



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

MARTHA MARIA ANDREOTTI FAVARO

**EXPLORAÇÃO DE DADOS MULTIVARIADOS DE FONTES E EXTRATOS DE
ANTOCIANINAS UTILIZANDO ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS E MÉTODO
DO VIZINHO MAIS PRÓXIMO**

**TESE DE DOUTORADO APRESENTADA AO
INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM CIÊNCIAS.**

ORIENTADOR: Prof. Dr. ADRIANA VITORINO ROSSI

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA
POR MARTHA MARIA ANDREOTTI FAVARO, E ORIENTADA PELA PROF^a.DR^a. ADRIANA VITORINO ROSSI.**

Assinatura do Orientador

CAMPINAS, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA

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

F277e Favaro, Martha Maria Andreotti (1981-).
Exploração de dados multivariados de fontes e extratos de antocianinas utilizando análise de componentes principais e método do vizinho mais próximo / Martha Maria Andreotti Favaro. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Adriana Vitorino Rossi.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Antocianinas. 2. Quimiometria. 3. Análise de componentes principais. 4. Método K-vizinho mais próximo. I. Rossi, Adriana Vitorino. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Exploring multivariate data of sources and extracts of anthocyanins using principal components analysis and method of nearest neighbor

Palavras-chave em inglês:

Anthocyanins
Chemometrics
Principal component analysis
K-nearest neighbor

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora:

Adriana Vitorino Rossi [Orientador]
Eder Tadeu Gomes Cavalheiro
Efraim Lázaro Reis
Matthieu Tubino
Cláudio Francisco Tormena

Data de defesa: 29/02/2012

Programa de pós-graduação: Química

Eu creio em mim mesmo.

Creio nos que trabalham comigo, creio nos meus amigos e creio na minha família.

Creio que Deus me emprestará tudo que necessito para triunfar, contanto que eu me esforce para alcançar com meios lícitos e honestos.

Creio nas orações e nunca fecharei meus olhos para dormir, sem pedir antes a devida orientação a fim de ser paciente com os outros e tolerante com os que não acreditam no que eu acredito.

Creio que o triunfo é resultado de esforço inteligente, que não depende da sorte, da magia, de amigos, companheiros duvidosos ou de meu chefe.

Creio que tirarei da vida exatamente o que nela colocar.

Serei cauteloso quando tratar os outros, como quero que eles sejam comigo.

Não caluniarei aqueles que não gosto.

Não diminuirei meu trabalho por ver que os outros o fazem.

Prestarei o melhor serviço de que sou capaz, porque jurei a mim mesmo triunfar na vida, e sei que o triunfo é sempre resultado do esforço consciente e eficaz.

Finalmente, perdooarei os que me ofendem, porque compreendo que às vezes ofendo os outros e necessito de perdão.

Mahatma Gandhi

*Que nenhuma família comece em qualquer de repente.
Que nenhuma família termine por falta de amor.
Que o casal seja um para o outro de corpo e de mente.
E que nada no mundo separe um casal sonhador.*

*Que nenhuma família se abrigue debaixo da ponte.
Que ninguém interfira no lar e na vida dos dois.
Que ninguém os obrigue a viver sem nenhum horizonte.
Que eles vivam do ontem, no hoje em função de um depois.*

*Que a família comece e termine sabendo onde vai.
E que o homem carregue nos ombros a graça de um pai.
Que a mulher seja um céu de ternura, aconchego e calor.
E que os filhos conheçam a força de onde brota o amor.*

*Que marido e mulher tenham força de amar sem medida.
Que ninguém vá dormir sem pedir ou dar seu perdão.
Que as crianças aprendam no colo o sentido da vida.
Que a família celebre a partilha do abraço e do pão.*

*Que marido e mulher não se traiam nem traiam seus filhos.
Que o ciúme não mate a certeza do AMOR entre os dois.
Que no seu firmamento a estrela que tem maior brilho.
Seja a firme esperança de um céu aqui mesmo e depois.*

Pe. Zezinho

*Dedico esta tese aos meus pais
Paulo e Cecília e aos meus irmãos Myrian e Matheus
por todo incentivo e apoio incondicional. Amo Vocês!*

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado o dom da vida e me colocado no seio de uma família que preza acima de tudo o AMOR, a UNIÃO e o RESPEITO, sentimentos que fizeram de mim o que sou hoje.

À minha família, meus pais Paulo e Cecília Favaro, por todos os ensinamentos e valores a mim passados desde criança e aos meus irmãos Myrian e Matheus Favaro que sempre estiveram ao meu lado.

À Prof^ª. Dr^ª. Adriana Vitorino Rossi pelo apoio, incentivo, confiança e respeito em todas as etapas deste trabalho e pelos ensinamentos que permitiram meu amadurecimento profissional.

Um agradecimento especial à Acácia Adriana Salomão, a técnica e amiga dedicada e atenciosa, pelas diversas contribuições e suporte técnico na realização deste trabalho, além dos momentos de diversão com essa pessoa única e ao meu “irmão japonês” Gustavo Giraldi Shimamoto, por toda amizade e companheirismo, além do apoio na realização de atividades experimentais desenvolvidas para esta Tese.

A toda direção, aos professores e funcionários do Instituto de Química e da Faculdade de Tecnologia da UNICAMP, que conviveram comigo durante os semestres os quais participei do Programa de Estágio Docente do grupo A (PED A). Especialmente aos professores doutores que foram meus supervisores durante todos esses semestres, Maria Aparecida Carvalho de Medeiros, José Alberto Fracassi da Silva, Ljubica Tasic, Adalberto Bono Maurizio Sacchi Bassi, Edvaldo Sabadini e Cláudio Francisco Tormena. Agradeço imensamente por todos os ensinamentos, conselhos e incentivos recebidos durante esse período. MUITO OBRIGADA!

Aos professores doutores, Jarbas José Rodrigues Rohwedder, Matthieu Tubino e Paulo José Samenho Moran por suas importantes contribuições por ocasião de meu Exame de Qualificação de Área. E aos professores doutores José Alberto Fracassi da Silva e Dosil Pereira de Jesus por disponibilizar o equipamento para análise de eletroforese capilar e a estudante Aline Ferreira Mora por todo auxílio na realização das análises.

Às minhas irmãs de coração Vivi e Mari pela amizade e cumplicidade e por entender os momentos de ausência.

Aos meus amigos, Ricardo e Adriana, Daniel, Rafael e Cintia; Fernando e Patrícia, Daniele, Paloma e Mariana; pela amizade, paciência e momentos de descontração que abrandaram os momentos de cansaço físico e mental.

E a todos os membros e ex-membros do GPQUAE que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho. Em especial, à amiga Patrícia Sampaio, que além da amizade, me apoiou no fornecimento de resultados e dados que auxiliaram na discussão desta Tese.

MUITO OBRIGADA!!!

CURRÍCULO DA AUTORA

- **Mestrado em Química Analítica**

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas-SP *Conclusão:* 01/2008

- **Graduação – Bacharelado em Química**

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

- **Graduação – Bacharelado em Química Tecnológica**

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

Trabalhos científicos apresentados em congressos

- “Estudo por PCA para avaliar tendências da copigmentação de antocianinas em solução com carboidratos em diferentes valores de pH”, no 16º Encontro Nacional de Química Analítica, 23 a 26/outubro/2011.
- “Quantificação de Antocianinas em extratos de frutas com medidas colorimétricas em dispositivo portátil”, no 16º Encontro Nacional de Química Analítica, 23 a 26/outubro/2011.
- “Classificação de Verduras e Legumes como Fontes de Antocianinas por Análise de Componentes Principais e Medidas de Reflectância”, na 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 23 a 26/maio/2011.
- “Exploração da propriedade complexante das antocianinas para detecção e quantificação de alumínio”, na 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 23 a 26/maio/2011.
- “Reconhecimento de padrão do envelhecimento de extratos de antocianinas com métodos quimiométricos supervisionados”, na 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 28 a 31/maio/2010.
- “Análise de Componentes Principais e K-vizinho mais próximo na identificação de solventes extratores de antocianinas”, na 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 28 a 31/maio/2010.
- “Estudo por Análise de Componentes Principais de tendências de comportamento da estabilidade de antocianinas aplicadas em papel”, na 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 28 a 31/maio/2010.
- “Quantificação de antocianinas em *Fragaria x ananassa* Duch utilizando diferentes métodos espectrofotométricos”, no 15º Encontro Nacional de Química Analítica e 3º Congresso Iberoamericano de Química Analítica, 18 a 21/outubro/2009.
- “Identificação de fontes de antocianinas a partir de dados de cromatografia líquida de alta eficiência com tratamento quimiométrico”, no 15º Encontro Nacional de Química Analítica e 3º Congresso Iberoamericano de Química Analítica, 18 a 21/outubro/2009.
- “Estudo da aplicação de métodos simplificados para a quantificação das antocianinas de jussara (*Euterpe edulis*)”, no 15º Encontro Nacional de Química Analítica e 3º Congresso Iberoamericano de Química Analítica, 18 a 21/outubro/2009.
- “Classificação de fontes de antocianinas por Análise de Componentes Principais e KNN”, na 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 30/maio a 02/junho/2009.
- “Quantificação total de antocianinas de frutas típicas brasileiras por CLAE com uso de padrão de cianidina-3-glicosídeo” na 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008.

Trabalhos científicos completos apresentados em congressos

- “Sorvete da Ciência: Experimentação contextualizada”, no VI Encontro Paulista de Pesquisa em Ensino de Química, 16 a 18/novembro/2011.
- “Iniciação Científica Júnior: Experimentação e Pesquisa Integrando o Ensino Médio e a Universidade”, no XV Encontro Nacional de Ensino de Química, 21 a 24/julho/2010.

Capítulo de livro

- “Jogo pedagógico que explora a propriedade indicadora de pH de extratos de antocianinas de espécies brasileiras”; Salomão, A. A.; Rossi, A. V.; Alves, A. S.; Shimamoto, G. G.; Favaro, M. M. A.; Coelho, T.B.; Organização Sociedade Brasileira de Química, A Química Perto de Você: Experimentos de Baixo Custo para a Sala de Aula do Ensino Fundamental e Médio, Cabeça de Papel Projetos e Design LTDA, São Paulo, 1ª Edição, 2010.

Experiência Acadêmica

- Programa de Estágio Docente A da UNICAMP (PED A) de 2009 a 2012.

Banca de Comissão Julgadora

- XVIII Congresso Interno de Iniciação Científica da UNICAMP em 22 e 23/setembro/2010.

Palestras Ministradas

- “Antocianinas e Suas Aplicações”, 2011, Faculdade de Educação – UNICAMP.
- “Quimiometria para Identificação de Fontes e Parâmetros de Qualidade de Extratos Vegetais”, 2010, Faculdade de Educação – UNICAMP.
- “Obtenção de Extratos de Antocianinas de Fontes Naturais e suas Aplicações”, 2010, Universidades de Sorocaba – UNISO.
- “Antocianinas”, 2009, Faculdade de Educação – UNICAMP.
- “Antocianinas: Corantes naturais de crescente interesse industrial”, 2008, Faculdade de Educação – UNICAMP.

Atividades Extra-Curriculares: Organização de Eventos

- Membro da Comissão Organizadora do “Simpósio de Profissionais do Ensino de Química – SIMPEQ e SIMPEQuinho”, desde 2003.
- Membro da Equipe do “III Química em Ação”, 2011.

Para maiores detalhes, consultar Currículo Lattes

RESUMO

“EXPLORAÇÃO DE DADOS MULTIVARIADOS DE FONTES E EXTRATOS DE ANTOCIANINAS UTILIZANDO ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS E MÉTODO DO VIZINHO MAIS PRÓXIMO”

Antocianinas (ACYS) são corantes naturais responsáveis pela coloração de frutas, hortaliças, flores e grãos. Novas perspectivas de usos de antocianinas em diversos segmentos industriais estimulam estudos analíticos para sistematizar a identificação e a classificação de fontes e extratos desses corantes. Neste trabalho foram utilizadas fontes de ACYS como frutas típicas brasileiras: amora (*Morus nigra*), amora preta (*Rubus* sp), jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*), jabolão (*Syzygium cumini*), jussara (*Euterpe edulis* Mart.), morango (*Fragaria x ananassa* Duch) e uva (*Vitis vinífera* e *Vitis vinífera* L. 'Brasil'); hortaliças: alface roxa (*Lactuca sativa*), berinjela (*Solanum melongena*), cebola roxa (*Allium cepa*), rabanete (*Raphanus sativus*), repolho roxo (*Brassica oleraceae*) e flores: beijo-turco (*Impatiens walleriana*), gerânio (*Pelargonium hortorum* e *Pelargonium peltatum* L.), hibisco (*Hibiscus sinensis* e *Hibiscus syriacus*) e hortênsia (*Hydrangea macrophylla*). A literatura descreve diversas técnicas para análise de ACYS em vegetais e seus extratos, com destaque para cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), espectrometria de massas (MS) e espectrofotometria (UV-VIS), sendo que todas elas foram aplicadas neste trabalho, incluindo-se espectrofotometria de reflectância e a técnica de eletromigração em capilares cromatografia eletrocínética micelar (MEKC). As ferramentas quimiométricas utilizadas no tratamento dos dados foram análise de componentes principais (PCA) e método do vizinho mais próximo (KNN). Os modelos quimiométricos de classificação obtidos apresentaram-se robustos com erros de previsão de menos de 30 % sendo possível identificar as fontes de ACYS, o solvente extrator, a idade dos extratos e dados sobre sua estabilidade e condições de armazenamento. Os resultados apontaram que dados obtidos de técnicas analíticas simples como espectrofotometria de absorção e sem necessidade de preparo de amostra como reflectância difusa na região do visível são comparáveis a resultados de técnicas mais sofisticadas e caras como HPLC e MEKC e até superam o potencial de algumas informações obtidas por MS.

ABSTRACT

“EXPLORING MULTIVARIATE DATA OF SOURCES AND EXTRACTS OF ANTHOCYANINS USING PRINCIPAL COMPONENTS ANALYSIS AND METHOD OF NEAREST NEIGHBOR”

Anthocyanins (ACYS) are natural dyes responsible for color in fruits, vegetables, flowers and grains. New perspectives for use of anthocyanins in various industries stimulate analytical studies to systematize the identification and classification of sources and extracts of these dyes. In this work, typical Brazilian fruits: mulberry (*Morus nigra*), blackberry (*Rubus sp*), jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*), jambolan (*Syzygium cumini*), jussara fruit (*Euterpe edulis Mart.*), strawberry (*Fragaria x ananassa Duch*) and grapes (*Vitis vinifera* and *Vitis vinifera L. 'Brazil'*); vegetables: red lettuce (*Lactuca sativa*), eggplant (*Solanum melongena*), purple onion (*Allium cepa*), radish (*Raphanus sativus*), red cabbage (*Brassica oleracea*) and flowers, Busy Lizzie (*Impatiens walleriana*), geranium (*Pelargonium hortorum* and *Pelargonium peltatum L.*), hibiscus (*Hibiscus sinensis* and *Hibiscus syriacus*) and hydrangea (*Hydrangea macrophylla*) were used as sources of ACYS. The literature describes several techniques for analyzing ACYS in vegetables and their extracts, with emphasis on high performance liquid chromatography (HPLC), mass spectrometry (MS) and spectrophotometry (UV-VIS). All of these techniques were applied in this work, including reflectance spectrophotometry and micellar electrokinetic chromatography (MEKC) which is one of the capillary electromigration techniques. The chemometric tools used in data handling were the principal component analysis (PCA) and the K-nearest neighbor method (KNN). The chemometric classification models obtained are robust with predict errors of less than 30 %. It is possible to identify the sources of ACYS, the extractor solvent, the age of the extracts, their stability and storage conditions. The results show that data obtained from simple analytical techniques such as absorption spectroscopy and diffuse reflectance in the visible region (sample preparation is not needed) are comparable to results of those obtained from sophisticated and expensive techniques such as HPLC and MEKC. These techniques also surpass the information obtained by MS.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas	xxiii
Índice de Tabelas	xxv
Índice de Figuras	xxvii
PREFÁCIO	01
Capítulo 1: INTRODUÇÃO	05
1.1. Antocianinas	07
1.1.1. A Química das Antocianinas	07
1.1.2. Estabilidade das Antocianinas	08
1.1.3. Propriedades das Antocianinas	12
1.2. Fontes de Antocianinas	17
1.2.1. Frutas	18
1.2.2. Flores	25
1.2.3. Hortaliças	27

1.3. Técnicas utilizadas para análise de ACYS	31
1.4. Quimiometria	33
1.4.1. Organização dos dados	33
1.4.2. Pré-processamento dos dados	34
1.4.2.1. Normalização	35
1.4.2.2. Alisamento	36
1.4.2.3. Centrar os dados na média	36
1.4.2.4. Autoescalamento	37
1.4.3. Métodos Quimiométricos	38
1.4.3.1. Métodos de aprendizagem não supervisionada	38
1.4.3.1.a. Análise de Agrupamentos Hierárquica (HCA)	38
1.4.3.1.b. Análise de Componentes Principais (PCA)	40
1.4.3.2. Método de aprendizagem supervisionada	42
1.4.3.2.a. Método do vizinho mais próximo (KNN)	43
1.4.3.2.b. Modelo independente de similaridade utilizando componentes principais (SIMCA)	44

Capítulo 2: OBJETIVOS	47
Capítulo 3: DESENVOLVIMENTO	51
3.1. Fontes de Antocianinas	53
3.2. Reagentes, soluções de pH conhecido, materiais e equipamentos	53
3.2.1. Reagentes	54
3.2.2. Soluções de pH conhecido ajustadas com pHmetro	54
3.2.3. Materiais e equipamentos	54
3.3. Procedimentos Experimentais	55
3.3.1. Extração	55
3.3.2. Obtenção de espectros eletrônicos de absorção	56
3.3.3. Obtenção de espectros eletrônicos de reflectância difusa de flores e hortaliças ...	56
3.3.4. Obtenção de cromatogramas por HPLC de extratos de frutas	56
3.3.5. Obtenção de dados de MEKC com extratos de frutas	57
3.3.6. Obtenção de espectros de MS dos extratos de frutas	57

3.3.7. Estudo do perfil de envelhecimento de extratos de ACYS de jabuticaba a partir de espectros eletrônicos de absorção	59
3.3.8. Estudo do efeito de solventes para extratos de uva a partir de espectros eletrônicos de absorção	59
3.3.9. Processamento dos dados.....	59
Capítulo 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
4.1. Identificação das espécies estudadas como fonte de ACYS	63
4.1.1. Dados de espectros eletrônicos de absorção de extratos aquosos de frutas	63
4.1.2. Dados de espectros eletrônicos de absorção de extratos alcoólicos de frutas	66
4.1.3. Dados de espectros eletrônicos de absorção de extratos alcoólicos de flores	69
4.1.4. Dados de espectros eletrônicos de absorção de extratos alcoólicos de hortaliças ...	71
4.1.5. Dados de espectros eletrônicos de reflectância difusa de flores.....	76
4.1.6. Dados de espectros eletrônicos de reflectância difusa de hortaliças.....	79
4.1.7. Dados de cromatogramas de extratos de frutas obtidos por HPLC.....	82
4.1.8. Dados de eletroferogramas de extratos de frutas obtidos por MEKC.....	84

4.1.9. Dados de espectros de extratos de frutas obtidos por MS.....	88
4.2. Estudo de perfil de envelhecimento de extratos de ACYS de jabuticaba a partir de espectros eletrônicos de absorção.....	92
4.3. Estudo de efeito de solventes para extratos de uva a partir de espectros eletrônicos de absorção.....	94
Capítulo 5: CONCLUSÕES.....	99
Capítulo 6: TRATAMENTO DE RESÍDUOS.....	103
Capítulo 7: PERSPECTIVAS.....	107
Capítulo 8: REFERÊNCIAS.....	111
ANEXO I: Conjunto dos dados obtidos de cromatogramas das amostras de extratos de frutas.....	135
ANEXO II: Conjunto dos dados obtidos de eletroferogramas das amostras de extratos de frutas.....	139
ANEXO III: Conjunto dos dados obtidos de espectros de massas das amostras de extratos de frutas.....	141
ANEXO IV: Conjunto dos dados obtidos de espectros de massas das amostras de extratos de frutas purificados e não purificados.....	143
ANEXO V: Conjunto dos dados obtidos de espectros de massas das amostras de extratos aquosos e alcoólicos (etanol 94 %) de frutas.....	145

LISTA DE ABREVIATURAS

ACYS: Antocianinas

CE: Eletroforese Capilar (*Capillary Electrophoresis*)

ESI: Ionização por *Eletrospray* (*Electrospray Ionization*)

FA: Análise de Fatores (*Factor Analysis*)

FAO: *Food and Agriculture Organization*

GPQUAE: Grupo de Pesquisa em Química Analítica e Educação

HCA: Análise de Agrupamentos Hierárquica (*Hierarchical Cluster Analysis*)

HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*High Liquid Performance Chromatography*)

KNN: Método do Vizinho mais Próximo (*K-Nearest Neighbor*)

LDL: Lipoproteína de baixa densidade

MECC: Cromatografia Capilar Eletrocinética Micelar (*Micellar Electrokinetic Capillary*)

MEKC: Cromatografia Eletrocinética Micelar (*Micellar Electrokinetic Chromatography*)

MS: Espectrometria de Massas (*Mass Spectrometry*)

mUA: miliunidade de área

ORAC: Capacidade de Absorção de Oxigênio Radical

PC: Componentes Principais (*Principal Components*)

PCA: Análise de Componentes Principais (*Principal Component Analysis*)

ROS: Espécies Reativas de Oxigênio

SDS: Dodecil Sulfato de Sódio (*Sodium Dodecyl Sulfate*)

SIMCA: Modelo Independente de Similaridade utilizando Componentes Principais (*Soft Independent Modeling of Class Analogies*)

SISBIO: Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

T_{amb}: Temperatura ambiente

T_{refrig}: Temperatura sob refrigeração

TQ: Triplo Quadrupolo

UA: Unidade de área

UPLC-MS: Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência-Espectrometria de Massas (*Ultra Performance Liquid Chromatography*)

UV-VIS: Ultravioleta-Visível

WHO: *World Health Organization*

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Fontes de ACYS utilizadas no trabalho com seus nomes populares e científicos...17
Tabela 2: ACYS identificadas nas amostras de jabuticaba e refugo (<i>Myrciaria cauliflora</i>).....19
Tabela 3: ACYS identificadas nas amostras de amora (<i>Morus nigra</i>).....20
Tabela 4: ACYS identificadas nas amostras de amora preta (<i>Rubus sp</i>).....20
Tabela 5: ACYS identificadas nas amostras de jambolão (<i>Syzygium cumini</i>).....21
Tabela 6: ACYS identificadas nas amostras de jussara (<i>Euterpe edulis Mart</i>).....22
Tabela 7: ACYS identificadas nas amostras de morango (<i>Fragaria x ananassa Duch</i>).....23
Tabela 8: ACYS identificadas nas amostras de uvas (<i>Vitis vinífera</i> e <i>Vitis vinífera L. 'Brasil'</i>).23

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Levantamento bibliográfico de publicações sobre antocianinas de 2000 a março de 2012.....	03
Figura 2: Estrutura genérica de algumas antocianinas.....	07
Figura 3: Estruturas dos principais flavonóides.....	08
Figura 4: Transformações estruturais de ACYS com mudanças no pH da solução.....	09
Figura 5: Modelos hipotéticos dos processos de associação e copigmentação inter- e intramolecular de antocianinas adaptado de Falcão <i>et al.</i> , 2003.....	11
Figura 6: Foto ilustrativa dos frutos de jabuticaba (<i>Myrciaria cauliflora</i>).....	18
Figura 7: Foto ilustrativa da amora (<i>Morus nigra</i>).....	19
Figura 8: Foto ilustrativa da amora preta (<i>Rubus sp</i>).....	20
Figura 9: Fotos ilustrativa do jambolão (<i>Syzygium cumini</i>).....	21
Figura 10: Foto ilustrativa da palmeira jussara (<i>Euterpe edulis</i> Mart.) e seus frutos.....	22
Figura 11: Foto ilustrativa do morango (<i>Fragaria × ananassa</i> Duch).....	22
Figura 12: Foto ilustrativa das espécies de uvas estudadas (<i>Vitis vinífera</i> (a) e <i>Vitis vinífera</i> L. 'Brasil' (b)).....	23
Figura 13: Foto ilustrativa das flores de beijo turco (<i>Impatiens walleriana</i>).....	25
Figura 14: Foto ilustrativa das flores das espécies de gerânio estudadas (<i>Pelargonium hortorum</i> (a) e <i>Pelargonium peltatum</i> L (b)).....	25

Figura 15: Foto ilustrativa das flores das espécies de hibisco estudadas (<i>Hibiscus sinensis</i> (a) e <i>Hibiscus syriacus</i> (b)).....	26
Figura 16: Foto ilustrativa das flores de hortênsias (<i>Hydrangea macrophylla</i>).....	26
Figura 17: Foto ilustrativa da alface roxa (<i>Lactuca sativa</i>).....	27
Figura 18: Foto ilustrativa do repolho roxo (<i>Brassica oleraceae</i>).....	27
Figura 19: Foto ilustrativa da berinjela (<i>Solanum melongena</i> L.).....	28
Figura 20: Foto ilustrativa da cebola roxa (<i>Allium cepa</i>).....	28
Figura 21: Foto ilustrativa do rabanete (<i>Raphanus sativus</i>).....	29
Figura 22: Organização dos dados químicos obtidos numa análise em forma de matriz.....	34
Figura 23: Cromatogramas com mesma concentração de dois compostos com variação de volume de injeção nas replicatas. Dados originais (a) e normalizados (b) adaptado de BEEBE <i>et al.</i> , 1998.....	35
Figura 24: Espectro antes (a) e após (b) aplicar a ferramenta de alisamento.....	36
Figura 25: Representação gráfica da centralização na média dos dados.....	37
Figura 26: Dados brutos para os experimentos ilustrando as diferentes escalas de intensidade (a) das variáveis (1-6) e (b) apenas as variáveis (7-11) adaptado de BEEBE <i>et al.</i> , 1998.....	37
Figura 27: Conjunto de cinco amostras e seu referido dendrograma utilizando o agrupamento simples.....	39
Figura 28: Decomposição da matriz X de m amostras com n variáveis em outras matrizes menores, de escores T (amostras), de pesos P (peso das variáveis) e a matriz de resíduos E.....	40

Figura 29: Gráfico de <i>loadings</i> para PC1 de um conjunto de dados de espectros eletrônicos de absorção de extratos de frutas.....	41
Figura 30: Gráfico de resíduos e distância de Mahalanobis de um conjunto de dados de espectros eletrônicos de absorção de extratos de frutas.....	42
Figura 31: Exemplo de reconhecimento de padrão para as amostras X, Z e Y pelo método de KNN adaptado de BEEBE <i>et al.</i> , 1998.....	43
Figura 32: Exemplo tridimensional de SIMCA.....	45
Figura 33: Esquema para medidas de reflectância difusa: (a) amostra de berinjela, (b) acessório de reflectância e (c) orifício de saída e entrada de luz do dispositivo.....	56
Figura 34: Organograma das etapas de preparação das amostras para análises por UPLC-MS.....	58
Figura 35: Conjunto de espectros eletrônicos de absorção das amostras de extratos aquosos de frutas.....	64
Figura 36: Gráficos de escores para PC2 × PC1 de extratos aquosos das frutas em estudo....	64
Figura 37: Gráfico de <i>loadings</i> para PC2 × PC1 de extratos aquosos das frutas em estudo.....	65
Figura 38: Conjunto de espectros eletrônicos de absorção das amostras de extratos alcoólicos de frutas.....	66
Figura 39: Gráfico de escores para PC3 × PC1 de extratos alcoólicos das frutas em estudo.....	67
Figura 40: Gráfico de <i>loadings</i> para PC3 × PC1 de extratos alcoólicos das frutas em estudo....	68

Figura 41: Conjunto de espectros eletrônicos de absorção obtidos para as amostras de extratos alcoólicos das flores estudadas.....	69
Figura 42: Gráfico de escores para PC4 × PC2 de extratos alcoólicos em pH 2,0 das amostras de flores.....	70
Figura 43: Gráfico de <i>loadings</i> para PC4 × PC2 de extratos alcoólicos das flores em estudo....	71
Figura 44: Espectros eletrônicos de absorção típicos obtidos para as amostras de extratos de hortaliças nas duas condições estudadas.....	72
Figura 45: Conjunto de espectros eletrônicos de absorção das amostras de extratos alcoólicos brutos (a) e acidificados (b) de hortaliças.....	73
Figura 46: Gráfico de escores para PC4 × PC1 de extratos alcoólicos brutos e acidificados das amostras de hortaliças estudadas.....	74
Figura 47: Gráfico de escores para PC4 × PC1 de extratos alcoólicos das amostras de hortaliças com separação das condições de diluição dos extratos.....	75
Figura 48: Gráfico de <i>loadings</i> para PC4 × PC1 de extratos das hortaliças em estudo.....	76
Figura 49: Espectros eletrônicos de reflectância difusa das amostras de flores.....	77
Figura 50: Gráfico de escores para PC2 × PC1 dos espectros eletrônicos de reflectância difusa das amostras de flores estudadas.....	78
Figura 51: Gráfico de <i>loadings</i> para PC2 × PC1 dos espectros eletrônicos de reflectância difusa das amostras de flores estudadas.....	79
Figura 52: Espectros eletrônicos de reflectância difusa obtidos para as amostras de hortaliças em estudo.....	80

Figura 53: Gráfico de escores para PC2 × PC1 dos espectros eletrônicos de reflectância difusa das amostras de hortaliças estudadas.....	80
Figura 54: Gráfico de escores para PC2 × PC1 dos espectros eletrônicos de reflectância difusa das amostras de rabanete, berinjela e cebola roxa.....	81
Figura 55: Conjunto de cromatogramas obtidos para as amostras de frutas em estudo.....	82
Figura 56: Gráficos de escores para PC2 × PC5 de extratos das frutas em estudo.....	83
Figura 57: Gráfico de <i>loadings</i> para PC2 × PC5 de extratos das frutas em estudo.....	84
Figura 58: Eletroferograma para amostra de extrato bruto de jussara.....	85
Figura 59: Conjunto de eletroferogramas das amostras de extratos de frutas estudadas.....	86
Figura 60: Gráfico de escores para PC4 × PC1 de extratos de jambolão, jaboticaba, uva e jussara.....	87
Figura 61: Gráfico de <i>loadings</i> para PC4 × PC1 de extratos das frutas em estudo.....	87
Figura 62: Parte do conjunto de espectros de massas obtidos para as amostras de extratos de frutas em estudo.....	88
Figura 63: Parte do conjunto de espectros de massas obtidos para as amostras de extratos de frutas purificados e sem purificação.....	89
Figura 64: Parte do conjunto de espectros de massas obtidos para as amostras de extratos de frutas obtidos em água e em etanol 94 %.....	89
Figura 65: Gráfico de escores para PC2 × PC1 de extratos das frutas em estudo para identificação das fontes de ACYS.....	90

Figura 66: Gráfico de escores para PC2 × PC1 de extratos das frutas em estudo para avaliação da purificação dos extratos.....	91
Figura 67: Gráfico de escores para PC2 × PC1 de extratos das frutas em estudo para avaliar os solventes extratores.....	91
Figura 68: Conjunto de espectros eletrônicos para as amostras de extratos de jabuticaba.....	92
Figura 69: Gráfico de escores para PC2 × PC1 de extratos de jabuticaba em estudo.....	93
Figura 70: Gráfico de <i>loadings</i> para PC2 × PC1 de extratos de jabuticaba.....	94
Figura 71: Conjunto de espectros eletrônicos obtidos para os extratos de uva.....	95
Figura 72: Gráfico de escores para PC2 × PC1 de extratos de uva.....	96
Figura 73: Gráfico de <i>loadings</i> para PC2 × PC1 de extratos de uva.....	96

PREFÁCIO

Um levantamento bibliográfico realizado a partir do ano de 2000 em publicações na base de dados *Web of Science* (WEB OF KNOWLEDGE, 2012), indicou o aumento no número de estudos envolvendo os compostos conhecidos como ANTOCIANINAS (ACYS), que são o foco principal desta tese. As palavras-chave utilizadas para esse levantamento foram *anthocyanin* e *anthocyanins* e os números obtidos estão representados na Figura 1.

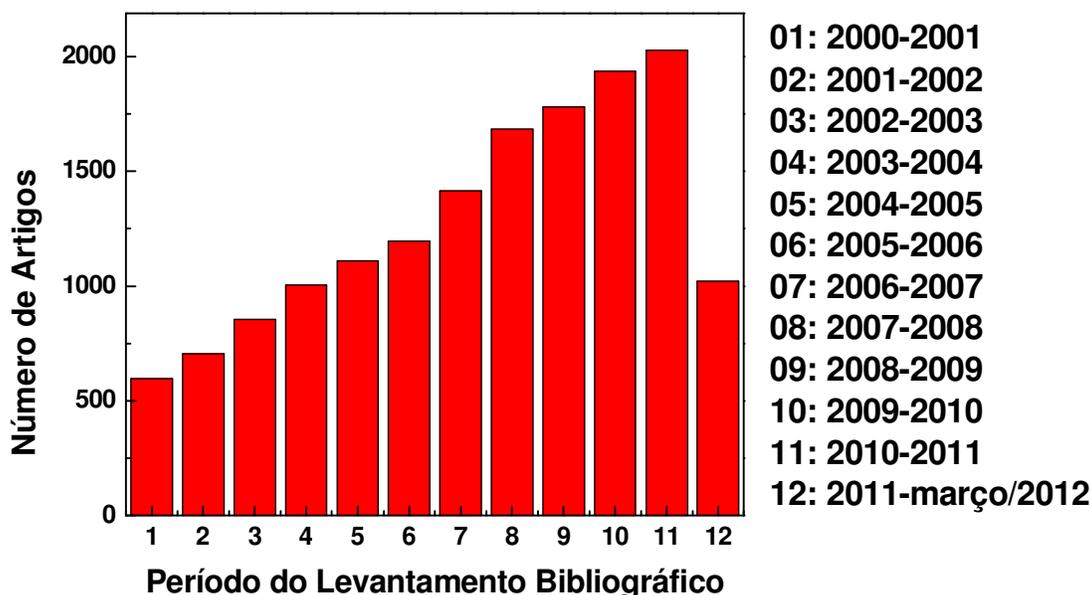


Figura 1. Levantamento bibliográfico de publicações sobre antocianinas de 2000 a março de 2012 (WEB OF KNOWLEDGE, 2012).

O levantamento retornou artigos de diversas áreas como Química, Engenharia de Alimentos, Biologia e Medicina, tratando de estudos de identificação e quantificação de ACYS em diversas fontes de diferentes locais, além de estudos que abordam interações metabólicas e as propriedades terapêuticas desses compostos. O crescente interesse no uso de ACYS em diversos segmentos industriais motivou o desenvolvimento do trabalho descrito nesta tese, para obter informações sobre a identificação e qualidade de fontes e extratos de ACYS com aplicação de métodos quimiométricos a dados experimentais obtidos por diversas técnicas.

Para fins de organização do texto, as siglas em inglês serão mantidas, pois são termos muito utilizados e conhecidos da comunidade química.

O texto da tese inicia-se com uma breve revisão que aborda as principais características estruturais e químicas das ACYS, além de informações sobre suas possíveis propriedades terapêuticas quando inseridas na dieta alimentar de animais e seres humanos, o que é extensamente estudado e discutido por diversos autores (Capítulo 1, Item 1.1). Em seguida apresentam-se as fontes de ACYS (Capítulo 1, Item 1.2) e as técnicas analíticas utilizadas para obtenção de dados deste trabalho (Capítulo 1, Item 1.3). Posteriormente, a tese traz uma breve revisão de métodos quimiométricos levando em consideração a organização e pré-processamento dos dados analíticos, análise exploratória dos dados e obtenção dos modelos de previsão (Capítulo 1, Item 1.4).

O Capítulo 2 traz os objetivos do trabalho. O Capítulo 3 descreve o desenvolvimento de todo o trabalho e foi subdividido em: 3.1. Descrição da forma de obtenção e armazenamento das fontes de ACYS, além dos números das autorizações obtidas no Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) para atividades com finalidade científica de coleta e transporte de material botânico; 3.2. Descrição dos reagentes, soluções, materiais e equipamentos utilizados; 3.3. Descrições dos procedimentos experimentais.

O Capítulo 4, Resultados e Discussão, foi subdividido em três itens principais, sendo eles, 4.1. Identificação das espécies estudadas como fonte de ACYS, 4.2. Estudo de perfil de envelhecimento de extratos de ACYS e 4.3. Estudo de efeito de solventes extratores.

O Capítulo 5 traz as conclusões do trabalho, seguido do Capítulo 6 que descreve os procedimentos adotados para o tratamento dos resíduos gerados durante a execução do trabalho e do Capítulo 7 que indica possíveis perspectivas para continuação do trabalho. E por fim o Capítulo 8 traz as referências bibliográficas que fundamentaram este trabalho.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1.1. Antocianinas

1.1.1. A Química das Antocianinas

Diversas frutas, flores e hortaliças apresentam em sua composição, corantes da classe dos flavonóides, chamados antocianinas (ACYS) (HARBORNE, 1994). Atualmente, sabe-se que estes pigmentos são responsáveis por cores como rosa, vermelha, violeta e azul de frutas como jabuticaba e amora; de flores como hortênsia e hibisco, de hortaliças como alface roxa, berinjela e rabanete (CLEVENGER, 1971; FOSSEN e ANDERSEN, 2003; KAMMERER *et al.*, 2004). ACYS têm papel importante para o desenvolvimento dos vegetais, pois suas cores fortes são úteis para atrair agentes polinizadores e dispersores de sementes, além disso, protegem os tecidos da planta de processos oxidativos induzidos pela exposição à radiação ultravioleta, principalmente nas fases iniciais de crescimento ((COUTO *et al.*, 1998; HE e GIUSTI, 2010).

ACYS ocorrem na natureza como glicosídeos de antocianidinas e apresentam grupos hidroxila nas posições 3, 5 e 7. Somente nas antocianinas, uma ou mais destas hidroxilas estão ligadas a açúcares, sendo os mais comuns: glicose e raminose, mas galactose, arabinose, xilose, rutinose, sambubiose ou dissacarídeos constituídos por esses açúcares também podem ser encontrados, sendo que essas moléculas de açúcar, por sua vez, podem estar ligadas a ácidos fenólicos como caféico, fenílico e vanílico. Os glicosídeos presentes nas moléculas de ACYS aumentam sua solubilidade, quando comparadas com as antocianidinas (FRANCIS, 1989; STINTZING *et al.*, 2002; TÜRKER e ERDOGDU, 2006; GRIS *et al.*, 2007). HE e GIUSTI (2007) descrevem que já foram identificadas mais de 635 diferentes ACYS. A estrutura genérica de algumas antocianinas está apresentada na Figura 2 (HARBORNE *et al.*, 1975; HARBORNE, 1994).

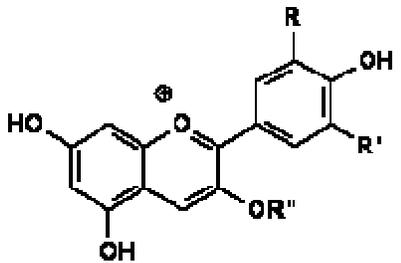
	Antocianina	Grupo R	Grupo R'	Grupo R''
	Cianidina-3-glicosídeo	OH	H	glicose
Delfinidina-3-glicosídeo	OH	OH	glicose	
Pelargonidina-3-glicosídeo	H	H	glicose	
Malvidina-3-glicosídeo	OCH ₃	OCH ₃	glicose	
Peonidina-3-glicosídeo	OCH ₃	H	glicose	

Figura 2. Estrutura genérica de algumas antocianinas (HARBORNE *et al.*, 1975; HARBORNE, 1994).

O grupo cromóforo com oito ligações duplas conjugadas carregadas positivamente é o responsável pela coloração das ACYS que apresentam coloração vermelha intensa em solução acidificada. O comprimento de onda de absorção máxima na região do espectro visível de soluções que contêm ACYS encontra-se geralmente entre 465 e 550 nm sendo que variações nesse comprimento de onda podem ser devidas a diferentes substituições em R, R' e R'' (Figura 2) (HE e GIUSTI, 2010).

ACYS juntamente com flavanas, flavanonas, flavonas, isoflavonas, flavonóis, entre outros (Figura 3) constituem a classe dos flavonóides que é uma das três importantes classes de agentes cromóforos, que incluem os carotenóides e as porfirinas (HARBORNE, 1994; LOPES *et al.*, 2000; BEHLING *et al.*, 2004).

