



UNICAMP

Instituto de Química



Grupo de Pesquisas em Química
Analítica e Educação

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

“OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO, ESTERILIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE ANTOCIANINAS OBTIDAS A PARTIR DE FRUTAS”

Autora: PATRÍCIA GISELA SAMPAIO

Orientadora: PROFa. DRa. ADRIANA VITORINO ROSSI

Fevereiro 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE
QUÍMICA DA UNICAMP

Sa47o Sampaio, Patrícia Gisela.
Otimização da extração, esterilização e identificação
de antocianinas obtidas a partir de frutas / Patrícia Gisela
Sampaio. -- Campinas, SP: [s.n], 2008.

Orientadora: Adriana Vitorino Rossi.

Dissertação - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Química.

1. Antocianinas. 2. Extração. 3. Esterilização.
4. Identificação de antocianinas. I. Rossi, Adriana Vitorino.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Química. III. Título.

Título em inglês: Optimization of extraction, sterilization and identification of
anthocyanins obtained from fruits

Palavras-chaves em inglês: Anthocyanins, Extraction, Sterilization, Identification of
anthocyanins

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Mestre em Química na área de Química Analítica

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

Data de defesa: 25/02/2008

*"Comece fazendo o que é necessário,
depois o que é possível,
e de repente
você estará fazendo o impossível."*

São Francisco de Assis

*Dedico esta dissertação à minha família,
pelo apoio incondicional,
com amor.*

AGRADECIMENTOS

A Deus pelos dons da sabedoria, discernimento e paciência.

À Profa. Dra. Adriana Vitorino Rossi por acreditar em meu potencial desde a graduação na iniciação científica até a finalização deste trabalho. Agradeço por me escutar, compreender e incentivar por minhas decisões pessoais e profissionais.

Ao Grupo CentroFlora pela oportunidade da vivência industrial e ao incentivo à pesquisa. Ao CNPq, pela bolsa RHAÉ concedida.

À toda direção, professores e funcionários do Instituto de Química da UNICAMP, em particular aos funcionários da CPG, Bel, Izabel e Wesley pela disponibilidade em ajudar. Ao Ricardo, técnico responsável pelo HPLC, por compartilhar sua vasta experiência profissional.

Ao Prof. Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP pela parceria em projeto temático com o Grupo GPQUAE e à funcionária Marcela Sismotto pela atenção a mim dispensada, apoio técnico e por dividir as inúmeras horas sob intenso frio da sala de equipamento de MS.

Aos professores Drs. Dosil Pereira de Jesus e Maria Izabel Maretti Silveira Bueno por suas importantes contribuições neste trabalho pela participação em meu Exame de Qualificação.

A Acácia Adriana Salomão que, mais do que técnica do laboratório GPQUAE, é um anjo disposta a ajudar sem medir esforços. Pela amizade, incentivo, alegria, dedicação e suporte técnico. Com certeza pessoa indispensável para o nosso laboratório.

Às meninas do laboratório que contribuíram para a realização deste trabalho, Martha, Luciana, Juliana e Daniela Terci pela amizade e cumplicidade. Aos meninos do laboratório, Marcio, Felipe e Danilo, pelas boas risadas e momentos de descontração. E a todos os membros e ex-membros do GPQUAE e ao Prof. Matthieu Tubino que fazem parte dessa família e que, direta ou indiretamente, contribuíram para esse trabalho.

À minha amiga Tatí, que mais que melhor amiga, é uma irmã. Pelo incentivo, pelas confidências, pelas conversas sem fim, pelas viagens, passeios, compras, choros, gargalhadas... Como já sabe, nunca te darei trégua!!! Te adoro!!!

Aos meus amigos, Neto, Maíra, Daiane, Jacqueline, Lucy, Camila e Roberta, pela amizade sincera e presente desde a graduação, vocês são incríveis!!!

Às minhas eternas amigas da ETECAP, Fernanda, Cíntia, Patrícia e Sabrina, que mesmo distantes me apoiaram e são mais do que importantes na minha vida!!!

Ao Fernando, que descrever o seu apoio incondicional torna-se uma tarefa complicada... Pelas diversas idas à UNICAMP (quase pode também ser mestre!!!), pelo incentivo, por me fazer sentir a mulher mais inteligente do universo, pelos conselhos, por me seqüestrar me impedindo de explodir, pelo colo, por ser o melhor momento do meu dia... E, principalmente, por me entender nos momentos de ausência e cansaço. TE AMO!!!

À minha vó Maria e minha tia Palmira que me incentivaram desde à iniciação científica, cultivando as lindas hortênsias! Aos meus primos Waltinho, Fabíola e Alexandre pelo entusiasmo, amizade, interesse pelos meus projetos e ótimas risadas.

Em especial aos meus queridos pais, Hamilton e Cidinha, por nunca desistiram de mim, pelos meus retornos sem questionamentos, orações e, principalmente, por me fazerem entender e ter a certeza de que o estudo é o melhor bem e a maior herança. Ao meu irmão Marcelo e sua esposa Angela, que sempre estiveram ao meu lado. Amo vocês!!!

A todos, meu carinho e amor!!!

Tudo é função do estado mais provável de ser no tempo, com todas as incertezas das palavras!

POEMA QUÂNTICO – Fernando Pessoa

CURRÍCULO DA AUTORA

- Graduação – *Bacharelado em Química*
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas-SP *Conclusão: 12/2005*
- Graduação – Licenciatura em Química
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas-SP *Conclusão: 12/2005*

TRABALHOS DESENVOLVIDOS EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA

- “Aspectos analíticos de antocianinas extraídas de hortênsias: caracterização e aplicações” Período: agosto/2003 a julho/2004. Bolsista PIBIC/CNPq. Orientação: Profa. Dra. Adriana Vitorino Rossi
- “Aspectos analíticos de antocianinas extraídas de hortênsias: caracterização e aplicações”. Período: agosto/2004 a julho/2005. Bolsista PIBIC/CNPq. Orientação: Profa. Dra. Adriana Vitorino Rossi

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

- “Aspectos analíticos de antocianinas extraídas de hortênsias: caracterização e aplicações” no XII CONGRESSO INTERNO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNICAMP, 22 e 23/setembro/2004. Trabalho apresentado na forma de painel.
- “Aspectos analíticos de antocianinas extraídas de hortênsias: caracterização e aplicações” no 27ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 30/maio a 2/junho/2004. Trabalho apresentado na forma de painel.
- “Aspectos analíticos de antocianinas extraídas de hortênsias: caracterização e aplicações” no XIII CONGRESSO INTERNO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNICAMP, 28 e 29/setembro/2005. Trabalho apresentado na forma de painel.
- “Procedimentos analíticos para estudo de interação de antocianinas extraídas de hortênsias com ferro (II)” no 13º ENQA – ENCONTRO NACIONAL DE QUÍMICA ANALÍTICA e 1º CONGRESSO IBERO-AMERICANO DE QUÍMICA ANALÍTICA, 12 a 16/setembro/2005. Trabalho apresentado na forma de painel.
- “Estudos de esterilização de frutas para otimização de características de extratos de antocianinas” na 30ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 31/maio a 03/junho/2007. Trabalho apresentado na forma de painel.
- “Ajustes de condições de solubilização de extratos vegetais para identificação por HPLC de antocianinas encontradas em frutas” no 14º ENQA – Encontro Nacional de Química Analítica, 07 a 11/outubro/2007. Trabalho apresentado na forma de painel.

ESTÁGIOS

- Anidro do Brasil Extrações Ltda, Grupo CentroFlora, Botucatu–SP, de 14 a 18 de maio de 2007. Estágio 40 horas no laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento.
- Programa de Estágio de Capacitação Docente (PED - C), Disciplina de Química Analítica Quantitativa e Qualitativa oferecida para alunos do 3º semestre do curso de farmácia da UNICAMP. De agosto a dezembro de 2007.

ATIVIDADES EXTRA-CURRICULARES

- Integrante da Empresa Júnior AllQuímica - setor de RH, contratação de estagiários, viabilização de metodologia e execução de trabalho, de agosto/2002 a agosto/2003, no IQ-UNICAMP.
- Monitora no III SIMPÓSIO DE PROFISSIONAIS DO ENSINO DE QUÍMICA (SIMPEQ), realizado em 12 e 13/setembro/2003, no IQ-UNICAMP.
- Monitora no IV SIMPÓSIO DE PROFISSIONAIS DO ENSINO DE QUÍMICA (SIMPEQ), 17 e 18/setembro/2004, no IQ-UNICAMP.
- Monitora no I ENCONTRO PAULISTA DE PESQUISA EM ENSINO DE QUÍMICA (EPPEQ), 17 e 18/setembro/2004, no IQ-UNICAMP.
- Monitora no Programa Ciência & Arte nas Férias: Projeto “Corantes e Pigmentos: Parece Brincadeira, mas é Pura Química”, 07/janeiro a 06/fevereiro/2004, no IQ-UNICAMP.

CURSOS EXTRA-CURRICULARES

- “Entre vitrais e Transparências: a fascinação do vidro”, duração de 6 horas, realizado na II Semana de Química do IQ-UNICAMP, 7 a 11/outubro/2002.
- “Química Forense”, duração de 6 horas, realizado na II Semana de Química do IQ-UNICAMP, 7 a 11/outubro/2002.
- “Química das Sensações”, duração de 6 horas, realizado na III Semana de Química do IQ-UNICAMP, 6 a 10/outubro/2003.
- “Química Forense”, duração de 6 horas, realizado na IV Semana de Química do IQ-UNICAMP, 5 a 8/outubro/2004.

Para maiores detalhes, consultar Currículo Lattes

RESUMO

“OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO, ESTERILIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE ANTOCIANINAS OBTIDAS A PARTIR DE FRUTAS”

Aluna: Patrícia Gisela Sampaio

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Vitorino Rossi

Antocianinas (ACYS) são pigmentos naturais de origem vegetal classificados quimicamente como flavonóides. O uso industrial de ACYS é restrito em função de algumas limitações, como seu alto custo e sua relativa baixa estabilidade. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi utilizar frutas do Brasil como fontes para extração de ACYS, testando-se estratégias para estabilização dos extratos e identificação das ACYS. Foram obtidos extratos de ACYS, a partir de frutos de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*), amora (*Morus nigra*), amora preta (*Rubus* sp) e jabolão (*Eugenia jambolana* Lam), otimizando-se condições de extração com a variação de solventes, temperatura de extração, uso de agitação e de trituração mecânica. Foram utilizadas cascas, frutas inteiras e descaroçadas na proporção 1:3 fonte de ACYS:solvente (m/v). Os extratos com maior quantidade de ACYS foram obtidos a partir de extração com etanol 94% v/v, a 55°C por 30 minutos e, em alguns casos, com uso de trituração mecânica. Para aumentar a estabilidade dos extratos de ACYS, investigaram-se processos de esterilização como a tinalização dos extratos e o branqueamento das frutas. Este último mostrou-se mais favorável, pois além de aumentar a estabilidade dos extratos, que podem durar 360 dias sem aparecimento de fungos, elevou a quantidade de ACYS extraída. Para identificação de ACYS foram avaliados 3 métodos, aplicando-se como técnica de separação a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Testaram-se métodos envolvendo padrões de ACYS; comparação relativa de tempos de retenção e espectrometria de massas com ionização por eletrospray e analisador quadrupolo-tempo de voo (ESI-Q-TOF-MS). A antocianina majoritária identificada foi a cianidina-3-glicosídeo nos extratos de jabuticaba, amora e amora preta. O método por comparação relativa de t_R é uma boa opção para a identificação de ACYS, pois envolve procedimento simples e não requer o uso de padrões, mas tem limitações que foram superadas com a viabilização ou confirmação da identificação de ACYS por HPLC-ESI-Q-TOF-MS.

ABSTRACT

“OPTIMIZATION OF EXTRACTION, STERILIZATION AND IDENTIFICATION OF ANTHOCYANINS OBTAINED FROM FRUITS”

Author: Patrícia Gisela Sampaio

Adviser: Profa. Dra. Adriana Vitorino Rossi

Anthocyanins (ACYS) are natural pigments of plant origin, chemically classified as flavonoids. The industrial use of ACYS is restricted according to some limitations, such as its high cost and relative low stability. In this context, the objective of this study was to use jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*), mulberry (*Morus nigra*), blackberry (*Rubus spp*) and jambolão (*Eugenia jambolana Lam*), whose are common Brazilians fruits, as sources of ACYS to test extraction conditions, extracts stabilization strategies and ACYS identification strategies. The extraction conditions were optimized varying solvents, temperature, and using or not the stirrer and the mechanic grinding. Peels, whole fruits and fruits without pits were used in the proportion of 1:3 ACYS source: solvent (m/v). The extracts with the greatest amount of ACYS were obtained from extraction with ethanol 94% v/v, 55 °C for 30 minutes and, in some cases, using mechanical grinding. To increase the stability of the ACYS extracts, sterilization processes such as tyndalization of the extracts and blanching of fruit were investigated. The blanching was more favorable because it increased the stability of the extracts, which can last for 360 days without appearance of fungi, and increased the amount of ACYS extracted. Using the high performance liquid chromatography (HPLC) for separation, three methods were evaluated in order to identify ACYS: the method with ACYS patterns; the relative comparison of retention time (t_R); and mass spectrometry using electrospray ionization and quadrupole-time-of-flight mass analysis (ESI-Q-TOF-MS). The majority anthocyanin identified in extracts of jaboticaba, mulberry and blackberry was cyanidin-3-glycoside. The method with comparison of t_R was a good option for the ACYS identification because it is a simple procedure and does not require the use of standards, but it has limitations that could be overcome making possible or confirming the ACYS identification using HPLC-ESI-Q-TOF-MS.

ÍNDICE

Lista de Abreviaturas e Termos.....	xix
Lista de Tabelas.....	xxi
Lista de Figuras.....	xxiii
 Apresentação do Convênio.....	 01
 Capítulo 1 – INTRODUÇÃO.....	 03
1.1 Antocianinas (ACYS).....	05
1.2 Uso industrial de ACYS.....	08
1.3 Fontes de ACYS.....	09
1.3.1 Jabuticaba (<i>Myrciaria cauliflora</i>).....	09
1.3.2 Amora (<i>Morus nigra</i>).....	10
1.3.3 Amora Preta (<i>Rubus</i> sp).....	11
1.3.4 Jambolão (<i>Eugenia jambolana</i> Lam).....	12
1.3.5 Outras Considerações.....	13
1.4 Extração.....	13
1.5 Estabilidade.....	14
1.5.1 Esterilização.....	15
1.5.1.1 Branqueamento.....	16
1.5.1.2 Tindalização.....	18
1.6 Identificação.....	18
1.6.1 Identificação por HPLC com detecção espectrofotométrica.....	20
1.6.2 Identificação por HPLC com detecção MS.....	21
 Capítulo 2 – OBJETIVOS.....	 23

Capítulo 3 – PARTE EXPERIMENTAL.....	27
3.1 Considerações Gerais.....	29
3.2 Reagentes, Materiais e Equipamentos.....	31
3.2.1. Reagentes.....	31
3.2.2 Materiais.....	31
3.2.3 Equipamentos.....	31
3.3 Procedimentos Experimentais.....	32
3.3.1 Estudos de Métodos de Extração de ACYS.....	32
3.3.2 Estudos de Esterilização.....	34
3.3.2.1 Branqueamento.....	34
3.3.2.2 Tindalização.....	35
3.3.3 Estudos de Estabilidade dos Extratos de ACYS.....	36
3.3.4 Estudos de identificação de ACYS.....	36
3.3.4.1 Ajustes de condições de solubilização das pastas de ACYS.....	36
3.3.4.2 Método de Goiffon.....	37
3.3.4.3 Testes com Padrões de ACYS.....	38
3.3.4.4 Identificação de ACYS por HPLC-ESI-Q-TOF-MS.....	38
Capítulo 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.1 Estudos de Métodos de Extração de ACYS.....	44
4.1.1 Estudos Iniciais de Extração de ACYS.....	45
4.1.2. Outros Estudos de Extração de ACYS.....	46
4.1.2.1 Jabuticaba e Refugo de Jabuticaba (Estudos: K4; K5; M4; M5; Q4; Q5; S4; S5).....	46
4.1.2.2 Amora Preta (Estudos: U4; U5; W4; W5).....	47
4.1.2.3 Jambolão (Estudos: Y4; Y5; Y6; AA4; AA5; AA6).....	47
4.2 Estudos de Esterilização e Estabilidade dos Extratos de ACYS.....	48

4.2.1 Branqueamento.....	48
4.2.1.1 Estudos iniciais do Branqueamento.....	49
4.2.1.1.1 Amora Fresca (Estudos: G1; G2; G3).....	49
4.2.1.1.2 Amora Congelada (Estudos: P1; P2; P3).....	50
4.2.1.1.3 Jabuticaba Fresca (Estudos: B1; B2; B3; C1; C2; C3; E1; E2; E3).....	51
4.2.1.1.3.1 Extração em água destilada (Estudos: B1; C1; E1).....	51
4.2.1.1.3.2 Extração em etanol 99,5 % v/v (Estudos: B2; C2; E2).....	52
4.2.1.1.3.3 Extração em etanol:ácido acético 1 % 85:15 v/v (Estudos: B3; C3; E3).....	53
4.2.1.1.4 Jabuticaba Congelada (Estudos: I1; I2; I3; J1; J2; J3; L1; L2; L3).....	54
4.2.1.1.4.1 Extração em água destilada (Estudos: I1; J1; L1).....	54
4.2.1.1.4.2 Extração em etanol 99,5 % v/v (Estudos: I2; J2; L2).....	56
4.2.1.1.4.3 Extração em etanol:ácido acético 1 % 85:15 v/v (Estudos: I3; J3; L3).....	57
4.2.1.2 Outros estudos do Branqueamento.....	58
4.2.1.2.1 Jabuticaba e Refugo (Estudos: L4; L5; N4; N5; R4; R5; T4; T5).....	59
4.2.1.2.2 Amora Preta (Estudos: V4; V5; X4; X5).....	60
4.2.1.2.3 Jambolão (Estudos: Z4; Z5; Z6; AB4; AB5; AB6).....	61
4.2.2 Tindalização (Estudos: Y5; AA5).....	62
4.3 Estudos de Identificação de ACYS.....	63
4.3.1 Ajustes de condições de solubilização das pastas de ACYS.....	63
4.3.2 Método de Goiffon.....	66
4.3.2.1 Jabuticaba (Estudos: L5; N5).....	67
4.3.2.2 Refugo de Jabuticaba (Estudos: R5; T5).....	69
4.3.2.3 Amora (Estudos: O4; P4).....	70
4.3.2.3 Amora Preta (Estudos: U4; V4).....	72
4.3.2.4 Jambolão (Estudos: Y4; Y5; Z4; Z5; AA4; AA5; AB4; AB5).....	74
4.3.3 Testes com Padrões de ACYS.....	78
4.3.4 Identificação de ACYS por HPLC–ESI–Q–TOF– MS.....	83
4.3.4.1 Jabuticaba (Estudos: L5; N5).....	88

4.3.4.2 Refugio de Jabuticaba (Estudos: R5; T5).....	89
4.3.4.3 Amora (Estudos: O4; P4).....	90
4.3.4.4 Amora Preta (Estudos: U4; V4).....	94
4.3.4.5 Jambolão (Estudos: Y4; Y5; Z4; Z5; AA4; AA5; AB4; AB5).....	96
 Capítulo 5 – CONCLUSÕES.....	101
 Capítulo 6 – TRATAMENTO DE RESÍDUOS.....	105
 Capítulo 7 – PERSPECTIVAS.....	109
 Capítulo 8 – REFERÊNCIAS.....	113
 Anexos.....	129
Anexo 1: Avaliação da vazão da capela pela Comissão de Segurança do Instituto de Química da UNICAMP.....	131
Anexo 2: Testes estatísticos utilizados para as análises dos dados.....	133

LISTA DE ABREVIATURAS E TERMOS

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

m/z : Razão massa/carga

$[M]^+$: Cátion

$[M + H]^+$: Molécula Protonada

t_R : Tempo de Retenção do Composto

t_0 : Tempo de Retenção de um Composto não Retido

α : Fator de Separação

A: Absorbância

ACYS: Antocianinas

DAD: Arranjo de Diodos

ESI: Ionização por Eletrospray

HAc: Ácido Acético

HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

MS: Espectrometria de Massas

MS/MS: Espectrometria de Massas em Sequência

NMR: Ressonância Magnética Nuclear

PC: Cromatografia em Papel

PPO: Polifenol Oxidase

Q: Analisador de Massas Quadrupolo

SPE: Extração em Fase Sólida

TLC: Cromatografia em Camada Delgada

TOF: Analisador por Tempo de Voo

UV: Ultravioleta

Vis: Visível

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições de extração de ACYS de frutas.....	33
Tabela 2. Representação das condições de estudo para otimização da extração de ACYS.....	33
Tabela 3. Condições de extração de ACYS de frutas branqueadas.....	34
Tabela 4. Condições das frutas usadas para branqueamento.....	35
Tabela 5. Condições de extração de ACYS de jambolão.....	38
Tabela 6. Gradiente de eluição e tempo.....	39
Tabela 7. Valores de absorbância (A) em $\lambda_{\text{máx}}$ dos diferentes extratos.....	45
Tabela 8. Valores de absorbância (A) em $\lambda_{\text{máx}} = 539$ nm para extratos alcoólicos de jabuticaba e refugo.....	46
Tabela 9. Valores de absorbância (A) em $\lambda_{\text{máx}} = 539$ nm para extratos de amora preta.....	47
Tabela 10. Valores de absorbância (A) em $\lambda_{\text{máx}} = 539$ nm para extratos de jambolão.....	47
Tabela 11. Valores de absorbância (A) em $\lambda_{\text{máx}} = 524$ nm para extratos aquosos e em $\lambda_{\text{máx}} = 538$ nm para extratos alcoólicos de amora fresca.....	50
Tabela 12. Valores de absorbância (A) em $\lambda_{\text{máx}} = 524$ nm para extratos aquosos e em $\lambda_{\text{máx}} = 538$ nm para extratos alcoólicos de amora congelada.....	51
Tabela 13. Valores de absorbância (A) em $\lambda_{\text{máx}} = 539$ nm para extratos de jabuticaba branqueada e refugo branqueado.....	59
Tabela 14. Valores de absorbância (A) em $\lambda_{\text{máx}} = 538$ nm para extratos de jabuticaba.....	59
Tabela 15. Valores de absorbância (A) em $\lambda_{\text{máx}} = 538$ nm para extratos de refugo.....	60
Tabela 16. Valores de absorbância (A) em $\lambda_{\text{máx}} = 539$ nm para extratos de amora preta branqueada.....	60
Tabela 17. Valores de absorbância (A) em $\lambda_{\text{máx}} = 538$ nm para extratos de amora preta.....	61
Tabela 18. Valores de absorbância (A) em $\lambda_{\text{máx}} = 538$ nm para extratos de jambolão branqueado.....	61

Tabela 19. Valores de absorvância (A) em $\lambda_{\text{máx}} = 538$ nm para extratos de jambolão.....	62
Tabela 20. Valores de absorvância (A) em $\lambda_{\text{máx}} = 538$ nm para extratos de jambolão.....	62
Tabela 21. Valores de absorvância média (A) em $\lambda_{\text{máx}} = 538$ nm para extratos tindalizados de jambolão	62
Tabela 22. ACYS de extratos de jabuticaba.....	68
Tabela 23. ACYS de extratos de refugo.....	70
Tabela 24. ACYS de extratos de amora.....	71
Tabela 25. ACYS de extratos de amora preta.....	73
Tabela 26. ACYS de extratos de jambolão.....	78
Tabela 27 - Tempo de retenção (t_R) dos padrões de ACYS.....	83
Tabela 28. Dados experimentais de tempo de retenção e razão m/z dos padrões de ACYS.....	84
Tabela 29. ACYS de extratos de jabuticaba identificadas por HPLC-ESI-Q-TOF-MS.....	89
Tabela 30. ACYS de extratos de refugo identificadas por HPLC-ESI-Q-TOF-MS.....	90
Tabela 31. ACYS de extratos de amora identificadas por HPLC-ESI-Q-TOF-MS.....	93
Tabela 32. ACYS de extratos de amora preta identificadas por HPLC-ESI-Q-TOF-MS.....	96
Tabela 33. ACYS de extratos de jambolão identificadas por HPLC-ESI-Q-TOF-MS.....	99

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas do cátion flavílico ⁶	05
Figura 2. Estrutura genérica de ACYS ⁴	05
Figura 3. Possíveis mudanças estruturais das ACYS em meio aquoso em função do pH ^{6,18}	07
Figura 4. Ilustração da jabuticaba (<i>Myrciaria cauliflora</i>) ³⁷	09
Figura 5. Ilustração da amora (<i>Morus nigra</i>) ³⁸	10
Figura 6 - Ilustração da amora preta (<i>Rubus</i> sp) ³⁹	11
Figura 7. Ilustração do jambolão (<i>Eugenia jambolana</i> Lam) ⁴⁰	12
Figura 8. Principais componentes do equipamento de ESI-Q-TOF-MS. *Pusher: lentes de aceleração, direcionamento e lentes do tubo vôo; ** Reflectron: reflete os íons para o detector. Q indica o analisador quadrupolo e TOF o analisador por tempo de vôo ¹²¹	22
Figura 9. Fluxograma com identificação do estudo para as condições de extração e de esterilização.....	30
Figura 10. Espectros de extratos de ACYS de frutas obtidos em etanol 99,5 % v/v (amora) e 94 % v/v (demais frutas) na proporção 1:3 fruta/solvente (m/v) ²⁰ . O branco utilizado para cada espectro foi o respectivo solvente extrator.....	43
Figura 11. Espectro típico de extrato de ACYS de jabuticaba obtido a partir da extração a 25 °C por 24 horas na proporção 1:3 fruta/solvente (m/v) ²⁰ , sendo em meio aquoso, $\lambda_{\text{máx}} = 524$ nm, e meio alcoólico $\lambda_{\text{máx}} = 538$ nm. O branco utilizado para cada espectro foi o respectivo solvente extrator.....	44
Figura 12. Valores de absorbância em $\lambda_{\text{máx}} = 524$ nm para extratos aquosos de jabuticaba fresca do dia de extração das ACYS (■) e após 18 dias para extratos de fruta não branqueada (A1 e D1), 60 dias para extratos de fruta inteira branqueada (B1 e C1) e após 200 dias para extratos de casca branqueada (E1) (■).....	52
Figura 13. Valores de absorbância em $\lambda_{\text{máx}} = 539$ nm para extratos alcoólicos não acidificados de jabuticaba fresca do dia de extração das ACYS (■) e após 350 dias de armazenamento (■).....	53

Figura 14. Valores de absorbância em $\lambda_{\text{máx}} = 539$ nm para extratos alcoólicos acidificados de jabuticaba fresca do dia de extração das ACYS (■) e após 350 dias de armazenamento (■)54

Figura 15. Valores de absorbância em $\lambda_{\text{máx}} = 524$ nm para extratos aquosos de jabuticaba congelada do dia de extração das ACYS (■) e após 19 dias para extratos de fruta não branqueada (H1 e K1), 87 dias para extratos de fruta inteira branqueada usada para extração (J1), 177 dias para extratos de fruta inteira branqueada e apenas casca para extração (I1) e após 210 dias para extratos de casca branqueada (L1) (■).....55

Figura 16. Valores de absorbância em $\lambda_{\text{máx}} = 539$ nm para extratos alcoólicos não acidificados de jabuticaba congelada do dia de extração das ACYS (■) e após 300 dias de armazenamento (■).....57

Figura 17. Valores de absorbância em $\lambda_{\text{máx}} = 539$ nm para extratos alcoólicos acidificados de jabuticaba congelada do dia de extração das ACYS (■) e após 300 dias de armazenamento (■).....58

Figura 18. Cromatograma da pasta de ACYS de amora preta 32 g L⁻¹, em água com 0,1 % v/v de HCl, sem purificação. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 v/v/v; volume de injeção 20 µL e detecção em 525 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.....64

Figura 19. Cromatograma da pasta de ACYS de amora preta 12 g L⁻¹, em etanol com 0,1 % de HCl v/v, sem purificação. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 v/v/v; volume de injeção 20 µL e detecção em 525 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.....64

Figura 20. Cromatograma da pasta de ACYS de amora preta 24 g L⁻¹, em água, após purificação com SPE detalhada na página 37. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 v/v/v; volume de injeção 20 µL e detecção em 525 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.....65

Figura 21. Cromatograma da pasta de ACYS de amora preta 24 g L⁻¹, em metanol com 0,1 % de HCl v/v, sem purificação. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 v/v/v; volume de injeção 20 µL e detecção em 525 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.....65

Figura 22. Cromatograma da pasta de ACYS de jabuticaba 17 g L⁻¹, em metanol com 0,01 % de HCl v/v, sem purificação (Estudo: L5). Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 v/v/v; volume de injeção 20 µL e detecção em 525 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.....67

Figura 23. Cromatograma da pasta de ACYS de jabuticaba 16 g L⁻¹, em metanol com 0,01 % de HCl v/v, sem purificação (Estudo: N5). Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 v/v/v; volume de injeção 20 µL e detecção em 525 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.....68

Figura 24. Cromatograma da pasta de ACYS de refugo de jabuticaba 14 g L⁻¹, em metanol com 0,01 % de HCl v/v, sem purificação (Estudo: R5). Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 v/v/v; volume de injeção 20 µL e detecção em 525 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.....69

Figura 25. Cromatograma da pasta de ACYS de refugo de jabuticaba 18 g L⁻¹, em metanol com 0,01 % de HCl v/v, sem purificação (Estudo: T5). Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 v/v/v; volume de injeção 20 µL e detecção em 525 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.....69

Figura 26. Cromatograma da pasta de ACYS de amora 16 g L⁻¹, em metanol com 0,01 % de HCl v/v, sem purificação (Estudo: O4). Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 v/v/v; volume de injeção 20 µL e detecção em 525 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.....70

Figura 27. Cromatograma da pasta de ACYS de amora 12 g L⁻¹, em metanol com 0,01 % de HCl v/v, sem purificação (Estudo: P4). Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 v/v/v; volume de injeção 20 µL e detecção em 525 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.....71

Figura 28. Cromatograma da pasta de ACYS de amora preta 12 g L⁻¹, em metanol com 0,01 % de HCl v/v, sem purificação (Estudo: U4). Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 v/v/v; volume de injeção 20 µL e detecção em 525 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.....72

Figura 29. Cromatograma da pasta de ACYS de amora preta 16 g L^{-1} , em metanol com 0,01 % de HCl v/v, sem purificação (Estudo: V4). Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 v/v/v; volume de injeção $20 \mu\text{L}$ e detecção em 525 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.....73

Figura 30. Cromatograma da pasta de ACYS de jambolão 16 g L^{-1} , em metanol com 0,01 % de HCl v/v, sem purificação (Estudo: Y4). Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 v/v/v; volume de injeção $20 \mu\text{L}$ e detecção em 525 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.....74

Figura 31. Cromatograma da pasta de ACYS de jambolão 15 g L^{-1} , em metanol com 0,01 % de HCl v/v, sem purificação (Estudo: Y5). Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 v/v/v; volume de injeção $20 \mu\text{L}$ e detecção em 525 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.....74

Figura 32. Cromatograma da pasta de ACYS de jambolão 19 g L^{-1} , em metanol com 0,01 % de HCl v/v, sem purificação (Estudo: AA4). Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 v/v/v; volume de injeção $20 \mu\text{L}$ e detecção em 525 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.....75

Figura 33. Cromatograma da pasta de ACYS de jambolão 13 g L^{-1} , em metanol com 0,01 % de HCl v/v, sem purificação (Estudo: AA5). Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 v/v/v; volume de injeção $20 \mu\text{L}$ e detecção em 525 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.....75

Figura 34. Cromatograma da pasta de ACYS de jambolão 14 g L^{-1} , em metanol com 0,01 % de HCl v/v, sem purificação (Estudo: Z4). Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 v/v/v; volume de injeção $20 \mu\text{L}$ e detecção em 525 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.....76

Figura 35. Cromatograma da pasta de ACYS de jambolão 15 g L^{-1} , em metanol com 0,01 % de HCl v/v, sem purificação (Estudo: Z5). Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 v/v/v; volume de injeção $20 \mu\text{L}$ e detecção em 525 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.....76

- Figura 36.** Cromatograma da pasta de ACYS de jambolão 15 g L^{-1} , em metanol com 0,01 % de HCl v/v, sem purificação (Estudo: AB4). Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 v/v/v; volume de injeção $20 \mu\text{L}$ e detecção em 525 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.....77
- Figura 37.** Cromatograma da pasta de ACYS de jambolão 20 g L^{-1} , em metanol com 0,01 % de HCl v/v, sem purificação (Estudo: AB5). Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 v/v/v; volume de injeção $20 \mu\text{L}$ e detecção em 525 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.....77
- Figura 38.** Cromatograma de solução de cloreto de pelargonidina, em metanol com 0,01 % de HCl v/v. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 v/v/v; volume de injeção $20 \mu\text{L}$ e detecção em 525 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.....79
- Figura 39.** Cromatograma de solução de cloreto de malvidina-3-glicosídeo, em metanol com 0,01 % de HCl v/v. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 v/v/v; volume de injeção $20 \mu\text{L}$ e detecção em 525 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.....79
- Figura 40.** Cromatograma de solução de cloreto de pelargonidina-3-glicosídeo, em metanol com 0,01 % de HCl v/v. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 v/v/v; volume de injeção $20 \mu\text{L}$ e detecção em 525 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.....80
- Figura 41.** Cromatograma de solução de cloreto de cianidina-3-galactosídeo, em metanol com 0,01 % de HCl v/v. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 v/v/v; volume de injeção $20 \mu\text{L}$ e detecção em 525 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.....80
- Figura 42.** Cromatograma de solução de cloreto de cianidina-3-glicosídeo, em metanol com 0,01 % de HCl v/v. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 v/v/v; volume de injeção $20 \mu\text{L}$ e detecção em 525 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.....81

- Figura 43.** Cromatograma de solução de cloreto de cianidina-3,5-diglicosídeo, em metanol com 0,01 % de HCl v/v. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 v/v/v; volume de injeção 20 µL e detecção em 525 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.....81
- Figura 44.** Cromatograma de solução de cloreto de cianidina-3-rutinosídeo, em metanol com 0,01 % de HCl v/v. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 v/v/v; volume de injeção 20 µL e detecção em 525 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.....82
- Figura 45.** Cromatograma de solução de cloreto de peonidina-3-glicosídeo, em metanol com 0,01 % de HCl v/v. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 v/v/v; volume de injeção 20 µL e detecção em 525 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.....82
- Figura 46.** Cromatograma e espectro de massas de solução de cloreto de cianidina-3,5-diglicosídeo em metanol com 0,01 % de HAc v/v. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada acidificada:metanol; eluição por gradiente; volume de injeção 50 µL e detecção ESI-Q-TOF-MS.....84
- Figura 47.** Cromatograma e espectro de massas de solução de cloreto de cianidina-3-glicosídeo e de cloreto de cianidina-3-galactosídeo em metanol com 0,01 % de HAc v/v. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada acidificada:metanol; eluição por gradiente; volume de injeção 50 µL e detecção ESI-Q-TOF-MS.....85
- Figura 48.** Cromatograma e espectro de massas de solução de cloreto de pelargonidina-3-glicosídeo em metanol com 0,01 % de HAc v/v. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada acidificada:metanol; eluição por gradiente; volume de injeção 50 µL e detecção ESI-Q-TOF-MS.....85
- Figura 49.** Cromatograma e espectro de massas de solução de cloreto de cianidina-3-rutinosídeo em metanol com 0,01 % de HAc v/v. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada acidificada:metanol; eluição por gradiente; volume de injeção 50 µL e detecção ESI-Q-TOF-MS.....86

Figura 50. Cromatograma e espectro de massas de solução de cloreto de peonidina-3-glicosídeo em metanol com 0,01 % de HAc v/v. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada acidificada:metanol; eluição por gradiente; volume de injeção 50 µL e detecção ESI-Q-TOF-MS.....86

Figura 51. Cromatograma e espectro de massas de solução de cloreto de malvidina-3-glicosídeo em metanol com 0,01 % de HAc v/v. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada acidificada:metanol; eluição por gradiente; volume de injeção 50 µL e detecção ESI-Q-TOF-MS.....87

Figura 52. Cromatograma e espectro de massas de solução de cloreto de pelargonidina em metanol com 0,01 % de HAc v/v. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada acidificada:metanol; eluição por gradiente; volume de injeção 50 µL e detecção ESI-Q-TOF-MS.....87

Figura 53. Cromatograma e espectro de massas de solução de pasta de ACYS de extrato de jabuticaba 10 g L⁻¹ em metanol com 0,01 % de HAc v/v (Estudo: N5), identificando a cianidina-3-glicosídeo. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada acidificada:metanol; eluição por gradiente; volume de injeção 50 µL e detecção ESI-Q-TOF-MS.....88

Figura 54. Cromatograma e espectro de massas de solução de pasta de ACYS de extrato de jabuticaba 12 g L⁻¹ em metanol com 0,01 % de HAc v/v (Estudo: L5), identificando a malvidina-3-galactosídeo. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada acidificada:metanol; eluição por gradiente; volume de injeção 50 µL e detecção ESI-Q-TOF-MS.....89

Figura 55. Cromatograma e espectro de massas de solução de pasta de ACYS de extrato de refugo de jabuticaba 14 g L⁻¹ em metanol com 0,01 % de HAc v/v (Estudo: T5), identificando a cianidina-3-glicosídeo. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada acidificada:metanol; eluição por gradiente; volume de injeção 50 µL e detecção ESI-Q-TOF-MS.....90

Figura 56. Cromatograma e espectro de massas de solução de pasta de ACYS de amora 15 g L⁻¹ em metanol com 0,01 % de HAc v/v (Estudo: O4), identificando a cianidina-3-glicosídeo.

Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada acidificada:metanol; eluição por gradiente; volume de injeção 50 μL e detecção ESI-Q-TOF-MS.....91

Figura 57. Cromatograma e espectro de massas de solução de pasta de ACYS de amora 14 g L⁻¹ em metanol com 0,01 % de HAc v/v (Estudo:P4), identificando a cianidina-3-rutinosídeo. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada acidificada:metanol; eluição por gradiente; volume de injeção 50 μL e detecção ESI-Q-TOF-MS.....91

Figura 58. Cromatograma e espectro de massas de solução de pasta de ACYS de extrato de amora 12 g L⁻¹ em metanol com 0,01 % de HAc v/v (Estudo: P4), identificando a pelargonidina-3-glicosídeo. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada acidificada:metanol; eluição por gradiente; volume de injeção 50 μL e detecção ESI-Q-TOF-MS.....92

Figura 59. Cromatograma e espectro de massas de solução de pasta de ACYS de extrato de amora 9 g L⁻¹ em metanol com 0,01 % de HAc v/v (Estudo: O4), identificando a delfinidina-3-galactosídeo. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada acidificada:metanol; eluição por gradiente; volume de injeção 50 μL e detecção ESI-Q-TOF-MS.....92

Figura 60. Cromatograma e espectro de massas de solução de pasta de ACYS de amora preta 11 g L⁻¹ em metanol com 0,01 % de HAc v/v (Estudo: U4), identificando a cianidina-3-glicosídeo. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada acidificada:metanol; eluição por gradiente; volume de injeção 50 μL e detecção ESI-Q-TOF-MS.....94

Figura 61. Cromatograma e espectro de massas de solução de pasta de ACYS de amora preta 9 g L⁻¹ em metanol com 0,01 % de HAc v/v (Estudo: V4), identificando a delfinidina-3-galactosídeo. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada acidificada:metanol; eluição por gradiente; volume de injeção 50 μL e detecção ESI-Q-TOF-MS.....94

Figura 62. Cromatograma e espectro de massas de solução de pasta de ACYS de amora preta 10 g L⁻¹ em metanol com 0,01 % de HAc v/v (Estudo: V4), identificando a cianidina-3-rutinosídeo. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada

acidificada:metanol; eluição por gradiente; volume de injeção 50 μL e detecção ESI-Q-TOF-MS.....95

Figura 63. Espectros de massas de solução de pasta de ACYS de amora preta 10 g L⁻¹ em metanol com 0,01 % de HAc v/v (Estudo: V4), identificando a pelargonidina-3-galactosídeo e seu respectivo padrão isotópico. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada acidificada:metanol; eluição por gradiente; volume de injeção 50 μL e detecção ESI-Q-TOF-MS.....95

Figura 64. Cromatograma e espectro de massa de solução de pasta de ACYS de jambolão 13 g L⁻¹ em metanol com 0,01 % de HAc v/v (Estudo: Y4), identificando a cianidina-3-glicosídeo e espectro de massas de seu respectivo padrão isotópico. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada acidificada:metanol; eluição por gradiente; volume de injeção 50 μL e detecção ESI-Q-TOF-MS.....97

Figura 65. Cromatograma e espectro de massa de solução de pasta de ACYS de jambolão 18 g L⁻¹ em metanol com 0,01 % de HAc v/v (Estudo: AB5), identificando a delfinidina-3-rutinosídeo. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada acidificada:metanol; eluição por gradiente; volume de injeção 50 μL e detecção ESI-Q-TOF-MS.....97

As atividades realizadas neste trabalho fazem parte de um projeto mais amplo de convênio de colaboração científica (processo 11-P-09209/2006 e Termo Aditivo 01, processo 11-P-09214/2006) entre a UNICAMP, através do GPQUAE¹ - Grupo de Pesquisas em Química Analítica e Educação, e a empresa Anidro do Brasil Extrações Ltda, via Grupo CentroFlora, de Botucatu-SP.

