 °C.

Nos espectros de massa dos padrões, foi possível identificar íons moleculares com razão massa/carga de 449 e 493, correspondendo respectivamente, a cianidina-3-glicosídeo e malvidina-3-glicosídeo. Além disso, observaram-se fragmentos em 287 e 331, atribuídos as suas agliconas. Foram realizadas análises utilizando o segundo quadrupolo, dado apresentado na Figura 24, de uma amostra do padrão de cianidina-3-glicosídeo, para verificar se o fragmento 287 resultava da fragmentação do íon com razão m/z 449, observado no espectro de ACYS. Isto indicou que os dados de UHPLC-MS, sem a utilização do segundo quadrupolo podem ser usados para a identificação de ACYS.



Figura 24: Espectro de massas sequencial do padrão de cianidina-3-glicosídeo, injetado no UHPLC-MS/MS, Condições MS: Capilar 3,0 kV, Cone 30 V, Extrator 3 V, RF lentes 0,5 V, temperatura da fonte = 120 °C e temperatura de dessolvatação = 350 °C.

Os dados dos cromatrogramas dos padrões e respectivos espectros de massas não permitiram identificar nenhum composto sugerido pela literatura como produto de degradação térmica de ACYS em extratos. Embora os dados não

sejam suficientes para elucidar os produtos de degradação ou possível rota de degradação dos padrões nas condições estudadas, os dados indicam nitidamente o efeito da temperatura na degradação das ACYS.

A Figura 25 A a B apresenta o monitoramento típico de absorbância a 525 nm para os padrões a 55 °C e 85 °C, respectivamente, monitorados por 55 e 11 horas. As Figuras 26 A a B e 27 A a B apresentam os espectros eletrônicos típicos dos padrões monitorados ao longo da degradação a 55 °C e 85 °C respectivamente. Notou-se a aceleração da degradação com o aumento da temperatura: perfis espectrofotométricos e cromatográficos semelhantes foram atingidos com tempo de monitoramento menor a 85 °C do que a 55 °C, o que é coerente com o efeito cinético de aceleração de reações com aumento da temperatura.



Figura 25: Monitoramento dos padrões de malvidina-3-glicosideo (preto) e **B**:cianidina-3-glicosideo (vermelho)ostras degradadas a **A**: 55 °C e **B**: 85 °C utilizando água destilada como branco, monitorado por 55 e 11 horas respectivamente, com medidas em 525 nm.



Figura 26: Espectros eletrônicos do padrão de **A:** malvidina-3-glicosídeo e **B:** cianidina-3-glicosídeo, amostras degradadas a 55 °C utilizando água destilada como branco, monitorados por 18,5 horas.



Figura 27: Espectros eletrônicos do padrão de **A:** malvidina-3-glicosídeo e **B:** cianidina-3-glicosídeo amostras degradadas a 85 °C utilizando água destilada como branco, monitorados por 11 horas.

4.3.2 Resultados Fase 2: Extratos brutos de ACYS.

Os cromatogramas e as razões m/z encontradas para extratos de uva e jabuticaba respectivamente indicaram as espécies identificadas que são apresentadas na Tabela 5 e 6.

tr (min)	Íon molecular m/z (M ⁺)	Identificação
2,4	465	Delfinidina-3-glicosídeo
,6	449	Cianidina-3-glicosídeo
2,9	463	Peonidina-3-glicosídeo
3,2	493	Malvidina-3-glicosídeo
3,4	531	Derivado da petunidina
3,5	561	Derivado da malvidina
4,1	505	Derivado 6 acetil petunidina
4,6	479	Petunidina-3-glicosídeo

Tabela 5: Dados de espécies presentes em extrato bruto de uva.

Tabela 6: Dados de espécies presentes em extrato bruto de jabuticaba.

tr (min)	Íon molecular m/z (M⁺)	Identificação
0,11	155	Protoglucinaldeído
0,45	130	-
0,7	129	-
2,6	449	Cianidina-3-glicosídeo



Figura 28: Cromatogramas do **A:** extrato bruto de uva, **B:** extrato bruto de uva degradado a 55 $^{\circ}$ C e **C:** extrato bruto de uva degradado a 85 $^{\circ}$ C injetados no UHPLC-MS. Condições: eluição por gradiente A (água:ácido fórmico 0,1%) e B (acetonitrila:ácido fórmico 0,1%), tempo de eluição 12 minutos, vazão da fase móvel:0,35 mL/min, gradiente inicial: 99 % de A e 1 % de B, 4 a 8 minutos: 80 % de A e 20 % de B, 8 a 10 minutos: 70 % de A e 30 % de B, 10 a 12 minutos: 95 % de A e 5% de B. Volume de injeção 10 µL



Figura 29: Cromatrogramas do extrato bruto de uva e os picos das ACYS identificadas injetados no UHPLC-MS. Condições cromatográficas: eluição por gradiente A (água:ácido fórmico 0,1%) e B (acetonitrila:ácido fórmico 0,1%), tempo de eluição de 12 minutos, vazão da fase móvel:0,35 mL/min, gradiente inicial: 99 % de A e 1 % de B, 4 a 8 minutos: 80 % de A e 20 % de B, 8 a 10 minutos: 70 % de A e 30 % de B, 10 a 12 minutos: 95 % de A e 5% de B. Volume de injeção 10 μ L.

A Figura 28 mostra os cromatogramas do extrato bruto de uva A: inicial, B: degradado a 55 °C e C: degradado a 85 °C. A Figura 29 mostra os cromatrogramas das ACYS identificadas no extrato de bruto de uva. As figuras 30 a 34 trazem os espectros de massas e as estruturas de ACYS identificadas nos extratos de uva.

Na Figura 35 é possível observar compostos de degradação com razão m/z iguais nos extratos de uva para as diferentes temperaturas de degradação.