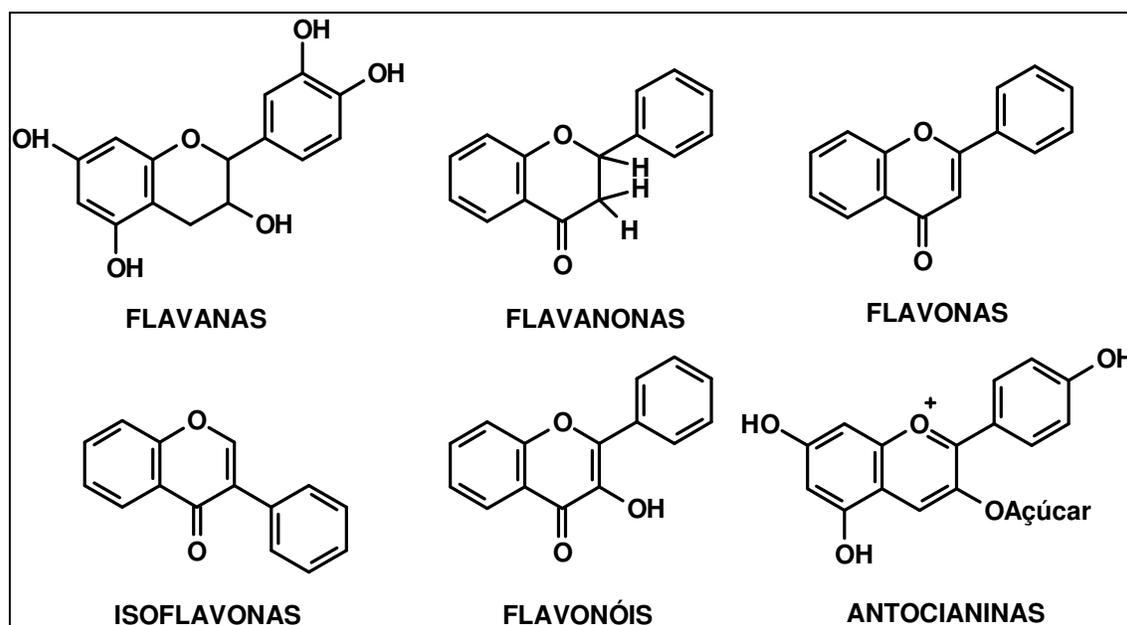


Figura 3. Estruturas dos principais flavonóides (HARBORNE, 1994; LOPES *et al.*, 2000; BEHLING *et al.*, 2004).

1.1.2. Estabilidade das Antocianinas

ACYS compõe a única subclasse dos flavonóides que sofrem transformações estruturais reversíveis em solução com a mudança de pH do meio (Figura 4). Em solução com pH < 2,0, predomina o cátion flavílico, que é a estrutura mais estável de ACYS. A medida que o valor de pH aumenta ocorrem as transformações estruturais apresentadas na Figura 4 levando a soluções com diferentes colorações.

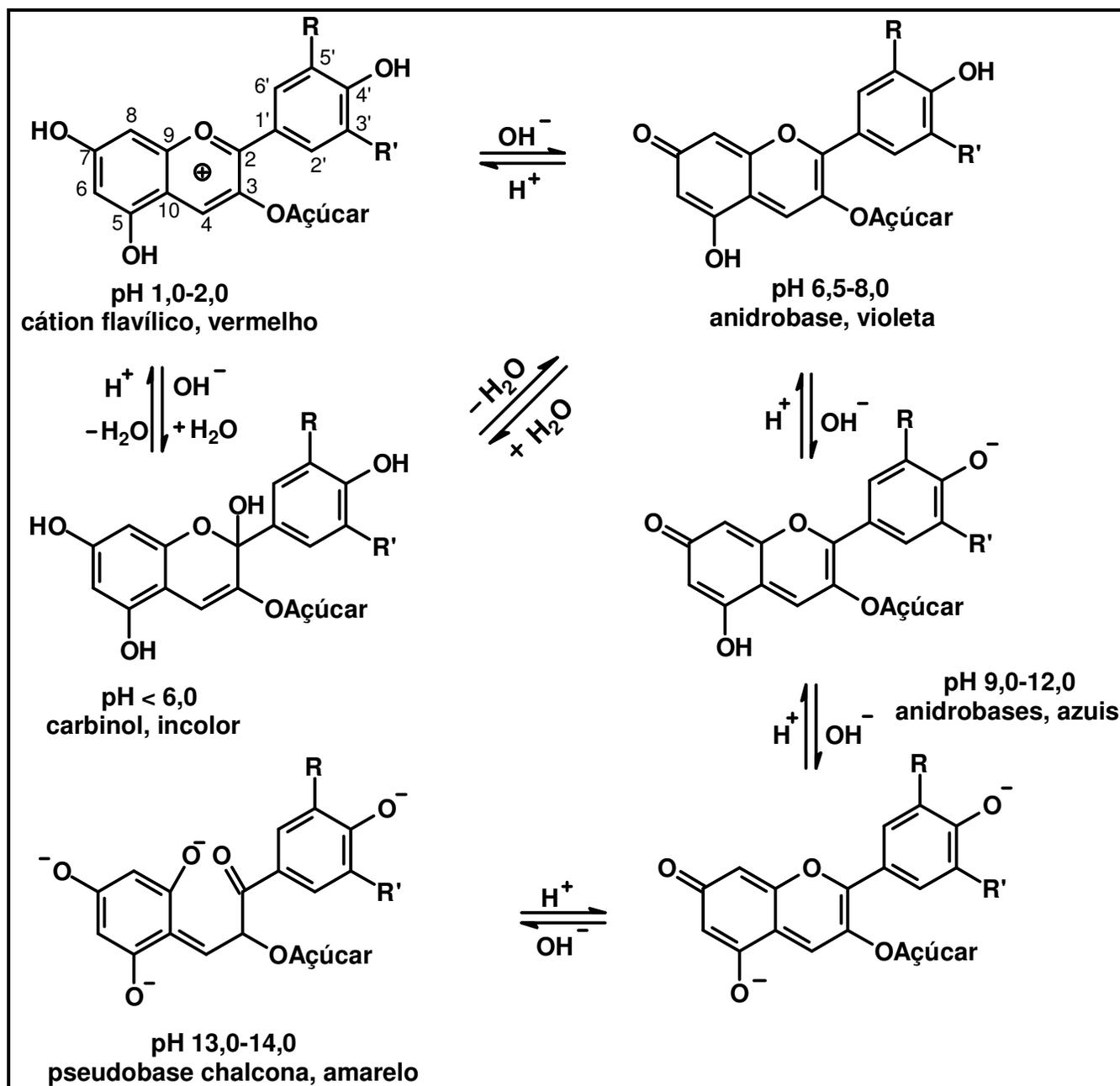


Figura 4. Transformações estruturais de ACYS com mudanças no pH da solução (BROUILLARD, 1982; TERCI e ROSSI, 2002).

A estabilidade de ACYS pode sofrer alteração com variações de temperatura e pH e sob ação de luz, oxigênio e enzimas específicas, além de outras substâncias como ácido ascórbico, açúcares, sulfitos, copigmentos e íons metálicos (HARBORNE *et al.*, 1975; JACKMAN *et al.*, 1987a; JACKMAN *et al.*, 1987b; MOURTZINOS *et al.*, 2008; MULINACCI *et al.*, 2008; CASTAÑEDA-OVANDO *et al.*, 2009; PETERSSON *et al.*, 2010; XU *et al.*, 2010a; CAVALCANTI *et al.*, 2011; FRANK *et al.*, 2012).

Controle rigoroso de temperatura é indispensável durante todo o processo de extração e armazenamento de ACYS, pois pode favorecer condições de geração de produtos de degradação geralmente de coloração marrom. A combinação de aumento da temperatura e presença de oxigênio parece ser o fator mais prejudicial na degradação de ACYS (JACKMAN *et al.*, 1987b; CAVALCANTI *et al.*, 2011).

A incidência de luz pode afetar a estabilidade das ACYS, pois acelera sua degradação através de processos fotoquímicos. Quando os extratos de ACYS são protegidos da luz a coloração desses extratos é preservada por um período maior. Estudos mostraram que extratos sofreram alteração na cor com 24 horas de armazenamento à temperatura e expostos a luz (CAVALCANTI *et al.*, 2011).

Normalmente, nas frutas, as enzimas e seus substratos localizam-se em compartimentos celulares distintos. Processos de extração de ACYS, que envolvem, por exemplo, maceração das frutas, promovem a destruição desses compartimentos e colocam as enzimas em contato com os compostos fenólicos, dando início a processos de oxidação que degradam as ACYS (KRIFI *et al.*, 2000; CHAOVANALIKIT e WROLSTAD, 2004; NUNES *et al.*, 2005; FANG *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2007; POZO-INSFRAN *et al.*, 2007).

Um dos mecanismos propostos para a degradação de ACYS envolve a oxidação de compostos fenólicos a quinonas, pela ação da enzima polifenol oxidase (PPO) presente em frutas. Esta enzima atua nas reações de ACYS e/ou na polimerização de quinonas, que produzem compostos de cor marrom, modificando, portanto, as características iniciais dos extratos (JAIN E SESHADRI, 1975; JACKMAN *et al.*, 1987b; SILVA e TASSARA, 2005; BARROS e STRINGHETA, 2006). Quanto mais compostos fenólicos estiverem presentes nos extratos, maior será a possibilidade de polimerização de ACYS (BOYLES e WROLSTAD, 1993). Na prática, a degradação de ACYS compromete a qualidade dos extratos e pode ser inferida a partir da quantificação de ACYS totais e visualmente, por sua coloração.

Diversas propostas para estabilização de ACYS vêm sendo estudadas e descritas na literatura, com destaque para o processo de encapsulamento e mecanismos de associação. O encapsulamento está relacionado com a imobilização e a incorporação de um composto ativo, no caso ACYS, dentro de partículas sólidas, conhecidas como microesferas, o que possibilita estabilizar e proteger esse composto (OIDTMANN *et al.*, 2012).

Nos processos de associação de ACYS com outros compostos, além da coloração das soluções, sua estabilidade também é afetada. Há quatro tipos de interações de associação: (1) auto-associação entre duas ou mais moléculas de ACYS, (2) copigmentação intermolecular, (3) copigmentação intramolecular e (4) quelação com metais como magnésio e alumínio. Na Figura 5 estão representadas as três primeiras interações (CASTAÑEDA-OVANDO *et al.*, 2009; CAVALCANTI *et al.*, 2011; VANKAR e SHUKLA, 2011).

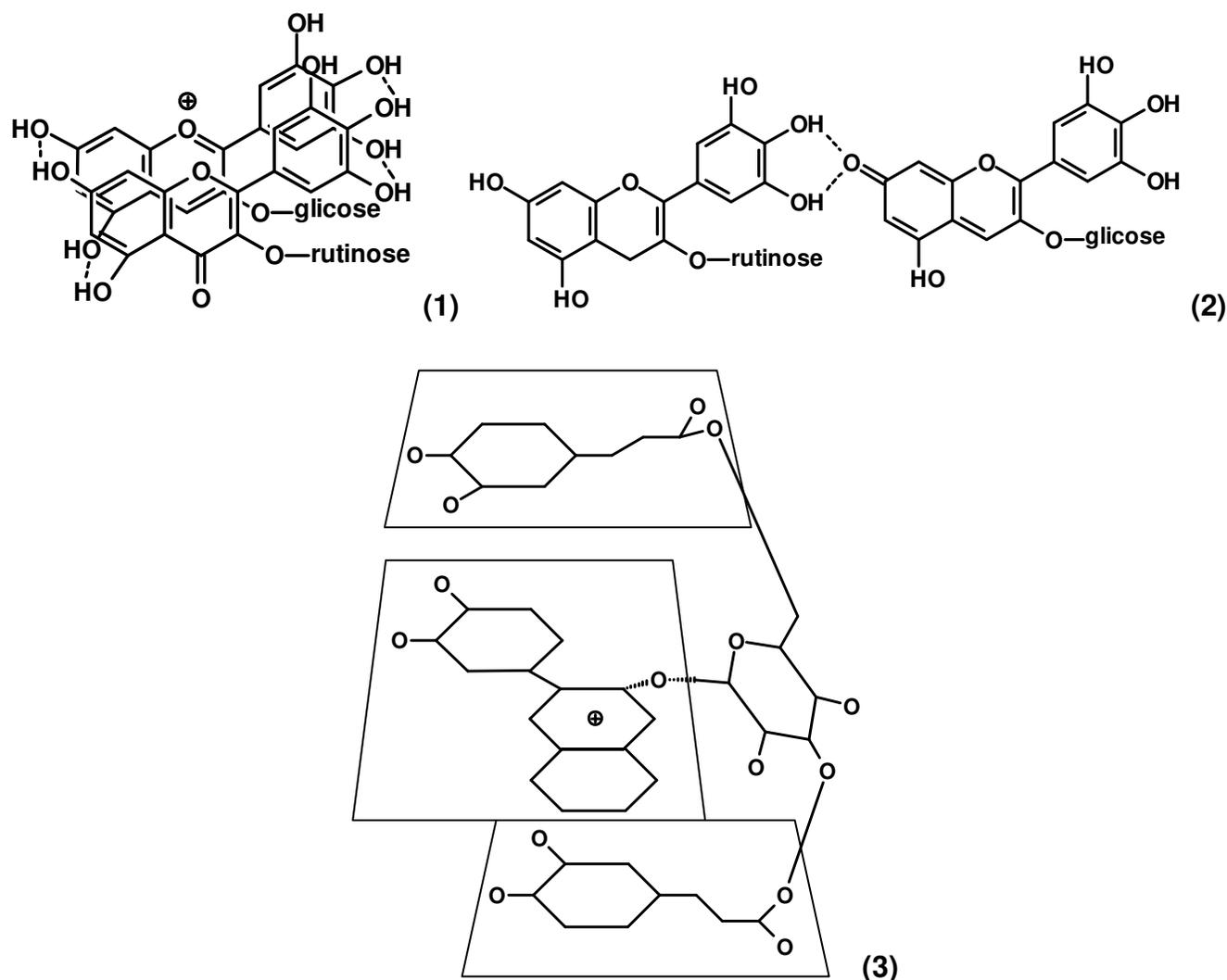


Figura 5. Modelos hipotéticos dos processos de (1) auto-associação e copigmentação (2) inter- e (3) intramolecular de antocianinas adaptado de FALCÃO *et al.*, 2003.

1.1.3. Propriedades das Antocianinas

Atualmente, os consumidores estão cada vez mais preocupados com o efeito adverso à saúde de corantes sintéticos presentes nos alimentos industrializados. Por exemplo, estudos de MCCANN e colaboradores (2007) indicaram que alguns corantes sintéticos comumente utilizados na indústria de alimentos quando misturados com benzoato de sódio na dieta alimentar podem causar hiperatividade em crianças de até 9 anos. Em busca de novas opções, vem surgindo propostas como a utilização de ACYS para substituir o corante vermelho número 40, que é o corante sintético mais utilizado (HE e GIUSTI, 2010).

ACYS são sempre lembradas como alternativas para corantes sintéticos, principalmente devido à sua baixa toxicidade e vêm sendo usadas como corantes especialmente na indústria de bebidas. Vale lembrar que a coloração de produtos alimentícios contribui para sua aceitabilidade e a indústria utiliza corantes para conferir ou restaurar a aparência de vários produtos. Tem sido notado crescente interesse para usar ACYS em outros segmentos industriais, como: cosmético, farmacêutico, além do alimentício. (WROLSTAD, 2004; HE e GIUSTI, 2010).

O consumo oral de ACYS, por animais e humanos, tem aumentado ao longo dos anos desde os tempos antigos e ainda não se encontrou nenhum relato de impacto negativo à saúde. As organizações internacionais *Food and Agriculture Organization* (FAO) e *World Health Organization* (WHO) avaliaram os efeitos toxicológicos de extratos contendo ACYS e reportaram que os extratos não possuem efeitos mutagênicos, teratogênicos e toxicidade aguda e de curto prazo (HE e GIUSTI, 2010). Ao contrário, há perspectivas de propriedades terapêuticas de ACYS, o que aumenta o interesse em sua aplicação como corantes (EIBOND *et al.*, 2004; RAMIREZ *et al.*, 2005; BALIGA *et al.*, 2011).

Espécies reativas de oxigênio (ROS), incluindo os radicais livres, são importantes para o sistema imunológico, sinalização celular e muitas outras funções do corpo. Entretanto se ROS são excessivamente produzidas, podem provocar dano celular, levando a doenças degenerativas, tais como inflamação, doenças cardiovasculares, câncer e envelhecimento e doenças neurodegenerativas como Parkinson e Alzheimer (HE e GIUSTI, 2010; PASCUAL-TERESA, *et al.*, 2010; CARTEA *et al.*, 2011).

As ACYS são poderosos antioxidantes *in vitro* e podem eliminar os radicais livres e interromper a reação em cadeia que é responsável pelo dano oxidativo. Um método de avaliação da capacidade antioxidante muito aceito é o ensaio de capacidade de absorção do oxigênio radical (ORAC) e foi aplicado para avaliar a atividade antioxidante de 14 ACYS. Dentre as ACYS estudadas, a cianidina 3-glicosídeo apresentou um valor de capacidade antioxidante 3,5 vezes maior quando comparado ao reagente Trolox (6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico), padrão de referência que é utilizado neste método (WANG *et al.*, 1997; CASTAÑEDA-OVANDO *et al.*, 2009; HASSIMOTTO *et al.*, 2009; HE e GIUSTI, 2010; LIMA *et al.*, 2011; ROUTRAY e ORSAT, 2011; SIMIRGIOTIS *et al.*, 2012).

A oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) leva ao acúmulo de placas de colesterol na parede das artérias e a liberação dessas placas pode provocar doenças cardiovasculares (AVIRAM 2000, AVIRAM *et al.*, 2005; BASU *et al.*, 2010). Um estudo envolvendo sete seres humanos que consumiam diariamente 125 mL de suco de uva concentrado durante sete dias revelou a elevação da capacidade antioxidante e a diminuição da susceptibilidade da LDL à oxidação. Esses benefícios podem estar diretamente relacionados à presença de ACYS e outros compostos fenólicos dos sucos de uvas e vinhos (DAY *et al.*, 1997; HE e GIUSTI, 2010).

Há ensaios clínicos em andamento para confirmar essas observações em seres humanos. PASCUAL-TERESA (2010) e colaboradores descreveram que, em ratos, a ingestão de ACYS na dieta diminui a susceptibilidade de isquemia do miocárdio, não levando a lesão do músculo. Porém, resultados de testes em humanos são controversos e não demonstram o mesmo efeito.

Outro aspecto de ação terapêutica de ACYS relaciona-se com processos inflamatórios que são uma resposta biológica à lesão de algum tecido. Muitos tipos de câncer podem ocorrer nos locais de inflamação, pois as células inflamatórias fornecem um ambiente favorável para o desenvolvimento de um tumor. Portanto, terapias utilizando anti-inflamatórios têm o potencial de prevenir a transformação maligna (COUSSENS e WERB, 2002; HE e GIUSTI, 2010). Há estudos que indicam a atividade anti-inflamatória de ACYS e, em alguns casos consequentemente anticâncer, quase todos baseados em evidências *in vitro* (FARIA *et al.*, 2010).

Na literatura também se encontram relatos que dietas alimentares podem estar relacionadas ao risco de diversos tipos de cânceres. O consumo de frutas e vegetais tem sido associado à diminuição do risco do desenvolvimento de câncer e as ACYS têm sido estudadas por seu potencial efeito quimiopreventivo. Os mecanismos de ação das ACYS envolvidos nesse processo ainda não foram completamente elucidados, no entanto, há comprovação da habilidade de suprimir a indução e a proliferação de tumores cancerígenos e promover apoptose celular de células tumorais (FARIA *et al.*, 2010).

Outro aspecto de ação biológica das ACYS relaciona-se com a obesidade que é resultado de tecido adiposo acumulado e geralmente está associada a distúrbios metabólicos. O consumo de ACYS poderia melhorar a função das células adiposas e, conseqüentemente, prevenir a obesidade segundo TSUDA (2008) e HE e GIUSTI (2010).

Um estudo antiobesidade foi realizado com um grupo de ratos submetidos a uma dieta rica em gorduras. ACYS extraídas de soja preta foram inseridas na dieta de parte deste grupo enquanto a outra parte foi utilizada como grupo controle. As ACYS se mostraram efetivas na inibição de ganho de peso do grupo que as ingeriu quando comparados ao grupo controle (KWON *et al.*, 2007; HE e GIUSTI, 2010; UDANI *et al.*, 2011).

Também é possível pensar na ação de ACYS sobre diabetes tipo 2, que é uma doença metabólica associada, em parte, com resistência à insulina (responsável pela estimulação do transporte de glicose no sangue), bem como à supressão da produção hepática de glicose (GHOSH e KONISHI 2007; TAKIKAWA *et al.* 2010; ROJO *et al.* 2012).

A ingestão excessiva de alto teor de gordura ou alto índice glicêmico são possíveis razões para a inadequação de insulina em fases da diabetes tipo 2. Considerando o potencial de ACYS para controle da obesidade pode esperar que contribua para a prevenção da diabete tipo 2. (AL-AWWADI *et al.* 2005; GHOSH e KONISHI, 2007; HE e GIUSTI, 2010). Evidências também sugerem que o consumo de ACYS pode melhorar a visão (KRAMER, 2004; GHOSH e KONISHI 2007; KALT *et al.* 2010).

O efeito curativo de qualquer composto fitoquímico é decidido pela sua disponibilidade quando exposto a um organismo a partir dos alimentos consumidos. A biodisponibilidade de ACYS tem sido discutida em várias revisões, juntamente com fatores que a afetam, porém dados sobre sua biodisponibilidade são raros. A maioria dos estudos é baseada na ação do cátion flavílico que é a forma presente em meio ácido, porém não é a forma mais comum nas diferentes partes do corpo humano, principalmente devido às diferenças de pH nos tecidos e fluídos biológicos (ROUTRAY e ORSAT, 2011).

A absorção dos compostos fenólicos na dieta é uma questão que ainda não está totalmente elucidada para que se avalie seus potenciais efeitos benéficos à saúde humana. Esses efeitos dependem da quantidade consumida e sua biodisponibilidade. Estudos recentes têm indicado que a maioria dos compostos fenólicos possui baixa biodisponibilidade, uma vez que são detectados em quantidades muito pequenas, tanto em plasma quanto em tecidos (CARTEA *et al.*, 2011). Juntamente com o pH, a microflora presente no interior do corpo pode ser outro fator que afeta a biodisponibilidade pois pode levar à deglicosilação e desmetilação de ACYS (ROUTRAY e ORSAT, 2011).

Neste contexto de interesse crescente e diversificado para aplicação de ACYS, a necessidade de caracterização e avaliação da qualidade de fontes e extratos de ACYS estimula a realização de estudos analíticos para elaboração de métodos úteis aos diversos segmentos diante das novas perspectivas de uso de ACYS (ERSUS e YURDAGEL, 2007).

1.2. Fontes de Antocianinas

As ACYS podem ser encontradas em vários vegetais, distribuídas em flores, frutas e hortaliças, além de grãos, folhas e raízes. As fontes de ACYS utilizadas neste trabalho foram: frutas; flores e hortaliças. A Tabela 1 apresenta as fontes utilizadas com seus nomes científicos e populares.

Tabela 1. Fontes de ACYS utilizadas no trabalho com seus nomes populares e científicos.

Fontes de ACYS	Nomes Populares	Nomes Científicos
FRUTAS	jabuticaba	<i>Myrciaria cauliflora</i>
	amora	<i>Morus nigra</i>
	amora preta	<i>Rubus sp</i>
	jambolão	<i>Syzygium cumini</i>
	jussara	<i>Euterpe edulis Mart.</i>
	morango	<i>Fragaria × ananassa Duch.</i>
	uva	<i>Vitis vinífera</i> <i>Vitis vinífera L. 'Brasil'</i>
FLORES	beijo turco ou maria sem-vergonha	<i>Impatiens walleriana</i>
	gerânio	<i>Pelargonium hortorum</i>
		<i>Pelargonium peltatum L.</i>
	hibisco	<i>Hibiscus sinensis</i>
		<i>Hibiscus syriacus</i>
hortênsia	<i>Hydrangea macrophylla</i>	
HORTALIÇAS	alface roxa	<i>Lactuca sativa</i>
	repolho roxo	<i>Brassica oleraceae</i>
	berinjela	<i>Solanum melongena L.</i>
	cebola roxa	<i>Allium cepa</i>
	rabanete	<i>Raphanus sativus</i>

Em seguida, são apresentadas algumas informações sobre cada uma das fontes de ACYS utilizadas neste trabalho. As frutas foram escolhidas, pois se apresentam como potenciais fontes de extração de ACYS para aplicação industrial como corantes, enquanto as flores e hortaliças foram utilizadas visando a avaliação da potencialidade da técnica espectrofotométrica de reflectância difusa visto que estas fontes apresentam quantidade menores de ACYS quando comparada às frutas além de distribuição não uniforme nos tecidos das fontes.

1.2.1. Frutas

A jabuticabeira (*Myrciaria cauliflora*) (Figura 6) pertence à família Myrtaceae e é uma árvore frutífera nativa da Mata Atlântica. Ocorre naturalmente desde o Mato Grosso do Sul até o Rio Grande do Sul, sendo mais comum na região Sudeste e no Paraná. Frutifica duas vezes por ano, de janeiro a fevereiro e de agosto a setembro. No Brasil, o consumo de jabuticaba começou com os índios que saboreavam esse fruto tanto na forma natural como fermentada. O nome vem do Tupi, *iautikáua*, que significa fruta de que se alimenta o jabuti (REYNERTSON *et al.*, 2006; JABOTICABAL, 2012).



Figura 6. Foto ilustrativa dos frutos de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*).

A Tabela 2 mostra as ACYS identificadas nas amostras de jabuticaba estudadas (FAVARO, 2008).

Tabela 2. ACYS identificadas nas amostras de jabuticaba e refugo (*Myrciaria cauliflora*).

Fonte	ACYS identificadas
JABUTICABA	Petunidina 3-glicosídeo
	Cianidina 3-glicosídeo
	Cianidina 3-sambubiosídeo
REFUGO	Petunidina 3-arabinosídeo
	Cianidina 3-glicosídeo
	Petunidina 3-glicosídeo
	Cianidina 3-sambubiosídeo

Pertencente à família Moraceae, a amora (*Morus nigra*) (Figura 7) é nativa da China e Japão, frutifica no Brasil de setembro a novembro e sua comercialização *in natura* é delicada por sua estrutura frágil e baixa estabilidade para armazenamento (HASSIMOTO *et al.*, 2007). Geralmente seus frutos são utilizados para preparo de geléias e compotas. As folhas comumente são utilizadas na sericultura, como alimento principal para o bicho-da-seda. A árvore é ornamental pelo efeito de sua folhagem em regiões de clima mais ameno, como no sul e sudeste do Brasil. É empregada no paisagismo e na arborização urbana.

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

A Tabela 3 mostra as ACYS identificadas nas amostras de amora estudadas (FAVARO, 2008).

Tabela 3. ACYS identificadas nas amostras de amora (*Morus nigra*).

Fonte	ACYS identificadas
AMORA	Cianidina 3-glicosídeo
	Cianidina 3-soforosídeo
	Cianidina 3-sambubiosídeo
	Cianidina 3-arabinosídeo
	Petunidina 3-galactosídeo
	Delfinidina 3-glicosídeo

Pertencente à família Rosaceae; a amoreira preta (*Rubus sp*) é uma frutífera de grande potencial para regiões de clima temperado, sendo nativa do sul do Brasil com frutificação de outubro a fevereiro. Os frutos dessa espécie têm vida pós-colheita curta devido a sua fragilidade (Figura 8) (ANTUNES, 2006).

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

A Tabela 4 mostra as ACYS identificadas nas amostras de amora preta estudadas (FAVARO, 2008).

Tabela 4. ACYS identificadas nas amostras de amora preta (*Rubus sp*).

Fonte	ACYS identificadas
AMORA PRETA	Cianidina 3-arabinosídeo
	Cianidina 3-glicosídeo
	Cianidina 3-sambubiosídeo
	Delfinidina 3-glicosídeo
	Cianidia 3-sambubiosídeo-5-glicosídeo

O jambolão (*Syzygium cumini*) (Figura 9), também conhecido como Jamelão dentre várias outras denominações, é o fruto de uma árvore tropical amplamente disseminada e encontrada no nordeste do Brasil. Os frutos são parecidos com uma azeitona roxa, têm sabor azedo (BRITO *et al.*, 2007) e juntos com suas sementes podem ser usados no tratamento de diabetes, faringites e outras infecções na forma de extratos brutos aquosos ou alcoólicos obtidos por decocção (AFIFY *et al.*, 2011).

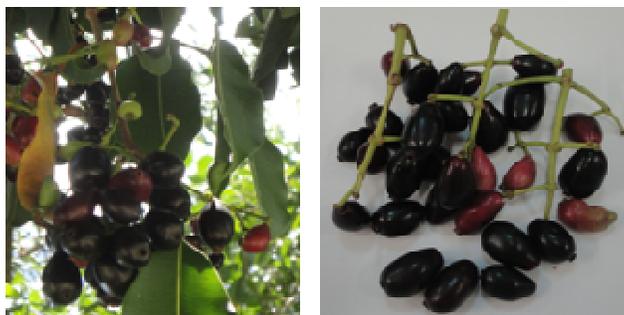


Figura 9. Fotos ilustrativa do jambolão (*Syzygium cumini*).

A Tabela 5 mostra as ACYS identificadas nas amostras de jambolão estudadas (SAMPAIO, 2008).

Tabela 5. ACYS identificadas nas amostras de jambolão (*Syzygium cumini*).

Fonte	ACYS identificadas
JAMBOLÃO	Delfinidina 3-rutinosídeo
	Cianidina 3-galactosídeo
	Cianidina 3-glicosídeo

A palmeira jussara (*Euterpe edulis Mart*) (Figura 10) é natural da Mata Atlântica e seu palmito era vendido *in natura* pelos indígenas residentes dessas áreas em feiras regionais, o que quase levou a palmeira a extinção. O estudo da aplicação de ACYS extraídas de frutos de jussara representa uma opção de incentivo à conservação da espécie, já que a coleta sustentável dos frutos não impede o desenvolvimento da palmeira (CORSO, 2003; HENDERSON, 2000) Os frutos de jussara são carnosos, com uma grande semente única, esféricos, de cor quase preta quando maduros, parecidos com o açaí que já é bem conhecido no Brasil (REIS, 1995; HENDERSON e GALEANO, 1996).



Figura 10. Foto ilustrativa da palmeira jussara (*Euterpe edulis Mart*) e seus frutos.

A Tabela 6 mostra as ACYS identificadas nas amostras de jussara estudadas (SHIMAMOTO E ROSSI, 2009).

Tabela 6. ACYS identificadas nas amostras de jussara (*Euterpe edulis Mart*).

Fonte	ACYS identificadas
JUSSARA	Cianidina 3-glicosídeo
	Cianidina 3-sambubiosídeo
	Petunidina 3-galactosídeo

O morango (*Fragaria x ananassa Duch.*) (Figura 11) comumente comercializado no Brasil é uma espécie híbrida de *Fragaria virginiana* e *Fragaria chiloensis*, ambas nativas do continente americano. Consumido em altas quantidades em diversos países, pois é saboroso, atraente e também apresenta possíveis benefícios à saúde (SKUPIEN e OSZMIANSKI, 2004; AABY *et al.*, 2007).



Figura 11. Foto ilustrativa do morango (*Fragaria x ananassa Duch*).

A Tabela 7 mostra as ACYS identificadas nas amostras de morango estudadas (AABY *et al.*, 2007).

Tabela 7. ACYS identificadas nas amostras de morango (*Fragaria x ananassa Duch*).

Fonte	ACYS identificadas
MORANGO	Pelargonidina 3-glicosídeo
	Cianidina 3-glicosídeo

A uva é uma das plantas frutíferas mais conhecidas pela humanidade, com sua origem no Oriente e introdução no Brasil em 1532. Possui algumas propriedades medicinais como adstringente, antiinflamatória, antioxidante e emoliente (ABE *et al.*, 2007). A Figura 12 ilustra as duas espécies de uvas utilizadas neste trabalho.

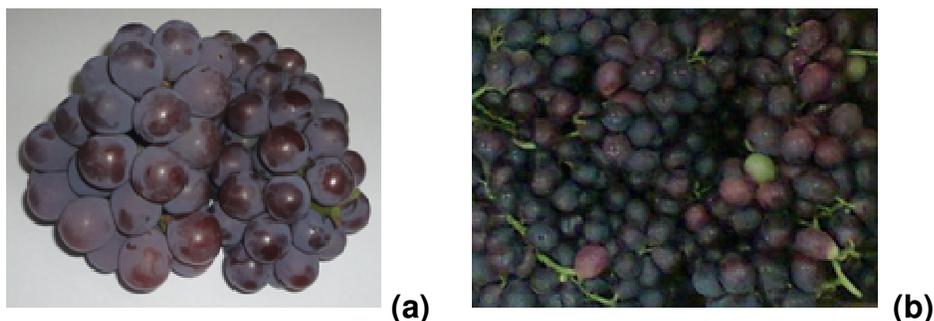


Figura 12. Foto ilustrativa das espécies de uvas estudadas (*Vitis vinífera* (a) e *Vitis vinífera* L. 'Brasil' (b)).

A Tabela 8 mostra as ACYS identificadas nas amostras das diferentes espécies de uva estudadas (TERCI, 2004; COELHO, 2011).

Tabela 8. ACYS identificadas nas amostras de uvas (*Vitis vinífera* e *Vitis vinífera* L. 'Brasil').

Fonte		ACYS identificadas
UVA	<i>Vitis vinífera</i>	Cianidina 3-glicosídeo
		Petunidina 3-glicosídeo
		Peonidina 3-glicosídeo
		Malvidina 3-glicosídeo
	<i>Vitis vinífera</i> L. 'Brasil'	Cianidina 3-glicosídeo
		Petunidina 3-glicosídeo
		Pelargonidina 3-arabinosídeo
		Malvidina 3-glicosídeo

1.2.2. Flores

O gênero *Impatiens* é comum de clima tropical com poucos membros em regiões de clima temperado. A espécie mais frequentemente encontrada é *Impatiens walleriana* e a ampla variação de cores das flores (Figura 13), indicando seu potencial como fonte de corantes naturais (CLEVINGER, 1971).



Figura 13. Foto ilustrativa das flores de beijo turco (*Impatiens walleriana*).

Flores do gênero *Pelargonium* apresentam diversas cores como branco, rosa, laranja, salmão, vermelho, as quais estão relacionadas com a presença de ACYS (Figura 14) (MITCHELL *et al.*, 1998).

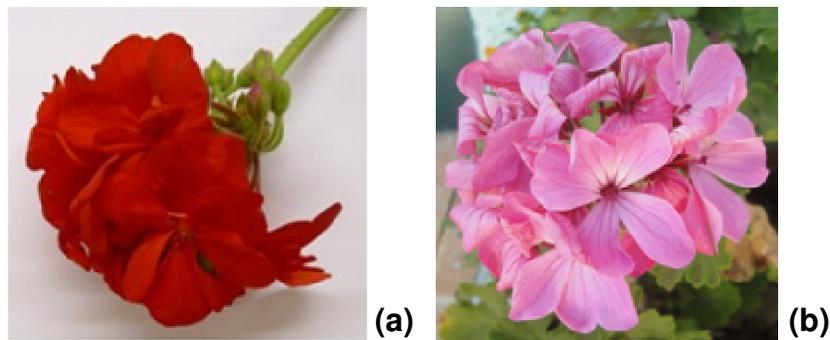


Figura 14. Foto ilustrativa das flores das espécies de gerânio estudadas (*Pelargonium hortorum* (a) e *Pelargonium peltatum* L (b)).

O hibisco (*Hibiscus sinensis* e *Hibiscus syriacus*) (Figura 15) vem sendo cultivado com aproveitamento de suas flores para produção de chá, bebida típica do Egito que pode ser servida gelada ou quente, além disso, vem sendo usado devido ações terapêuticas. As espécies de hibisco apresentam elevadas quantidades de ACYS (2,52 g ACYS/100 g de amostra) (MOURTZINOS *et al.*, 2008; SEGURA-CARRETERO *et al.*, 2008).

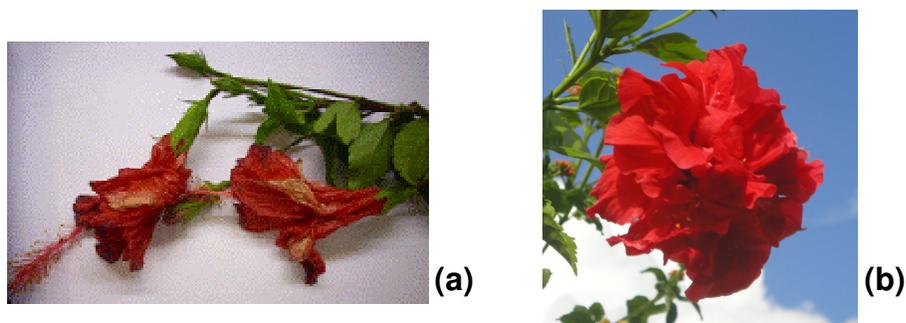


Figura 15. Foto ilustrativa das flores das espécies de hibisco estudadas (*Hibiscus sinensis* (a) e *Hibiscus syriacus* (b)).

As hortênsias (*Hydrangea macrophylla*) (Figura 16) são flores rosas, azuis e brancas, cuja coloração está relacionada com o pH do solo, e também, com a formação de complexos entre ACYS das flores e metais presentes no solo, como alumínio. (YOSHIDA *et al.*, 2008; YOSHIDA *et al.*, 2009).



Figura 16. Foto ilustrativa das flores de hortênsias (*Hydrangea macrophylla*).

1.2.3. Hortaliças

O consumo de alface roxa (*Lactuca sativa*) (Figura 17) tem aumentado, pois pode ser armazenado por longos períodos em comparação com a alface verde tradicional, sem degradação nem perda de qualidade. Contudo, há pouca informação na literatura sobre ACYS e outros compostos fenólicos presentes nesse vegetal (FERRERES *et al.*, 1997; MULABAGAL *et al.*, 2010).



Figura 17. Foto ilustrativa da alface roxa (*Lactuca sativa*).

Tradicionalmente reconhecido como fonte de ACYS para experimentos didáticos, o repolho roxo (*Brassica oleraceae*) (Figura 18) destaca-se por funções e aplicações fisiológicas, especialmente como agente anti-inflamatório. Um estudo indicou que ACYS de repolho roxo são estáveis sob as condições de digestão gástrica, o que pode auxiliar na absorção desses compostos de potencial interesse terapêutico (ARAPITSAS *et al.*, 2008; LIN *et al.*, 2008).



Figura 18. Foto ilustrativa do repolho roxo (*Brassica oleraceae*).

Berinjela (*Solanum melongena* L.) (Figura 19) é originária da Índia e foi introduzida no Brasil no século XVI (SANTOS *et al.*, 2002). É um dos vegetais mais cultivados no mundo, sendo o sexto em quantidade de produção (MENNELLA *et al.*, 2010). A coloração roxa intensa de sua casca deve-se a presença de ACYS (MULINACCI *et al.*, 2008; TODARO *et al.*, 2009).



Figura 19. Foto ilustrativa da berinjela (*Solanum melongena* L.).

A cebola roxa, *Allium cepa* (Figura 20), cujo consumo tem sido associado à prevenção de certas doenças, tem composição influenciada pelas condições de cultivo (sistema de produção, tipo de solo, clima) e por fatores genéticos, inclusive em relação à presença de ACYS (FOSSEN e ANDERSEN, 2003; GORINSTEIN, 2009).



Figura 20. Foto ilustrativa da cebola roxa (*Allium cepa*).

O rabanete (*Raphanus sativus*) (Figura 21) contém quantidade significativa de ACYS (principalmente pelargonidina 3-glicosídeo) com potencial tintorial, devido à sua relativa estabilidade e características similares às do corante sintético vermelho número 40. (RODRÍGUEZ-SAONA *et al.*, 1999; OTSUKI *et al.*, 2002; TSUJI *et al.*, 2005; TATSUZAWA *et al.*, 2008).



Figura 21. Foto ilustrativa do rabanete (*Raphanus sativus*).

