

THAÍS CAROLINE BUTTOW RIGOLON

**PREDIÇÃO DO CONTEÚDO DE ANTOCIANINAS, FENÓLICOS TOTAIS E
CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS FRUTOS DE AMORA (*Rubus* sp.),
MIRTILO (*Vaccinium* sp.) E CASCA DE JABUTICABA (*Plinia jaboticaba*)
USANDO PARÂMETROS COLORIMÉTRICOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

R572p
2017

Rigolon, Thais Caroline Buttow, 1988-

Predição do conteúdo de antocianinas, fenólicos totais e capacidade antioxidante dos frutos de amora (*Rubus* sp.), mirtilo (*Vaccinium* sp.) e casca de jaboticaba (*Plinia jaboticaba*) usando parâmetros colorimétricos / Thais Caroline Buttow Rigolon. – Viçosa, MG, 2017.

xiii, 56f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Paulo César Stringheta.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Compostos bioativos. 2. Antocianinas. 3. Antioxidantes. 4. Amora. 5. Mirtilo. 6. Jaboticaba. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. II. Título.

CDD 22 ed. 664.07

THAÍS CAROLINE BUTTOW RIGOLON

**PREDIÇÃO DO CONTEÚDO DE ANTOCIANINAS, FENÓLICOS TOTAIS E
CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS FRUTOS DE AMORA (*Rubus sp.*),
MIRTILO (*Vaccinium sp.*) E CASCA DE JABUTICABA (*Plinia jaboticaba*)
USANDO PARÂMETROS COLORIMÉTRICOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 7 de julho de 2017.

Frederico A. Ribeiro de Barros
(Coorientador)

Erica Nascif Rufino Vieira
(Coorientadora)

Luciana Marques Vieira

Paulo Cesar Stringheta
(Orientador)

*Àquela que iniciou esta etapa em meus pensamentos,
morou em mim durante a maior parte,
viveu comigo as conquistas deste mestrado,
guiou-me e deu-me forças para chegar até aqui,
minha linda e amada filha Cecília Büttow Rigolon,
Pituca,
dedico.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ronaldo e Wiviane, por acreditarem em mim, me apoiarem e se orgulharem do que faço.

Aos meus *ermãos*, Sara e Ronaldo, por me divertirem, me ajudarem e serem sempre meus grandes companheiros.

Aos meus avós Elzira e Osmar, à vó Lia e a todos os meus familiares pelo apoio.

À minha sogra querida, Dirce Rigolon, por compartilhar comigo as conquistas e por torcer por mim sempre.

Ao professor Paulo Cesar Stringheta, por me orientar e caminhar comigo durante os anos de estudo e pesquisa, pelos conhecimentos compartilhados, pela amizade e por ser minha inspiração de ótimo profissional.

Ao meu coorientador, Frederico Augusto Ribeiro de Barros, por toda dedicação e ajuda com meu trabalho, por acreditar em mim e pela amizade.

À minha coorientadora, Erica Nascif Rufino Vieira, pela amizade, pela contribuição com meu trabalho e por ser sempre muito prestativa e atenciosa.

A Luciana Marques Vieira, pelo companheirismo no laboratório, pela disponibilidade de participação na banca e contribuição valiosa para melhoria do meu trabalho.

Aos meus amigos do Laboratório de Corantes Naturais e Compostos Bioativos: Juliana, Kéllen, Jeferson, Eliana, Elder, Mariana, Dani, Natália, Rita, Bárbara, Mariane e Amanda, pelo apoio, pelas discussões, pelo conhecimento compartilhado, pela ajuda nas análises, pelas melhores conversas na hora do cafezinho, pelos abraços, pelas palavras de incentivo e principalmente pela amizade. Vocês realmente fizeram meus dias muito felizes e confortantes.

Aos estagiários Matheus, Luíza e Gilmara por serem sempre prestativos e principalmente a Maria Adelaide, que fez um ótimo trabalho e tanto me ajudou.

Às minhas amigas da pós-graduação Marcela, Alessandra, Letícia e Patrícia, por estarem presentes nos momentos árduos de estudo e por compartilharem os momentos felizes de conquistas.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, pelos ensinamentos e momentos compartilhados durante o mestrado.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela formação acadêmica e profissional e pela oportunidade do mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão da bolsa de estudos.

Às digníssimas Cynthia, Gilmara e Mariana e aos picaretas Sérgio, Marcão e Ricardo por dividirem comigo as conquistas, as derrotas e por serem a família que ganhei aqui em Viçosa.

A Mércia e Serrão, por torcerem por mim, pela grande amizade que construímos e por cuidarem com tanto carinho da minha família.

Aos amigos, que carrego no coração desde a graduação, Aline, Franslaine, Laíza Martinha, Samara, Sofie e Vinícius, pelo incentivo, pela amizade e pela torcida.

Aos amigos Thiago Mendonça e Mário Cupertino por compartilharem ótimos momentos dessa caminhada e fazerem minha vida mais feliz.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para que este trabalho tivesse êxito.

E finalmente, àquele que é o meu maior incentivador, meu melhor amigo, minha torcida sempre presente, meu grande companheiro e parceiro de vida, que mais me deu motivos para sorrir, que compartilhou todos os momentos desse mestrado comigo e que me deu meu maior presente, que fez tudo ser possível e fez até o impossível, que me fez ficar e seguir em frente, que me inspira a ser uma excelente profissional, mãe e esposa, meu amor de todas as vidas, Rafael Rigolon, *ab imo pectore*, meus mais sinceros agradecimentos!

BIOGRAFIA

THAÍS CAROLINE BUTTOW RIGOLON, filha de Wiviane Aparecida da Silva Buttow e Ronaldo Büttow, nasceu em 14 de abril de 1988, em Maringá - PR.

Iniciou seus estudos em 1994 no Colégio Platão, em Maringá, e concluiu o Ensino Médio no Colégio Estadual Dr. Gastão Vidigal, também na cidade de Maringá, no ano de 2005.

Em março de 2008, ingressou na Universidade Estadual de Maringá, em Maringá, no curso de Engenharia de Alimentos. Em julho de 2009, transferiu-se para a Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa – MG, no mesmo curso, onde possuiu bolsa de monitoria, iniciação científica, entre outros trabalhos. Em fevereiro de 2010, casou-se com Rafael Gustavo Rigolon e, 4 anos depois, graduou-se Engenheira de Alimentos em agosto de 2014.

Em setembro de 2014, iniciou seu estudo na Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, também na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG. Em maio de 2016 deu a luz à sua filha linda, Cecília. Em julho de 2017, submeteu sua defesa da dissertação.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Compostos Fenólicos	3
2.2 Antocianinas.....	5
2.3 Fatores envolvidos na variação de antocianinas totais, fenólicos totais e capacidade antioxidante em frutas.....	6
2.4 Frutas em estudo	8
2.4.1 Amora	8
2.4.2 Mirtilo	10
2.4.3 Jaboticaba.....	11
2.5 Métodos para determinação de antocianinas totais, fenólicos totais e capacidade antioxidante.....	12
2.6 Colorimetria	14
2.7 Predição dos teores de antocianinas, fenólicos totais e capacidade antioxidante em frutas.....	17
3. OBJETIVOS	19
3.1 Objetivo Geral.....	19
3.2 Objetivos Específicos.....	19
4. MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1 Matéria-prima.....	20
4.2 Obtenção do extrato fenólico bruto.....	20
4.3 Purificação do extrato fenólico bruto.....	21
4.3.1 Purificação para obtenção do extrato fenólico.....	21
4.3.2 Purificação para obtenção do extrato antociânico	21
4.4 Caracterização dos extratos obtidos	22
4.4.1 Determinação de Antocianinas totais	22
4.4.2 Determinação de Fenólicos Totais.....	24
4.4.3 Determinação da Capacidade Antioxidante.....	24
4.4.4 Análise Colorimétrica	26
4.5 Delineamento Experimental e Análise Estatística	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1 Caracterização dos extratos.....	28