Figura 30: Espectro de massas da delfinidina-3-glicosídeo, obtida da injeção do extrato bruto de uva no UHPLC-MS, Condições MS: Capilar 0,80 kV, Cone 30 V, Extrator 3 V, RF lentes 0,5 V, temperatura da fonte = $120 \ ^{\circ}$ C e temperatura de dessolvatação = $400 \ ^{\circ}$ C.



Figura 31: Espectro de massas da cianidina-3-glicosídeo, obtida da injeção do extrato bruto de uva no UHPLC-MS, Condições MS: Capilar 0,80 kV, Cone 30 V, Extrator 3 V, RF lentes 0,5 V, temperatura da fonte = 120 °C e temperatura de dessolvatação = 400 °C.



Figura 32: Espectro de massas da peonidina-3-glicosídeo, obtida da injeção do extrato bruto de uva no UHPLC-MS, Condições: Capilar 0,80 kV, Cone 30 V, Extrator 3 V, RF lentes 0,5 V, temperatura da fonte = 120 °C e temperatura de dessolvatação = 400 °C.



Figura 33: Espectro de massas da malvidina-3-glicosídeo, obtida da injeção do extrato bruto de uva no UHPLC-MS, Condições: Capilar 0,80 kV, Cone 30 V, Extrator 3 V, RF lentes 0,5 V, temperatura da fonte = 120 °C e temperatura de dessolvatação = 400 °C.



Figura 34: Espectro de massas da petunidina-3-glicosídeo, obtida da injeção do extrato bruto de uva no UHPLC-MS, Condições MS: Capilar 0,80 kV, Cone 30 V, Extrator 3 V, RF lentes 0,5 V, temperatura da fonte = 120 °C e temperatura de dessolvatação = 400 °C.
10 x		
AM 9R ALINE 93 (0.937)		Scan ES+
100 g ¹⁴³	Degradado a 55 ºC	4.76e7
■ ⁸ 132 144	339	
0 1, A.A. 125 150 175 200 225 250 275	300 325 350 375 400 425 450 475 500 525 550 575 600 625 650 (
AM 65 ALINE 89 (0.897)		Scan ES+
100 143	Degradado a 85 ºC	4.19e7
*		
0		m/z
AM 65 ALINE 57 (0.574)	300 323 330 373 400 423 430 473 300 323 330 373 600 623 630 (Scan ES+
100- 157	Degradado a 85 ºC	6.23e6
≈ 130 155 158 176 too out 040 070		
0 198 245249 273		m/z
125 150 175 200 225 250 275	300 325 350 375 400 425 450 475 500 525 550 575 600 625 650 (675 700
130 130		2.24e7
100 1 8-1 157	Degradado a 55 ºC	
125 150 175 200 225 250 275	300 325 350 375 400 425 450 475 500 525 550 575 600 625 650 (675 700
AM 9R ALINE 41 (0.413)		Scan ES+ 5 78e6
100 175 219 001	Degradado a 55 ºC	0.7000
* 123 156158 176 203 221235 271273	350 381 497	
125 150 175 200 225 250 275	300 325 350 375 400 425 450 475 500 525 550 575 600 625 650 (675 700
AM 65 ALINE 42 (0.423)		Scan ES+
		3.04e6
× 143 ¹⁵⁹ ¹⁷⁹ 216 233235	Degradado a 85 °C 478 530	
125 150 175 200 225 250 275	300 325 350 375 400 425 450 475 500 525 550 575 600 625 650 (675 700

Figura 35:Espectro de massas de produtos de degradação dos extratos de uva bruto por UHPLC-MS, Condições: Capilar 0,80 kV, Cone 30 V, Extrator 3 V, RF lentes 0,5 V, temperaturas da fonte: 120 °C e dessolvatação: 400 °C

As Figuras 36 A a C mostram os cromatogramas extrato bruto de jabuticaba A: inicial, **B:** degradado a 55 °C e **C:** degradado a 85 °C.



Capítulo 4

Figura 36:Cromatogramas UHPLC-MS de **A:** extrato bruto de jabuticaba, **B:** extrato bruto de jabuticaba degradado a 55 °C e **C:** extrato bruto de jabuticaba degradado a 85 °C. Condições: eluição por gradiente A (água:ácido fórmico 0,1%) e B (acetonitrila:ácido fórmico 0,1%), tempo de eluição: 12 min, vazão da fase móvel:0,35 mL/min, gradiente inicial: 99 % de A e 1 % de B, 4 a 8 minutos: 80 % de A e 20 % de B, 8 a 10 minutos: 70 % de A e 30 % de B, 10 a 12 minutos: 95 % de A e 5 % de B. Volume de injeção 10 µL.

A Figura 37 mostra os cromatrogramas de ACYS identificadas no extrato de bruto de jabuticaba.



Figura 37: Cromatrogramas UHPLC-MS do extrato bruto de uva e picos das ACYS identificadas. Condições: eluição por gradiente A (água:ácido fórmico 0,1%) e B (acetonitrila:ácido fórmico 0,1%), eluição: 12 min, vazão da fase móvel:0,35 mL/min, gradiente inicial: 99 % de A e 1 % de B, 4 a 8 min: 80 % de A e 20 % de B, 8 a 10 min: 70 % de A e 30 % de B, 10 a 12 min: 95 % de A e 5% de B. Volume de injeção 10 μ L.

As figuras 38 e 39 mostram os espectros de massas com as estruturas da antocianina identificada e do protoglucinaldeído no extrato de jabuticaba, únicas espécies possíveis de serem identificadas.