1.3. Técnicas utilizadas para análise de ACYS

A literatura descreve diversas técnicas para análise de ACYS em fontes vegetais e seus extratos, com destaque para espectrofotometria UV-VIS (SONDHEIMER e KERTESZ, 1948; FULEKI e FRANCIS, 1968a; FULEKI e FRANCIS, 1968b; PETRI *et al.*, 1997, XU *et al.*, 2010b), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (FIORINI, 1995; BERENTE *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2008; CHEPLICK *et al.*, 2010, ZHANG *et al.*, 2010) e espectrometria de massas (MS) (TIAN *et al.*, 2005; GÓMEZ-ARIZA *et al.*, 2006; SCHÜTZ *et al.*, 2006; ARAPITSAS *et al.*, 2008; NAKAMURA *et al.*, 2010; HA *et al.*, 2010).

Vários autores descrevem o uso dessas técnicas em aplicações variadas, com alguns exemplos apresentados na sequência. A espectrofotometria UV-VIS foi utilizada para diferenciação e classificação de vinhos (URBANO *et al.*, 2006), verificação da captura de radicais livres e a atividade antibacteriana de vinhos tintos do sul da Sérvia (RADOVANOVIC *et al.*, 2009), caracterização de ACYS e antocianidinas de batata doce roxa (TRUONG *et al.*, 2010) e quantificação de ACYS e caracterização de óleos essenciais extraídos de três cultivares de amoras produzidas no Rio Grande do Sul – Brasil (ANDRADE *et al.*, 2010). Estudos de NAYAK e colaboradores (2011) utilizaram esta técnica como detecção de HPLC para determinar parâmetros de degradação e o impacto dessa degradação na capacidade antioxidante de ACYS extraídas de batata roxa.

HPLC tem sido amplamente utilizada para identificação de ACYS e compostos fenólicos em amostras diversas como: duas variedades de uva (IVANOVA *et al.*, 2011), chás (KERIO *et al.*, 2012), frutas (LEE e CHOUNG, 2011), feijão preto (HA *et al.*, 2010), dentre outras. A análise de compostos fenólicos em vinhos por HPLC para diferenciação de região de origem e formas de cultivo foi desenvolvida por MAKRIS e colaboradores (2006).

A aplicação de técnicas que empregam eletromigração em capilares tem sido proposta para análise de compostos fenólicos e ACYS. Essas técnicas de separação são baseadas na migração diferenciada de compostos iônicos ou ionizáveis, quando submetidas a um campo elétrico (TAVARES, 1996; SILVA *et al.*, 2007).

As técnicas de eletromigração apresentam algumas vantagens como alta eficiência de separação, necessidade de pequenas quantidades de amostras e baixo custo da análise, possibilidade de automação completa da análise, além da compatibilidade com uma ampla variedade de sistemas de detecção disponíveis como UV-VIS e MS (TAVARES, 1996; SILVA *et al.*, 2007).

A técnica de eletroforese capilar (CE) baseia-se somente nas diferenças entre as mobilidades de espécies carregadas em eletrólitos que podem ser aquosos ou orgânicos. Esta técnica foi introduzida por BRIDLE E GÁRCIA-VIGUERA (1997) para análise de ACYS em morangos e *elderberries*. Posteriormente, outros autores têm utilizado essa técnica para testar a idade de vinhos (SÁENZ-LÓPEZ *et al.*, 2004) e análise de ACYS em alimentos (COSTA *et al.*, 2000) o que indica seu potencial para exploração com ferramentas quimiométricas (WATANABE *et al.*, 1998; BICARD *et al.*, 1999; PETERSSON *et al.*, 2008; SEGURA-CARRETERO *et al.*, 2008; PETERSSON *et al.*, 2010). Além disso, tem sido descrita para análises de ACYS outra técnica de migração conhecida como cromatografia eletrocinética micelar (MEKC, *micellar electrokinetic chromatography*), também conhecida por cromatografia capilar eletrocinética micelar (MECC, *micellar electrokinetic capillary chromatography*). Essa técnica de separação está baseada na combinação de eletroforese e interações dos analitos com aditivos, por exemplo, tensoativos, havendo a formação de uma fase dispersa micelar no capilar que se move com velocidade diferente do analito. Para que a separação ocorra é necessário que o analito ou a fase dispersa possua carga. (BEDNAR *et al.*, 2003; KONG *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2007; VALLS *et al.*, 2009).

Uma técnica analítica versátil, mas que a literatura ainda não traz em aplicações com ACYS é espectrometria de reflectância difusa, que permite obter dados sem a necessidade de preparo de amostras. Numa etapa deste trabalho, foi estudada a caracterização de fontes de ACYS a partir de espectros eletrônicos de reflectância difusa obtidos diretamente a partir da manipulação das espécies vegetais, o que é inédito até o momento, de acordo com o levantamento bibliográfico realizado.

A utilização dessas técnicas fornece resultados rápidos com vasta quantidade de dados, sendo que métodos quimiométricos surgem como indispensáveis para explorar o potencial informativo dos dados obtidos, para expandir suas perspectivas de aplicação, como foi desenvolvido neste trabalho de doutorado.

1.4. Quimiometria

Técnicas instrumentais estão em crescente desenvolvimento, gerando volume de dados cada vez maiores. Como consequência, são necessários tratamentos matemáticos e estatísticos mais elaborados para expandir a potencialidade das respostas e viabilizar interpretações mais abrangentes. Neste contexto, procedimentos univariados tornam-se limitados. Métodos multivariados representam opção indispensável, pois permitem analisar um grande número de variáveis simultaneamente (BRUNS e FAIGLE, 1985).

Neste contexto, a análise multivariada foi inserida na avaliação e interpretação de dados químicos, originando uma nova área da Química, denominada Quimiometria, proposta pelo sueco Svante Wold e pelo americano Bruce R. Kowalski em 1972 (SHARAF *et al.*, 1986; BEEBE *et al.*, 1998). A visita do professor Kowalski ao IQ-UNICAMP, na década de 1980 impulsionou os primeiros trabalhos de quimiometria no Brasil. Pesquisas que utilizam métodos quimiométricos para tratamento de dados analíticos têm sido desenvolvidas desde então (BRUNS, 1988).

Para avaliação de dados multivariados, os métodos quimiométricos consideram a correlação entre amostras, entre variáveis e entre amostras e variáveis avaliadas simultaneamente, o que permite extrair quantidade muito maior de informação. Com esta premissa, vários procedimentos quimiométricos têm sido propostos para os mais diversos fins, como a otimização de experimentos, classificação e calibração de dados, análise exploratória, seleção de variáveis, reconhecimento de padrões, dentre outros (AMENDOLIA *et al.*, 2003; TROCHE *et al.*, 2005; JAPÓN-LUJÁN *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 2008; PETURSDOTTIR *et al.*, 2008; FERRANDINO e GUIDONI, 2010).

1.4.1. Organização dos dados

Para trabalhar com dados experimentais multivariados, inicialmente é necessário organizá-los. Para dados bidimensionais é comum a disposição na forma de uma matriz, sendo os objetos dispostos em linhas e as variáveis em colunas (Figura 22). Os dados consistem em p medidas de diferentes propriedades (variáveis) realizadas sobre n amostras (objetos), de modo que a matriz de dados \mathbf{A} é formada por $n \times p$ elementos (SHARAF *et al.*, 1986; BRUNS e FAIGLE, 1985; MASSART *et al.*, 1990; BEEBE *et al.*, 1998).

$$\mathbf{A} = \begin{bmatrix} \mathbf{X}_{11} & \mathbf{X}_{12} & \dots & \mathbf{X}_{1p} \\ \mathbf{X}_{21} & \mathbf{X}_{22} & \dots & \mathbf{X}_{2p} \\ \vdots & \vdots & \dots & \vdots \\ \mathbf{X}_{n1} & \mathbf{X}_{n2} & \dots & \mathbf{X}_{np} \end{bmatrix}$$

Figura 22. Organização dos dados químicos obtidos em uma análise em forma de matriz¹.

A visualização prévia dos dados em uma avaliação qualitativa dos dados na forma original (espectros, cromatogramas, etc) é importante para se obter informações preliminares sobre os mesmos. Esse procedimento permite avaliar as faixas de valores em que as variáveis são distribuídas e qual o grau de correlação entre elas, auxiliando na escolha do tipo de pré-processamento e na identificação de objetos (amostras) anômalos (*outliers*) (BEEBE *et al.*, 1998).

1.4.2. Pré-processamento dos dados

A etapa de pré-processamento tem a finalidade de remover ou reduzir fontes irrelevantes de variação, como erros aleatórios ou sistemáticos, com o uso de manipulações matemáticas. Porém, é preciso ter em mente que o pré-processamento altera os dados, o que pode influenciar positiva ou negativamente os resultados (HENDRIKS *et al.*, 2005; MUTIHAC *et al.*, 2008).

Existem dois tipos básicos de pré-processamento, dependendo de como são operados. O pré-processamento por colunas opera sobre variáveis, enquanto o pré-processamento por linhas, opera nas amostras. Dentre os tipos de pré-processamento por linhas estão normalização, alisamento e correção da linha base; por colunas é usual centrar na média e autoescalar os dados dependendo da situação de análise (SHARAF *et al.*, 1986; BEEBE *et al.*, 1998).

¹ As notações de álgebra linear também se aplicam à quimiometria. Um vetor é uma matriz que tem somente uma linha ou uma coluna sendo chamado de vetor linha ou coluna respectivamente. Os vetores são designados por letras minúsculas em negrito (**v**). As matrizes são designadas por letras maiúsculas em negrito (**A**). Os elementos das matrizes, dos vetores, ou ainda constantes como coeficientes de regressão (**b**) são representados por letras sem negrito (SHARAF *et al.*, 1986; BRUNS e FAIGLE, 1985; MASSART *et al.*, 1990; BEEBE *et al.*, 1998).

1.4.2.1. Normalização

A normalização, um pré-processamento geralmente aplicado às amostras, é utilizada para remover variação em um conjunto de dados devida a diferenças em magnitudes arbitrárias de um conjunto de medidas; é aplicada quando tal efeito no conjunto de dados é significativo, impedindo a visualização de informações realmente relevantes. Em cromatografia, por exemplo, a normalização de um cromatograma completo é usada para remover o efeito de volume de injeção variado. A Figura 23 mostra um exemplo da aplicação de normalização a um conjunto de dados de cromatogramas no qual as linhas contínuas referem-se a duas injeções com volumes diferentes da mesma amostra e as linhas tracejadas referem-se a duas injeções com volumes diferentes de uma segunda amostra (SHARAF *et al.*, 1986; BEEBE *et al.*, 1998).

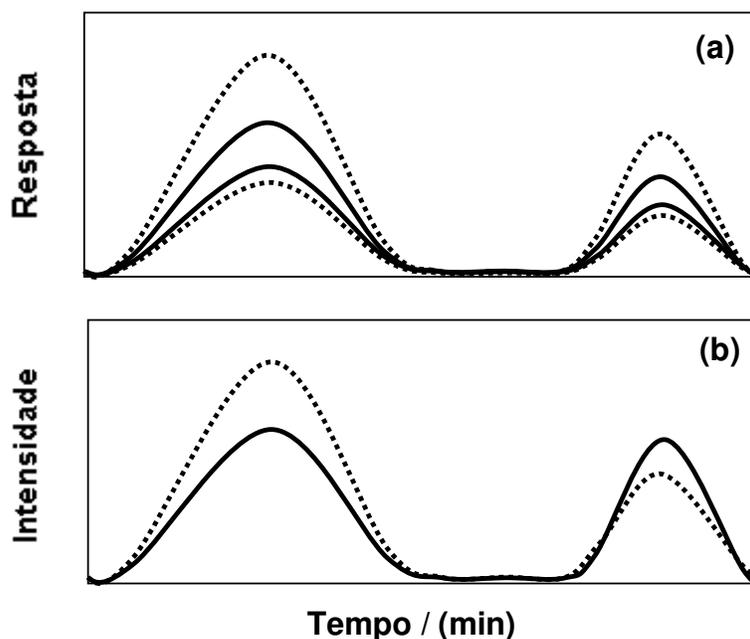


Figura 23. Cromatogramas com a mesma concentração de dois compostos com variação de volume de injeção nas replicatas. Dados originais (a) e normalizados (b) adaptado de BEEBE *et al.*, 1998.

1.4.2.2. Alisamento

Em Química Analítica, assume-se que um sinal medido consiste do sinal de interesse mais um ruído aleatório, sendo que a quantidade e a estrutura desse ruído dependem de cada experimento. As ferramentas de alisamento são usadas para reduzir matematicamente o ruído aleatório com o objetivo de aumentar a relação sinal-ruído. Algumas fontes de ruído contribuem para o sinal de baixa intensidade o que pode dificultar a remoção matemática sem remover algumas das informações químicas de interesse (BEEBE *et al.*, 1998).

Métodos de correção de linha base também podem ser utilizados para remover estes sinais de baixa frequência (BEEBE *et al.*, 1998). A Figura 24 apresenta um exemplo da aplicação de alisamento em um espectro eletrônico de absorção.

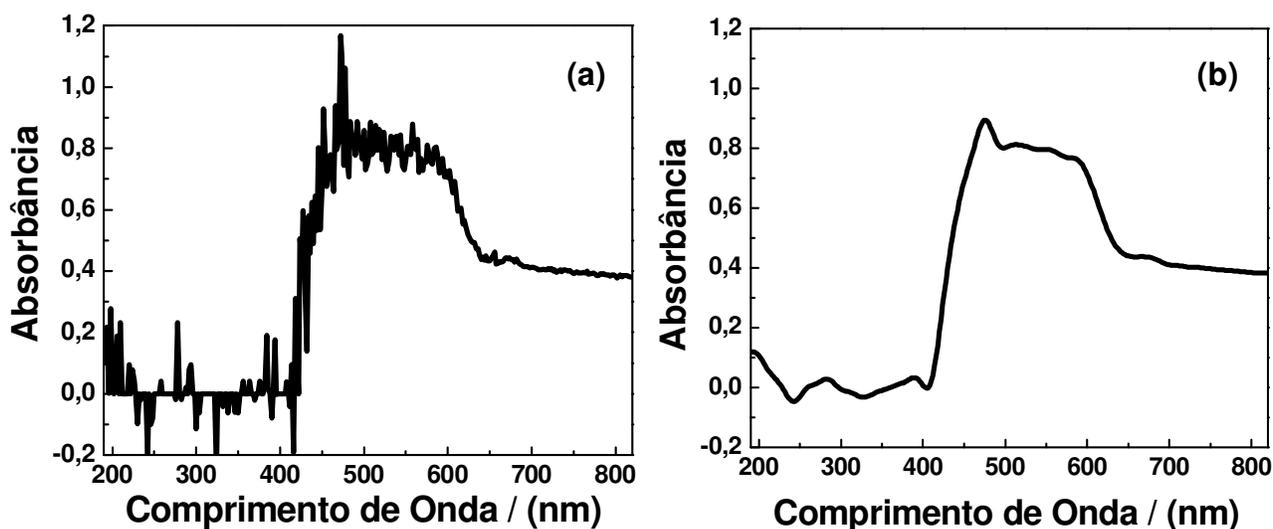


Figura 24. Espectro antes (a) e após (b) aplicar uma ferramenta de alisamento.

1.4.2.3. Centrar os dados na média

Um pré-processamento de uso comum para espectros, por exemplo, no UV-VIS, é centrar os dados na média. Este procedimento corresponde em fazer com que a média dos valores para cada variável seja zero. Isto é feito obtendo-se o valor médio para cada variável e subtraindo-o de cada um dos valores da variável correspondente. Com isso, ocorre a mudança do sistema de coordenadas para o centro de dados, ou seja, translada-se o eixo de coordenadas para o centro de dados.

Esse procedimento é aplicado às colunas da matriz (SHARAF *et al.*, 1986; BEEBE *et al.*, 1998). Na Figura 25, representa-se a centralização na média de um conjunto de dados com três variáveis (x_1 , x_2 , x_3).

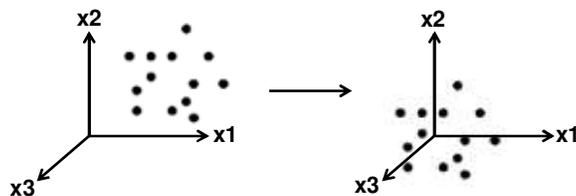


Figura 25. Representação gráfica da centralização na média dos dados (BEEBE *et al.*, 1998).

1.4.2.4. Autoescalamento

Neste caso, os dados são primeiramente centrados na média e, então, divididos pelo desvio padrão, promovendo a mudança da escala. Recomenda-se o autoescalamento quando todas as variáveis têm a mesma importância, como em um cromatograma no qual todos os picos são relevantes. Também é recomendável autoescalar os dados se a faixa de variação entre as variáveis for muito grande. Um exemplo da vantagem de autoescalamento está representado na Figura 26 (SHARAF *et al.*, 1986; BEEBE *et al.*, 1998).

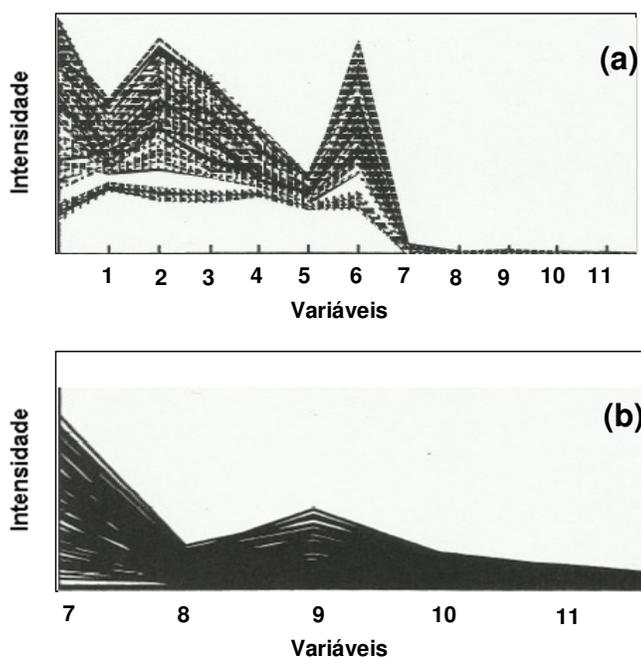


Figura 26. Dados brutos para os experimentos ilustrando as diferentes escalas de intensidade para (a) das variáveis (1-6) e (7-11) e (b) apenas das variáveis (7-11) adaptado de BEEBE *et al.*, 1998.

1.4.3. Métodos Quimiométricos

Os métodos multivariados de análise de dados podem ser divididos em dois grupos: *aprendizagem não supervisionada* e *aprendizagem supervisionada*.

Na aprendizagem não supervisionada, o objetivo é encontrar agrupamentos naturais das amostras num espaço p-dimensional sem utilização de informações a respeito das classes existentes entre as amostras. Os métodos mais utilizados são análise de agrupamentos hierárquica (HCA) e análise de componentes principais (PCA). Diferentemente, na aprendizagem supervisionada o objetivo é desenvolver modelos baseados nas informações da origem das amostras, para que estas sejam classificadas de forma correta e, então, aplicar esta regra para amostras de origem desconhecida visando sua classificação. Os métodos mais utilizados neste caso são o método do vizinho mais próximo (KNN) e o método do modelo independente de similaridade utilizando componentes principais (SIMCA). Essas técnicas de estatística multivariada têm grande aceitação na análise de dados químicos e, neste trabalho, foram utilizados PCA e KNN para obtenção de modelos estatísticos com os dados obtidos por diferentes técnicas analíticas.

1.4.3.1. Métodos de aprendizagem não supervisionada

Métodos de aprendizagem não supervisionada envolvem basicamente a análise de grupos ou agrupamentos. Muitas vezes a quantidade de informação obtida de uma análise química é tão grande, que a única maneira prática de buscar a similaridade é a análise de agrupamentos que podem ser avaliados utilizando-se HCA e PCA (MASSART *et al.*, 1990; BEEBE *et al.*, 1998). Em seguida, serão apresentados os dois principais métodos de análise de agrupamentos, sendo utilizado neste trabalho PCA.

1.4.3.1.a. Análise de Agrupamentos Hierárquica (HCA)

Um nome coletivo dado a uma grande variedade de técnicas que permitem a separação dos objetos ou variáveis em grupos diferentes é “análise de agrupamentos”. O método mais utilizado é HCA, que avalia as distâncias entre as amostras com base na informação das variáveis medidas, revelando os agrupamentos naturais existentes no conjunto de dados.

Graficamente, a hierarquia pode ser representada na forma de um gráfico bidimensional chamado dendrograma, no qual as amostras semelhantes, segundo as variáveis escolhidas são agrupadas entre si. Devido ao seu caráter não supervisionado, ela é comumente aplicada antes da aplicação de outras técnicas de análise multivariada. Existem muitas maneiras de procurar agrupamentos num espaço p-dimensional. A maneira matematicamente mais simples consiste em agrupar os pares de pontos (amostras) que estão mais próximos, usando a distância Euclidiana (Equação 1) (MASSART *et al.*, 1990; BEEBE *et al.*, 1998).

$$d_{ik} = \left[\sum_{j=1}^p (x_{ij} - x_{kj})^2 \right]^{1/2} \quad \text{Equação 1}$$

onde d_{ik} é a distância Euclidiana entre os pontos i e k .

Este procedimento é repetido sucessivamente até que todos os pontos sejam agrupados em um só ponto, levando à construção do dendrograma, onde no eixo vertical são colocadas as amostras e no eixo horizontal, o índice de similaridade (distância Euclidiana) (MASSART *et al.*, 1990; BEEBE *et al.*, 1998).

HCA também utiliza diferentes métodos de agrupamento, dentre os quais estão os métodos simples, completo, da média, centróide e incremental. Um exemplo do método simples está representado na Figura 27. Estes métodos apresentam características individuais que favorecem ou não a aplicação de cada um em determinada situação (MASSART *et al.*, 1990; BEEBE *et al.*, 1998).

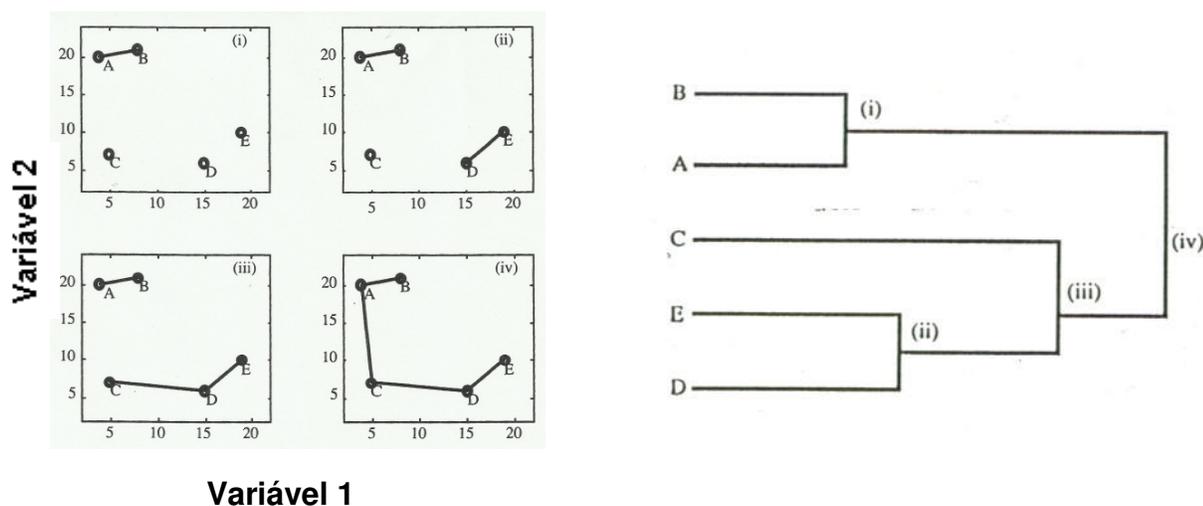


Figura 27: Conjunto de cinco amostras e seu referido dendrograma utilizando o agrupamento simples (BEEBE *et al.*, 1998).

1.4.3.1.b. Análise de Componentes Principais (PCA)

Métodos baseados em fatores resultantes da transformação de uma matriz de dados visam reduzir a dimensão espacial da projeção dos dados originais para facilitar a visualização de informações relevantes. É comum realizar esta projeção por Análise de Componentes Principais (PCA) e Análises de Fatores (FA), dentre outras (SHARAF *et al.*, 1986; BEEBE *et al.*, 1998).

O objetivo da PCA é transformar dados complexos para facilitar a visualização das informações mais relevantes, assim matrizes com muitas variáveis são transformadas para visualizar dados multivariados em um número relativamente menor de dimensões. Para isso, a matriz original \mathbf{X} em que as amostras são dispostas em linhas e as variáveis em colunas, é transformada em duas matrizes menores, as matrizes de escores (*scores*) (\mathbf{T}) e de pesos (*loadings*) (\mathbf{P}), mais uma matriz de resíduos que indica a parte não modelada como mostrado na Figura 28.

$$\begin{array}{c} n \\ \boxed{\mathbf{X}} \\ m \end{array} = \begin{array}{c} d \\ \boxed{\mathbf{T}} \\ m \end{array} \times \begin{array}{c} n \\ \boxed{\mathbf{P}^t} \\ d \end{array} + \begin{array}{c} n \\ \boxed{\mathbf{E}} \\ m \end{array}$$

Figura 28. Decomposição da matriz \mathbf{X} de m amostras com n variáveis em outras matrizes menores, de escores \mathbf{T} (amostras), de pesos \mathbf{P} (peso das variáveis) e a matriz de resíduos \mathbf{E} .

Neste caso, \mathbf{X} é a matriz original constituída de m linhas (amostras) e n colunas (variáveis); \mathbf{T} é a matriz de escores com m linhas e d colunas; \mathbf{P} é a matriz de pesos (*loadings*) com n colunas e d linhas e \mathbf{E} é a matriz de resíduos com m linhas e n colunas.

Após os cálculos, os resultados são utilizados para interpretar a distribuição das amostras num gráfico bidimensional das componentes principais (PC), e posteriormente identificar e julgar a importância das variáveis originais escolhidas, sendo que as variáveis originais com maiores valores de pesos (*loadings*) são as mais importantes do ponto de vista estatístico. Devido à grande fração de variância usualmente descrita pela primeira, segunda e terceira PCs, os dados podem ser visualizados plotando-se os escores de uma componente contra os de outra.

O gráfico de *loadings* representa o peso que cada variável possui na classificação das amostras em estudo, ou seja, destaca informações químicas ou físicas, específicas das amostras que podem estar associadas aos resultados estatísticos e explicar o sistema estudado. Um exemplo deste gráfico está apresentado na Figura 29, para o qual as variáveis estudadas eram comprimentos de onda de espectros eletrônicos de absorção, sendo 390, 495 e 550 nm aqueles responsáveis pela classificação das amostras estudadas.

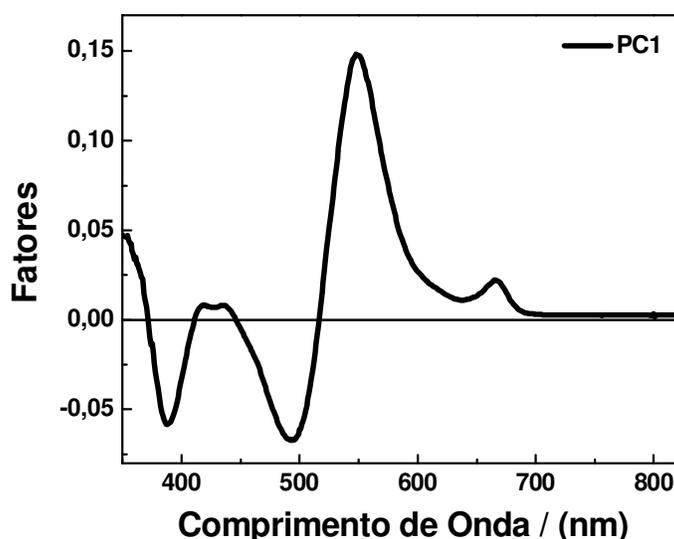


Figura 29. Gráfico de *loadings* para PC1 de um conjunto de dados de espectros eletrônicos de absorção de extratos de frutas.

O gráfico da matriz de resíduos os expressa em função da distância de Mahalanobis (parâmetro estatístico) e permite detectar amostras anômalas (*outliers*) do conjunto de treinamento. A Figura 30 ilustra este tipo de gráfico no qual esses parâmetros são avaliados. As linhas verdes indicam os valores ótimos desses parâmetros (distância de Mahalanobis menor que 7,25 e resíduos das amostras menor que 0,85), conseqüentemente, o conjunto de dados apresenta uma amostra anômala, uma replicata da amostra 1, que possui distância de Mahalanobis igual a 7,45.

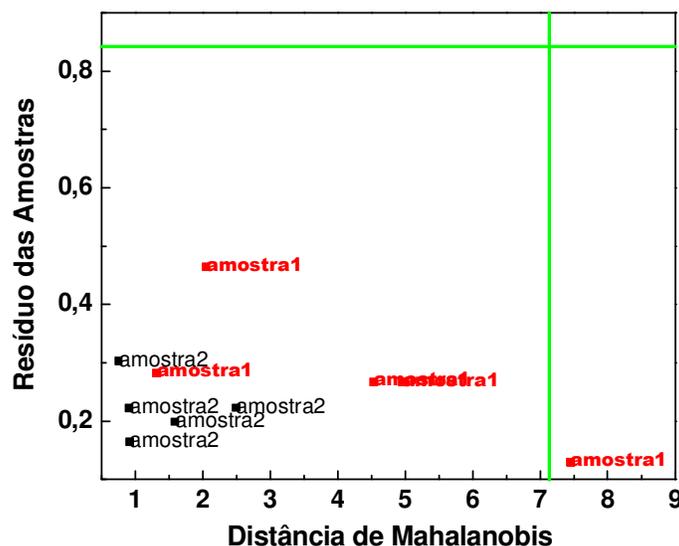


Figura 30. Gráfico de resíduos e distância de Mahalanobis de um conjunto de dados de espectros eletrônicos de absorção de extratos de frutas.

PCA tem sido muito aplicada no controle de qualidade de matérias primas, produtos acabados bem como no monitoramento do produto durante a produção, de acordo com PINI (1995), LÓPEZ *et al.* (1996), BARTHUS (1999), BORIN (2003), MORGANO (2005) e BORTOLETO (2007).

1.4.3.2. Método de aprendizagem supervisionada

A aplicação dos métodos de aprendizagem supervisionada tem o objetivo de construir modelos para serem usados futuramente na classificação de amostras desconhecidas (conjunto teste). Isso é feito com um conjunto de dados que possui classificação conhecida (conjunto de treinamento). Este conjunto é utilizado para desenvolver regras de classificação, ou seja, para que ele consiga distinguir uma classe de outra (SHARAF *et al.*, 1986; BRUNS e FAIGLE, 1985; MASSART *et al.*, 1990; BEEBE *et al.*, 1998).

Para aprendizagem supervisionada, há métodos de reconhecimento de padrão, dentre eles, o KNN e o SIMCA.

1.4.3.2.a. Método do vizinho mais próximo (KNN)

No método do vizinho mais próximo (KNN) utiliza-se um conjunto de treinamento para distribuir as amostras entre as classes, sendo cada amostra classificada na mesma categoria do seu vizinho mais próximo. As rotinas de classificação dos programas de cálculo determinam normalmente o “Késimo vizinho mais próximo” variando de 1 a 10. Este método não é capaz de sugerir que uma amostra possa pertencer a uma categoria ainda não definida, trata-se de um exemplo de modelo de similaridade no qual amostras do conjunto de treinamento mais similares à amostra em estudo servem como referência para a classificação (BRUNS e FAIGLE, 1985).

Para selecionar um número K ótimo de vizinhos, um procedimento de validação cruzada é aplicado ao conjunto de treinamento. Esse procedimento é repetido usando diferentes números de vizinhos mais próximos para a classificação. Se as classes estão bem separadas, uma regra adequada para classificação é $K = 1$, contudo mais vizinhos mais próximos deveriam ser considerados para aumentar a confiabilidade dos resultados (BEEBE *et al.*, 1998).

A Figura 31 apresenta um exemplo de classificação utilizando KNN para três (X, Y e Z) amostras desconhecidas com duas variáveis (1 e 2) e quatro classes (A, B, C e D).

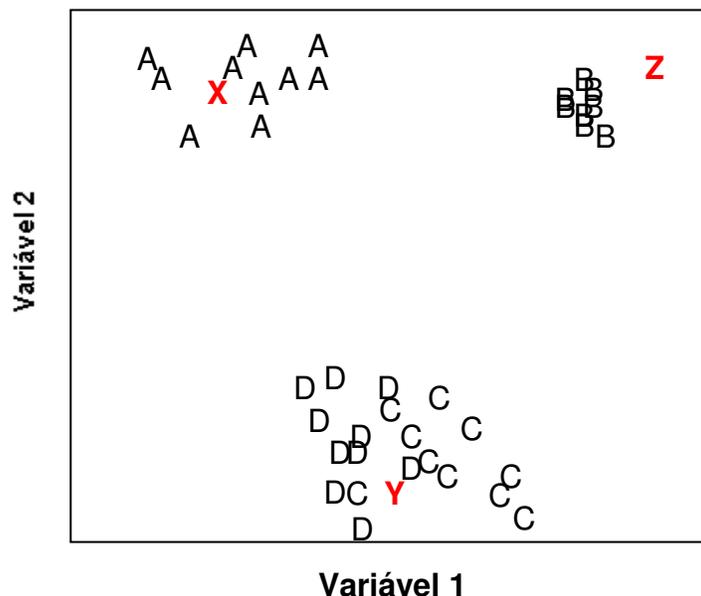


Figura 31. Exemplo de reconhecimento de padrão para as amostras X, Z e Y pelo método de KNN adaptado de BEEBE *et al.*, 1998.

Observando a Figura 31, conclui-se que a amostra X seria classificada como um componente da classe A. De fato, os 10 primeiros vizinhos mais próximos para X pertencem à classe A. Raciocínio análogo indica que a amostra Z pode ser classificada na classe B. Já a amostra desconhecida Y está contida na interface das classes C e D, e a classificação é menos óbvia. O primeiro vizinho mais próximo é da classe D, enquanto o segundo é da classe C. Numa situação em que várias classes são representadas pelos vizinhos mais próximos, a maior parte dos pacotes computacionais de cálculo classificaria a amostra desconhecida na classe contendo a maioria dos vizinhos mais próximos. Por exemplo, se fossem utilizados três vizinhos mais próximos ($K = 3$) a amostra Y seria classificada na classe C (BEEBE *et al.*, 1998).

Existem muitas vantagens no KNN, com relação a outros métodos de reconhecimento de padrões. Por exemplo, é de simples implementação e não é necessário manter a relação entre o número de amostras e o de variáveis em 5, como o desejável em outros métodos, sendo apropriado quando existem poucas amostras (BEEBE *et al.*, 1998).

Na literatura os modelos de KNN obtidos vêm apresentando erros aceitáveis de até 30 % na validação de amostras externas.

1.4.3.2.b. Modelo independente de similaridade utilizando componentes principais (SIMCA)

Outro método de reconhecimento de padrões é o método SIMCA, onde os dados do conjunto de treinamento são utilizados para determinar o modelo de cada categoria independentemente a partir da aplicação de PCA. Neste método, cada classe pode ter um número ótimo de componentes principais. A Figura 32 mostra que a classe ○ ocupa um espaço tridimensional (3 PCs), a classe ● ocupa um plano (2 Pcs) e a classe □ ocupa uma linha (1 PC). O modelo obtido é formado por uma caixa multidimensional em que novas amostras são provavelmente classificadas de acordo com seus ajustes e separadas pela falta de ajuste, aos modelos de classe. Porém o método pode localizar um ponto referente a uma amostra não pertencente a qualquer uma das classes, indicando-o como um ponto deslocado, ou anômalo (*outlier*), ou membro potencial de uma categoria ainda não definida. (BRUNS e FAIGLE, 1985; SHARAF *et al.*, 1986; PINI, 1995; BEEBE *et al.*, 1998; OTTO, 1999; LONNY *et al.*, 2005).

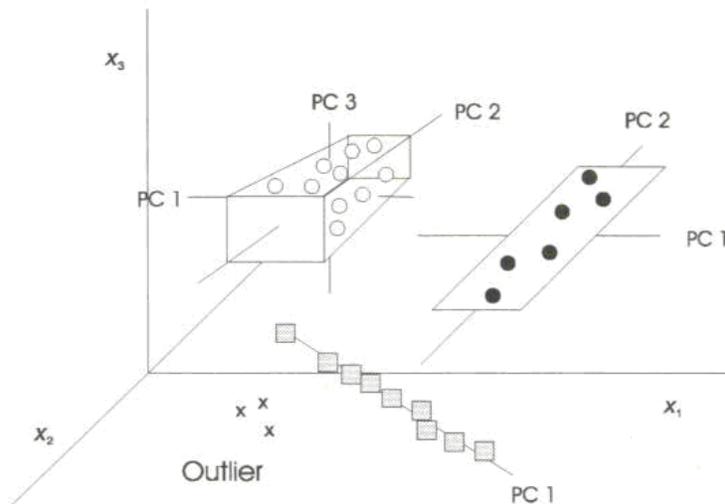


Figura 32. Exemplo tridimensional de SIMCA (OTTO, 1999).

Dentre as vantagens da utilização de SIMCA está a capacidade de indicar quando uma amostra não pertence a nenhuma das classes definidas no conjunto de treinamento, representando-o como um ponto deslocado, ou anômalo (*outlier*), ou membro potencial de uma categoria ainda não definida, ao contrário do KNN, que identificaria uma amostra desconhecida na categoria mais próxima da mesma. Porém, para se obter uma representação adequada do tamanho e da forma de uma determinada classe, muitas amostras por classe devem ser obtidas para derivar os modelos de classificação (BEEBE *et al.*, 1998). Isso pode restringir a aplicação de SIMCA quando o conjunto de dados disponível não é muito grande, como aconteceu em alguns casos neste trabalho, por isso optou-se por não utilizar este modelo.

As crescentes perspectivas do uso de ACYS em diversos segmentos industriais apontam a necessidade de desenvolver métodos para caracterização de fontes e extratos de ACYS, a fim de viabilizar o controle da qualidade e autenticidade desses extratos e fontes que apresentam potencial para aplicações em crescente expansão e diversificação.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

O presente trabalho teve os seguintes objetivos:

- Desenvolver metodologias analíticas utilizando métodos quimiométricos e diferentes técnicas analíticas para exploração de dados de fontes e extratos vegetais de ACYS a partir das seguintes fontes: frutas comuns no Brasil (amora (*Morus nigra*), amora preta (*Rubus* sp), jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*), jambolão (*Syzygium cumini*), jussara (*Euterpe edulis* Mart.), morango (*Fragaria x ananassa* Duch) e uva (*Vitis vinífera* e *Vitis vinífera* L. 'Brasil'), hortaliças (alface roxa (*Lactuca sativa*), repolho roxo (*Brassica oleraceae*), berinjela (*Solanum melongena*), cebola roxa (*Allium cepa*) e rabanete (*Raphanus sativus*)) e flores (beijo-turco (*Impatiens walleriana*), gerânio (*Pelargonium hortorum* e *Pelargonium peltatum* L.), hibisco (*Hibiscus sinensis* e *Hibiscus syriacus*) e hortênsia (*Hydrangea macrophylla*)).
- Verificar a potencialidade da aplicação de técnicas analíticas simples como espectrofotometria de absorção e de reflectância difusa na região do visível para obtenção de dados analíticos, comparando os resultados dos modelos de previsão com aqueles obtidos a partir de dados de técnicas mais sofisticadas como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), espectrometria de massas (MS) e cromatografia eletrocínética micelar (MEKC).
- Obter modelos estatísticos utilizando as ferramentas quimiométricas PCA e KNN para estudos de identificação de espécies a partir de fontes e extratos de ACYS; estabilidade dos extratos; avaliação de solventes extratores, visando controle de qualidade e autenticidade desses compostos.

CAPÍTULO 3

DESENVOLVIMENTO

3.1 Fontes de Antocianinas

A aquisição das fontes de ACYS foi realizada em mercados do comércio paulista e, posteriormente, alguns cuidados foram tomados para armazenamento das amostras.

As frutas amora, amora preta, jabuticaba, jambolão, jussara, morango e uvas foram armazenadas em frascos de 700 g após a aquisição e congeladas a aproximadamente - 11 °C em freezer até serem utilizadas. As frutas foram armazenadas por períodos de até 12 meses sem alteração da qualidade das fontes e extratos. No caso da jabuticaba foram utilizados, além dos frutos comercializados para consumo humano, o refugo constituído de frutos não comercializáveis que já sofreram algum tipo de degradação como ação de vento, chuva ou ataque de pássaros estando ainda fixados na jabuticabeira ou já caídos dela.