5.1.1	Extrato Bruto.....	28
5.1.2	Extrato Fenólico.....	31
5.1.3	Extrato Antociânico	33
5.2	Correlação entre os teores de antocianinas, fenólicos totais, e capacidade antioxidante com as coordenadas colorimétricas.....	36
5.2.1	Extrato Bruto.....	36
5.2.2	Extrato Fenólico.....	37
5.2.3	Extrato Antociânico	38
5.3	Modelos matemáticos de predição dos extratos obtidos	42
6.	CONCLUSÃO	47
	REFERÊNCIAS	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Conteúdo de vitamina C, compostos fenólicos totais e antocianinas totais em amora, mirtilo e casca de jaboticaba.	8
Tabela 2. Parâmetros colorimétricos (L^*, a^*, b^*, C^* e h^*), teor de antocianinas, compostos fenólicos e capacidade antioxidante do extrato fenólico bruto de amora, mirtilo e casca de jaboticaba.....	28
Tabela 3. Parâmetros colorimétricos (L^*, a^*, b^*, C^* e h^*), teor de antocianinas, compostos fenólicos e capacidade antioxidante do extrato fenólico de amora, mirtilo e casca de jaboticaba.....	31
Tabela 4. Parâmetros colorimétricos (L^*, a^*, b^*, C^* e h^*), teor de antocianinas, compostos fenólicos e capacidade antioxidante do extrato antociânico de amora, mirtilo e casca de jaboticaba.....	33
Tabela 5. Correlação de Pearson (r) entre os parâmetros estudados para o extrato bruto.....	39
Tabela 6. Correlação de Pearson (r) entre os parâmetros estudados para o extrato fenólico.	40
Tabela 7. Correlação de Pearson (r) entre os parâmetros estudados para o extrato antociânico.	41
Tabela 8. Equações de regressão linear múltipla, ajustada para predição do teor de antocianinas, compostos fenólicos e capacidade antioxidante dos frutos de amora, mirtilo e casca de jaboticaba usando parâmetros colorimétricos obtidas para os três extratos.	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas dos diferentes flavonoides (Adaptado de Del Rio et al., 2013).	4
Figura 2. Estrutura química das principais antocianinas (Adaptado de Cavalcanti, 2013).	5
Figura 3. (a) Criação tridimensional do sólido colorimétrico utilizado nas análises de cor. (b) Espaço tridimensional do sistema CIELab [Adaptado de Korifi <i>et al.</i>, (2013)].	16
Figura 4. (a) Amora, (b) mirtilo e (c) jabuticaba utilizados para obtenção dos extratos.	20
Figura 5. Esquema de purificação para obtenção do extrato fenólico purificado.	21
Figura 6. Esquema de purificação para obtenção do extrato antociânico.	22
Figura 7. Extrato de amora (a) bruto (b) fenólico e (c) antociânico.	34
Figura 8. Extrato de mirtilo (a) bruto (b) fenólico e (c) antociânico.	34
Figura 9. Extrato de jabuticaba (a) bruto (b) fenólico e (c) antociânico.	35

RESUMO

RIGOLON, Thaís Caroline Buttow, *M.Sc.*, Universidade Federal de Viçosa, julho de 2017. **Predição do conteúdo de antocianinas, fenólicos totais e capacidade antioxidante dos frutos de amora (*Rubus* sp.), mirtilo (*Vaccinium* sp.) e casca de jaboticaba (*Plinia jaboticaba*) usando parâmetros colorimétricos.** Orientador: Paulo Cesar Stringheta. Coorientadores: Frederico Augusto Ribeiro de Barros e Erica Nascif Rufino Vieira.

Os compostos bioativos estão presentes em diversos frutos tais como a amora (*Rubus* sp.), mirtilo (*Vaccinium* sp.) e na casca de jaboticaba (*Plinia jaboticaba*). Levando-se em consideração essas frutas e seus altos conteúdos de compostos fenólicos, a indústria de alimentos deve possuir metodologias padronizadas que possibilitem identificar rapidamente sua capacidade antioxidante e teores desses compostos, que sejam eficientes e de baixo custo. Esta pesquisa tem por objetivo a obtenção de modelos matemáticos para a predição da capacidade antioxidante e dos teores de antocianinas e compostos fenólicos totais, dos extratos bruto e purificados, das frutas amora e mirtilo e da casca de jaboticaba por meio de parâmetros colorimétricos. Inicialmente, obteve-se o extrato fenólico bruto de amora e mirtilo e de casca da jaboticaba e, posteriormente, os extratos brutos foram purificados, resultando em outros dois extratos para cada fruta (fenólico e antociânico). Os extratos foram caracterizados por meio de medidas colorimétricas (L^* , a^* , b^* , C^* e h^*), quantificação de antocianinas totais, pelos métodos pH único e pH diferencial, compostos fenólicos totais, e, capacidade antioxidante, pelos métodos ABTS, DPPH e FRAP. A correlação dos parâmetros colorimétricos, com as demais análises para todos os extratos, foi realizada pelo método de Pearson. A obtenção do modelo matemático para prever os teores de antocianinas e compostos fenólicos, e, da capacidade antioxidante, foi realizada pelo método Stepwise. O extrato fenólico bruto apresentou coloração mais clara, tons mais avermelhados e amarelos quando comparado aos extratos purificados. O extrato de mirtilo foi o que apresentou maior teor de antocianinas totais, para os dois métodos empregados. Com relação à capacidade antioxidante, tanto para o extrato bruto, quanto para o extrato fenólico, a casca de jaboticaba foi o que apresentou valor mais elevado. Já para o extrato antociânico, os valores encontrados para a capacidade antioxidante, das três frutas, não diferiram significativamente ($p > 0,05$). Os parâmetros L^* , a^* , b^* , C^* e h^* apresentaram correlação significativa, ao nível de 5% de probabilidade com os resultados obtidos para as análises de interesse, para o extrato bruto. Para o extrato fenólico, houve correlação para conteúdo de antocianinas totais com as coordenadas

colorimétricas, e, para o extrato antociânico, houve correlação entre o parâmetro hue e o conteúdo de antocianinas totais e fenólicos totais. As correlações entre os parâmetros de cor e o conteúdo de antocianinas foram, em todos os casos, negativas, demonstrando que, à medida que o conteúdo de antocianinas aumenta, os parâmetros de cor diminuem. O extrato bruto obteve correlação entre os parâmetros de cor e todas as análises realizadas, o que resultou na obtenção dos modelos matemáticos para predição com elevado r^2 para as análises de conteúdo de antocianinas, de fenólicos e as três metodologias de capacidade antioxidante. Com o extrato fenólico foi possível a obtenção do modelo matemático para prever o conteúdo de antocianinas utilizando os parâmetros colorimétricos. E para o extrato antociânico, obteve-se modelo para prever o conteúdo de antocianinas, compostos fenólicos, DPPH e FRAP com as coordenadas de cor, com r^2 pouco significativo. Dessa forma, a predição dos teores de antocianinas e compostos fenólicos totais, e, capacidade antioxidante das três frutas, para o extrato fenólico bruto, utilizando os parâmetros colorimétricos, é viável e muito promissora para economia de custos e tempo.

ABSTRACT

RIGOLON, Thaís Caroline Buttow, M.Sc., Federal University of Viçosa, July, 2017. **Prediction of anthocyanins, total phenolic content and antioxidant capacity of fruits of blackberry, blueberry and jaboticaba skin using colorimetric parameters.** Adviser: Paulo Cesar Stringheta. Co-advisers: Frederico Augusto Ribeiro de Barros e Erica Nascif Rufino Vieira.