Figura 38: Espectro de massas da protogucinaldeido, obtida da injeção do extrato bruto de jabuticaba no UHPLC-MS, Condições MS: Capilar 0,80 kV, Cone 30 V, Extrator 3 V, RF lentes 0,5 V, temperatura da fonte = 120 °C e temperatura de dessolvatação = 400 °C.



Figura 39: Espectro de massas da cianidina-3-glicosídeo, obtida da injeção do extrato bruto de jabuticaba no UHPLC-MS, Condições MS: Capilar 0,80 kV, Cone 30 V, Extrator 3 V, RF lentes 0,5 V, temperatura da fonte = 120 °C e temperatura de dessolvatação = 400 °C.

O monitoramento das absorbâncias durante a degradação dos extratos indicou maior dispersão do conjunto de dados de absorbância dos extratos de uva, provavelmente relacionada à maior variedade de ACYS presentes nesse extrato em comparação com o extrato de jabuticaba, como indicam as Tabelas 5 e 6 (páginas 46).



Figura 40: Monitoramento de extratos brutos de **A:** jabuticaba e **B:** uva amostras degradadas a 55 °C, monitorados por 70 horas com medidas em 525 nm., tendo água destilada como branco.



Figura 41: Espectros eletrônicos dos extratos brutos de **A:** jabuticaba e **B:** uva amostras degradadas a 55 °C utilizando água destilada como branco, monitorados por 70 horas com medidas em 525 nm.



Figura 42: Monitoramento de extratos brutos de **A:** jabuticaba e B: uva amostras degradadas a 85 °C utilizando água destilada como branco, monitorados por 12 horas com medidas em 525 nm.



Figura 43: Espectros eletrônicos dos extratos brutos de **A:** jabuticaba e **B:** uva amostras degradadas a 85 °C utilizando água destilada como branco, monitorados por 9 horas com medidas em 525 nm.

Os extratos degradados a 85 °C apresentaram comportamento semelhante aos degradados a 55 °C, entretanto a perda da cor característica de ACYS para essas amostras foi significativamente mais rápida como seria esperado com o aumento da temperatura de monitoramento que acelera a degradação, como pode ser observado nas Figuras 40 a 43. A semelhança entre esses extratos também pode ser observada nos espectros de massas que apresentam compostos com mesma razão (m/z) para as diferentes temperaturas de degradação (Figura 44).



Figura 44:Espectro de massas de produtos de degradação dos extratos de jabuticaba , obtida da injeção do extrato bruto de jabuticaba no UHPLC-MS, Condições MS: Capilar 0,80 kV, Cone 30 V, Extrator 3 V, RF lentes 0,5 V, temperatura da fonte = $120 \ ^{\circ}$ C e temperatura de dessolvatação = $400 \ ^{\circ}$ C.

4.3.3 Resultados Fase 2: Extratos purificados de ACYS.

Para os extratos purificados por SPE, houve menos variabilidade de absorbância no monitoramento.

A diminuição de picos nos cromatogramas dos extratos purificados apresentados nas Figuras 45A e 46A em comparação com os extratos brutos (Figuras 28 A e 36 A, páginas 46 e 51) é indicativo da purificação dos extratos.



Capítulo 4

Figura 45: Cromatogramas do **A:** extrato purificado de uva, **B:** extrato purificado de uva degradado a 55 °C e **C:** extrato purificado de uva degradado a 85 °C. Condições: eluição por gradiente A (água:ácido fórmico 0,1%) e B (acetonitrila:ácido fórmico 0,1%), tempo de eluição de 12 min, vazão da fase móvel:0,35 mL/min, gradiente inicial: 99 % de A e 1 % de B, 4 a 8 min: 80 % de A e 20 % de B, 8 a 10 min: 70 % de A e 30 % de B, 10 a 12 minutos: 95 % de A e 5 % de B. Volume de injeção 10 μ L



Figura 46: Cromatogramas do **A:** extrato purificado de jabuticaba, **B:** extrato purificado de jabuticaba degradado a 55 °C e **C:** extrato purificado de jabuticaba degradado a 85 °C, injetados no UHPLC-MS. Condições cromatográficas: eluição por gradiente A (água:ácido fórmico 0,1 %) e B (acetonitrila:ácido fórmico 0,1 %), tempo de eluição de 12 minutos, vazão da fase móvel:0,35 mL/min, gradiente inicial: 99 % de A e 1 % de B, 4 a 8 minutos: 80 % de A e 20 % de B, 8 a 10 minutos: 70 % de A e 30 % de B, 10 a 12 minutos: 95 % de A e 5 % de B. Volume de injeção 10 µL.

Os cromatogramas dos extratos purificados e degradados aparecem nas Figuras 45 A a C referentes à uva e nas Figuras 46 A a C para jabuticaba. É possível observar a diminuição progressiva da intensidade dos picos, indicando a degradação térmica das ACYS. Essa constatação também é reforçada pelo perfil da variação de absorbância com o tempo (Figuras 47 e 48) e pelos espectros eletrônicos (Figuras 49 e 50).



Figura 47: Monitoramento dos extratos purificados de **A:** jabuticaba e **B:** uva amostras degradadas a 55 °C utilizando água destilada como branco, monitorados por 120 horas com medidas em 525 nm.



Figura 48: Monitoramento dos extratos purificados de **A:** jabuticaba e **B:** uva amostras degradadas a 85 °C utilizando água destilada como branco, monitorados por 18 horas com medidas em 525 nm.



Figura 49: Espectros eletrônicos dos extratos purificados de **A:** jabuticaba e **B:**uva amostras degradadas a 55 °C utilizando água destilada como branco, monitorados por 120 horas com medidas em 525 nm



Capítulo 4

Figura 50: Espectros eletrônicos dos extratos purificados de **A:** jabutucaba e **B:** uva amostra degradada a 85 °C utilizando água destilada como branco, monitorado por 18,5 horas com medidas em 525 nm.