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

Neste contexto, o sigilo dos resultados é solicitado para efeito de cumprimento da cláusula específica do Convênio e do Termo Aditivo.

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

1.1 Antocianinas (ACYS)

A coloração das espécies vegetais pode ser atribuída a várias classes de substâncias, denominadas de agentes cromóforos, destacando-se as porfirinas, os carotenóides e os flavonóides². ACYS são classificadas quimicamente como flavonóides e são os principais pigmentos naturais responsáveis pelas cores rosa, laranja, vermelha, violeta e azul de certos vegetais, em frutas, pétalas de flores e em folhas³⁻⁵. Elas pertencem ao grupo mais importante de pigmentos naturais visíveis ao olho humano^{6,7,8}.

O termo antocianinas (do grego anthos = flores; kianos = azul) foi proposto em 1835 por Marquat, referindo-se a pigmentos azuis, violetas e vermelhos encontrados em flores⁶. A estrutura geral das ACYS é derivada do cátion flavílico (Figura 1). ACYS, assim como antocianidinas, possuem grupo hidroxila nas posições 3, 5 e 7. Só nas ACYS, em uma ou mais destas posições, principalmente em 3, estão ligados açúcares⁶, conforme ilustra a Figura 2, que traz exemplos de algumas ACYS comuns.

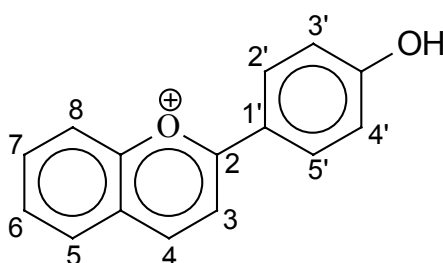
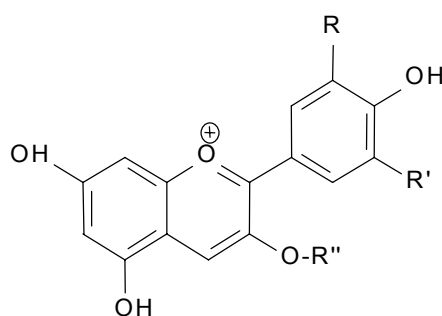


Figura 1. Estrutura do cátion flavílico⁶.



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

* Grupo R'' = unidade glicosídica
(Se R'' = H tem-se antocianidina)

Figura 2. Estrutura genérica de ACYS⁴.

Antocianidinas são raramente encontradas na natureza, ocorre comumente a forma glicosilada com açúcares que estabilizam a molécula^{6,7,9} de antocianina. As unidades glicosídicas mais frequentemente encontradas em ACYS são monossacarídeos, como glicose, galactose, ramnose, arabinose e xilose, e também polissacarídeos, destacando-se rutinose, soforose, sambubiose^{6,10}.

ACYS também podem ser aciladas com ácidos orgânicos unidos às unidades glicosídicas por ligação éster. Os ácidos geralmente são ácidos fenólicos aromáticos, como *p*-coumárico, ferúlico, cafeico e hidroxibenzóico, ou ácidos orgânicos alifáticos, como acético, málico, succínico e oxálico, ou ainda uma combinação de alguns desses ácidos, porém são raros os relatos de ACYS aciladas em frutas¹¹⁻¹³.

A cor de soluções contendo ACYS é influenciada pelo número de grupos metoxilas, glicosídicos e hidroxilas. Quanto maior a quantidade de hidroxilas e grupos glicosídicos nas estruturas das ACYS, maior a intensidade da cor azul; a cor vermelha é acentuada pelo maior número de grupos metoxilas².

A cor pode ainda ser estabilizada e realçada por copigmentação, resultante de diversas interações¹⁴⁻¹⁶. A copigmentação pode ser influenciada pelo pH do meio e pela quantidade de ACYS¹⁶. Os mecanismos mais importantes de copigmentação são as interações intermoleculares (entre ACYS e/ou entre ACYS e outros flavonóides) e as interações intramoleculares entre ACYS. Auto-associação e complexação com metal são também podem levar à copigmentação^{14,17}. Fenômenos de copigmentação geram deslocamento batocrômico, tornando as soluções de ACYS com coloração tendendo ao azul ou em um efeito hiperocrômico, em que a intensidade da cor da solução das ACYS é aumentada pela copigmentação^{14,15}.

ACYS podem sofrer transformações estruturais, causadas por variações de pH, acompanhadas da mudança de coloração das soluções devido ao equilíbrio ácido-base das diversas espécies representadas na Figura 3. Em pH entre 1-2, soluções de ACYS apresentam coloração avermelhada intensa, característica do cátion flavílico e em pH em torno de 6, tornam-se incolor, devido à estrutura carbinol. Com o aumento do pH, anidrobases são formadas e a coloração tende ao violeta (pH entre 6,5 e 8) e ao azul (pH entre 9 e 12). Em meio fortemente alcalino, pH 13 e 14, há ruptura do anel heterocíclico e

formam-se chalconas, que conferem coloração amarela à solução e podem precipitar, tornando o processo irreversível^{6,18,19}.

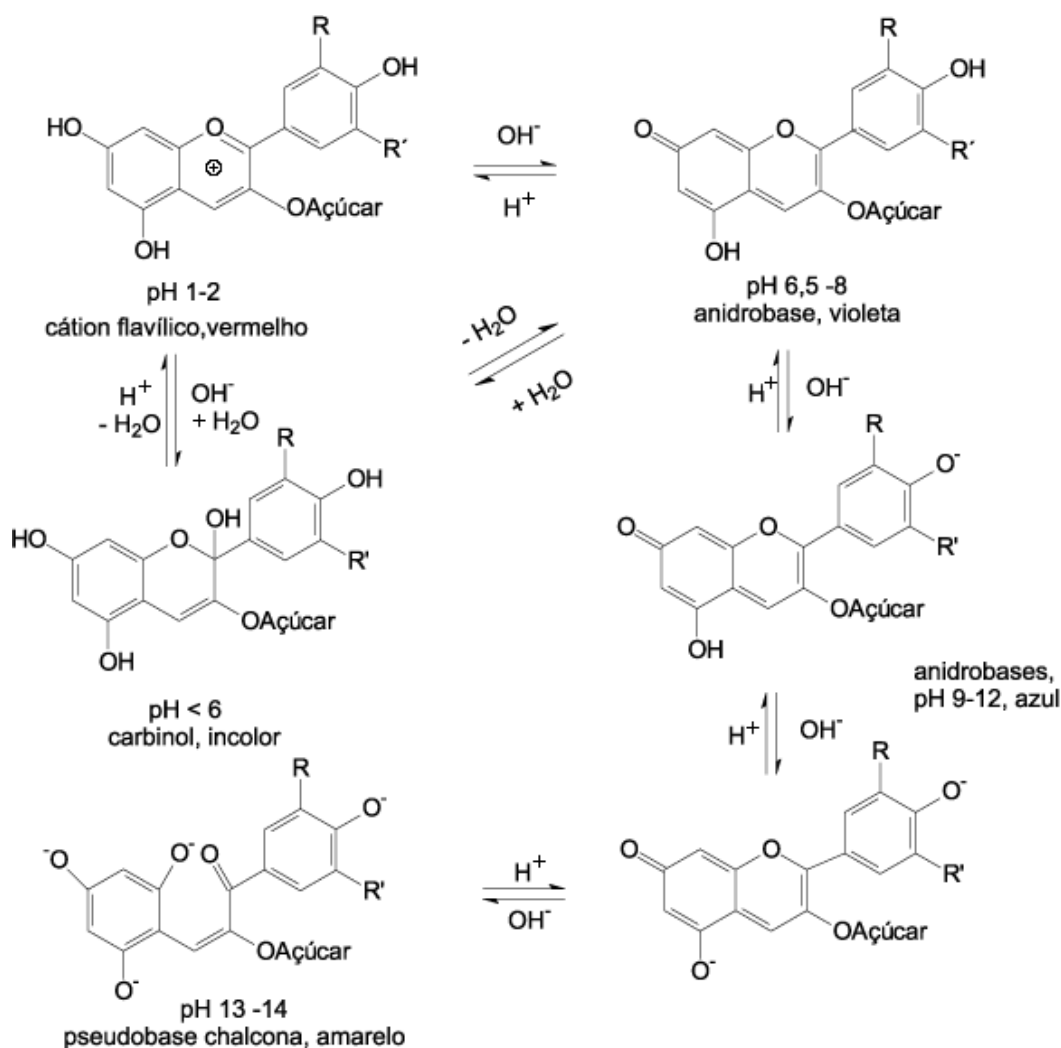


Figura 3. Possíveis mudanças estruturais das ACYS em meio aquoso em função do pH^{6,18}.

Alguns autores têm se preocupado em aproveitar essas variações de coloração em aplicações didáticas para o ensino de Química de nível médio e superior^{20,21}. Extratos de ACYS podem ilustrar, por exemplo, discussões sobre equilíbrio químico, indicadores de pH e de titulações ácido-base; de maneira mais ampla ACYS podem fomentar abordagens de Química Analítica, Química Orgânica, Produtos Naturais e Classificação Botânica, que certamente enriquecem ações pedagógicas interdisciplinares.

1.2 Uso industrial de ACYS

Recentemente, intensificou-se o estudo de potenciais efeitos benéficos de ACYS à saúde humana, em termos de ação antioxidante, antiinflamatória, anticancerígena, contra riscos de doenças coronárias e como proteção contra obesidade devida à hipoglicemia^{10,22-28}.

Também há um crescente interesse no uso de ACYS em vários segmentos industriais, pela sua capacidade corante²⁹, associado à bioatividade da ACYS^{30,31}, que ainda é tema para aprofundamento de estudos. As cores de alimentos, e mesmo de alguns cosméticos e produtos farmacêuticos, conferem valores de qualidade aos produtos que influenciam o comportamento dos consumidores. A obtenção de uma cor realçada e estável com o uso de corantes naturais, entretanto, ainda é um desafio por apresentar algumas limitações, como a baixa estabilidade e fácil susceptibilidade de degradação no caso de extratos de ACYS, considerados de grande interesse para esse tipo de aplicação.

O uso de corantes sintéticos vem sendo questionado devido a problemas gerais de toxicidade e impacto ambiental dos processos de síntese que em geral são muito poluentes. Somando-se a estes aspectos a publicidade contínua e adversa, o resultado é um crescente interesse pelo uso de corantes naturais, sendo que a opção de seu uso em substituição aos corantes sintéticos representa uma forte tendência atual. Isto estimula o interesse pelo desenvolvimento de pesquisas nesta temática, com forte apelo de *marketing* para consumidores que preferem os produtos naturais que tragam benefícios para a saúde e o meio ambiente. Para viabilizar a utilização de corantes naturais, como as ACYS, é necessário aplicar conhecimento químico para adaptá-las às condições de uso industrial envolvendo questões de processos, embalagem e distribuição^{32,33}.

O presente trabalho, inserido neste contexto, utilizou frutas nativas ou comuns do Brasil, como fontes de ACYS, para a realização de estudos de procedimentos de extração de ACYS, de esterilização de frutas e extratos para estabilização e conseqüente aumento do tempo de vida útil dos extratos, além da identificação das ACYS extraídas.

1.3 Fontes de ACYS

1.3.1 Jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*):

A jabuticaba ou jaboticaba ou ainda jabuticabeira (*Myrciaria cauliflora*) é uma árvore frutífera nativa brasileira e muito cultivada desde os tempos coloniais. A jabuticaba é originária da Mata Atlântica, mas pode ser encontrada na maior parte do país, no entanto, é mais freqüente em Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná. É uma angiosperma e sua árvore tem de 3 a 6 m de altura, com casca que se descama em placas. Suas folhas possuem pontuações esparsas e têm de 3 a 7 cm de comprimento. Suas flores são aglomeradas sobre o caule e os ramos. Seus frutos possuem casca negra e polpa branca succulenta, geralmente doce, e crescem no tronco e ramos, dando uma característica peculiar à árvore. São consumidos principalmente *in natura* e deles se faz licor, geléia e aguardente, de forma artesanal. Sua propagação é por sementes e sua frutificação inicia-se no final do inverno, durante a primavera até o verão³⁴⁻³⁶.



Figura 4. Ilustração da jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*)³⁷.

1.3.2 Amora (*Morus nigra*):

A amora (*Morus nigra*) é uma fruta nativa da China e do Japão, muito cultivada na região sul e sudeste do Brasil. A amoreira é uma angiosperma e sua árvore tem geralmente de 4 a 5 m de altura. Suas folhas possuem de 6 a 12 cm de comprimento e são serreadas em plantas adultas, com nervação saliente. Os frutos são verdes quando jovens e se tornam vermelho a preto quando amadurecem e assumem sabor adocicado e agradável, o que, no Brasil, ocorre na primavera. São consumidos *in natura* ou na forma de doces, geléias, licores e xaropes. Sua propagação é por estacas³⁴⁻³⁶.



Figura 5. Ilustração da amora (*Morus nigra*)³⁸.

1.3.3 Amora Preta (*Rubus* sp):

A amora preta (*Rubus* sp) é uma fruta de clima temperado nativa da Europa e América do Norte, foi introduzida no Brasil em 1972, onde vem sendo cultivada com sucesso, principalmente no Rio Grande do Sul. A amoreira é uma angiosperma e sua árvore pode atingir até 10 m de altura, porém geralmente chega a 4 a 5 m. Suas folhas tem de 4 a 7 cm de comprimento e pêlos esparsos. As flores são formadas na primavera e os frutos são do tipo globoso, suculento, de sabor adocicado, sendo que a maturação, no Brasil, ocorre no verão. São consumidos *in natura* e na forma de geléias, polpas e sucos. Sua propagação é por rebentos basais, ou seja, reprodução assexuada por brotos³⁴⁻³⁶.



Figura 6. Ilustração da amora-preta (*Rubus* sp)³⁹.

1.3.4 Jambolão (*Eugenia jambolana* Lam):

O jambolão (*Eugenia jambolana* Lam) ou jamelão ou ainda azeitona-doce é uma fruta originária da Índia e Sri Lanka, amplamente cultivada no Brasil como ornamental ou de sombra, principalmente no litoral. É uma angiosperma e sua árvore (jameloeiro) possui de 15 a 20 m de altura, com tronco geralmente tortuoso. Suas folhas são lustrosas de 8 a 14 cm de comprimento, com a nervura principal destacada. Suas flores são brancas e florescem de setembro a novembro, no Brasil. Seus frutos possuem polpa succulenta de sabor adocicado e adstringente, contendo uma única semente grande e sua maturação no Brasil ocorre em janeiro e fevereiro. Os frutos são consumidos *in natura* e apreciados em algumas regiões do país, principalmente no nordeste brasileiro. Sua propagação é por sementes^{34,36}.



Figura 7. Ilustração do jambolão (*Eugenia jambolana* Lam)⁴⁰.

1.3.5 Outras Considerações:

Fatores ambientais de cultivo, com variações de iluminação, irrigação e adubação, além de diferentes estágios de maturação das frutas podem resultar em diferentes ACYS nas espécies vegetais, assim como modificar as concentrações desses corantes nesses vegetais⁴¹⁻⁴⁶. É comum que as folhas novas sejam vermelhas porque têm ACYS como forma de proteção contra oxidação ou processos fotoquímicos¹⁵.

ACYS concentram-se nos vacúolos das células vegetais^{15,44,45,47} e, geralmente, quando as frutas apresentam casca removível, como as uvas e jabuticabas, ACYS concentram-se nos vacúolos celulares das cascas. Já em frutas com características semelhantes às das amoras, ACYS encontram-se em toda a polpa^{44,48,49}. Essas diferenças de acúmulo de ACYS nas diferentes frutas, possivelmente são devidas a uma das funções das ACYS que é atrair insetos e aves para disseminação de sementes de frutos¹¹, além de proteger a planta de alguns processos oxidativos, principalmente durante os primeiros estágios de crescimento⁷.

1.4 Extração

Estudos com extratos de frutas realizados em projetos de pesquisa do GPQUAE indicaram que a quantidade de ACYS extraída depende do solvente e da forma de extração empregados²⁰.

ACYS são mais solúveis em solventes polares do que as antocianidinas, devido à presença de unidades glicosídicas e, portanto, são facilmente extraídas em água, metanol e etanol e esta solubilidade é aumentada quando as mesmas se encontram em meio ácido^{6,12}. O meio ácido também faz com que ACYS encontrem-se predominantemente na forma de cátion flavílio, o qual apresenta coloração vermelha em solução aquosa¹². O fato do cátion flavílio ser estável em meio ácido torna indicável a utilização de solventes contendo ácidos orgânicos ou minerais na extração de ACYS de frutas, como ácidos clorídrico, fórmico e acético. Entretanto, o uso de solventes ácidos deve ser cauteloso, pois pode resultar em hidrólise das ACYS¹² além de comprometer aplicações industriais.

Apesar da toxicidade, solventes como metanol e acetona são muito utilizados para a extração de ACYS^{50,51}. Porém, para algumas aplicações do extrato, como, por exemplo, para as indústrias cosmética, farmacêutica e alimentícia, o uso desses solventes tem restrições,

não só pela toxicidade, como também pelo alto custo e impacto ambiental dos resíduos⁵². Diante das limitações de uso desses solventes, a extração deve ser realizada com etanol ou água, sendo que a utilização da água tem ainda como limitação de uso uma menor eficiência de extração em comparação aos outros solventes, além de uma menor durabilidade de seus extratos²⁰.

Outro fator que influencia na quantidade de ACYS extraída é a temperatura de extração. Elevar a temperatura de extração facilita a liberação das ACYS dos vacúolos celulares das frutas, além de aumentar a permeabilidade do solvente nas estruturas celulares, aumentando assim a quantidade de ACYS extraída e reduzindo o tempo de extração⁵². No entanto, o aumento da temperatura não deve exceder 60 °C, pois acentua a degradação posterior dos extratos obtidos ACYS, recomendando-se, assim, que a extração ocorra entre 25 e 55 °C^{20,52-54}.

1.5 Estabilidade

As características de extratos de ACYS podem ser alteradas após algum tempo de armazenamento, dependendo do solvente extrator e da temperatura de armazenamento²⁰. Outros fatores também podem influenciar a estabilidade desses extratos como a presença de oxigênio, enzimas, íons metálicos, açúcar e o pH⁵⁵⁻⁵⁸. O grau de hidroxilação exerce importante efeito na estabilidade das ACYS, sendo que aquelas que contêm mais grupos hidroxilas em sua estrutura são menos estáveis. Inversamente, alto grau de metoxilação aumenta a estabilidade das ACYS⁹. Além disso, ACYS são geralmente instáveis quando expostas à luz ultravioleta e visível⁵⁹.

Um dos mecanismos propostos para a degradação das ACYS envolve a oxidação de compostos fenólicos a quinonas, pela ação da enzima polifenol oxidase (PPO) presente em frutas. A enzima reage com a antocianina da fruta e/ou as quinonas são polimerizadas, gerando produtos castanhos que alternam as características iniciais dos extratos^{49,60-65}.

Nas frutas, as enzimas e seus substratos localizam-se em compartimentos celulares diferentes. Durante a maceração das frutas para dar início ao processo de extração de ACYS, esses compartimentos são destruídos e as enzimas entram em contato com os compostos fenólicos, oxidando-os. Após certo período de armazenamento, esses extratos adquirem coloração fortemente castanha e turva, sendo difícil de preservar a cor inicial e a

limpidez⁶¹, o que compromete a qualidade do extrato para aplicações gerais. Sendo assim, alguns parâmetros de extração, como a trituração das frutas, devem ser considerados para garantir o aumento do tempo de vida útil dos extratos de ACYS, já que quanto mais compostos fenólicos estiverem presentes nos extratos, maior será a possibilidade de polimerização de ACYS⁶⁶.

Na tentativa de aumentar a estabilidade dos extratos de ACYS obtidos a partir de frutas, no presente trabalho, foram investigados processos de esterilização buscando minimizar ou eliminar microrganismos envolvidos na deterioração dos extratos e reduzir a ação enzimática nesses extratos.

1.5.1 Esterilização

Esterilização é o processo que promove a eliminação ou a destruição de todas as formas de microrganismos presentes em objetos ou materiais: vírus, bactérias, fungos, protozoários, esporos, para um aceitável nível de segurança. O processo de esterilização pode ser físico, químico ou físico-químico^{36,67,68}. Algumas técnicas de esterilização para produtos alimentícios podem ser citadas, como pasteurização, autoclave e liofilização.

São descritos diversos processos de pasteurização, que combinam diferentes tempos e temperaturas. A escolha do tratamento adequado a ser empregado depende das características do produto e do seu nível de contaminação inicial. Geralmente, são utilizadas temperaturas entre 70 e 90 °C, em intervalos entre 15 e 60 segundos, seguindo-se de resfriamento rápido em torno de 3 °C. Entretanto há materiais muito sensíveis que sofrem modificações irreversíveis, nestas temperaturas. A estes, pode ser aplicado um tratamento mais brando com emprego de longos tempos^{36,69,70}.

Autoclave é um aparelho utilizado para esterilização por exposição do material ao vapor de água (chamado calor úmido) sob pressão, geralmente a 121 °C por 15 min. A ação esterilizadora decorre da termo-coagulação das proteínas bacterianas, ou seja, o aquecimento tem um efeito letal sobre os microrganismos devido à desnaturação e subsequente coagulação das proteínas citoplasmáticas^{36,71}.

Liofilização é uma técnica de desidratação a frio, aplicada principalmente a alimentos, por manter as propriedades do produto original: sabor, odor, cor e valores nutricionais e

vitamínicos. Os alimentos são acondicionados em uma câmara hermeticamente fechada, a vácuo, e a temperatura pode chegar a $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Desta forma, a água contida nos alimentos congela e, em seguida, passa diretamente para o estado gasoso, numa etapa de sublimação. Após 6 a 12 horas nesta condição, dependendo do tipo de alimento e do percentual de água, a câmara é aberta e o alimento encontra-se desidratado contendo apenas cerca de 1 % de umidade, nível extremamente reduzido que inibe a ação de microrganismos e enzimas que normalmente degradam os compostos, como nas ACYS^{36,72}.

Os métodos de esterilização por aquecimento de alimentos e produtos correlatos têm sido aprimorados na tentativa de reduzir o dano irreversível aos nutrientes e componentes organolépticos, com a aplicação de tratamentos mais brandos, em termos do tempo de choque térmico mínimo necessário⁷³. Esses processos também visam fungos remanescentes do tratamento térmico, que, além de alterar as características organolépticas como mudanças de cor, sabor e odor, podem formar micotoxinas⁷⁴. Para evitar estes tipos de problemas, outros métodos térmicos e não térmicos de combate aos microrganismos, têm sido sugeridos no intuito de melhorar a qualidade de sucos, por exemplo. Alguns destes métodos térmicos são: branqueamento, tindalização e o uso de dióxido de enxofre. Como exemplos de métodos não térmicos podem ser citados: emissão de pulso elétrico, altas pressões e radiação ionizante⁷⁴.

Este trabalho investigou 2 métodos de esterilização de extratos de frutas, envolvendo tratamento prévio das frutas, fontes de ACYS, o branqueamento, e um processo realizado com os extratos brutos de ACYS, a tindalização. Ambos os processos de esterilização, branqueamento e tindalização, foram testados para minimizar ou eliminar os fungos termo-resistentes, que são microrganismos de maior relevância envolvidos na deterioração dos extratos de frutas⁷⁴.

1.5.1.1 Branqueamento

O processo de branqueamento, do inglês *bleaching*, é um método de esterilização utilizado em algumas aplicações e citados por alguns autores envolvendo o uso de dióxido de enxofre (SO_2) como agente químico⁷⁵. No entanto, em outros artigos da literatura^{60,76-78},

encontra-se também o *blanching*, que é outro processo conhecido em português por branqueamento, mas que envolve apenas o tratamento térmico das frutas, sem adição de agentes químicos como o SO₂.

O uso de SO₂ deve ser controlado, pois pode haver diminuição do seu efeito esterilizante devido a outro efeito: o alvejamento irreversível⁷⁵. A adição de SO₂ em materiais como extratos vegetais, sucos ou outros produtos alimentícios, pode ainda produzir sabor e aroma desagradáveis ao produto, além do SO₂ causar um possível risco de reações alérgicas ao homem⁷⁹.

Devido aos fatores indesejáveis do uso do SO₂ e principalmente pela maior simplicidade, optou-se neste trabalho pelo processo de branqueamento que envolve apenas o tratamento térmico das frutas.

O branqueamento difere da pasteurização por envolver o tratamento térmico da matéria-prima⁶⁰, que no caso desse trabalho seriam as frutas, enquanto que a pasteurização é um procedimento de esterilização realizado no material acabado⁷⁰, que nesse trabalho seriam os extratos de frutas.

O processo de branqueamento além de ser um método de esterilização, atua também na inibição da atividade enzimática (PPO) responsável pelo mecanismo de degradação das ACYS⁶⁰. A inativação da PPO não é completa a 60 °C⁸⁰ (temperatura que favorece a degradação de extratos de ACYS²⁰), por ser muito resistente ao calor, mas, em geral, completa-se 80 °C e a redução da atividade da PPO pode apresentar resultados ligeiramente distintos em frutas diferentes⁸¹.

O branqueamento também é proposto para aumentar a quantidade de ACYS extraída. Essa outra característica do branqueamento se dá por um possível desarranjo dos tecidos das frutas, durante o tratamento térmico, que leva a um aumento da permeabilidade das células, conduzindo a um aumento da quantidade de ACYS extraídas⁶⁰.

Todos esses fatores favoráveis do branqueamento justificaram a opção desse método para estudos de esterilização, na tentativa de aumentar o tempo de vida útil dos extratos de ACYS obtidos de frutas.

1.5.1.2 Tindalização

A tindalização pode ser entendida como um método simplificado de esterilização que envolve um choque térmico do material a ser esterilizado e de uso industrial comum⁸². Esse método geralmente é aplicado para soluções açucaradas ou que contenham gelatina³⁶ e dependendo de cada produto e do rigor térmico desejado, as temperaturas variam de 60 a 90 °C, durante alguns minutos⁸³. A vantagem desse processo é que podem ser mantidos praticamente todos os nutrientes e as qualidades organolépticas do produto, em proporções maiores do que quando se utilizam outros tratamentos térmicos^{83,84}.

Na literatura consultada, encontrou-se que este processo envolve aquecimento de maneira descontínua, isto é, períodos de repouso entre choques térmicos. Ou seja, após o acondicionamento dos materiais a serem submetidos ao tratamento, em recipiente fechado, o produto é submetido ao aquecimento. As células bacterianas em forma vegetativa são destruídas, porém os esporos sobrevivem. Depois do resfriamento, os esporos entram em processo de germinação e depois de 24 horas a operação é repetida. O número de operações pode variar de 3 a 12 vezes até a obtenção da esterilização completa⁸³⁻⁸⁵.

No presente trabalho, optou-se pelo procedimento envolvendo apenas um choque térmico visando similaridade com a metodologia usual da empresa conveniada⁸², assemelhando-se a um processo de pasteurização.

1.6 Identificação

A identificação da presença de ACYS em extratos de frutas pode ser feita por espectrofotometria UV-Vis. ACYS apresentam espectros de absorção característicos com comprimentos de onda de absorção máxima em torno de 525 nm. Para a identificação individual de ACYS várias técnicas podem ser empregadas.

A análise qualitativa de ACYS individuais requer, em alguns casos, separação e/ou purificação prévia da mistura. A purificação da amostra algumas vezes é recomendada, pois os solventes empregados na extração não são específicos para ACYS e podem extrair diversos materiais, como outros compostos fenólicos. Esses compostos podem afetar a estabilidade e a análise de ACYS^{77,86}.

A purificação de extratos brutos de ACYS geralmente visa a remoção de açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos e compostos fenólicos. Alguns suportes sólidos são usados

para essa purificação, como Sephadex-LH-20 e resina XAD-16-HP⁸⁷ e a técnica mais utilizada é a extração em fase sólida (SPE)^{20,88-91}.

Diversas técnicas cromatográficas são empregadas para separar e identificar ACYS em extratos de frutas. Cromatografias em papel (PC)⁹²⁻⁹⁷ e em camada delgada (TLC)⁹⁸ são as técnicas tradicionalmente mais utilizadas. Para a separação de ACYS por essas técnicas podem ser empregados diferentes sistemas de solventes como fase móvel^{7,41}. Entretanto, como ACYS são sujeitas a oxidação, alguns cuidados devem ser tomados, evitando sempre que possível sua exposição ao ar. Neste aspecto, em PC e TLC pode haver problemas porque as ACYS ficam expostas a intenso contato com atmosfera contendo O₂⁹⁹.

A mais rápida e eficiente separação de misturas complexas de ACYS é feita por HPLC⁹⁸. A técnica não é destrutiva e, portanto, os compostos separados podem ser coletados para análises posteriores, em escala preparativa. Além disso, HPLC pode ser usada para separar e identificar ACYS dispensando extensa purificação preliminar dos extratos^{86,100}.

Um protocolo oficial para separação e identificação de ACYS tem autoria de Durst e Wrolstad¹⁰⁰, sendo baseado na técnica de HPLC com detecção espectrofotométrica. Nesse protocolo, são utilizados padrões de ACYS e sugere-se substituí-los por sucos ou extratos de frutas, de uvas por exemplo, para servirem como referência para tempos de retenção. Além disso, sugere-se confirmar a identificação das ACYS com HPLC acoplada à espectrometria de massa (MS), combinando assim a eficiência da técnica de HPLC com a seletividade e sensibilidade do detector MS, o que permite a identificação de compostos individuais numa mistura complexa¹⁰⁰.

Outras técnicas podem ser utilizadas para identificação de ACYS, como a eletroforese capilar (CE)¹⁰¹ e a ressonância magnética nuclear (NMR)¹⁰², por exemplo.

Neste trabalho, a espectrofotometria UV-Vis foi fundamental para a identificação da presença de ACYS. Já para identificação individual de ACYS, foram estudados procedimentos por HPLC com detecção espectrofotométrica e com detecção por MS¹⁰³.

A identificação das ACYS pode ser útil para a indústria já que, para extratos de diferentes frutas há diferentes ACYS, que representam uma “impressão digital” que pode servir para atribuir a autenticidade de um extrato específico^{17,100}.

Devido à baixa estabilidade e dificuldades inerentes para a purificação, a disponibilidade de padrões de ACYS ainda é limitada e os preços são elevados, como exemplo, padrão de cianidina-3-glicosídeo R\$ 404,92/mg, malvidina 3-glicosídeo R\$ 456,02/mg e peonidina-3-glicosídeo R\$ 1537,10/mg^A. Isso dificulta a identificação de ACYS por HPLC, mas não a limita seriamente para análises qualitativas, desde que técnicas e/ou métodos auxiliares sejam utilizados¹⁰⁰.

O conhecimento e adequado controle de determinados parâmetros relacionados aos processos de separação cromatográficos são de extrema relevância na condução de um processo de separação cromatográfica. Alguns destes parâmetros são a composição e vazão da fase móvel, solventes da amostra e tipo de eluição (isocrática ou por gradiente).

1.6.1 Identificação por HPLC com detecção espectrofotométrica

Um procedimento clássico, que foi empregado neste trabalho, envolve o método de Goiffon, Mouly e Gaydou^{104 B}, que propuseram um procedimento de identificação de ACYS por HPLC por comparação de tempos de retenção como opção para minimizar a dificuldade da aquisição e o alto custo de padrões de ACYS. Neste método, há uma relação empírica entre o tempo de retenção (t_r) das ACYS presentes nos extratos de frutas com o t_r da cianidina-3-glicosídeo, que está presente em quase todas as frutas vermelhas e acaba funcionando como referência para identificação das demais ACYS⁹⁴.

A identificação de ACYS por HPLC com detecção espectrofotométrica foi estimulada com o desenvolvimento do arranjo de diodos (DAD), pois com ele é possível obter os espectros eletrônicos de cada substância^{105,106}. No entanto, a necessidade de informações estruturais que permitam identificar os componentes da amostra analisada levou ao desenvolvimento de técnicas hífenadas mais modernas, como o acoplamento de HPLC com MS e com NMR^{105,107,108}. Atualmente, as técnicas hífenadas ou acopladas representam importantes ferramentas para os estudos de matrizes naturais, pois apesar de se tratarem de

^A http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/The_Americas/Brazil.html, acessado em 13/02/2008.

^B Apenas por questão de simplificação da redação, a partir deste ponto este método será citado como Método de Goiffon.

misturas complexas, a hifenação dispensa um pré-tratamento elaborado da amostra para a caracterização química do material em estudo¹⁰⁵.

1.6.2 Identificação por HPLC com detecção MS

Para análises de extratos vegetais, os instrumentos de HPLC acoplados a MS, em sua maioria, utilizam ionização por eletrospray (ESI), por se tratar de uma ionização branda e, geralmente, são observados moléculas protonadas do tipo $[M + H]^+$ ¹⁰⁹⁻¹¹⁴. No entanto, como ACYS tem uma carga positiva natural, tem-se a representação como $[M]^+$, por se tratar de um cátion¹¹³.

Para a obtenção de fragmentos de massas dos compostos, dois analisadores de massas podem ser acoplados com uma célula de colisão entre eles^{112,115,116}, sendo que este procedimento é conhecido como espectrometria de massas em sequência (MS/MS). No primeiro analisador, ocorre a seleção do íon de interesse (íon principal¹¹⁴), que é então introduzido na célula de colisão com um gás inerte (argônio ou nitrogênio, por exemplo) levando à sua fragmentação com a formação de íons secundários¹¹⁴. Finalmente, os fragmentos são analisados no segundo analisador de massas. O quadrupolo-tempo de voo (Q-TOF) é um exemplo de analisador acoplado empregado no estudo de amostras naturais^{105,117}.

No quadrupolo (Q), os íons se movem oscilando entre 4 barras paralelas. As oscilações dos íons durante a trajetória pelo quadrupolo são devidas à aplicação, em um dos pares de barras, de uma voltagem de corrente contínua e, em outro, de corrente alternada (ou de radiofrequência). Variam-se as voltagens, de maneira a se realizar uma varredura em toda a faixa de razão massa carga (m/z) desejada. Assim somente íons com determinadas razões m/z conseguem passar pelo quadrupolo em trajetória estável, enquanto os outros íons são desviados da trajetória central^{114,118,119}.

No analisador por tempo de voo (TOF), os íons são submetidos a uma diferença de potencial e levados, com alta energia cinética, por um tubo. Assim, o analisador TOF faz uso do tempo em que íons de diferentes m/z levam para cruzar o sistema de separação de íons. Como energia cinética é dada pela relação direta entre a massa e o quadrado da velocidade, íons mais leves terão um tempo de voo mais rápido do que os pesados^{114,118-120}.

Q-TOF permite ainda determinar o cátion $[M]^+$, sem necessariamente causar sua fragmentação. Nesse caso, o analisador quadrupolo acaba funcionando como um “filtro” de massas, no qual íons dentro de uma determinada faixa de razões m/z são selecionados para, em seguida, serem determinados pelo analisador TOF.

O presente trabalho utilizou um equipamento HPLC-ESI-Q-TOF-MS, ilustrado na Figura 8, para identificar ACYS presentes nos extratos de frutas. A aplicação de HPLC-ESI-Q-TOF-MS, apesar do alto custo do equipamento, faz com que as análises tornem-se rápidas e, graças à alta resolução, permite obter resultados de caracterização mais confiáveis que HPLC, por exemplo, além de reduzir resíduos e reagentes.

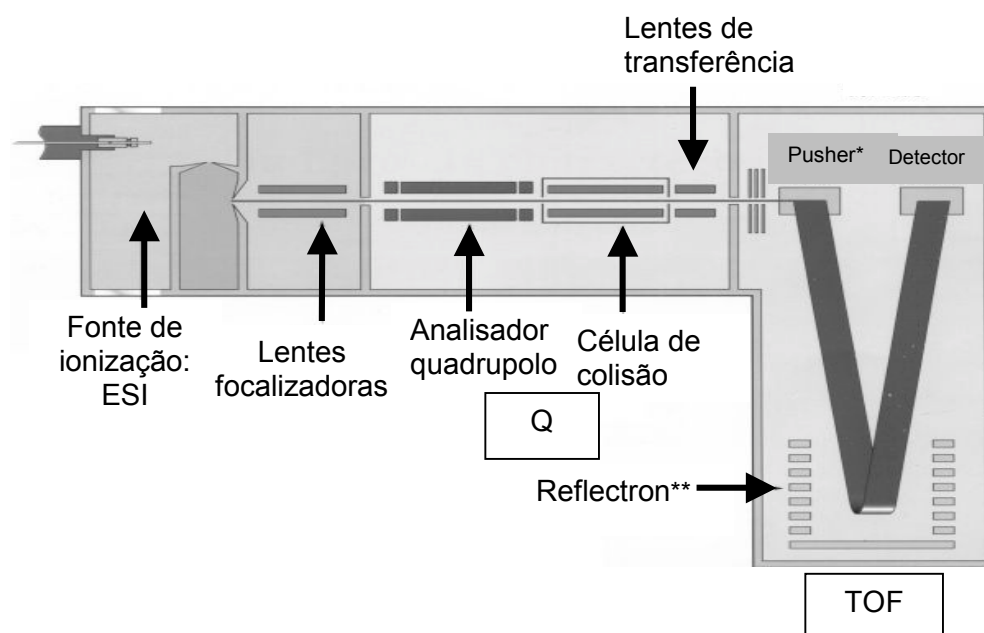


Figura 8. Principais componentes do equipamento de ESI-Q-TOF-MS. *Pusher: lentes de aceleração, direcionamento e lentes do tubo vô; ** Reflectron: reflete os íons para o detector. Q indica o analisador quadrupolo e TOF o analisador por tempo de vô¹²¹.

CAPÍTULO 2:

OBJETIVOS

O desenvolvimento deste trabalho teve os seguintes objetivos:

- Otimizar o processo de extração de ACYS a partir das frutas estudadas, visando maximizar a quantidade de ACYS extraída a partir de procedimentos com possibilidade de implementação em escala industrial.
- Investigar a eficiência de processos de esterilização como branqueamento e tindalização para aumentar a estabilidade desses extratos com altos teores de ACYS.
- Desenvolver um procedimento simplificado para identificação de ACYS extraídas de frutas, aplicando-se HPLC, com e sem o uso de padrões de ACYS para comparação, e espectrometria de massas (ESI-Q-TOF-MS), incluindo-se testes de tratamento de amostra.

CAPÍTULO 3:

PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Considerações Gerais

Os processos de extração, esterilização e identificação de ACYS foram realizados com jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*), amora (*Morus nigra*), amora preta (*Rubus sp*) e jambolão (*Eugenia jambolana Lam*). Essas espécies vegetais foram escolhidas por serem nativas ou comuns do Brasil. Todas as frutas foram fornecidas pelo Grupo Centroflora, obtidas junto a fornecedores credenciados e a identificação das espécies foi realizada pela empresa conveniada. Como o presente trabalho envolveu o uso de frutas adquiridas no comércio nacional, houve questões de limitação de matéria-prima para os experimentos em função da sazonalidade da frutificação de cada espécie.

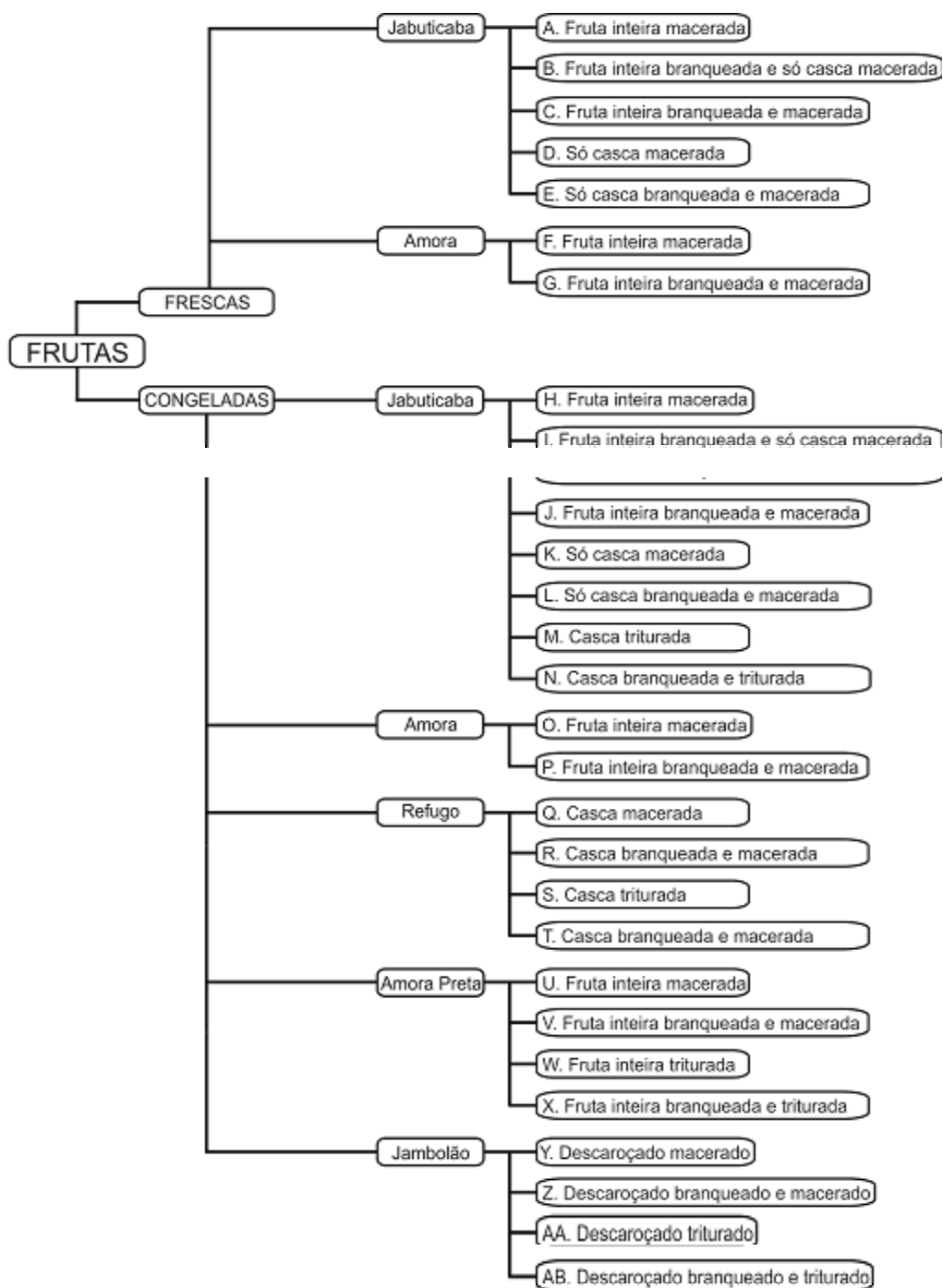
Para estudos com frutas frescas, utilizaram-se apenas jabuticaba e amora, das quais imediatamente após seu recebimento, eram retiradas porções para trabalho, sendo o restante acondicionado em frascos plásticos para 700 g e congeladas a $-11\text{ }^{\circ}\text{C}$ para armazenamento. Para os demais estudos, as frutas eram recebidas e refrigeradas a $\sim 6\text{ }^{\circ}\text{C}$ e depois transferidas para frascos de 700 g e congeladas a $-11\text{ }^{\circ}\text{C}$ para armazenamento. Para usar as frutas congeladas, procedia-se ao descongelamento da fração a ser utilizada, deixando-a em repouso à temperatura ambiente por cerca de 24 h antes do uso.