Bioactive compounds are present in many fruits such as blackberry (*Rubus* sp.), blueberry (*Vaccinium* sp.) and jaboticaba skin (*Plinia jaboticaba*). Considering those fruits and their high content of bioactive compounds, the food industry should have standard methodologies that allow a fast identification of their antioxidant capacity, anthocyanins content and the amount of total phenolic compounds, and that would be efficient and have low cost. The objective of this research was to obtain mathematical models for the prediction of the antioxidant capacity and the anthocyanins and total phenolic contents of crude and purified extracts obtained from fruits of blackberry, blueberry and jaboticaba skins through the color parameters. Initially, the crude phenolic extracts were obtained from the blackberry, blueberry fruits and the jaboticaba skin, and then, they were purified, resulting in other two different extracts to each fruit (phenolic and anthocyanin extract). The extracts were characterized using the following analyses: Colorimetry (L^* , a^* , b^* , C^* e h^*); Total anthocyanins (unique pH and differential pH); Total phenolic content; and antioxidant capacity, by three different methods, ABTS, DPPH and FRAP. In addition, a correlation was done between the color parameters and the other analyses, for the three different extracts, using Pearson method. Mathematical models to predict anthocyanins and phenolic compounds, and antioxidant capacity, were obtained using the Stepwise method. The crude phenolic extract presented, in general, lighter coloring, more reddish and yellowish tones when compared to the purified extracts. In addition, the blueberry extract was the one that presented greater total anthocyanins content, for the two methods used. The extracts obtained from jaboticaba skins, for both the crude extract and the phenolic extract, presented the highest values of antioxidant capacity. For the anthocyanin extract, the values found for the three fruits did not differ significantly ($p > 0.05$). The parameters L^* , a^* , b^* , C^* and h^* showed significant correlation at 5% probability level with the results of the chemical analyses for the crude extract. However, for the phenolic extract, there was correlation only for the total anthocyanin content with the colorimetric parameters, and for the anthocyanin extract there was correlation between the hue

parameter and the total anthocyanin and total phenolic content. The correlations between the color parameters and the anthocyanins content were negative in all cases showing that as the anthocyanins content increases, the color parameters decrease. The crude extract had correlation between the color parameters and all the analyses done resulting in a high r^2 prediction models for the analyses of anthocyanins content, phenolics and the three antioxidant capacity methodologies. Prediction models were obtained only for the anthocyanins content when the phenolic extract was used. For the anthocyanin extract, prediction models were obtained for the anthocyanin content, phenolic compounds, DPPH and FRAP, however with a lower r^2 . Thus, the prediction of the anthocyanin content, total phenolic compounds and the antioxidant capacity of the three fruits using colorimetric parameters is viable and very promising from the point of view of reducing cost and time.

1. INTRODUÇÃO

Os consumidores têm procurado cada vez mais adotar hábitos de vida saudáveis e, com isso, se preocupam em consumir alimentos ricos em compostos bioativos, que oferecem uma variedade de benefícios à saúde. Um grupo desses compostos que vem chamando muito a atenção é o dos compostos fenólicos.

Os compostos fenólicos são os principais responsáveis pela capacidade antioxidante de frutos, atuando na prevenção do estresse oxidativo e nos processos de inibição de algumas doenças e processos inflamatórios (ROCHA et al., 2011; SÉFORA BEZERRA SOUSA; MORAIS VIEIRA; LIMA, 2011).

As chamadas frutas *berries*, como mirtilo, framboesa, amora e morango, apresentam elevado conteúdo de compostos fenólicos (KECHINSKI et al., 2010). Dentre elas, estão as antocianinas, principalmente na sua forma glicosilada (BARBA; ESTEVE; FRIGOLA, 2013; BOWEN-FORBES; ZHANG; NAIR, 2010; KAUME; HOWARD; DEVAREDDY, 2012). Outra fruta que se destaca por seu alto conteúdo de compostos fenólicos é a jabuticaba. Sua casca contém antocianinas, ácidos fenólicos, outros flavonoides (LIMA et al., 2011; SILVA et al., 2014) e vitamina C (LIMA et al., 2011). Lima et al. (2012) comprovaram alta correlação entre o teor total de compostos fenólicos, dos quais se destacam as antocianinas, e a capacidade antioxidante de frutos.

As antocianinas são muito utilizadas na indústria como corantes naturais em alimentos e na indústria de fármacos. Por esse motivo, são realizados estudos visando a melhor forma de extração, estabilização e a otimização de métodos de análises.

Nesse sentido, a indústria de alimentos deve possuir metodologias padronizadas que possibilitem determinar rapidamente sua capacidade antioxidante, teores de antocianinas e compostos fenólicos totais, que sejam eficientes e de baixo custo.

Os métodos mais utilizados para análise dos compostos bioativos de interesse nesses frutos são pH único e diferencial para quantificar antocianinas, *Folin-Ciocalteu* para quantificar fenólicos e ABTS, DPPH e FRAP para determinar a capacidade antioxidante. Com base nisso, muitos estudos (EKICI et al., 2014; HOSU; CRISTEA; CIMPOIU, 2014; PACE et al., 2013) vêm sendo realizados com o objetivo de correlacionar metodologias de análise complexas, como as descritas anteriormente, a outras mais simples, como é o caso da colorimetria, da espectroscopia de infravermelho (IR), infravermelho próximo (NIR) e da ressonância.

Alguns estudos correlacionaram teor de antocianinas em frutas com a metodologia de espectroscopia de infravermelho e infravermelho próximo (INÁCIO et al., 2013; MARIANI et al., 2015; RASINES-PEREA et al., 2015), que é uma metodologia não destrutiva e de baixo custo, obtendo resultados satisfatórios. Outros estudos correlacionaram capacidade antioxidante, conteúdo de fenólicos e carotenoides em cenouras, com a colorimetria, obtendo alta correlação entre esses fatores (PACE et al., 2013; PEREIRA, 2002).

A colorimetria é uma metodologia de análise rápida e simples, pois não utiliza reagentes e pode ser realizada de forma direta. Ela utiliza colorímetros, aparelhos que determinam os parâmetros de cor das amostras (L, a, b, por exemplo). Esses aparelhos podem ser portáteis e os valores medidos, de acordo com o sistema escolhido (CIE, CIELAB ou CIE LCH), podem ser traduzidos em mudanças físicas, como luminosidade, intensidade de cores e tonalidade, além de outros (QUEIROZ, 2015).

Visando atender às exigências do controle de qualidade dos frutos na indústria e dos pesquisadores que trabalham com melhoramento genético, facilitando as análises relacionadas aos compostos fenólicos, tornando-as rápidas e menos onerosas, e visando investigar a predição de conteúdo de compostos fenólicos e capacidade antioxidante dos frutos em questão, esta pesquisa teve como objetivo a predição da capacidade antioxidante e dos teores de antocianinas e compostos fenólicos totais dos frutos amora e mirtilo e da casca de jabuticaba, por meio dos parâmetros de cor obtidos por colorimetria em extratos brutos e purificados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Compostos Fenólicos

Compostos fenólicos constituem a maior parte dos metabólitos secundários de plantas e a maior classe de antioxidantes encontrados nelas, além de se apresentarem em grandes concentrações nas frutas e vegetais (BOUAYED; HOFFMANN; BOHN, 2011; YOU et al., 2011).

Definem-se compostos fenólicos como substâncias que possuem um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. No reino vegetal englobam desde moléculas mais simples, até outras com alto grau de polimerização (ROCHA et al., 2011). Eles possuem estruturas diversas, com uma faixa de 8000 estruturas diferentes já reportadas, e muitos são encontrados em um número limitado de espécies de plantas (DEL RIO et al., 2013).

Estes compostos podem ser classificados em flavonoides e não-flavonoides. Os flavonoides são polifenóis contendo 15 carbonos com dois anéis aromáticos conectados por uma ponte de três carbonos (estrututra C6-C3-C6). Essa subclasse engloba as flavonas, flavonóis, flavan-3-ols, isoflavonas, flavononas e, por fim, as antocianidinas, que é o grupo de grande interesse para este trabalho (Figura 1). Outro grupo de flavonoides, presentes em menor quantidade nas plantas, são as chalconas, dehidrochalconas, dehidroflavonóis, flavan-3,4-diois, cumarinas e auronas. A estrutura básica dos flavonoides pode conter numerosos substituintes, a maioria ocorre naturalmente como glicosídeos, especialmente as agliconas (DEL RIO et al., 2013).

Dentre os não-flavonoides de significância nutricional estão os ácidos fenólicos e os estilbenos. O ácido gálico é o mais comum entre os ácidos fenólicos, além do ácido elágico e entre os estilbenos, o mais comum é o resveratrol, um importante composto fenólico com alta capacidade antioxidante (DEL RIO et al., 2013).