A tendência de variação de absorbância dos extratos purificados é semelhante a que se observou para as soluções de padrões de ACYS (item 4.3.1., página 40). Isso indica que os diversos constituintes dos extratos brutos removidos pela purificação têm influência na degradação dos extratos. Para corroborar essa idéia, aponta-se que os extratos purificados mantiveram coloração característica por até 120 horas enquanto os extratos brutos descoraram com 70 horas de monitoramento.

A Figura 51 mostra um espectro de massas típico de um dos produtos de degradação térmica de ACYS propostos na literatura para a degradação das ACYS o protoglucinaldeído (Patras *et al*, 2010) identificado em alguns extratos. A presença deste composto nos extratos degradados em diferentes temperaturas indica que a possível rota de degradação térmica das ACYS dos extratos não se modifica com o aumento da temperatura que apenas acelera o processo. Esse produto de degradação não foi identificado na degradação dos padrões, o que pode ser relacionado à composição dos extratos. O extrato de jabuticaba, por exemplo, contém protoglucinaldeído em sua composição inicial e os padrões não contem enzimas que influenciam a degradação dos extratos.



Figura 51: Espectro de massas do protogucinaldeido, injetado no UHPLC-MS, Condições MS: Capilar 0,80 kV, Cone 30 V, Extrator 3 V, RF lentes 0,5 V, temperatura da fonte = $120 \ ^{\circ}$ C e temperatura de dessolvatação = $400 \ ^{\circ}$ C.

4.3.4 Cinética da degradação de extratos e padrões

Modelos cinéticos são usualmente utilizados para avaliações objetivas e necessárias para estudos de adequação de produtos, servindo para avaliações de influência de processamento em parâmetros de qualidade, como cor, por exemplo. O conhecimento da cinética de degradação de um composto, incluindo ordem de reação, constante de reação e a energia de ativação é importante como indicativos de perda da qualidade de alimentos durante estocagem bem como em processos térmicos de tratamento (Patras *et al*, 2010). Tendo em vista a importância desses parâmetros, foram testados modelos matemáticos para os sistemas estudados buscando informações sobre as influências da temperatura na cinética da reação de degradação térmica das ACYS (Atkins, 2006).

Diversos modelos matemáticos para dados cinéticos (em função da concentração de ACYS) foram testados, buscando-se encontrar o melhor ajuste em termos de ordem de reação. Foram aplicados os dados de monitoramento das soluções dos padrões e alguns extratos. Buscava-se relação linear dos dados ajustados para encontrar a ordem da reação. Foram testados modelos de ordem zero, primeira e segunda, com resultados satisfatórios em termos de ajuste linear avaliado pelo coeficiente de correlação da ordem de 0,97 apenas para os modelos de segunda ordem e por isso este ajuste foi considerado o mais adequado.

Reações de segunda ordem com relação a um dado reagente têm sua velocidade variando com o quadrado da concentração desse reagente. Para reação de segunda ordem, a lei cinética é dada pela Equação 4

$$C^{-1} = C_0^{-1} + kt$$
 Equação 4

De acordo com a Equação 4, gráficos (C⁻¹ x t) com ajuste linear indicam que a reação é de segunda ordem, sendo que C refere-se a concentração de ACYS, [ACYS]. Esse ajuste foi satisfatório com os dados do monitoramento cinético da degradação das soluções de padrões de ACYS, como pode ser observado nas Figuras de 52 a 53.

A Figura 52 traz os gráficos típicos que representam ajustes de cinética de segunda ordem para a degradação dos padrões de malvidina-3-glicosídeo e cianidina-3-glicosídeo a 55 °C. A Figura 53 é análoga, com dados típicos de degradação a 85 °C. A linearidade das curvas obtidas aponta adequação do ajuste, ou seja, sugere que a degradação ocorre de acordo com processo de segunda ordem com relação à concentração de ACYS.



Figura 52: Ajuste de segunda ordem para degradação a 55 °C dos padrões de malvidina-3-glicosídeo (preto) e cianidina-3-glicosídeo (vermelho) monitorados por 55 horas





As tabelas 7 e 8 apresentam as constantes de reação (k), o tempo de meia vida ($t_{1/2}$), e o parâmetro de Arrhenius: energia de ativação (E_a) para as reações de degradação dos padrões. As constantes de reação são os coeficientes angulares das retas encontradas plotando-se [ACYS]⁻¹ em função do tempo. O tempo de meia vida para cinéticas de segunda ordem é calculado pela Equação 5.

$$t_{1/2} = \frac{1}{k[ACYS]_0}$$
 Equação 5

A energia de ativação foi calculada de acordo com a Equação 6 (Atkins, 2006).

 $\ln k = \ln A - \frac{Ea}{R}$ Equação 6

Tabela 7: Constantes de reação, tempo de meia- vida e parâmetros de Arrhenius para a
degradação da Malvidina-3-glicosídeo.

Temperatura (K)	k (dm³/mol s)	t 1/2 (horas)	E _a (kJ/mol)
328	0,149±0,004	78±2	05 2+0 1
358	0,278±0,009	4,2±0,1	95,2±0,1

Valores médios de duplicatas ± desvio da média

Tabela 8: Constantes de	reação, tempo	de meia-	vida e parâ	àmetros de <i>l</i>	Arrhenius p	para a
	degradação de	e cianidina	a-3-glicosíde	eo		

Temperatura (K)	k (dm³ / mol s)	t _{1/2} (horas)	E _a (kJ/mol)
328	0,01834	58,7	90 24+0 05
358	0,29±0,02	3,8±0,4	09,34±0,03

Valores médios de duplicatas ± desvio da média

A estabilidade de amostras de ACYS está relacionada com a estabilidade das ACYS. Estudos indicam que ACYS com hidroxilas nas posições 3' e 4' da Figura 13 página 31 são oxidadas mais rapidamente. Esta característica de maior estabilidade da malvidina-3-glicosídeo em relação à cianidina-3-glicosídeo explica o maior tempo de meia-vida da malvidina-3-glicosídeo (Huang *et al*, 2009). Já energia de ativação para a degradação dos padrões indicou forte efeito da temperatura na velocidade da reação (Atkins, 2006), o que também se notou pela grande diferença entre os tempos de meia-vida.