As hortaliças (alface roxa, berinjela, cebola roxa, rabanete, repolho roxo) foram acondicionadas após a aquisição em frascos protegidos da luz, fechados e refrigerados a aproximadamente 8 °C por um período de no máximo 24 horas até a utilização.

As flores beijo-turco, gerânio, hibisco e hortênsia foram utilizadas imediatamente após colheita, para obtenção de espectros de reflectância difusa e de extratos alcoólicos.

Para a realização dos procedimentos experimentais, porções das amostras eram removidas do freezer ou da geladeira e mantidas a temperatura ambiente até utilização.

Para atividades com finalidade científica de coleta e transporte de material botânico foram realizados os registros no Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) para A. V. Rossi e M. M. A. Favaro, sendo obtidas as autorizações registradas sob os números 5092212 e 5102258, respectivamente.

3.2. Reagentes, soluções de pH conhecido, materiais e equipamentos

Os três itens a seguir descrevem os reagentes, soluções, materiais e equipamentos utilizados neste trabalho com detalhamento de especificações como pureza dos reagentes e características dos equipamentos, além do modo de preparo das soluções utilizadas.

3.2.1. Reagentes

Acetato de sódio anidro PA (Synth), acetonitrila 99,9 % (Merck), ácido acético glacial 99,7 % PA (Synth), ácido clorídrico 36,5-38,0 % PA (Synth), ácido fórmico 85 % PA (Synth), água potável tratada, água deionizada (deionizador e purificador MilliPore Milli-Q Plus), borato de sódio 99,5 % (Synth), citrato de sódio PA (Synth), cloreto de cianidina 3-rutinosídeo 98 % HPLC (SIGMA), cloreto de potássio PA (Synth), dodecil sulfato de sódio (90 %) (Synth), etanol PA 99,5 % (Synth), metanol grau HPLC (TEDIA).

3.2.2. Soluções de pH conhecido ajustadas com pHmetro

Foram preparadas as seguintes soluções a partir do procedimento descrito por TERCI (2004) e CHRISTIAN (1977):

- ❖ pH 1,0: cloreto de potássio (KCl) 0,2 mol L⁻¹ + ácido clorídrico (HCl) 0,2 mol L⁻¹
- ❖ pH 2,0: citrato de sódio (Na₃C₆H₅O₇) 0,2 mol L⁻¹ + ácido clorídrico (HCl) 1,0 mol L⁻¹
- ❖ pH 3,4: citrato de sódio (Na₃C₆H₅O₇) 0,2 mol L⁻¹ + ácido clorídrico (HCl) 1,0 mol L⁻¹
- ❖ pH 4,5: acetato de sódio (NaC₂H₃O₂) 2,0 mol L⁻¹ + ácido clorídrico (HCl) 0,2 mol L⁻¹

3.2.3. Materiais e equipamentos

Foram utilizados: balanças analíticas (Quimis Q-500L210C e Shimadzu AX200) para pesagens dos reagentes; banho termostatizado (Templette TE-8D Refrigerator Bath ESRB-11 Techne) para o procedimento de extração; capela laboratorial para o procedimento de secagem dos extratos; cromatógrafo (Shimadzu Prominece coluna C18, tipo ODS2, comprimento = 25,0 cm, diâmetro interno = 4,6 mm, tamanho de partícula = 5 µm e tamanho de poro = 100 Å, Varian, Microsorb MV com eluição isocrática em fase reversa e detector com arranjo de diodos SPD-M20A para obtenção dos cromatogramas; espectrofotômetro HP 8452A Diode Array com dispositivo de reflectância acoplado Labsphere RSA-HP-84 para obtenção dos espectros eletrônicos de reflectância difusa; espectrofotômetro (Biotech Pharmacia Ultrospech 2000 e cubetas de quartzo 1,0 cm de caminho óptico (Q4-Biocel) para obtenção dos espectros eletrônicos de absorção; equipamento para análise por cromatografia eletrocínica micelar (Agilent CE, DE01603589, polaridade positiva, voltagem 30 kV e tempo de análise de 20 minutos); espectrômetro de massas (LC-MS/MS Waters

Ultra Performance LC Acquity Quattro Micro API, Ionização por *electrospray* (ESI) e detecção Triplo Quadrupolo (TQ), coluna Acquity UPLC BEH C18 1,7 μm com 2,1 mm x 50 mm); pHmetro (Analyser pH300) com eletrodo de vidro para ajuste de pH das soluções utilizadas para manter o pH dos extratos; e geladeira com freezer (GE TMNF-E) para armazenagem das amostras e dos extratos.

Os programas computacionais utilizados foram: Origin 7.0 para conversão dos arquivos obtidos pelas diversas técnicas analíticas e o Pirouette 4.0 para os tratamentos quimiométricos.

3.3. Procedimentos Experimentais

3.3.1. Extração

As extrações foram realizadas por imersão das fontes de ACYS a 55 °C por 30 minutos sob termostatização numa proporção 1:3 (m/V) massa de fonte de ACYS (g):volume de solvente (mL). Essas condições foram otimizadas em trabalhos anteriores do GPQUAE (Grupo de Pesquisa em Química Analítica e Educação) (TERCI, 2004). Em alguns casos foi necessária a secagem dos extratos realizada sob fluxo de ar em capela 0,6 m s⁻¹ para obtenção de extratos secos de ACYS (FAVARO, 2008).

Todas as extrações foram realizadas utilizando-se etanol 94 % como solvente extrator com exceção do estudo do efeito de solventes extratores. Estudos anteriores mostraram que extratos obtidos com etanol 94 % apresentaram maior estabilidade e também maior quantidade de ACYS extraídas (FAVARO, 2008; SAMPAIO, 2008).

Para o estudo do efeito de solventes extratores de ACYS, os procedimentos de extração foram realizados utilizando-se uva como fonte de ACYS e três diferentes solventes: água potável tratada, etanol 94% e etanol 94% acidificado com ácido acético 1%. Além disso, foram realizadas variações nas condições de extração como a utilização do uso exclusivo das cascas da uva; uso de fruta inteira e branqueamento nas condições anteriores (SAMPALIO, 2008).

Vale ressaltar que os solventes descritos foram escolhidos visando baixa toxicidade e baixo custo para posterior aplicação desses extratos de ACYS em diferentes segmentos industriais.

3.3.2. Obtenção de Espectros Eletrônicos de Absorção

Os espectros eletrônicos de absorção dos extratos das fontes de ACYS estudadas foram obtidos entre 200 e 800 nm para a maioria dos estudos realizados. Os extratos de uva utilizados no estudo com diferentes solventes e condições de extração e os extratos de jaboticaba, refugo, jambolão e jussara utilizados no estudo de identificação de diferentes fontes, foram obtidos entre 400 e 800 nm. Os extratos de flores e hortaliças para o estudo da identificação das fontes de ACYS foram utilizados na forma bruta e na forma acidificada com solução de pH 2,0 na proporção 1,0 mL de extrato bruto para 2,0 mL de solução de pH 2,0. Os solventes extratores foram utilizados como branco.

3.3.3. Obtenção de Espectros Eletrônicos de Reflectância difusa de Flores e Hortaliças

Os espectros eletrônicos de reflectância difusa foram obtidos entre 190 e 820 nm com acessório Labsphere RSA-HP-84 acoplado ao espectrofotômetro que possui orifício de saída e entrada de luz com 5 mm de diâmetro. O dispositivo era posicionado diretamente sobre cascas, folhas e pétalas das amostras estudadas e o espectro era obtido após acionamento do equipamento. A Figura 33 representa um esquema do procedimento de obtenção dos espectros eletrônicos de reflectância difusa.



Figura 33. Esquema para medidas de reflectância difusa: (a) amostra de berinjela, (b) acessório de reflectância e (c) orifício de saída e entrada de luz do dispositivo.

3.3.4. Obtenção de cromatogramas por HPLC de extratos de frutas

Para os procedimentos por HPLC, inicialmente os extratos foram submetidos a fluxo de ar em sistema de exaustão da capela com fluxo de ar de $0,6 \text{ m s}^{-1}$ à temperatura ambiente por 24 horas.

Em seguida, as pastas obtidas foram solubilizadas em uma mistura de metanol e 0,1 % HCl concentrado (v/v) para posterior injeção no cromatógrafo nas seguintes condições:

- Fase móvel: água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 v/v/v (LEE, 1992; GOIFFON, 1999);
- Vazão da fase móvel: 1,0 mL min⁻¹ com eluição isocrática e em fase reversa;
- Volume de injeção: 20 µL;
- Detecção: 525 nm;
- Tempo de eluição: 40 minutos.

3.3.5. Obtenção de dados de MEKC com extratos de frutas

Inicialmente foram realizados testes utilizando a técnica de eletromigração em capilares MEKC para obter as condições ótimas de análise para extratos de ACYS. Este estudo foi realizado utilizando-se solução do padrão cianidina 3-rutinosídeo e um teste inicial foi realizado com extrato de jussara.

As variáveis avaliadas foram:

- Condição da dissolução da amostra antes da injeção: em água ou eletrólito;
- Concentrações de eletrólitos em água deionizada: borato de sódio e dodecil sulfato de sódio (SDS);
- Diâmetro do capilar: 75 ou 50 µm;
- Temperatura da análise: 20, 25 e 30 °C.

Posteriormente, os dados obtidos na condição ótima para todas as frutas estudadas foram utilizados na identificação de diferentes fontes de ACYS.

3.3.6. Obtenção de espectros de MS dos extratos de frutas

A Figura 34 mostra o organograma das etapas de preparação das amostras dos extratos de frutas (jaboticaba, jambolão, jussara e uva) a partir da extração até o procedimento de diluição em solvente água deionizada: ácido fórmico 0,1 % (v/v) em água para posterior injeção no equipamento UPLC-MS. Quando pertinente, os extratos foram secos sob fluxo de ar do sistema de exaustão da capela de 0,6 m s⁻¹ à temperatura ambiente por 24 horas e purificados com cartucho C18 por extração em fase sólida (SAMPAIO, 2008).

Para obtenção dos espectros de massas das amostras de frutas estudadas, os extratos foram previamente filtrados em filtro com poro de 0,22 μm . Utilizou-se eluição por gradiente A (água:ácido fórmico 0,1 %) e B (acetonitrila: ácido fórmico 0,1 %) com tempo de eluição de 12 minutos. Gradiente inicial: 99 % de A e 1 % de B por 3 minutos; 80 % de A e 20 % de B de 4 a 8 minutos; 70 % de A e 30 % de B de 8 a 10 minutos; 95 % de A e 5 % de B de 10 a 12 minutos. Condições otimizadas em outro trabalho do GPQUAE (COELHO, 2011) foram aplicadas para obtenção dos espectros: capilar 0,80 kV, cone 30 V, extrator 3 V, temperatura da fonte 120 $^{\circ}\text{C}$ e temperatura de desolvatação 400 $^{\circ}\text{C}$. Foi utilizado UPLC-MS, Triplo Quadrupolo com ionização por *eletrospray* (ESI).

Os dados analíticos foram utilizados para avaliar as condições de extração e preparo das amostras estudadas e também obter modelos de classificação para identificação das fontes estudadas.

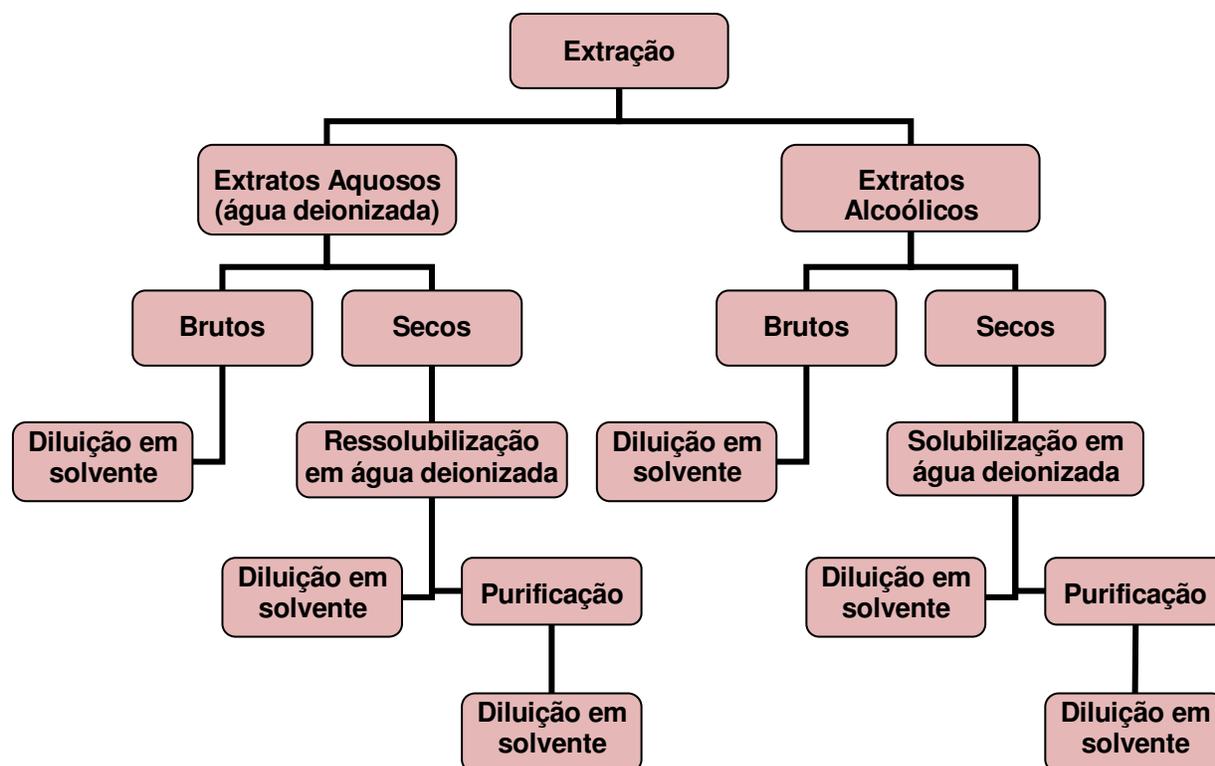


Figura 34. Organograma das etapas de preparação das amostras para análises por UPLC-MS.

3.3.7. Estudo do Perfil de Envelhecimento de extratos de ACYS de jabuticaba a partir de espectros eletrônicos de absorção

Para este estudo, foram monitoradas 60 amostras de extratos de jabuticaba obtidos em etanol 94 % e utilizando-se somente as cascas como fonte de ACYS. Todos os extratos foram armazenados em frascos de vidro âmbar. Metade das amostras foi armazenada à temperatura ambiente em armários protegidos de luz ambiente a aproximadamente 25 °C e a outra metade foi armazenada em refrigerador doméstico a aproximadamente 8 °C.

Os extratos armazenados à temperatura ambiente foram monitorados em média durante 60 dias, pois posteriormente foi observada a perda da coloração avermelhada característica das ACYS, além da presença de fungos. Os extratos armazenados sob refrigeração foram monitorados em média por 300 dias.

Os espectros eletrônicos de absorção foram obtidos de 200 a 850 nm.

3.3.8. Estudo do efeito de solventes para extratos de uva a partir de espectros eletrônicos de absorção

Uva foi a fruta utilizada no estudo do efeito de solventes extratores de ACYS, tendo sido testados água potável tratada, etanol 94% e etanol 94% acidificado com ácido acético 1%. Também foram estudadas variações nas condições de extração como a utilização do uso exclusivo das cascas da uva; uso de fruta inteira e aplicação de branqueamento (SAMPAIO, 2008).

Foram obtidos espectros eletrônicos de absorção de 400 a 800 nm de todos os extratos.

3.3.9. Processamento dos dados

Todos os dados experimentais foram obtidos em arquivos com formatos WSX e WAV.

Inicialmente os dados foram importados com o programa Origin 7.0 para montar as matrizes dos dados.

Quando métodos espectrofotométricos foram utilizados, montava-se a matriz dos dados espectrais (absorbâncias) com as amostras alocadas em linhas e as variáveis (comprimentos de onda) em colunas.

Para os dados cromatográficos e eletroforéticos, a matriz era montada utilizando-se dados das áreas dos picos (UA para cromatogramas e mUA para eletroferogramas) com as amostras alocadas em linhas e as variáveis (tempos de eluição e migração de cada ponto do cromatograma ou eletroferograma, respectivamente) em colunas.

Para os dados de espectros de massas a matriz era montada utilizando-se dados das intensidades das alturas dos picos (em porcentagem) com as amostras alocadas em linhas e as variáveis (razões massa/carga (m/z) dos compostos identificados) em colunas.

Na sequência, os dados eram transferidos para o programa Pirouette 4.0 para tratamento quimiométrico. Os espectros eletrônicos de absorção dos extratos foram centrados na média com validação cruzada e os espectros eletrônicos de reflectância difusa foram centrados na média e alisados com 5,0 pontos (flores) e 7,0 pontos (hortaliças) diretamente no Pirouette como pré-processamento. Os cromatogramas e os eletroferogramas foram autoescalados como pré-processamento. Para os espectros de massas não foram utilizados pré-processamentos.

O estudo de PCA e KNN visou identificar e classificar os extratos de acordo com as diferentes fontes estudadas. Os modelos de classificação representam uma opção de ferramenta para obtenção de dados para controle de qualidade e verificação de autenticidade dos extratos. Além disso, as ferramentas serviram para identificar solventes extratores de ACYS e avaliar perfis de envelhecimento de extratos de ACYS, buscando viabilizar a possibilidade de distinção da idade dos extratos e detalhes relacionados com a condição de armazenamento.

Os modelos de KNN obtidos com até dois vizinhos mais próximos sem erros de classificação foram posteriormente utilizados para validação, usando um conjunto de amostras externas, a fim de se obter o erro de previsão. A quantidade de amostras utilizadas para montar os conjuntos de treinamento e de validação externa, bem como o número de replicatas de cada medida vem descrita juntamente com a discussão de cada item na seção correspondente, a fim de tornar a leitura mais dinâmica.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As espécies vegetais utilizadas como amostras são distintas devido à composição diferenciada de ACYS individuais, além de diferentes concentrações de cada antocianina, determinadas por diversas técnicas analíticas. (MITCHELL *et al.*, 1998; DEGENHARDT *et al.*, 2000; OKUMURA *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2002; FAVARO, 2008; SAMPAIO, 2008; TAMURA *et al.*, 2010; TATSUZAWA *et al.*, 2010).

A composição distinta também pode ocorrer para exemplares de uma mesma espécie devido a fatores como condições de cultivo, tempo de plantio, exposição à radiação UV e método de colheita (FURLANI *et al.*, 1978; SIRIWOHARN *et al.*, 2004; SYVACY e SÖKMEN, 2004; PÔRTO, 2006; SFALCIN, 2009; MENNELLA *et al.*, 2010; MULABAGAL *et al.*, 2010; NUTRITIONAL INFORMATION, 2011).

Estes aspectos são relevantes para fundamentar a explicação da separação dos diferentes grupos como resultados dos modelos de classificação.

4.1. Identificação das espécies estudadas como fonte de ACYS

4.1.1. Dados de espectros eletrônicos de absorção de extratos aquosos de frutas

Para um conjunto de treinamento de 26 amostras de extratos aquosos de frutas e 401 variáveis (400 a 800 nm) foi realizado um estudo de PCA com os dados dos espectros eletrônicos de absorção obtidos. A Figura 35 apresenta o conjunto dos espectros utilizados no estudo.

Um modelo de classificação foi obtido com cinco fatores que explicaram 99,99 % da variância total. A Figura 36 apresenta o gráfico de escores de PC2 × PC1 onde pode ser observada a tendência da formação de seis grupos (A, B, C, D, E e F) que representam respectivamente as amostras de extratos aquosos de jabuticaba, amora, amora preta, jussara, jambolão e uva.

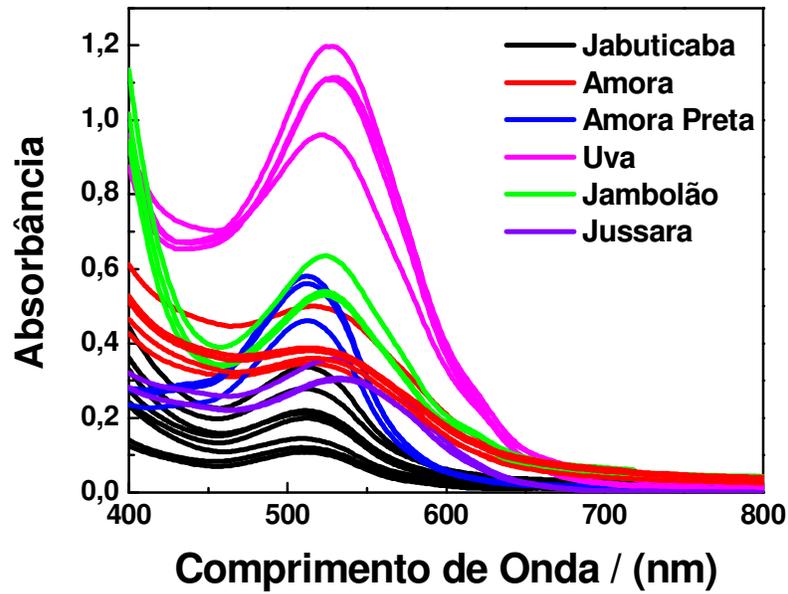


Figura 35. Conjunto de espectros eletrônicos de absorção das amostras de extratos aquosos de frutas.

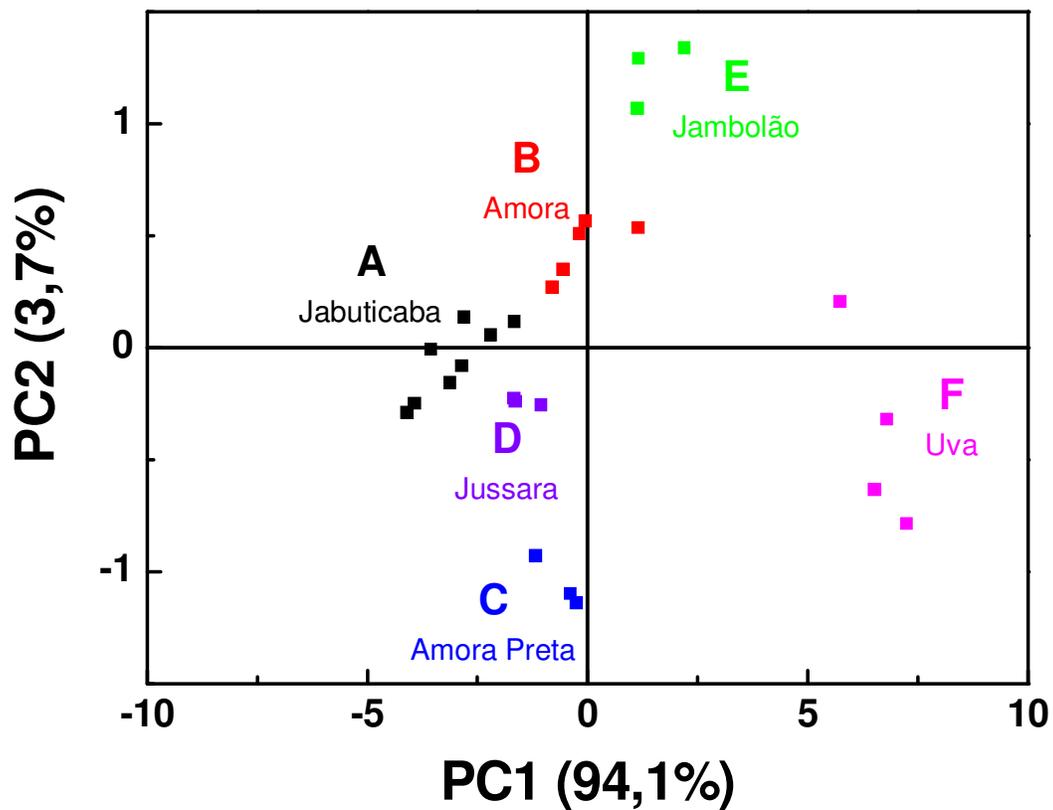


Figura 36. Gráficos de escores para PC1 × PC2 de extratos aquosos das frutas em estudo.

O gráfico de *outliers* mostrou a ausência dos mesmos considerando uma distância de Mahalanobis menor que 9,5 e resíduo de amostra menor que 0,005.

A Figura 37 mostra o gráfico de *loadings* que indica a região entre 500 e 550 nm, região de máxima absorção das ACYS, como responsável pela classificação das amostras de extratos aquosos de frutas.

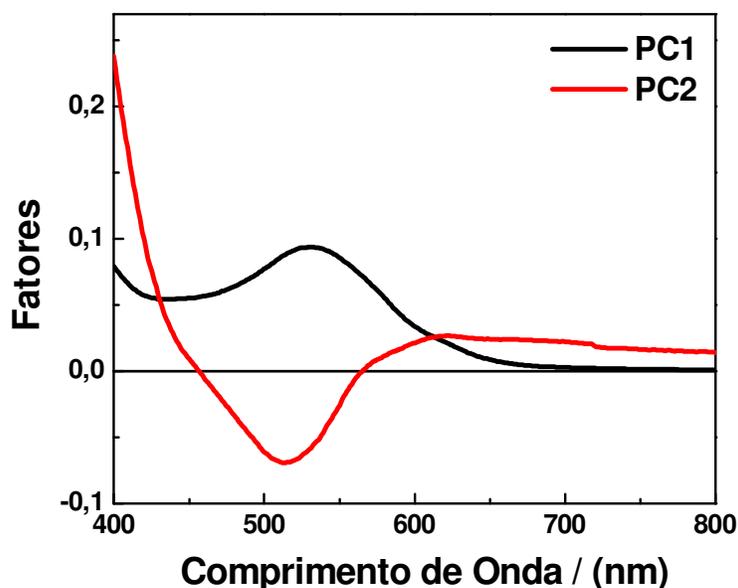


Figura 37. Gráfico de *loadings* para PC1 e PC2 de extratos aquosos das frutas em estudo.

Observando-se esse gráfico de *loadings* da Figura 37, foi possível notar que a região entre 600 e 800 nm apresenta pouca influência na classificação das amostras sendo uma informação coerente para análise de extratos de ACYS, pois não corresponde à região de máxima absorção das ACYS. Testes foram realizados buscando-se um modelo mais representativo do conjunto de treinamento, utilizando apenas a região entre 400 e 600 nm e o resultado da classificação não foi alterado. Portanto, optou-se por manter o uso dos dados do espectro de 400 a 800 nm para obtenção do modelo e posterior validação com amostras externas, pois reduz a etapa de seleção de variáveis que, por sua vez, não é trivial.

Outro estudo foi realizado extraíndo-se as amostras de extratos aquosos de uva do modelo para verificar a influência dessas amostras na separação por PC1 entre o grupo das amostras de uva e o grupo das demais amostras. O modelo obtido com o novo conjunto de treinamento com 22 amostras mostrou-se inferior ao modelo anterior, pois requeria um número maior de componentes principais (7 PCs) para explicar a mesma variância total.

Então, a partir dos resultados obtidos com o conjunto de treinamento inicialmente apresentado foi construído o modelo de classificação KNN para as amostras de extratos aquosos das frutas. Posteriormente, foi avaliado um conjunto de 13 amostras externas para validação deste modelo.

Os resultados mostraram que com até dois vizinhos mais próximos o modelo não apresenta erros de classificação, indicando ser robusto. Em seguida, foi analisado um conjunto de 13 amostras externas, obtendo-se acerto em 85 % dessas amostras. Portanto, o modelo de classificação obtido mostrou-se favorável para a caracterização de extratos aquosos de ACYS obtidos de diferentes frutas, o que indicou a possibilidade de identificar a fonte de um extrato de ACYS a partir de seu espectro eletrônico de absorção.

4.1.2. Dados de espectros eletrônicos de absorção de extratos alcoólicos de frutas

Para um conjunto de treinamento com 15 amostras de extratos alcoólicos obtidos em etanol 94 % e 401 variáveis (400 a 800 nm) foi realizado um estudo de PCA com os dados dos espectros eletrônicos de absorção obtidos. A Figura 38 apresenta o conjunto dos espectros utilizados no estudo e o modelo de classificação obtido com três fatores explica 99,46 % da variância total.

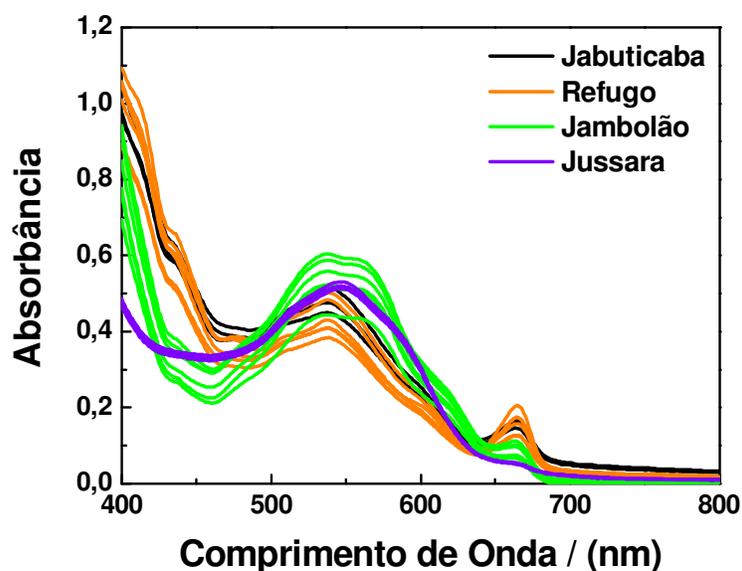


Figura 38. Conjunto de espectros eletrônicos de absorção das amostras de extratos alcoólicos de frutas.

No gráfico de escores PC3 × PC1 (Figura 39) pode ser observada a tendência da formação de quatro grupos (A, B, C e D) que representam respectivamente as amostras de extratos alcoólicos de jussara, jambolão, jabuticaba e refugo de jabuticaba (frutos não comercializáveis).

Além da separação observada por PC1 dos grupos das diferentes espécies de frutas estudadas, é possível verificar a tendência por PC3 da distinção da qualidade da fruta (grupos C e D, respectivamente para jabuticaba e refugo).

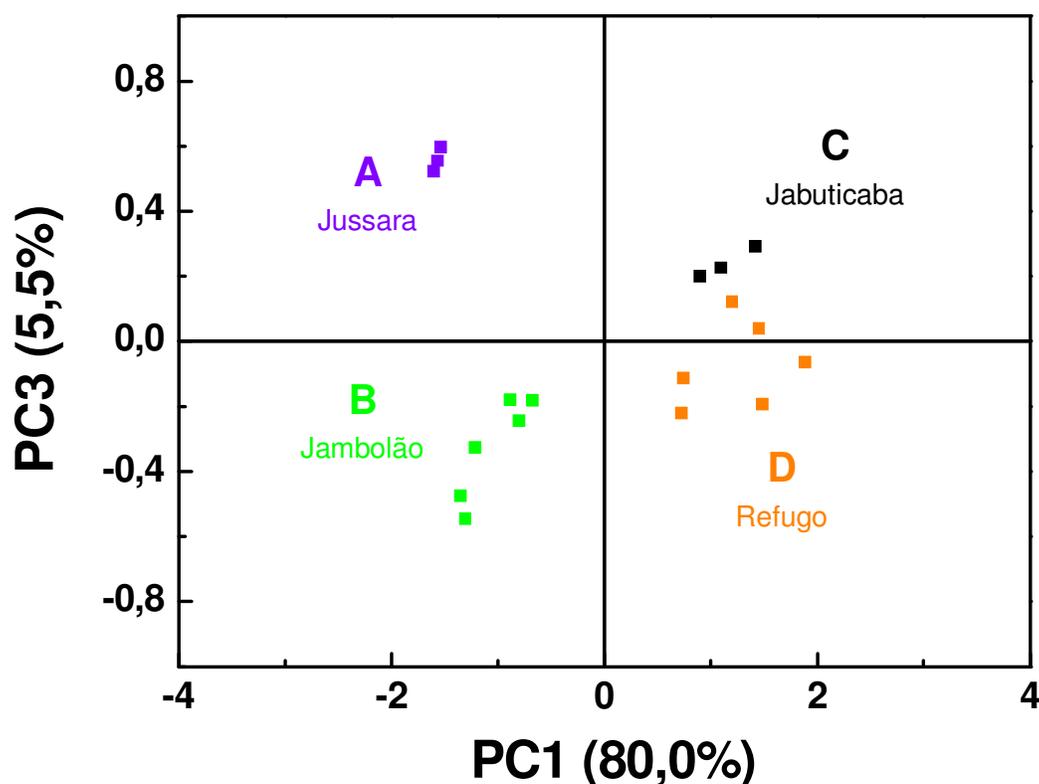


Figura 39. Gráfico de escores para PC1 × PC3 de extratos alcoólicos das frutas em estudo.

A separação dos grupos pode ser explicada pelo gráfico de *loadings* do modelo obtido (Figura 40), indicando que a região espectral relevante para separação em PC1 está entre 400 e 450 nm e 500 e 600 nm sendo coerente, pois as frutas estudadas possuem diferentes ACYS individuais em diferentes concentrações, o que está diretamente relacionado com as absorções nesta região do espectro eletrônico.

Em PC3 algumas faixas de comprimento de onda são relevantes para indicar a tendência de separação da qualidade dos frutos de jabuticaba, como pode ser observado na Figura 40. Uma hipótese seria que esses comprimentos de onda específicos estejam relacionados com a absorção de produtos de degradação eventualmente presentes nos extratos de refugo extraídos junto com as ACYS, o que não aconteceria nos extratos de jabuticaba, provavelmente menos afetado por processos de degradação.

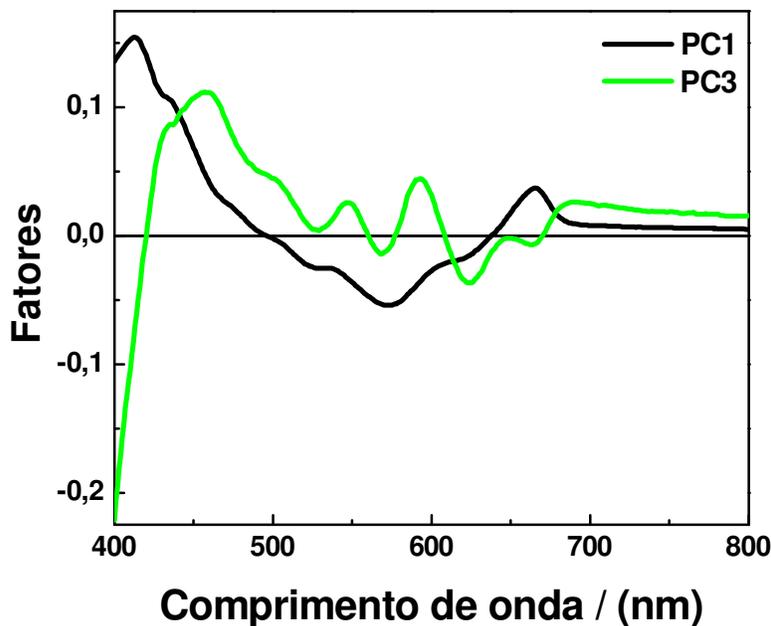


Figura 40. Gráfico de *loadings* para PC1 e PC3 de extratos alcoólicos das frutas em estudo.

Um modelo de classificação KNN foi construído e posteriormente foi avaliado um conjunto de amostras externas para validação deste modelo. Os resultados mostraram que, com até dois vizinhos, mais próximos o modelo não apresenta erros de classificação, indicando ser robusto.

Na validação deste modelo, com um conjunto de cinco amostras externas, obteve-se acerto em 80 % das amostras. Portanto, o modelo de classificação obtido mostrou-se adequado para a caracterização de extratos alcoólicos de ACYS obtidos de diferentes frutas, o que indicou a possibilidade de identificar a fonte de um extrato de ACYS a partir de seu espectro eletrônico de absorção.

4.1.3. Dados de espectros eletrônicos de absorção de extratos alcoólicos de flores

Estudos de PCA foram realizados para um conjunto de treinamento de 37 amostras de 1,0 mL de extratos alcoólicos (etanol 94 %) de flores acidificados com 2,0 mL de solução pH 2,0 e 631 variáveis (190 a 820 nm) com todos os espectros eletrônicos de absorção das amostras.

O conjunto dos espectros obtidos em solução de pH 2,0 está apresentado na Figura 41. Um modelo de classificação foi obtido com seis fatores que explicaram 99,13 % da variância total.

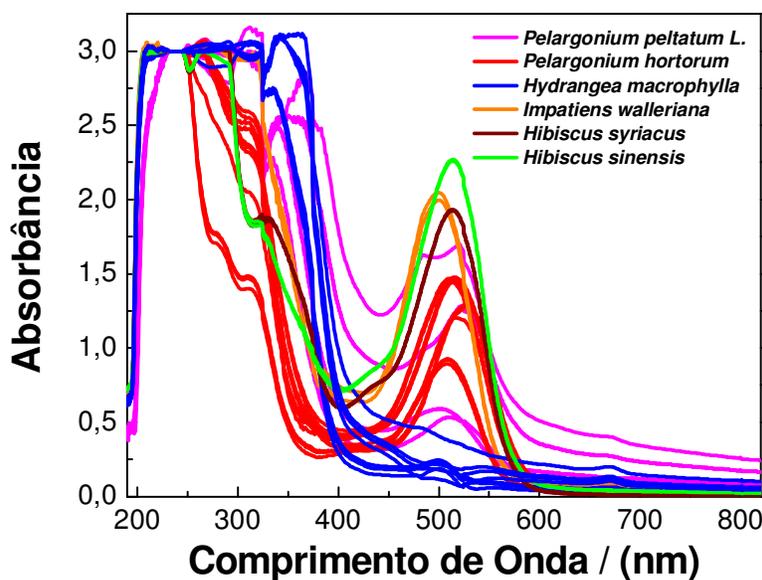


Figura 41. Conjunto de espectros eletrônicos de absorção obtidos para as amostras de extratos alcoólicos das flores estudadas.

Testou-se a construção de modelos com seleção de variáveis na região do espectro correspondente à região de máxima absorção de ACYS, entre 400 e 600 nm, mas o novo modelo não apresentou resultados diferentes para classificação das amostras de extratos alcoólicos acidificados de flores. Portanto, optou-se por manter o modelo anterior para continuidade dos estudos, pois apesar do ruído da região do espectro abaixo de 400 nm, os resultados de classificação não foram alterados.

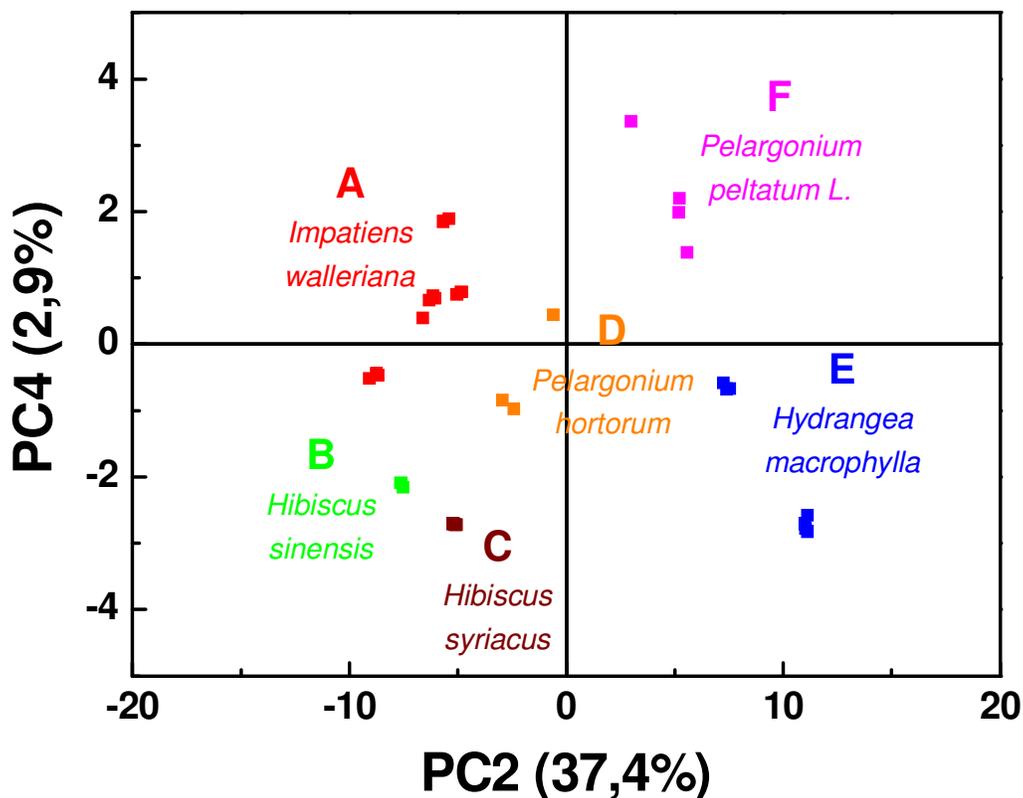


Figura 42. Gráfico de escores para PC2 × PC4 de extratos alcoólicos em pH 2,0 das amostras de flores.