Nas plantas, os compostos fenólicos, estão relacionados, especialmente, com a proteção, conferindo resistência aos micro-organismos e pragas. Já nos alimentos, estes compostos influenciam no valor nutricional e na qualidade sensorial, conferindo atributos como cor, textura, amargor e adstringência (ROCHA et al., 2011). Além disso, possuem elevada capacidade antioxidante, o que faz com que esses compostos atuem sobre os estresse oxidativo e nos processos de inibição de várias doenças, como

cardiovasculares, diabetes, câncer e processos inflamatórios (ROCHA et al., 2011; VIEIRA et al., 2011).

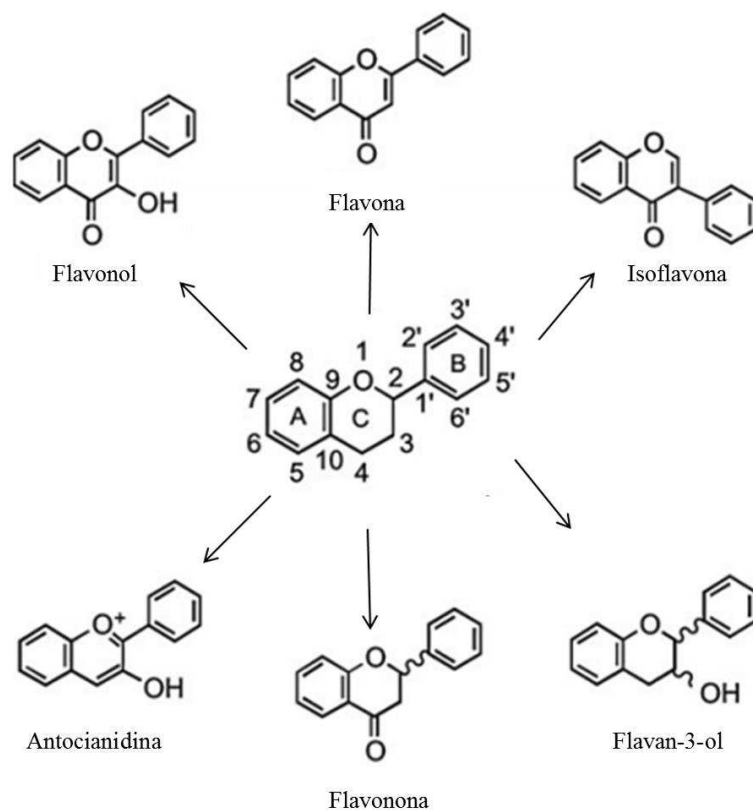


Figura 1. Estruturas dos diferentes flavonoides (Adaptado de Del Rio et al., 2013).

O conteúdo de compostos fenólicos e sua capacidade antioxidante dependem de muitos fatores, como as condições de cultivo e maturação, além do tempo e condições de armazenamento dos frutos (BOBINAIT; VIŠKELIS; VENSKUTONIS, 2012). Eles são encontrados principalmente em frutas e bebidas (sucos de frutas, chá, vinho, café, chocolate e cervejas) e, em menor extensão em vegetais, legumes e cereais (CIPRIANO, 2011).

A capacidade antioxidante do ácido ascórbico é semelhante à do Trolox, um composto muito utilizado neste tipo de análise como padrão antioxidante. Alguns polifenóis, porém, apresentam capacidade antioxidante muito superior em relação aos padrões de referência, como é o caso da cianidina, que possui 4,4 vezes mais capacidade antioxidante que o ácido ascórbico (VEBERIC et al., 2015).

Levando-se em consideração a grande diversidade química dos compostos fenólicos presentes na natureza, uma variedade de solventes é empregada na extração e uma variedade de metodologias é empregada no processo de quantificação destes

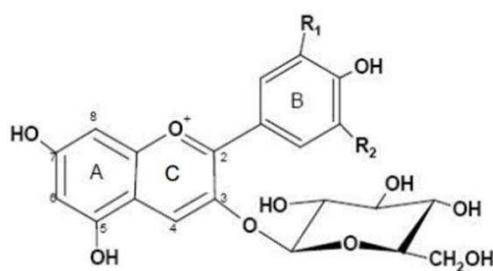
compostos. O método de *Folin-Ciocalteu* é empregado com o objetivo de detectar todas as classes de compostos poli-hidroxifenólicos e apresenta correlação com métodos usados para avaliar a capacidade antioxidante, por reagir com compostos não fenólicos que apresentam atividade antioxidante (ROCHA et al., 2011).

2.2 Antocianinas

As antocianinas constituem o maior e mais importante grupo de pigmentos naturais hidrossolúveis. Atualmente, existem mais de 635 antocianinas identificadas na natureza, que abrangem a faixa de cores entre o azul, roxo e vermelho de muitas frutas, vegetais e flores. Elas são de grande importância para as plantas, pois sua cor atrai insetos, levando à dispersão de sementes e polinização. Além disso, devido à forte absorção de luz, elas também podem ser importantes para a proteção das plantas contra danos causados por raios UV (HE; GIUSTI, 2010).

Esses pigmentos naturais são moléculas pertencentes ao grupo dos flavonoides, e são derivados da estrutura básica do cátion flavilium, constituindo em derivados polimetil e/ou polihidroxi glicosilados, que contém ligações duplas conjugadas responsáveis pela absorção de luz em torno de 500 nm, caracterizando sua cor típica, e é deficiente em elétrons sendo, por esse motivo, muito reativo (CAVALCANTI, 2013; GUIMARÃES; ALVES; FILHO, 2012).

A molécula de antocianina é constituída por duas ou três partes, uma aglicona (antocianidina), um grupo de açúcares e, geralmente, um grupo de ácidos orgânicos. São conhecidas aproximadamente 22 agliconas, das quais apenas 6 possuem importância em alimentos. São elas a pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina e malvidina.



Aglicona	R ₁	R ₂
Pelargonidina	H	H
Cianidina	OH	H
Delfinidina	OH	OH
Peonidina	OCH ₃	H
Petunidina	OCH ₃	OH
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃

Figura 2. Estrutura química das principais antocianinas (Adaptado de Cavalcanti, 2013).

Raramente encontram-se na natureza antocianinas livres, elas ocorrem comumente glicosiladas com açúcares que estabilizam a molécula (CAVALCANTI, 2013). As antocianinas são altamente instáveis e muito susceptíveis à degradação. Sua estabilidade é geralmente afetada pelas condições de processamento, incluindo pH, temperatura, luz, oxigênio, solventes, presença de enzimas, flavonoides, proteínas e íons metálicos, além de sua estrutura química (LIMA et al., 2011; TIWARI et al., 2010).

Uma alternativa para aumentar a estabilidade e os efeitos antioxidantes das antocianinas é a associação da antocianina à outras moléculas. Essa associação se faz através das reações de copigmentação, que são interações entre as antocianinas e outros compostos chamados de copigmentos, que podem ser flavonoides, alcaloides, aminoácidos, ácidos orgânicos, nucleotídeos, polissacarídeos ou metais. Essas reações são comuns na natureza, ocorrendo preferencialmente em condições ácidas, nas quais existem altas concentrações de compostos fenólicos (PORTINHO; ZIMMERMANN; BRUCK, 2012).

As antocianinas têm atraído a atenção das indústrias farmacêuticas e nutracêuticas, em parte por seu potencial poder corante natural aplicado aos alimentos processados e medicamentos. Além disso, esses compostos apresentam benefícios para a saúde humana por suas propriedades antioxidantes e por prevenir doenças crônicas degenerativas, incluindo câncer e doenças cardiovasculares (GOUVÊA et al., 2012; VEITCH; GRAYER, 2011).

2.3 Fatores envolvidos na variação de antocianinas totais, fenólicos totais e capacidade antioxidante em frutas

O conteúdo de compostos fenólicos em frutas depende de muitos fatores, como as condições de cultivo, maturação, espécies, origem geográfica e técnicas de colheita, além do tempo e condições de armazenamento (BOBINAIT; VIŠKELIS; VENSKUTONIS, 2012). No entanto, o genótipo é um dos principais fatores que determina o conteúdo de compostos bioativos em *berries* (BOBINAIT; VIŠKELIS; VENSKUTONIS, 2012). Estes fatores são extremamente relevantes para a caracterização e comparação de *berries* produzidos em climas tropicais e subtropicais, visto que são frutas de clima temperado (DE SOUZA et al., 2014).