Parâmetros cinéticos de alguns extratos foram calculados e são apresentados na sequência para ilustrar a tendência de comportamento que é comparável com a literatura. As Figuras 54 mostram ajustes de segunda ordem típicos para a degradação de extratos brutos de uva a 55 e 85 °C, respectivamente. A Tabela 9 mostra alguns parâmetros cinéticos da degradação desses extratos. A Figura 55 apresenta o ajuste típico para a degradação do extrato purificado de jabuticaba a 85 °C e a Tabela 10 traz alguns parâmetros cinéticos da degradação do extrato purificado de jabuticaba. Os resultados obtidos encontram semelhança com dados da literatura, como energias de ativação de 72,0 kJ/mol para sucos de morango, de 73,0 kJ/mol para sucos de *blackcurrant* (Patras *et al*,2010) e 85,0 kJ/mol para sucos de *blueberry* (Buchow *et al*, 2010).



Figura 54: Ajustes típicos de segunda ordem para degradação a 55 e 85 ºC de extratos

de uva bruto, em monitoramento espectrofotométrico por 72 e 18 horas, respectivamente.

Tabela 9: Constantes de reação, tempo de meia- vida e parâmetros de Arrhenius para a degradação de extrato bruto de uva

Temperatura (K)	k (dm³ / mol s)	t _{1/2} (horas)	E _a (kJ/mol)
328	0,0012±0,0002	42,8±0,4	
358	0,056±0,02	9,2±0,2	50,52



Valores médios de duplicatas ± desvio da média

Figura 55: Ajuste de segunda ordem para degradação a 85 °C de extratos de jabuticaba purificados típicos, monitorados em espectrofotômetro por 18 Horas.

Tabela 10: Constantes de reação, tempo de meia-vida para a degradação de extrato purificado de jabuticaba.

Temperatura (K)	k (dm³ / mol s)	t 1/2 (horas)		
358	$0,23 \pm 0,02$	$8,4 \pm 0,8$		

Valores médios de duplicatas \pm desvio da média

Os resultados apresentados corroboram a influência da composição das amostras de ACYS para estabilidade de extratos e padrões de ACYS. A estrutura da antocianina, bem como a presença de outros constituintes em extratos, afeta o processo de degradação térmica. Embora não tenha sido possível detalhar o mecanismo da degradação de ACYS, o efeito da temperatura na degradação é destacado, como ilustram os tempos de meia-vida dos padrões (Tabelas 7 a 8, página 62 e 63) e de alguns extratos (Tabelas 9 e 10, página 64), com valores da mesma ordem de grandeza dos resultados da degradação acelerada.

Capítulo 4

Capítulo 5: Conclusão

5-Conclusão

Extratos de jabuticaba com concentração de ACYS 1,7±0,2; 16,5±0,9 e 51±5 mg/L foram obtidos, respectivamente, a 25, 55 e 85 °C. A concentração dos extratos de uva obtidos em diferentes temperaturas foi 49±2 mg/L a 25°C; 90±2 a 55 °C; e 96±3 mg/L a 85 °C. O aumento da concentração de ACYS nos extratos obtidos com temperatura mais elevada aponta o efeito favorável da temperatura na extração.

Os dados de identificação por UHPLC-MS indicaram cianidina-3-glicosídeo, petunidina-3-glicosídeo, peonidina-3-glicosídeo e malvidina-3-glicosídeo como constituintes dos extratos de uva e cianidina-3-glicosídeo para jabuticaba.

O monitoramento da estabilidade dos extratos nas diferentes condições estudadas neste trabalho demonstrou o efeito do pH, da temperatura de extração, da concentração e de enzimas para a estabilidade dos extratos de jabuticaba. A estabilidade dos extratos de uva está relacionada com a temperatura de armazenamento dos extratos, associada com a diminuição de atividade enzimática e da velocidade das reações a temperaturas mais baixas.

Os ensaios de degradação acelerada dos extratos e padrões corroboram o efeito significativo da temperatura na degradação de ACYS, a despeito de vantagens como aumento na concentração de ACYS extraídas e inativação enzimática. Temperaturas elevadas podem comprometer rapidamente a concentração e as funcionalidades de ACYS em extratos ou isoladas.

As diferentes técnicas analíticas utilizadas para o estudo da degradação térmica de ACYS, como espectrofotometria, HPLC, UHPLC-MS, demonstram a versatilidade das diferentes técnicas que possibilitaram a obtenção de resultados satisfatórios para as análises realizadas.

Na degradação acelerada dos padrões não foram identificados produtos de degradação de ACYS típicos, mas foram estimados parâmetros cinéticos como tempo de meia vida de 78±2 e 4,2±0,1 horas, a 55 e 85 °C, respectivamente para malvidina-3-glicosídeo; 58,7 e 3,8±0,4 horas a 55 e 85 °C, respectivamente para cianidina-3-glisosídeo; 42,8±0,4 e 9,2±0,2 horas a 55 e 85 °C, respectivamente para extratos brutos de uva e 8,4±0,8 horas para extrato de jabuticaba purificado

degradado a 85 °C. Todos os processos tiveram ajuste de cinética de segunda ordem com relação à concentração de ACYS nas condições estudadas.