No gráfico de escores PC2 × PC4 do modelo de PCA com seis fatores (Figura 42) puderam ser observados seis grupos (A a F). Os grupos representam, respectivamente, as amostras de extratos alcoólicos acidificados de beijo turco (*Impatiens walleriana*), hibisco (*Hibiscus sinensis*), hibisco (*Hibiscus syriacus*), gerânio (*Pelargonium hortorum*), hortênsia (*Hydrangea macrophylla*) e gerânio (*Pelargonium peltatum L.*).

A Figura 43 mostra o gráfico de *loadings* obtido para o modelo PCA do estudo das amostras de extratos alcoólicos acidificados de flores. A separação obtida em PC2 pode estar relacionada com diferentes concentrações de ACYS nas amostras, pois a região entre 500 e 550 nm relaciona-se com esta informação. Não foi possível encontrar dados sobre a composição dos extratos dessas flores nem realizar a caracterização experimental para justificar a separação das classes. Entretanto foi possível observar que a coloração era visivelmente diferente assim como a textura das pétalas, o que pode indicar relação com os fatores relevantes para a separação das classes.

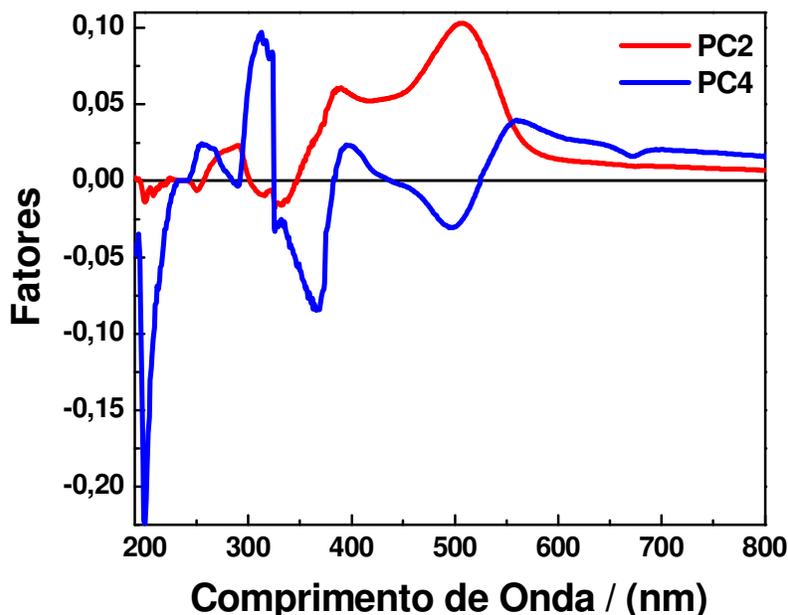


Figura 43. Gráfico de *loadings* para PC2 e PC4 de extratos alcoólicos das flores em estudo.

Com esses resultados foi construído o modelo de classificação KNN para as amostras de flores e posteriormente avaliado um conjunto de 16 amostras externas para validação do modelo. Os resultados mostraram que com até dois vizinhos mais próximos o modelo não apresenta erros de classificação, indicando ser robusto. Posteriormente, foi analisado um conjunto de 16 amostras externas, obtendo-se acerto em 69 % dessas amostras.

4.1.4. Dados de espectros eletrônicos de absorção de extratos alcoólicos de hortaliças

Estudos de PCA foram realizados para um conjunto de treinamento de 29 amostras de extratos alcoólicos de hortaliças obtidos em etanol 94 % e 471 variáveis (350 a 820 nm) com todos os espectros eletrônicos de absorção das amostras.

A Figura 44 mostra os espectros de absorção típicos de extratos alcoólicos brutos e acidificados com solução de pH 2,0 de hortaliças e pode-se observar uma diferença significativa no perfil do espectro eletrônico de absorção dos extratos brutos e acidificados. Isto, pode ser explicado devido a mudanças nas estruturas das ACYS com variação do pH da solução (Figura 4) visto que, em meio ácido, prevalece o cátion flavílico sendo esta a estrutura mais estável das ACYS. Optou-se pelo uso de solução de extratos de ACYS em pH 2,0 pois, nessa condição, a coloração da espécie predominante é intensa e favorece a manipulação de soluções mais diluídas.

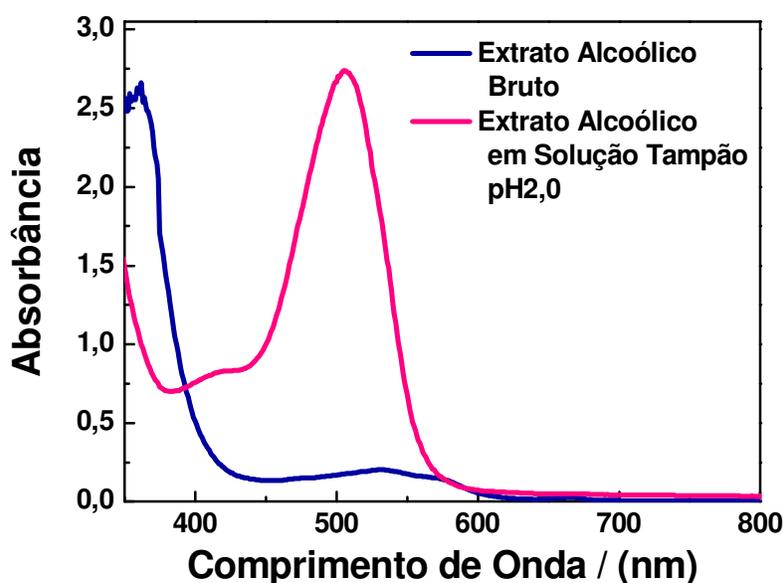


Figura 44. Espectros eletrônicos de absorção típicos obtidos para as amostras de extratos de hortaliças nas duas condições estudadas.

O conjunto dos espectros obtidos está apresentado na Figura 45 para as duas condições estudadas **(a)** extrato alcoólico bruto e **(b)** extrato alcoólico em solução de pH 2,0. Os estudos de PCA resultaram num modelo de classificação com cinco fatores que explicaram 99,62 % da variância total.

No gráfico de escores PC1 × PC4 do modelo de PCA com cinco fatores para visualização das diferentes fontes de ACYS (Figura 46) podem ser observados nove grupos (A a I).

Os grupos A, B, C, D e E, representam, respectivamente, as amostras de extratos alcoólicos brutos de rabanete, cebola roxa, repolho roxo, alface roxa e berinjela. Enquanto os grupos F, G, H e I representam as amostras de extratos alcoólicos diluídos em solução de pH 2,0 de rabanete, cebola roxa, repolho roxo e berinjela.

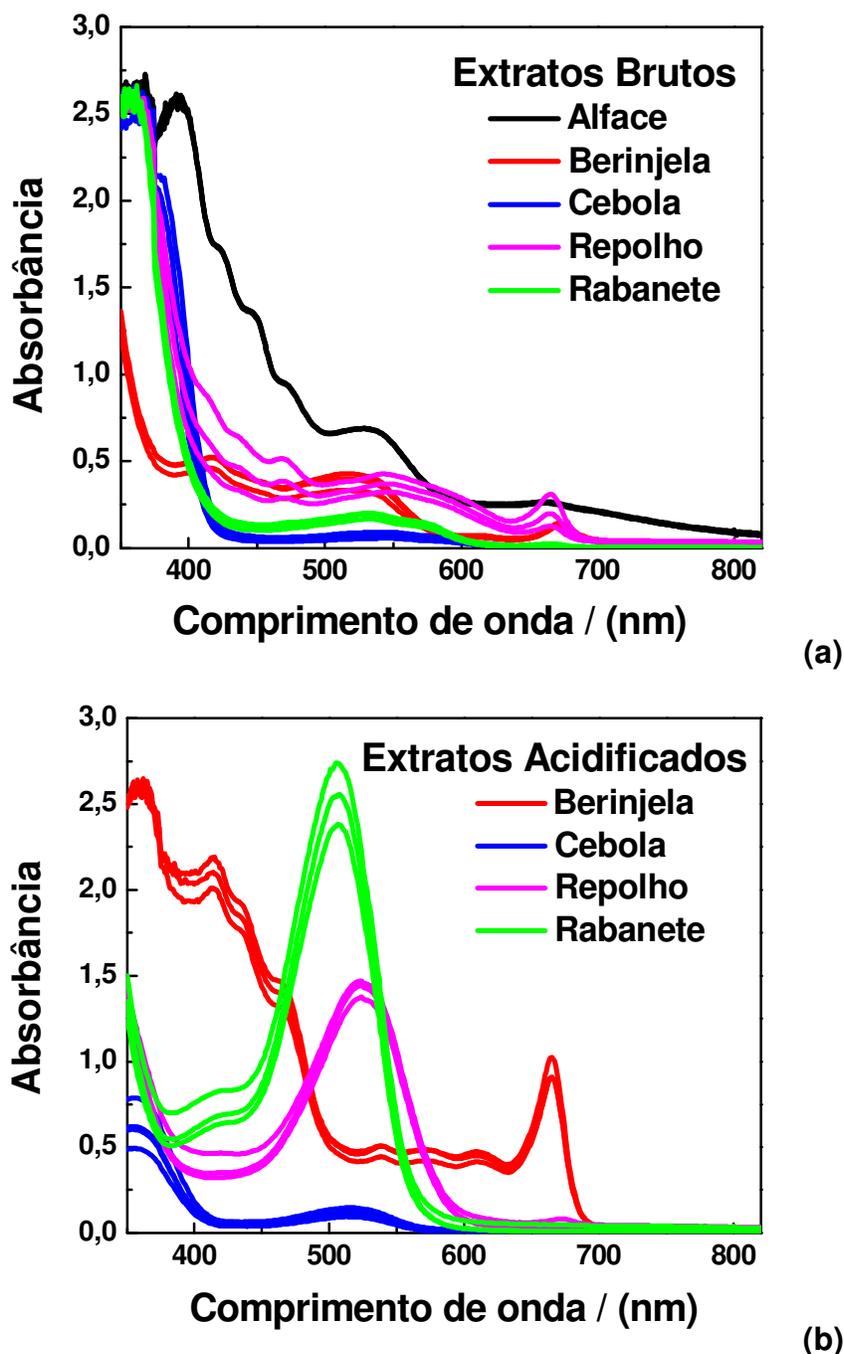


Figura 45. Conjunto de espectros eletrônicos de absorção das amostras de extratos alcoólicos brutos (a) e acidificados (b) de hortaliças.

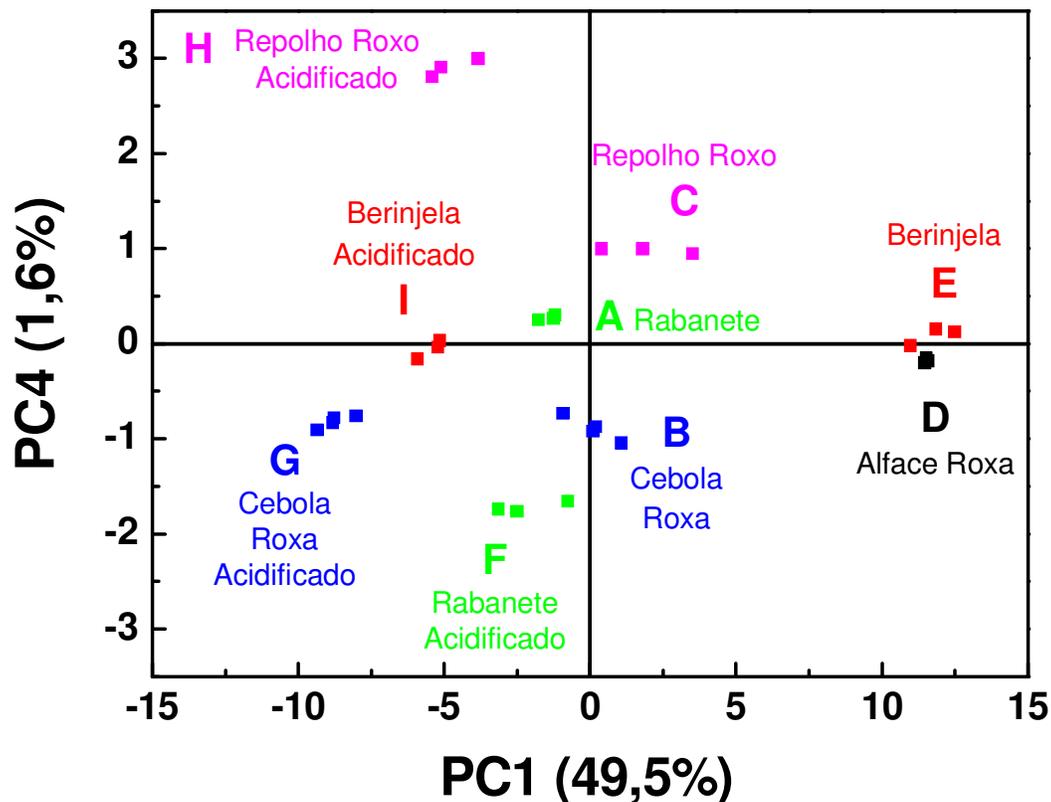


Figura 46. Gráfico de escores para PC1 × PC4 de extratos alcoólicos brutos e acidificados das amostras de hortaliças estudadas.

A Figura 47 mostra o gráfico de escores PC1 × PC4 do modelo de PCA com cinco fatores para visualização das condições de diluição do extrato. Pode-se observar a tendência de formação de dois grupos (A e B) separados pela PC1. O grupo A representa as amostras de extratos alcoólicos brutos das hortaliças e o grupo B representa as amostras de extratos alcoólicos diluídos em solução de pH 2,0.

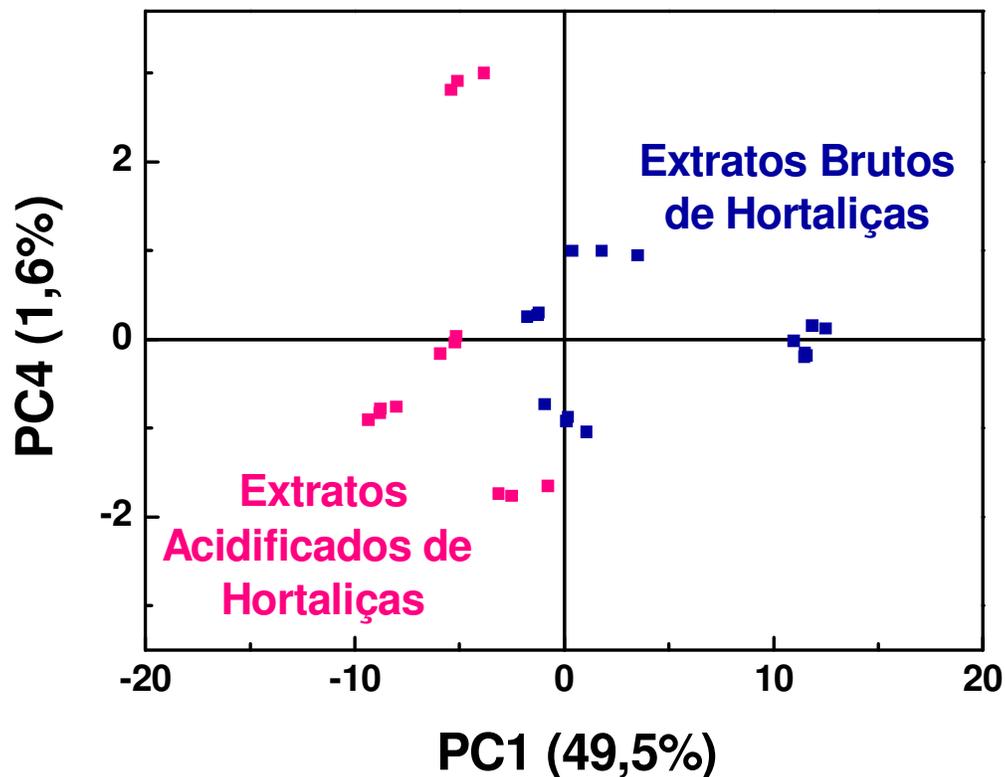


Figura 47. Gráfico de escores para PC1 × PC4 de extratos alcoólicos das amostras de hortaliças com separação das condições de diluição dos extratos.

A Figura 48 mostra o gráfico de *loadings* do modelo de PCA para as amostras de extratos alcoólicos brutos e acidificados de hortaliças. As regiões do espectro relevantes para a separação de grupos em PC4 estão entre 350 e 400 nm e 500 e 550 nm, esta última relacionada ao λ_{\max} de ACYS, região de absorção da forma mais estável típica das soluções com coloração vermelha. Em PC1, a região de maior relevância para a classificação das amostras nos grupos de extratos brutos e acidificados está localizada entre 350 e 450 nm, o que indica a potencialidade de métodos quimiométricos na detecção de regiões espectrais importantes, porém sem relação direta com os compostos estudados, o que causa estranheza.

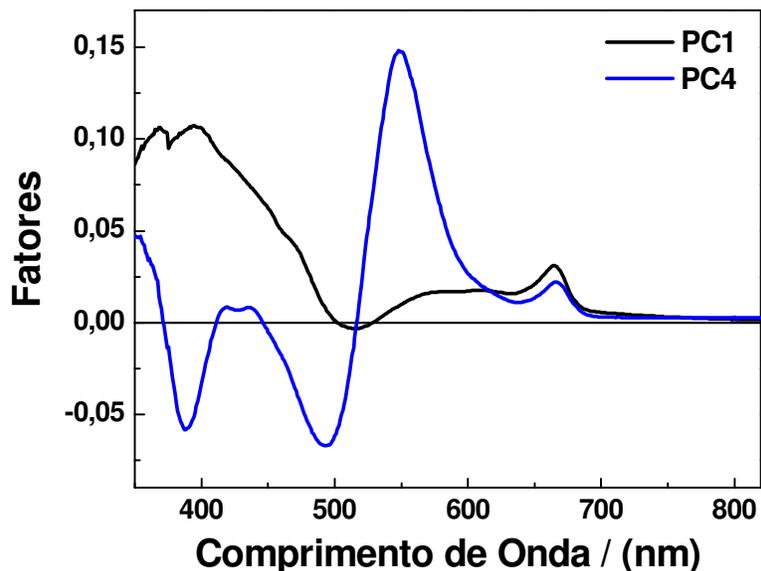


Figura 48. Gráfico de *loadings* para PC1 e PC4 de extratos das hortaliças em estudo.

O modelo de classificação obtido mostrou-se robusto, com duas classificações simultâneas. A primeira classificação separou as amostras de acordo com a fonte de ACYS. Outra classificação permitiu distinguir as condições iniciais dos extratos: extratos alcoólicos brutos ou extratos alcoólicos acidificados em pH 2,0.

O modelo de classificação KNN não apresentou erros de classificação com até dois vizinhos mais próximos e, então, foi validado com um conjunto de oito amostras externas tendo sido obtido 88 % de acerto nas amostras de extratos de hortaliças, o que pode confirmar a robustez do modelo com duas classificações simultâneas.

4.1.5. Dados de espectros eletrônicos de reflectância difusa de flores

Um conjunto de treinamento de 35 amostras de flores e 316 variáveis (cinco ou seis replicatas) foi analisado utilizando-se a ferramenta de PCA com todos os espectros eletrônicos de reflectância difusa (Figura 49) obtidos diretamente das pétalas das amostras. Um modelo de classificação com oito fatores foi obtido, explicando 91,26 % da variância total.

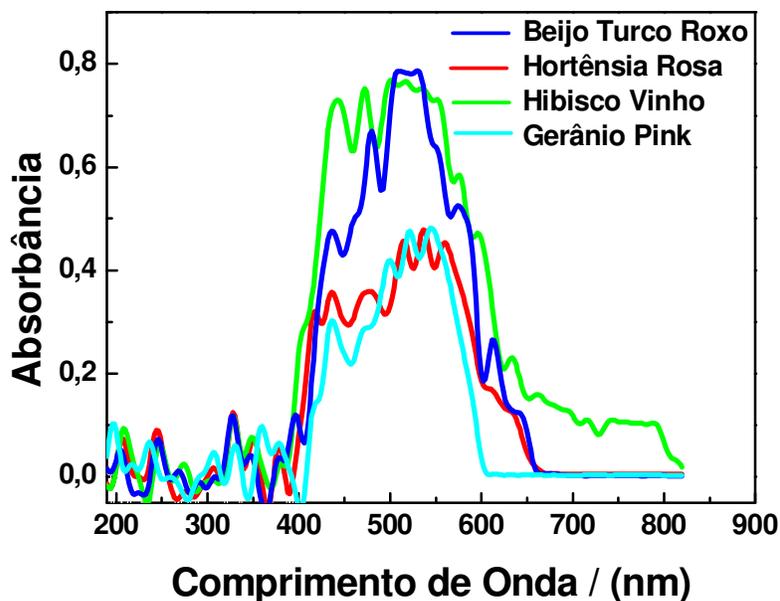


Figura 49. Espectros eletrônicos de reflectância difusa das amostras de flores.

No gráfico de escores PC1 × PC2 do modelo de PCA com oito fatores (Figura 50) podem ser observados sete grupos (de A a G) que representam respectivamente as amostras de hortênsia azul, hortênsia rosa, hibisco vinho, gerânio vermelho, beijo turco rosa, gerânio laranja e beijo turco laranja claro. Além da separação das espécies, também foi possível obter a separação das flores de mesma espécie com diferentes colorações. Isso pode ser observado no caso das flores da espécie *Impatiens walleriana* (beijo turco) que possuem cores variadas, porém muitas vezes parecidas visualmente.

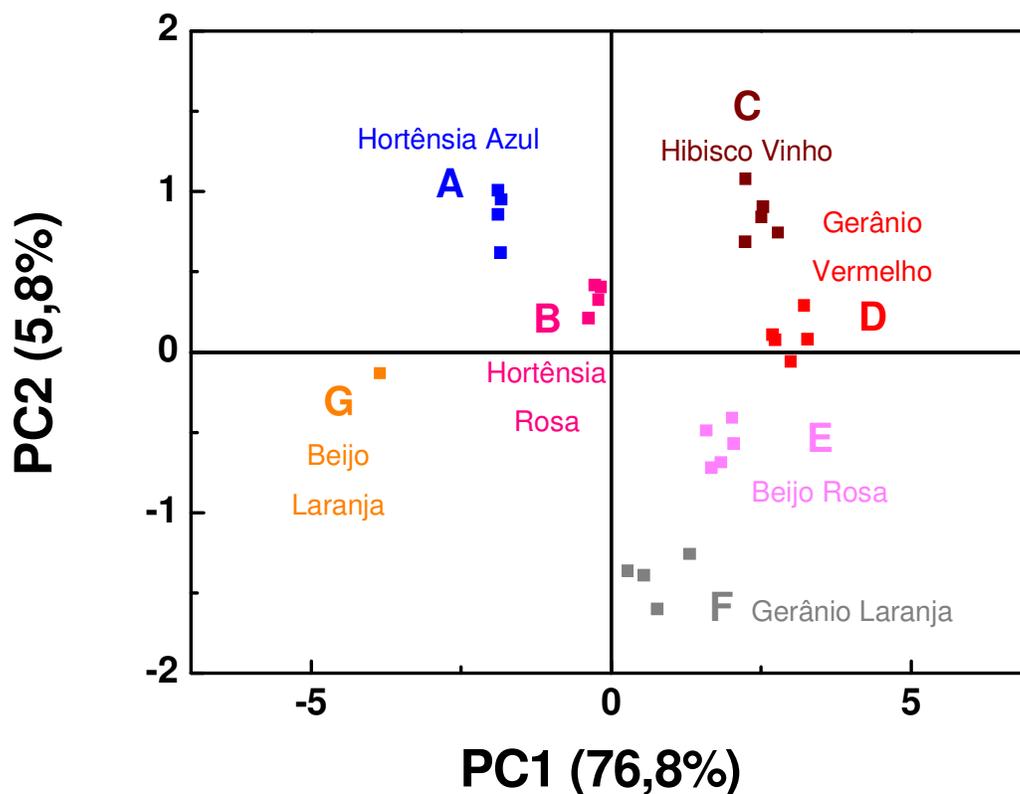


Figura 50. Gráfico de escores para PC1 × PC2 dos espectros eletrônicos de reflectância difusa das amostras de flores estudadas.

A Figura 51 mostra o gráfico de *loadings*, no qual se nota que tanto em PC1 como em PC2 a região entre 450 e 650 nm é relevante na classificação das amostras que pode estar relacionada com a presença de diferentes ACYS em concentrações diferentes. Porém para confirmar essa hipótese são necessárias informações de caracterização dos extratos que ainda não foi possível obter neste trabalho. Além disso, PC2 indica outra região do espectro (entre 600 e 650 nm) com informações relevantes para separação dos grupos das amostras de extratos de flores. Isto pode estar relacionado com a presença de clorofila no extrato, pois o que se costuma chamar de flores, no caso das hortênsias, na verdade, são folhas modificadas.

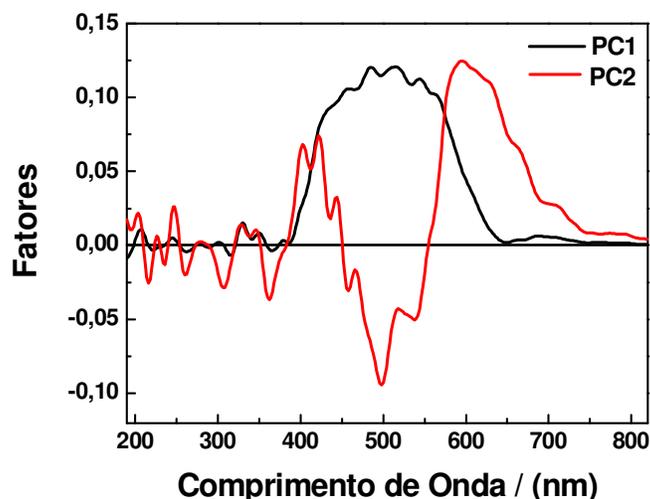


Figura 51. Gráfico de *loadings* para PC1 e PC2 dos espectros eletrônicos de reflectância difusa das amostras de flores estudadas.

O gráfico de *loadings* obtido (Figura 51) indica que a região do espectro em 500 nm contribuiu amplamente para as separações obtidas pelas PC2 e PC1 (Figura 50), o que é coerente com o λ_{\max} de ACYS. A separação desses grupos pode ser explicada, pois cada amostra possui composição distinta de ACYS individuais, além de diferentes concentrações de cada ACYS (MENNELLA *et al.*, 2010). Posteriormente, para avaliar e validar o modelo obtido foi aplicado o método de reconhecimento de padrões, KNN, em um conjunto de seis amostras externas, obtendo-se acerto em 83,33 % das amostras. Isto indicou a relevância da aplicação de ferramentas quimiométricas em dados de espectros eletrônicos de reflectância difusa para identificação de flores contendo ACYS.

4.1.6. Dados de espectros eletrônicos de reflectância difusa de hortaliças

Inicialmente, foram realizados estudos de PCA para um conjunto de treinamento de 24 amostras e 316 variáveis (5 ou 6 replicatas de cada amostra) de hortaliças com todos os espectros eletrônicos de reflectância difusa (Figura 52) obtidos diretamente das superfícies coloridas das amostras (cascas de rabanete, berinjela e cebola roxa e folhas de alface roxa e repolho roxo). A Figura 53 mostra o gráfico de escores obtidos para PC2 × PC3, no qual podem ser observados cinco grupos bem distintos (A, B, C, D e E), que representaram respectivamente as amostras de berinjela, alface roxa, cebola roxa, rabanete e repolho roxo.

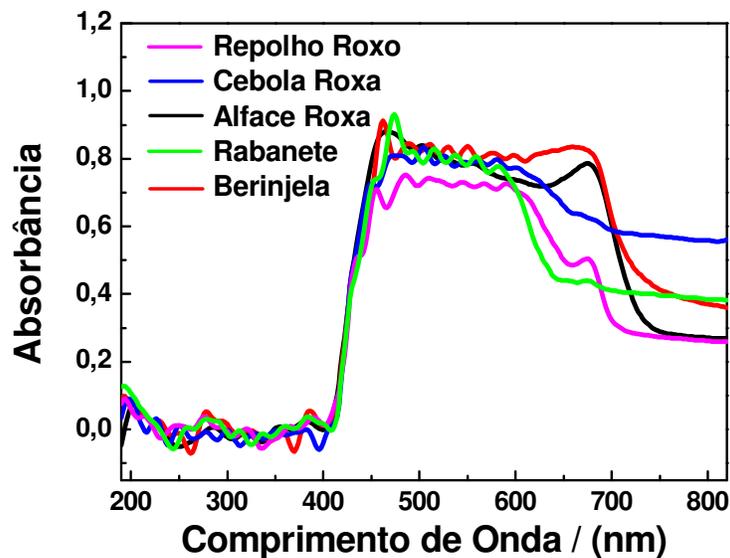


Figura 52. Espectros eletrônicos de reflectância difusa obtidos para as amostras de hortaliças em estudo.

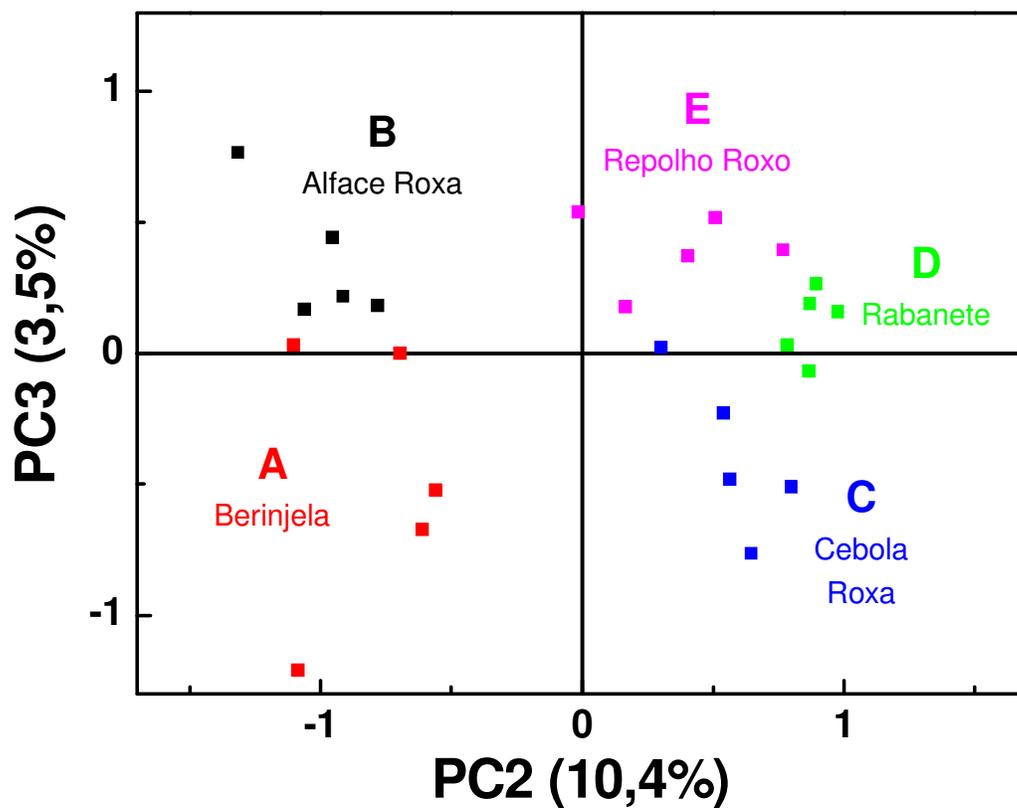


Figura 53. Gráfico de escores para PC2 x PC3 dos espectros eletrônicos de reflectância difusa das amostras de hortaliças estudadas.

Buscou-se construir um modelo KNN para posterior validação com amostras externas, mas não foi possível ajustar um modelo que representasse todo o conjunto de dados sem erros de classificação. Assim, não foi possível validar amostras externas para este conjunto de dados e por isso foram realizados novos estudos de PCA com redução do conjunto de amostras de treinamento, com os resultados apresentados na sequência.

Com um novo conjunto de treinamento de 11 amostras e 316 variáveis, um modelo de classificação com cinco fatores que explicam 95,05 % da variância total foi obtido. No gráfico de escores PC1 × PC2 desse modelo de PCA (Figura 54) podem ser observados três grupos (A, B e C) que representam respectivamente as amostras de rabanete, berinjela e cebola roxa. A partir deste modelo foi construído um modelo KNN e posteriormente foram avaliadas cinco amostras externas sem erros de classificação do modelo. Porém os modelos PCA e KNN obtidos envolveram um conjunto de treinamento muito reduzido, que não permitiu obter um modelo robusto de identificação de amostras de hortaliças a partir de seus espectros eletrônicos de reflectância difusa.

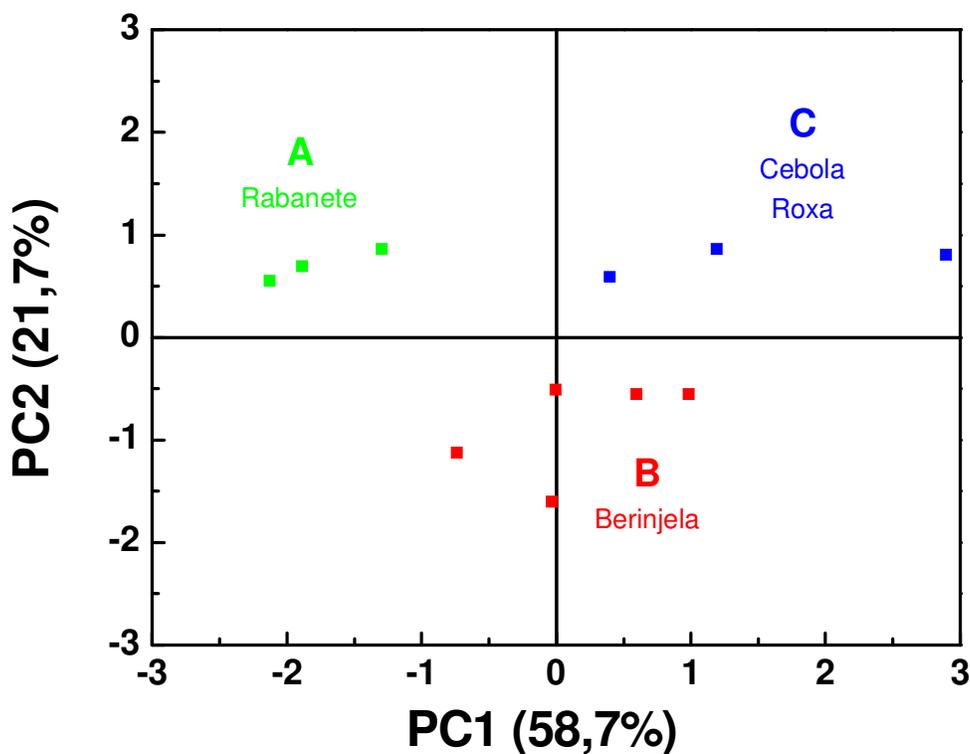


Figura 54. Gráfico de escores para PC1 × PC2 dos espectros eletrônicos de reflectância difusa das amostras de rabanete, berinjela e cebola roxa.

Pode-se associar a falta de ajuste dos modelos incluindo todas as espécies vegetais a dificuldades inerentes à obtenção de espectros eletrônicos de reflectância difusa diretamente das amostras dessas espécies, visto que a matriz problema incluiu hortaliças carnudas e folhosas. Além disso, aspectos como irregularidade na superfície e dispersão de ACYS podem introduzir variações nos dados que não são modeláveis satisfatoriamente ou que requerem um conjunto maior de dados para modelagem adequada. Considerando as vantagens da técnica de reflectância, é recomendável expandir o conjunto de treinamento para modelagem, incluindo ajustes de condições para melhorar a qualidade dos espectros eletrônicos de reflectância difusa das amostras dessas espécies, e tentar estabelecer um modelo de classificação.

4.1.7. Dados de cromatogramas de extratos de frutas obtidos por HPLC

Para um conjunto de treinamento de 30 amostras e 4679 variáveis, foram realizados estudo de PCA com todos os cromatogramas obtidos com detecção em 525 nm (Figura 55).

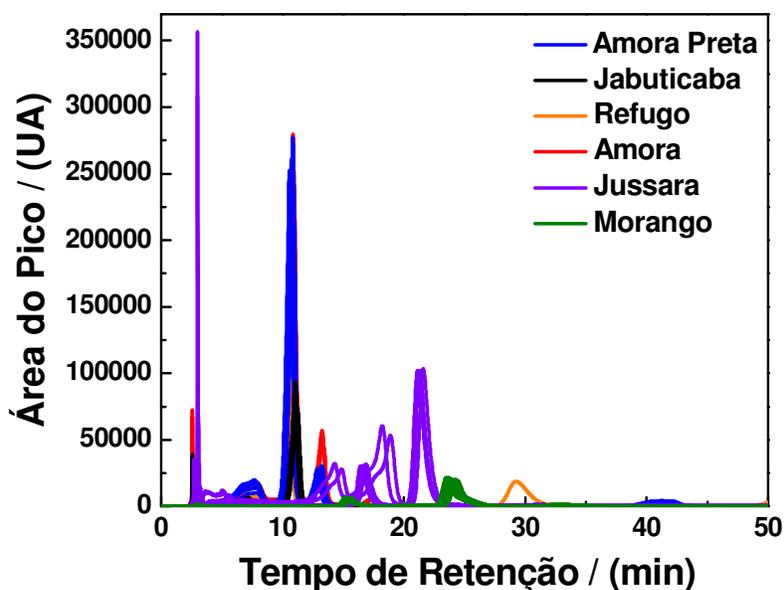


Figura 55. Conjunto de cromatogramas obtidos para as amostras de frutas em estudo.

Foi possível obter um modelo de classificação com quatro fatores que explicaram 97,72 % da variância total.

No gráfico de escores PC2 × PC5 (Figura 56), podem ser observados seis grupos (A, B, C, D, E e F) que representam respectivamente as amostras de jussara, morango, jabuticaba, refugio de jabuticaba (frutos não comercializáveis), amora e amora preta. Além da separação em grupos das diferentes espécies estudadas como fontes de ACYS por PC2, foi possível distinguir a qualidade da fruta (grupos C e D, respectivamente para jabuticaba e refugio) por PC5. Esta separação pode ser entendida pelas contribuições diferenciadas da composição distinta do extrato de cada fruta em termos de ACYS individuais (SAMPAIO, 2008).

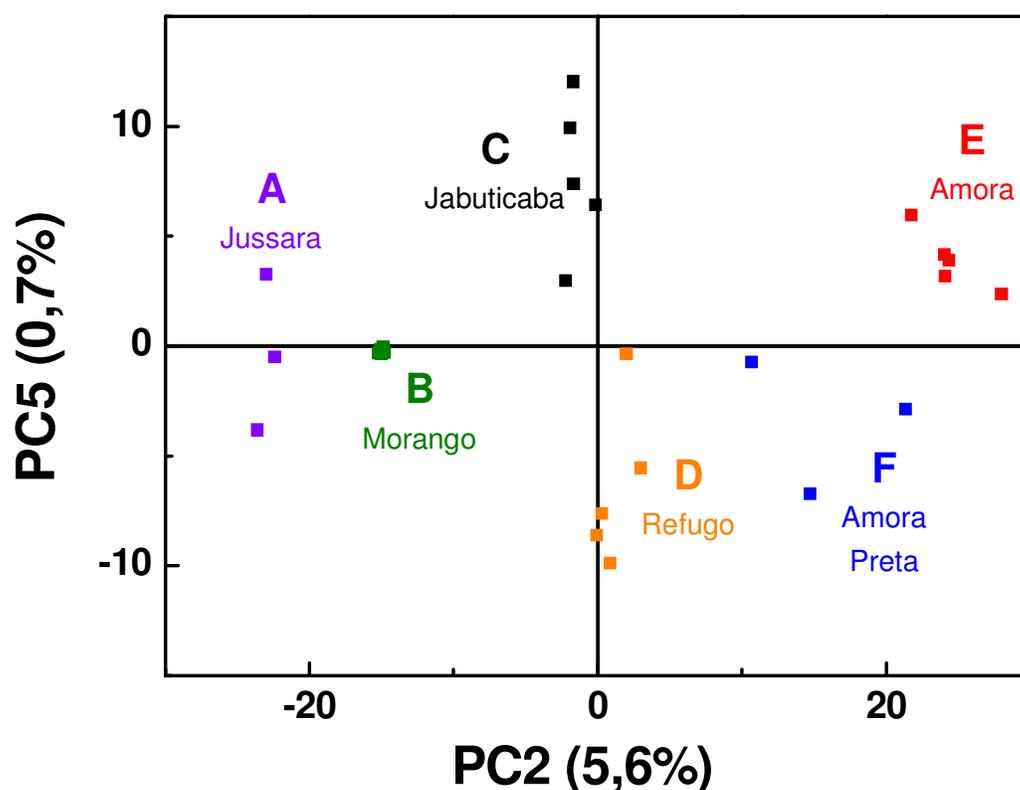


Figura 56. Gráfico de escores para PC2 × PC5 de extratos das frutas em estudo.