As propriedades antioxidantes das frutas estão mais relacionadas à espécie e às condições de cultivos das mesmas, como ambiente e técnicas de manejo, além da maturidade durante a colheita, pois quanto mais maduras as frutas, menor o teor de compostos fenólicos e, conseqüentemente, menor é a capacidade antioxidante (VIZZOTTO et al., 2012). Estudos com jabuticabas, realizados por Alezandro et al., (2013), mostraram que à medida que os frutos amadureceram, a capacidade antioxidante e o conteúdo de compostos fenólicos diminuíram, mesmo as jabuticabas apresentando elevado conteúdo de antocianinas.

Até na mesma planta podem-se encontrar variações na composição quantitativa e qualitativa de compostos antioxidantes (DAWIDOWICZ; WIANOWSKA; OLSZOWY, 2012). Os flavonoides se acumulam nas cascas dos frutos e nas folhas das plantas e sua síntese é estimulada pela luz. Isso explica as diferenças de composição entre os frutos da mesma planta, uma vez que aqueles que recebem maior incidência de luz, tendem a ter uma síntese maior destes compostos (PAES et al., 2014).

Segundo Chavarria et al. (2011), frutos de jabuticabeiras cultivados em solos com menor disponibilidade hídrica apresentam maior teor de polifenóis totais, porém, há um menor crescimento da planta e menor rendimento em frutos.

Rodrigues et al. (2011) realizaram estudos utilizando diferentes cultivares de mirtilo produzidos no Brasil. Os mirtilos apresentaram variação no conteúdo de compostos fenólicos e na capacidade antioxidante de acordo com a região e a cultivar, comprovando que estes são fatores que influenciam nas características da fruta.

Moro (2013) mostrou que a utilização de alguns hormônios na produção de frutas influenciou a síntese de antocianinas em framboesas, o que já havia sido identificado em morangos e uvas, mostrando que a utilização de hormônios é uma técnica promissora para geneticistas no melhoramento de outras plantas.

Contudo, é muito importante conhecer o teor de antioxidantes em alimentos, com o objetivo de minimizar alterações e, conseqüentemente, perdas de valor comercial e nutricional. Para tanto, há a necessidade de um método rápido e eficiente para a determinação do potencial de capacidade antioxidante nos alimentos (KEDARE; SINGH, 2011).

2.4 Frutas em estudo

Para este trabalho, foram estudadas frutas com elevado conteúdo de compostos fenólicos e que apresentam em sua composição as antocianinas. São elas a amora, o mirtilo e a casca de jabuticaba.

Na tabela 1, são mostrados os principais constituintes de interesse dessas frutas e posteriormente, segue a descrição mais detalhada de cada fruta.

Tabela 1. Conteúdo de vitamina C, compostos fenólicos totais e antocianinas totais em amora, mirtilo e casca de jabuticaba.

Vitamina C (mg/100g)	Amora	21	(KAUME; HOWARD; DEVAREDDY, 2012)
	Mirtilo	190	(BARCIA et al., 2010)
	Jabuticaba	250	(LIMA et al., 2011)
Compostos fenólicos totais (mgEAC/100g)	Amora	248-633	(SARIBURUN et al., 2010)
	Mirtilo	944	(HUANG et al., 2012)
	Jabuticaba	636	(SILVA et al., 2010)
Antocianinas totais (mg/100g)	Amora	70-201	(KAUME; HOWARD; DEVAREDDY, 2012)
	Mirtilo	243,8	(HUANG et al., 2012)
	Jabuticaba	48	(SILVA et al., 2010)

2.4.1 Amora

A produção de amora (*Rubus* sp.) teve início na Europa, no século XVII e, a partir daí, se espalhou para os outros continentes (KAUME; HOWARD; DEVAREDDY, 2012; VIZZOTTO; PEREIRA, 2011). No Brasil, as primeiras amoreiras foram introduzidas, em 1972, pela Embrapa Clima Temperado, de Pelotas-RS, que selecionou cultivares adaptados para cultivo (VIZZOTTO; PEREIRA, 2011). Desde então, seu cultivo vem crescendo nos estados do Rio Grande do Sul, São Paulo e Minas Gerais, com introdução e adaptação de novos cultivares (HIRSCH et al., 2012).

A amoreira é uma espécie arbustiva de porte ereto ou rasteiro, bem adaptada às regiões com inverno bem definido, de clima temperado e subtropical (HIRSCH et al., 2012; JACQUES et al., 2010). Produz frutos agregados com massa entre 4 e 7 gramas, de coloração negra e de sabor ácido a doce-ácido (HIRSCH et al., 2012).

As amoras são principalmente consumidas frescas, mas, como possuem alta taxa respiratória e, conseqüentemente, pequena vida de prateleira, são preferencialmente

vendidas congeladas, a granel, em polpas e em sucos concentrados (FERRARI; GERMER; DE AGUIRRE, 2012; JACQUES et al., 2010; KAUME; HOWARD; DEVAREDDY, 2012). Na indústria, são utilizadas para produção de suplementos dietéticos, sorvetes, geleias, doces, vinhos, entre outros (BOWEN-FORBES; ZHANG; NAIR, 2010; KAUME; HOWARD; DEVAREDDY, 2012).

O cultivo da amoreira se destaca por ser uma das opções de espécies frutíferas com grandes perspectivas de aumento de produção. Por seu baixo custo de implantação e de manutenção do pomar e, ainda, pela reduzida utilização de defensivos agrícolas, sua cultura se demonstra muito promissora para cultivo na agricultura familiar. Ela apresenta retorno rápido, pois inicia sua produção no segundo ano de plantio, proporcionando ao pequeno produtor opções de renda pela destinação do produto ao mercado *in natura* e como matéria-prima para indústrias processadoras de alimentos (JACQUES; ZAMBIAZI, 2011).

A amora contém cerca de 85% de água, 10% de carboidratos, vitaminas do complexo B e A e compostos bioativos (HIRSCH et al., 2012). Ela é rica em compostos fenólicos, contendo ácidos fenólicos, taninos, estilbenos, flavonoides e antocianinas (DE SOUZA et al., 2014; MACHADO et al., 2015; SARIBURUN et al., 2010). Além disso, apresentam outros fitoquímicos como vitaminas C e E, ácido elágico e ácido fólico e minerais, especialmente o ferro (BOWEN-FORBES; ZHANG; NAIR, 2010; DE SOUZA et al., 2014). A composição química da amora pode variar em função da variedade, condições de cultivo, estágio de maturação e condições de armazenamento (KAUME; HOWARD; DEVAREDDY, 2012).

Compostos fenólicos presentes nas amoras, conferem-nas alta atividade antioxidante, demonstrando correlação entre esse parâmetro e o conteúdo total de fenólicos e antocianinas (FERRARI; GERMER; DE AGUIRRE, 2012; SARIBURUN et al., 2010). Essa característica demonstra seu potencial na dieta humana sendo muito utilizada em várias aplicações medicinais (BOWEN-FORBES; ZHANG; NAIR, 2010).

As antocianinas majoritárias presentes na amora são a cianidina-3-glicosídeo e cianidina-3-rutinosídeo. Porém, nela encontram-se também, em menor quantidade, cianidina-3-galactosídeo, cianidina-3-xilosídeo e cianidina-3-arabnosídeo (BOWEN-FORBES; ZHANG; NAIR, 2010; KAUME; HOWARD; DEVAREDDY, 2012; MACHADO et al., 2015).

2.4.2 Mirtilo

O mirtilo é uma fruta da família das Ericáceas, subfamília Vaccinoideae e gênero *Vaccinium*. Ele é nativo da América do Norte e de algumas regiões frias da Europa, onde é muito apreciado por seu sabor exótico e sua coloração azulada (PELEGRINE et al., 2012; STÜLP; GNAS; CLEMENTE, 2014).