Nas condições estudadas neste trabalho, picos com razões m/z idênticos foram encontrados nos espectros de massas das amostras de extrato degradadas em diferentes temperaturas. Esses resultados de degradação acelerada dos extratos indicaram que o aumento da temperatura não deve alterar a rota de degradação de ACYS em padrões ou extratos.

As perspectivas para trabalhos futuros relacionam-se à aplicação de outras técnicas cromatográficas e espectrometria de massas para detalhar o monitoramento do processo de degradação, com o monitoramento de cada espécie ao longo do tempo. Outra perspectiva é da aplicação de Ressonância Magnética Nuclear para elucidação estrutural de extratos e produtos de degradação. Tais estudos possibilitarão obter importantes informações adicionais que servirão para compreensão dos processos envolvidos na degradação de ACYS.

Capítulo 6: Referências

6. Referências

ADAMS, J. B. Thermal degradation of anthocyanins with particular reference to the 3glycosides of Cianidin I. in acidified aqueous solution at 100 ^oC. *Journal of Science and Food Agriculture*, 24, 747, **1973**

ALIGHOURCHI, H.; BARZEGAR, M. Some physicochemical characteristics and degradation kinetic of anthocyanin of reconstituted pomegranate juice during storage. *Journal of Food Engineering*, 90, 179, **2009**

AMIN, K. A.; H. HAMEID II, A.; ELSTTAR, A. Effect of food azo dyes tartrazine and carmoisine on biochemical parameters related to renal, hepatic function and oxidative stress biomarkers in young male rats. *Food and Chemical Toxicology* 48, 2994, **2010**

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA) Disponível em: <<u>http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/44_77.htm</u>> Acesso em 14/01/2012

ATKINS. P; PAULA, J. Atkins Physical Chemistry. New York, 2006

BARROS, R. S.; FINGER, F. L. MAGALHÃES, M. M. .Changes in non-structural carbohydrates in developing fruit of *Myrciaria jaboticaba*. *Scientia Horticulturae* 66, 209, **1996**

BEN AMOR, B.; ALLAF, K. Impact of texturing using instant pressure drop treatment prior to solvent extraction of anthocyanins from Malaysian Roselle (Hibiscus sabdariffa). *Food Chemistry* 115, 820, **2009**

BORDIGNON-LUIZ, M. T; GAUCHE, C.; GRIS, E. F.; FALCÃO, L. D. Colour stability of anthocyanins from Isabel grapes (*Vitis labrusca L.*) in model systems. *LWT* – Food Science and Technology, 40, 594, **2007**

BRIDLE, P.; GARCÍA-VIGUERA, C. Analysis of anthocyanins in strawberries and elderberries. A comparison of capillary zone electrophoresis and HPLC. *Food chemistry*, 59, 299, **1997**

BROUILLARD, R. The vivo expression of anthocyanins color in plants. *Phytochemistry*, 22, 1311, **1983**

BUCKOW, R.; KASTELL,A.; TEREFE,N.S.; VERSTEEG, C. Pressure and Temperature Effects on Degradation Kinetics and Storage Stability of Total Anthocyanins in Blueberry Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 1076, **2010**

CACACE, J. E.; MAZZA, G. Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering*. 59, 379, **2003**

CASTAÑEDA-OVANDO, A. C.; VIDAL, C. A. G; ACHECO, M. L. H.; HERNÁNDEZ, E. P.; RODRÍGUEZ, J. A. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113, 859, **2009**

CAVALCANTI, R. N.; SANTOS, D. T.; MEIRELES, M. A. A. Non-thermal stabilization mechanims of anthocyanins in model and food systems - An overview. *Food Research International.* 44, 499, **2011** *apud* HOSHINO, MATSUMOTO e GOTO, **1982**

CITADIN, I.; VICARI, I. J.; SILVA, T. da; DANNER, M. A. Qualidade de frutos de jabuticabeira (*myrciaria cauliflora*) sob influência de duas condições de cultivo: sombreamento natural e pleno sol. *Revista Brasileira de Agrociência*, 11, 373, **2005**

CORRALES, M.; GARCÍA, A. F.; Peter BUTZ, P.; TAUSCHER, B. Extraction of anthocyanins from grape skins assisted by high hydrostatic pressure, Review. *Journal of Food Engineering.* 90,415, **2009**

CORRALES, M.; TOEPFL, S.; BUTZ, P.; KNORR, D.; TAUSCHER, B. Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: A comparison. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 9, 85, **2008**

COSTA, C. T. da; HORTON, D.; MARGOLIS, S. A. Review: Analysis of anthocyanins in foods by liquid chromatography, liquid chromatography-mass spectrometry and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 881, 403, **2000**

FALCÃO, L. D; BARROS, D. M.; GAUCHE, C.; LUIZ, M. T. B. Copigmentação intra e intermolecular de ACYS: uma revisão. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos (CEPPA)*, 21, 351, **2003**

FAVARO, M. M. A. "Extração, estabilidade e quantificação de antocianinas de frutas típicas brasileiras para aplicação como corantes." Dissertação de mestrado; Instituto de Química. Unicamp, Campinas, **2008**

FAVARO, M. M. A.; ROSSI, A. V. "Reconhecimento de padrão de envelhecimento de extratos de antocianinas com métodos quimiométricos supervisionados", 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Resumos ANA192, **2010.**

FREITAS, A. A; FRANCELIN, M. F; HIRATA, G. F.; CLEMENTE, E.; SCHMIDT, F. L. Atividades das enzimas peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) nas uvas dos cultivares benitaka e rubi e em seus sucos e geléias. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28, 172, **2008**.