Visando obter extratos mais concentrados e com maior estabilidade, investigaram-se procedimentos de extração de ACYS das frutas e de esterilização dos extratos e frutas. Como tentativa de facilitar o acompanhamento da leitura, para descrever as diversas condições das frutas, variáveis de extração e esterilização estudadas foi elaborada a Figura 9 que indica procedimentos envolvidos que são detalhados a seguir. Todos os procedimentos de extração e esterilização foram realizados em triplicata.

Para os estudos de extração e estabilidade, relacionou-se a quantidade de ACYS, nos extratos recém obtidos e durante o período de monitoramento, valores de absorbância (A) no comprimento de onda de absorção máxima (λ_{max}) de cada extrato. Para extratos aquosos $\lambda_{\text{max}} = 524\text{ nm}$, para extratos alcoólicos $\lambda_{\text{max}} = 538\text{ nm}$.

Foram obtidos espectros no UV-Vis dos extratos ou de soluções obtidas pela diluição dos extratos, quando necessário, usando os respectivos solventes extratores como branco.

Para otimização de um procedimento simplificado de identificação de ACYS foram avaliados 3 métodos de análise envolvendo HPLC e MS, descritos a partir da página 36.



CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO:

1. Água, 55°C, 30 minutos
2. Etanol 99,5 % v/v, 25°C, 24 horas
3. Etanol 99,5 % v/v acidificado, 25°C, 24 horas
4. Etanol 94 % v/v, 55°C, 30 minutos, sem agitador magnético
5. Etanol 94 % v/v, 55°C, 30 minutos, com agitador magnético
6. Etanol 94 % v/v, 25°C, 24 horas

Figura 9. Fluxograma com identificação do estudo para as condições de extração e de esterilização.

3.2 Reagentes, Materiais e Equipamentos

3.2.1 Reagentes

- Padrões de ACYS (Sigma-Aldrich):

Cloreto de pelargonidina, cloreto de malvidina-3-glicosídeo com pureza $\geq 90,0$ %, cloreto de pelargonidina-3-glicosídeo com pureza $\geq 93,0$ %, cloreto de cianidina-3-galactosídeo com pureza $\geq 90,0$ %, cloreto de cianidina-3-glicosídeo com pureza $\geq 95,0$ %, cloreto de cianidina-3,5-diglicosídeo com pureza $\geq 90,0$ %, cloreto de cianidina-3-rutinosídeo com pureza $\geq 98,0$ %, cloreto de peonidina-3-glicosídeo com pureza $\geq 98,0$ %;

- Ácido acético glacial 99,7 % v/v (Synth);

- Ácido clorídrico 36,5-38,0 % v/v (Synth);

- Ácido fórmico 85,0 % v/v (Synth);

- Etanol 99,5 % v/v (Synth);

- Metanol grau HPLC (Tedia);

- Acetonitrila 99,9 % v/v (Merck);

- Água destilada (destilador de vidro);

- Água deionizada (Millipore).

3.2.2 Materiais:

- Vidraria de uso comum em laboratório, devidamente calibrada quando necessário;

- Papel de filtro qualitativo - Qualy 14 μm ;

- Cartucho C18 para SPE - Varian, 500 mg, 3 mL, 50/PK;

- Filtros de membrana Millipore 0,45 μm ;

3.2.3 Equipamentos:

- Capela laboratorial com vazão 0,6 m s^{-1} com abertura de 28 cm^2 ;

- Geladeira GE TMNF-E;

- Liquidificador Walita Beta HL3252;

^C Valores obtidos com Anemômetro LT Lutron, modelo AM-4202 em avaliação da Comissão de Segurança do Instituto de Química, conforme relatório apresentado no *ANEXO 1*.

- Banho termostatzado Refrigerated Bath ESRB-11 Techne;
- Banho termostatzado RCS LAUDA;
- Centrifuga FANEM Excelsa II Modelo 206 BL;
- Balança Shimadzu AX200;
- Balança Mettler Toledo AX205 Delta Range;
- Espectrofotômetro Biotech Pharmacia Ultrospech 2000;
- Cromatógrafo Shimadzu Prominece com coluna C18 (Varian, Microsorb MV – 25 cm x 4,6 diâmetro interno) e detector com arranjo de diodos SPD-M20A;
- Cromatógrafo Waters Alliance 2695 com coluna C18 (Waters, XTerra® – 15 cm x 2,1 diâmetro interno) e detector MS;
- Espectrômetro de massas Micromass tipo quadrupolo-tempo de voo Q-Tof Micro.

3.3 Procedimentos Experimentais

3.3.1 Estudos de Métodos de Extração de ACYS

Para otimização da extração de ACYS, foram realizadas extrações variando-se solventes, temperatura de extração, uso de agitação e de trituração mecânica, utilizando-se cascas, frutas inteiras e descaroçadas, mantendo-se a proporção 1:3 fonte de ACYS:solvente (m/v)²⁰.

Os primeiros estudos de extração de ACYS envolveram as frutas frescas e congeladas de jabuticaba e amora, conforme esquematizado na Tabela 1. Nos testes com amoras, utilizou-se a fruta inteira macerada manualmente, com o auxílio de uma bagueta, enquanto que para a jabuticaba foram testadas extrações utilizando-se a fruta inteira macerada e somente casca da fruta macerada, removida manualmente.

Tabela 1. Condições de extração de ACYS de frutas*.

Identificação do estudo**	Solvente	Temperatura	Tempo
A1; D1; F1; H1; K1; O1	Água	55 ± 1 °C	30 minutos
A2; D2; F2; H2; K2; O2	Etanol 99,5 % v/v	25 ± 1 °C	24 horas
A3; D3; F3; H3; K3; O3	Etanol 99,5 % v/v acidificado***	25 ± 1 °C	24 horas

* proporção 1:3 fruta/solvente (m:v)²⁰ ** de acordo com o fluxograma apresentado na Figura 9, página 30

*** adição de ácido acético 1 % v/v, na proporção 85:15 v/v

Realizou-se o estudo de outros métodos de extração de ACYS apenas de frutas congeladas de jabuticaba, refugo de jabuticaba^D, amora preta e jambolão, a partir de condições testadas em atividades no grupo.

Esse estudo com diversos métodos envolveu a extração de ACYS com a imersão das frutas maceradas manualmente, com auxílio de um pistilo, em etanol 94 % v/v e mantidas a 55 ± 1 °C, por 30 minutos em banho termostatzado com água destilada, mantendo-se a proporção 1:3 fonte de ACYS/solvente (m/v)²⁰. Testou-se também o efeito de trituração mecânica das fontes de ACYS, com liquidificador doméstico, e o uso de agitação mecânica, com agitador com barra magnética, durante o processo de extração.

Para jabuticaba e refugo, utilizaram-se apenas as cascas, enquanto que para a amora utilizou-se a fruta inteira. Os testes com jambolão foram realizados após a retirada manual do caroço da fruta e envolveram todas as condições de extração, além da extração a 25 °C por 24 horas, como mostra a Tabela 2.

Tabela 2. Representação das condições de estudo para otimização da extração de ACYS.

Identificação do estudo*	Fonte de ACYS
K4; K5; M4; M5	Casca de jabuticaba
Q4; Q5; S4; S5	Casca de refugo de jabuticaba
U4; U5; W4; W5	Amora Preta – fruta inteira
Y4; Y5; Y6; AA4; AA5; AA6	Jambolão sem caroço

* de acordo com o fluxograma apresentado na Figura 9, página 30

^D Considera-se como refugo de jabuticaba as frutas não comercializáveis para consumo humano devido a algum tipo de deterioração. A partir deste ponto, que este material será citado no texto simplesmente como refugo.

Todos os processos eram concluídos com a filtração simples dos extratos em papel de filtro qualitativo. A extração em cada condição de estudo foi realizada em triplicata. Os extratos obtidos foram armazenados em frascos âmbar e sob refrigeração a 8 °C para monitoramento da estabilidade.

3.3.2 Estudos de Esterilização

Os métodos de esterilização foram aplicados em alguns casos às frutas (processo prévio de branqueamento) e em outros momentos aos extratos brutos obtidos (tindalização).

➤ 3.3.2.1 Branqueamento

Os primeiros estudos envolveram as frutas frescas e congeladas de jabuticaba (fruta inteira e só casca) e amora (fruta inteira), as quais inicialmente, foram lavadas em água corrente para serem branqueadas. Após o processo de branqueamento, seguiram-se os primeiros testes de procedimentos de extração, de acordo com a Tabela 3.

Tabela 3. Condições de extração de ACYS de frutas branqueadas*.

Identificação do estudo***	Solvente	Temperatura	Tempo
B1; C1; E1; G1; I1; J1; L1; P1	Água	55 ± 1 °C	30 minutos
B2; C2; E2; G2; I2; J2; L2; P2	Etanol 99,5 % v/v	25 ± 1 °C	24 horas
B3; C3; E3; G3; I3; J3; L3; P3	Etanol 99,5 % v/v acidificado**	25 ± 1 °C	24 horas

* proporção 1:3 fruta/solvente (m:v)²⁰ ** adição de ácido acético 1 % v/v, na proporção 85:15 v/v

*** de acordo com o fluxograma apresentado na Figura 9, página 30

Nos estudos seguintes, utilizaram-se apenas frutas congeladas para o branqueamento, nas condições de estudo descritas na Tabela 4, mantendo-se a etapa posterior de extração em etanol 94 % v/v, com as variáveis já descritas anteriormente e apresentadas no Fluxograma (Figura 9, página 30).

Tabela 4. Condições das frutas usadas para branqueamento.

Identificação do estudo*	Fruta	Condição
L4; L5; N4; N5	Jabuticaba	Somente casca
R4; R5; T4; T5	Refugo de jabuticaba	Somente casca
V4; V5; X4; X5	Amora Preta	Fruta inteira
Z4; Z5; Z6; AB4; AB5; AB6	Jambolão	Fruta inteira sem caroço

* de acordo com o fluxograma apresentado na Figura 9, página 30

O branqueamento envolveu a imersão das frutas, contidas em sacos de polietileno, em água termostatzada a $90 \pm 1^\circ\text{C}$, por 2 minutos. Imediatamente em seguida, as frutas eram transferidas para outro banho termostatzado, com água a $40 \pm 1^\circ\text{C}$, por 15 minutos⁵⁹. Em seguida, os diferentes métodos de extração já mencionados eram realizados e os extratos mantidos sob refrigeração a 8°C para estudos de estabilidade.

➤ 3.3.2.2 Tindalização

Outro método de esterilização testado, a tindalização, foi aplicado aos extratos de jambolão, obtidos com frutas descaroçadas manualmente, não branqueadas, imersas em etanol 94 % (v/v) na proporção 1:3 fruta:etanol (m/v), a 55°C por 30 minutos, com agitação mecânica (agitador magnético). Para obtenção dos extratos, utilizaram-se distintamente: frutas sem trituração, frutas maceradas manualmente com auxílio de um pistilo e, também, frutas trituradas mecanicamente. Estes extratos foram obtidos nos estudos Y5 e AA5, do fluxograma (Figura 9, página 30).

A tindalização envolveu a imersão de ~ 80 mL dos extratos, contidos em erlenmeyers de 250 mL, em banho de água termostatzado a $95 \pm 1^\circ\text{C}$, por 3 minutos. Imediatamente em seguida, os extratos eram transferidos para outro banho termostatzado a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, onde permaneciam por 15 minutos para depois serem armazenados sob refrigeração a 8°C para estudos de estabilidade⁸¹.

3.3.3 Estudos de Estabilidade dos Extratos de ACYS

Todos os extratos obtidos, ou seja, aqueles que não passaram por qualquer tratamento de esterilização, assim como extratos de frutas branqueadas e extratos tindalizados tiveram suas estabilidades avaliadas. Para tanto, estes extratos foram monitorados, sob refrigeração a 8 °C, com medidas espectrofotométricas e observações sobre o aparecimento de fungos e alterações visuais do extrato. A periodicidade da avaliação inicial era de 15 dias e após 60 dias, o monitoramento passava a ser mensal. Em algumas condições esse monitoramento foi interrompido em 30 dias, enquanto outros duraram até 360 dias. Todas as medidas eram realizadas em triplicata.

Quando houve o aparecimento de fungos, as soluções foram centrifugadas, 3000 rpm por 3 minutos. Alíquotas do sobrenadante eram separadas para obtenção dos espectros eletrônicos. Esta era a última manipulação do extrato cujo monitoramento era então interrompido, sendo o extrato descartado.

3.3.4 Estudos de identificação de ACYS

Para garantir homogeneidade da amostra contendo ACYS extraídas e minimizar a influência de solventes no procedimento de identificação de ACYS, foram obtidas “pastas de ACYS”, denominação dada ao produto pastoso obtido a partir da eliminação parcial do solvente dos extratos¹²². Para este procedimento de secagem, imediatamente após a extração de ACYS, massas conhecidas dos extratos eram adicionadas em placas de Petri e mantidas sob fluxo de ar à temperatura ambiente, em capela, até massa constante (~24 horas). Em seguida, as ACYS mantidas nas placas de Petri eram refrigeradas e armazenadas a -11 °C para uso posterior nos testes de identificação.

➤ 3.3.4.1 Ajustes de condições de solubilização das pastas de ACYS

Foram realizados testes para otimizar as condições de solubilização das pastas de ACYS para aplicação dos procedimentos de identificação por HPLC¹²³.

Avaliou-se o efeito de diferentes solventes para a dissolução da pasta de ACYS de amora preta que garantisse uma melhor resolução do cromatograma. Partindo-se de 0,0600

a 0,1000 g da pasta, foram testados como solventes: água destilada, etanol 94 % (v/v) e metanol. Avaliou-se também a acidulação desses 3 solventes com adição de 10 μL de HCl 5 % (v/v)⁵⁰ e a contribuição da purificação por extração em fase sólida (SPE)^{20,22,87}. Neste último caso, foi utilizado cartucho C18, condicionado com 10 mL metanol e 10 mL água deionizada e eluído com HCl 0,01 % em metanol e adição final de 300 μL de HCl 0,1 %. Os cromatogramas foram obtidos nas seguintes condições após filtração em membranas com porosidade de 0,45 μm :

- fase móvel = água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 v/v/v^{104,120},
- vazão da fase móvel = 1,0 mL min⁻¹ com eluição isocrática e em fase reversa,
- volume de injeção = 20 μL ,
- detecção em 525 nm,
- tempo de eluição = 50 min.

Após o ajuste de solubilização das pastas de ACYS, prosseguiram-se aos estudos de identificação de ACYS individuais, aplicando-se HPLC como técnica de separação. Foram testados 3 métodos envolvendo comparação relativa de tempos de retenção, padrões de ACYS e espectrometria de massas (MS).

➤ 3.3.4.2 Método de Goiffon

Realizou-se o estudo de identificação das ACYS dos extratos de frutas por HPLC, pelo método de Goiffon¹⁰⁴, com o procedimento descrito na sequência: massas de pastas de ACYS variando de 0,0600 a 0,1000 g foram solubilizadas em metanol com adição de 10 μL de HCl 5 % (v/v), para um volume final de 5 mL de solução. Os cromatogramas foram obtidos nas mesmas condições descritas na página 37.

Para a identificação de ACYS, foram utilizados os extratos obtidos a partir da imersão das frutas em etanol 94 % v/v, na proporção 1:3 m/v, a 55 °C por 30 minutos.

De jabuticaba e refugo de jabuticaba, foram estudados extratos obtidos em 2 condições diferentes de extração: com trituração mecânica (liquidificador doméstico) das cascas após o branqueamento ou sem trituração. Estes extratos foram obtidos nos estudos L5, N5, R5 e T5, do fluxograma (Figura 9, página 30).

Também foram identificadas ACYS de extratos de amora e amora preta obtidos a partir de 2 condições de extração a fim de se verificar algum eventual efeito do processo na composição do extrato. A variável estudada foi extração de ACYS de frutas branqueadas e não branqueadas, de acordo com os estudos O4, P4, U4 e V4, do fluxograma (Figura 9, página 30).

Procedeu-se à identificação de ACYS em extratos de jambolão obtidos em 8 condições de extração, descritas na Tabela 5.

Tabela 5. Condições de extração de ACYS de jambolão.

Identificação do estudo*	Jambolão
Y4; Y5; AA4; AA5	Não Branqueado
Z4; Z5; AB4; AB5	Branqueado

* de acordo com o fluxograma apresentado na Figura 9, página 30

➤ 3.3.4.3 Testes com Padrões de ACYS

Para obter o tempo de retenção característico de algumas ACYS prováveis de serem encontradas em extratos de frutas, de acordo com outros estudos prévios GPQUAE¹, foram utilizados 8 padrões. Preparava-se a solução a partir de ~ 0,00030 g do padrão de ACYS, adicionava-se 10 µL de HCl 5 % (v/v) e completava-se o volume final de 5,00 mL com metanol. Os cromatogramas foram obtidos nas mesmas condições descritas na página 37.

➤ 3.3.4.4 Identificação de ACYS por HPLC–ESI-Q-TOF-MS

Diante de problemas com os resultados obtidos a partir da aplicação do Método de Goiffon⁴³ e a limitação de padrões de ACYS disponíveis, optou-se pelo desenvolvimento de um estudo com HPLC-ESI-Q-TOF-MS.

Inicialmente, foram otimizadas condições de separação cromatográfica de uma mistura dos 8 padrões de ACYS em coluna C18 de 15 cm de comprimento, utilizando-se como fase móvel água deionizada acidificada com ácido fórmico (90:10 v/v) e metanol. Os

cromatogramas foram obtidos nas seguintes condições após filtração em membranas com porosidade de 0,45 μm :

- vazão da fase móvel = 0,250 mL min⁻¹ com eluição por gradiente e em fase reversa,
- volume de injeção = 50 μL ,
- detecção por MS,
- tempo de eluição = 45 min.

O gradiente de eluição otimizado e os respectivos tempos em cada estágio de eluição são descritos na Tabela 6.

Tabela 6. Gradiente de eluição e tempo.

Tempo (minutos)	Ácido fórmico (% v/v)	Metanol (% v/v)
0,00	90	10
5,00	90	10
25,00	70	30
35,00	70	30
40,00	90	10
45,00	90	10

Para a aquisição dos cromatogramas e dos respectivos espectros de massas das ACYS dos extratos de frutas, foram dissolvidos de 0,0400 a 0,1200 g das pastas de ACYS em metanol para volume final de 5 mL, na presença de 6,9 μL de ácido acético (HAc). As soluções obtidas eram filtradas em membranas com porosidade de 0,45 μm antes da injeção no cromatógrafo.

Trabalhou-se com ionização por eletrospray (ESI) com analisador quadrupolo-tempo de voo (Q-TOF), em condições de *tuning* otimizadas para ionização por eletrospray íon positivo^{50,102,124} com o seguinte ajuste:

- resolução = 5000,
- voltagem de capilaridade = 2,8 KV,
- voltagem do cone da amostra = 60 V,
- temperatura da fonte = 100°C,
- temperatura de dessolvatação do gás (Nitrogênio)= 350°C com fluxo de 55 L/h,
- energia de colisão = 5,0 eV e energia do íon = 1,0 eV.

CAPÍTULO 4:

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, a presença de ACYS foi identificada pelos perfis típicos dos espectros eletrônicos dos extratos obtidos com as frutas estudadas. A Figura 10 apresenta os espectros desses extratos obtidos em meio alcoólico, nas condições K4, Q4, O2, U4 e Y4 do fluxograma (Figura 9, página 30). Nesta figura, pode-se observar o típico comprimento de onda de absorção máxima (λ_{max}) das soluções alcoólicas de ACYS em ~ 530 nm, que serve para identificar a presença de ACYS nos extratos. No ultravioleta, as absorções são relacionadas com outros compostos presentes nos extratos, como ácidos fenólicos e taninos^{60,125}.

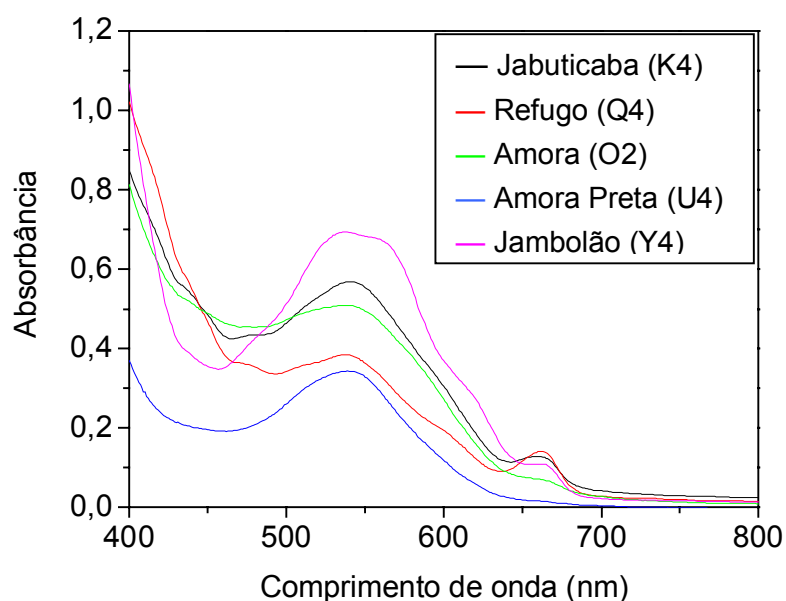


Figura 10. Espectros de extratos de ACYS de frutas obtidos em etanol 99,5 % v/v (amora) e 94 % v/v (demais frutas) na proporção 1:3 fruta/solvente (m/v)²⁰. O branco utilizado para cada espectro foi o respectivo solvente extrator.

Para discutir os resultados em termos comparativos da adequação das condições de extração e para os monitoramentos da estabilidade dos extratos, relacionou-se a quantidade de ACYS extraída com valores de absorbância no comprimento de onda de absorção máxima (λ_{max}) de cada extrato: para extratos aquosos $\lambda_{\text{max}} = 524$ nm, para extratos alcoólicos $\lambda_{\text{max}} = 538$ nm^{6,20}, conforme exemplificado na Figura 11. Nessa figura estão representados os espectros dos extratos foram obtidos a partir de massas iguais de jabuticaba, na proporção de 1:3 fruta:solvente (m/v), e imersão em etanol e em água à 25 °C por 24 horas, variando-se apenas o solvente utilizado, para verificar seu efeito na quantidade de ACYS extraída.

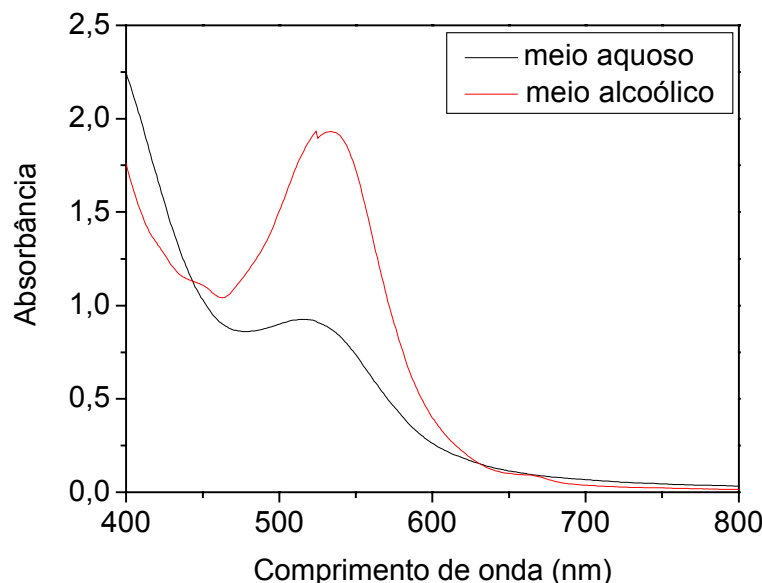


Figura 11. Espectro típico de extrato de ACYS de jabuticaba obtido a partir da extração a 25 °C por 24 horas na proporção 1:3 fruta/solvente (m/v)²⁰, sendo em meio aquoso, $\lambda_{\text{máx}} = 524$ nm, e meio alcoólico $\lambda_{\text{máx}} = 538$ nm. O branco utilizado para cada espectro foi o respectivo solvente extrator.

Para comparações das diferentes condições de extração dos extratos, realizaram-se testes estatísticos, como o teste t-pareado e o teste $F^{126,127}$, com 95 % de confiança. Uma breve descrição desses testes estatísticos, incluindo as expressões matemáticas envolvidas, encontra-se no Anexo 2.

4.1 Estudos de Métodos de Extração de ACYS

Os testes de procedimentos de extração de ACYS das frutas foram executados visando aplicabilidade em escala industrial, por isso estudaram-se processos simplificados, de relativo baixo custo e baixa toxicidade de reagentes.

Para facilitar o acompanhamento dos resultados das diversas condições de extração das diferentes fontes de ACYS, optou-se em relacionar a identificação do estudo, de acordo com o fluxograma da Figura 9, nas Tabelas 7 a 10, no momento da exposição dos valores. Estes códigos também aparecem nos textos da discussão.

4.1.1 Estudos iniciais de Extração de ACYS

Os resultados indicaram que a maior quantidade de ACYS extraída de jabuticaba fresca e congelada e amora congelada foi alcançada utilizando-se etanol 99,5 % v/v como solvente extrator. No caso de extratos de amora fresca, a quantidade de ACYS extraídas não diferiu estatisticamente nos 3 solventes utilizados, conforme pode ser verificado com os dados da Tabela 7.

Tabela 7. Valores de absorbância (A) em $\lambda_{\text{máx}}$ dos diferentes extratos.

Fonte de ACYS	Água		Etanol 99,5 % v/v		Etanol 99,5 % v/v acidificado*	
Jabuticaba Fresca	$0,192 \pm 0,003$ (A1)	$0,21 \pm 0,05$ (D1)	$2,1 \pm 0,3$ (A2)	$1,6 \pm 0,8$ (D2)	$1,8 \pm 0,2$ (A3)	$1,23 \pm 0,04$ (D3)
Jabuticaba Congelada	$0,36 \pm 0,02$ (H1)	$0,26 \pm 0,02$ (K1)	$1,7 \pm 0,2$ (H2)	$0,9 \pm 0,1$ (K2)	$1,58 \pm 0,08$ (H3)	$1,2 \pm 0,3$ (K3)
Amora Fresca	$1,46 \pm 0,01$ (F1)		$1,5 \pm 0,1$ (F2)		$1,4 \pm 0,1$ (F3)	
Amora Congelada	$1,16 \pm 0,06$ (O1)		$1,44 \pm 0,06$ (O2)		$1,00 \pm 0,06$ (O3)	

* adição de ácido acético 1 % v/v, na proporção 85:15 v/v

Para jabuticaba fresca e congelada, a extração com etanol 99,5 % v/v forneceu extratos com cerca de 85 % mais ACYS em comparação com o solvente aquoso. Já em comparação aos extratos com etanol acidificado, a quantidade foi 14 % maior. Para amora congelada, a extração em etanol produziu extratos com 19 % mais ACYS em comparação com o solvente aquoso e 30 % com o etanol acidificado.

Para extratos de jabuticaba fresca e congelada, com os 3 solventes, a maior quantidade de ACYS extraída foi observada quando se utilizou apenas a casca da fruta. A extração com fruta inteira reduziu de 24 a 47 % de ACYS extraídas, dependendo do solvente, em comparação aos extratos correspondentes obtidos somente com as cascas. Isso possivelmente ocorreu porque, em jabuticabas, ACYS concentram-se nas cascas.

Comparando-se a extração de frutas frescas e congeladas, verificou-se uma menor quantidade de ACYS extraída a partir de frutas congeladas, independente do solvente extrator. A quantidade de ACYS extraída de amora congelada foi 5 % inferior com meios alcoólicos e cerca de 25 % em meio aquoso, em comparação com os extratos de frutas

frescas. Com jabuticaba, a redução na quantidade de ACYS extraída foi menor se utilizar apenas casca em meio alcoólico acidificado, apenas 2 %.

4.1.2 Outros Estudos de Extração de ACYS

A partir dos primeiros resultados, optou-se pela continuidade dos estudos utilizando-se somente cascas de jabuticaba. Além disso, outros estudos em andamento paralelo no GPQUAE¹²² mostraram que, dentre os solventes alcoólicos já mencionados e a utilização de etanol 94 % v/v, não há diferença estatística com nível de confiança de 95 % com relação à quantidade de ACYS extraída. Sendo assim, optou-se em prosseguir os estudos de extração com etanol 94 % v/v em função de custo mais baixo que torna o processo mais interessante para aplicação em escala industrial.

Neste contexto, visando obter extratos com maior quantidade de ACYS, a partir de um processo de extração mais rápido, outros testes foram realizados, utilizando-se etanol 94 % v/v durante 30 minutos, a 55 °C. Além disso, testou-se o efeito de trituração mecânica das frutas e verificou-se a influência de agitação, durante a extração, para garantir uma maior homogeneidade do sistema extrator. Estas condições foram escolhidas a partir de testes em desenvolvimento no GPQUAE¹.

➤ 4.1.2.1 Jabuticaba e Refugo de Jabuticaba (Estudos: K4; K5; M4; M5; Q4; Q5; S4; S5)

A trituração mecânica das cascas e a extração com agitação magnética aumentaram a quantidade de ACYS extraída, comparando-se com os extratos de frutas sem maceração e sem agitação (Tabela 8).

Tabela 8. Valores de absorbância (A) em $\lambda_{\text{máx}} = 539 \text{ nm}$ para extratos alcoólicos de jabuticaba e refugo.

Fruta	A	A	A	A
Jabuticaba	0,47 ± 0,03 (K4)	0,46 ± 0,08 (K5)	0,53 ± 0,04 (M4)	0,59 ± 0,02 (M5)
Refugo	0,45 ± 0,05 (Q4)	0,64 ± 0,07 (Q5)	0,80 ± 0,06 (S4)	0,82 ± 0,06 (S5)

Vale ressaltar a importância do monitoramento dos extratos de frutas trituradas para verificar se a modificação das estruturas celulares pela trituração aumenta a atividade enzimática, o que aceleraria o processo de degradação dos extratos em comparação aos extratos de frutas sem maceração. Esse efeito não foi detectado após 120 dias de monitoramento dos extratos de ACYS de jabuticaba e após 30 dias para o refugo de jabuticaba, pois não se observaram diferenças significativas com nível de confiança de 95 %, nos valores de absorção máxima apresentados na Tabela 8.

➤ 4.1.2.2 Amora Preta (Estudos: U4; U5; W4; W5)

A trituração da fruta, seguida da extração sem agitação magnética, aumentou a quantidade de ACYS extraída, como mostra a Tabela 9.

Tabela 9. Valores de absorbância (A) em $\lambda_{\text{máx}} = 539$ nm para extratos de amora preta.

Fruta	A	A	A	A
Amora Preta	$0,90 \pm 0,09$ (U4)	$1,24 \pm 0,06$ (U5)	$1,84 \pm 0,03$ (W4)	$1,78 \pm 0,03$ (W5)

➤ 4.1.2.3 Jambolão (Estudos: Y4; Y5; Y6; AA4; AA5; AA6)

Jambolão gerou extratos mais concentrados em ACYS sob aquecimento a 55°C por 30 minutos em comparação com extração a 25 °C por 24 horas, como mostra a Tabela 10.

Tabela 10. Valores de absorbância (A) em $\lambda_{\text{máx}} = 539$ nm para extratos de jambolão.

Fruta	A	A	A	A	A	A
Jambolão	$0,52 \pm 0,08$ (Y6)	$0,55 \pm 0,04$ (AA6)	$0,71 \pm 0,04$ (Y4)	$0,74 \pm 0,05$ (Y5)	$1,28 \pm 0,04$ (AA4)	$1,30 \pm 0,06$ (AA5)

A extração de frutas maceradas manualmente, com auxílio de pistilo, a 25 °C por 24 horas (Y6) produziu extratos com 27 % menos ACYS em comparação com extração a 55 °C por 30 minutos (Y4 e Y5). Essa diferença foi de – 57 % em comparação com os extratos obtidos com frutas trituradas mecanicamente e aquecidos a 55 °C por 30 minutos (AA4 e AA5). Já nas melhores condições de extração, trituração mecânica das frutas seguida de extração a 55 °C por 30 minutos (AA4 e AA5), foram obtidos extratos com cerca de 45 %

mais ACYS em comparação com os extratos obtidos nas mesmas condições de extração, porém com frutas maceradas (Y4 e Y5).

4.2 Estudos de Esterilização e Estabilidade dos Extratos de ACYS

Para os estudos da estabilidade dos extratos de ACYS, realizou-se a inspeção visual dos mesmos para verificação do aparecimento de fungos e modificações na coloração destes extratos, além da obtenção periódica de seus espectros eletrônicos.

Como mencionado no item 3.1, para os estudos de estabilidade, relacionou-se a quantidade de ACYS com valores de absorbância (A) no comprimento de onda de absorção máxima ($\lambda_{\max}$) de cada extrato. As possíveis reduções na quantidade de ACYS nos extratos, durante o período de monitoramento, foram justificadas como sendo perda por degradação das ACYS.

Para obtenção de extratos mais duráveis, investigaram-se os efeitos de 2 processos de esterilização, ambos baseados em choques térmicos, sendo um realizado nas frutas antes das extrações, branqueamento, e o outro nos extratos, tindalização.

Assim como nos estudos de extração de ACYS, juntamente com os resultados obtidos dos estudos de estabilidade estão relacionados à identificação dos estudos, de acordo com o fluxograma da Figura 9 da página 30.

4.2.1 Branqueamento

O método do branqueamento é um procedimento de pré-tratamento, ou seja, é uma esterilização realizada nas frutas antes de serem utilizadas na extração, como tentativa de minimizar ou eliminar os microrganismos envolvidos na deterioração de seus extratos⁷⁴. Além disso, este é uma alternativa para inibir a atividade enzimática da PPO responsável pelo mecanismo de degradação das ACYS e ainda pode aumentar a quantidade de ACYS extraída⁶⁰.

O processo de branqueamento aplicado neste trabalho envolve um tratamento térmico das frutas, sem adição de agentes químicos como SO_2 , seguindo indicações de alguns artigos da literatura consultada³²⁻³⁴.

Um dos mecanismos de degradação das ACYS é proposto como sendo causado pela oxidação de compostos fenólicos a quinonas pela ação da enzima polifenol oxidase (PPO) presente nas frutas. A enzima atua nas reações de ACYS e/ou na polimerização de quinonas, produzindo compostos de cor marrom, que modificam, portanto, as características iniciais dos extratos^{32,35-36,41}.

Nas frutas intactas, as enzimas e seus substratos estão em compartimentos celulares diferentes. Durante a maceração das frutas para dar início ao processo de extração de ACYS, esses compartimentos são destruídos e as enzimas entram em contato com os compostos fenólicos, oxidando-os. Após certo período de armazenamento, esses extratos tornam-se turvos e com coloração castanho escuro, dificultando a manutenção da cor inicial e da limpidez³⁵, o que compromete a qualidade do extrato para aplicações gerais.

Sabe-se que, por ser muito resistente ao calor, a inativação da PPO não é completa à 60 °C⁴² (temperatura que favorece a degradação de extratos de ACYS²⁹), mas, em geral, completa-se a 80 °C. Por essa razão, o tempo em que as frutas permaneceram em contato com água em temperatura elevada foi de apenas 2 minutos, para minimizar eventual perda de ACYS e, dessa maneira, os extratos não perderiam suas características iniciais.

A redução da atividade da PPO pode apresentar resultados ligeiramente distintos em frutas diferentes. Isso se deve ao fato de que enzimas PPO de diferentes frutas podem apresentar diferenças nas temperaturas ótimas de reação e na resistência à inativação térmica. O tamanho das frutas também deve ser considerado para diferenciar a redução da atividade das PPO⁴³.

O branqueamento, além de ser um método de esterilização e de inativação da PPO, também é proposto para aumentar a quantidade de ACYS extraídas por um possível desarranjo dos tecidos das frutas, que leva a um aumento da permeabilidade das células, conduzindo a um aumento da quantidade de ACYS extraídas³².

4.2.1.1 Estudos iniciais do Branqueamento

➤ 4.2.1.1.1 Amora Fresca (Estudos: G1; G2; G3)

Com esta fonte de ACYS, notou-se que o processo de branqueamento não contribuiu para modificar a quantidade de ACYS extraída com qualquer um dos 3 solventes testados.

Com relação ao aumento da estabilidade do extrato em meio aquoso, não se notou efeito favorável do branqueamento (G1), tendo sido observado o surgimento de fungos e perda das características visuais dos extratos de fruta branqueada ou não, em 18 dias.

Nos extratos alcoólicos não acidificados (G2) com 360 dias de armazenamento notou-se um efeito favorável do branqueamento já que apresentaram uma perda por degradação de 8 % na quantidade de ACYS em comparação a 13 % de perda nos extratos obtidos nas mesmas condições sem frutas branqueadas. Já para os extratos alcoólicos acidificados (G3), a adição de ácido parece ter um efeito favorável para o aumento da durabilidade dos extratos se comparado aos extratos não acidificados, pois com 360 dias de armazenamento, não houve alterações visuais nem redução na quantidade de ACYS. No entanto, não é possível concluir sobre o efeito do branqueamento no caso dos extratos alcoólicos acidificados, pois a durabilidade e as características em 360 dias de armazenamento foram análogas para extratos de frutas branqueadas ou não (Estudos F3 e G3), conforme indicam os dados da Tabela 11.

Tabela 11. Valores de absorbância (A) em $\lambda_{\text{máx}} = 524 \text{ nm}$ para extratos aquosos e em $\lambda_{\text{máx}} = 538 \text{ nm}$ para extratos alcoólicos de amora fresca.

Dias	A (F1)	A (G1)	A (F2)	A (G2)	A (F3)	A (G3)
0*	1,46 ± 0,01	1,3 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,24 ± 0,08
360**	1,4 ± 0,1	1,3 ± 0,2	1,3 ± 0,2	1,29 ± 0,08	1,4 ± 0,2	1,2 ± 0,1

* valores após extração ** após 18 dias de armazenamento para extratos aquosos e 360 dias alcoólicos

➤ 4.2.1.1.2 Amora Congelada (Estudos: P1; P2; P3)

Com amora congelada, o processo de branqueamento pareceu ser eficiente para aumentar em 3 % a quantidade de ACYS extraída em meio alcoólico. Usando meio alcoólico acidificado, a quantidade de ACYS extraída foi 13 % maior em relação aos extratos de fruta não branqueada. A Tabela 12 traz os resultados dos testes realizados.

Tabela 12. Valores de absorvância (A) em $\lambda_{\text{máx}} = 524 \text{ nm}$ para extratos aquosos e em $\lambda_{\text{máx}} = 538 \text{ nm}$ para extratos alcoólicos de amora congelada.

Dias	A (O1)	A (P1)	A (O2)	A (P2)	A (O3)	A (P3)
0**	1,16 ± 0,06	0,93 ± 0,07	1,44 ± 0,06	1,48 ± 0,05	1,00 ± 0,06	1,15 ± 0,06
300***	0,527	0,60 ± 0,04	0,6 ± 0,4	0,7 ± 0,3	0,7 ± 0,2	0,8 ± 0,1

** valores após extração *** após 177 dias de armazenamento para extratos aquosos e 360 dias alcoólicos

Com relação ao aumento da estabilidade do extrato aquoso, não se notou efeito favorável do branqueamento (P1), tendo sido observado o surgimento de fungos e perda na quantidade de ACYS 55 % nos extratos de fruta não branqueada e 35 % de fruta branqueada, em 177 dias. Porém, a estabilidade foi aumentada comparando-se com extratos de amoras frescas (18 dias de armazenamento), o que sugere efeitos favoráveis do branqueamento para evitar a degradação de ACYS, principalmente por ação de fungos, em extratos de amora congelada.