O Brasil apresenta grande potencial de cultivo dessa fruta. Uma das vantagens é o expressivo ganho do produtor, pois a cultura se adapta a pequenas áreas de cultivo, com alta produção por área plantada. Além disso, há grande interesse do mercado consumidor, tanto para consumo interno, quanto para exportação. No entanto, seu cultivo está restrito apenas ao Rio Grande do Sul e às regiões serranas de Minas Gerais (PELEGRINE et al., 2012).

No Brasil, a produção anual de mirtilo é de cerca de 60 toneladas. Uma parte considerável é exportada e cerca de um terço é descartado pelas dificuldades de conservação pós-colheita e alta perecibilidade das frutas, mesmo sob refrigeração (KECHINSKI et al., 2010; PELEGRINE et al., 2012). Um dos principais fatores responsáveis pelo curto prazo de validade dessas frutas é a perda de peso, devido à perda de água, que faz com que ela murche e perca o brilho (CHIABRANDO; GIACALONE, 2011). Por esse motivo, o mirtilo é preferencialmente consumido congelado ou processado, como sucos, geleias, iogurtes entre outros (PELEGRINE et al., 2012; STÜLP; GNAS; CLEMENTE, 2014).

Entre as *berries*, o mirtilo apresenta a maior capacidade antioxidante, que está ligada ao seu conteúdo de antocianinas, principalmente nas formas glicosiladas (KECHINSKI et al., 2010). Entre as principais antocianinas encontradas nas variedades de mirtilo, estão a malvidina-3-O-galactosídeo, petunidina-3-O-galactosídeo e delphinidina-3-O-galactosídeo (BUNEA et al., 2013). O conteúdo de antocianinas pode ser associado com a intensidade da cor das *berries* e sua tonalidade, pois quanto mais azul-escuro é a fruta, como no caso do mirtilo, maior é o seu teor de antocianinas (VEBERIC et al., 2015). Além disso, o mirtilo apresenta alto conteúdo de vitaminas C e E, ácido clorogênico e outras substâncias benéficas para o organismo humano (BARBA; ESTEVE; FRIGOLA, 2013; STEVENSON; SCALZO, 2012).

O mirtilo é também conhecido como “superfruta”, por apresentar potencial nutracêutico e funcional (HUANG et al., 2012). Estudos (BARBA; ESTEVE; FRIGOLA, 2013; HUANG et al., 2012; KECINSKI et al., 2010) comprovam que a atividade antioxidante do mirtilo, ligada ao conteúdo de antocianinas, pode prevenir

doenças degenerativas neurológicas, cardiovasculares, câncer e diabetes, além de prevenir processos inflamatórios, hiperglicemia e diminuir a deposição de gordura no organismo. A presença de compostos fenólicos não antociânicos e outras impurezas, porém, interferem na avaliação das atividades biológicas dos extratos de antocianinas brutos, obtidos a partir do mirtilo *in natura*. Portanto, para essas análises, é indicada a purificação desses extratos (WANG et al., 2014).

2.4.3 Jaboticaba

A jaboticaba (ou jaboticaba) é o fruto da jaboticabeira, uma planta nativa brasileira, originária da região de Minas Gerais, que se encontra amplamente distribuída em quase todas as regiões brasileiras e também em outros países como Bolívia, Argentina, Uruguai e Peru (NUNES et al., 2014). É um fruto climatérico com casca de coloração avermelhada a roxo-escuro e polpa agridoce de cor branco-violeta, sob a forma de baga globosa, com até 3 cm de diâmetro (ALEZANDRO et al., 2013; DESSIMONI-PINTO et al., 2011; NUNES et al., 2014; SILVA et al., 2010). Dentre as espécies comerciais, destaca-se a *Plinia jaboticaba*¹, uma espécie da região de Sabará-MG, cultivada em Minas Gerais e São Paulo (NUNES et al., 2014). Seus frutos são apropriados tanto para a industrialização quanto para consumo *in natura* (VIEITES et al., 2011). Seu potencial econômico para comercialização é grande, em função das características sensoriais da fruta fresca, além de ser utilizada na fabricação de licores, geleias, vinhos e vinagres (DESSIMONI-PINTO et al., 2011; NUNES et al., 2014; VIEITES et al., 2011). Geralmente, a jaboticaba é utilizada em produtos com valores de pH mais baixos, pois seus pigmentos apresentam maior estabilidade em condições ácidas (IBRAHIM SILVA et al., 2013).

A jaboticaba é altamente perecível e, por isso, apresenta um período curto de comercialização de dois a três dias após a colheita. Isso se deve à intensa perda de umidade, deterioração e fermentação da polpa, ocorrendo principalmente pelo seu alto teor de água e açúcares (NUNES et al., 2014; VIEITES et al., 2011).

A casca da jaboticaba possui altos teores de antocianinas, taninos, ácidos fenólicos (ácido elágico) e outros flavonoides (rutina e quercetina) (IBRAHIM SILVA et al., 2013). Ela apresenta majoritariamente as antocianinas cianidina-3-glicosídeo,

¹ Muitos trabalhos tem utilizado como nome científico da jaboticaba *Myrciaria jaboticaba* (Mart.) O. Berg. (1877), no entanto os índices GBIF e Kew Royal Botanic Gardens apresentam o nome *Plinia jaboticaba* (Mart.) Kausel (1957) como aceite atualmente.

peonidina-3-glicosídeo e a delphinidina-3-glicosídeo (LIMA et al., 2011; RODRIGUES et al., 2015; SILVA et al., 2014). Além disso, apresenta altos teores de vitamina C e fibras (LEITE-LEGATTI et al., 2012; LIMA et al., 2011; RODRIGUES et al., 2015). Por esse motivo, ela é utilizada em muitos produtos como composto bioativo (DESSIMONI-PINTO et al., 2011).

Conseqüentemente, a jabuticaba também demonstra grande capacidade antioxidante (DESSIMONI-PINTO et al., 2011; SILVA et al., 2014). Com base nisso, pode-se afirmar que a jabuticaba é um potencial antioxidante e anti-inflamatório, com atividade antimutagênica e quimioprotetiva (SILVA et al., 2014).

2.5 Métodos para determinação de antocianinas totais, fenólicos totais e capacidade antioxidante

As antocianinas ocorrem comumente glicosiladas com açúcares que estabilizam a molécula (CAVALCANTI, 2013). Elas são altamente instáveis e muito susceptíveis à degradação. Sua estabilidade é geralmente afetada pelas condições de processamento, incluindo pH, temperatura, luz, oxigênio, solventes, presença de enzimas, flavonoides, proteínas e íons metálicos, além de sua estrutura química (LIMA et al., 2011; TIWARI et al., 2010).

Para extração das antocianinas dos vegetais, são utilizados solventes com adição de ácido, com o objetivo de manter o pH próximo de 2, para prevenir a oxidação. Além disso, eles são muito solúveis em solventes polares e, por isso, facilmente extraídos utilizando água, metanol e etanol (LIMA et al., 2011).

A quantificação de antocianinas é realizada por métodos espectrofotométricos, e, diferentemente dos flavonoides, que absorvem luz na região entre 350 e 380 nm, são capazes de absorver fortemente luz na região do visível, compreendida entre 496 e 550 nm. Este método é muito simples, porém, para estimar a fração real de antocianinas presente nas frutas, utiliza-se o método pH diferencial, que consiste em efetuar uma leitura espectrofotométrica do extrato em tampão pH 1,0 e pH 4,5, baseando-se na sensibilidade destes compostos ao pH (FULEKI; FRANCIS, 1968a; TEIXEIRA; STRINGHETA; OLIVEIRA, 2008). Esta metodologia é mais segura, porém mais trabalhosa e onerosa, quando comparada ao método de pH único, pois demanda preparo de soluções com gastos de reagentes, além de maior tempo de análise.

Alguns métodos de ensaio de eliminação de radicais livres podem fornecer informações sobre como é a capacidade antioxidante de um composto na prevenção de espécies radicais reativas (KATALINIĆ et al., 2010). São eles os métodos ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)), DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), FRAP (*Ferric Reducing Ability Power*), TRAP (*Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter*) e ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*), porém, neste trabalho, são descritos detalhadamente apenas os métodos de interesse.