FULEKI, T.; FRANCIS, F. J. Quantitative methods for anthocyanins. Determination of total anthocyanin and degradation index for cranberry juice. *Journal of Food Science*, 33, 78, **1968**

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Review: Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochemical Engineering Journal* 14, 217, **2003**

GOIFFON, J-P.; MOULY, P. P.; GAYDOU, E. M. Anthocyanic pigment determination in red fruit juices, concentrated juices and syrups using liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta* 382, 39, **1999**

GONZÁLEZ-MANZANO, S.; DUEÑAS, M.; RIVAS-GONZALO, J. C.; ESCRIBANO-BAILÓN, M. T.; SANTOS-BUELGA, C. Studies on the copigmentation between anthocyanins and flavan-3-ols and their influence in the colour expression of red wine. *Food Chemistry*, 114, 649, **2009**

GONZALO, J; BUELGA, C. S.; BAILÓN, M. T. E. Anthocyanins in cereals. *Journal of Cromatography A*, 1054, 129, **2004**

HARBORNE, J. B. The Flavonoids: advanced in research since 1986, Champman and Hall: New York, 5th edition, **1994**.

HARBOURNE, N.; JACQUIER, J.C.; MORGAN, D. J.; LYNG, J. G. Determination of the degradation kinetics of anthocyanins in a model juice system using isothermal and non-isothermal methods. Food Chemistry, 111, 204, **2008** *apud* LUND, D, **1982**

HOSHINO, T; MATSUMOTO, U; GOTO, T. Evidences of the self-association of anthocyanins I. Circular dichroism of anhydrobase. *Tetrahedrom letters*, 21, 1751, **1980**.

HUANG, Z.; WANG, B.; WILLIAMS, P.; PACE, R. D. Identification of anthocyanins in muscadine grapes with HPLC-ESI-MS. *LWT - Food Science and Technology*, 42, 819, **2009**

JING, P.; BOMSER, J. A; SCHWARTZ, S. J.; JIAN, H.; MAGNUSON, B. A.; GIUSTI, M. M. Structure-Function relationships of anthocyanins from various anthocyanin-rich extracts on the inhibition of colon cancer cell growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 9391, **2008**

KIRCA, A.; CEMEROGLU, B. Degradation kinetics of anthocyanins in blood orange juice and concentrate. *Food Chemistry* 81, 583, **2003**

LEE, J.; DURST, R. W.; WROLSTAD, R. E. "Determination of total monomeric anthocyanin pigment contento f fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study"; *Journal of AOAC International*; 88, 1269, **2005.**

LEE, J; RENNAKER, C; WROLSTAD, R. E. Correlation of two anthocyanin quantification methods: HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chemistry*, 110, 782, **2008**

LONGO, L.; SCARDINO, A.; VASAPOLLO, G. Identification and quantification of anthocyanins in the berries of *Pistacia lentiscus L., Phillyrea latifolia L.* and *Rubia peregrina L. Innovative Food Science and Emerging Technologies* 8, 360, **2007**

LING, Y.; REN. C.; MALLERY, S. R.; UGALDE, C. M.; PEI, P.; VIJAYA SARADHI, U. V. R.; STONER, G. D.; CHAN, K. K.; LIU, Z. A rapid and sensitive LC-MS/MS method for quantification of four anthocyanins and its application in a clinical pharmacology study of a bioadhesive black raspberry gel. *Journal of chomatografhy B*, 877, 4027, **2009**

LUND, D. Effect of processing on nutrient content and nutritional value of food: Heat processing. In M. Rechcigal, Jr. (Ed.). Handbook of nutritive value of processed food (Vol. 1, pp. 3–9). Florida: CRC Press, **1982**.

MALACRIDA ,C. R. ;MOTTA, S. D. M. Antocianinas em suco de uva: composição e estabilidade. *Boletim do centro de pesquisa e processamento de alimentos*, 24, 59, **2006**

MATSUMOTO, H.; HANAMURA, S.; KAWAKAMI, T.; SATO, Y; HIRAYAMA, M. Preparative-Scale Isolation of Four Anthocyanin Components of Black Currant (*Ribes nigrum L.*) Fruits. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49, 1541, **2001**

MAURO, A.D.; ARENA, E.; FALLICO, B.; PASSERINI, A.; MACCARONE, E. Recovery of Anthocyanins from Pulp Wash of Pigmented Oranges by Concentration on Resins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50, 5968, **2002**

MAZZA G, BROUILLARD, R. The mechanism of copigmentation of anthocyanins in aqueous solutions. *Phytochemistry*, 29,1097,**1990**

MAZZA G, BROUILLARD R. Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products. *Food Chemistry*, 25, 207, **1987 a**

MULINACCI, N.; VECCHIO, V.; ANDRENELLI, L.; INNOCENTI, M.; IERI, F. Rapid HPLC/DAD/MS method to determine phenolic acids, glycoalkaloids and anthocyanins in pigmented potatoes (*Solanum tuberosum* L.) and correlations with variety and geographical origin. *Food Chemistry*, 125, 750, **2011**

MUNÕZ, S.; MESTRES, M.; BUSTO, O.; GUASCH, J. Determination of some flavan-3-ols and anthocyanins in red grape seed and skin extracts by HPLC-DAD: Validation study and response comparison of different standards. *Analytica Chimica Acta*, 628, 104, **2008**

NAGAI, S; OHARA, K.; MUKAI, K. Kinetic study of the quenching reaction of singlet oxygen by flavonoids in ethanol solutions. *Journal of Physical Chemistry B*, 109, 4234, **2005**

OLIVEIRA-COLLET, S. A; COLLET, M. A.; MACHADO, M. de F. P da S. Differencial gene expression for isozymes in somatic mutants of Vitis Vinifera L. (Vitacea). *Biochemical Systematics and Ecology*, 33, 691, **2005**