A estabilidade dos extratos alcoólicos (P2) foi monitorada por 300 dias sem que se observasse aparecimento de fungos, o que indica que provavelmente o processo de branqueamento teve efeito favorável na estabilidade desses extratos. A perda por degradação das ACYS, nos extratos de fruta branqueada ou não, foi cerca de 55 % em meio alcoólico não acidulado contra a perda de cerca de 30 % nos extratos em meio alcoólico acidificado. Com relação aos extratos alcoólicos acidificados, há uma menor perda de ACYS, já que, dentro de certo limite de concentração, o meio ácido estabiliza os extratos de frutas já que evita a oxidação das ACYS que ocorre em meio alcalino¹².

➤ 4.2.1.1.3 Jabuticaba Fresca (Estudos: B1; B2; B3; C1; C2; C3; E1; E2; E3)

4.2.1.1.3.1 Extração em água destilada (Estudos: B1; C1; E1)

Nos extratos aquosos de jabuticaba fresca inteira branqueada (B1 e C1), a quantidade de ACYS extraídas foi 4 vezes maior e mantiveram suas características sem aparecimento de fungos por 60 dias, com cerca de 40 % de perda na quantidade de ACYS, enquanto que os extratos aquosos de jabuticaba não branqueada foram degradados em apenas 18 dias.

Branqueando somente a casca da jabuticaba (E1) e realizando-se extração em meio aquoso, obteve-se extrato com maior quantidade de ACYS extraída, com valores de

absorbância 2 vezes maior com relação aos extratos em mesmas condições de jabuticaba inteira branqueada. Observou-se também um aumento na estabilidade dos extratos da casca da jabuticaba branqueada, pois somente após 200 dias houve aparecimento de fungos, com perda de 59 % na quantidade de ACYS. Isto indica que o processo de branqueamento das cascas de jabuticaba favoreceu a eliminação ou minimização dos microorganismos responsáveis pela deterioração dos extratos de ACYS.

A figura 12 ilustra os resultados obtidos com extratos aquosos de jabuticaba discutidos acima.

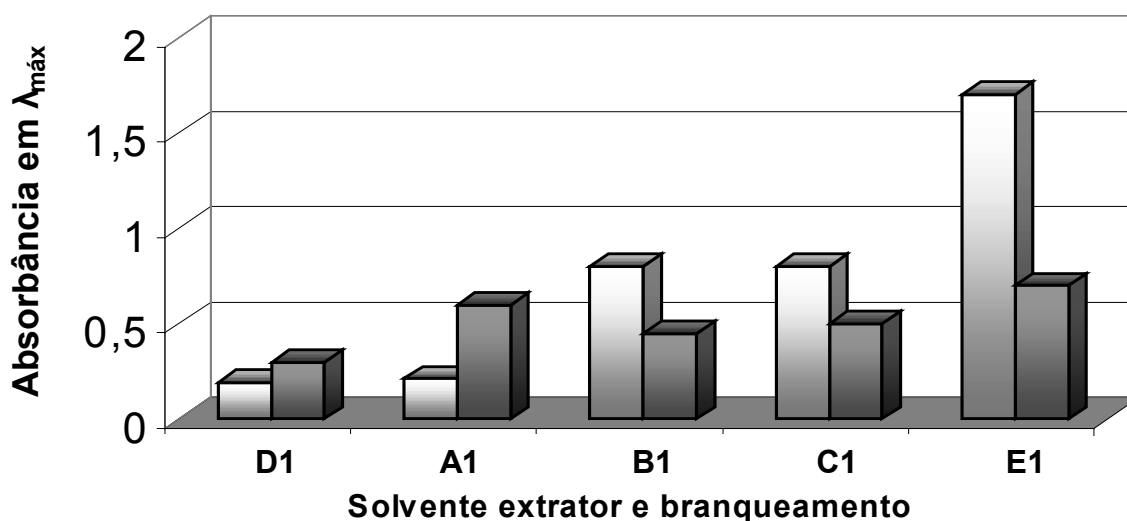


Figura 12. Valores de absorbância em $\lambda_{máx} = 524$ nm para extratos aquosos de jabuticaba fresca do dia de extração das ACYS (■) e após 18 dias para extratos de fruta não branqueada (A1 e D1), 60 dias para extratos de fruta inteira branqueada (B1 e C1) e após 200 dias para extratos de casca branqueada (E1) (□).

4.2.1.1.3.2 Extração em etanol 99,5 % v/v (Estudos: B2; C2; E2)

Os extratos alcoólicos não acidificados de jabuticaba fresca inteira branqueada também apresentaram maior quantidade de ACYS extraídas em comparação aos extratos de fruta não branqueada, sendo 7 % maior com uso exclusivo de cascas (B2) e 23 % maior em comparação com as extrações realizadas a partir de casca+polpa (C2).

Todos os extratos de jabuticaba fresca em meio alcoólico não acidificado foram monitorados até 350 dias após a extração. Com relação à perda na quantidade de ACYS,

neste período de 350 dias, extratos de jabuticaba inteira branqueada e não branqueada, foi cerca de 20 %, indicando que o branqueamento não favorece a estabilidade desses extratos.

Os extratos alcoólicos não acidificados de casca de jabuticaba branqueada não apresentaram maior quantidade de ACYS extraídas, no entanto, a degradação das ACYS ao longo de 350 dias foi significativamente menor que aquela observada para extratos obtidos com a fruta inteira, 6 % e 20 % respectivamente.

A figura 13 ilustra os resultados obtidos com extratos alcoólicos de jabuticaba discutidos acima.

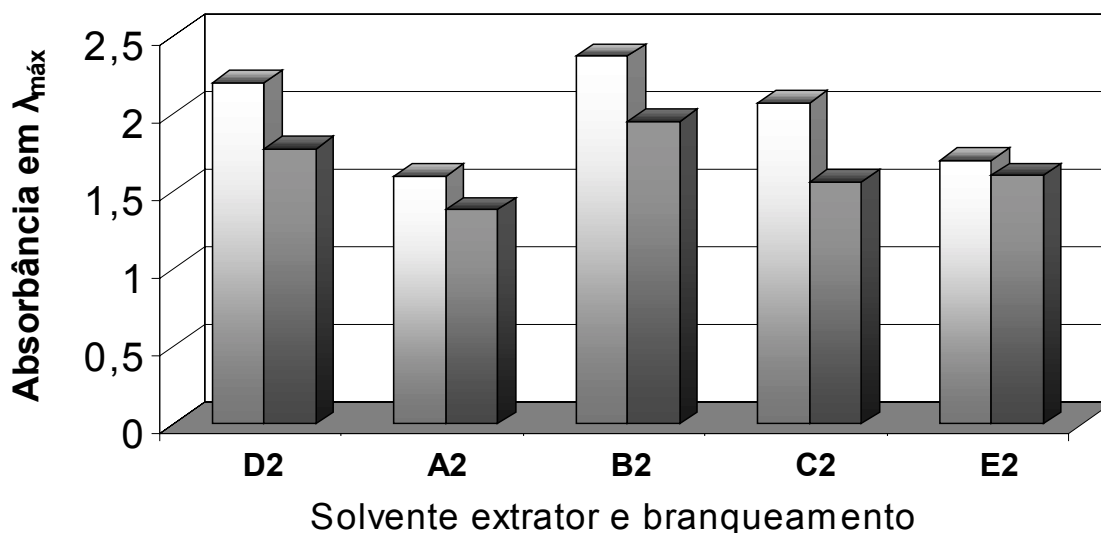


Figura 13. Valores de absorbância em $\lambda_{máx} = 539$ nm para extratos alcoólicos não acidificados de jabuticaba fresca do dia de extração das ACYS (■) e após 350 dias de armazenamento (■).

4.2.1.1.3.3 Extração em etanol:ácido acético 1 % 85:15 v/v (Estudos: B3; C3; E3)

Os extratos alcoólicos acidificados de jabuticaba fresca inteira branqueada e somente casca branqueada apresentaram maior quantidade de ACYS extraídas em comparação aos extratos de fruta não branqueada. O aumento na quantidade de ACYS extraídas foi de 69 %, quando se utilizou somente casca branqueada (E3) em relação ao uso de fruta inteira branqueada para extração (B3 e C3), como mostra a Figura 14.

Todos os extratos de jabuticaba fresca em meio alcoólico acidificado permaneceram em monitoramento por 350 dias. Nesse período, todos os extratos alcoólicos acidificados apresentaram perda na quantidade de ACYS, como mostra a Figura 14. Os extratos de fruta sem branqueamento apresentaram 11 % de perda de ACYS por degradação ao usar apenas a casca para extração (D3) e de 36 % ao usar a fruta inteira (A3). Já nos extratos de fruta inteira branqueada, essa perda foi cerca de 9 % para extrações usando fruta inteira (C3) e apenas casca (B3). Nos extratos de casca de jabuticaba fresca branqueada (E3) houve uma redução de 18 % na quantidade de ACYS.

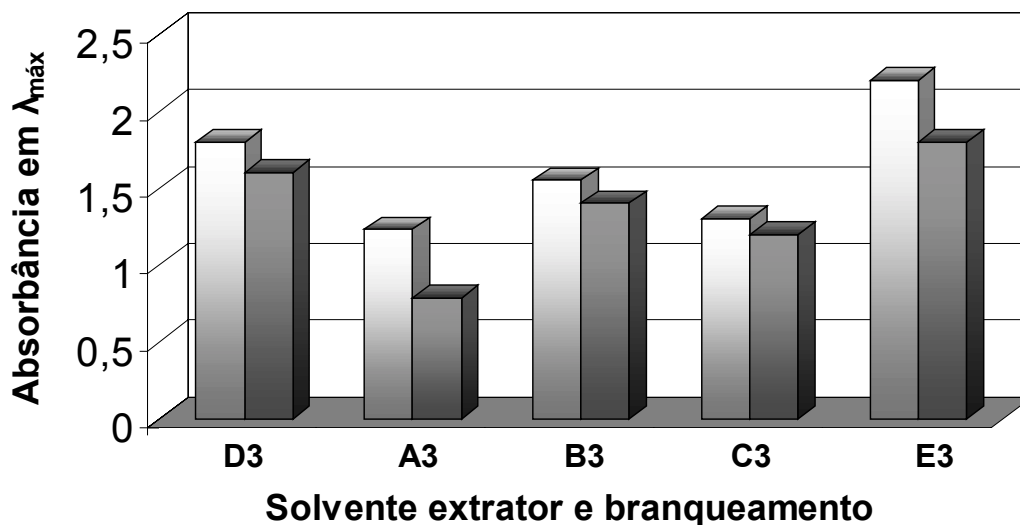


Figura 14. Valores de absorbância em $\lambda_{máx} = 539$ nm para extratos alcoólicos acidificados de jabuticaba fresca do dia de extração das ACYS (■) e após 350 dias de armazenamento (■).

➤ 4.2.1.1.4 Jabuticaba Congelada (Estudos: I1; I2; I3, J1; J2; J3; L1; L2; L3)

4.2.1.1.4.1 Extração em água destilada (Estudos: I1; J1; L1)

Os extratos aquosos de jabuticaba congelada inteira branqueada, apresentaram maior quantidade de ACYS extraídas, com valores de absorbância 2 vezes maior que nos extratos de fruta não branqueada. Branquear exclusivamente as cascas (L1) mostrou-se uma opção adequada para aumentar a quantidade de ACYS extraída, pois gerou extratos com absorbância 50 % maior que os extratos de jabuticaba congelada inteira branqueada.

Com relação à estabilidade dos extratos aquosos de jabuticaba inteira branqueada, houve aparecimento de fungos com mais de 177 dias de armazenamento e notou-se perda de 44 % na quantidade de ACYS, quando se utilizou apenas casca para extração (I1) e ao usar a fruta inteira para extração (J1), a estabilidade foi de apenas 87 dias, com uma perda na quantidade de ACYS de 23 %. No caso de extratos de apenas casca branqueada (L1), houve um aumento na estabilidade, com aparecimento de fungos somente após cerca de 210 dias, observando-se uma perda de 52 % na quantidade de ACYS extraída. Já os extratos de fruta não branqueada sofreram ação de fungos em apenas 19 dias e com perda na quantidade de ACYS de 23 % ao usar somente a casca na extração (K1) e de 35 % ao usar a fruta inteira (H1).

A figura 15 ilustra os resultados obtidos discutidos acima que indicam que, assim como para os extratos de jabuticaba fresca, a esterilização por branqueamento, principalmente realizado somente nas cascas de jabuticabas, pode ser uma alternativa de aumentar o tempo de vida útil desses extratos.

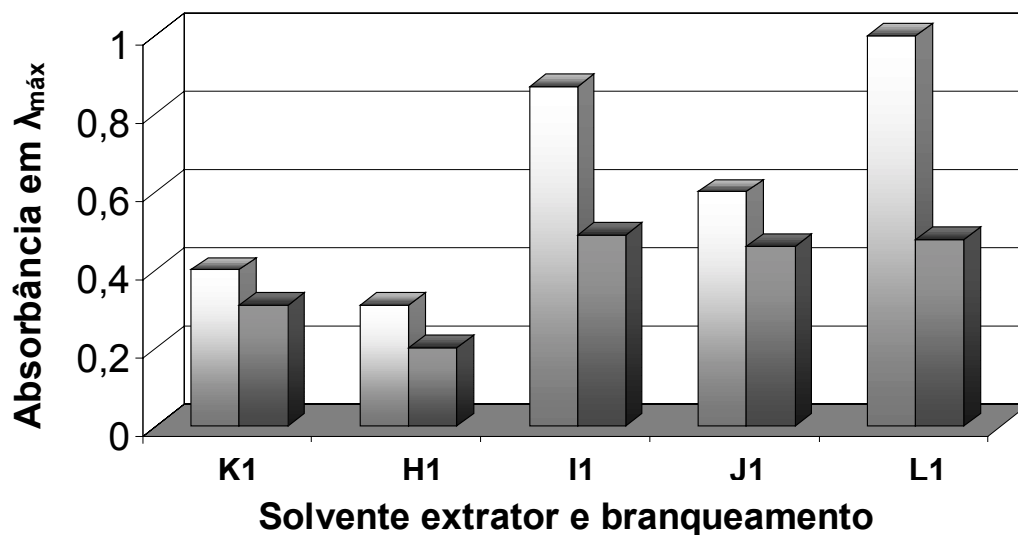


Figura 15. Valores de absorbância em $\lambda_{\text{máx}} = 524 \text{ nm}$ para extratos aquosos de jabuticaba congelada do dia de extração das ACYS (□) e após 19 dias para extratos de fruta não branqueada (H1 e K1), 87 dias para extratos de fruta inteira branqueada usada para extração (J1), 177 dias para extratos de fruta inteira branqueada e apenas casca para extração (I1) e após 210 dias para extratos de casca branqueada (L1) (■).

4.2.1.1.4.2 Extração em etanol 99,5 % v/v (Estudos: I2; J2; L2)

A Figura 16 apresenta valores de absorbância em $\lambda_{\text{máx}}$ dos extratos alcoólicos não acidificados de jabuticaba congelada. Pode ser verificado que não houve variação na quantidade de ACYS extraídas em comparação aos extratos de fruta não branqueada. Porém, os extratos obtidos de apenas casca branqueada (L2) mostraram maior quantidade de ACYS extraída. Esse aumento foi 2 vezes maior em relação ao extrato de fruta inteira branqueada.

Todos os extratos permaneceram sob monitoramento, após 300 dias de obtenção. A perda de ACYS por degradação neste período para extrato de casca de jabuticaba congelada inteira branqueada (I1) foi de 27 % contra 12 % nos extratos de casca de fruta não branqueada (K1), inesperadamente. Esse comportamento pode ser devido ao rompimento de estruturas celulares devido às modificações dos tecidos nos processos de congelamento e descongelamento, levando à liberação de compostos e enzimas que entram em contato com ACYS e favorecem sua degradação, sendo que esses compostos não seriam eliminados com o branqueamento. Quando se usa somente a casca, mesmo sem branquear, não se expõem as ACYS ao contato com esses compostos e a degradação pode ser minimizada.

Extratos de casca+ polpa de jabuticaba apresentaram perda de cerca de 35 % tanto para os extratos de fruta branqueada e não branqueada (J1 e H1). Nos extratos de apenas casca branqueada (L1), a perda na quantidade de ACYS, nesse período de 300 dias foi de 25 %, como pode ser observado a partir da Figura 16.

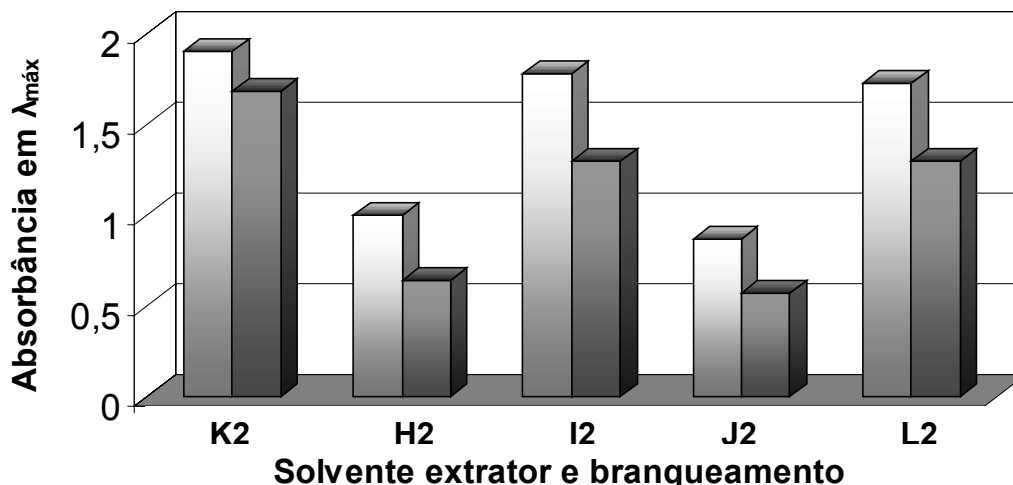


Figura 16. Valores de absorbância em $\lambda_{máx} = 539$ nm para extratos alcoólicos não acidificados de jabuticaba congelada do dia de extração das ACYS (■) e após 300 dias de armazenamento (■).

4.2.1.1.4.3 Extração em etanol:ácido acético 1 % 85:15 v/v (Estudos: I3; J3; L3)

Extratos em meio alcoólico acidificado, quando obtidos de apenas casca branqueada (L3) tiveram um aumento de 42 % a mais na quantidade de ACYS extraída com relação à fruta inteira branqueada usando só a casca para extração (I3). Esse aumento foi de 71 %, comparando-se com o extrato de fruta inteira branqueada usando casca+polpa para extração (J3), como ilustra a Figura 17.

Os extratos alcoólicos acidificados de jabuticaba congelada inteira branqueada permaneceram em monitoramento por 300 dias. Neste período de armazenamento, os extratos de fruta não branqueada apresentaram redução na quantidade de ACYS, sendo de 24 % para extratos utilizando-se somente casca (K3) e de 37 % utilizando-se a fruta inteira (H3). Já os extratos de fruta branqueada apresentaram 21 % de perda na quantidade de ACYS nos extratos de casca (I3) e de 24 % nos obtidos da fruta inteira (J3). Após 300 dias, os extratos obtidos de casca branqueada (L3) apresentaram perda de 11 % na quantidade de ACYS inicialmente extraídas. A Figura 17 traz dados relacionados com esses resultados.

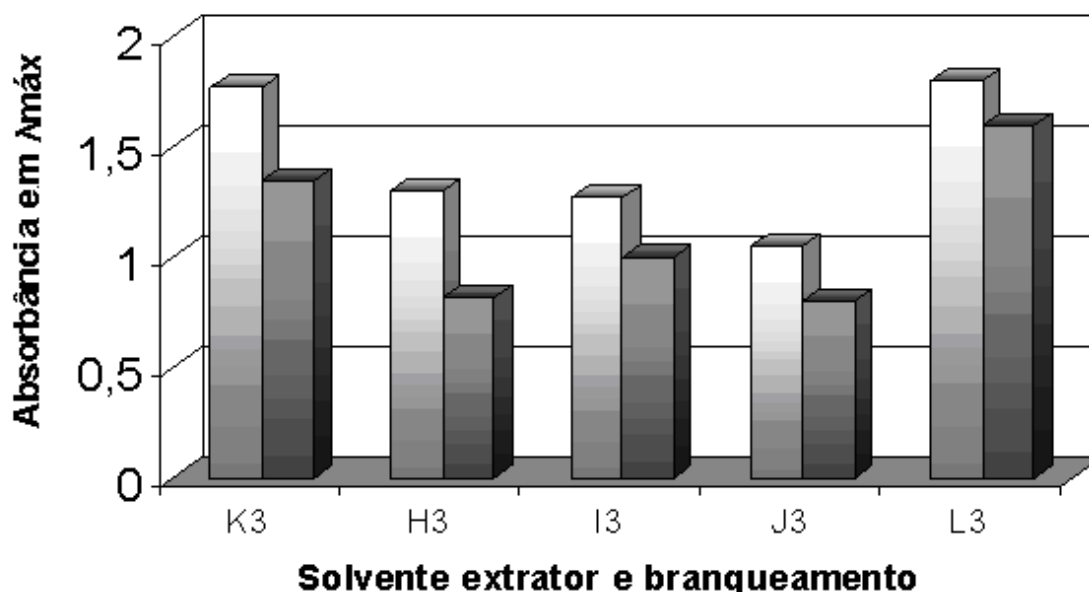


Figura 17. Valores de absorbância em $\lambda_{\text{máx}} = 539 \text{ nm}$ para extratos alcoólicos acidificados de jabuticaba congelada do dia de extração das ACYS (■) e após 300 dias de armazenamento (■).

•Comparando-se extratos de Jabuticaba Fresca e Congelada

Em meio aquoso, nos extratos de jabuticaba fresca e congelada não branqueada (A1, D1, H1, K1), houve aparecimento de fungos em 18 dias. Os extratos aquosos de cascas frescas (E1) ou congeladas branqueadas (L1) mantiveram-se estáveis por mais de 200 dias. Para os extratos em meios alcoólicos de frutas branqueadas (B2, B3, C2, C3, E2, E3, I2, I3, J2, J3, L2, L3) e não branqueadas (A2, A3, D2, D3, H2, H3, K2, K3), as estabilidades permaneceram sob monitoramento por 300, utilizando-se frutas congeladas, e por 350 dias com frutas frescas, sem surgimento de fungos.

4.2.1.2 Outros estudos do Branqueamento

Realizou-se o branqueamento das frutas para as novas condições de extração em etanol 94 % v/v, a 55 °C por 30 minutos.

4.2.1.2.1 Jabuticaba e Refugo (Estudos: L4; L5; N4; N5; R4; R5; T4; T5)

A quantidade de ACYS extraídas a partir de frutas branqueadas, nas diferentes condições de extração, é estimada a partir da absorbância em $\lambda_{\text{máx}}$, (dados na Tabela 13).

Tabela 13. Valores de absorbância (A) em $\lambda_{\text{máx}} = 539 \text{ nm}$ para extratos de jabuticaba branqueada e refugo branqueado.

Fruta	A	A	A	A
Jabuticaba	$0,50 \pm 0,02$ (L4)	$0,67 \pm 0,02$ (L5)	$0,70 \pm 0,04$ (N4)	$0,73 \pm 0,05$ (N5)
Refugo	$0,60 \pm 0,05$ (R4)	$0,77 \pm 0,07$ (R5)	$0,8 \pm 0,1$ (T4)	$1,00 \pm 0,04$ (T5)

Para extratos de jabuticaba branqueada, a trituração mecânica seguida de agitação (N5) garantiu a maior quantidade de ACYS extraída. Comparando-se com os melhores resultados de extração com fruta não branqueada (trituração mecânica e agitação: M5: $0,59 \pm 0,02$, para jabuticaba e S5: $0,82 \pm 0,06$ para refugo, conforme Tabela 8, página 46), branquear parece ser uma boa opção para aumentar a quantidade de ACYS extraída, exceto quando se usa simples imersão da fruta não macerada.

Os extratos de casca de jabuticaba não branqueada e branqueada permaneceram em monitoramento por 160 dias. Neste período de armazenamento, os extratos de fruta não branqueada não apresentaram redução na quantidade de ACYS, exceto na condição K4 com redução de 4 %. Para extratos de casca branqueada de jabuticaba, houve uma perda por degradação de 4% nas condições L4 e N5, de 3% na condição N4 e de 16% na L5. Mesmo com essa redução na quantidade de ACYS nos extratos de frutas branqueadas, a concentração de ACYS ainda foi maior em relação aos extratos de frutas não branqueadas, o que pode ser constatado a partir dos dados da Tabela 14.

Tabela 14. Valores de absorbância (A) em $\lambda_{\text{máx}} = 538 \text{ nm}$ para extratos de jabuticaba.

Dias	A (K4)	A (K5)	A (L4)	A (L5)	A (M4)	A (M5)	A (N4)	A (N5)
0*	$0,47 \pm 0,03$	$0,46 \pm 0,08$	$0,50 \pm 0,02$	$0,67 \pm 0,02$	$0,53 \pm 0,04$	$0,59 \pm 0,02$	$0,70 \pm 0,04$	$0,73 \pm 0,05$
160**	$0,45 \pm 0,04$	$0,46 \pm 0,07$	$0,48 \pm 0,01$	$0,56 \pm 0,03$	$0,53 \pm 0,07$	$0,59 \pm 0,06$	$0,68 \pm 0,07$	$0,7 \pm 0,1$

* valores após extração ** após 160 dias de armazenamento

Para extratos de cascas de refugo de jabuticaba não branqueada e branqueada os dados obtidos são de 60 dias de monitoramento. A redução na quantidade de ACYS nos extratos de frutas branqueadas (R4: 27 %, R5: 23 %, T4: 21 % e T5: 29 %) também foi maior se comparado à redução nos extratos de frutas não branqueadas (Q4: 16 %, Q5: 38 %, S4: 13 % e S5: 27 %). Assim como para os extratos de jabuticaba, a quantidade de ACYS em extratos de casca de refugo branqueada ainda é maior em relação aos extratos de frutas não branqueadas, mesmo tendo apresentado maior perda de ACYS. A Tabela 15 traz os resultados dos estudos realizados.

Tabela 15. Valores de absorbância (A) em $\lambda_{\text{máx}} = 538 \text{ nm}$ para extratos de refugo.

Dias	A (Q4)	A (Q5)	A (R4)	A (R5)	A (S4)	A (S5)	A (T4)	A (T5)
0*	0,45 ± 0,05	0,64 ± 0,07	0,60 ± 0,05	0,77 ± 0,07	0,80 ± 0,06	0,82 ± 0,06	0,8 ± 0,1	1,00 ± 0,04
60**	0,38 ± 0,03	0,4 ± 0,1	0,44 ± 0,02	0,59 ± 0,05	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,63 ± 0,06	0,71 ± 0,05

* valores após extração ** após 60 dias de armazenamento

4.2.1.2.2 Amora Preta (Estudos: V4; V5; X4; X5)

A extração sem agitação de amora preta macerada (V4), aumentou a quantidade de ACYS extraída, como mostra a Tabela 16. O uso de frutas branqueadas aumentou a quantidade de ACYS extraídas em todas as diferentes condições de extração quando comparado às mesmas condições de extração de frutas não branqueadas, como ilustram os dados das Tabelas 9 (página 47) e 16.

Tabela 16. Valores de absorbância (A) em $\lambda_{\text{máx}} = 539 \text{ nm}$ para extratos de amora preta branqueada.

Fruta	A	A	A	A
Amora Preta	2,57 ± 0,08 (V4)	1,84 ± 0,08 (V5)	2,015 ± 0,005 (X4)	2,115 ± 0,009 (X5)

Os extratos de amora preta não branqueada e branqueada permaneceram em monitoramento por 70 dias. Neste período de armazenamento, os extratos não apresentaram redução na quantidade de ACYS, exceto na condição V4 com redução de apenas 2 %. Nesse período não se notou um efeito favorável do branqueamento para aumentar a estabilidade dos extratos, mas a quantidade de ACYS extraída foi maior quando se fez uso

desse processo de esterilização das frutas em comparação à extração de frutas não branqueadas. A Tabela 17 traz os resultados dos estudos realizados.

Tabela 17. Valores de absorbância (A) em $\lambda_{\text{máx}} = 538 \text{ nm}$ para extratos de amora preta.

Dias	A (U4)	A (U5)	A (V4)	A (V5)	A (W4)	A (W5)	A (X4)	A (X5)
0*	0,90 ± 0,09	1,24 ± 0,06	2,57 ± 0,08	1,84 ± 0,08	1,84 ± 0,03	1,78 ± 0,03	2,015 ± 0,005	2,115 ± 0,009
70**	0,45 ± 0,04	0,46 ± 0,07	0,48 ± 0,01	0,56 ± 0,03	0,53 ± 0,07	0,59 ± 0,06	2,01 ± 0,03	2,11 ± 0,04

* valores após extração ** após 70 dias de armazenamento

4.2.1.2.3 Jambolão (Estudos: Z4; Z5; Z6; AB4; AB5; AB6)

Extratos mais concentrados de ACYS de jambolão branqueado ou não foram obtidos mediante aquecimento a 55 °C por 30 minutos em comparação com extração por imersão das frutas a 25 °C por 24 horas, como mostra a Tabela 18.

Tabela 18. Valores de absorbância (A) em $\lambda_{\text{máx}} = 538 \text{ nm}$ para extratos de jambolão branqueado.

Fruta	A	A	A	A	A	A
Jambolão	0,50 ± 0,02 (Z6)	0,60 ± 0,04 (AB6)	0,73 ± 0,06 (Z4)	0,83 ± 0,08 (Z5)	0,963 ± 0,009 (AB4)	1,03 ± 0,03 (AB5)

A melhor condição de extração foi aquecimento a 55 °C por 30 minutos, com agitação da fruta branqueada triturada (AB5), apresentada na Tabela 18. Assim foram obtidos extratos com 19 % mais ACYS em comparação com extratos obtidos com frutas não trituradas mantidas sem agitação (Z4) e 29 % a mais em relação aos extratos de frutas não trituradas mantida sob agitação (Z5). Já em comparação aos extratos de frutas branqueadas trituradas mantidas sem agitação (AB4), o aumento foi de 7 %.

A estabilidade de todos os extratos de frutas branqueadas foi monitorada por 150 dias e em nenhuma condição houve o aparecimento de fungos, assim como para todas as condições de extração a partir de frutas não branqueadas. Observou-se que os extratos de frutas branqueadas (Z6 e AB6) e não branqueadas (Y6 e AA6) submetidas à extração a 25 °C por 24 horas não apresentaram redução na quantidade de ACYS extraída após esse período de 150 dias de armazenamento (Tabela 19). Extratos de frutas branqueadas aquecidas a 55 °C, por 30 minutos (Z4, Z5, AB4, AB5) tiveram uma perda por degradação

em torno de 10 %, analogamente ao observado com extratos das frutas não branqueadas (Y4, Y5, AA4), exceto para a condição AA5, no qual a redução na quantidade de ACYS de 26 %. A Tabela 20 traz os resultados dos testes realizados.

Tabela 19. Valores de absorvância (A) em $\lambda_{\text{máx}} = 538 \text{ nm}$ para extratos de jambolão.

Dias	A (Y6)	A (Z6)	A (AA6)	A (AB6)
0*	0,52 ± 0,08	0,50 ± 0,02	0,55 ± 0,04	0,60 ± 0,04
150**	0,52 ± 0,06	0,5 ± 0,1	0,55 ± 0,08	0,60 ± 0,04

* valores após extração ** após 150 dias de armazenamento

Tabela 20. Valores de absorvância (A) em $\lambda_{\text{máx}} = 538 \text{ nm}$ para extratos de jambolão.

Dias	A (Y4)	A (Y5)	A (Z4)	A (Z5)	A (AA4)	A (AA5)	A (AB4)	A (AB5)
0*	0,71 ± 0,04	0,74 ± 0,05	0,73 ± 0,06	0,83 ± 0,08	1,28 ± 0,04	1,30 ± 0,06	0,963 ± 0,009	1,03 ± 0,03
150**	0,63 ± 0,04	0,65 ± 0,05	0,67 ± 0,03	0,73 ± 0,09	1,15 ± 0,04	0,96 ± 0,07	0,9 ± 0,1	0,91 ± 0,02

* valores após extração ** após 150 dias de armazenamento

4.2.2 Tindalização (Estudos: Y5; AA5)

A tindalização é uma proposta de simplificação do processo de esterilização eficiente para extratos de frutas^{60,73}, de uso comum em processos industriais que envolvem extratos vegetais de fontes diversas⁸².

Os extratos tindalizados tiveram sua estabilidade avaliada em termos de verificação da durabilidade, mediante o monitoramento da absorvância máxima dos extratos durante cerca de 150 dias. Os resultados obtidos nesse período encontram-se na Tabela 21.

Tabela 21. Valores de absorvância (A) em $\lambda_{\text{máx}} = 538 \text{ nm}$ para extratos tindalizados de jambolão.

A	Y5	AA5	Z5	AB5	Extratos tindalizados	
					Y5	AA5
A _i	0,74 ± 0,05	1,30 ± 0,06	0,83 ± 0,08	1,03 ± 0,03	1,2 ± 0,1	1,17 ± 0,07
A _f	0,66 ± 0,07	1,03 ± 0,03	0,73 ± 0,09	0,91 ± 0,02	0,92 ± 0,05	1,10 ± 0,08

A_i: Absorvância inicial dos extratos; A_f: Absorvância dos extratos após 150 dias.

Após 150 dias de armazenamento, os extratos tindalizados não apresentaram aparecimento de fungos, porém houve redução na quantidade de ACYS extraída de 23 % nos extratos de frutas maceradas (extratos tindalizados Y5) e de apenas 6 % nos extratos de frutas trituradas (extratos tindalizados AA5), como mostra a Tabela 21.

Os extratos tindalizados de frutas sem trituração (extratos tindalizados Y5) apresentaram maior redução na quantidade de ACYS (23 %) comparando-se com extratos sem esterilização obtidos nas mesmas condições (11 %) e com extratos de frutas branqueadas, condição Z5 (12 %). Já nos extratos tindalizados de frutas trituradas (extratos tindalizados AA5), a redução foi menor (6 %), comparativamente (extratos sem esterilização obtidos nas mesmas condições: AA5: redução de 21 %; e extratos de frutas branqueadas na condição AB5: redução de 12 %).

4.3 Estudos de Identificação de ACYS

4.3.1 Ajustes de condições de solubilização das pastas de ACYS

Para verificar a validade de uso do método de Goiffon¹⁰⁴ para identificar ACYS individuais de extratos de frutas por HPLC, em comparação com o uso de padrões (de difícil acesso e alto custo) na análise cromatográfica, realizaram-se estudos de solubilização das pastas de ACYS em busca da melhor resolução dos picos referentes às ACYS presentes nesses extratos vegetais. Os cromatogramas estão apresentados nas Figuras de 18 a 21^E.

^E Todos os cromatogramas apresentam picos sobrepostos, pois a detecção da corrida cromatográfica foi realizada em dois comprimentos de onda diferentes.

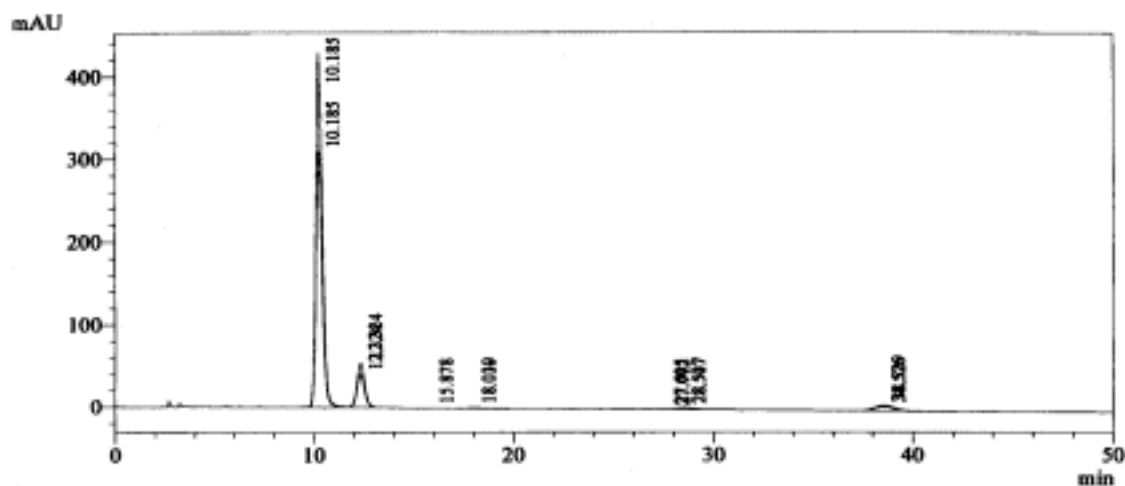


Figura 18. Cromatograma da pasta de ACYS de amora preta 32 g L⁻¹, em água com 0,1 % v/v de HCl, sem purificação. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 v/v/v; volume de injeção 20 µL e detecção em 525 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.

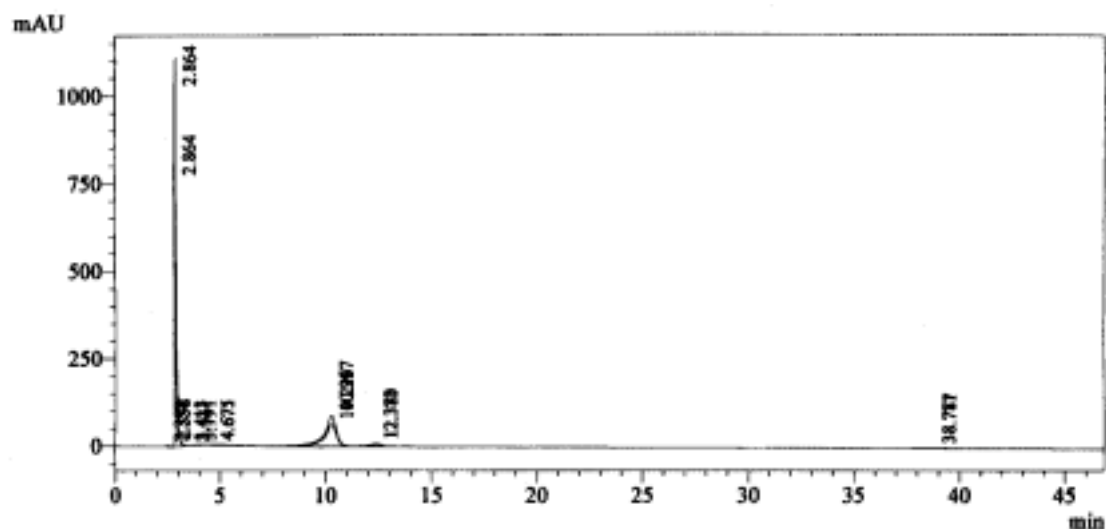


Figura 19. Cromatograma da pasta de ACYS de amora preta 12 g L⁻¹, em etanol com 0,1 % de HCl v/v, sem purificação. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 v/v/v; volume de injeção 20 µL e detecção em 525 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.

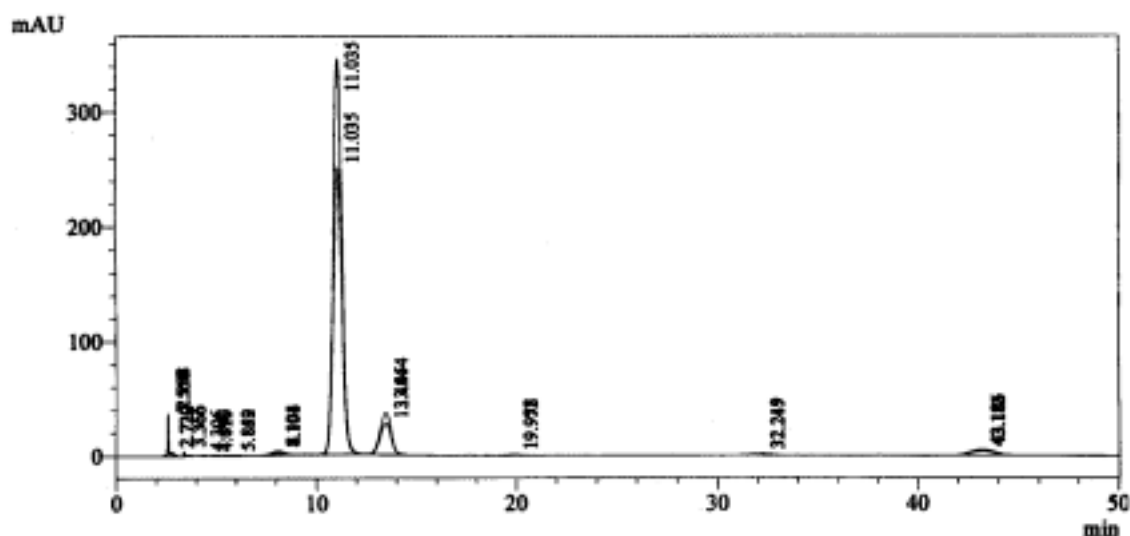


Figura 20. Cromatograma da pasta de ACYS de amora preta 24 g L⁻¹, em água, após purificação com SPE detalhada na página 37. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 v/v/v; volume de injeção 20 µL e detecção em 525 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.