Esses ensaios para determinação da capacidade antioxidante descrevem a capacidade de moléculas redox em alimentos e sistemas biológicos eliminarem os radicais livres. Esse conceito considera os efeitos aditivos e sinérgicos de todos os antioxidantes presentes na amostra, em vez do efeito dos compostos individuais, e podem, portanto, ser úteis para estudar os benefícios potenciais desses antioxidantes para saúde (FLOEGEL et al., 2011).

A maioria dos métodos emprega o mesmo princípio, no qual um composto sintético radical colorido é gerado e a capacidade de uma amostra biológica para eliminar este radical ou para reduzir o composto redox-ativo é monitorada por espectrofotometria (FLOEGEL et al., 2011).

Os métodos ABTS, DPPH e FRAP envolvem transferência de elétrons e redução de um antioxidante colorido. O ensaio ABTS é baseado na geração de um radical azul/verde que pode ser reduzido por antioxidantes enquanto o DPPH baseia-se na redução de um radical roxo. Ambos os ensaios são mais populares entre os métodos utilizados. O ensaio FRAP é diferente desses, pois não envolve redução de radicais livres, mas a redução de íon férrico (Fe^{+3}) para íon ferroso (Fe^{+2}), que é monitorada por espectrofotometria (FLOEGEL et al., 2011; MÜLLER; FRÖHLICH; BÖHM, 2011).

Todos os métodos de análise citados para avaliação da capacidade antioxidante demandam reagentes com custos elevados, além de preparo de soluções e curvas padrão para comparação, além de longo tempo de reação antes da leitura espectrofotométrica, o que acarreta em tempo longo de análise.

Quando aplicado na análise de alimentos, as medições de capacidade antioxidante podem ser diferentes, pois dependem do método utilizado, logo, as determinações de atividade antioxidante obtidas por cada método não devem ser comparadas entre si, somente dentro do mesmo método.

Levando-se em consideração a grande diversidade química dos compostos fenólicos presentes na natureza, uma variedade de solventes e de metodologias é

empregada no processo de extração e quantificação destes compostos. O método de *Folin-Ciocalteou* é utilizado com o objetivo de detectar todas as classes de compostos poli-hidroxifenólicos e apresenta correlação com métodos usados para avaliar atividade antioxidante, por reagir com compostos não fenólicos que apresentam atividade antioxidante (ROCHA et al., 2011).

Assim como os métodos para quantificação de antocianinas e de capacidade antioxidante, o método *Folin-Ciocalteou* também demanda o uso de reagentes, preparo de curva-padrão utilizando ácido gálico como padrão para comparação e longo tempo de reação antes da leitura espectrofotométrica.

A correlação entre os compostos fenólicos totais e a capacidade antioxidante dos frutos pode depender do método escolhido para análise, e também das características hidrofóbicas e ou hidrofílicas do sistema teste e dos antioxidantes testados. Além disso, a capacidade antioxidante dos compostos fenólicos depende de diversos fatores, como sistema oxidante, grau de glicosilação e coeficiente de partição (LIMA et al., 2011).

2.6 Colorimetria

A cor desempenha um papel muito importante na aceitabilidade dos alimentos, pois os consumidores julgam a qualidade de um produto, primeiramente, por sua cor. Por este motivo, a indústria alimentícia vem utilizando corantes para melhorar ou restaurar a aparência original de alimentos ou assegurar a uniformidade da cor (VEBERIC et al., 2015).

Para o entendimento das cores é necessário, primeiramente, compreender o que é luz. A luz visível é uma série de ondas eletromagnéticas que compreendem uma parte do espectro eletromagnético. Essas ondas possuem duas características que a descrevem, a frequência e o comprimento de onda (MARTINS; SUCUPIRA; SUAREZ, 2015).

O espectro de cores visível se inicia no vermelho, com comprimento de onda em torno de 740 nm, sendo a faixa de menor energia, e termina no violeta, com comprimento de onda em torno de 380 nm, sendo a faixa de maior energia. Existem ainda, fora do espectro visível as faixas mais próximas, o infravermelho e o ultravioleta, mas estas não conseguem interagir com o sistema de visão humano e, portanto, não geram imagens e cores no cérebro (MARTINS; SUCUPIRA; SUAREZ, 2015).

Em 1931, desenvolveu-se um sistema, pela Comissão Internacional de L'Eclairage (CIE), para especificação de sinais de cor e recomendou-o para ser utilizado em larga escala. Os três atributos da cor poderiam ser expressos como uma esfera tridimensional, expressos numericamente por um sistema de ordens de cores, podendo a cor ser quantificada e expressa de maneira objetiva e precisa (OLIVEIRA, 2011).

Com base nisso, os sistemas CIE e CIELAB para a expressão de resultados de cor, compreendem as seguintes características básicas:

- Tonalidade (Hue): Primeiro atributo de cor a ser mencionado, a tonalidade é a grandeza que caracteriza a qualidade da cor (vermelho, verde, azul, etc.), permitindo diferenciá-la e está associada a certo comprimento de onda do espectro visível;

- Saturação (Chroma): descreve a intensidade ou quantidade de uma tonalidade, indicando a proporção em que ela está misturada com o branco, preto ou cinza. Também chamada de pureza ou intensidade da cor, é a qualidade que nos permite distinguir cores fortes de fracas;

- Luminosidade (Value): caracteriza o grau de claridade da cor, indicando se as cores são claras ou escuras (RAMOS, 2007).

O sistema CIE utiliza as coordenadas X (vermelho), Y (verde) e Z (azul), por meio da transmitância por medições espectrofotométricas que, posteriormente, são transformadas matematicamente em coordenadas de cor. Esses três valores especificam as quantidades de cores para se descrever uma cor do espectro de luz visível (OLIVEIRA, 2011; RAMOS, 2007).

O sistema CIELAB, criado em 1976, é muito semelhante ao anterior, porém, utiliza coordenadas geométricas para a identificação dos parâmetros colorimétricos. Ele utiliza os parâmetros L^* , a^* e b^* , nos quais a coordenada L^* corresponde à luminosidade, que varia do valor zero, com tom menos luminoso, preto, ao valor 100 como sendo mais luminoso, incolor; a^* e b^* correspondem as coordenadas cromáticas, onde a coordenada a^* , varia do sentido negativo para o positivo, de tons verdes (-80) para tons vermelhos (+100); e a coordenada b^* , varia do sentido negativo para o positivo, entre tons azuis (-50) e amarelos (+70) (KORIFI et al., 2013; RAMOS, 2007). Os eixos de a^* e b^* formam um plano ortogonal ao eixo do L^* , como mostra a Figura 1b (OLIVEIRA, 2011).

A cor é representada por um ponto no espaço, o que permite alta precisão em sua definição. Os valores de L^* , a^* e b^* são proporcionais aos valores XYZ do sistema CIE, como segue nas equações 1, 2 e 3 (KORIFI et al., 2013).

$$L^* = 116 \times \left(\frac{Y}{Y_n}\right)^{1/3} - 16 \quad (\text{Equação 1})$$

$$a^* = 500 \left[\left(\frac{X}{X_n}\right)^{1/3} - \left(\frac{Y}{Y_n}\right)^{1/3} \right] \quad (\text{Equação 2})$$

$$b^* = 200 \left[\left(\frac{Y}{Y_n}\right)^{1/3} - \left(\frac{Z}{Z_n}\right)^{1/3} \right] \quad (\text{Equação 3})$$

Além destes sistemas, existe o sistema CIE LCH, que utiliza coordenadas cilíndricas, onde L^* indica a luminosidade exatamente como no modelo CIELAB, o valor C^* indica o croma e h^* o ângulo de tonalidade, como mostrado na Figura 1a. Essas coordenadas são obtidas pelos parâmetros a^* e b^* do sistema CIELAB (Equações 4 e 5), e o valor de L^* é o mesmo nos dois modelos (OLIVEIRA, 2011).