A Figura 57 mostra o gráfico de *loadings* em que pode ser observada a contribuição do tempo de retenção característico da cianidina 3-glicosídeo (aproximadamente 11 minutos), antocianina majoritária na maioria das amostras estudadas, como responsável pela separação das amostras em PC5.

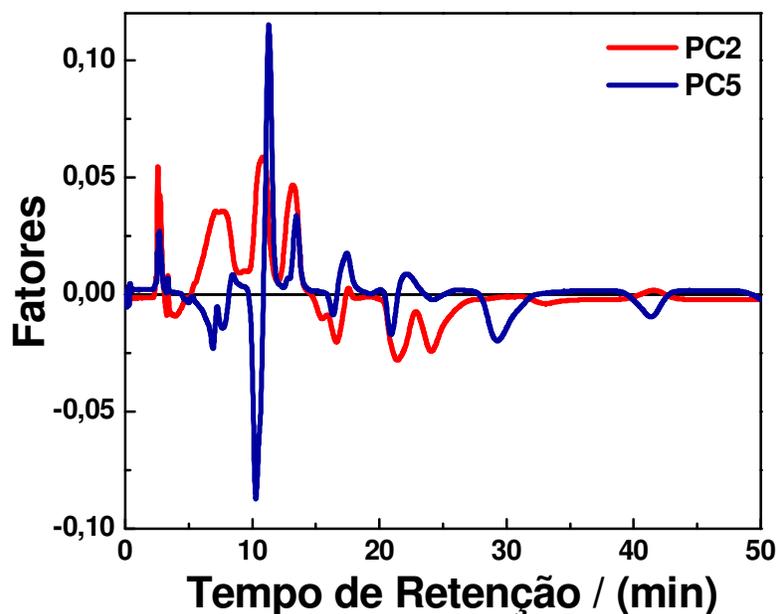


Figura 57. Gráfico de *loadings* para PC2 e PC5 de extratos das frutas em estudo.

Para criação de um modelo de classificação para as amostras, foi aplicado o método de reconhecimento de padrões KNN. Os resultados mostraram que com até quatro vizinhos mais próximos o modelo não apresenta erros de classificação, indicando sua robustez. Posteriormente, foi analisado um conjunto de 10 amostras externas para validação do modelo, obtendo-se acerto em 90 % das amostras. Portanto, este modelo de classificação pode ser considerado adequado para a identificação de fontes de ACYS a partir dos cromatogramas (detecção em 525 nm) de seus extratos alcoólicos e HPLC.

4.1.8. Dados de eletroferogramas de extratos de frutas obtidos por MEKC

Para análise por CE foram testados diferentes eletrólitos, condições de diluição das amostras e dos eletrólitos em questão, diâmetro do capilar com comprimento efetivo de 56 cm, temperatura de análise. Para as análises foi aplicada uma voltagem de 30 kV.

Os melhores resultados foram obtidos nas seguintes condições:

- Condição da dissolução da amostra antes da injeção: em eletrólito;
- Concentrações de eletrólitos em água deionizada: borato de sódio (30 mmol L^{-1}) e SDS (100 mmol L^{-1});
- Diâmetro do capilar: $50 \text{ }\mu\text{m}$;
- Temperatura da análise: $20 \text{ }^\circ\text{C}$.

As condições escolhidas para continuidade do trabalho levaram em consideração a migração das ACYS, visto que em outras condições testadas não foram observados picos referentes a esses compostos no eletroferograma. A Figura 58 apresenta o eletroferograma obtido nas melhores condições para uma amostra de extrato bruto de jussara diluído (100 mmol L^{-1}) em eletrólito para injeção no equipamento.

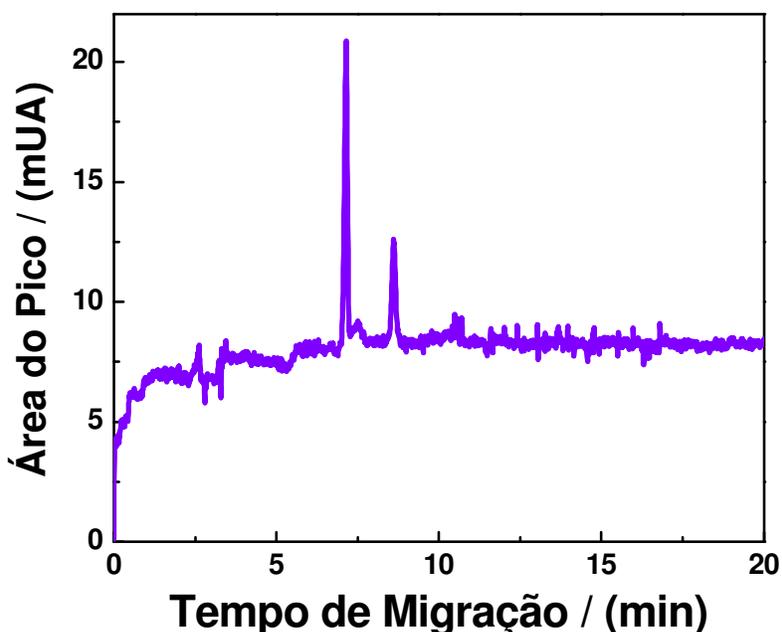


Figura 58. Eletroferograma para amostra de extrato bruto de jussara.

A Figura 59 apresenta o conjunto dos eletroferogramas obtidos para as amostras de extratos de frutas em eletrólito. Foram realizados estudos de PCA com os dados obtidos com um conjunto de treinamento de 37 amostras e 2995 variáveis (tempos de migração), tendo sido obtido um modelo com oito fatores que explicaram 91,65 % da variância total.

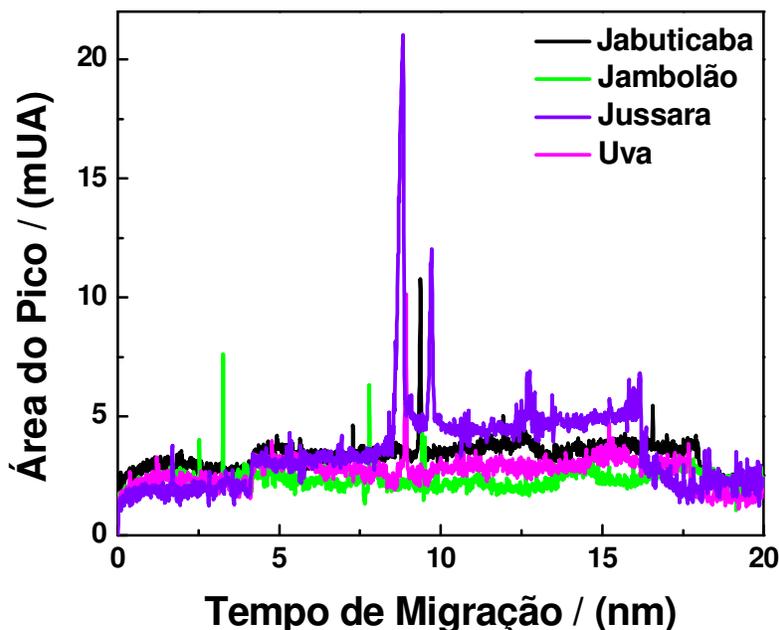


Figura 59. Conjunto de eletroferogramas das amostras de extratos de frutas estudadas.

No gráfico de escores PC1 × PC4 (Figura 60) pode ser observada a tendência da formação de quatro grupos (A, B, C e D) que representam respectivamente as amostras de extratos de jambolão, jabuticaba, uva e jussara.

A separação dos grupos pode ser explicada pelo gráfico de *loadings* do modelo obtido (Figura 61), indicando que a região do eletroferograma relevante para separação obtida tanto em PC quanto em PC4 (aproximadamente 8,5 minutos) está relacionada com a presença de cianidina 3-glicosídeo, que é a antocianina majoritária na maioria das frutas estudadas. Isto foi confirmado com a adição de padrão numa amostra de extrato de jussara em conjunto com estudos anteriores do GPQUAE (BRITO, 2007; SHIMAMOTO e ROSSI, 2009) que identificaram as ACYS presentes em extratos de jussara.

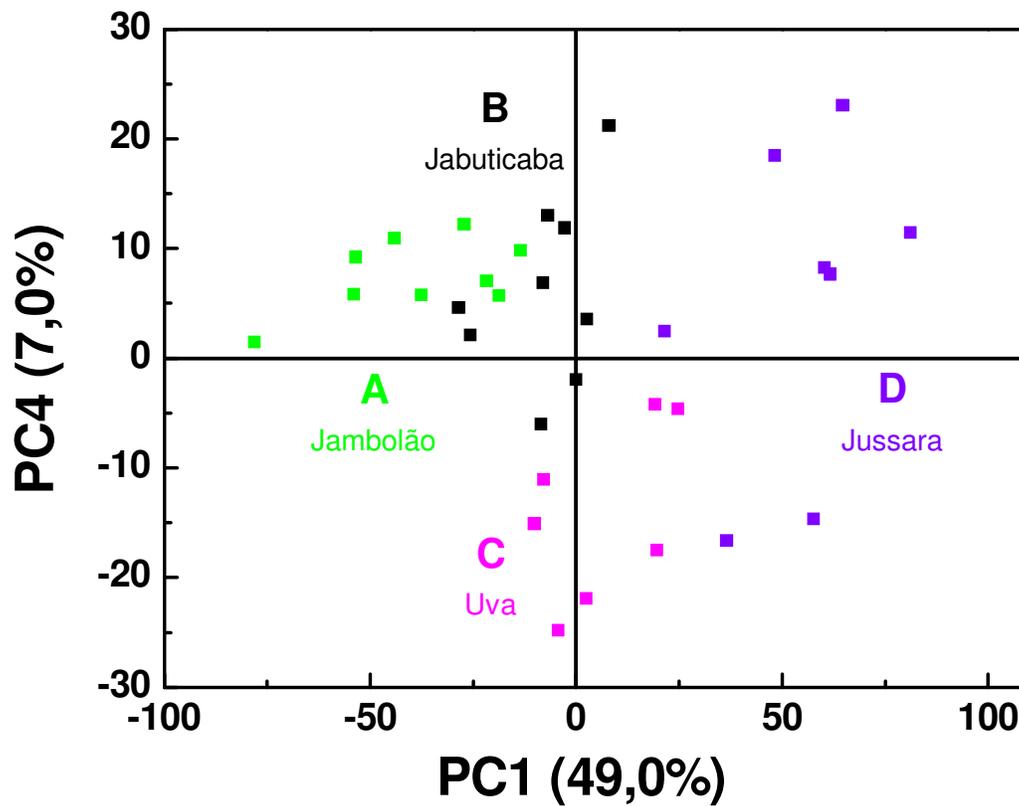


Figura 60. Gráfico de escores para PC1 × PC4 de extratos de jambolão, jaboticaba, uva e jussara.

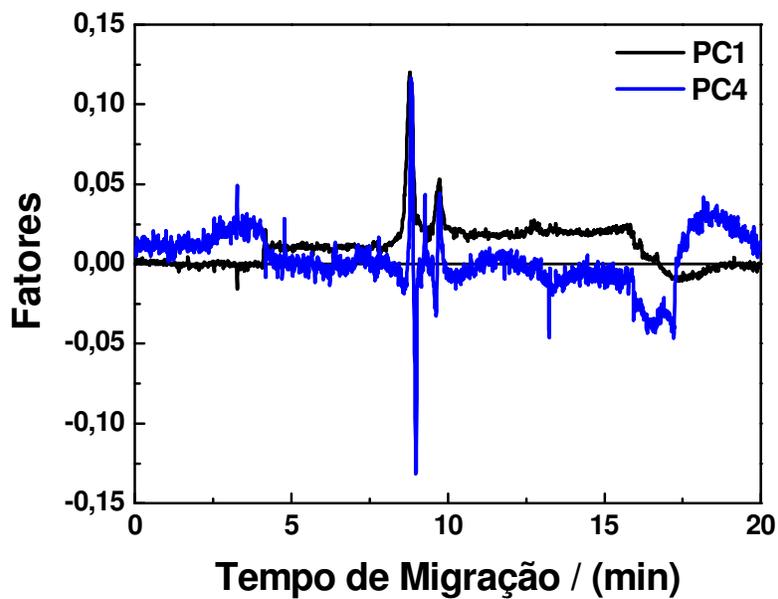


Figura 61. Gráfico de loadings para PC1 e PC4 de extratos das frutas em estudo.

Um modelo de classificação KNN foi construído e posteriormente foi avaliado um conjunto de sete amostras externas para validação deste modelo. Os resultados mostraram que, com até dois vizinhos, mais próximos o modelo não apresenta erros de classificação, indicando ser robusto.

Na validação deste modelo, com um conjunto de sete amostras externas, obteve-se acerto em 86 % das amostras. Portanto, o modelo de classificação obtido mostrou-se adequado para a caracterização de extratos de ACYS obtidos de diferentes frutas, o que indicou a possibilidade de identificar a fonte de um extrato de ACYS a partir de seu eletroferograma obtido por MEKC.

4.1.9. Dados de espectros de extratos de frutas obtidos por MS

Foram realizados estudos de PCA para um conjunto de treinamento de 122 amostras e 1908 variáveis, com todos os espectros de massas obtidos das amostras de extratos de frutas. Diante da dificuldade de visualização dos espectros sobrepostos em conjuntos, apresentam-se separadamente alguns espectros de massas obtidos para ilustrar os dados utilizados para os estudos de PCA (Figuras 62, 63, 64).

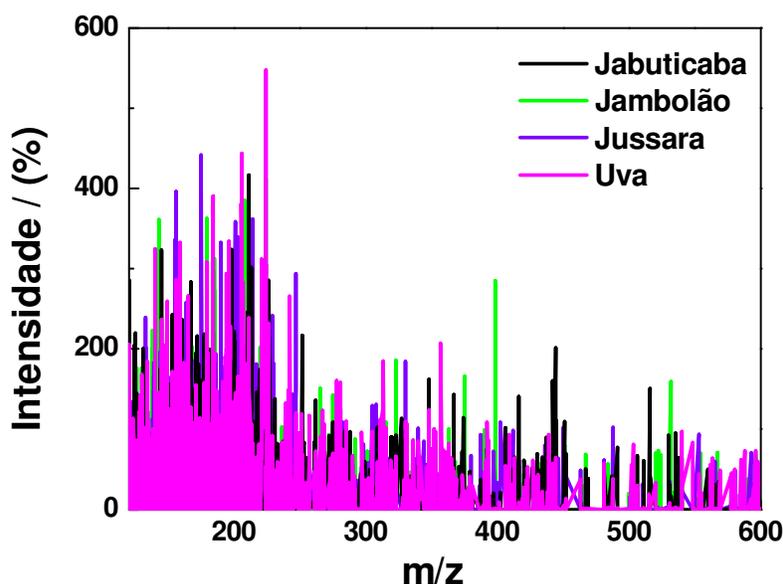


Figura 62. Parte do conjunto de espectros de massas obtidos para as amostras de extratos de frutas em estudo.

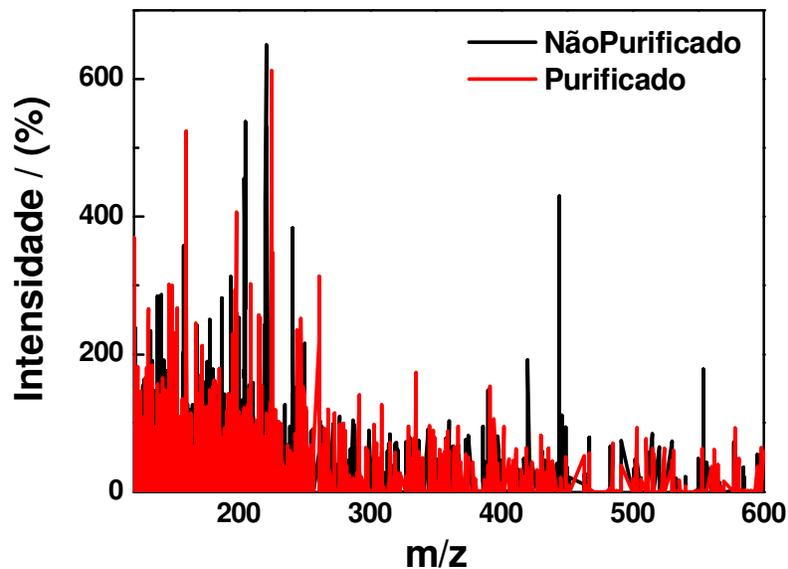


Figura 63. Parte do conjunto de espectros de massas obtidos para as amostras de extratos de frutas purificados e sem purificação.

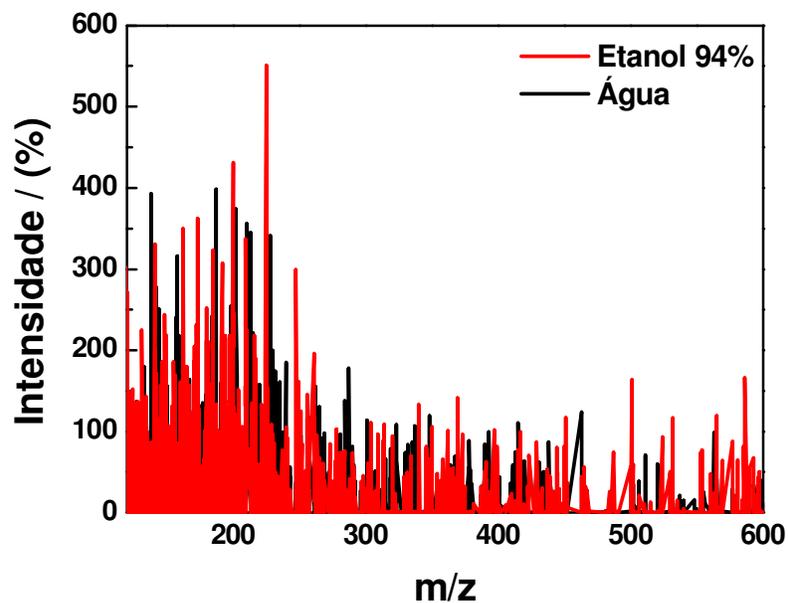


Figura 64. Parte do conjunto de espectros de massas obtidos para as amostras de extratos de frutas obtidos em água e em etanol 94 %.

O tratamento quimiométrico destes dados para identificação de fontes de ACYS, condições de purificação dos extratos e solventes extratores, surpreendentemente não resultou em modelos de classificação. As Figuras 65, 66, 67 mostram os gráficos de escores obtidos sem indicativo de separação dos grupos analisados.

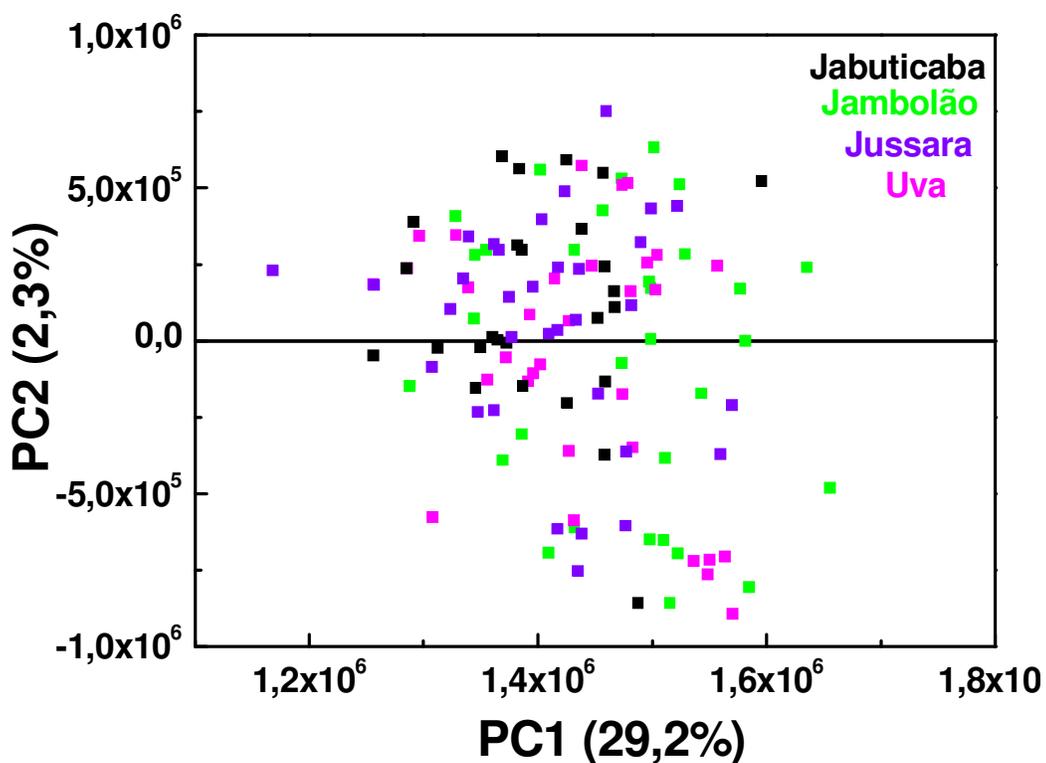


Figura 65. Gráfico de escores para PC1 × PC2 de extratos das frutas em estudo para identificação das fontes de ACYS.

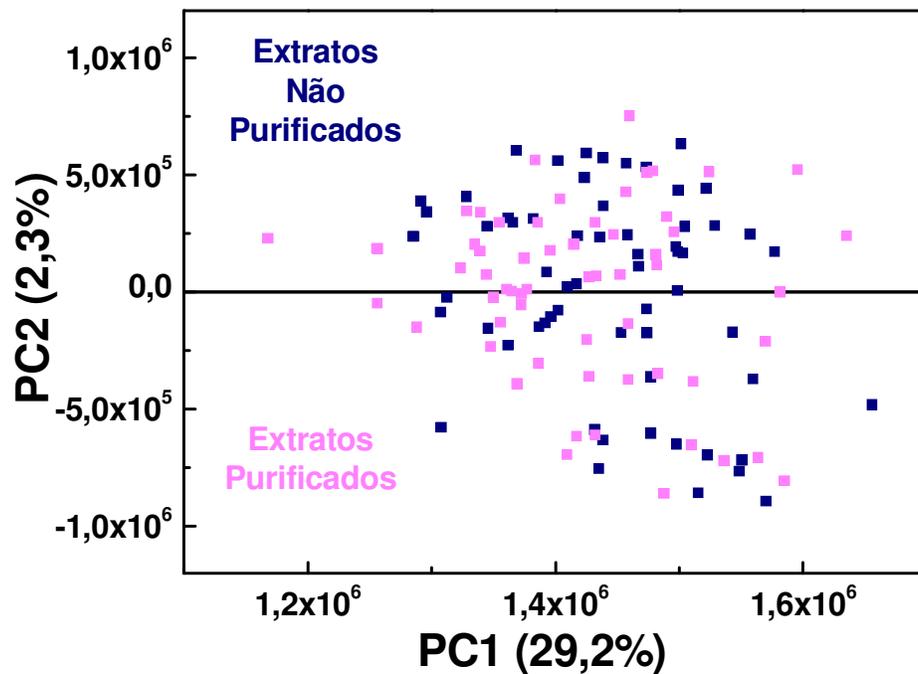


Figura 66. Gráfico de escores para PC1 \times PC2 de extratos das frutas em estudo para avaliação da purificação dos extratos.

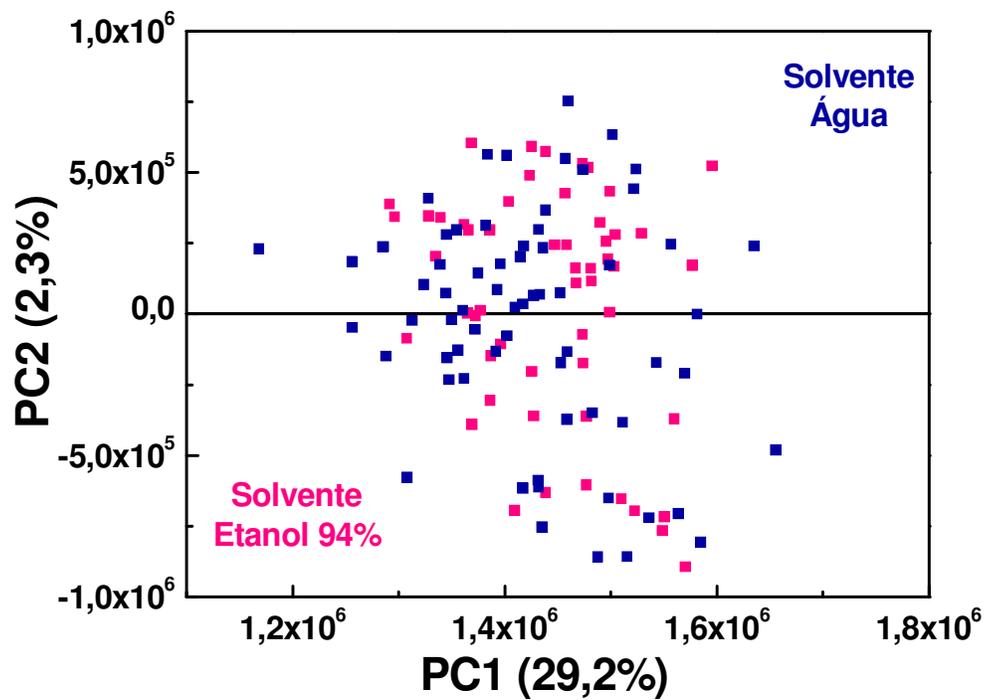


Figura 67. Gráfico de escores para PC1 \times PC2 de extratos das frutas em estudo para avaliar os solventes extratores.

Estes resultados do tratamento quimiométrico de dados obtidos por MS dos extratos de ACYS, não indicaram potencialidade da técnica para identificação de fontes de ACYS nem obtenção de informações relacionadas com condições de obtenção e purificação dos extratos.

4.2. Estudo do perfil de envelhecimento de extratos de ACYS de jabuticaba a partir de espectros eletrônicos de absorção

Para o conjunto de treinamento com 46 amostras de extratos de jabuticaba, foram realizados estudos de PCA com todo espectro de absorção obtido, ou seja, 651 variáveis (200 a 850 nm), tendo sido criado um modelo de classificação com cinco fatores e variância total de 99,49 %. As variáveis com maior poder de modelagem estão entre 400 e 700 nm (Figura 68). Então foi possível reduzir as variáveis e obter um modelo de classificação com quatro fatores e variância total de 99,57 %. Portanto, a redução de variáveis favoreceu a modelagem.

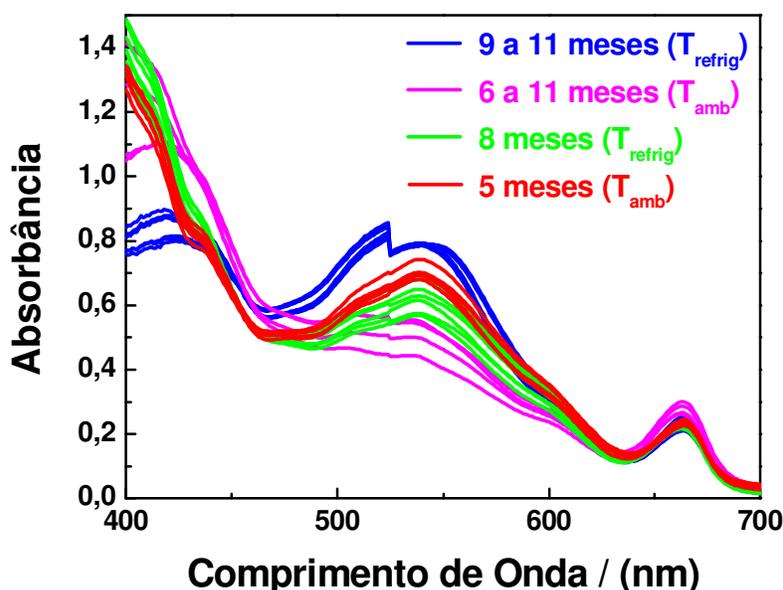


Figura 68. Conjunto de espectros eletrônicos para as amostras de extratos de jabuticaba.

A Figura 69 apresenta o gráfico de escores de PC1 × PC2 do modelo PCA com quatro fatores, onde podem ser observados quatro grupos (A, B, C e D). Os grupos A e B representam extratos armazenados até cinco meses (mantidos à temperatura ambiente) e oito meses (sob refrigeração), respectivamente. Já os grupos C e D representam extratos armazenados de seis a onze meses (temperatura ambiente) e de nove a onze meses (sob refrigeração). Portanto, o modelo permitiu distinguir o tipo de armazenamento utilizado para os extratos de ACYS.

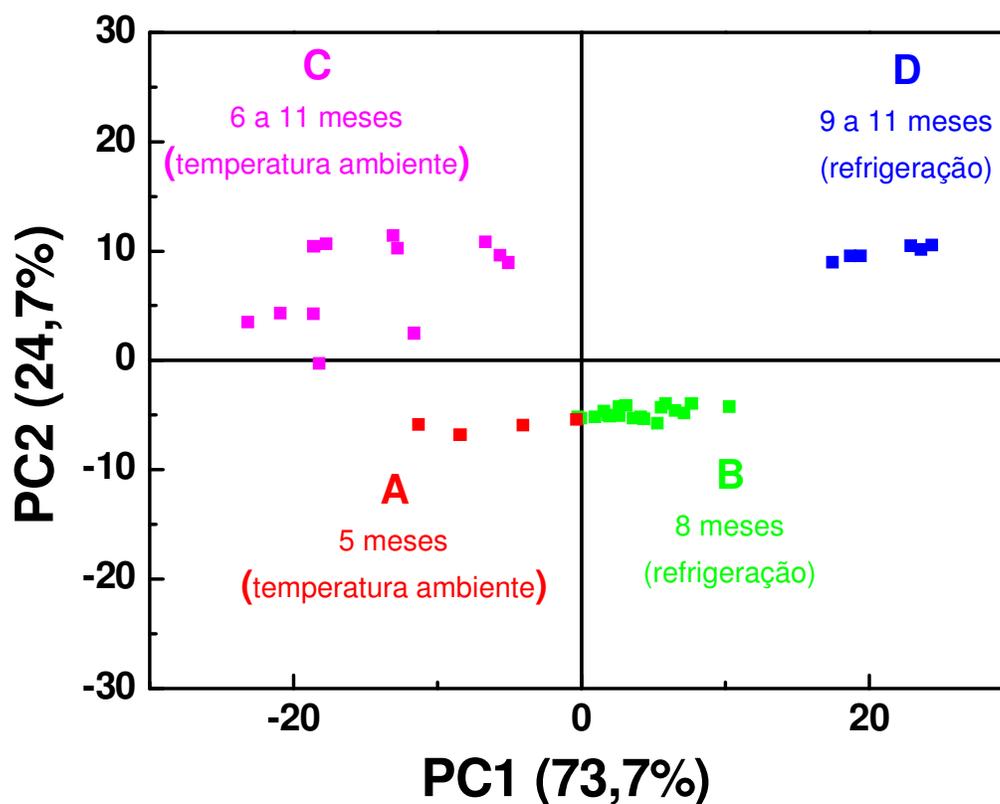


Figura 69. Gráfico de escores para PC1 × PC2 de extratos de jabuticaba em estudo.

A Figura 70 mostra o gráfico de *loadings* do modelo obtido em que novamente a região entre 500 e 550 nm, relacionada ao λ_{\max} de ACYS, possui maior relevância na classificação do perfil de envelhecimento das amostras. Isto é coerente já que com o envelhecimento, a tendência de comportamento é a diminuição da concentração de ACYS, indicada pelo valor de absorvância nessa faixa de comprimento de onda.

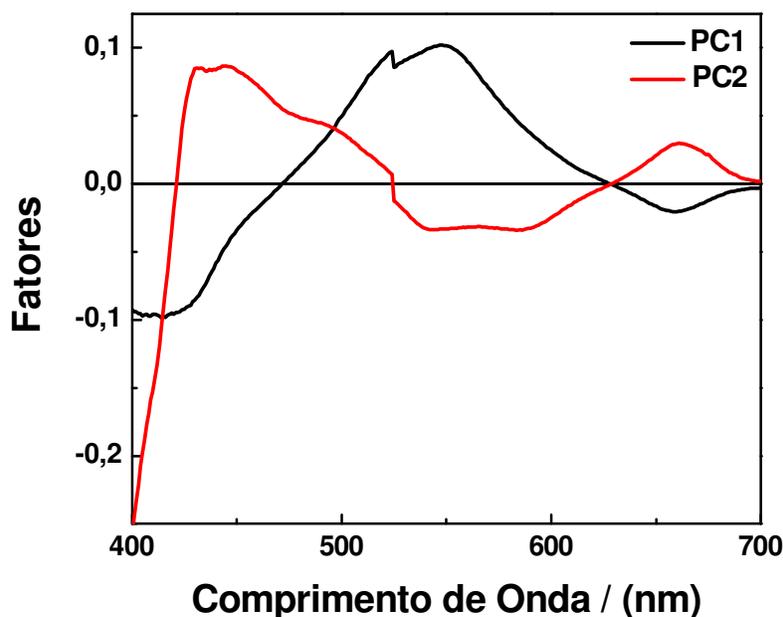


Figura 70. Gráfico de *loadings* para PC1 e PC2 de extratos de jabuticaba.

Posteriormente, para avaliar e validar o modelo obtido foi aplicado o método de reconhecimento de padrões, KNN, em um conjunto de 14 amostras externas, obtendo-se acerto em 81,25 % das amostras. Isto indicou a relevância da aplicação de ferramentas quimiométricas em dados de espectros eletrônicos para identificação dos extratos de ACYS em termos de degradação e armazenamento.

4.3. Estudo do efeito de solventes para extratos de uva a partir de espectros eletrônicos de absorção

No modelo de PCA com 36 amostras de extratos de uva e 401 variáveis (Figura 71) e cinco fatores, obteve-se explicação de 99,79 % da variância total. O gráfico de outliers não indicou a presença dos mesmos considerando distância de Mahalanobis menor que 16 e resíduo de amostra menor que 0,05.

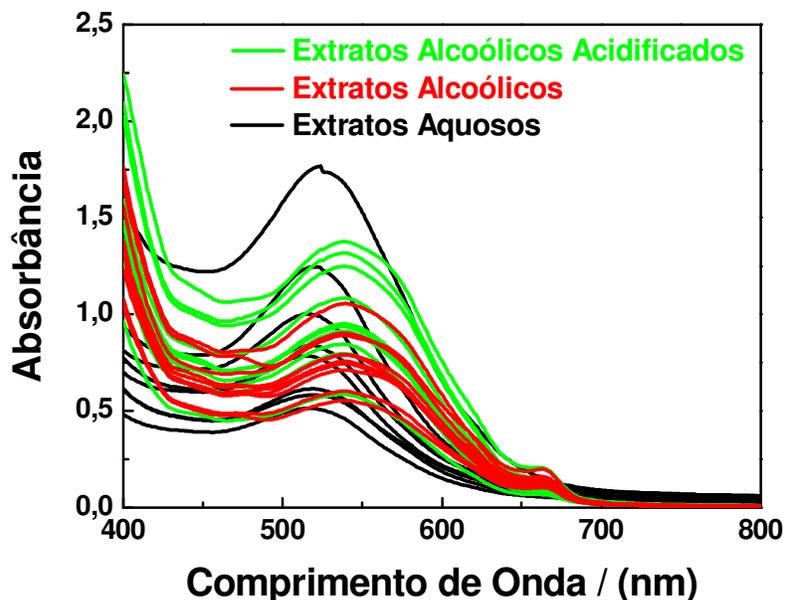


Figura 71. Conjunto de espectros eletrônicos obtidos para os extratos de uva.

O gráfico de escores PC1 × PC2 (Figura 72) indica três grupos distintos (A, B e C). Em PC1, nota-se a separação entre extratos obtidos com solvente aquoso (Grupo A) e etanólico (Grupos B e C). Além disso, a partir de PC2 é possível notar a separação dos extratos em função da acidez: o grupo B traz extratos obtidos com etanol 94 % e no grupo C estão extratos obtidos com etanol acidificado.

A acidez e a polaridade de solventes extratores têm efeito direto na quantidade de ACYS extraídas e estudos anteriores (FAVARO, 2008; SAMPAIO, 2008) mostraram que solventes alcoólicos fornecem maior quantidade de ACYS quando comparados a solventes aquosos. A Figura 71 também indicou que as variações de outras condições de extração formaram grupos de classificação distinta, indicando pouca contribuição desses fatores para a caracterização de extratos de ACYS. A Figura 73 mostra o gráfico de *loadings* em que é observada a região entre 500 e 550 nm, $\lambda_{\text{máx}}$ da ACYS, como maior responsável pela separação das amostras de extratos de uva, o que é coerente já que estão envolvidas variações de concentração de ACYS nos diferentes solventes.

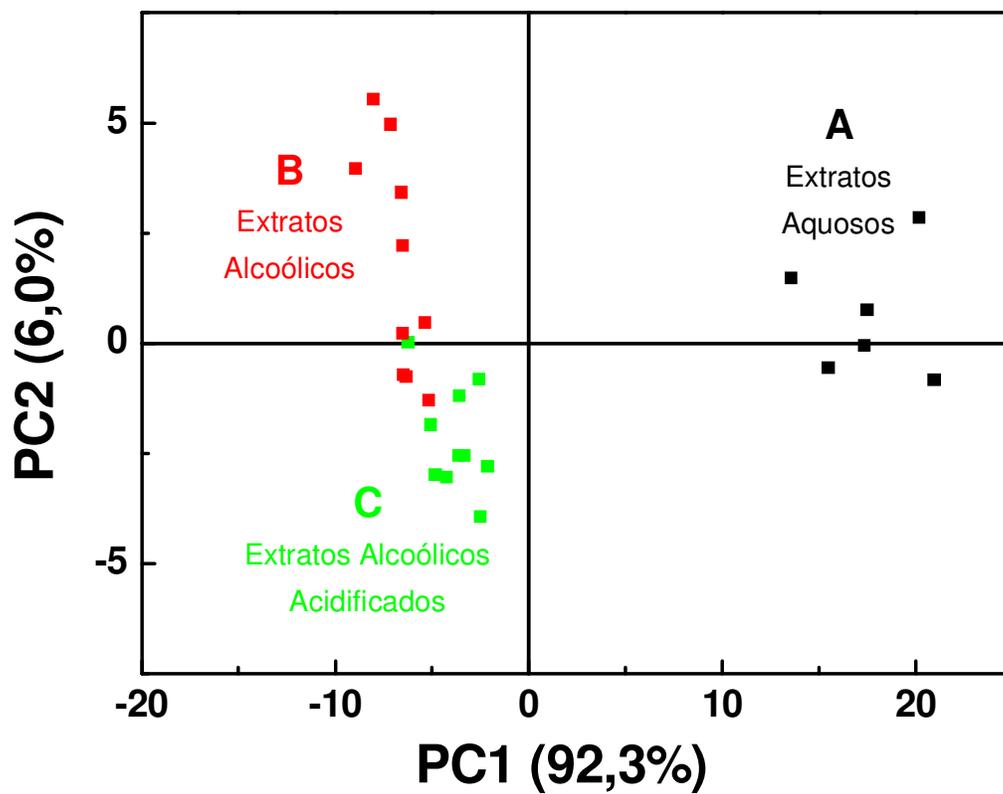


Figura 72. Gráficos de escores para PC1 × PC2 de extratos de uva.