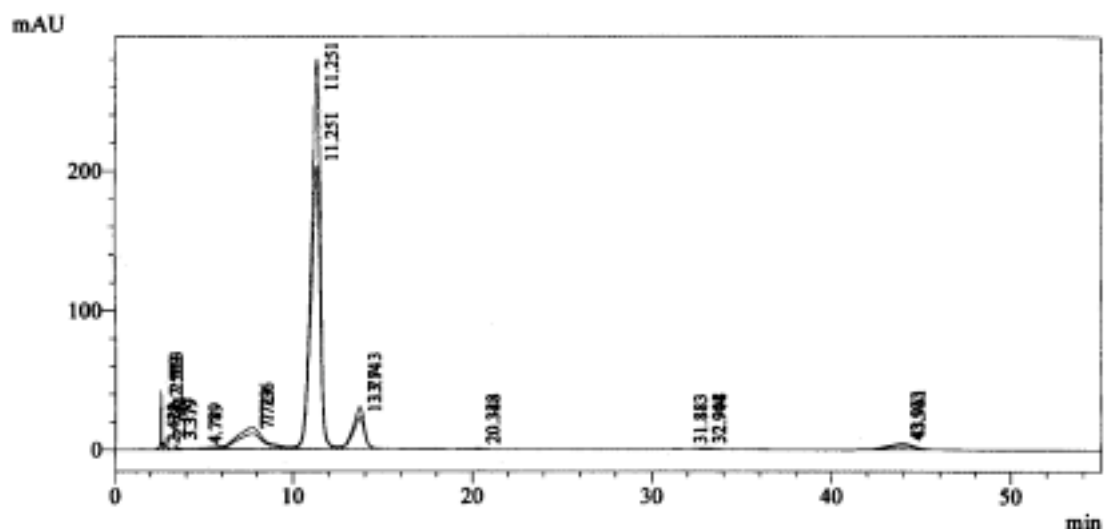


Figura 21. Cromatograma da pasta de ACYS de amora preta 24 g L⁻¹, em metanol com 0,1 % de HCl v/v, sem purificação. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 v/v/v; volume de injeção 20 µL e detecção em 525 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.

Comparando-se os cromatogramas das Figuras 18 a 21, notou-se resolução adequada dos picos obtidos a partir da injeção direta de soluções das pastas de ACYS em metanol com 0,1% de HCl v/v, sem necessidade de purificação. Pode-se considerar que o metanol apresenta ligações de hidrogênio menos extensivas que a água, o que deve permitir

interações mais efetivas do metanol com ACYS, favorecendo sua solvatação. O meio ácido, com concentração final 0,1 % v/v de HCl, contribui para garantir a predominância do cátion flavílico¹⁰⁰, sem levar à hidrólise ácida que prejudicaria os resultados.

A purificação do extrato por SPE foi eficiente, como indica a Figura 20, mas cromatogramas com resolução semelhantes foram obtidos a partir da injeção direta das soluções de pastas de ACYS em metanol com HCl sem purificação¹²³ (Figura 21). Essa verificação confirma o que é proposto no protocolo de identificação das ACYS¹⁰⁰, que dispensa a purificação prévia por SPE para a maioria dos casos. Entretanto, para amostras com pigmentos degradados ou polimerizados devido a problemas na extração ou longos períodos de armazenamento, a melhor resolução cromatográfica requer a purificação por SPE¹⁰⁰. Além disso, materiais que contêm ACYS aciladas (por exemplo, uvas), onde ácidos orgânicos são ligados às unidades glicosídicas das ACYS por ligação éster, e amostras altamente complexas podem também ser beneficiadas pela purificação por SPE com C18¹²⁸. Este não foi o caso dos extratos das frutas estudadas, conforme literatura consultada^{20,50,88,103,124,128}.

Com as condições otimizadas de solubilização das pastas de ACYS, em metanol com 0,01 % de HCl, foi possível obter cromatogramas para aplicar o método de Goiffon¹⁰⁴.

4.3.2 Método de Goiffon

Como descrito anteriormente, o Método de Goiffon¹⁰⁴ relaciona o tempo de retenção das ACYS dos cromatogramas dos extratos das frutas com o tempo de retenção da cianidina-3-glicosídeo (quanto presente), mediante o cálculo de α , que se relaciona com o fator de separação dos diferentes compostos. A partir dos tempos de retenção obtidos nos cromatogramas apresentados nas Figuras 22 a 37, fez-se a relação empírica entre o tempo de retenção (t_R) das ACYS presentes nesses extratos de frutas com o t_R da cianidina-3-glicosídeo, presente em todos os extratos, como propõe o método de Goiffon¹⁰⁴, de acordo com a equação 1:

$$\alpha = \frac{t_R'}{t_{R(\text{cianidina-3-glicosídeo})}'} \quad \text{Equação 1}$$

onde: $t_R' = t_R - t_0$, t_R = tempo de retenção do composto, t_0 = tempo de retenção de um composto não retido.

A comparação de $\alpha_{\text{calculado}}$ com α_{tabelado} pelos autores permite identificar a ACYS presente. As Figuras 22 a 37 trazem os cromatogramas obtidos a partir dos diferentes extratos de frutas (nas melhores condições de extração). As Tabelas 22 a 26 apresentam os valores de $\alpha_{\text{calculado}}$ e α_{tabelado} , além das médias dos valores da área (%) dos picos correspondentes para identificação das ACYS. Vale salientar que, de acordo com a literatura pesquisada, picos com valores de área inferiores a 1 % não são considerados^{100,104}.

4.3.2.1 Jabuticaba (Estudos: L5; N5)

Foram utilizadas ACYS de extratos de jabuticaba obtidos em 2 condições de extração: frutas sem trituração mecânica (L5) e com trituração mecânica (N5), para verificar se diferentes ACYS seriam extraídas. As Figuras 22 e 23 ilustram os cromatogramas obtidos cujos dados foram usados para montar a Tabela 22 que traz a identificação das ACYS pelo Método de Goiffon.

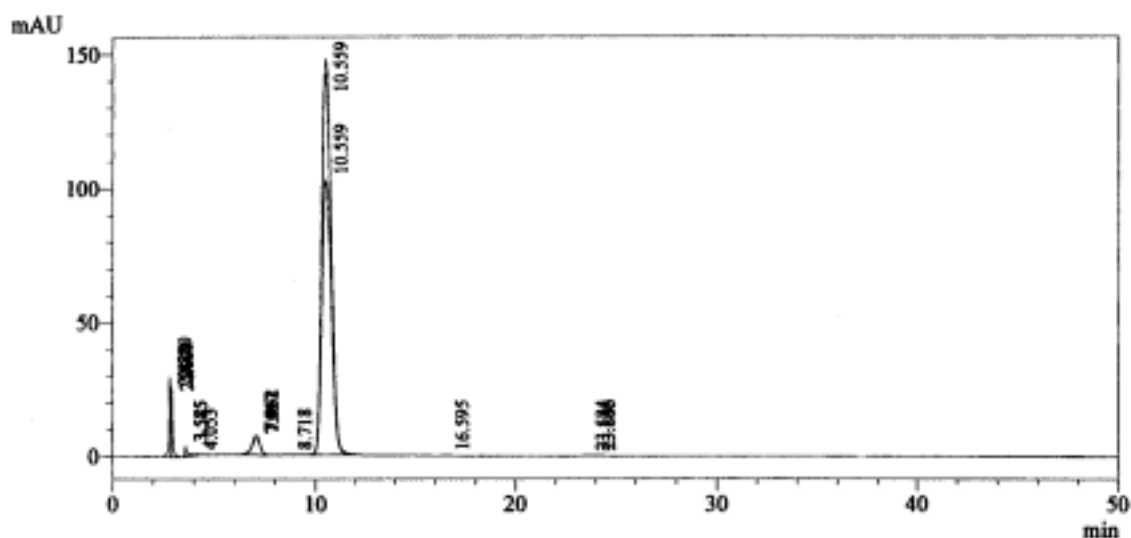


Figura 22. Cromatograma da pasta de ACYS de jabuticaba 17 g L⁻¹, em metanol com 0,01 % de HCl v/v, sem purificação (Estudo: L5). Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 v/v/v; volume de injeção 20 µL e detecção em 525 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.

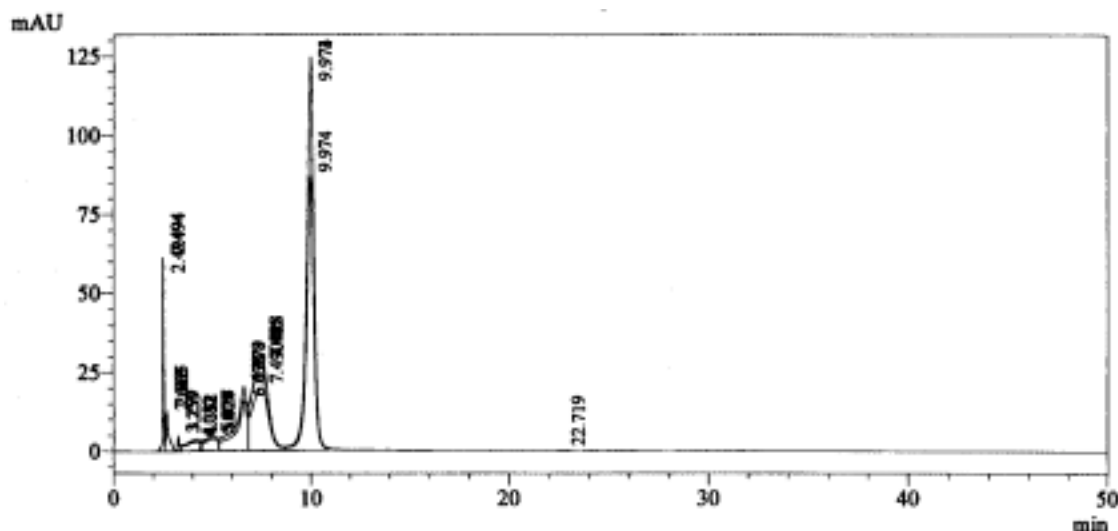


Figura 23. Cromatograma da pasta de ACYS de jaboticaba 16 g L^{-1} , em metanol com 0,01 % de HCl v/v, sem purificação (Estudo: N5). Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 v/v/v; volume de injeção $20 \mu\text{L}$ e detecção em 525 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.

Tabela 22. ACYS de extratos de jaboticaba.

Antocianina	α_{tabelado}	$\alpha_{\text{calculado}}$	A_1 (%) L5	A_2 (%) N5
Cianidina-3-sambubiose-5-glicosídeo	0,37	$0,33 \pm 0,01$	—	$3,5 \pm 0,2^*$
Cianidina-3-glicosídeo	1,00	1,00	90 ± 3	$49,9 \pm 0,3$
Malvidina-3-galactosídeo	2,79	$2,71 \pm 0,02$	**	**

A_1 e A_2 : áreas médias dos picos dos extratos de frutas sem e com trituração mecânica (L5 e N5), respectivamente

* ACYS apenas em extratos com trituração mecânica (N5); ** Área inferior a 1 %, porém presente em todos os extratos

A trituração mecânica das cascas de jaboticaba provavelmente causou alterações nas células das frutas e conseqüentemente um maior número de compostos pode ter sido extraído, aumentando a possibilidade de reações que inclusive podem levar às outras ACYS.

A literatura consultada aponta que as ACYS mais comuns em extratos de frutas com características próximas às da jaboticaba (como a *elderberry* e *black currant*) são as ACYS de cianidinas^{10,104,128}. Isso pode ser verificado nos extratos analisados, pois os dados da Tabela 22, indicam que, independentemente das condições de extração, as cianidinas foram identificadas com picos de maior área.

4.3.2.2 Refugo de Jabuticaba (Estudos: R5; T5)

Analogamente aos extratos de jabuticaba, os extratos de refugo de jabuticaba obtidos em 2 condições diferentes foram comparados (R5 e T5). As Figuras 24 e 25 ilustram os cromatogramas obtidos cujos dados serviram para montar a Tabela 23 que traz a identificação de cianidina3-glicosídeo como única ACYS presente, de acordo com o Método de Goiffon. Possivelmente, características de envelhecimento das cascas já deterioradas promoveram reações com outros compostos que degradaram outras ACYS.

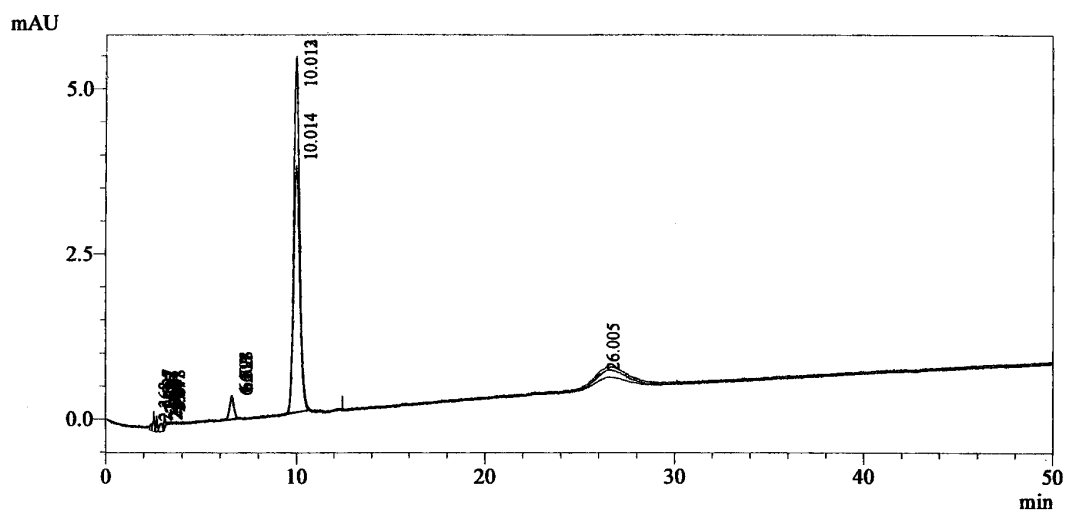


Figura 24. Cromatograma da pasta de ACYS de refugo de jabuticaba 14 g L^{-1} , em metanol com 0,01 % de HCl v/v, sem purificação (Estudo: R5). Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 v/v/v; volume de injeção $20 \mu\text{L}$ e detecção em 525 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.

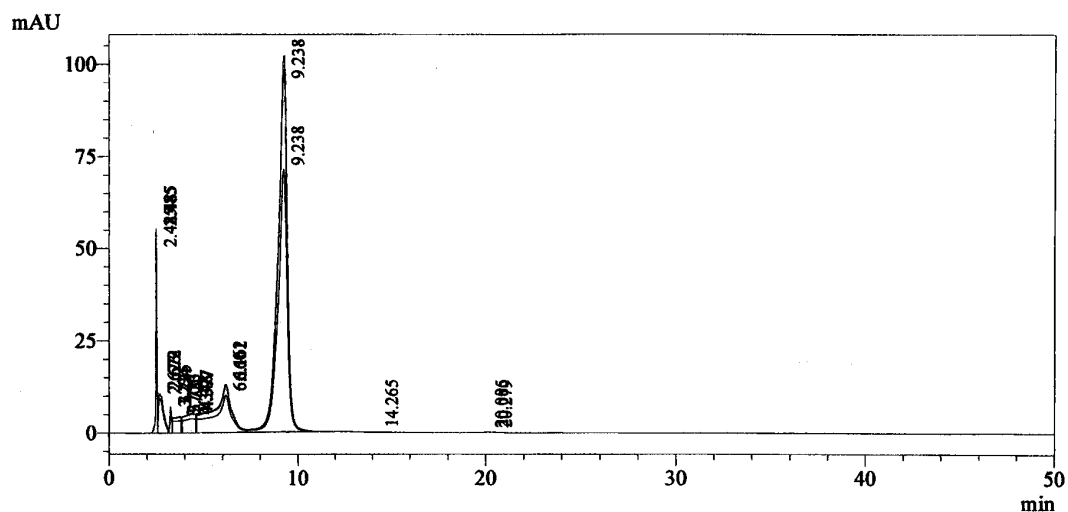


Figura 25. Cromatograma da pasta de ACYS de refugo de jabuticaba 18 g L^{-1} , em metanol com 0,01 % de HCl v/v, sem purificação (Estudo: T5). Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 v/v/v; volume de injeção $20 \mu\text{L}$ e detecção em 525 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.

Tabela 23. ACYS de extratos de refugo.

Antocianina	α_{tabelado}	$\alpha_{\text{calculado}}$	A_1 (%) R5	A_2 (%) T5
Cianidina-3-glicosídeo	1,00	1,00	91 ± 1	79 ± 13

A_1 e A_2 : áreas médias dos picos dos extratos de frutas sem e com trituração mecânica (**R5** e **T5**), respectivamente

4.3.2.3 Amora (Estudos: O4; P4)

Nos extratos de amora, identificaram-se ACYS em extratos obtidos a partir de 2 condições diferentes de extração: frutas não branqueadas (O4) e branqueadas (P4). As Figuras 26 e 27 apresentam os cromatogramas cujos dados foram usados para montar a Tabela 24 que traz a identificação das ACYS pelo Método de Goiffon.

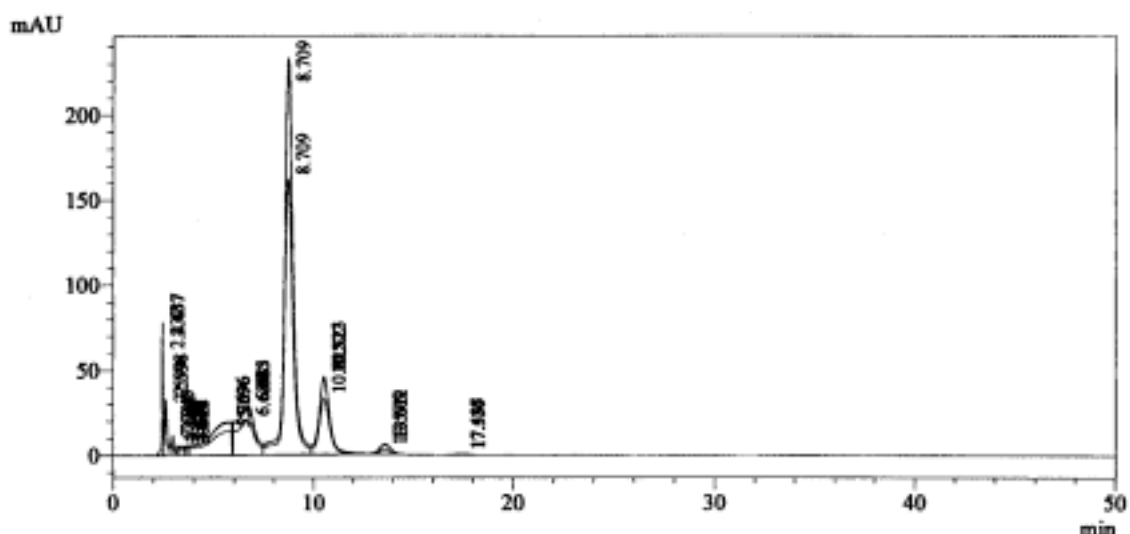


Figura 26. Cromatograma da pasta de ACYS de amora 16 g L^{-1} , em metanol com 0,01 % de HCl v/v, sem purificação (Estudo: O4). Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 v/v/v; volume de injeção $20 \mu\text{L}$ e detecção em 525 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.

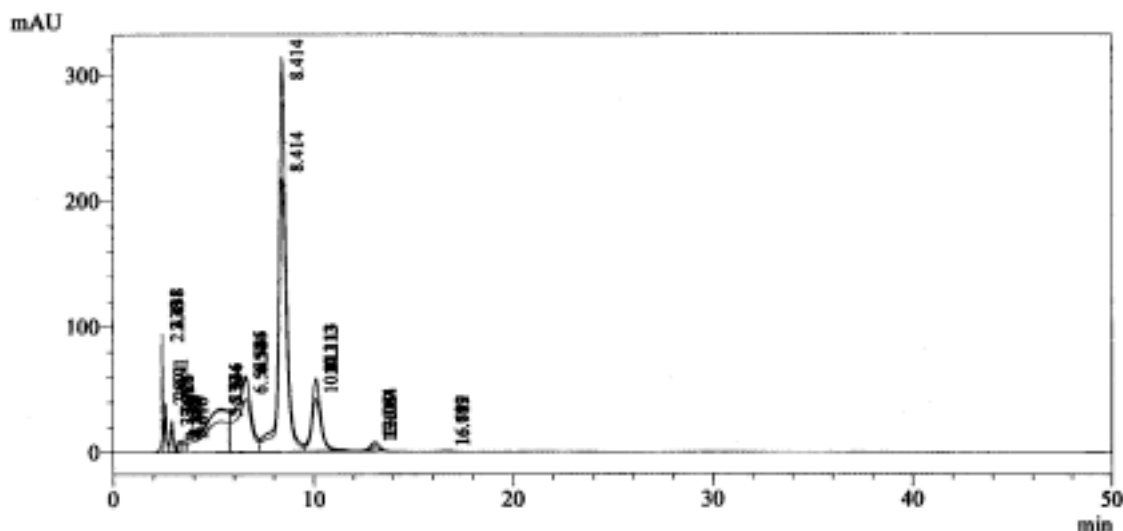


Figura 27. Cromatograma da pasta de ACYS de amora 12 g L^{-1} , em metanol com 0,01 % de HCl v/v, sem purificação (Estudo: P4). Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 v/v/v; volume de injeção $20 \mu\text{L}$ e detecção em 525 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.

Tabela 24. ACYS de extratos de amora.

Antocianina	α_{tabelado}	$\alpha_{\text{calculado}}$	A_1 (%) O4	A_2 (%) P4
Delfinidina-3-galactosídeo	0,46	$0,49 \pm 0,02$	—	$5,2 \pm 0,3^*$
Cianidina-3-glicosídeo	1,00	1,00	58 ± 10	$48,0 \pm 0,9$
Cianidina-3-rutinosídeo ^{***}	1,29	$1,29 \pm 0,01$	$12,9 \pm 0,9$	$11,3 \pm 0,9$
Pelargonidina-3-galactosídeo ^{***}	1,29	$1,29 \pm 0,01$	$12,9 \pm 0,9$	$11,3 \pm 0,9$
Pelargonidina-3-glicosídeo	1,66	$1,79 \pm 0,01$	$1,7 \pm 0,4$	$1,3 \pm 0,2$
Pelargonidina-3-arabinosídeo	2,27	$2,40 \pm 0,01$	$0,23 \pm 0,04^{**}$	$0,16 \pm 0,01^{**}$

A_1 e A_2 : áreas médias dos picos dos extratos de frutas não branqueadas e branqueadas (O4 e P4), respectivamente

* ACYS apenas em extratos de frutas branqueadas (P4); ** Área inferior a 1%, porém presente em todos os extratos

*** ACYS com mesmo α_{tabelado}

Nos cromatogramas dos extratos de frutas branqueadas (P4), observou-se apenas um pico, provavelmente referente à delfinidina-3-galactosídeo. Pode-se cogitar que a exposição das frutas a alta temperatura, ainda que por curto período na etapa o branqueamento tenha favorecido reações entre outros os compostos presentes na fruta, podendo levar à formação de outras ACYS.

ACYS mais comuns em amora, segundo a literatura, são os glicosídeos de cianidinas^{10,104,128}, e os resultados obtidos sugerem coerência na identificação das 2 principais ACYS nos extratos, conforme indicada pela Tabela 24.

Segundo o Método de Goiffon, 2 ACYS diferentes seriam identificadas com o mesmo valor de $\alpha_{\text{tabelado}} = 1,29$. Isto gerou a necessidade de confirmação de sua identidade por outro método ou técnica, apontando um aspecto problemático deste método. Neste trabalho a confirmação dessa identificação foi realizada por HPLC-ESI-Q-TOF-MS, cujo resultado é discutido na página 76.

4.3.2.3 Amora Preta (Estudos: U4; V4)

ACYS de extratos de amora preta foram obtidas a partir das 2 condições diferentes de extração, assim como para a amora, tendo sido utilizadas, frutas não branqueadas e branqueadas (U4 e V4). As Figuras 28 e 29 ilustram os cromatogramas obtidos dos extratos cujos dados foram usados para montar a Tabela 25 que traz a identificação das ACYS pelo Método de Goiffon.

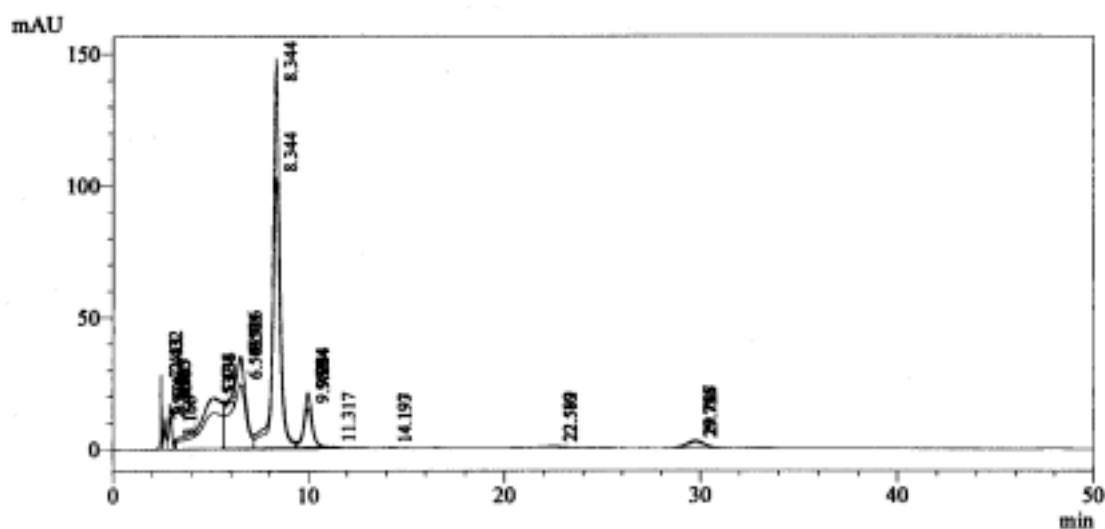


Figura 28. Cromatograma da pasta de ACYS de amora preta 12 g L⁻¹, em metanol com 0,01 % de HCl v/v, sem purificação (Estudo: U4). Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 v/v/v; volume de injeção 20 µL e detecção em 525 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.

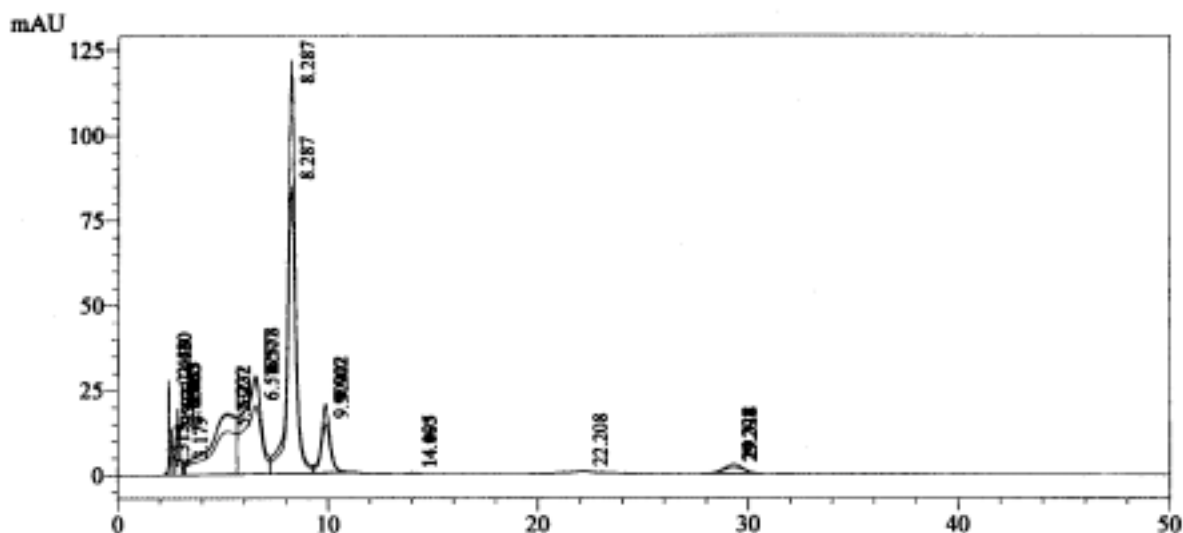


Figura 29. Cromatograma da pasta de ACYS de amora preta 16 g L⁻¹, em metanol com 0,01 % de HCl v/v, sem purificação (Estudo: V4). Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 v/v/v; volume de injeção 20 µL e detecção em 525 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.

Tabela 25. ACYS de extratos de amora preta.

Antocianina ou Antocianidina	α_{tabelado}	$\alpha_{\text{calculado}}$	A ₁ (%) U4	A ₂ (%) V4
Delfinidina-3-galactosídeo	0,46	0,47 ± 0,01	19,1 ± 0,4	16 ± 10
Cianidina-3-glicosídeo	1,00	1,00	46 ± 1	48 ± 13
Cianidina-3-rutinosídeo**	1,29	1,277 ± 0,003	7,9 ± 0,7	7,8 ± 0,6
Pelargonidina-3-galactosídeo**	1,29	1,277 ± 0,003	7,9 ± 0,7	7,8 ± 0,6
Cianidina***	4,45	4,58 ± 0,04	1,9 ± 0,7	2,6 ± 0,8

A₁ e A₂: áreas médias dos picos dos extratos de frutas não branqueadas e branqueadas (U4 e V4), respectivamente.

** ACYS com mesmo α_{tabelado} .

*** produto da hidrólise da ACYS

Da mesma forma que para a amora, as principais ACYS em amora preta, segundo a literatura são glicosídeos de cianidinas^{10,104,128}, o que está de acordo com os resultados apresentados na Tabela 25. Encontrou-se a mesma dificuldade para identificar as ACYS dos extratos de amora, já que 2 ACYS podem ter o mesmo valor de α_{tabelado} . A confirmação dessa identificação foi realizada por HPLC-ESI-Q-TOF-MS, cujo resultado é discutido na página 94.

4.3.2.4 Jambolão (Estudos: Y4; Y5; Z4; Z5; AA4; AA5; AB4; AB5)

Foram identificadas ACYS de extratos de jambolão, obtidos em 8 condições de extração e as Figuras de 30 a 37 ilustram os cromatogramas obtidos dos extratos. Com esses dados foi montada a Tabela 26 que traz a identificação das ACYS pelo Método de Goiffon. Em todos os extratos de jambolão foram identificadas as mesmas ACYS, independente das condições de extração.

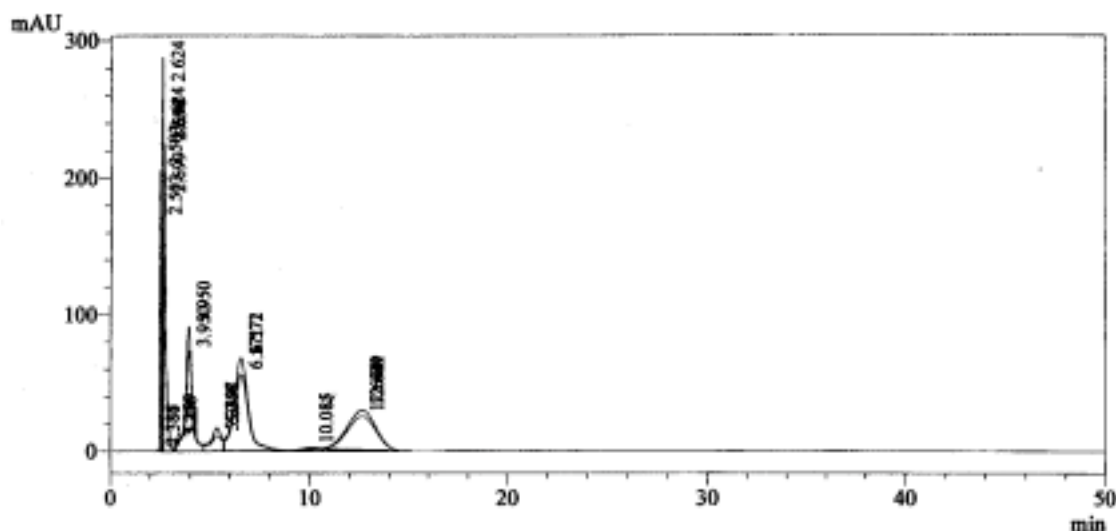


Figura 30. Cromatograma da pasta de ACYS de jambolão 16 g L^{-1} , em metanol com 0,01 % de HCl v/v, sem purificação (Estudo: Y4). Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 v/v/v; volume de injeção $20 \mu\text{L}$ e detecção em 525 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.

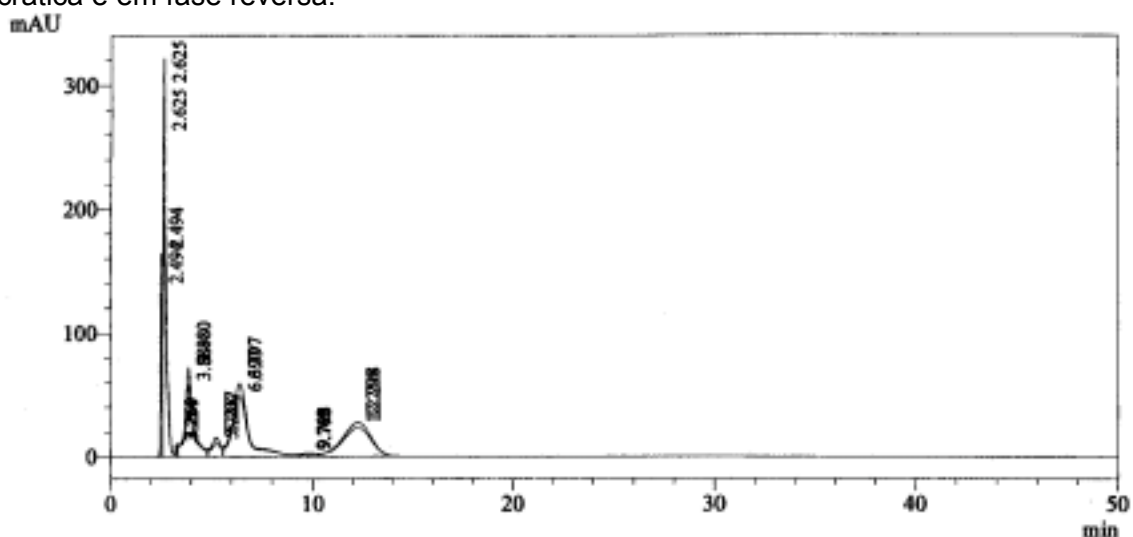


Figura 31. Cromatograma da pasta de ACYS de jambolão 15 g L^{-1} , em metanol com 0,01 % de HCl v/v, sem purificação (Estudo: Y5). Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 v/v/v; volume de injeção $20 \mu\text{L}$ e detecção em 525 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.

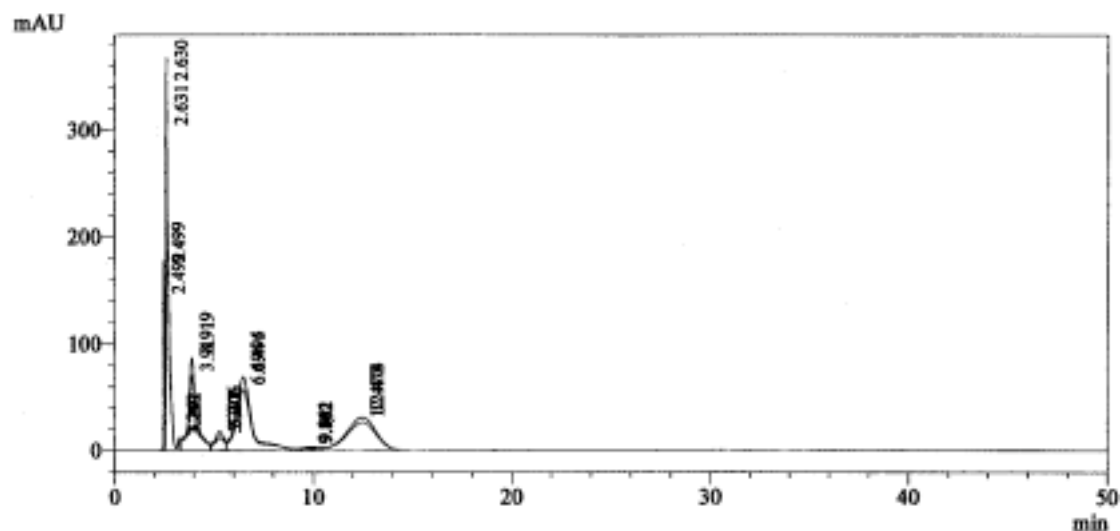


Figura 32. Cromatograma da pasta de ACYS de jambolão 19 g L^{-1} , em metanol com 0,01 % de HCl v/v, sem purificação (Estudo: AA4). Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 v/v/v; volume de injeção $20 \mu\text{L}$ e detecção em 525 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.

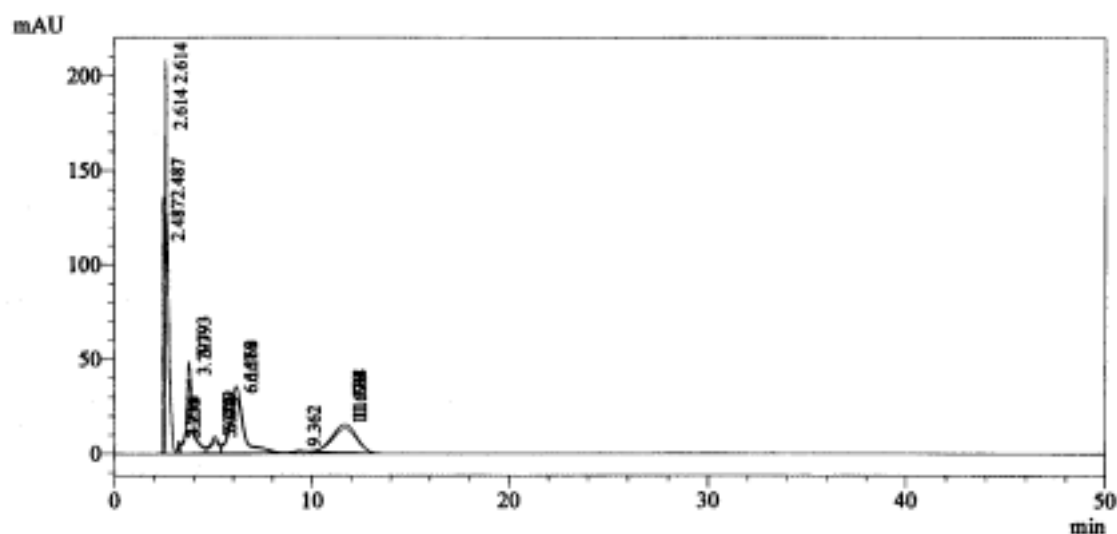


Figura 33. Cromatograma da pasta de ACYS de jambolão 13 g L^{-1} , em metanol com 0,01 % de HCl v/v, sem purificação (Estudo: AA5). Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 v/v/v; volume de injeção $20 \mu\text{L}$ e detecção em 525 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.

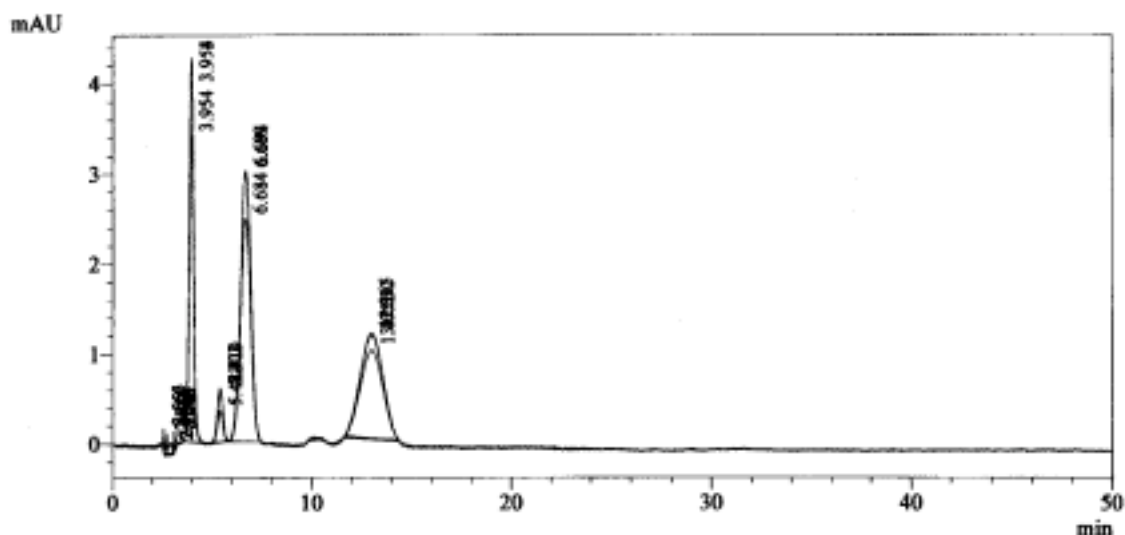


Figura 34. Cromatograma da pasta de ACYS de jambolão 14 g L⁻¹, em metanol com 0,01 % de HCl v/v, sem purificação (Estudo: Z4). Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 v/v/v; volume de injeção 20 µL e detecção em 525 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.