OLIVEIRA-COLLET,S. A; ZEQUIM-MAIA,H. de S. ; MANGOLIN, C. A.; MACHADO, M. de F. P da S. Mutações e recombinações genéticas geram uvas coloridas. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*. Ano VIII, 35, **2005**

PATRAS, A.; BRUNTON, N. P.; O'DONNELL, C.; TIWARI, B. K. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Trends in Food Science & Technology*, 21, 3, **2010**

REIN, M. Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins. Academic Dissertation. University of Helsinki-Helsinki, **2005**

RING, J.; BROCKOW, K.; BEHRENDT, H. Review: Adverse reactions to foods. *Journal of Chromatography B*, 756, 3, **2010**

SÁENZ-LOPEZ, R.; FERNÁNDEZ-ZURBANO, P.; TENA, M. T. Development and validation of a capillary zone electrophoresis method for the quantitative determination of anthocyanins in wine. *Journal of Chromatography A*, 990, 247, **2003**

SAMPAIO, P. G. "Otimização da extração, esterilização e identificação de antocianinas obtidas de frutas." Dissertação de mestrado; Instituto de Química. Unicamp – Campinas, São Paulo, **2008**

SEERAM, N. P.; BOURQUIN, L. D.; NAIR, M. G. Degradation Products of Cyanidin Glycosides from Tart Cherries and Their Bioactivities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*, 4924, **2001**

SENDRA, J. M.; NAVARRO, J. L.; SENTANDREU, E. LC-DAD-ESI/MS determination of direct condensation flavanol Anthocyanin adducts in pressure extracted pomegranate (*Punica granatrum* L.) Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 10560, **2010**

SERRA, A.; MACIÀ, A.; ROMERO, M.; PIÑOLB, C.; MOTILVA, M. Rapid methods to determine procyanidins, anthocyanins, theobromine and caffeine in rat tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 879, 1519, **2011**

SHAMIR, M. O. Does anthocyanin degradation play a significant role in determining pigment concentration in plants? *Plant Science*, 177, 310, **2009**

SISBIO, Manual do usuário. Instituto Chico Mendes de conservação da biodiversidade (ICMBio) 3ª edição, **2010**. Disponível em <http://:www.icmbio.gov.br/sisbio>, acessado em 30/10/2011

SKREDE, G., WROLSTAD, R. E. Flavonoids from berries and grapes. In SHI, J., MAZZA, G., MAGUER, M. L. (Eds.) Functional foods: Biochemical and processing aspects. New York: CRC Press LLC. **2002** *apud* Lee, **2008**

SMYK, B; PLISZKA, B.; DRABENT, R. Interaction between Cyanidin-3-glucoside and Cu(II) ions. *Food Chemistry*, 107, 1616, **2008**

STEIMER, S.; SJÖBERG, P. J. R. Anthocyanin Characterization Utilizing Liquid Chromatography Combined with Advanced Mass Spectrometric Detection. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 59, 2988, **2011**

SUN, J.; CAO, X.; BAI, W.; LIAO, X.; HUA, X. Comparative analyses of copigmentation of cyanidin 3-glucoside and cyanidin 3-sophoroside from red raspberry fruits. *Food Chemistry* 120, 1131–1137 **2010**

SUN, J.; YAO, J.; HUANG, S.; LONG, X.; WANG, J.; GARCIA, E. G. Antioxidant activity of polyphenol and anthocyanin extracts from fruits of *Kadsura coccinea* (Lem.). *Food Chemistry*, 117, 276, **2009**

TEIXEIRA-NETO, A. A., SHIGUIHARA, A. L.; IZUMI, C. M. S.; BIZETO, M. A.; TEMPERINI, M. L. A.; CONSTANTINO, V. R. L. Stabilization of natural dyes from *Euterpe oleracea mart.* by intercalation between niobium lamellar oxide. *LNLS Activity Report*, **2007**

TERCI, D. B. L. "Aplicações analíticas e didáticas de ACYS extraídas de frutas." Tese de doutorado; Instituto de Química. Unicamp – Campinas, São Paulo, **2004**

VALLS, J.; MILLÁNA, S.; MARTÍ, M. P.; BORRÀS, E.; AROLA, L. Review: Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols. *Journal of Chromatography A*, 1216, 7143, **2009**

VILLIERS, de A.; CABOOTER, D.; LYNEN, F.; DESMET, G.; SANDRA. P. High-efficiency high performance liquid chromatographic analysis of red wine Anthocyanins. *Journal of Chromatography A*, 1218, 4660, **2011**

WANG, L; STONER, G. D. Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Letters*, 269,281, 2008

WANG, W.; XU, S. Degradation kinetics of anthocyanins in blackberry juice and concentrate. *Journal of Food Engineering* 82, 271, **2007**

WROLSTAD, R. E.; DURSTA, W.; LEE, J. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends in Food Science and Technology*, 16, 423, **2005**

WROLSTAD, R. E.; GIUSTI, M. M. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems, Review. *Biochemical Engineering Journal* 14, 217, 2003

WROLSTAD, R. E. Anthocyanin Pigments-Bioactivity and Coloring Properties. *Journal of Food Science*, 69, 5, 419, **2004**

ZHAI, W.; YANG. Z. Optimization of microwave- assisted extraction of anthocyanins from purple corn(*Zea mays* L.) cob and identification with HPLC-MS. *Innovative Food Science and Emerging Techonologies*, 11, 470, **2010**

YANG, Z.; ZHAI, W. Identification and antioxidant activity of anthocyanins extracted from the seed and cob of purple corn (*Zea mays L.*). *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 11, 169, **2010**

YANG, Z.; HAN, Y.; GU, Z.; FAN, G.; CHEN, Z. Thermal degradation kinetics of aqueous anthocyanins and visual color of purple corn (*Zea mays L.*) cob. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9, 341, **2008**