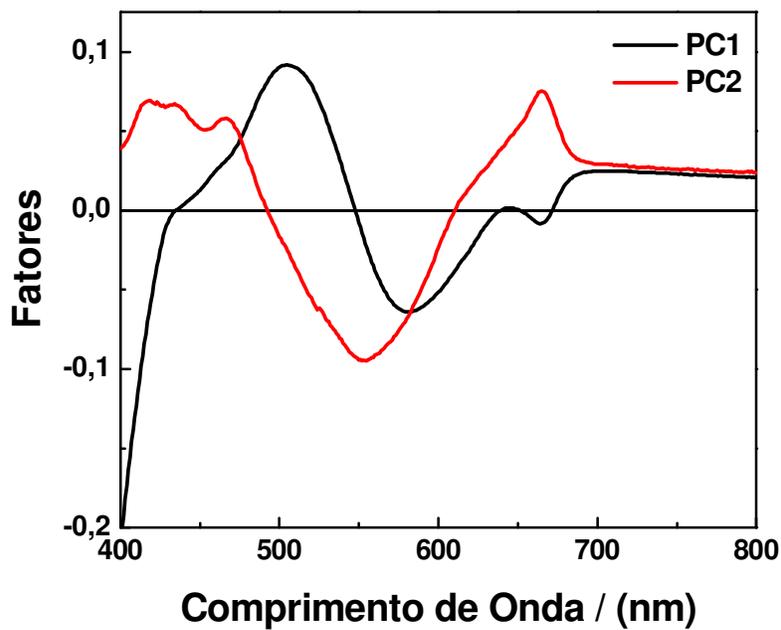


Figura 73. Gráfico de *loadings* para PC1 e PC2 de extratos de uva.

Posteriormente, foi aplicado o método KNN para criação de um modelo de classificação para as amostras do conjunto de treinamento. O modelo foi validado com um conjunto de oito amostras externas, obtendo-se acerto em 75 % das amostras.

O modelo de classificação obtido mostrou-se adequado para identificar as condições de extração de ACYS a partir dos espectros de absorção dos extratos na região do visível. Os resultados são coerentes com resultados de monitoramentos laboriosos e longos (SAMPAIO, 2008), indicando a adequação do modelo para classificação de extratos de acordo com o solvente extrator utilizado durante o processamento das amostras.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES

Os dados obtidos com técnicas espectrofotométricas e cromatográficas aplicadas aos extratos de ACYS a partir de diferentes amostras e condições de análise, tratados com os métodos quimiométricos possibilitaram obter informações relevantes a respeito da identificação das fontes de ACYS, idade, estabilidade e tipo de armazenamento dos extratos, além dos solventes utilizados no processo de extração.

Para identificação das espécies das fontes de ACYS, foram construídos modelos de classificação utilizando-se espectros eletrônicos de absorção de extratos aquosos e alcoólicos de frutas, explicando uma variância total de 99,99 % e 99,46 %, respectivamente. Ambos os modelos apresentaram acerto de cerca de 80 % na validação com amostras externas. Também foram obtidos modelos de classificação de fontes a partir de dados de amostras de extratos alcoólicos de hortaliças e flores, com variância total de 99,62 % e 99,13 % para hortaliças e flores, respectivamente. Para as amostras de hortaliças o modelo apresentou cerca de 90 % de acertos das amostras externas enquanto para as amostras de flores o modelo apresentou cerca de 70 % de acertos das amostras externas.

Destaca-se a relevância dos dados obtidos com dados da técnica de reflectância difusa na região do visível, para estudos das fontes de ACYS. As características favoráveis desta técnica como medidas simples, rápidas e sem necessidade de preparação da amostra são destacadas, pois os espectros eletrônicos de reflectância difusa podem ser obtidos diretamente das cascas, folhas e pétalas das fontes de ACYS e trazem dados pertinentes para resultar nas informações detalhadas das amostras, sem etapa de preparo prévio. Para as amostras de flores foi possível identificar além das espécies de flores estudadas, a coloração de flores de uma mesma espécie não facilmente distintas com observação visual. O modelo obtido com oito fatores apresentou 91,26 % de variância total na explicação das amostras e 83,33 % de acertos na classificação de amostras externas.

Para as amostras de hortaliças ainda não foi possível chegar a um modelo de classificação robusto com o conjunto inicial disponível para treinamento, provavelmente devido a características visuais das matrizes com constituições físicas superficiais consideravelmente distintas, entre as hortaliças carnudas e foliáceas estudadas. A tendência de separação das amostras observada é indicativo da potencialidade da técnica para esses fins, sendo recomendável prosseguir estudos para explorá-la adequadamente.

Foi possível obter um modelo de classificação para identificação de amostras de extratos de frutas utilizando MEKC com variância total 91,65 % e 86 % de acerto na validação de amostras externas. Os resultados demonstraram que a técnica de eletroforese capilar MEKC pode ser promissora na obtenção de modelos de classificação de extratos de frutas de ACYS.

A partir de dados obtidos por MS de extratos de frutas com posterior tratamento quimiométrico surpreendentemente não foi possível obter modelos de classificação para identificar fontes de ACYS, nem solventes extratores e nem condições de purificação dos extratos.

Os modelos de classificação KNN obtidos, a partir de suas características, mostraram-se ferramentas de grande potencial para controle da qualidade dos extratos em processos industriais. Além disso, os modelos introduzem a possibilidade de verificar a autenticidade de produtos comercializados com a identificação da procedência de extratos de ACYS. Os resultados apontam a adequação do uso das técnicas analíticas simples como espectrofotometria em conjunto com ferramentas quimiométricas para controle de qualidade e autenticidade de extratos de ACYS, visto que os resultados são comparáveis àqueles obtidos com técnicas analíticas sofisticadas e caras como HPLC e MEKC e superam o potencial de obter as informações estudadas por MS.

CAPÍTULO 6

TRATAMENTO DE RESÍDUOS

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

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

Metanol foi armazenado em frascos adequados e encaminhado à Comissão de Segurança do IQ-UNICAMP para enviá-lo posteriormente para incineração.

Acetonitrila foi armazenada em recipientes adequados e encaminhada para tratamento pela Comissão de Segurança do IQ-UNICAMP, seguindo-se as recomendações descritas nas seguintes referências:

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

CAPÍTULO 7

PERSPECTIVAS

Tendo em vista as perspectivas de aplicação industrial de extratos de ACYS como corantes, planeja-se elaborar propostas para protocolos de análise de extratos e fontes de ACYS, utilizando métodos quimiométricos simples e de fácil aplicação.

Considerando-se os resultados favoráveis da aplicação de quimiometria aos dados de reflectância difusa no visível, com medidas simples, rápidas e de baixo custo sem necessidade de preparo de amostras contendo ACYS, vislumbra-se a potencialidade de expandir o conjunto de espécies e condições de obtenção de dados para explorar novas fontes de ACYS e o levantamento de outras informações a partir desses dados.

Outra vertente de trabalhos que podem surgir a partir dos resultados positivos deste trabalho envolve a intensificação da prospecção e estudo de novas fontes de ACYS a partir do tratamento remoto de dados de reflectância digitalizados, para expandir o acesso às análises em campo e regiões distantes, com biodiversidade disponível para estudos.

CAPÍTULO 8

REFERÊNCIAS

AABY, K.; EKEBERG, D.; SKREDE, G.; Characterization of Phenolic Compounds in Strawberry (*Fragaria × ananassa*) Fruits by Different HPLC Detectors and Contribution of Individual Compounds to Total Antioxidant Capacity, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, n. 11, p. 4395–4406, 2007.

ABE, L. T.; MOTA, R. V.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I.; Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca L.* e *Vitis vinifera L.*, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 2, p. 394-400, 2007.

AFIFY, A. EL-M. M. R.; FAYED, S. A.; SHALABY, E. A.; EL-SHEMY, H. A.; *Syzygium cumini* (pomposia) active principles exhibit potent anticancer and antioxidant activities, **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Benin, v. 5, n. 7, p. 948-956, 2011.

AL-AWWADI, N. A.; ARAIZ, C.; BORNET, A.; DELBOSC, S.; CRISTOL, J. P.; LINCK, N.; AZAY, J.; TEISSEDE, P. L.; CROS, G.; Extracts enriched in different polyphenolic families normalize increased cardiac NADPH oxidase expression while having differential effects on insulin resistance, hypertension, and cardiac hypertrophy in high-fructose-fed rats, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, n. 1, p. 150–157, 2005.

AMENDOLIA, S. R.; COSSU, G.; GANADU, M. L.; GOLOSIO, B.; MASALA, G. L.; MURA, G. M.; A comparative study of K-nearest neighbour, support vector machine and multi-layer perceptron for *Thalassemia* screening, **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, New York, v. 69, n. 1-2, p. 13-20, 2003.

ANDRADE, J. M. M.; APEL, M. A.; RAMIREZ, M. R.; RASEIRA, M. C. B.; PEREIRA, J. F. M.; HENRIQUES, A. T.; Anthocyanins content and chemical composition of the essential oil of three blackberry cultivars from southern Brazil, **Latin American Journal of Pharmacy**, Buenos Aires, v. 29, n. 4, p. 622–625, 2010.

ANTUNES, L. E. C.; Amora-preta: nova opção de cultivo no Brasil; **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 1, p. 151-158, 2006.

ARAPITSAS, P.; SJÖBERG, P. J. R.; TURNER, C.; Characterisation of anthocyanins in red cabbage using high resolution liquid chromatography coupled with photodiode array detection and electrospray ionization-linear ion trap mass spectrometry, **Food Chemistry**, Oxford, v. 109, n. 1, p. 219-226, 2008.

AVIRAM, M.; KAPLAN, M.; ROSENBLAT, M.; FUHRMAN, B.; Dietary antioxidants and paraoxonases against LDL oxidation and atherosclerosis development, **Handbook of Experimental Pharmacology**, New York, v. 170, n. 1, p. 263-300, 2005.

AVIRAM, M.; Review of human studies on oxidative damage and antioxidant protection related to cardiovascular diseases, **Free Radical Research**, London, v. 33, n. suppl, p. S85-S97, 2000.

BALIGA, M. S.; BHAT, H. P.; BALIGA, B. R. V.; WILSON, R.; PALATY, P. L.; Phytochemistry, traditional uses and pharmacology of *Eugenia jambolana* Lam. (black plum): A review, **Food Research International**, Ontário, v. 44, n. 7, p. 1776-1789, 2011.

BARROS, F. A. R.; STRINGHETA, P. C.; Microencapsulamento de antocianinas, **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 36, n. 1, p. 273-279, 2006.

BARTHUS, R. C.; **Aplicação de Métodos Quimiométricos para Análises de Controle de Qualidade de Óleos Vegetais utilizando Espectroscopias no Infravermelho e no Raman**, 1999, 89 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

BASU, A.; RHONE, M.; LYONS, T. J.; Berries: emerging impact on cardiovascular health, **Nutrition Reviews**, Malden, v. 68, n. 3, p. 168-177, 2010.

BEDNAR, P.; TOMASSI, A. V.; PRESUTTI, C.; PAVLIKOVA, M.; LEMR, K.; FANALI, S.; Separation of structurally related anthocyanins by MEKC, **Chromatographia**, Wiesbaden, v. 58, n. 5-6, p. 283-287, 2003.

BEEBE, K. R.; PELL, R. J.; SEASHOLTZ, M. B.; **Chemometrics: A Practical Guide**, 1. ed New York: John Wiley & Sons, 1998, 56 p.

BEHLING, E. B.; SENDÃO, M. C.; FRANCESCATO, H. D. C.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. L. P.; Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas, **Alimentos e Nutrição: Brazilian Journal of Food and Nutrition**, Araraquara, v. 15, n. 3; p. 285-292, 2004.

BERENTE, B.; GARCIA, D. D. C.; REICHENBÄCHER, M.; DANZER, K.; Method development for the determination of anthocyanins in red wines by high-performance liquid chromatography and classification of German red wines of multivariate statistical methods, **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 871, n. 1-2, p. 95-103, 2000.

BICARD, V.; FOUGEROUSSE, A.; BROUILLARD, R.; Analysis of natural anthocyanins by capillary zone electrophoresis in acidic media, **Journal of Liquid Chromatography e Related Technologies**, Norcross, v. 22, n. 4; p. 541–550, 1999.

BORIN, A.; **Aplicação de Quimiometria e Espectroscopia no Infravermelho no Controle de Qualidade de Lubrificantes**, 2003, 104 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

BORTOLETO, G. G.; **Desenvolvimento de Métodos Analíticos usando Espectrometria de Raios-X e Quimiometria**, 2007, 97 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

BOYLES, M. J.; WROLSTAD, R. E.; Anthocyanin Composition of Red Raspberry Juice: Influences of Cultivar, Processing, and Environmental Factors, **Journal of Food Science**, Chicago, v. 58, n. 5, p. 1135-1141, 1993.

BRIDLE, P.; GÁRCIA-VIGUERA, C.; Analysis of anthocyanins in strawberries and elderberries. A comparison of capillary zone electrophoresis and HPLC, **Food Chemistry**, Oxford, v. 59, n. 2, p. 299-304, 1997.

BRITO, E. S. BRITO; ARAÚJO, M. C. P.; ALVES, R. E.; CARKEET, C.; CLEVIDENCE, B. A.; NOVOTNY, J. A.; Anthocyanins Present in Selected Tropical Fruits: Acerola, Jambolão, Jussara, and Guajiru, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, n. 23, p. 9389-9394, 2007.

BROUILLARD, R.; **Chemical structure of anthocyanins.** *In: Anthocyanins as Food Colors*, MARKAKIS, P.. New York: Academic Press Inc, 1982, 263 p.

BRUNS, R. E.; Chemometric activities in Brazil, **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, New York, v. 5, n. 1, p. 1-2, 1988.

BRUNS, R. E.; FAIGLE, J. F. G.; Quimiometria, **Química Nova**, São Paulo, v. 8, n. 2, p. 84-99, 1985.

CARTEA, M. E.; FRANCISCO, M.; SOENGAS, P.; VELASCO, P.; Phenolic compounds in brassica vegetables, **Molecules**, Basel, v. 16, n. 1; p. 251-280, 2011.

CASTAÑEDA-OVANDO, A.; PACHECO-HERNÁNDEZ, M. L.; PÁES-HERNÁNDEZ, M. E.; RODRÍGUEZ, J. A.; GALÁN-VIDAL, C. A.; Chemical studies of anthocyanins: A review, **Food Chemistry**, Oxford, v. 113, n. 4, p. 859-871, 2009.

CAVALCANTI, R. N.; SANTOS, D. T.; MEIRELES, M. A. A.; Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems - An overview, **Food Research International**, Ontário, v. 44, n. 2, p. 499-509, 2011.

CHAOVANALIKIT, A.; WROLSTAD, R. E.; Total anthocyanins and total phenolics of fresh and processed cherries and their antioxidant properties, **Journal of Food Science**, Chicago, v. 69, n. 1, p. FCT67–FCT72, 2004.

- CHEN, Q.; ZHAO, J.; VITTAYAPADUNG, S.; Identification of the green tea grade level using electronic tongue and pattern recognition, **Food Research International**, Ontário, v. 41, n. 5, p. 500-504, 2008.
- CHEPLICK, S; KWON, Y-I; BHOWMIK, P.; SHETTY, K.; Phenolic-linked variation in strawberry cultivars for potential dietary management of hyperglycemia and related complications of hypertension, **Bioresource Technology**, Maryland Heights, v. 101, n. 1, p. 404-413, 2010.
- CHRISTIAN, G. D.; **Analytical Chemistry**; 2.ed New York: John Wiley & Sons, 1977, 812 p.
- CLEVENGER, S.; Anthocyanidins of some *Impatiens* species, **Evolution**, Malden, v. 25, n. 1, p.669-677, 1971.
- COELHO, A. G.; **Estudo da degradação térmica de antocianinas de extratos de uva (*Vitis vinifera* L. 'Brasil') e jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*)**, 2011, 74 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- CORSO, N. M.; **O Agronegócio do palmito no Paraná: situação atual e perspectivas**; 2003, 140 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Faculdade de Engenharia Florestal – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- COSTA, C.; HORTON, D.; MARGOLIS, S. A.; Analysis of anthocyanins in foods by liquid chromatography, liquid chromatography–mass spectrometry and capillary electrophoresis; **Journal of Chromatography A**; Amsterdam, v. 881, n. 1-2, p. 403-410, 2000.
- COUSSENS, L. M.; WERB, Z.; Inflammation and cancer, **Nature**, London, v. 420, n. 6917, p. 860-867, 2002.
- COUTO, A. B.; RAMOS, L. A.; CAVALHEIRO, E. T. G.; Aplicação de pigmentos de flores no ensino de química, **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n. 2; 221-227, 1998.

- DAY, A. P.; KEMP, H. J.; BOLTON, C.; HARTOG, M.; STANSBIE, D.; Effect of concentrated red grape juice consumption on serum antioxidant capacity and low-density lipoprotein oxidation, **Annals of Nutrition and Metabolism**, Basel, v. 41, n. 6, p. 353-357, 1997.
- DEGENHARDT, A.; KNAPP, H.; WINTERHALTER, P.; Separation and purification of anthocyanins by high-speed countercurrent chromatography and screening for antioxidant activity, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 48, n. 2, p. 338-343, 2000.
- EIBOND, L. S.; REYNERTSON, K. A.; LUO, X. D.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J.; Anthocyanin antioxidants from edible fruits, **Food Chemistry**; Washington, v. 84, n. 1, p. 23-28, 2004.
- ERSUS, S.; YURDAGEL, U.; Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucuscarota L.*) by spray drier, **Journal of Food Engineering**, Davis, v. 80, n. 3, p. 805-812, 2007.
- FALCÃO, L. D.; BARROS, D. M.; GAUCHE, C.; LUIZ, M. T. B.; Copigmentação intra e intermolecular de antocianinas: Uma revisão, **CEPPA**, Curitiba, v. 21, n. 2, p. 351-366, 2003.
- FANG, Z.; ZHANG, M.; SUN, Y.; SUN, J.; How to improve bayberry (*Myrica rubra Sieb. et Zucc.*) juice color quality: effect of juice processing on bayberry anthocyanins and polyphenolics, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 54, n. 1, p. 99-106, 2006.
- FARIA, A.; PESTANA, D.; TEIXEIRA, D.; FREITAS, V.; MATEUS, N.; CALHAU, C.; Blueberry anthocyanins and pyruvic acid adducts: anticancer properties in breast cancer cell lines, **Phytotherapy Research**, Malden, v. 24, n. 12, p. 1862-1869, 2010.

FAVARO, M. M. A.; **Extração, estabilidade e quantificação de antocianinas de frutas típicas brasileiras para aplicação industrial como corantes**; 2008, 105 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

FERRANDINO, A.; GUIDONI, S.; Anthocyanins, Flavonols and hydroxycinnamates: an attempt to use them to discriminate *Vitis vinifera L.* cv 'Barbera' clones; **European Food Research and Technology**, Dresden, v. 230, n. 3, p. 417-427, 2010.

FERRERES, F.; GIL, M. I.; CASTAÑER, M.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; Phenolic metabolites in red pigmented lettuce (*Lactuca sativa*). Changes with minimal processing and cold storage, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 45, n. 11, p. 4249-4254, 1997.

FIORINI, M.; Preparative high-performance liquid chromatography for the purification of natural anthocyanins, **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 692, n. 1-2, p. 213-219, 1995.

FOSEN, T.; ANDERSEN, O. M.; Anthocyanins from red onion, *Allium cepa*, with novel aglycone, **Phytochemistry**, Oxford, v. 62, n. 8, p. 1217-1220, 2003.

FRANCIS, F.J.; Food Colorants: Anthocyanins; **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Amherst, v. 28, n. 4, p. 273-314, 1989.

FRANK, K.; KÖHLER, K.; SCHUCHMANN, H. P.; Stability of anthocyanins in high pressure homogenization, **Food Chemistry**, Oxford, v. 130, n. 3, p. 716-719, 2012.

FULEKI, T.; FRANCIS, F. J.; Quantitative methods for anthocyanins. 1. Extraction and determination of total anthocyanin in cranberries; **Journal of Food Science**; Chicago, v. 33, n. 1, p. 72-77, 1968a.

FULEKI, T.; FRANCIS, F. J.; Quantitative methods for anthocyanins. 2. Determination of total anthocyanin and degradation index for cranberry juice; **Journal of Food Science**; Chicago, v. 33, n. 1, p. 78-83, 1968b.

FURLANI, A. M. C.; FURLANI, P. R.; BATAGLIA, O. C.; HIROCE, R.; GALLO, J. R.; BERNARDI, J. B.; FORNASIER, J. B.; CAMPOS, H. R.; Composição Mineral de Diversas Hortaliças, **Bragantia**, Campinas, v. 37, n. 5, p. 33-44, 1978.

GHOSH, D.; KONISHI, T.; Anthocyanins and anthocyanin-rich extracts: role in diabetes and eye function, **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, Taipei, v. 16, n. 2, p. 200-208, 2007.

GIUSTI, M.; WROLSTAD, R. E.; Characterization and measurement of anthocyanins by UV-Visible spectroscopy; **In Current Protocols in Food Analytical Chemistry**; Protocol F1.2; London: John Wiley and Sons, Inc. 2000.

GOIFFON, J. P.; MOULY, P. P.; GAYDOU, E. M.; Anthocyanic pigment determination in red fruit juices, concentrated juices and scrups using liquid chromatography; **Analytical Chemical Acta**, Amsterdam, v. 382, n. 1-2, p. 39-50, 1999.

GÓMEZ-ARIZA, J. L.; GARCÍA-BARRERA, T.; LORENZO, F.; Anthocyanins profile as fingerprint of wines using atmospheric pressure photoionisation coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry, **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 570, n. 1, p. 101-108, 2006.

GORINSTEIN, S.; PARK, Y. S.; HEO, B. G.; NAMIESNIK, J.; LEONTOWICZ, H.; LEONTOWICZ, M.; HAM, K. S.; CHO, J. Y.; KANG, S. G.; A comparative study of phenolic compounds and antioxidant and antiproliferative activities in frequently consumed raw vegetables, **European Food Research Technology**, Berlin, v. 228, n. 6, p. 903-911, 2009.

GRIS, E. F.; FERREIRA, E. A.; FALCÃO, L. D.; BORDIGNON-LUIZ, M. T.; Caffeic acid copigmentation of anthocyanins from Cabernet Sauvignon grape extracts in model systems; **Food Chemistry**, Oxford, v. 100, n. 3, p. 1289-1296, 2007.

HA, T. J.; LEE, M. H.; PARK, C. H.; PAE, S. B.; SHIM, K. B.; KO, J. M.; SHIN, S. O.; BAEK, I. Y.; PARK, K. Y.; Identification and Characterization of Anthocyanins in Yard-Long Beans (*Vigna unguiculata ssp. sesquipedalis L.*) by High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection and Electrospray Ionization/Mass Spectrometry (HPLC-DAD-ESI/MS) Analysis, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 58, n. 4, p. 2517-2576, 2010.

HARBORNE, J. B. **The Flavonoids: advanced in research since 1986**. 5. ed. New York: Chapman and Hall, 1994, 676 p.

HARBORNE, J. B.; MABRY, T. J.; MABRY, H. **The flavonoids**. 3. ed. New York: Academic Press, 1975, 1204 p.

HASSIMOTO, N. M. A.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M.; Identification and Characterization of Anthocyanins from wild mulberry (*Morus nigra L.*) growing in Brazil; **Food Science Technology International**, Valencia, v. 13, n. 1, p. 17-25, 2007.

HASSIMOTTO, N. M. A.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M.; Antioxidant capacity of Brazilian fruit, vegetables and commercially-frozen fruit pulps, **Journal of Food Composition and Analysis**, London, v. 22, n. 5, p. 394-396, 2009.

HE, J.; GIUSTI, M. M.; Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties, **Annual Review of Food Science and Technology**, Palo Alto, v. 1, n. 1, p. 163-187, 2010.

HENDERSON, A.; GALEANO, G.; Euterpe, Prestoea, and Neonichlsonia (Palmae), **Flora Neotropica**, New York, v. 72, n. 1, p. 1-89, 1996.

HENDERSON, A.; **The genus *Euterpe* in Brazil. In: REIS M. S. e REIS, A. (Editors) *Euterpe edulis Martius* (Palmitreiro) - Biologia, conservação e manejo.** Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 2000, 1-22 p.

HENDRIKS, M. M. W. B.; CRUZ-JUAREZ, L.; DE BONT, D.; HALL, R. D.; Preprocessing and exploratory analysis of chromatographic profiles of plant extracts, **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 545, n. 1, p. 53-64, 2005.

IVANOVA, V.; STEFOVA, M.; VOJNOSKI, B.; DÖRNYEI, A.; LÁSZLÓ, M.; DIMOVSKA, V.; STAFILOV, T.; KILÁR, F.; Identification of polyphenolic compounds in red and white grape varieties grown in R. Macedonia and changes of their content during ripening, **Food Research International**, Ontario, v. 44, n. 9, p. 2851-2860, 2011.

JABOTICABAL [Internet]. Disponível em: <<http://www.jaboticabal.sp.gov.br>>. Acesso em: 10 de jan. 2012.

JACKMAN, R. L.; YADA, R. Y.; TUNG, M. A.; A Review: Separation and chemical properties of anthocyanins used for their qualitative and quantitative analysis, **Journal of Food Biochemistry**, Trumbull, v.11, n. 4, p. 279-308, 1987a.

JACKMAN, R. L.; YADA, R. Y.; TUNG, M. A.; SPEERS, R. A.; Anthocyanins as food colorants – A review, **Journal of Food Biochemistry**, Trumbull, v. 11, n. 3, p. 201-247, 1987b.

JAIN, M. C.; SESHADRI, T. C.; Anthocyanins of *Eugenia jambolana*, **Indian Journal of Chemistry**, New Delhi, v. 13, n. 1, p. 20-23, 1975.

JAPÓN-LUJÁN, R.; RUIZ-JIMÉNEZ, J.; LUQUE DE CASTRO, M. D.; Discrimination and classification of olive tree varieties and cultivation zones by biophenol contents, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 54, n. 26, p. 9706-9712, 2006.

KALT, W.; HANNEKEN, A.; MILBURY, P.; TREMBLAY, F.; Recent research on polyphenolics in vision and eye health, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 58, n. 7, p. 4001-4007, 2010.

KAMMERER, D.; CARLE, R.; SCHIEBER, A.; Quantification of anthocyanins in black carrot extracts (*Daucus carota ssp. sativus var. atrorubens* Alef.) and evaluation of their color properties, **European Food Research Technology**, Berlin, v. 219, n. 5, p. 479-486, 2004.

KERIO, L. C.; WACHIRA, F. N.; WANYOKO, J. K.; ROTICH, M. K.; Characterization of anthocyanins in Kenyan teas: Extraction and identification, **Food Chemistry**, Oxford, v. 131, n. 1, p. 31-38, 2012.

KONG, J. M.; CHIA, L. S.; GOH, N. K.; CHIA, T. F.; BROUILLARD, R.; Analysis and biological activities of anthocyanins, **Phytochemistry**, Oxford, v. 64, n. 5, p. 923–933, 2003.

KRAMER, J. H.; Anthocyanosides of *Vaccinium myrtillus* (bilberry) for night vision - A systematic review of placebo-controlled trials, **Survey of Ophthalmology**, Plymouth, v. 49, n. 6, p. 618, 2004.

KRIFI, B.; CHOUTEAU, F.; BOUDRANT, J.; METCHE, M.; Degradation of anthocyanins from blood orange juices, **International Journal of Food Science e Technology**; Weinheim, v. 35, n. 3, p. 275-283, 2000.

KWON, S. H.; AHN, I. S.; KIM, S. O.; KONG, C. S.; CHUNG, H. Y.; DO, M. S.; PARK, K. Y.; Anti-obesity and hypolipidemic effects of black soybean anthocyanins, **Journal of Medicinal Food**, New Rochelle, v. 10, n. 3, p. 552-556, 2007.

LEE, H. S.; HONG, V.; Chromatographic analysis of anthocyanins; **Journal of Chromatography A**; Amsterdam, v. 624, n. 1-2, p. 221-234, 1992.

- LEE, J. H.; CHOUNG, M. G.; Identification and characterisation of anthocyanins in the antioxidant activity-containing fraction of *Liriope platyphylla* fruits, **Food Chemistry**, Oxford, v. 127, n. 4, p. 1686-1693, 2011.
- LIMA, A. J. B.; CORREA, A. D.; SACZK, A. A.; MARTINS, M. P.; CASTILHO, R. O.; Anthocyanins, pigments stability and antioxidant activity in jaboticaba (*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O Berg), **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 3, p. 877-887, 2011.
- LIN, J. Y.; LI, C. Y.; HWANG, I. F.; Characterisation of the pigment components in red cabbage (*Brassica oleracea L. var.*) juice and their anti-inflammatory effects on LPS-stimulated murine splenocytes, **Food Chemistry**, Oxford, v. 109, n. 4, p. 771-781, 2008.
- LIU, L.; CAO, S.; XIE, B.; SUN, Z.; WU, J.; Degradation of cyanidin 3-rutinoside in the presence of (-)-epicatechin and litchi pericarp polyphenol oxidase, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, n. 22, p. 9074-9078, 2007.
- LONNI, A. A. S. G.; SCARMINIO, I. S.; SILVA, L. M. C.; FERREIRA, D. T.; Numerical Taxonomy Characterization of *Baccharis* Genus Species by Ultraviolet-visible spectrophotometry, **Analytical Sciences**, Tokyo, v. 21, n. 3, p. 235-239, 2005.
- LOPES, R. M.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; PINTO, A. S.; Flavonóides, **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 3, n. 17, p. 18-22, 2000.
- LÓPEZ, B.; LATORRE, M. J.; FERNÁNDEZ, M. I.; GARCÍA, M. A.; GARCÍA, S.; HERRERO, C.; Chemometric classification of honeys according to their type based on quality control data, **Food Chemistry**, Oxford, v. 55, n. 3, p. 281-287, 1996.
- MAKRIS, D. P.; KALLITHRAKA, S.; MAMALOS, A.; Differentiation of young red wines based on cultivar and geographical origin with application of chemometrics of principal polyphenolic constituents, **Talanta**, Washington, v. 70, n. 5, p. 1143-1152, 2006.

MASSART, D. L.; VANDEGINSTE, B. G. M.; DEMING, S. N.; KAUFMAN, Y. M.; **Chemometrics: a textbook**, 3 ed. New York: Elsevier Science Publishing Company, Inc., 1990, 339 p.

MCCANN, D.; BARRETT, A.; COOPER, A.; CRUMPLER, D.; DALEN, L.; GRIMSHAW, K.; KITCHIN, E.; LOK, K.; PORTEOUS, L.; PRINCE, E.; SONUGA-BARKE, E.; WARNER, J. O.; STEVENSON, J.; Food additives and hyperactive behavior in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomized, double-blinded, placebo-controlled trial, **The Lancet**, London, v. 370, n. 9598, p. 1560-1567, 2007.

MENNELLA, G.; ROTINO, G. L.; FIBIANI, M.; D'ALESSANDRO, A.; FRANCESE, G.; TOPPINO, L.; CAVALLANTI, F.; ACCIARRI, N.; LO SCALZO, R.; Characterization of health-related compounds in eggplant (*Solanum melongena* L.) lines derived from introgression of allied species, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 58, n. 13, p. 7597-7603, 2010.

MITCHELL, K. A.; MARKHAM, K. R.; BOASE, M. R.; Pigment chemistry and colour of *Pelargonium* flowers, **Phytochemistry**, Oxford, v. 47, n. 3, p. 355-361, 1998.

MORGANO, M. A.; **Aplicação de métodos quimiométricos em análise de alimentos**; 2005, 110 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

MOURTZINOS, I.; MAKRIS, D. P.; YANNAKOPOULOU, K.; KALOGEROPOULOS, N.; MICHALI, I.; KARATHANOS, V. T.; Thermal stability of anthocyanin extract of *Hibiscus sabdariffa* L. in the presence of β -cyclodextrin, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 56, n. 21, p. 10303-10310, 2008.

MULABAGAL, V.; NGOUAJIO, M.; NAIR, A.; ZHANG, Y.; GOTTUMUKKALA, A. L.; NAIR, M. G.; In vitro evaluation of red and green lettuce (*Lactuca sativa*) for functional food properties, **Food Chemistry**, Oxford, v. 118, n. 2, p. 300-306, 2010.

MULINACCI, N.; IERI, F.; GIACCHERINI, C.; INNOCENTI, M.; ANDRENELLI, L.; CANOVA, G.; SARACCHI, M.; CASIRAGHI, M. C.; Effect of cooking on the anthocyanins, phenolic acids, glycoalkaloids, and resistant starch content in two pigmented cultivars of *Solanum tuberosum* L., **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 56, n. 23, p. 11830-11837, 2008.

MUTIHAC, L.; MUTIHAC, R.; Mining in Chemometrics, **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 612, n. 1, p. 1-18, 2008.

NAKAMURA, Y.; MATSUMOTO, H.; MORIFUJI, M.; IIDA, H.; TAKEUCHI, Y.; Development and Validation of a Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Method for Simultaneous Determination of Four Anthocyanins in Human Plasma after Black Currant Anthocyanins Ingestion, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 58, n. 2, p. 1174–1179, 2010.

NAYAK, B.; BERRIOS, J. J.; POWERS, J. R.; TANG, J.; Thermal Degradation of Anthocyanins from Purple Potato (Cv. Purple Majesty) and Impact on Antioxidant Capacity, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 59, n. 20, p. 11040–11049, 2011.

NUNES, M. C. N.; BRECHT, J. K.; MORAIS, A. M. M. B.; SARGENT, S.; Possible influences of water loss and polyphenol oxidase activity on anthocyanin content and discoloration in fresh ripe strawberry (*cv. Oso Grande*) during storage at 1 °C, **Journal of Food Science**, Chicago, v. 70, n. 1, p. S79-S84, 2005.

NUTRITIONAL INFORMATION. Disponível em: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi-bin/list_nut_edit.pl>. Acesso em: 28 jan. 2011.

OIDTMANN, J.; SCHANTZ, M.; MÄDER, K.; BAUM, M.; BERG, S.; BETZ, M.; KULOZIK, U.; LEICK, S.; REHAGE, H.; SCHWARZ, K.; RICHLING, E.; Preparation and comparative release characteristics of three anthocyanin encapsulation systems, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, 2012. Disponível em: <<http://pubs.acs.org>>. Acesso em: 02 jan. 2012.

OKUMURA, F.; SOARES, M. H. F. B.; CAVALHEIRO, E. T. G.; Identificação de pigmentos naturais de espécies vegetais utilizando-se cromatografia em papel, **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 4; 680-683, 2002.

OTSUKI, T.; MATSUFUJI, H.; TAKEDA, M.; TOYODA, M.; GODA, Y.; Acylated anthocyanins from red radish (*Raphanus sativus L.*), **Phytochemistry**, Oxford, v. 60, n. 1, p. 79-87, 2002.

OTTO, M.; **Chemometrics: statistics and computer application in analytical chemistry**, 2 ed. Weinheim: Wiley-VCH, 1999, 314 p.

PASCUAL-TERESA, S.; MORENO, D. A.; GARCÍA-VIGUERA, C.; Flavanols and anthocyanins in cardiovascular health: a review of current evidence, **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 11, n. 4, p. 1679-1703, 2010.

PETERSSON, E. V.; LIU, J.; SJÖBERG, P. J. R.; DANIELSSON, R.; TURNER, C.; Pressurized hot water extraction of anthocyanins from red onion: A study on extraction and degradation rates, **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 663, n. 1, p. 27-32, 2010.

PETERSSON, E. V.; PUERTA, A.; BERGQUIST, J.; TURNER, C.; Analysis of anthocyanins in red onion using capillary electrophoresis-time of flight-mass spectrometry, **Electrophoresis**, Weinheim, v. 29, n. 12; 2723-2730, 2008.

PETRI, G.; KRAWCZYK, U.; KÉRY, À.; Spectrophotometric and chromatographic investigation of bilberry anthocyanins for quantification purposes; **Microchemical Journal**; San Diego, v. 55, n. 1, p. 12-23, 1997.

PETURSDOTTIR, H.; GISLASON, A.; FLAK-PETERSEN, S.; Lipid classes and fatty acid composition of muscle, liver and skull oil in deep-sea redfish *Sebastes mentella* over the Reykjanes Ridge, **Journal of Fish Biology**, Dumfries, v. 73, n. 10, p. 2485-2496, 2008.

PINI, G. F.; **Estudos da Classificação de Óleos Essenciais com uso Combinado de Cromatografia Gasosa e Métodos Quimiométricos**, 1995, 65 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

PÔRTO, M. L.; **Produção, estado nutricional e acúmulo de nitrato em plantas de alface submetidas à adubação nitrogenada e orgânica**; 2006, 65 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia.

POZO-INSFRAN, D.D.; FOLLO-MARTINEZ, A. D.; TALCOTE, S.T.; BRENES, C. H.; Stability of copigmented anthocyanins and ascorbic acid in muscadine grape juice processed by high hydrostatic pressure, **Journal of Food Science**, Chicago, v. 72, n. 4, p. S247-S253, 2007.

RADOVANOVIC´, A.; RADOVANOVIC´, B.; JOVANCIC´EVIC´, B.; Free radical scavenging and antibacterial activities of southern Serbian red wines; **Food Chemistry**, Oxford, v. 117, n. 2, p. 326-331, 2009.

RAMIREZ, M. R.; IZQUIERDO, I.; RASEIRA, M. C. B.; ZUANAZZI, J. A.; BARROS, D.; HENRIQUES, A. T.; Effect of lyophilised Vaccinium berries on memory, anxiety and locomotion in adult rats; **Pharmacological Research**, Madrid, v. 52, n. 6, p. 457-462, 2005.

REIS, A; **Dispersão de sementes de Euterpe edulis Martius. (Palmae) em uma Floresta Ombrófila Densa Montana da Encosta Atlântica em Blumenau, SC**; 1995, 164 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia - Departamento de Biologia Vegetal – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

REYNERTSON, K. A.; WALLACE, A. M.; ADACHI, S.; GIL, R. R.; YANG, H.; BASILE, M. J.; D'ARMIENTO, J.; WEINSTEIN, I. B.; KENNELLY, E. J.; Bioactive depsides and anthocyanins from Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*); **Journal of Natural Products**, Washington, v. 69, n. 8, p. 1228- 1230, 2006.

RODRÍGUEZ-SAONA, L. E.; GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E.; Color and pigment stability of red radish and red-fleshed potato anthocyanins in juice model systems, **Journal of Food Science**, Chicago, v. 64, n. 3, p. 451-456, 1999.

ROJO, L. E.; RIBNICKY, D.; LOGENDRA, S.; POULEV, A.; ROJAS-SILVA, P.; KUHN, P.; DORN, R.; GRACE, M. H.; LILA, M. A.; RASKIN, I.; *In vitro* and *in vivo* antidiabetic effects of anthocyanins from Maqui Berry (*Aristotelia chilensis*), **Food Chemistry**, Oxford, v. 131, n. 2, p. 387-396, 2012.

ROUTRAY, W.; ORSAT, V.; Blueberries and their anthocyanins: Factors affecting biosynthesis and properties, **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Weinheim, v. 10, n. 6, p. 303-320, 2011.

SÁENZ-LÓPEZ, R.; FERNÁNDEZ-ZURBANO, P.; TENA, M. T.; Analysis of aged red wine pigments by capillary zone electrophoresis; **Journal of Chromatography A**; Amsterdam, v. 1052, n. 1-2, p. 191-197, 2004.

SAMPAIO, P. G.; **Otimização da extração, esterilização e identificação de antocianinas obtidas a partir de frutas**; 2008, 133 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

SANTOS, K. A.; KARAM, L. M.; FREITAS, R. J. S.; STERTZ, S. C.; Composição química da berinjela (*Solanum melongena L.*), **CEPPA**, Curitiba, v. 20, n. 2, p. 247-256, 2002.

SCHÜTZ, K.; PERSIKE, M.; CARLE, R.; SCHIEBER, A.; Characterization and quantification of anthocyanins in selected artichoke (*Cynara scolymus L.*) cultivars by HPLC–DAD–ESI–MS, **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 384, n. 7-8, p. 1511-1517, 2006.

SEGURA-CARRETERO, A.; PUERTAS-MEJÍA, M. A.; CORTACERO-RAMÍREZ, S.; BELTRÁN, R.; ALONSO-VILLAVÉRDE, C.; JOVEN, J.; DINELLI, G.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A.; Selective extraction, separation, and identification of anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa* L. using solid phase extraction-capillary electrophoresis-mass spectrometry (time-of-flight/ion trap), **Electrophoresis**, Weinheim, v. 29, n. 13; 2852-2861, 2008.