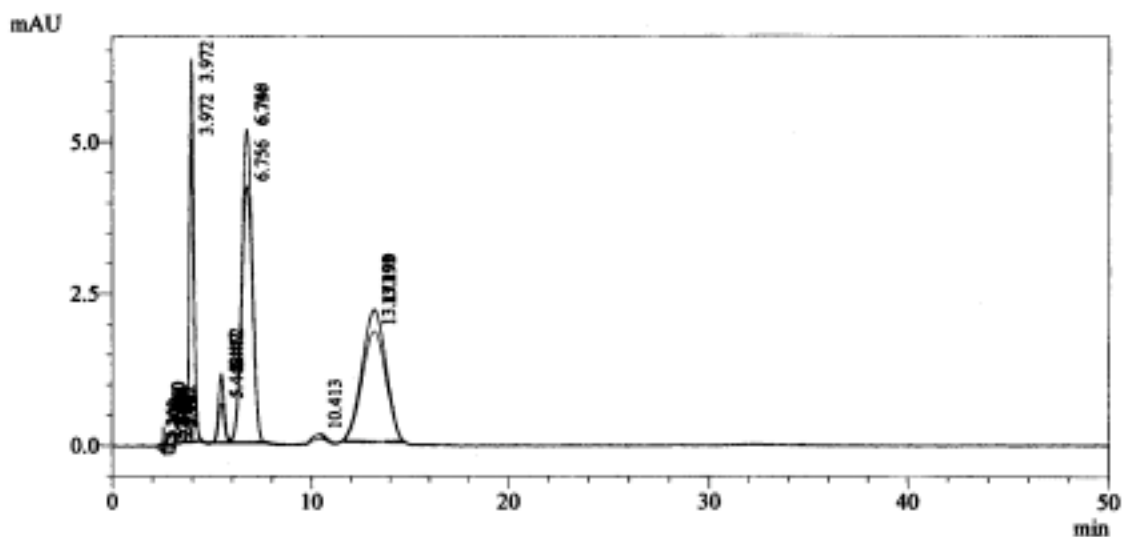


Figura 35. Cromatograma da pasta de ACYS de jambolão 15 g L⁻¹, em metanol com 0,01 % de HCl v/v, sem purificação (Estudo: Z5). Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 v/v/v; volume de injeção 20 µL e detecção em 525 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.

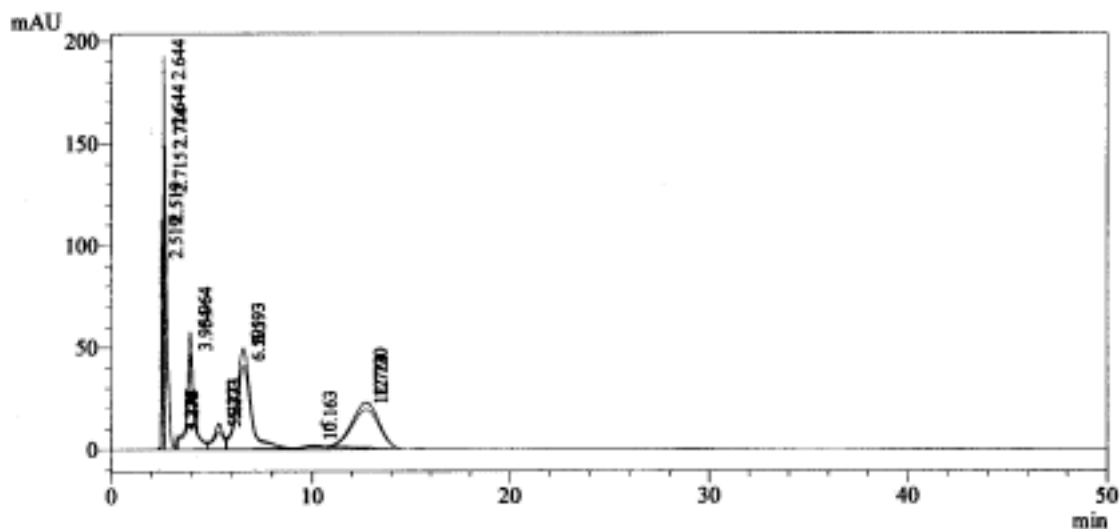


Figura 36. Cromatograma da pasta de ACYS de jambolão 15 g L^{-1} , em metanol com 0,01 % de HCl v/v, sem purificação (Estudo: AB4). Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 v/v/v; volume de injeção $20 \mu\text{L}$ e detecção em 525 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.

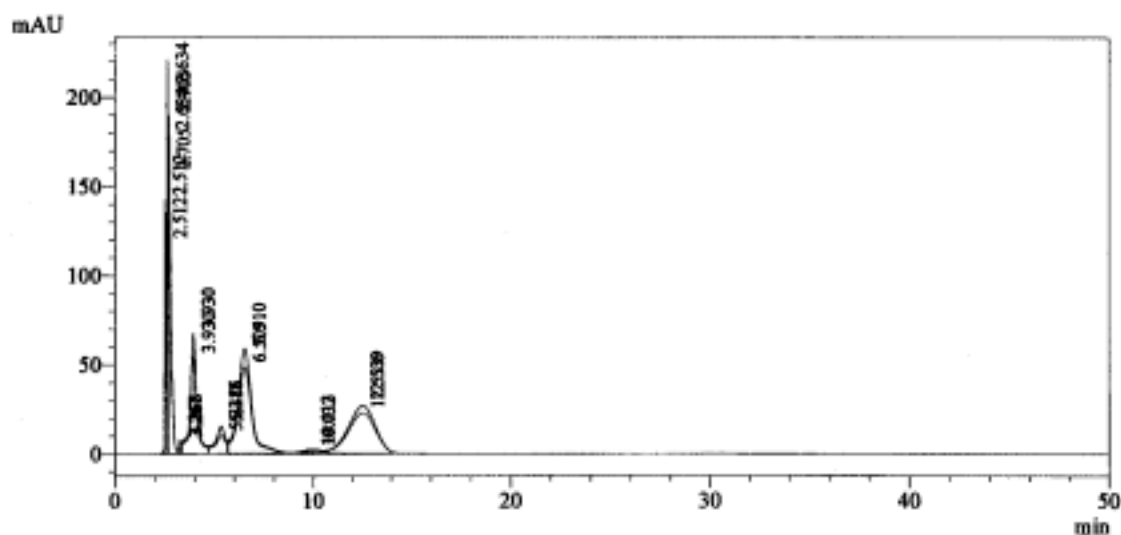


Figura 37. Cromatograma da pasta de ACYS de jambolão 20 g L^{-1} , em metanol com 0,01 % de HCl v/v, sem purificação (Estudo: AB5). Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 v/v/v; volume de injeção $20 \mu\text{L}$ e detecção em 525 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.

Tabela 26. ACYS de extratos de jambolão.

Antocianina	α_{tabelado}	$\alpha_{\text{calculado}}$	A₁ (%) Y4, Y5, AA4, AA5	A₂ (%) Z4, Z5, AB4, AB5
Delfinidina-3-rutinosídeo*	0,71	0,74 ± 0,01	0,9 ± 0,4	0,9 ± 0,4
Cianidina-3-galactosídeo*	0,77	0,74 ± 0,01	0,9 ± 0,4	0,9 ± 0,4
Cianidina-3-glicosídeo	1,00	1,00	23 ± 4	31 ± 5

A₁ e **A₂**: áreas médias dos picos dos extratos de frutas não branqueadas (**Y4, Y5, AA4, AA5**) e branqueadas (**Z4, Z5, AB4, AB5**), respectivamente

* ACYS com mesmo $\alpha_{\text{calculado}}$, porém com 2 possíveis α_{tabelado}

Em 2 trabalhos da literatura^{41,42} sobre identificação de ACYS em jambolão da mesma espécie (*Eugenia jambolana* Lam), foram encontradas diferentes ACYS. Em um dos estudos⁴¹ foram encontradas: delfinidina-3-gentibiosídeo, petunidina-3-gentibiosídeo e malvidina-3-laminaribiosídeo. Em outro trabalho⁴², encontrou-se apenas cianidina-3-glicosídeo presente em seus extratos. Isso pode ocorrer devido a diferenças de culturas, origens geográficas e condições ambientais, como solo, luz e temperatura, que podem modificar o conjunto de ACYS presentes na fruta.

Outra dificuldade na aplicação do método de Goiffon para identificar ACYS dos extratos de jambolão foi concluir qual ACYS estaria presente nesses extratos a partir do valor de $\alpha_{\text{calculado}} = 0,74$, já que não se encontra este valor tabelado, que é intermediário entre α_{tabelado} com valores de 0,71 e 0,77, atribuídos a 2 ACYS diferentes.

4.3.3 Testes com Padrões de ACYS

Para obter os tempos de retenção característicos de algumas ACYS, foram obtidos cromatogramas de soluções de 8 padrões comerciais, conforme descrito em 3.3.4.3. Esses cromatogramas estão apresentados nas Figuras de 38 a 45 e os respectivos valores de t_R são listados na Tabela 27.

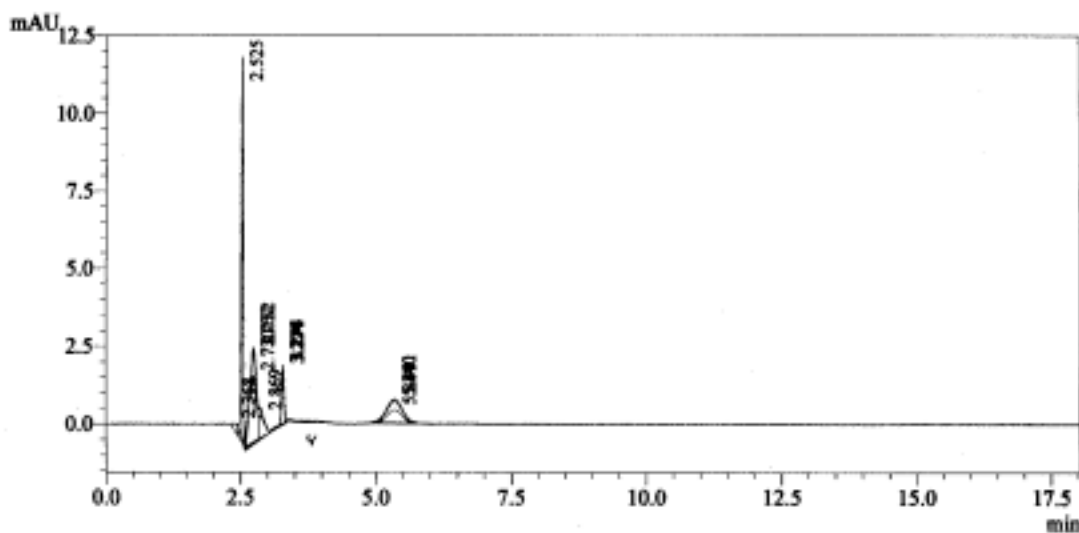


Figura 38. Cromatograma de solução de cloreto de pelargonidina, em metanol com 0,01 % de HCl v/v. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 v/v/v; volume de injeção 20 μ L e detecção em 525 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.

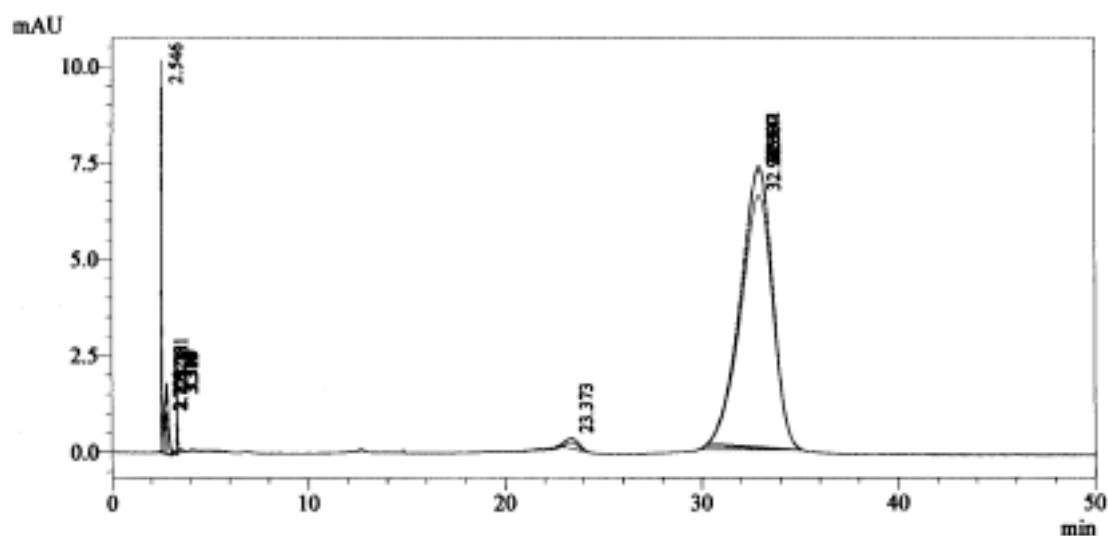


Figura 39. Cromatograma de solução de cloreto de malvidina-3-glicosídeo, em metanol com 0,01 % de HCl v/v. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 v/v/v; volume de injeção 20 μ L e detecção em 525 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.

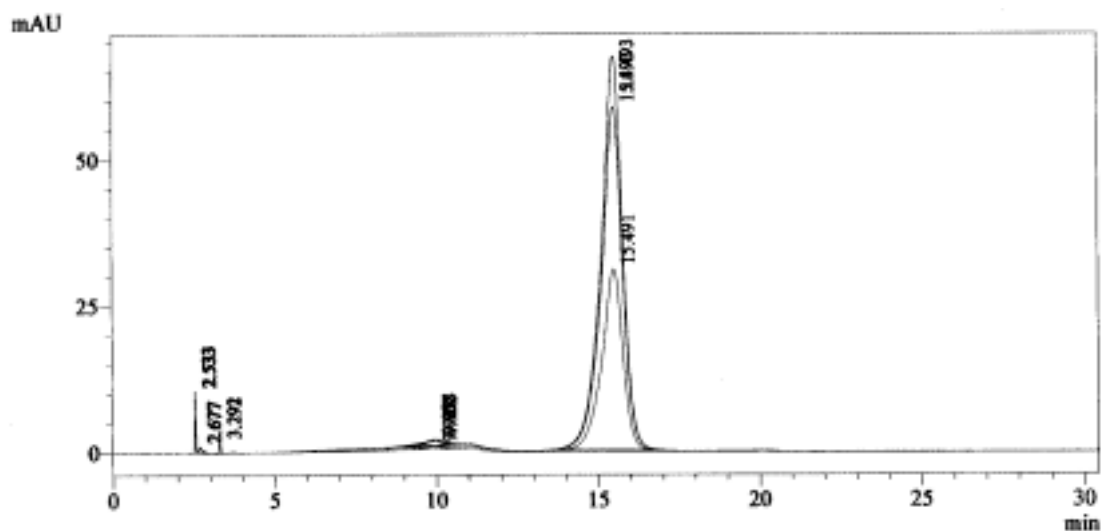


Figura 40. Cromatograma de solução de cloreto de pelargonidina-3-glicosídeo, em metanol com 0,01 % de HCl v/v. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 v/v/v; volume de injeção 20 μ L e detecção em 525 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.

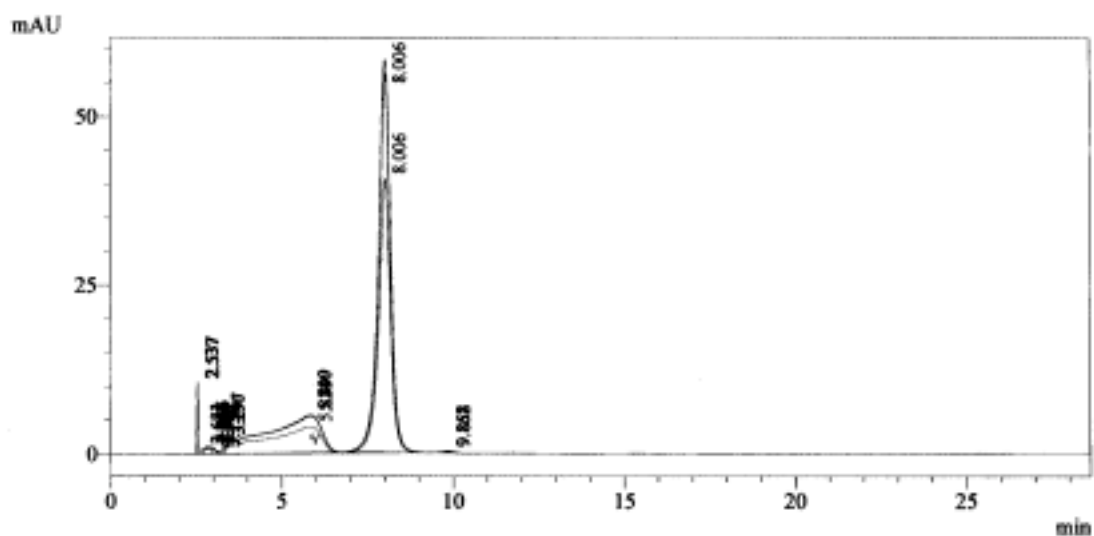


Figura 41. Cromatograma de solução de cloreto de cianidina-3-galactosídeo, em metanol com 0,01 % de HCl v/v. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 v/v/v; volume de injeção 20 μ L e detecção em 525 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.

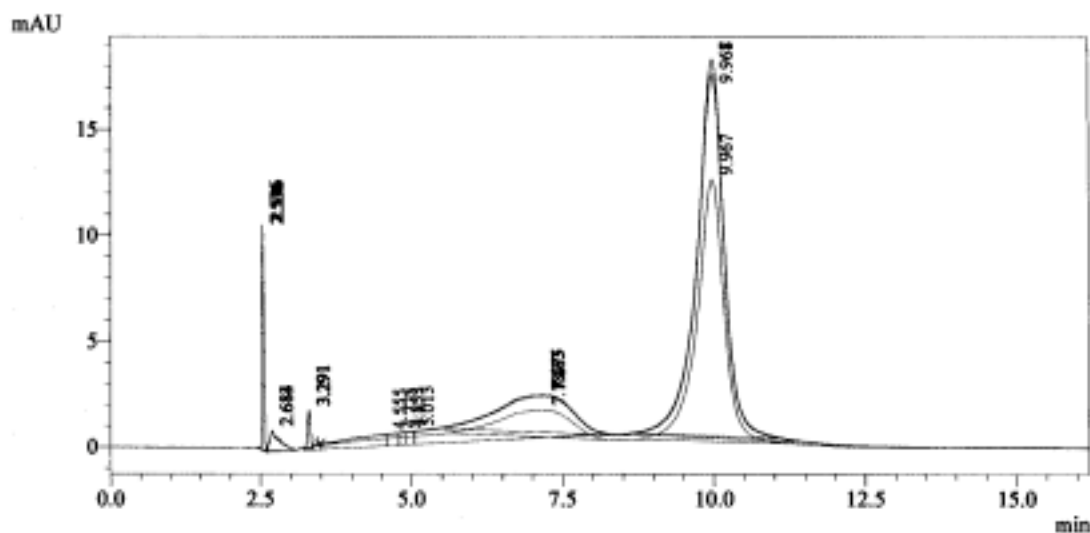


Figura 42. Cromatograma de solução de cloreto de cianidina-3-glicosídeo, em metanol com 0,01 % de HCl v/v. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 v/v/v; volume de injeção 20 μ L e detecção em 525 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.

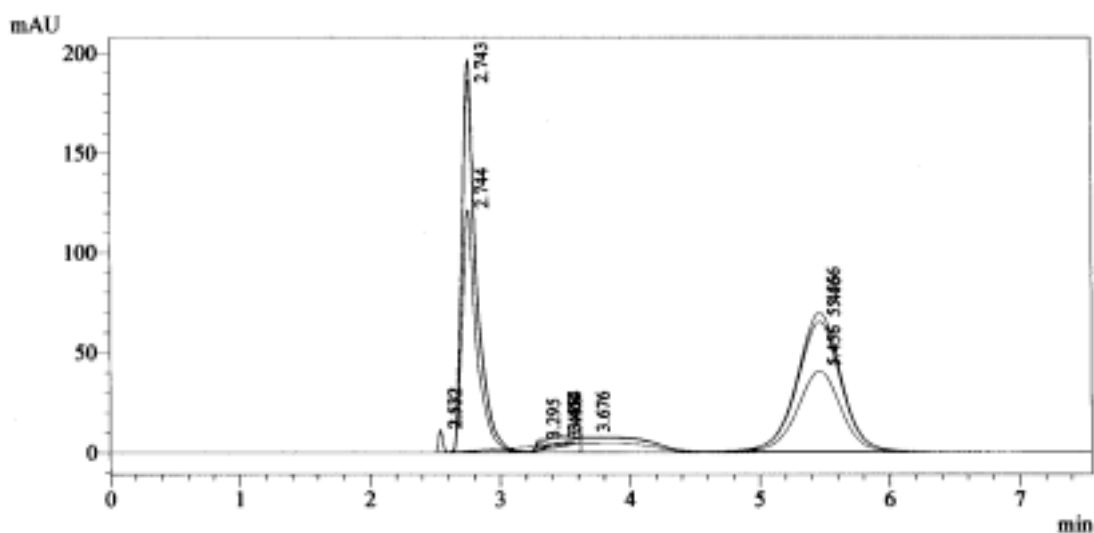


Figura 43. Cromatograma de solução de cloreto de cianidina-3,5-diglicosídeo, em metanol com 0,01 % de HCl v/v. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 v/v/v; volume de injeção 20 μ L e detecção em 525 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.

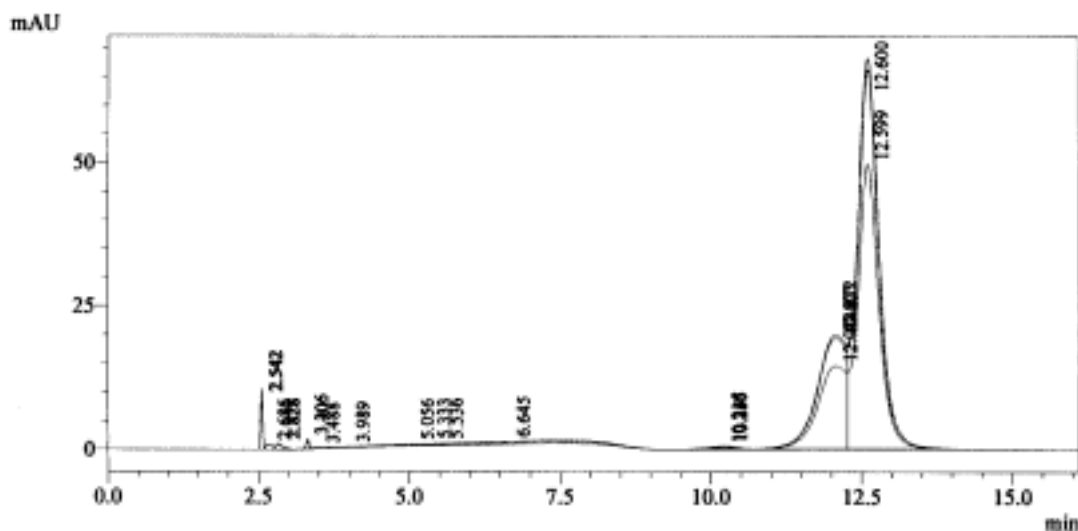


Figura 44. Cromatograma de solução de cloreto de cianidina-3-rutinosídeo, em metanol com 0,01 % de HCl v/v. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 v/v/v; volume de injeção 20 μ L e detecção em 525 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.

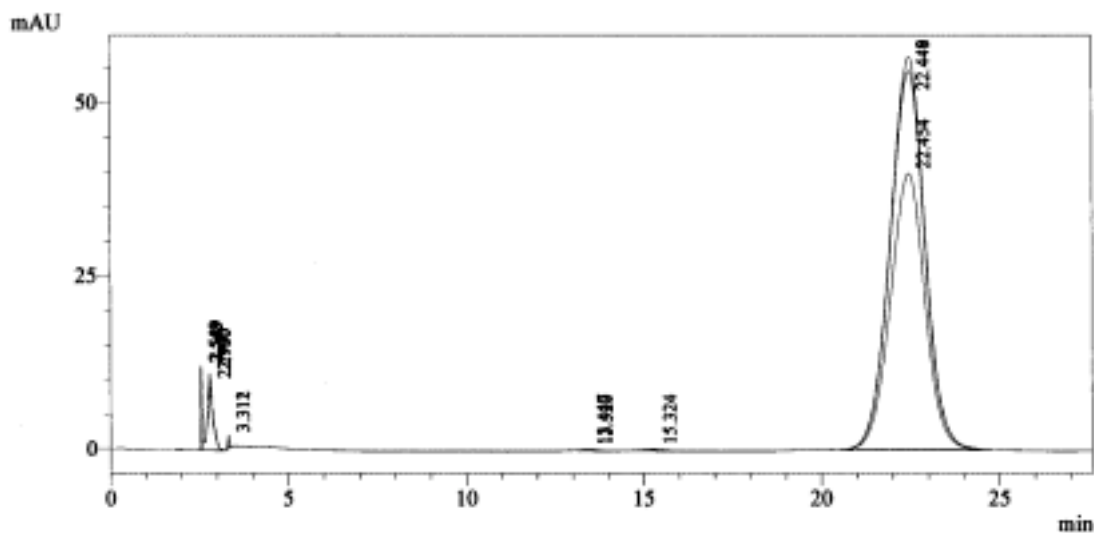


Figura 45. Cromatograma de solução de cloreto de peonidina-3-glicosídeo, em metanol com 0,01 % de HCl v/v. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada:acetonitrila:ácido fórmico 81:9:10 v/v/v; volume de injeção 20 μ L e detecção em 525 nm. Eluição isocrática e em fase reversa.

Tabela 27. Tempo de retenção (t_R) dos padrões de ACYS.

Padrão	t_R (minutos)
Cloreto de pelargonidina	5,340
Cloreto de Malvidina-3-glicosídeo	32,941
Cloreto de Pelargonidina-3-glicosídeo	15,493
Cloreto de Cianidina-3-galactosídeo	8,006
Cloreto de Cianidina-3-glicosídeo	9,968
Cloreto de Cianidina-3,5-diglicosídeo	5,456
Cloreto de Cianidina-3-rutinosídeo	12,600
Cloreto de Peonidina-3-glicosídeo	22,448

Esses valores de t_R foram comparados com os t_R de ACYS dos cromatogramas das soluções das pastas de ACYS (Figuras de 22 a 37). Em todos os extratos estudados, identificou-se a presença de cianidina-3-glicosídeo, com o tempo de retenção característico do seu padrão (9,968 min). Em extrato de jambolão foi identificada cianidina-3-galactosídeo, com t_R confirmado pela injeção do padrão (t_R = 8,006 min).

4.3.4 Identificação de ACYS por HPLC–ESI–Q–TOF– MS

Diante das dificuldades encontradas no Método de Goiffon¹⁰⁴, optou-se pela identificação das ACYS nos extratos por HPLC-ESI-Q-TOF-MS^{50,103,113,124,129}.

Realizou-se um estudo de composição da fase móvel e de um método com eluição por gradiente, visando otimizar a separação e posterior identificação das diferentes ACYS nos extratos. Isso foi necessário, pois o procedimento aplicado para a realização do HPLC para o Método de Goiffon foi realizado em coluna cromatográfica diferente da disponível para HPLC–ESI–Q–TOF–MS. Além disso, não se recomenda a adição de HCl na amostra para injeção no espectrômetro de massas, como foi realizado para HPLC com detecção espectrofotométrica, devido à possível danos ao equipamento. Optou-se, por esse motivo, pela utilização de ácido acético, por ser um ácido mais fraco.

Esse estudo inicial foi realizado com a injeção da mistura dos 8 padrões disponíveis visando encontrar os t_R e os espectros de massas dessas ACYS, com os picos de razão massa/carga (m/z) correspondentes. Nas Figuras 46 a 52, são apresentados os

cromatogramas e espectros de massas de cada padrão, obtidos sequencialmente. Com os valores de t_R e m/z conhecidos dessas ACYS é possível confirmar a presença dessas ACYS correspondentes nos extratos. Esses dados estão apresentados na Tabela 28.

Tabela 28. Dados experimentais de tempo de retenção e razão m/z dos padrões de ACYS^F.

Padrão*	t_R (minutos)	Razão m/z
Cianidina-3,5-diglicosídeo	16,98	611,1567
Cianidina-3-galactosídeo	21,04	449,1068
Cianidina-3-glicosídeo	22,67	449,1078
Pelargonidina-3-glicosídeo	24,52	433,1335
Cianidina-3-rutinosídeo	24,74	595,1687
Peonidina-3-glicosídeo	26,74	463,1224
Malvidina-3-glicosídeo	27,63	493,1373
Pelargonidina	29,42	271,2490

* As fórmulas estruturais encontram-se nas Figuras 46 a 52

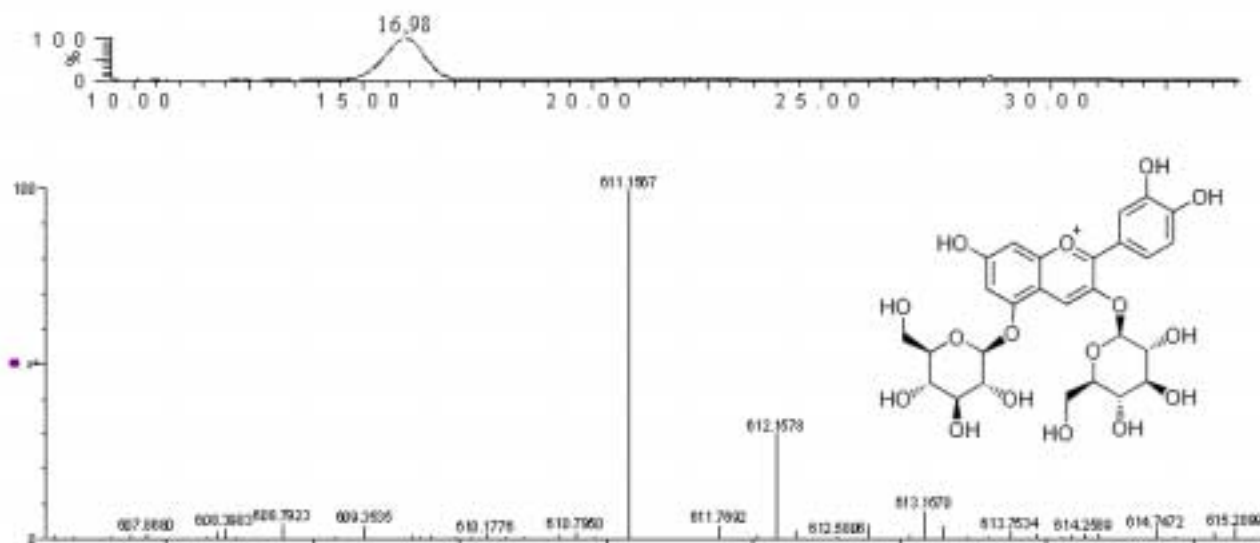


Figura 46. Cromatograma e espectro de massas de solução de cloreto de cianidina-3,5-diglicosídeo em metanol com 0,01 % de HAc v/v. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada acidificada:metanol; eluição por gradiente; volume de injeção 50 μ L e detecção ESI-Q-TOF-MS.

^F Embora tenham sido usados cloretos de antocianinas, considerados como contra-íons, não se detectaram seus picos correspondentes já que foi selecionada faixa de razão m/z superior, observando-se assim, as razões m/z dos cátions, correspondente à ACYS

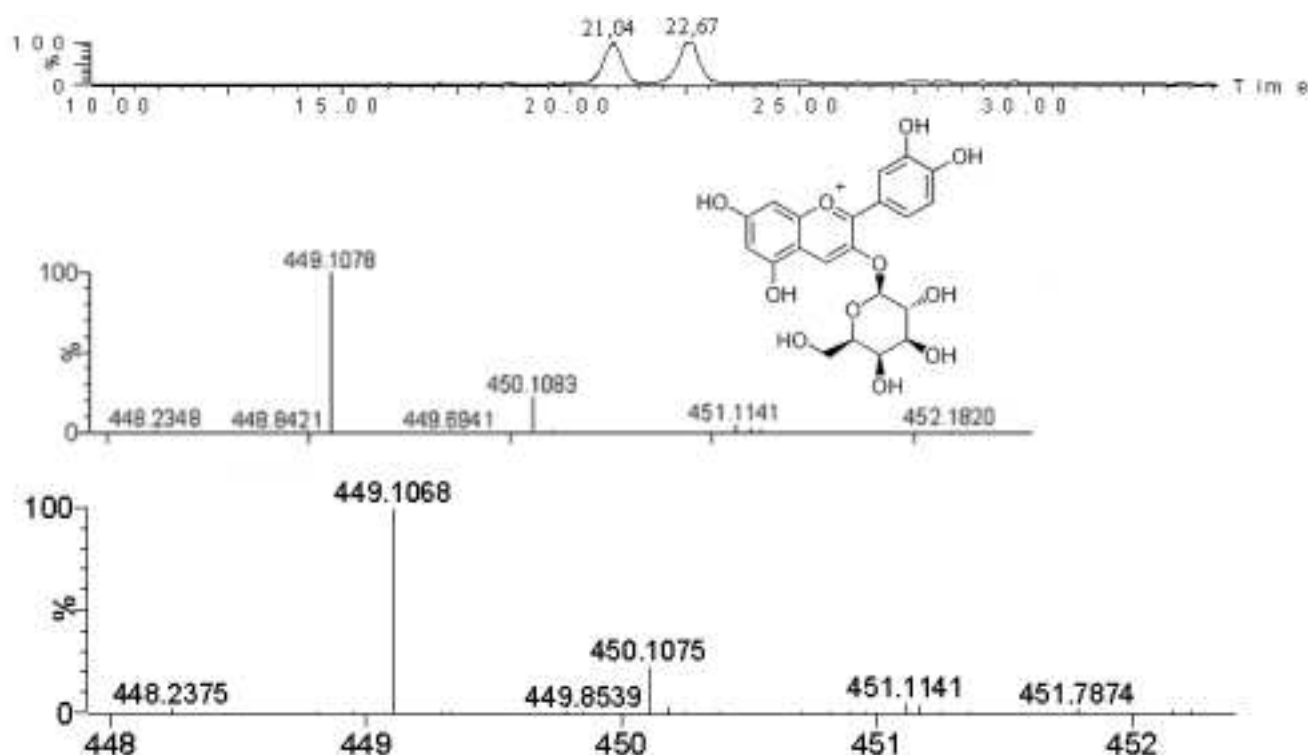


Figura 47. Cromatograma e espectro de massas de solução de cloreto de cianidina-3-glicosídeo e de cloreto de cianidina-3-galactosídeo em metanol com 0,01 % de HAc v/v. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada acidificada:metanol; eluição por gradiente; volume de injeção 50 μ L e detecção ESI-Q-TOF-MS.

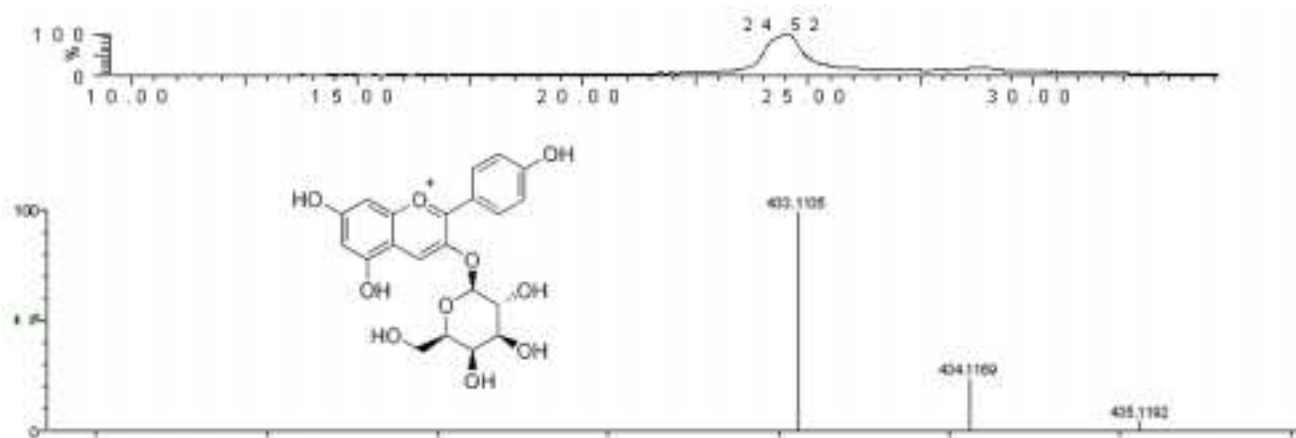


Figura 48. Cromatograma e espectro de massas de solução de cloreto de pelargonidina-3-glicosídeo em metanol com 0,01 % de HAc v/v. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada acidificada:metanol; eluição por gradiente; volume de injeção 50 μ L e detecção ESI-Q-TOF-MS.

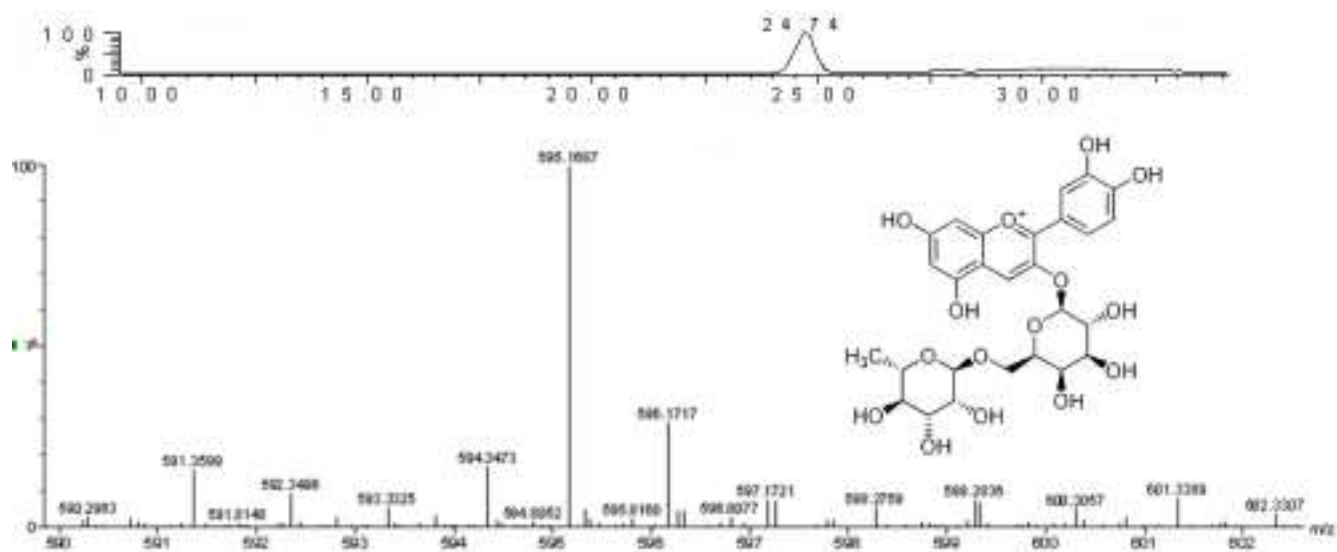


Figura 49. Cromatograma e espectro de massas de solução de cloreto de cianidina-3-rutinosídeo em metanol com 0,01 % de HAc v/v. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada acidificada:metanol; eluição por gradiente; volume de injeção 50 μ L e detecção ESI-Q-TOF-MS.

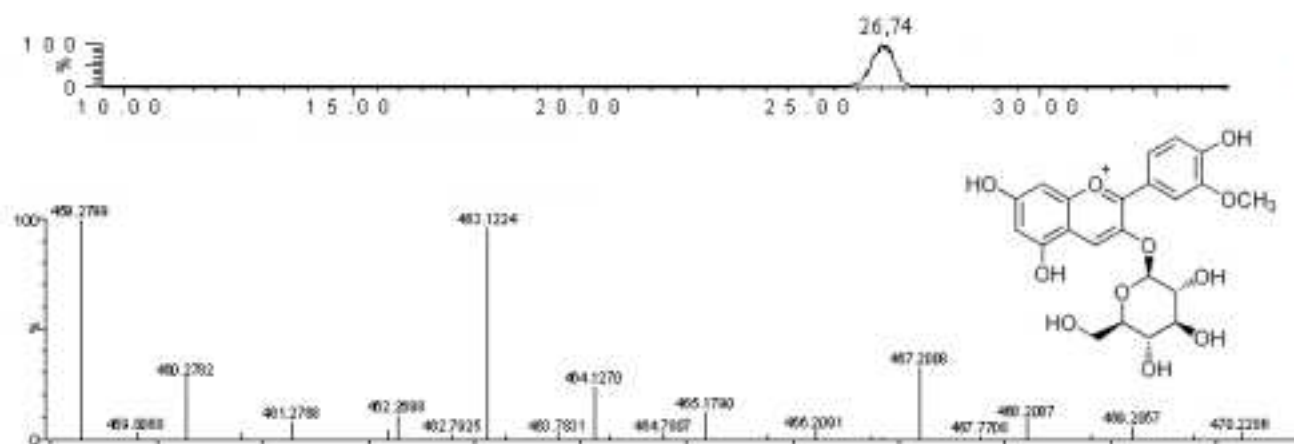


Figura 50. Cromatograma e espectro de massas de solução de cloreto de peonidina-3-glicosídeo em metanol com 0,01 % de HAc v/v. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada acidificada:metanol; eluição por gradiente; volume de injeção 50 μ L e detecção ESI-Q-TOF-MS.

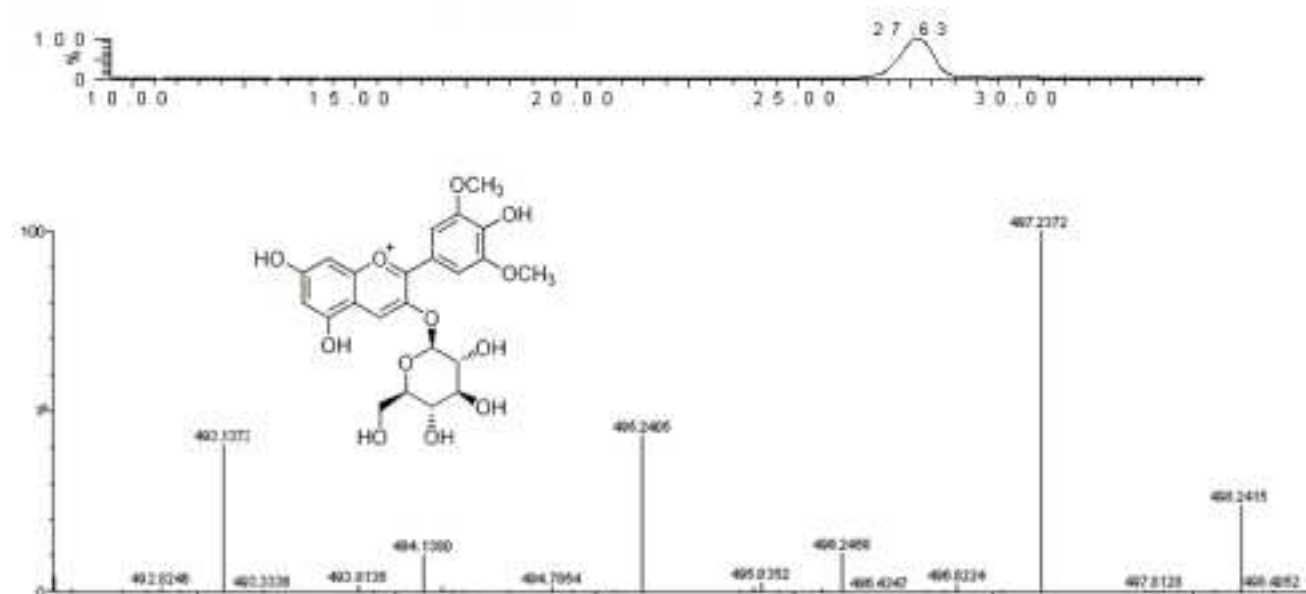


Figura 51. Cromatograma e espectro de massas de solução de cloreto de malvidina-3-glicosídeo em metanol com 0,01 % de HAc v/v. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada acidificada:metanol; eluição por gradiente; volume de injeção 50 μ L e detecção ESI-Q-TOF-MS.

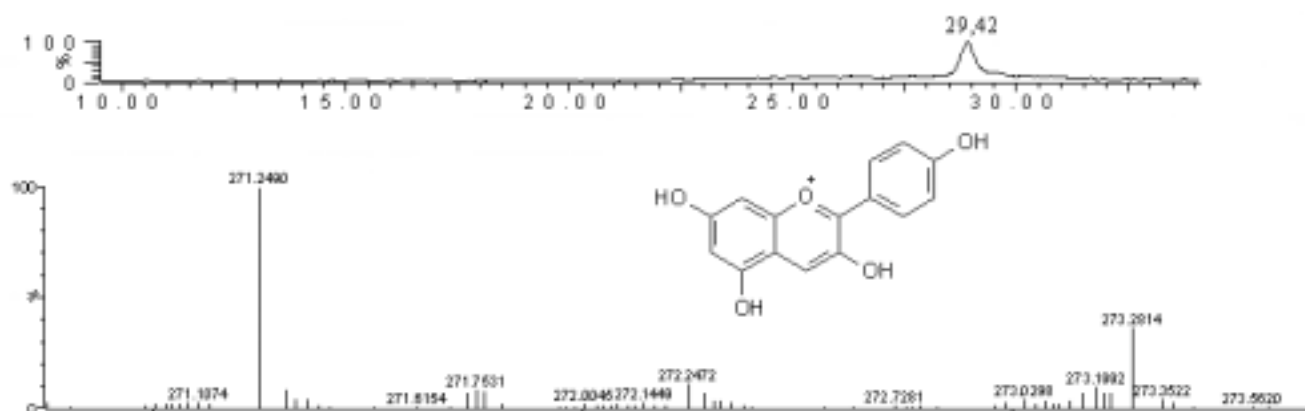


Figura 52. Cromatograma e espectro de massas de solução de cloreto de pelargonidina em metanol com 0,01 % de HAc v/v. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada acidificada:metanol; eluição por gradiente; volume de injeção 50 μ L e detecção ESI-Q-TOF-MS.

Para a identificação de ACYS dos extratos de frutas, utilizou-se MS para encontrar a razão m/z do cátion sem fragmentação. Após passar pelo quadrupolo, os íons moleculares direcionaram-se ao analisador por tempo de voo para então serem detectados. O quadrupolo serviu na seleção de uma faixa de razão m/z e, desta forma, nos espectros de massas picos de maiores intensidades são referentes às ACYS.

Foram obtidos cromatogramas e espectros de massas para extratos de cada fruta nas diferentes condições de extração. Pela semelhança dos cromatogramas e espectros de massas das diferentes condições de extração de cada fruta, serão apresentados apenas cromatogramas e espectros de massas dos extratos obtidos em uma das condições de extração para a mesma fruta.

Os espectros de massas apresentam um pico de maior intensidade correspondente à m/z da espécie molecular que contém isótopos mais abundantes. Existem também picos de baixas intensidades correspondentes às espécies moleculares que contém isótopos menos abundantes¹¹⁴. Este conjunto de espécies dá origem ao “padrão isotópico”, calculado a partir de considerações das abundâncias relativas dos isótopos dos elementos presentes nas moléculas em estudo.

As Figuras 53 a 65 mostram os cromatogramas e os espectros de massas obtidos para soluções de 8 a 24 g mL⁻¹ das pastas de ACYS das diversas frutas estudadas.

4.3.4.1 Jabuticaba (Estudos: L5; N5)

Foram utilizadas pastas de ACYS de jabuticaba de extratos obtidos em 2 condições de extração: frutas com maceração (L5) e com trituração mecânica (N5). Nas Figuras 53 e 54 são apresentados os cromatogramas para comparação de t_R e os espectros de massas para identificação das ACYS.

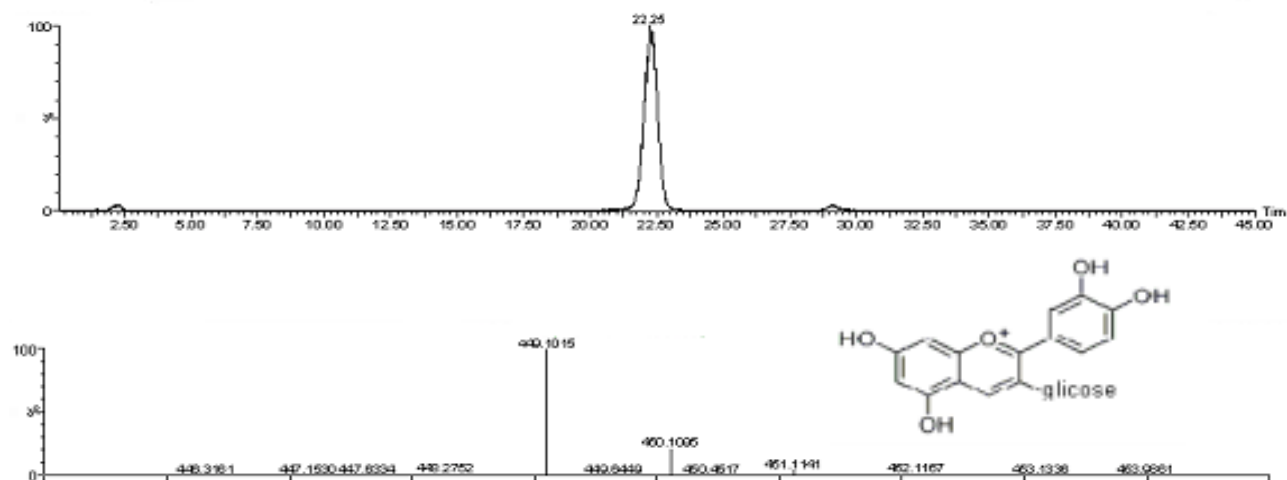


Figura 53. Cromatograma e espectro de massas de solução de pasta de ACYS de extrato de jabuticaba 10 g L⁻¹ em metanol com 0,01 % de HAc v/v (Estudo: N5), identificando a cianidina-3-glicosídeo. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada acidificada:metanol; eluição por gradiente; volume de injeção 50 µL e detecção ESI-Q-TOF-MS.

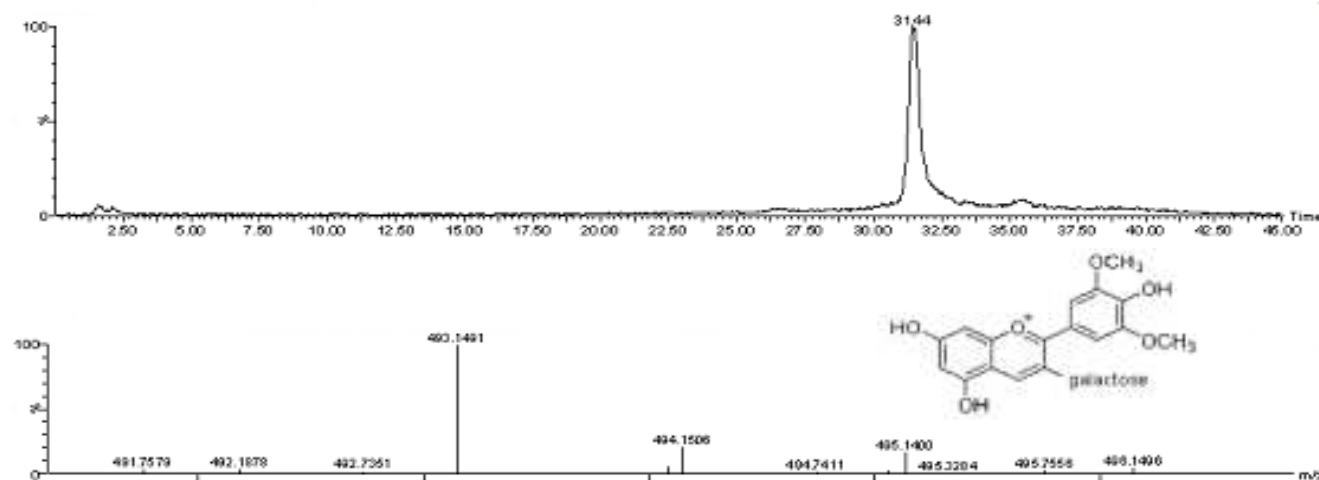


Figura 54. Cromatograma e espectro de massas de solução de pasta de ACYS de extrato de jabuticaba 12 g L⁻¹ em metanol com 0,01 % de HAc v/v (Estudo: L5), identificando a malvidina-3-galactosídeo. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada acidificada:metanol; eluição por gradiente; volume de injeção 50 µL e detecção ESI-Q-TOF-MS.

O tempo de retenção e o espectro de massas da ACYS majoritária dos extratos de jabuticaba, cianidina-3-glicosídeo (Tabela 29), coincidem com os valores do respectivo padrão (Tabela 28). Além disso, confirma sua presença já detectada pelo Método de Goiffon¹⁰⁴. A presença da malvidina-3-galactosídeo foi detectada, cujo padrão não estava disponível também foi indicada pelo Método de Goiffon¹⁰⁴.

Tabela 29. ACYS de extratos de jabuticaba identificadas por HPLC-ESI-Q-TOF-MS.

Antocianina	t _R (minutos)	Razão m/z
Cianidina-3-glicosídeo	22,25	449,1015
Malvidina-3-galactosídeo	31,44	493,1491

Cianidina-3-sambubiose-5-glicosídeo identificada pelo Método de Goiffon nos extratos obtidos de frutas trituradas não teve sua presença confirmada por HPLC-ESI-Q-TOF-MS, pois não foi possível detectar durante toda a corrida cromatográfica, nenhum pico com razão m/z em torno de 742, correspondente a essa ACYS.

4.3.4.2 Refugo de Jabuticaba (Estudos: R5; T5)

Analogamente a extratos de jabuticaba, extratos de refugo de jabuticaba obtidos em 2 condições diferentes de extração foram comparados: a partir de frutas maceradas (R5) e a

partir de frutas submetidas a trituração mecânica (R5). Na Figura 55, apresentam-se o cromatograma para comparação de t_R e os espectros de massas para identificação das ACYS.

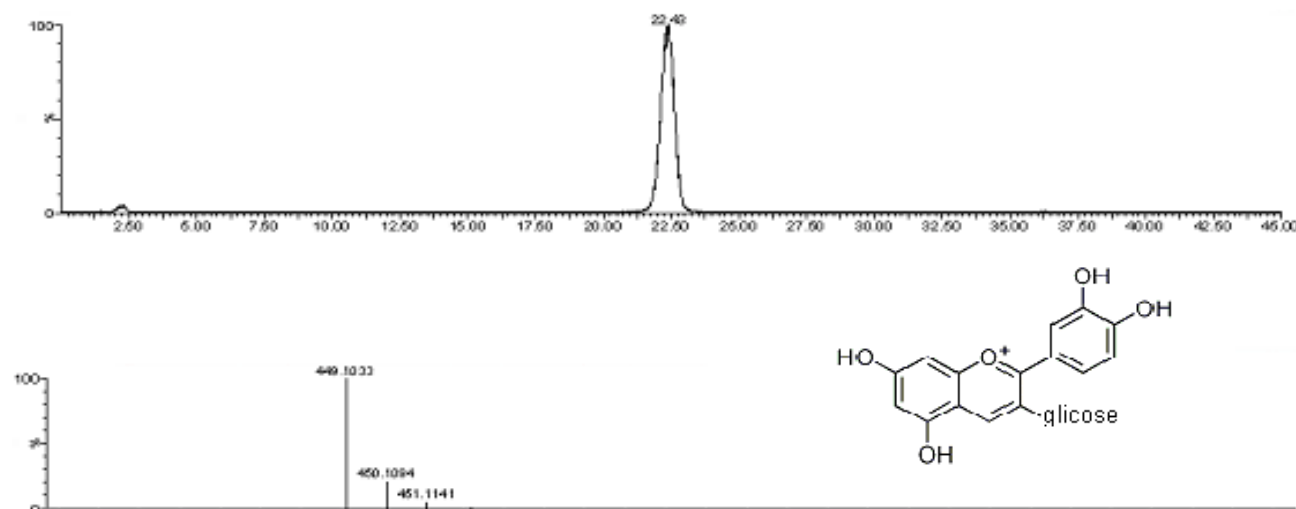


Figura 55. Cromatograma e espectro de massas de solução de pasta de ACYS de extrato de refugo de jabuticaba 14 g L^{-1} em metanol com 0,01 % de HAc v/v (Estudo: T5), identificando a cianidina-3-glicosídeo. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada acidificada:metanol; eluição por gradiente; volume de injeção $50 \mu\text{L}$ e detecção ESI-Q-TOF-MS.

Assim como pelo Método de Goiffon¹⁰⁴, a única ACYS identificada foi a cianidina-3-glicosídeo (Tabela 30), o que reforça a hipótese de que durante o amadurecimento da fruta algumas reações, como de oxidação e reações com outros compostos presentes na própria fruta, podem ocorrer e mudar a composição do extrato obtido, podendo assim variar a antocianina identificada nos extratos dessas frutas.

Tabela 30. ACYS de extratos de refugo identificadas por HPLC-ESI-Q-TOF-MS.

Antocianina	t_R (minutos)	Razão m/z
Cianidina-3-glicosídeo	22,43	449,1033

4.3.4.3 Amora (Estudos: O4; P4)

Foram utilizadas pastas de ACYS de amora obtidos em 2 condições diferentes de extração: extratos de frutas não branqueadas (O4) e de frutas branqueadas (P4). Nas Figuras de 56 a 59 estão apresentados os cromatogramas para comparação de t_R e os espectros de massas para identificação das ACYS.

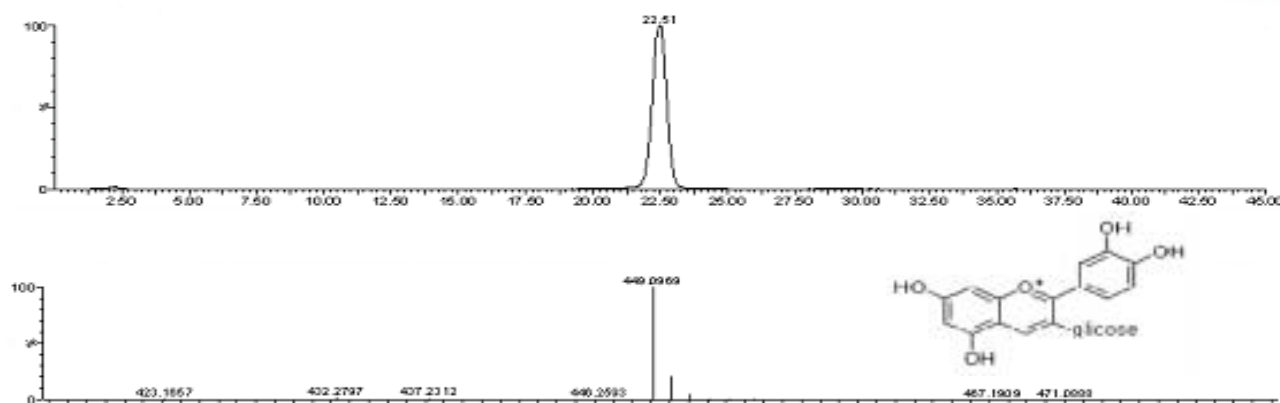


Figura 56. Cromatograma e espectro de massas de solução de pasta de ACYS de amora 15 g L⁻¹ em metanol com 0,01 % de HAc v/v (Estudo O4), identificando a cianidina-3-glicosídeo. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada acidificada:metanol; eluição por gradiente; volume de injeção 50 µL e detecção ESI-Q-TOF-MS.

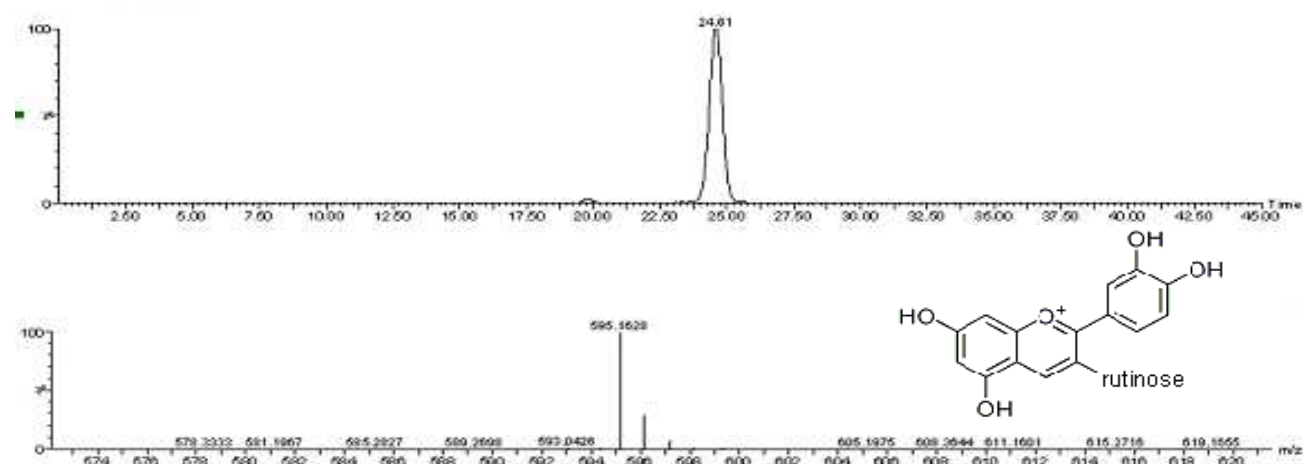


Figura 57. Cromatograma e espectro de massas de solução de pasta de ACYS de amora 14 g L⁻¹ em metanol com 0,01 % de HAc v/v (Estudo: P4), identificando a cianidina-3-rutinosídeo. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada acidificada:metanol; eluição por gradiente; volume de injeção 50 µL e detecção ESI-Q-TOF-MS.

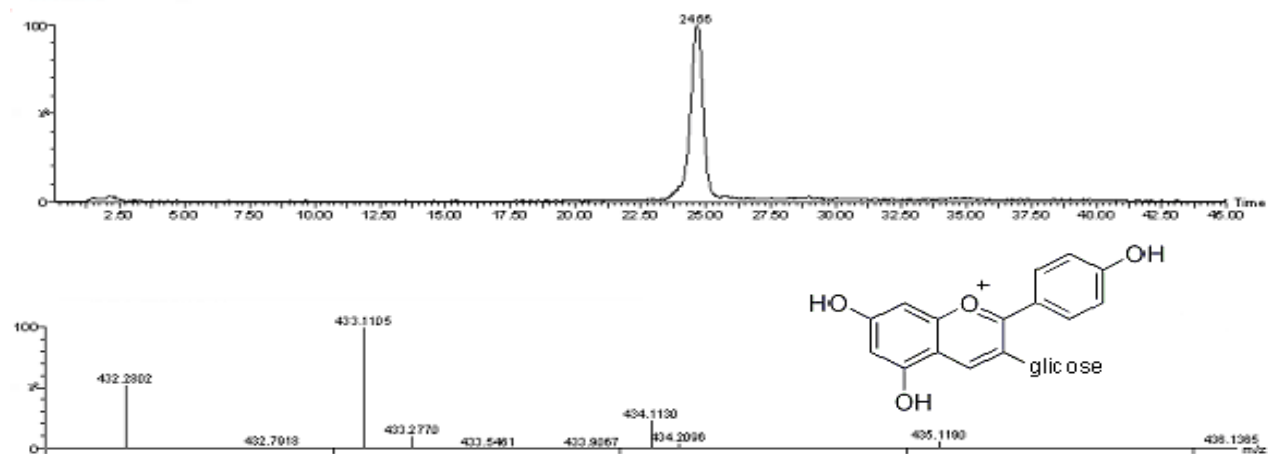


Figura 58. Cromatograma e espectro de massas de solução de pasta de ACYS de extrato de amora 12 g L^{-1} em metanol com 0,01 % de HAc v/v (Estudo: P4), identificando a pelargonidina-3-glicosídeo. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada acidificada:metanol; eluição por gradiente; volume de injeção $50 \mu\text{L}$ e detecção ESI-Q-TOF-MS.

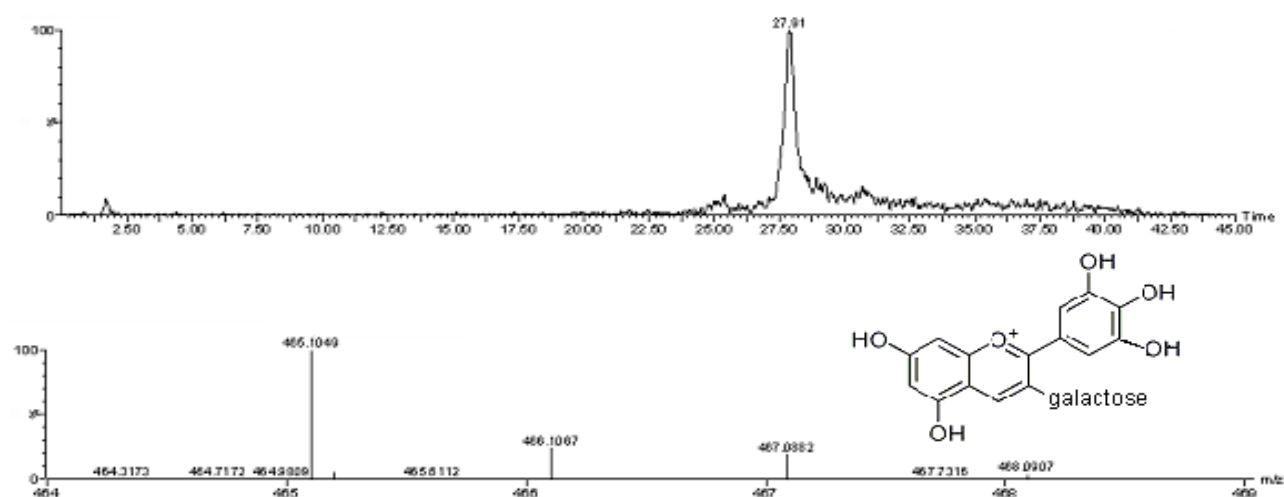


Figura 59. Cromatograma e espectro de massas de solução de pasta de ACYS de extrato de amora 9 g L^{-1} em metanol com 0,01 % de HAc v/v (Estudo: O4), identificando a delphinidina-3-galactosídeo. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada acidificada:metanol; eluição por gradiente; volume de injeção $50 \mu\text{L}$ e detecção ESI-Q-TOF-MS.

Pelos 2 métodos de HPLC utilizados, Método de Goiffon e HPLC-ESI-Q-TOF-MS, identificou-se a cianidina-3-glicosídeo como a ACYS majoritária e presente em todos os extratos de amora. O tempo de retenção e a m/z encontrados por HPLC-ESI-Q-TOF-MS estão apresentados na Tabela 31.

Pelo Método de Goiffon¹⁰⁴, observou-se apenas um pico nos cromatogramas dos extratos de frutas branqueadas, identificado como delphinidina-3-galactosídeo. No entanto, por

HPLC-ESI-Q-TOF-MS, essa ACYS também foi identificada nos extratos de frutas não branqueadas, conforme indica a Figura 59 e Tabela 31. Possivelmente isto tenha sido devido à maior sensibilidade na detecção por MS do que a espectrofotométrica, do Método de Goiffon.

Uma dificuldade encontrada ao aplicar o Método de Goiffon foi 2 ACYS diferentes identificadas com mesmo valor de $\alpha_{\text{tabelado}} = 1,29$. Para tentar identificar a ACYS correspondente, optou-se por MS. No mesmo tempo de retenção, cerca de 24 minutos, foram encontrados 2 picos distintos com razões m/z de ~ 595 e ~ 433 , podendo ser referentes à cianidina-3-rutinosídeo e pelargonidina-3-galactosídeo, respectivamente (Figuras 57 e 58). Essas ACYS com mesmo valor de α_{tabelado} eram prováveis pelo Método de Goiffon e buscou-se identifica-las por HPLC-ESI-Q-TOF-MS.

Pelargonidina-3-galactosídeo apresenta a mesma razão m/z da pelargonidina-3-glicosídeo, cujo padrão apresentou $t_R \sim 24$. Como não houve disponibilidade de padrão de pelargonidina-3-galactosídeo restaram dúvidas sobre sua identificação. Assim, o pico de t_R do cromatograma da Figura 58 pode ser atribuído a pelargonidina-3-galactosídeo (sugerida pelo Método de Goiffon) ou possivelmente pelargonidina-3-glicosídeo, pela proximidade de t_R .

Com relação à pelargonidina-3-arabinosídeo, identificada pelo Método de Goiffon¹⁰⁴ com área inferior a 1%, não houve confirmação por HPLC-ESI-Q-TOF-MS, pois não foi detectado pico com m/z em 403, que corresponderia a essa ACYS. Isso justificaria a sugestão do método de Goiffon para desconsiderar áreas inferiores a 1% como atribuídas às ACYS.

Tabela 31. ACYS de extratos de amora identificadas por HPLC-ESI-Q-TOF-MS.

Antocianina	t_R (minutos)	Razão m/z
Delfinidina-3-galactosídeo	27,91	495,1049
Cianidina-3-glicosídeo	22,51	449,0969
Cianidina-3-rutinosídeo	24,61	595,1628
Pelargonidina-3-galactosídeo*	24,61	433,1105
Pelargonidina-3-glicosídeo	24,66	433,1105

* ACYS não confirmada

4.3.4.4 Amora Preta (Estudos: U4; V4)

ACYS de extratos de amora preta foram obtidos a partir das 2 condições diferentes de extração, assim como para a amora, tendo sido utilizadas frutas não branqueadas e branqueadas (respectivamente U4 e V4). As Figuras de 60 a 63 apresentam os cromatogramas para comparação de t_R e os espectros de massas para identificação das ACYS.

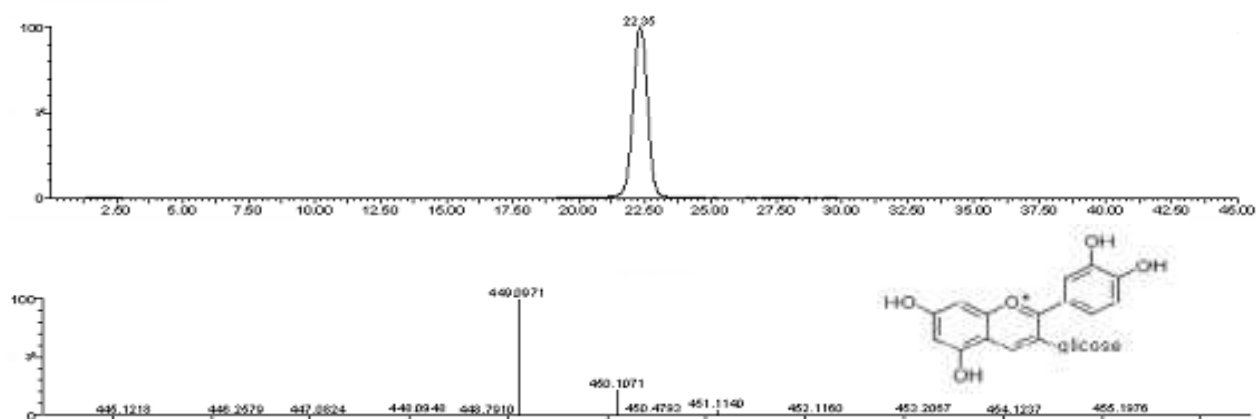


Figura 60. Cromatograma e espectro de massas de solução de pasta de ACYS de amora preta 11 g L⁻¹ em metanol com 0,01 % de HAc v/v (Estudo: U4), identificando a cianidina-3-glicosídeo. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada acidificada:metanol; eluição por gradiente; volume de injeção 50 μ L e detecção ESI-Q-TOF-MS.

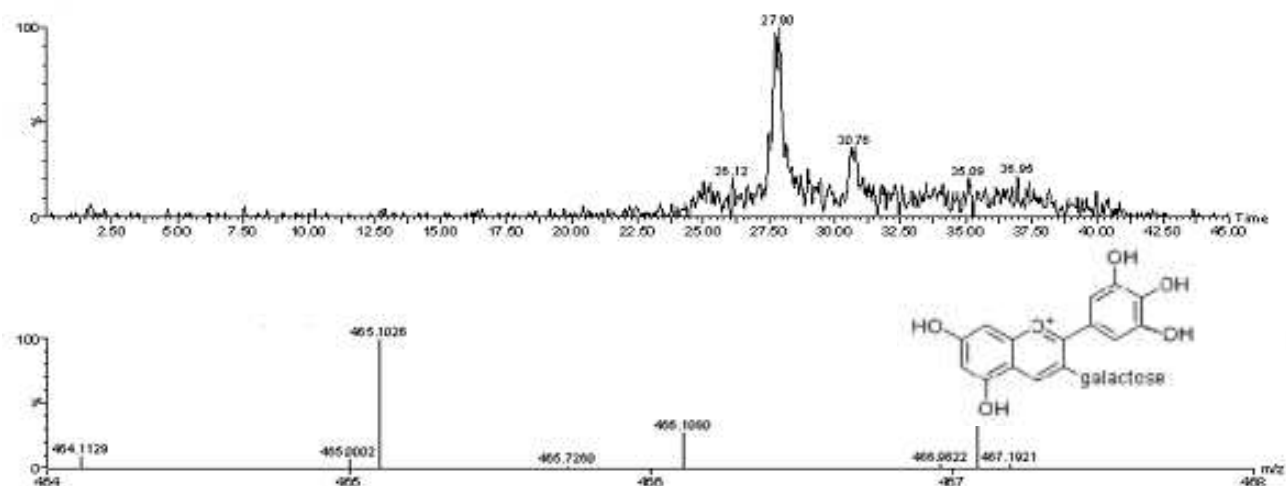


Figura 61. Cromatograma e espectro de massas de solução de pasta de ACYS de amora preta 9 g L⁻¹ em metanol com 0,01 % de HAc v/v (Estudo: V4), identificando a delfinidina-3-galactosídeo. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada acidificada:metanol; eluição por gradiente; volume de injeção 50 μ L e detecção ESI-Q-TOF-MS.

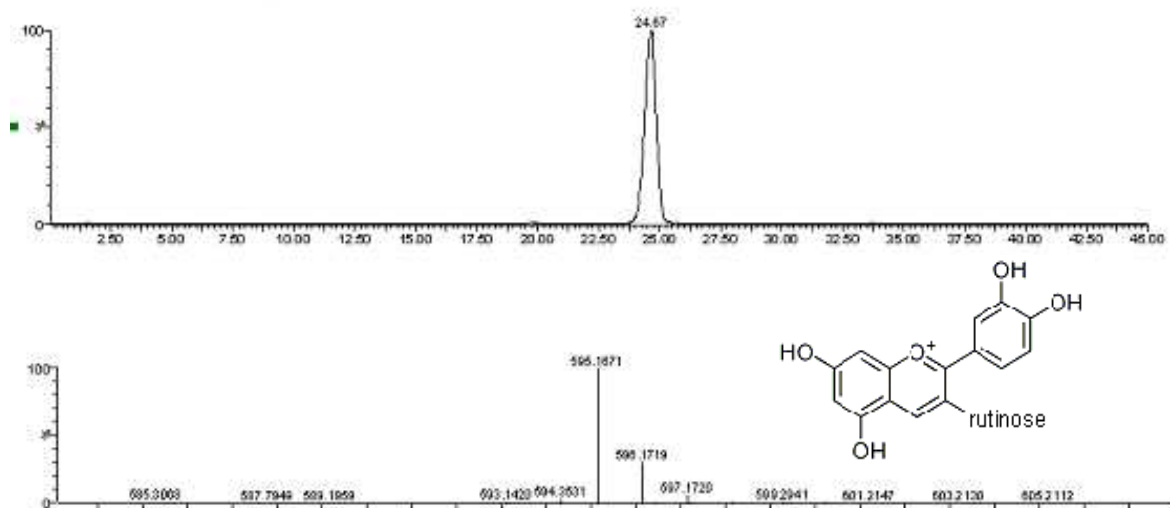


Figura 62. Cromatograma e espectro de massas de solução de pasta de ACYS de amora preta 10 g L⁻¹ em metanol com 0,01 % de HAc v/v (Estudo: V4), identificando a cianidina-3-rutinosídeo. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada acidificada:metanol; eluição por gradiente; volume de injeção 50 µL e detecção ESI-Q-TOF-MS.

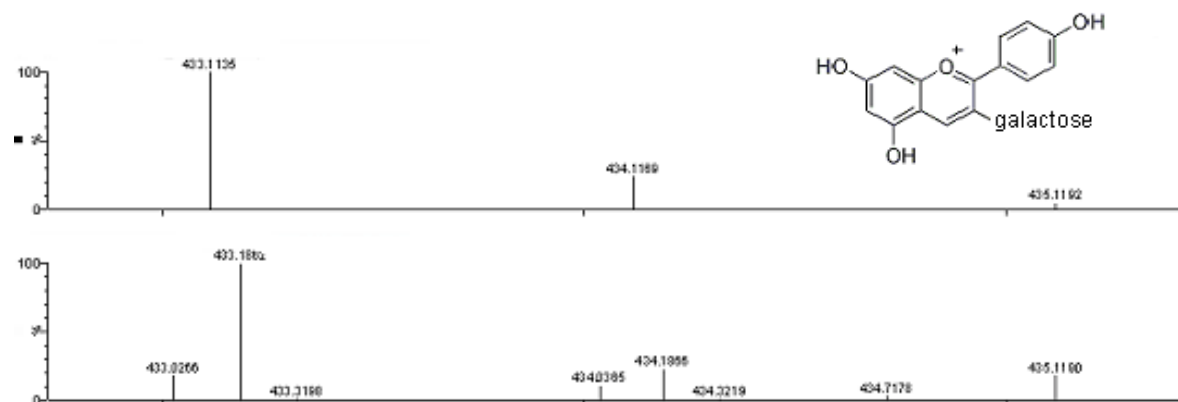


Figura 63. Espectros de massas de solução de pasta de ACYS de amora preta 10 g L⁻¹ em metanol com 0,01 % de HAc v/v (Estudo: V4), identificando a pelargonidina-3-galactosídeo e seu respectivo padrão isotópico. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada acidificada:metanol; eluição por gradiente; volume de injeção 50 µL e detecção ESI-Q-TOF-MS.

Cianidina-3-glicosídeo foi encontrada como ACYS majoritária presente em todos os extratos de amora preta (Figura 60 e Tabela 32). O pico de segunda maior área identificado pelo Método de Goiffon¹⁰⁴, em todos os extratos, foi referente à delphinidina-3-galactosídeo, que foi confirmada por HPLC-ESI-Q-TOF-MS, pela razão m/z de ~ 465 correspondente (Figura 61 e Tabela 32).

Análogo ao observado nos extratos de amora, ao empregar o Método de Goiffon¹⁰⁴ para a identificação das ACYS nos extratos de amora preta, observaram-se 2 ACYS diferentes com mesmo valor de $\alpha_{\text{tabelaado}} = 1,29$, referentes à cianidina-3-rutinosídeo e pelargonidina-3-galactosídeo. No entanto, nesses extratos, no tempo de retenção de 24 minutos, observou-se apenas um pico, cuja razão m/z foi de ~ 595 , correspondente à cianidina-3-rutinosídeo (Figura 62 e Tabela 32). Neste caso, portanto, a possibilidade da presença de 2 ACYS com mesmo valor de $\alpha_{\text{tabelaado}}$ pode ser descartada.

A identificação de pelargonidina-3-galactosídeo sugerida pelo método de Goiffon não se confirmou, como mostra a Figura 63, pois não há correspondência da razão m/z em torno de 433, detectada por MS, com o seu correspondente padrão isotópico.

A presença da cianidina hidrolisada, ou seja, ACYS sem a unidade glicosídica que é uma antocianidina, foi identificada pelo Método de Goiffon¹⁰⁴, mas não foi confirmada por HPLC-ESI-Q-TOF-MS, já que não observado pico com m/z correspondente (270). Isso possivelmente ocorreu devido ao uso de um ácido mais fraco (HAc) para HPLC-ESI-Q-TOF-MS em comparação com o ácido utilizado para HPLC com detecção espectrofotométrica (HCl). A adição de um ácido fraco não favoreceu a hidrólise da ACYS.

Tabela 32. ACYS de extratos de amora preta identificadas por HPLC-ESI-Q-TOF-MS.

Antocianina	t_R (minutos)	Razão m/z
Delfinidina-3-galactosídeo	27,90	465,1026
Cianidina-3-glicosídeo	22,35	449,0971
Cianidina-3-rutinosídeo	24,67	595,1671

4.3.4.5 Jambolão (Estudos: Y4; Y5; Z4; Z5; AA4; AA5; AB4; AB5)

Foram identificadas ACYS de extratos de jambolão obtidos em 8 condições de extração, conforme a identificação do estudo (Y4; Y5; Z4; Z5; AA4; AA5; AB4; AB5). As Figuras 64 e 65 ilustram os cromatogramas para comparação de t_R e os espectros de massas para identificação das ACYS presentes em todos os extratos.