SFALCIN, R. A.; **Avaliação de parâmetros fisiológicos e bioquímicos em berinjela (*Solanum melongena* L.) cultivada sob diferentes potenciais de água no solo**; 2009, 59 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

SHARAF, M. A.; ILLMAN, D. L.; KOWALSKI, B. R.; **Chemometrics**, 1. ed New York: John Wiley & Sons, 1986, 179 p.

SHIMAMOTO, G. G.; ROSSI, A. V. **Antocianinas de jussara (*Euterpe edulis*): identificação, quantificação e temperatura de decomposição do extrato**, In: 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (32ªRASBQ), 2009, Fortaleza – CE, Anais 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Fortaleza: SBQ, 2009, 1 CD.

SILVA, J. A. F.; COLTRO, W. K. T.; CARRILHO, E. E.; TAVARES, M. F. M.; Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares, **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 740-744, 2007.

SILVA, S.; TASSARA, H.; **Frutas no Brasil**. 1. ed. São Paulo: Empresa das Artes, 2005, 230 p.

SIMIRGIOTIS, M. J.; SILVA, M.; BECERRA, J.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; Direct characterisation of phenolic antioxidants in infusions from four Mapuche medicinal plants by liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD) and electrospray ionisation tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS), **Food Chemistry**, Oxford, v. 131, n. 1, p. 318-327, 2012.

SIRIWOHARN, T.; WROLSTAD, R. E.; FINN, C. E.; PEREIRA, C. B.; Influence of cultivar, maturity and sampling on blackberry (*Rubus L. Hybrids*) Anthocyanins, polyphenolics, and antioxidant properties; **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, n. 26, p. 8021-8030, 2004.

SKUPIEN, K.; OSZMIANSKI, J.; Comparison of six cultivars of strawberries (*Fragaria x ananassa Duch.*) grown in northwest Poland, **European Food Research and Technology**, Dresden, v. 219, n. 1, p. 66-70, 2004.

SONDHEIMER, E.; KERTESZ, Z.; Colorimetric determination in strawberries and strawberry products; **Analytical Chemistry**; Washington, v. 20, n. 3, p. 245-248, 1948.

STINTZING, F. C.; STINTZING, A. S.; CARLE, R.; FREI, B.; WROLSTAD, R. E.; Color and antioxidant properties of cyanidin-based anthocyanin pigments; **Journal of Agricultural and Food Chemistry**; Washington, v. 50, n. 21, p. 6172-6181, 2002.

SYVACY, A.; SÖKMEN, M.; Seasonal changes in antioxidant activity, total phenolic and anthocyanin constituent of the stems of two *Morus* species (*Morus alba L.* and *Morus nigra L.*), **Plant Growth Regulation**, Pietermaritzburg, v. 44, n. 3, p. 251-256, 2004.

TAKIKAWA, M.; INOUE, S.; HORIO, F.; TSUDA, T.; Dietary anthocyanin-rich bilberry extract ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity via activation of AMP-activated protein kinase in diabetic mice, **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 140, n. 3, p. 527-533, 2010.

TAMURA, S.; TSUJI, K.; YONGZHEN, P.; OHNISHI-KAMEYAMA, M.; MURAKAMI, N.; Six new acylated anthocyanins from red radish (*Raphanus sativus*), **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 58, n. 9; 1259-1262, 2010.

TATSUZAWA, F.; SAITO, N.; TOKI, K.; SHINODA, K.; SHIGIHARA, A.; HONDA, T.; Acylated cyanidin 3-sophoroside-5-glucosides from the purple roots of red radish (*Raphanus sativus L.*) 'Benikanmi', **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Tokyo, v. 79, n. 1; 103-107, 2010.

TATSUZAWA, F.; TOKI, K.; SAITO, N.; SHINODA, K.; SHIGIHARA, A.; HONDA, T.; Anthocyanin occurrence in the root peels, petioles and flowers of red radish (*Raphanus sativus L.*), **Dyes and Pigments**, Oxford, v. 79, n. 1; 83-88, 2008.

TAVARES, M. F. M.; Eletroforese capilar: Conceitos básicos, **Química Nova**, São Paulo, v. 19, n. 2, p. 173-181, 1996.

TERCI, D. B. L.; ROSSI, A. V.; Indicadores naturais de pH: usar papel ou solução?; **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 4, p. 684-688, 2002.

TERCI, D. B. L.; **Aplicações analíticas e didáticas de antocianinas extraídas de frutas**; 2004, 224 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

TIAN, Q.; AZIZ, R. M.; STONER, G. D.; SCHWARTZ, S. J.; Anthocyanin determination in black raspberry (*Rubus occidentalis*) and biological specimens using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry, **Journal of Food Science**, Chicago, v. 70, n. 1, p. C43-C47, 2005.

TODARO, A.; CIMINO, F.; RAPISARDA, P.; CATALANO, A. E.; BARBAGALLO, R. N.; SPAGNA, G.; Recovery of anthocyanins from eggplant peel, **Food Chemistry**, Oxford, v. 114, n. 2, p. 434-439, 2009.

TROCHE, K. S.; BRAGA, S. F.; COLUCI, V. R.; GALVÃO, D. S.; Carcinogenic classification of polycyclic aromatic hydrocarbons through theoretical descriptors, **International Journal of Quantum Chemistry**, Malden, v. 103, n. 5, p. 718-730, 2005.

TRUONG, V-D.; DEIGHTON, N.; THOMPSON, R. T.; MCFEETERS, R. F.; DEAN, L. O.; PECOTA, K. V.; YENCHO, G. C.; Characterization of Anthocyanins and Anthocyanidins in Purple-Fleshed Sweetpotatoes by HPLC-DAD/ESI-MS/MS; **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 58, n. 1, p. 404-410, 2010.

TSUDA, T.; Regulation of adipocyte function by anthocyanins; possibility of preventing the metabolic syndrome, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 56, n. 3, p. 642–646, 2008.

TSUJI, K.; TAMURA, S.; OHNO, T.; KODA, T.; MURAKAMI, N.; Enhancement of anthocyanin content in red radishes (*Raphanus sativa L.*) by γ -ray irradiation, **Japanese Journal of Food Chemistry**, Tokyo, v. 12, n. 3; 162, 2005.

TÜRKER, N.; ERDOGDU, F.; Effects of pH and temperature of extraction medium on effective diffusion coefficient of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota var. L.*); **Journal of Food Engineering**; Oxford, v. 76, n. 4, p. 579-583, 2006.

UDANI, J. K.; SINGH, B. B.; SINGH, V. J.; BARRETT, M. L.; Effects of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) berry preparation on metabolic parameters in healthy overweight population: A pilot study, **Nutrition Journal**, London, v. 10, n. 1, p. 45-51, 2011.

URBANO, M.; CASTRO, M. D. L.; PÉREZ, P. M.; GARCÍA-OLMO, J.; GÓMEZ-NIETO, M. A.; Ultraviolet-visible spectroscopy and pattern recognition methods for differentiation and classification of wines, **Food Chemistry**, Oxford, v. 97, n. 1, p. 166-175, 2006.

VALLS, J.; MILLÁN, S.; MARTÍ, M. P.; BORRÀS, E.; AROLA, L.; Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols, **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1216, n. 43, p. 7143–7172, 2009.

VANKAR, P. S.; SHUKLA, D.; Natural dyeing with anthocyanins from *Hibiscus rosa sinensis* flowers, **Journal of Applied Polymer Science**, Malden, v. 122, n. 5, p. 3361-3368, 2011.

WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R. L.; Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 45, n. 2, p. 304–309, 1997.

WATANABE, T.; YAMAMOTO, A.; NAGAI, S.; TERABE, S.; Analysis of elderberry pigments in commercial food samples by micellar electrokinetic chromatography, **Analytical Sciences**, Tokyo, v. 14, n. 4; 839-844, 1998.

WEB OF KNOWLEDGE. Base de dados. Disponível em: <<http://apps.webofknowledge.com>>. Acesso em: jan. 2012.

WROLSTAD, R. E.; Anthocyanin pigments – Bioactivity and coloring properties; **Journal of Food Science**, Chicago, v. 69, n. 5, p. 419-425, 2004.

XU, C.; ZHANG, Y.; CAO, L.; LU, J.; Phenolic compounds and antioxidant properties of different grape cultivars grown in China; **Food Chemistry**, Oxford, v. 119, n. 4, p. 1557-1565, 2010b.

XU, Z.; WU, J.; ZHANG, Y.; HU, X.; LIAO, X.; WANG, Z.; Extraction of anthocyanins from red cabbage using high pressure CO₂, **Bioresource Technology**, Oxford, v. 101, n. 18; 7151-7157, 2010a.

YOSHIDA, K.; ITO, D.; SHINKAI, Y.; KONDO, T.; Change of color and components in sepals of chameleon hydrangea during maturation and senescence; **Phytochemistry**, Oxford, v. 69, n. 18, p. 3159-3165, 2008.

YOSHIDA, K.; MORI, M.; KONDO, T.; Blue flower color development by anthocyanins: from chemical structure to cell physiology; **Natural Products Reports**, Cambridge, v. 26, n. 7, p. 857-964, 2009.

ZHANG, Y.; LI, J.; HOGAN, S.; CHUNG, H.; WELBAUM, G. E.; ZHOU, K.; Inhibitory effect of raspberries on starch digestive enzyme and their antioxidant properties and phenolic composition, **Food Chemistry**, Oxford, v. 119, n. 2, p. 592-599, 2010.

ZHANG, Y.; LIAO, X.; CHEN, F.; WU, J.; HU, X.; Isolation, identification, and color characterization of cyanidin-3-glucoside and cyaniding-3-sophoroside from red raspberry, **European Food Research and Technology**, Dresden, v. 226, n. 3, p. 395-403, 2008.

ANEXO I: Conjunto dos dados obtidos de cromatogramas das amostras de extratos de frutas

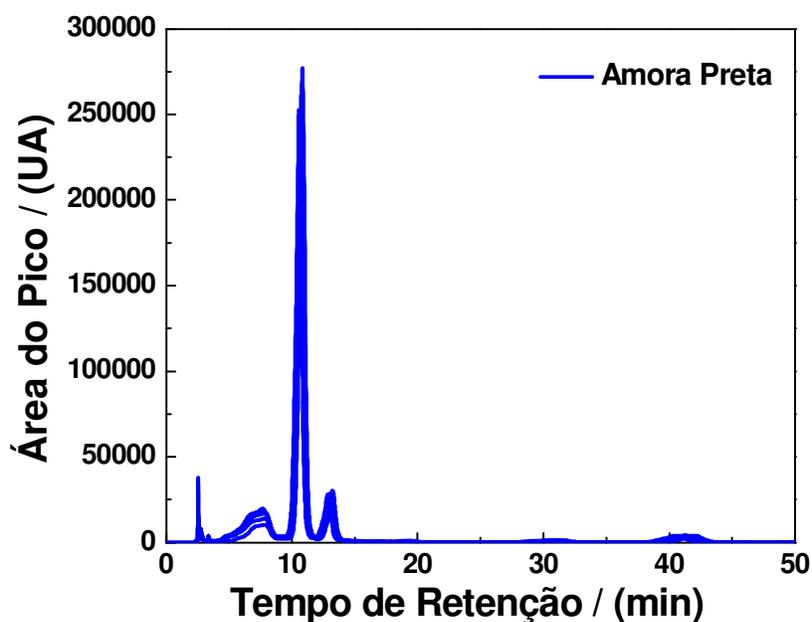


Figura I.a. Conjunto de cinco cromatogramas de extratos de amora preta obtidos de acordo com descrição da página 56.

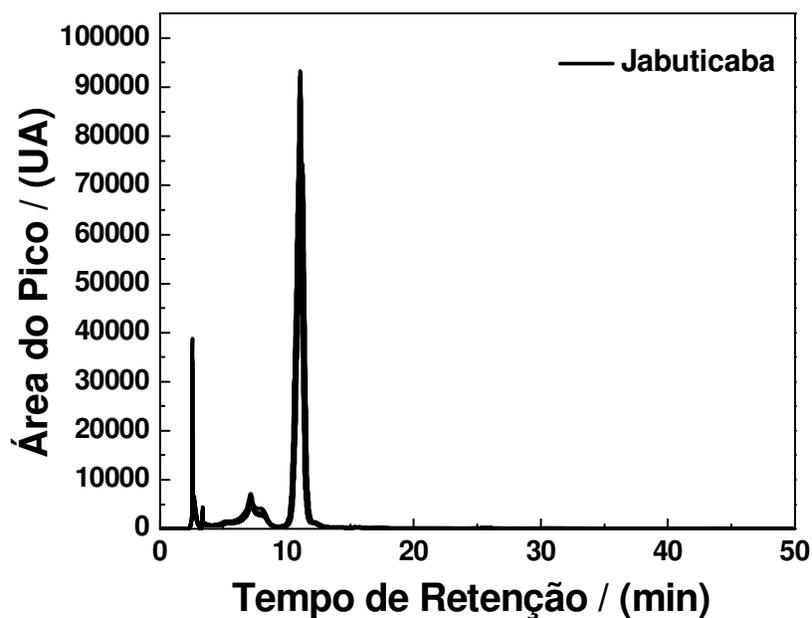


Figura I.b. Conjunto de cinco cromatogramas de extratos de jabuticaba obtidos de acordo com descrição da página 56.

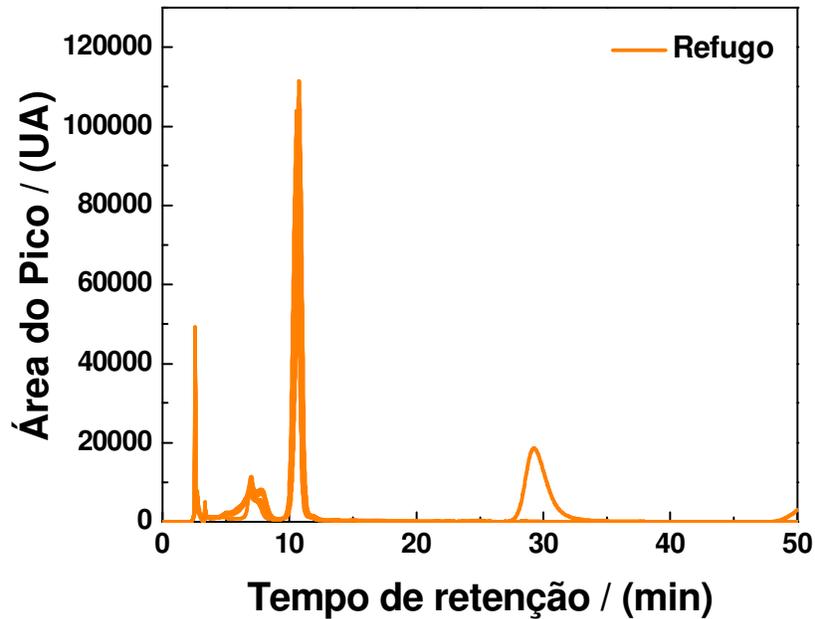


Figura I.c. Conjunto de cinco cromatogramas de extratos de refugo obtidos de acordo com descrição da página 56.

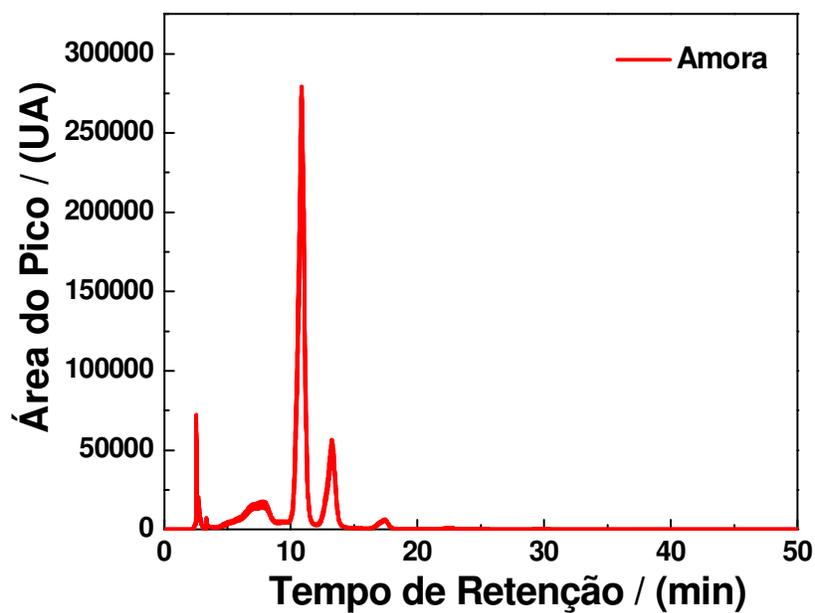


Figura I.d. Conjunto de cinco cromatogramas de extratos de amora obtidos de acordo com descrição da página 56.

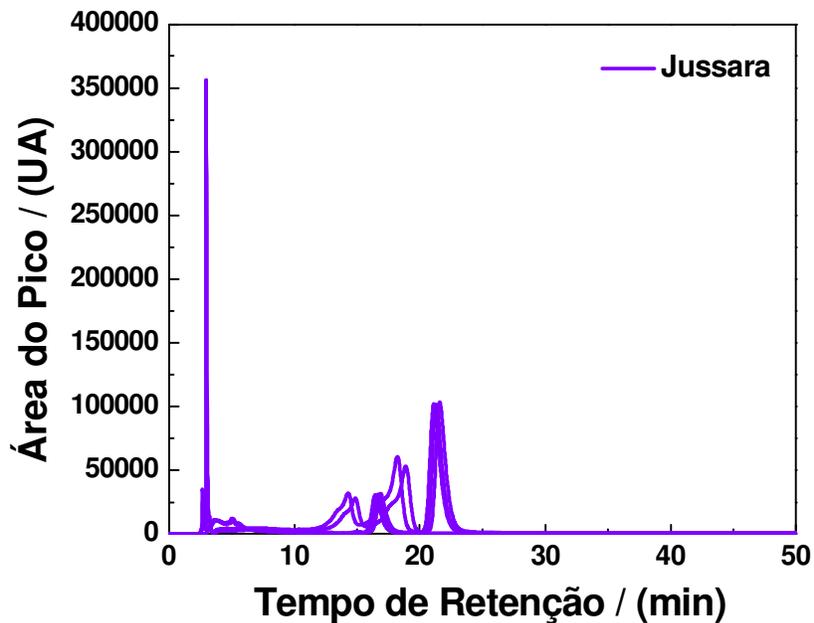


Figura I.e. Conjunto de cinco cromatogramas de extratos de jussara obtidos de acordo com descrição da página 56.

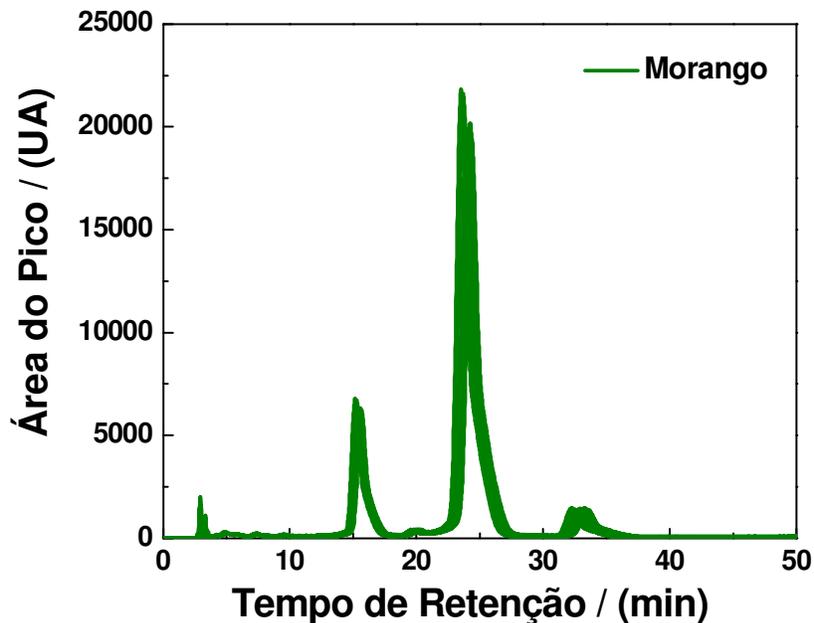


Figura I.f. Conjunto de oito cromatogramas de extratos de morango obtidos de acordo com descrição da página 56.

ANEXO II: Conjunto dos dados obtidos de eletroferogramas das amostras de extratos de frutas

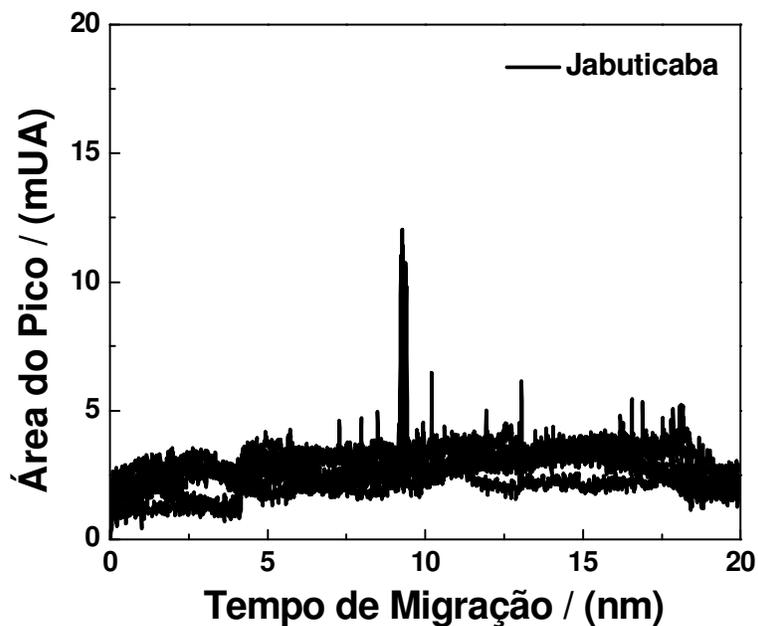


Figura II.a. Conjunto de seis eletroferogramas de extratos de jabuticaba obtidos de acordo com descrição da página 57.

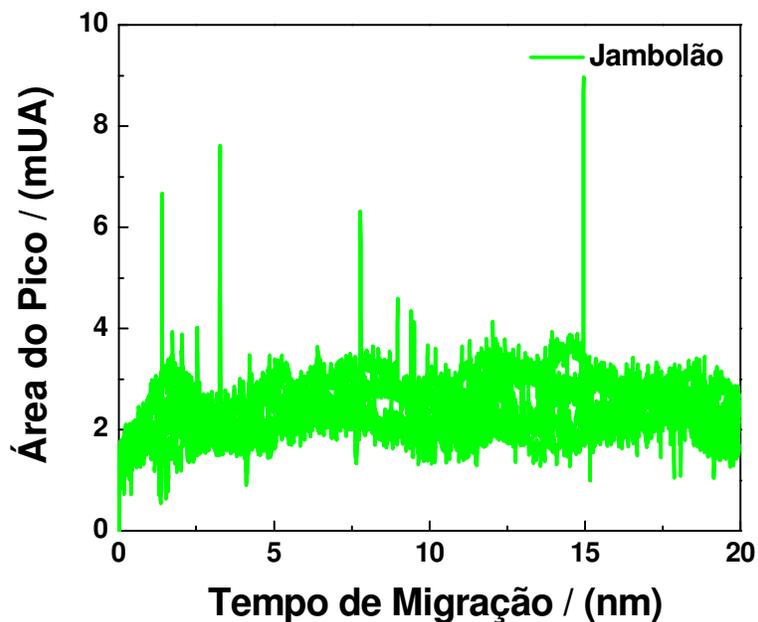


Figura II.b. Conjunto de seis eletroferogramas de extratos de jambolão obtidos de acordo com descrição da página 57.

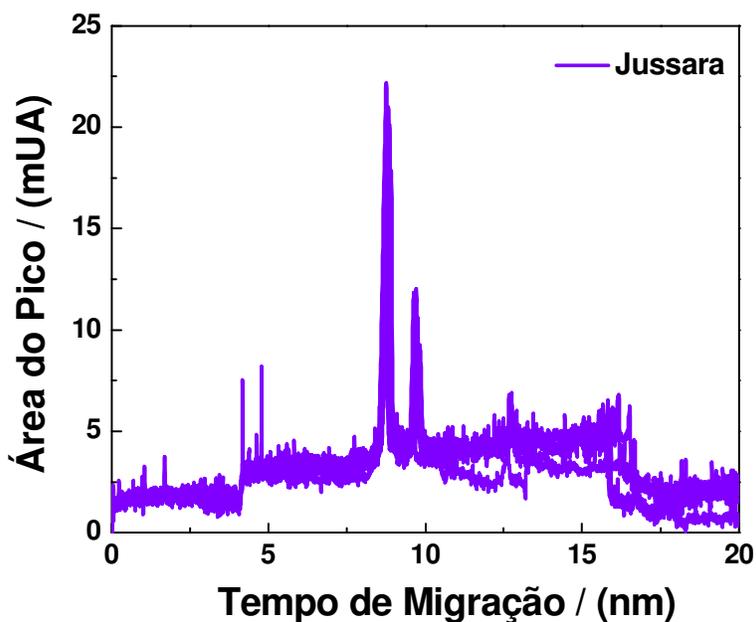


Figura II.c. Conjunto de seis eletroferogramas de extratos de jussara obtidos de acordo com descrição da página 57.

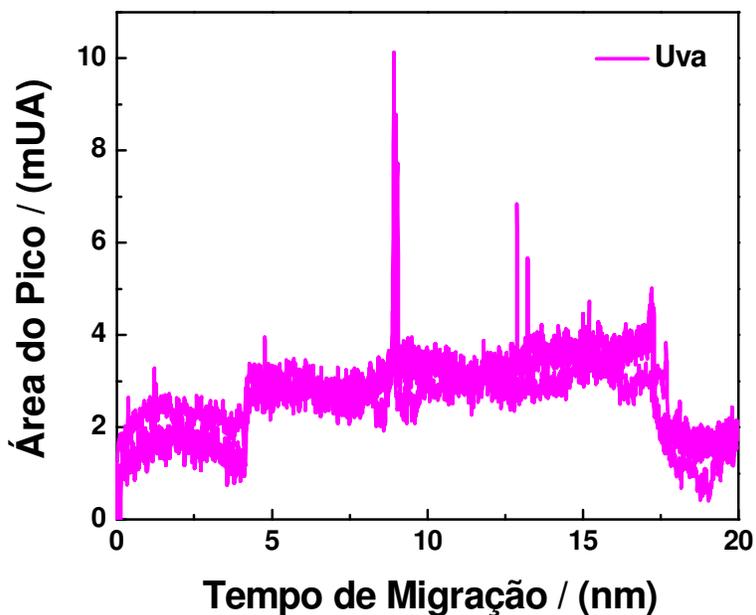


Figura II.d. Conjunto de seis eletroferogramas de extratos de uva obtidos de acordo com descrição da página 57.

ANEXO III: Conjunto dos dados obtidos de espectros de massas das amostras de extratos de frutas

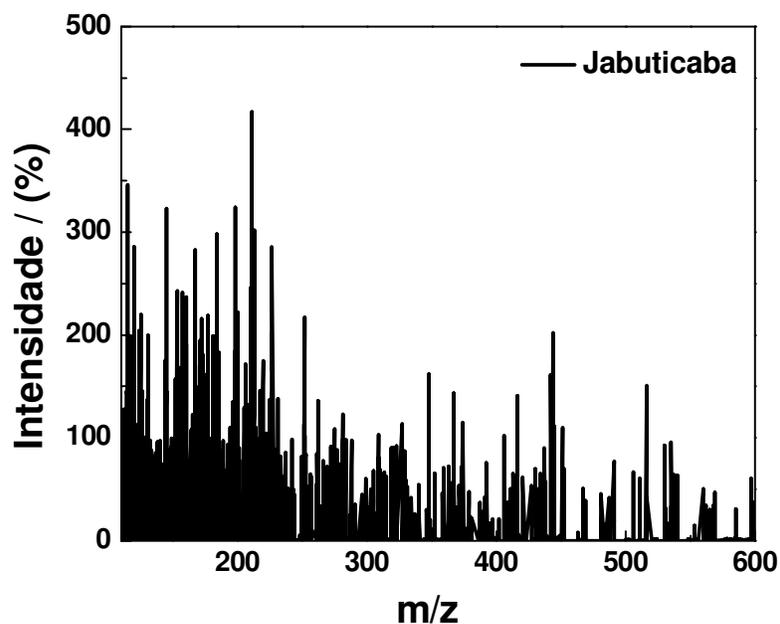


Figura III.a. Conjunto de 29 espectros de massas de extratos de jaboticaba obtidos de acordo com descrição da página 57.

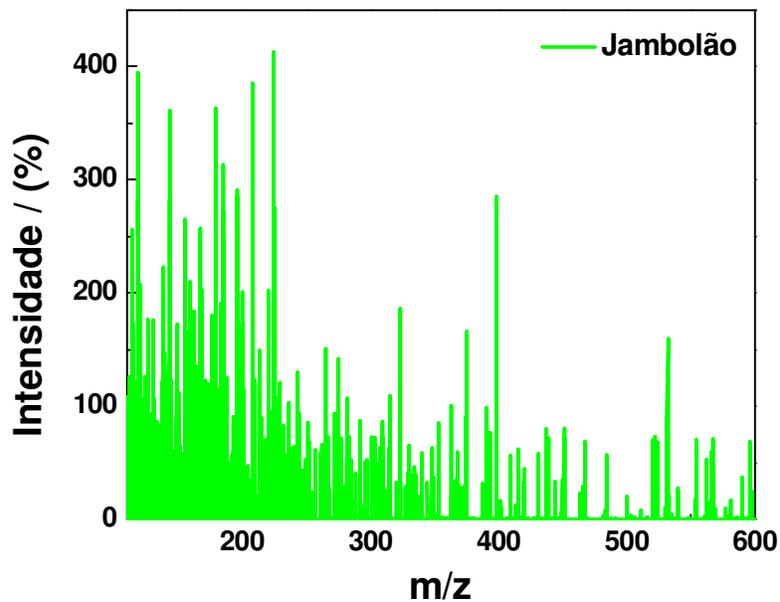


Figura III.b. Conjunto de 32 espectros de massas de extratos de jambolão obtidos de acordo com descrição da página 57.

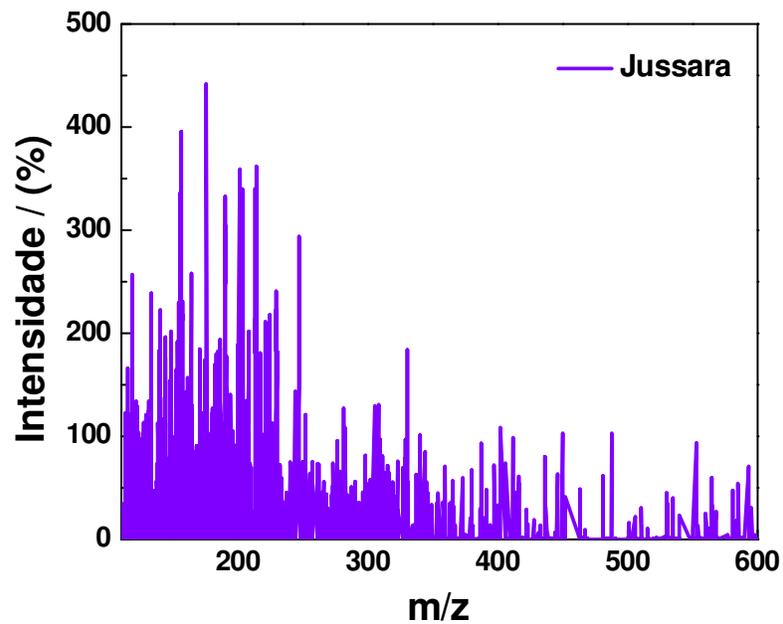


Figura III.c. Conjunto de 32 espectros de massas de extratos de jussara obtidos de acordo com descrição da página 57.

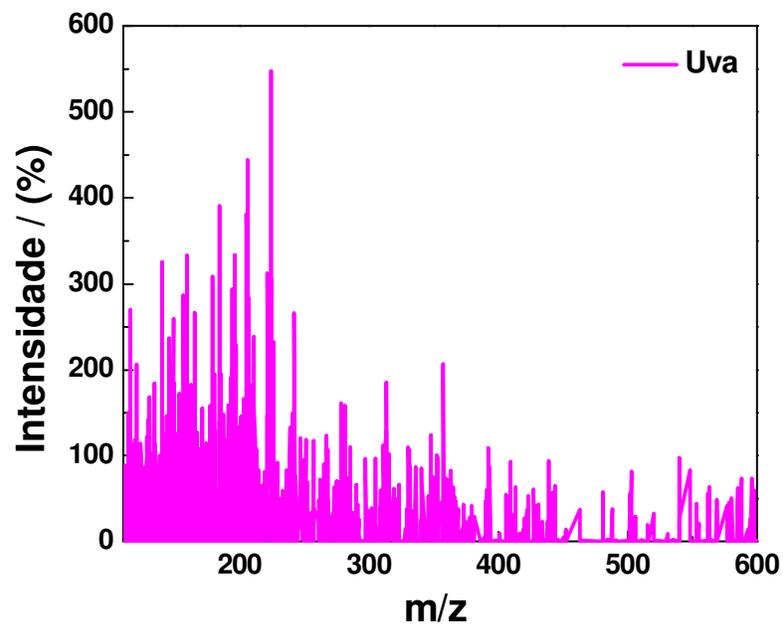


Figura III.d. Conjunto de 29 espectros de massas de extratos de uva obtidos de acordo com descrição da página 57.

ANEXO IV: Conjunto dos espectros de massas das amostras de extratos de frutas purificados e não purificados

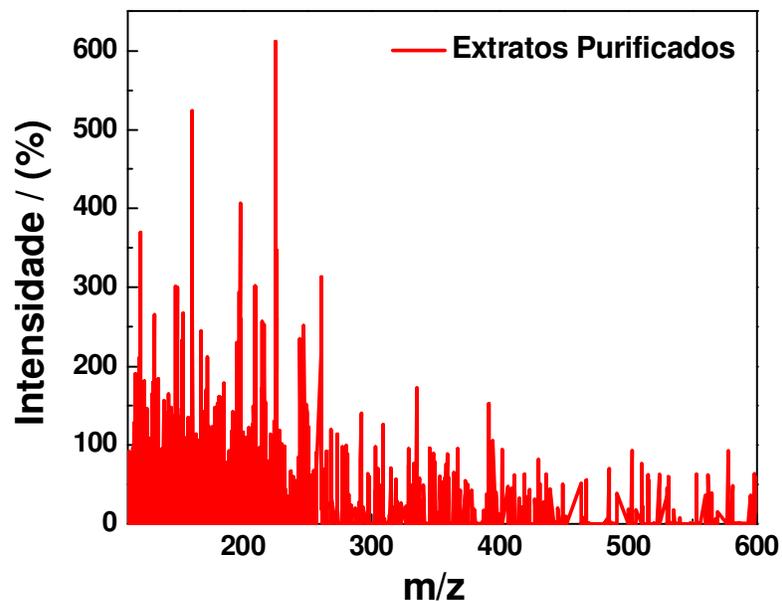


Figura IV.a. Conjunto de 63 espectros de massas de extratos purificados das frutas em estudo obtidos de acordo com descrição da página 57.

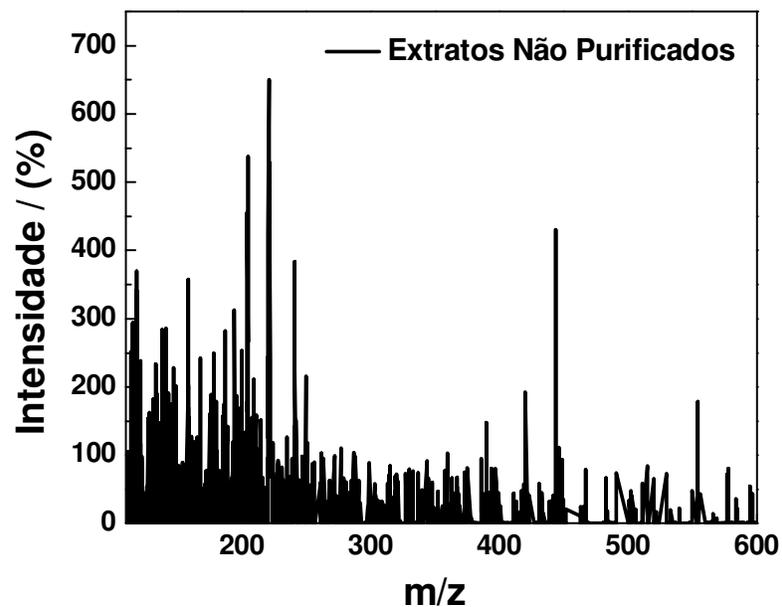


Figura IV.b. Conjunto de 59 espectros de massas de extratos não purificados das frutas em estudo obtidos de acordo com descrição da página 57.

ANEXO V: Conjunto dos espectros de massas das amostras de extratos aquosos e alcoólicos (etanol 94 %) de frutas

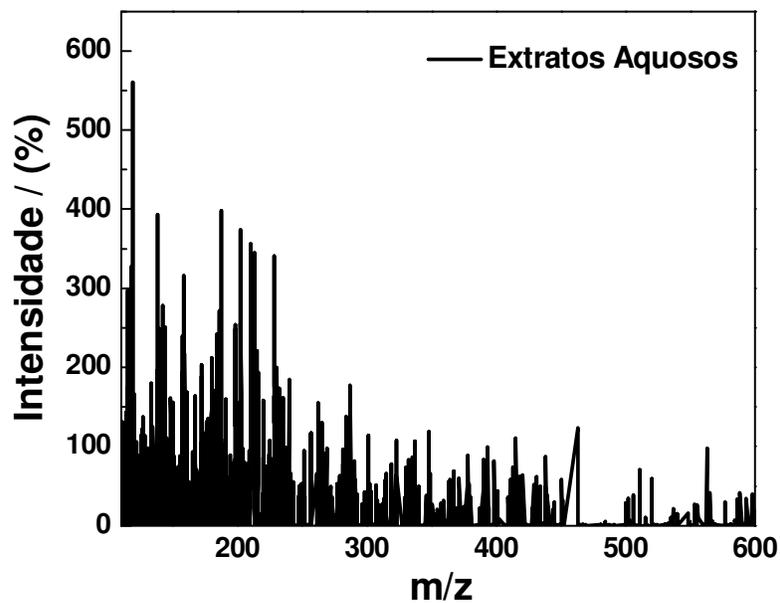


Figura V.a. Conjunto de 64 espectros de massas de extratos aquosos das frutas em estudo obtidos de acordo com descrição da página 57.

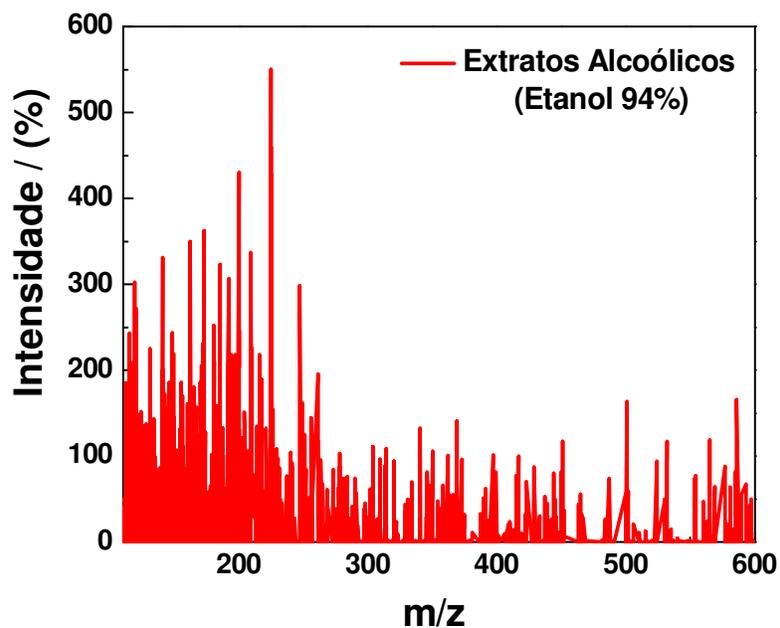


Figura V.b. Conjunto de 58 espectros de massas de extratos alcoólicos (etanol 94 %) das frutas em estudo obtidos de acordo com descrição da página 57.