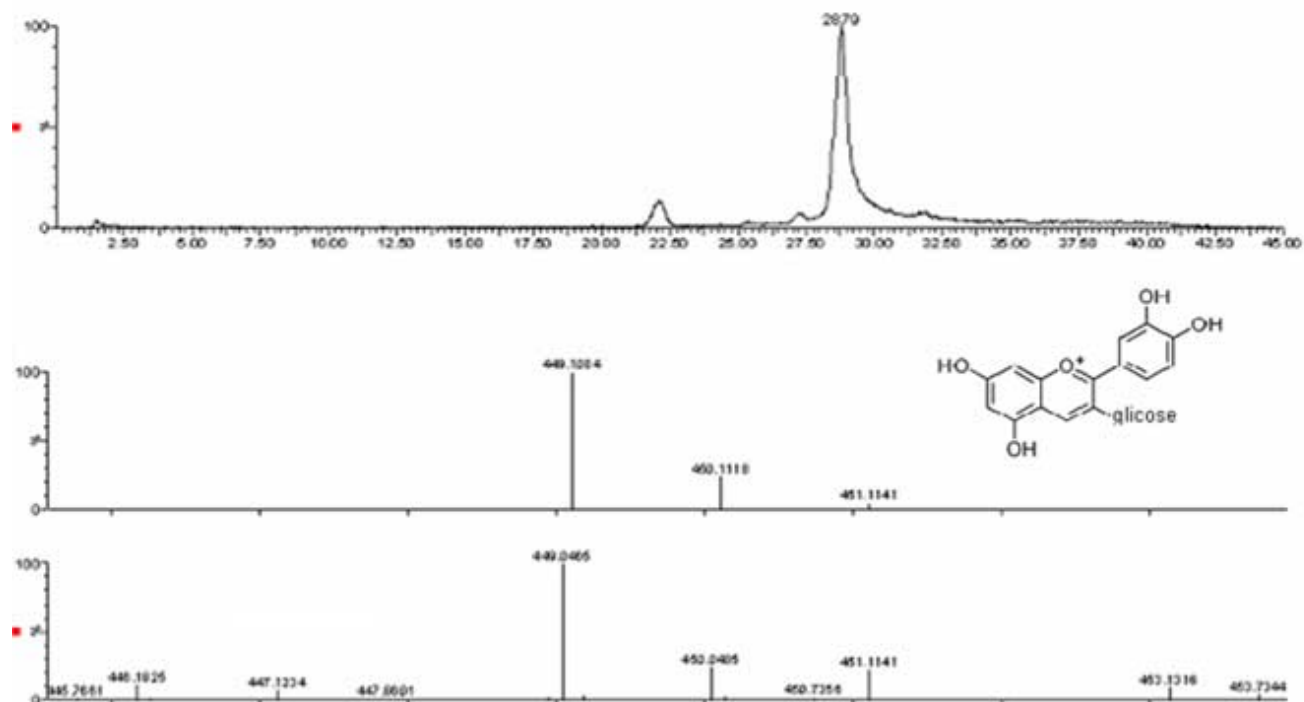


Figura 64. Cromatograma e espectro de massa de solução de pasta de ACYS de jambolão 13 g L^{-1} em metanol com 0,01 % de HAc v/v (Estudo: Y4), identificando a cianidina-3-glicosídeo e espectro de massas do seu respectivo padrão isotópico. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada acidificada:metanol; eluição por gradiente; volume de injeção $50 \mu\text{L}$ e detecção ESI-Q-TOF-MS.

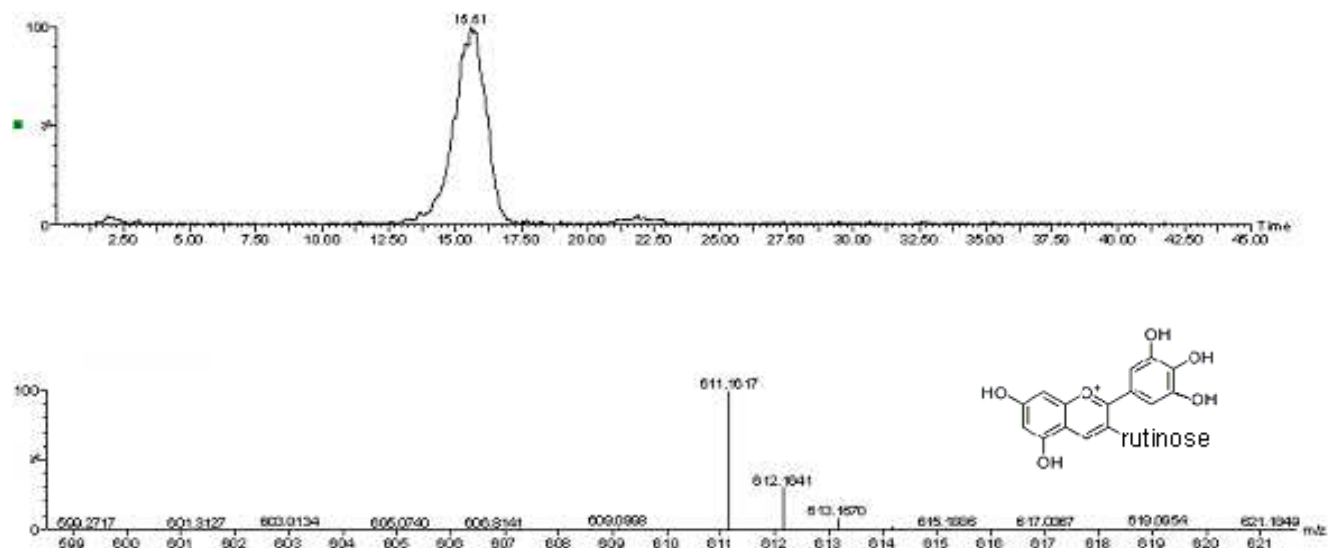


Figura 65. Cromatograma e espectro de massa de solução de pasta de ACYS de jambolão 18 g L^{-1} em metanol com 0,01 % de HAc v/v (Estudo: AB5), identificando a delphinidina-3-rutinosídeo. Condições cromatográficas: coluna C18; fase móvel água deionizada acidificada:metanol; eluição por gradiente; volume de injeção $50 \mu\text{L}$ e detecção ESI-Q-TOF-MS.

Para usar o Método de Goiffon¹⁰⁴, é necessário que a cianidina-3-glicosídeo esteja presente para que se possa fazer a relação empírica entre os tempos de retenção de todas as ACYS presentes nos extratos. Considerou-se, então, que a cianidina-3-glicosídeo seria o pico nos cromatogramas com t_R mais próximo ao t_R característico da mesma. No entanto, não foi possível confirmar sua identidade na detecção por MS, já que não há semelhança com o padrão isotópico correspondente ao da cianidina-3-glicosídeo (Figura 64). Além disso, o íon molecular com $m/z = 449$, supostamente correspondente a cianidina-3-glicosídeo, apresentou $t_R = 29$ minutos, sendo que para o padrão $t_R \sim 22$ minutos), como indica a Figura 64.

Pode-se concluir que a cianidina-3-glicosídeo não foi confirmada por HPLC-ESI-Q-TOF-MS em extratos de jambolão. Assim, o Método de Goiffon não deveria ter sido aplicado, a não ser que um padrão de cianidina-3-glicosídeo tivesse sido adicionado à amostra ou então esta tivesse sido enriquecida com um extrato de fruta que contenha essa ACYS²⁰.

Outra dificuldade encontrada na aplicação do método de Goiffon para identificação de ACYS dos extratos de jambolão foi concluir qual ACYS estaria presente nesses extratos a partir do valor de $\alpha_{\text{calculado}} = 0,74$, já que este é um valor intermediário a valores de $\alpha_{\text{tabelaado}}$ iguais a 0,71 e 0,77, atribuídos a 2 ACYS diferentes. Utilizando-se da técnica de HPLC-ESI-Q-TOF-MS, a ACYS detectada nos extratos de jambolão com $\alpha_{\text{calculado}} = 0,74$ não pode ser atribuída à ACYS com de $\alpha_{\text{tabelaado}} = 0,77$, pois não há igualdade de t_R nem semelhança nos espectro de massas.

Analisando-se os espectros de massas da Figura 65, observam-se picos com razão m/z de ~ 611 que poderiam ser atribuídos à delfinidina-3-rutinosídeo, cujo valor de $\alpha_{\text{tabelaado}} = 0,71$. No entanto, a ausência do padrão impediu a confirmação desta hipótese, já que há semelhança entre razão m/z e t_R de cianidina-3,5-diglicosídeo e a ACYS da amostra de extrato de jambolão. Nesse caso, seria necessário realizar uma fragmentação da ACYS separada da amostra, como por exemplo MS/MS e, finalmente, confirmar sua identidade, mas isso não pode ser feito neste trabalho por limitações de ordem prática.

Tabela 33. ACYS de extratos de jambolão identificadas por HPLC-ESI-Q-TOF-MS.

Antocianina	t_R (minutos) Y4, Y5, AA4, AA5	Razão m/z Z4, Z5, AB4, AB5
Delfinidina-3-rutinosídeo*	15,51	611,1617
Cianidina-3,5-diglicosídeo*	15,51	611

* ACYS possíveis com mesmo valor de razão m/z

CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES

Os resultados apontaram ajuste otimizado de condições para extração, com compromisso entre a quantidade de ACYS extraída e a estabilidade do extrato, descrito na sequência, para cada fruta individualmente, de acordo com os estudos realizados.

Para a jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*), a melhor condição, nos testes iniciais, parece ser branquear apenas a casca da fruta fresca e extração em meio alcoólico acidificado (etanol 99,5 % v/v com adição de HAc 1 %, na proporção 85:15 v/v). Esta também é a melhor condição para obtenção do extrato da fruta congelada.

Para a amora (*Morus nigra*): nos testes iniciais, os melhores resultados foram obtidos com extração da fruta fresca, sem branquear, em meio alcoólico (etanol 99,5 % v/v) sem acidificar. Para amora congelada: extração de fruta branqueada e solvente alcoólico acidificado (etanol 99,5 % v/v com adição de HAc 1 % v/v, na proporção 85:15 v/v). Para todos os extratos de amora congelada, a quantidade de ACYS extraída foi menor que nos extratos da fruta fresca.

A partir dos outros testes de extração de ACYS para as frutas congeladas (jabuticaba, refugo de jabuticaba, amora preta e jambolão) foi possível obter extratos com maior quantidade de ACYS extraída em um menor tempo de extração e com o uso de álcool mais diluído (etanol 94 % v/v), sem adição de ácido, o que torna o método economicamente mais atraente em comparação com o procedimento otimizado nos estudos iniciais de extração. Essa melhor condição envolveu também o uso do branqueamento para todas as frutas. A condição da fruta para o melhor resultado do branqueamento envolveu somente cascas de jabuticaba e refugo, fruta inteira para a amora preta e jambolão descaroçado.

Como método de esterilização, o branqueamento parece ser mais favorável que a tinalização para todas as frutas, pois além de contribuir para aumentar a estabilidade dos extratos, aumentou a quantidade de ACYS extraída.

Nos estudos de identificação de ACYS nos diferentes extratos de frutas empregando-se HPLC, verificou-se a adequação de solubilizar pastas de ACYS em metanol com 0,01% v/v de HCl, dispensando-se a necessidade de purificar a amostra como tratamento da amostra antes da injeção no cromatógrafo.

Por HPLC com detecção espectrofotométrica, foi possível identificar ACYS pelo método de Goiffon, tendo a cianidina-3-glicosídeo como ACYS majoritária dos extratos de frutas, exceto nos extratos de jambolão.

A aplicação do método de Goiffon representou algumas indefinições na identificação de ACYS que possuíam mesmo α_{tabelado} , já que atribui o mesmo valor para ACYS diferentes ou ainda quando o $\alpha_{\text{calculado}}$ tinha um valor intermediário aos valores de α_{tabelado} . Isto apontou a necessidade de aplicação de outra técnica ou método para confirmar a identificação das ACYS, o que neste trabalho foi realizado utilizando-se HPLC-ESI-TOF-MS.

As ACYS identificadas e confirmadas pelos diferentes métodos foram:

- Jabuticaba: cianidina-3-glicosídeo e malvidina-3-galactosídeo;
- Refugo de jabuticaba: cianidina-3-glicosídeo;
- Amora: cianidina-3-glicosídeo, delphinidina-3-galactosídeo, cianidina-3-rutinosídeo e pelargonidina-3-glicosídeo;
- Amora Preta: cianidina-3-glicosídeo, delphinidina-3-galactosídeo e cianidina-3-rutinosídeo.

Nos extratos de jambolão, a presença de delphinidina-3-rutinosídeo foi sugerida pelo Método de Goiffon, mas não foi possível confirmá-la devido à falta do padrão para HPLC-ESI-TOF-MS, indicando ser recomendável aplicar outra estratégia como por exemplo MS/MS.

Com relação à composição dos extratos, não parece ocorrer modificação das ACYS extraídas em diferentes condições de extração. Embora em alguns métodos analíticos tenham mostrado essa possibilidade, que não foi confirmada por uma técnica mais sensível, o que reforça a necessidade de cautela na escolha do método analítico.

CAPÍTULO 6: TRATAMENTO DE RESÍDUOS

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

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

Resíduos contendo metanol foram armazenados em frascos adequados e encaminhados à Comissão de Segurança para tratamento por incineração.

Resíduos contendo acetonitrila foram armazenados em recipientes adequados e encaminhados para a Comissão de Segurança do IQ-UNICAMP para tratamento seguindo-se as recomendações descritas nas referências:

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

CAPÍTULO 7: PERSPECTIVAS

Como a identificação de ACYS em extratos de frutas é de interesse para processos de produção industrial, é viável elaborar um protocolo para aplicação em análises de rotina para controle da qualidade dos extratos com procedimento simples e validado, envolvendo análises cromatográficas com detecção UV-Vis, minimizando a necessidade de uso de padrões.

As dificuldades de identificação de ACYS individuais por HPLC, tanto por detecção espectrofotométrica quanto por MS podem vir a ser superadas com a aplicação de procedimentos de HPLC acoplado a MS/MS. Uma outra opção seria a utilização dos espectros UV-Vis dos picos dos cromatogramas em métodos quimiométricos para identificar ACYS.

Tendo em vista a necessidade de minimizar perdas de ACYS em todas as etapas do processamento industrial (extração, filtração, secagem) é importante desenvolver uma sistemática para balanço de massas, visando subsidiar a aplicação dos processos de extração em escala industrial.

CAPÍTULO 8: REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. <<http://www.gpquae.iqm.unicamp.br>>. Acesso contínuo.
2. ALKEMA, S.; SEAGER, S.L.; “The chemical pigments of plants”; *Journal of Chemical Education*; **1982**, 59(3), p. 183.
3. McGHIE T. K.; ROWAN D. R.; EDWARDS P. J.; “Structural identification of two major anthocyanin components of boysenberry by NMR spectroscopy”; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **2006**, 54(23), p. 8756.
4. HARBONE, J. B.; MABRY, T. J.; MABRY, H.; *The flavonoids*, Academic Press: New York, **1975**.
5. JING, P.; GIUSTI, M. M.; “Effects of extraction conditions on improving the yield and quality of an anthocyanin-rich purple corn (*Zea mays* L.) color extract”; *Journal of Food Science*; **2007**, 72(7), p. C363.
6. HARBONE, J. B.; *The Flavonoids: advanced in research since 1986*, 5th edition, Champman and Hall: New York, **1994**.
7. HARBONE, J. B.; *Comparative biochemistry of the flavonoids*, Academic Press: London, **1967**.
8. CURTRIGHT, R. D.; RYNEARSON, J. A., MARKWELL, J.; “Fruit anthocyanins: colorful sensors of molecular milieu”; *Journal of Chemical Education*; **1994**, 71(8), p. 682.
9. FRANCIS, F.J.; “Food Colorants: Anthocyanins”; *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*; **1989**, 28(4), p. 273.
10. KÄHKÖNEN, M. P.; HEINÄMÄKI, J.; OLLILAINEN, V.; HEINONEN, M.; “Berry anthocyanins: isolation, identification and antioxidant activities”; *Journal of the Science of Food and Agriculture*; **2003**, 83(14), p. 1403.

11. GRIS, E. F.; FERREIRA, E. A.; FALCÃO, L. D.; LUIZ, M. T. B.; "Influence of ferulic acid on stability of anthocyanins from Cabernet Sauvignon grapes in a model system and a yogurt system"; *International Journal of Food Science and Technology*, **2007**, 42, p. 992.
12. REVILLA, E.; RYAN, J. M.; MARTIN-ORTEGA, G.; "Comparison of several procedures used for the extraction of anthocyanins from red grapes"; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1998**, 46, p. 4592.
13. TÜRKER, N.; ERDOGDU, F.; "Effects of pH and temperature of extraction medium on effective diffusion coefficient of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* var. L.)"; *Journal of Food Engineering*, **2006**, 76(4), p. 579.
14. ASEN, S.; STEWART, R. N.; NORRIS, K. H.; "Copigmentation of anthocyanins in plant tissues and its effect on color"; *Phytochemistry*, **1972**, 11, p. 1139.
15. QUINA, F. H.; FREITAS, A. A.; MAÇANITA, A. L.; SILVA, P. F.; LIMA, J. C.; "The (photo)chemistry of anthocyanins"; *The Spectrum*, **2006**, 19(3), p. 18.
16. GONNET, J-F.; "Colour effects of co-pigmentation of anthocyanins revisited – 2. A colorimetric look at the solutions of cyanin co-pigmented by rutin using the CIELAB scale"; *Food Chemistry*, **1999**, 66, p. 387.
17. TURKER, N.; AKSAY, S.; ISTANBULLU, O.; ARTUVAN, E.; "A study on the relation between anthocyanin content and product quality: shalgam as a model beverage"; *Journal of Food Quality*, **2007**, 30, p. 953.
18. TERCI, D. B. L.; ROSSI, A. V.; "Indicadores naturais de pH: usar papel ou solução?"; *Química Nova*, **2002**, 25(4), p. 684.
19. BROUILLARD, R.; DUBOIS, J-E.; "Mechanism of the structural transformations of anthocyanins in acidic media"; *Journal of the American Chemical Society*, **1977**, 99(5), p. 1359.
20. TERCI, D. B. L.; "Aplicações analíticas e didáticas de antocianinas extraídas de frutas"; Tese de Doutorado; Instituto de Química - UNICAMP, Campinas, São Paulo, **2004**.

21. COUTO, A. B.; RAMOS, L. A.; CAVALHEIRO, E. T. G.; “Aplicação de pigmentos de flores no ensino de química”; *Química Nova*; **1998**, 21(2), p. 221.
22. PALOMBINO, D. D.; “Extração, purificação e isolamento de antocianinas de jambolão (*Syzygium cumini*) e avaliação de seus efeitos biológicos”; Dissertação de Mestrado; Instituto de Química - UNICAMP, Campinas, São Paulo, **2006**.
23. HASSIMOTTO, N. M. A.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M.; “Identification and characterisation of anthocyanins from wild mulberry (*Morus Nigra* L.) growing in Brazil”; *Food Science and Technology International*; **2007**, 13(1), p. 17.
24. JAYAPRAKASAM, B.; OLSON, L. K.; SCHUTZKI, R. E.; TAI, M. H.; NAIR, M. G.; “Amelioration of obesity and glucose intolerance in high-fat-fed C57BL/6 mice by anthocyanins and ursolic acid in cornelian cherru (*Cornus mas*)”; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **2006**, 54, p. 243.
25. BRITO, E. S.; 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*; **2007**, 55, p. 9389.
26. MISHRA, D. K.; DOLAN, K. D.; YANG, L.; “Confidence intervals for modeling anthocyanin retention in grape pomace during nonisothermal heating”; *Journal of Food Science*; **2008**, 0. Publicado online em 12/12/2007.
27. VINOKUR, Y.; RODOV, V.; REZNICK, N.; GOLDMAN, G.; HOREV, B.; UMIEL, N.; FRIEDMAN, H.; “Rose Petal Tea as an antioxidant-rich beverage: cultivar effects”; *Journal of Food Science*; **2006**, 71(1), p. S42.
28. CAMIRE, M. E.; DOUGHERTY, M. P.; TEH, Y-H.; “Frozen wild blueberry-tofu-soymilk desserts”; *Journal of Food Science*; **2006**, 71(2), p. S119.
29. WROLSTAD, R. E.; LEE, J.; “Extraction of anthocyanins and polyphenolics from blueberry processing waste”; *Journal of Food Science*; **2004**, 69(7), p. C564.

30. ISLAM, S.; "Sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) leaf: its potential effect on Human health and nutrition"; *Journal of Food Science*; **2006**, 71(2), R13.
31. KRAFT, T. F. B.; SCHMIDT, B. M.; YOUSEF, G. G.; KNIGHT, C. T. G.; CUENDET, M.; KANG, Y-H.; PEZZUTO, J. M.; SEIGLER, D. S.; LILA, M. A.; "Chemopreventive potential of wild lowbush blueberry fruits in multiple stages of carcinogenesis"; *Journal of Food Science*; **2005**, 70(3), p. S159.
32. BARROS, F. A. R.; STRINGHETA, P. C.; "Microencapsulamento de antocianinas"; *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*; **2006**, 36, p. 273.
33. ARAÚJO, J. M. A.; *Química de alimentos: teoria e prática*, 2ª edição, Editora UFV: Viçosa, **1999**.
34. LORENZI, H.; BACHER, L. B.; LACERDA, M. T. C.; SARTORI, S. F.; *Frutas Brasileiras e Exóticas Cultivadas (de consumo in natura)*, Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda: São Paulo, **2006**.
35. SILVA, S.; TASSARA, H.; *Frutas Brasil Frutas*, Empresa das Artes: São Paulo, **2005**.
36. <<http://www.wikipidedia.org>>. Acesso em 01 de fev. 2008.
37. <<http://www.143.107.240.36/portal/Result2000/neto/frutas.htm>>. Acesso em 12 de jan. 2008.
38. <<http://www.agrov.com/vegetais/frutas/amora.htm>>. Acesso em 12 de jan. 2008.
39. <<http://www.portaldoagronegocio.com.br>>. Acesso em 12 de jan. 2008.
40. <<http://www.marinaheise.spaces.live.com>>. Acesso em 12 de jan. 2008.
41. JAIN, M. C.; SESHADRI, T. C.; "Anthocyanins of *Eugenia jambolana* fruits"; *Indian Journal of Chemistry*; **1975**, 13, p. 20.
42. BOBBIO, F. O.; SCAMPARINI, A. R. P.; "Carbohydrates, organic acids and anthocyanin of *Eugenia jambolana* Lamarck"; *Industrie Alimentari*; **1982**, 21, p. 296.

- 43.** REYES-CARMONA, J.; YOUSEF, G. G.; MARTÍNEZ-PENICHE, R. A.; LILA, M. A.; “Antioxidant Capacity of fruit extracts of blackberry (*Rubus* sp.) produced in different climatic regions”; *Journal of Food Science*; **2005**, 70(7), p. S497.
- 44.** AGATI, G.; MEYER, S.; MATTEINI, P.; CEROVIC, Z. G.; “Assessment of anthocyanins in grape (*Vitis vinifera* L.) berries using a noninvasive chlorophyll fluorescence method”; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **2007**, 55(4), p. 1053.
- 45.** OKI, T.; KOBAYASHI, M.; NAKAMURA, T.; OKUYAMA, A.; MASUDA, M.; SHIRATSUCHI, H.; SUDA, I.; “Changes in radical-scavenging activity and components of mulberry fruit during maturation”; *Journal of Food Science*; **2006**, 71(1), p. C18.
- 46.** MORI, T.; SAKURAI, M.; SHIGETA, J-I.; YOSHIDA, K.; KONDO, T.; “Formation of anthocyanins from cells cultured from different parts of strawberry plants”; *Journal of Food Science*; **1993**, 58(4), p. 788.
- 47.** MADHAVI, D. L.; SMITH, M. A. L.; BERBER-JIMÉNEZ, M. D.; “Expression of anthocyanins in callus cultures of cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait)”; *Journal of Food Science*; **1995**, 60(2), p. 351.
- 48.** HUGHES, N. M.; MORLEY, C. B.; SMITH, W. K.; “Coordination of anthocyanin decline and photosynthetic maturation in juvenile leaves of three deciduous tree species”; *New Phytologist*; **2007**, 175, p. 675.
- 49.** CHAOVANALIKIT, A.; WROLSTAD, R. E.; “Total anthocyanins and total phenolics of fresh and processed cherries and their antioxidant properties”; *Journal of Food Science*; **2004**, 69(1), p. FCT67.
- 50.** NICOUÉ, E. E.; SAVARD, S.; BELKACEMI, K.; “Anthocyanins in wild blueberries of Quebec: extraction and identification”; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **2007**, 55(14), p. 5626.
- 51.** KIM, S.; PARK, J.; HWANG, I. K.; “Composition of main carotenoids in Korean red pepper (*Capsicum annuum*, L.) and changes of pigment stability during the drying and storage process”; *Journal of Food Science*; **2004**, 69(1), p. FCT39.

- 52.** JU, Z. Y.; HOWARD, L. R.; “Subcritical water and sulfured water extraction of anthocyanins and other phenolics from dried red grape skin”; *Journal of Food Science*; **2005**, 70(4), p. S270.
- 53.** MURAKAMI, M.; YAMAGUCHI, T., TAKAMURA, H.; MATOBA, T.; “Effects of thermal treatment on radical-scavenging activity of single and mixed polyphenolic compounds”; *Journal of Food Science*; **2004**, 69(1), p. FCT7.
- 54.** AURELIO, D-L.; EDGARDO, R. G.; NAVARRO-GALINDO, S.; “Thermal kinetic degradation of anthocyanins in a roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. cv. ‘Criollo’) infusion”; *International Journal of Food Science and Technology*; **2008**, 43, p. 322.
- 55.** FOSSEN, T.; CABRITA, L.; ANDERSEN, O. M.; “Colour and stability of pure anthocyanins influenced by pH including the alkaline region”; *Food Chemistry*; **1998**, 63(4), p. 435.
- 56.** TSAI, P-J.; HSIEH, Y-Y.; HUANG, T-C.; “Effect of sugar on anthocyanin degradation and water mobility in a Roselle anthocyanin model system using ^{17}O NMR”; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **2004**, 52, p. 3097.
- 57.** CABRITA, L.; FOSSEN, T.; ANDERSEN, O. M.; “Colour and stability of the six common anthocyanidin 3-glucosides in aqueous solutions”; *Food Chemistry*; **2000**, 68, p. 101.
- 58.** VEAZIE, P. P.; COLLINS, J. K.; “Quality of erect-type blackberru fruit after short intervals of controlled atmosphere storage”; *Postharvest Biology and Technology*; **2002**, 25, p. 235.
- 59.** IACOBUCCI, G. A.; SWEENY, J. G.; “The chemistry of anthocyanins, anthocyanidins, and related flavilium salts”; *Tetrahedron Letters*; **1983**, 39, p. 3005.
- 60.** FANG, Z.; ZHANG, M.; SUN, Y.; SUN, J.; “How to improve bayberry (*Myrica rubra* Sieb. Et Zucc.) juice color quality: effect of juice processing on bayberry anthocyanins and polyphenolics”; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **2006**, 54(1), p. 99.
- 61.** SOUSA, I.; RICARDO-DA-SILVA, J. M.; LAUREANO, O.; “Inativação da enzima polifenoloxidase em bagos de uva para preservação da cor e dos compostos fenólicos em

produtos derivados da uva”; Anais do X Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia, Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul, 105-114, **2003**.

62. 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*; **2005**, 70(1), S79.

63. 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*; **2007**, 72, p. 247.

64. KRIFI, B.; CHOUTEAU, F.; BOUDRANT, J.; METCHE, M.; “Degradation of anthocyanins from blood orange juices”; *International Journal of Food Science and Technology*; **2000**, 35, p. 275.

65. 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*; **2007**, 55(22), p. 9074.

66. BOYLES, M. J.; WROLSTAD, R. E.; “Anthocyanin composition of red raspberry juice: influences of cultivar, processing, and environmental factors”; *Journal of Food Science*; **1993**, 58(5), p. 1135.

67. RICHARDS, J. W.; *Introduction to Industrial Sterilization*, Academic Press: London, **1968**.

68. BANERJIE, K.; CHEREMISINOFF, P. N.; *Sterilization Systems*, Technomic Publishing Co.: Lancaster, **1985**.

69. FULEKI, T.; RICARDO-DA-SILVA, J. M.; “Effects of cultivar and processing method on the contents of catechins and procyanidins in grape juice”; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **2003**, 51(3), p. 640.

70. BEHMER, M. L. A.; *Tecnologia do Leite*, 8ª edição, Livraria Nobel: São Paulo, **1978**.

- 71.** PINTO, C. R. G.; “Modelamento matemático do processo de esterilização de alimentos conditivos em embalagem de vidro”; Dissertação de Mestrado; Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP, Campinas, São Paulo, **2003**.
- 72.** TAKESHITA, M.; “Obtenção de um extrato aromático de camarão a partir de seus resíduos industriais”; Dissertação de Mestrado; Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP, Campinas, São Paulo, **1981**.
- 73.** PACHECO, C. P.; “Validação do processo de esterilização para polpa de tomate em unidade UHT”; Dissertação de Mestrado; Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP, Campinas, São Paulo, **2001**.
- 74.** MARCOLINO, V. A.; “Quantificação de leveduras, bolores comuns e termoresistentes em linha de processamento asséptico de bebida de uva”; Dissertação de Mestrado; Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP, Campinas, São Paulo, **2003**.
- 75.** ABDEL-AAL, EI-S. M.; HUCL, P.; “Composition and Stability of Anthocyanins in Blue-Grained Wheat”; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**, 51, p. 2174.
- 76.** FREITAS, C. A. S.; MAIA, G. A.; SOUSA, P. H. M.; BRASIL, I. M.; PINHEIRO, A. M.; “Storage stability of acerola tropical fruit juice obtained by hot fill method”; *International Journal of Food Science and Technology*, **2006**, 41, p. 1216.
- 77.** GIUSTI, M.M.; WROLSTAD, R.E.; “Characterization of red radish anthocyanins”; *Journal of Food Science*; **1996**, 61(2), p. 322.
- 78.** PRICE, C. L.; WROLSTAD, R. E.; “Anthocyanin pigments of royal Okanogan huckleberry juice”; *Journal of Food Science*; **1995**, 60(2), p. 369.
- 79.** GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E.; “Radish anthocyanin extract as a natural red colorant for Maraschino cherries”; *Journal of Food Science*; **1996**, 61(4), p. 688.
- 80.** DEMEAUX, M.; BIDAN, P.; “Study of inactivation of grape juice polyphenoloxidase by heat”; *Annales de Technologie Agricole*; **1967**, 16, p. 75.

81. DOGAN, M.; ARSLAN, O.; DOGAN, S.; "Substrate specificity, heat inactivation and inhibition of polyphenol oxidase from different aubergine cultivars"; *International Journal of Food Science and Technology*; **2002**, 37, p. 415.
82. Documentos e Protocolos de Esterilização do Grupo CentroFlora enviados via email por Maria Célia Hibari Reimberg em 08/06/2007.
83. <<http://www.cena.usp.br/irradiacao/conservacao.htm>>. Acesso em 05 de fev. 2008.
84. <<http://www.bioquimica.ffmpega.edu.br/pg2/tecnologia/conservacaocalor.pdf>>. Acesso em 05 de fev. 2008.
85. EVANGELISTA, J.; *Tecnologia de Alimentos*, 2ª edição, Atheneu: São Paulo, **2001**.
86. 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 Chemistry*; **1987**, 11(4), p. 279.
87. SADILOVA, E.; STINTZING, F. C.; CARLE, R.; "Thermal degradation of acylated and nonacylated anthocyanins"; *Journal of Food Science*; **2006**, 71(8), C504.
88. KRAEMER-SCHAFTHALTER, A.; FUCHS, H.; PFANNHAUSER, W.; "Solid-phase extraction (SPE) – a comparison of 16 materials for the purification of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* var Nero"; *Journal of the Science of Food and Agriculture*; **1998**, 78, p. 435.
89. SIRIWOHARN, T.; WROLSTAD, R. E.; "Polyphenolic composition of marion and evergreen blackberries"; *Journal of Food Science*; **2004**, 69(4), p. C233.
90. SUÁREZ, B.; PICINELLI, A.; MANGAS, J. J.; "Solid-phase extraction and high-performance liquid chromatographic determination of polyphenols in apple musts and ciders"; *Journal of Chromatography A*; **1996**, 727, p. 203.
91. ORDAZ-GALINDO, A.; WESCHE-EBELING, P.; WROLSTAD, R. E.; RODRIGUEZ-SAONA, L.; ARGAIZ-JAMET, A.; "Purification and identification of capulin (*Prunus serotina* Ehrh) anthocyanins"; *Food Chemistry*; **1999**, 65, p. 201.

- 92.** SKREDE, G.; WROLSTAD, R. E.; DURST, R. W.; "Changes in anthocyanins and polyphenolics during juice processing of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.)"; *Journal of Food Science*; **2000**, 65(2), p. 357.
- 93.** HARBONE, J. B.; "Review: The chromatographic identification of anthocyanin pigments"; *Journal of Chromatography*; **1958**, 1, p. 473.
- 94.** DU, C. T.; WANG, P. L.; FRANCIS, F. J.; "Anthocyanins of ornamental cherries"; *Journal of Food Science*; **1975**, 40, p. 1142.
- 95.** FRANCIS, F. J.; "Detection of enocyanin in cranberry juice cocktail by color an pigment profile"; *Journal of Food Science*; **1985**, 50, p. 1640.
- 96.** MAZZA, G.; VELIOGLU, Y. S.; "Anthocyanins and other phenolics compounds in fruits of red-flesh apples"; *Journal of Food Science*; **1992**, 43, p. 113.
- 97.** 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*; **2002**, 25, p. 680.
- 98.** DUSSI, M. C.; SUGAR, D.; WROLSTAD, R. E.; "Characterizing and quantifying anthocyanins in red pears and the effect of loght quality on fruit color"; *Journal of American Society for Horticultural Science*; **1995**, 120, p. 785.
- 99.** OLIVEIRA, J. S.; "Caracterização, extração e purificação por cromatografia de compostos de urucum (*Bixa orellana* L.)"; Tese de Doutorado; Engenharia Química - UFSC, Florianópolis, Santa Catarina, **2005**.
- 100.** DURST, R. W.; WROLSTAD, R. E.; "Anthocyanins: Separation and Characterization of Anthocyanins by HPLC"; *In Current Protocols in Food Analytical Chemistry*; Protocol F1.3; John Wiley and Sons: London, **2001**.
- 101.** COSTA, C. T.; HORTON, D.; MARGOLIS, S. A.; "Analysis of anthocyanins in foods by liquid chromatography, liquid chromatography-mass spectrometry and capillary electrophoresis"; *Journal of Chromatography A*; **2000**, 881, p. 403.

- 102.** SU, Q.; ROWLEY, K. G.; BALAZA, N. D. H.; “Carotenoids: separation methods applicable to biological samples”; *Journal of Chromatography B*; **2002**, 781, p. 393.
- 103.** TIAN, Q.; AZIZ, R.M.; STONER, G. D.; SCHWARTZ, S. T.; “Anthocyanin determination in black raspberry (*Rubus occidentalis*) and biological specimens using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry”; *Journal of Food Science*; **2005**, 70(1), p. C43.
- 104.** GOIFFON, J. P.; MOULY, P. P.; GAYDOU, E. M.; “Anthocyanic pigment determination in red fruit juices, concentrated juices and syrups using liquid chromatography”; *Analytica Chimica Acta*; **1999**, 382, p. 39.
- 105.** PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A.; “Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas”; *Química Nova*; **2002**, 25(1), p. 45.
- 106.** SHUI, G.; LEONG, L. P.; “Separation and determination of organic acids and phenolic compounds in fruit juices and drinks by high-performance liquid chromatography”; *Journal of Chromatography A*; **2002**, 977, p. 89.
- 107.** BAGLIO, D.; KOTIZIAS, D.; LARSEN, B. R.; “Atmospheric pressure ionisation multiple mass spectrometric analysis of pesticides”; *Journal of Chromatography A*; **1999**, 854, p. 207.
- 108.** WOLFENDER, J-L.; RODRÍGUES, S.; HOSTETTMANN, K.; “Liquid chromatography coupled to mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy for the screening of plant constituents”; *Journal of Chromatography A*; **1998**, 794, p. 299.
- 109.** SUZUKI, T.; KIM, S-J.; MOHAMED, Z. I. S.; MUKASA, Y.; TAKIGAWA, S.; MATSUURA-ENDO, C.; YAMAUCHI, H.; HASHIMOTO, N.; NODA, T.; SAITO, T.; “Structural identification of anthocyanins and analysis of concentrations during growth and flowering in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) petals”; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **2007**, 55(23), p. 9571.
- 110.** WU, X.; PRIOR, R. L.; “Identification and characterization of anthocyanins by high-performance liquid chromatography-electrspray ionization-tandem mass spectrometry in

common foods in the United States: vegetables, nuts, and grains”; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **2005**, 53(8), p. 3101.

111. KOPONEN, J. M.; HAPPONEN, A. M.; MATTILA, P. H.; TÖRRÖNEN, A. R.; “Contents of anthocyanins and ellagitannins in selected foods consumed in Finland”; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **2007**, 55, p. 1612.

112. WANG, H.; RACE, E. J.; SHRIKHANDE, A. J.; “Characterization of anthocyanins in grape juices by ion trap liquid chromatography-mass spectrometry”; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **2003**, 51, p. 1839.

113. ABDEL-AAL, EI-S. M.; YOUNG, J. C.; RABALSKI, I.; “Anthocyanin composition in black, bleu, pink, purple, and red cereal grains”; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **2006**, 46, p. 4592.

114. SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; “*Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*”, 6ª edição, Editora LTC: Rio de Janeiro, **2000**.

115. ROSSO, V. V.; MERCADANTE, A. Z.; “HPLC-PDA-MS/MS of anthocyanins and carotenoids from dovyalis and tamarillo fruits”; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **2007**, 55(22), p. 9135.

116. LI, H-J.; DEINZER, M. L.; “Tandem mass spectrometry for sequencing proanthocyanidins”; *Analytical Chemistry*; **2007**, 79, p. 1739.

117. CREWS, P.; RODRÍGUES, J.; JASPAR, M.; *Organic Structure Analysis*, Oxford University Press: New York, **1998**.

118. AEBERSOLD, R.; MANN, M.; “Mass spectrometry – based proteomics”; *Nature*; **2003**, 422, p. 198.

119. <http://www.iqsc.usp.br/iqsc/grupos_pesquisa/dfq/qopn/cursoEM-2.pdf>. Acesso em 06 de fev. 2008.

120. DOMON, B.; AEBERSOLD, R.; “Review: Mass spectrometry and protein analysis”; *Science*; **2006**, 312, p. 212.

- 121.** Manual do equipamento Espectrômetro de Massas Micromass tipo quadrupolo-tempo de voo Q-Tof Micro.
- 122.** FAVARO, M. M. A.; “Extração, estabilidade e quantificação de antocianinas de frutas típicas brasileiras para aplicação industrial como corantes”; Dissertação de Mestrado; Instituto de Química - UNICAMP, Campinas, São Paulo, **2008**.
- 123.** SAMPAIO, P.G.; ROSSI, A. V.; Livro de Resumos 14º Encontro Nacional de Química Analítica, João Pessoa, Paraíba, CR083, **2007**.
- 124.** KIM, S. J.; MAEDA, T.; SARKER, M. Z. I.; TAKIGAWA, S.; MATSUURA-ENDO, C.; YAMAUCHI, H.; MUKASA, Y.; SAITO, K.; HASHIMOTO, N.; NODA, T.; SAITO, T.; SUZUKI, T.; “Identification of anthocyanins in the sprouts of buckwheat”; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **2007**, 55(15), p. 6314.
- 125.** MENG, L.; LOZANO, Y.; BOMBARDA, I.; GAYDON, E.; LI, B.; “Anthocyanin and flavonoid production from *Perilla frutescens*: Pilot plant scale processing including cross-flow microfiltration and reverse osmosis”; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **2006**, 54(12), p. 4297.
- 126.** MILLER, J. C.; MILLER, J. N.; *Statistics for Analytical Chemistry*, 3rd edition, Ellis Horwood: London, **1993**.
- 127.** BACCAN, N.; ANDRADE, J. C.; GODINHO, O. E. S.; BARONE, J. S.; *Química Analítica Quantitativa Elementar*, 2^a edição, Edgard Blücher: Campinas, **1985**.
- 128.** KÄHKÖNEN, M. P.; HOPIA A.; HEINONEN, M.; “Berry phenolics and their antioxidant activity”; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **2001**, 49(8), p. 4076.
- 129.** GALLAND, S.; MORA, N.; ABERT-VIAN, M.; RAKOTOMANOMANA, N.; DANGLES, O.; “Chemical synthesis of hydroxycinnamic acid glucosides and evaluation of their ability to stabilize natural colors via anthocyanin copigmentation”; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **2007**, 55(18), p. 7573.

ANEXOS

ANEXO 1: Avaliação de Vazão da Capela pela Comissão de Segurança do Instituto de Química da UNICAMP.



Diretoria de Segurança do Trabalho –
Instituto de Química

Página 1 de 1

Campinas 17 de dezembro de 2007.

ST- 47 / 2007

Para:

Martha Maria Andreotti Fávaro

De:

Diretoria de Segurança do Trabalho - IQ

Ref: Avaliação de vazão de ar na capela.

Prezada Martha,

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

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

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

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

Conclusão:

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

Elizabeth Fernandes Ferreira
Diretora da Seg. do Trabalho do IQ.

Willian Felipe
Técnico em Segurança no Trabalho

ANEXO 2: Testes estatísticos utilizados para as análises dos dados.

Teste t -pareado:

O teste t -pareado tem a finalidade de comparar a exatidão entre resultados de dois métodos diferentes, utilizando-se a equação A¹²¹.

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

onde: $\overline{X}_1$ e $\overline{X}_2$ são as médias das determinações de cada método,
 s é a estimativa do desvio padrão,
 n_1 e n_2 é o número de determinações de cada método a partir das quais foi obtida a média $\overline{X}$.

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

Se o valor de $t_{\text{calculado}}$ for menor que o valor de t_{tabelado} significa que os resultados não são estatisticamente diferentes, a 95 % de confiança¹²¹.

Teste F:

O Teste F tem a finalidade de comparar a precisão de resultados, utilizando-se a equação B^{121,122}.

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

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

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

Se o valor de $F_{\text{calculado}}$ for menor que o valor de $F_{\text{crítico}}$ significa que os resultados não são estatisticamente diferentes, a 95 % de confiança^{121,122}.