$$C^* = [(a^*)^2 + (b^*)^2]^{1/2} \quad (\text{Equação 4})$$

$$h = \arctan(b^*/a^*) \quad (\text{Equação 5})$$

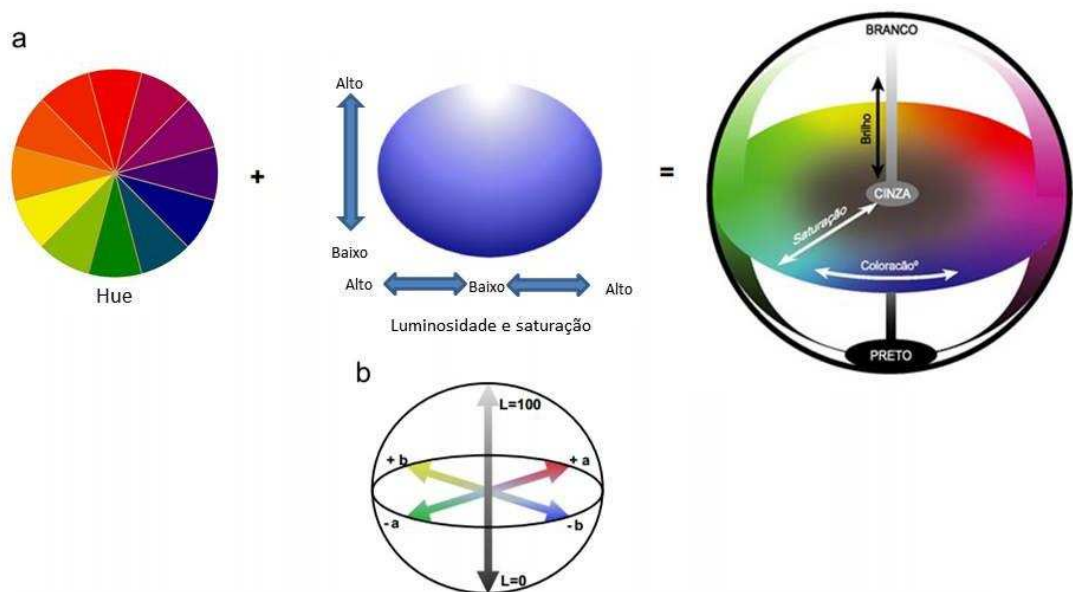


Figura 3. (a) Criação tridimensional do sólido colorimétrico utilizado nas análises de cor. (b) Espaço tridimensional do sistema CIELab [Adaptado de Korifi *et al.*, (2013)].

Os valores referentes ao parâmetro h^* (tonalidade) demonstram que o aumento do teor de antocianinas indica uma cor vermelha mais intensa, pois quanto menor o ângulo h^* , mais próximo estará do eixo a^* e com isso, mais vermelha será a coloração (LIMA; MÉLO; GUERRA, 2007).

A saturação (C^*) representa a intensidade de uma cor particular, indicando a pureza da cor em relação ao branco. Quanto mais cinza ou mais neutra for a cor, menos brilhante ou menos saturada ela é (OLIVEIRA, 2011).

A avaliação de parâmetros de cor consistente e objetiva é de grande importância para as áreas de pesquisa, desenvolvimento de produtos e controle de qualidade (GORDILLO et al., 2015; TRINDERUP et al., 2013). Nesse sentido, os sistemas descritos são muito promissores para análise de cor e correlação com outras análises.

2.7 Predição dos teores de antocianinas, fenólicos totais e capacidade antioxidante em frutas

A correlação é uma alternativa muito utilizada para predizer a relação entre dois parâmetros analíticos. Ela é muito importante para o controle de qualidade de indústrias de alimentos e para os produtores, pois torna as análises mais rápidas e diminui o uso de reagentes. Em alguns casos, ela torna a análise não destrutiva, mantendo intacto o produto e elimina a necessidade de preparação do mesmo. Nesse sentido, muitos trabalhos têm buscado metodologias novas ou menos complexas para correlacionar com parâmetros importantes para a qualidade dos alimentos.

Uma metodologia muito utilizada recentemente em estudos com predição é a tecnologia de espectroscopia com infravermelho, que é um método rápido, barato, não destrutivo e não requer o uso de solventes químicos. Mariani et al. (2015) realizaram um estudo que correlacionou o conteúdo de antocianinas de jabuticabas intactas com a espectroscopia de infravermelho, obtendo resultados promissores para predição. Inácio et al. (2013) relacionaram o teor de antocianinas de açaí e juçara com medidas de absorção de infravermelho por espectroscopia utilizando os frutos intactos com o objetivo de determinar o conteúdo antociânico sem a destruição da amostra. Dykes et al. (2014) estudaram a predição do conteúdo de fenólicos totais, tanino condensado e 3-desoxiantocianidina em sorgo integral utilizando a espectroscopia de infravermelho, obtendo resultados com grande potencial para uso na indústria de grãos. Outro estudo realizado com tecnologia de infravermelho foi feito por Andrianjaka-Camps et al. (2015), o qual obteve predição para análises físico-químicas de framboesas, utilizando espectroscopia de infravermelho combinada com métodos quimiométricos. No entanto, nesse último estudo, não foi possível predizer a quantidade de compostos bioativos,

como vitamina C, fenólicos totais e antocianinas, em função do baixo conjunto de dados utilizados.

A predição do teor de antocianinas de cascas de uvas pode ser feita através da espectroscopia de infravermelho próximo (NIR). Essa predição permite desenvolver um modelo que correlacionasse melhor o teor de antocianinas com a cor de cascas de uvas, utilizando metodologia de infravermelho. Esse modelo nos dá uma previsão da maturação fenólica do vinho e orienta na escolha do melhor período de colheita (CHEN et al., 2015). Ainda sobre estudos com vinhos, Rasines-Perea et al., (2015) desenvolveram um método de correlação entre análise com infravermelho e o potencial antociânico das uvas colhidas para prever a destinação da uva, com relação ao controle de qualidade.

Diferentemente dos estudos anteriores, Hosu, Cristea e Cimpoui (2014) realizaram um trabalho com o objetivo de criar um programa que correlacionasse características do vinho, como atividade antioxidante, com a qualidade dos vinhos, de forma a diminuir custos e tornar as análises mais eficientes.

Pace et al. (2013) realizaram estudos de predição entre atividade antioxidante ou composição fenólica e os parâmetros de cor de diferentes variedades de cenouras. Outro estudo com predição foi realizado por Pereira (2002), que relacionou os teores de carotenoides em cenoura com a sua coloração. Este estudo obteve equações para prever a melhor época de colheita das cenouras levando-se em consideração o teor de carotenoides, simplificando as análises de qualidade.

Por fim, Motta et al. (2015) obtiveram modelos matemáticos lineares que correlacionassem parâmetros de cor, determinados em colorímetros de baixo custo, com o estágio de maturação de goiaba, mamão e manga, medido pelos teores de sólidos solúveis totais, pH e consistência.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver modelos matemáticos para predição do conteúdo de antocianinas, compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante por meio de parâmetros colorimétricos.

3.2 Objetivos Específicos

- Extrair compostos fenólicos de amora, mirtilo e da casca de jabuticaba, e, purificar o extrato fenólico obtendo três extratos: bruto (EB), contendo apenas polifenóis (EP) e antocianinas (EA);

- Comparar a quantidade de antocianinas totais entre as frutas, dos três extratos;

- Comparar a quantidade de fenólicos totais entre as frutas, obtidos para os três extratos;

- Comparar capacidade antioxidante entre as frutas, para os três extratos;

- Obter correlações entre os teores de antocianinas, fenólicos totais, capacidade antioxidante e os parâmetros colorimétricos L^* , a^* , b^* , C^* e h^* , para amora, mirtilo e casca jabuticaba, em cada extrato obtido;

- Determinar modelos matemáticos para predição dos teores de antocianinas, compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante, por meio dos parâmetros colorimétricos L^* , a^* , b^* , C^* e h^* , para amora, mirtilo e casca de jabuticaba, utilizando os extratos bruto e purificados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no Laboratório de Corantes Naturais e Compostos Bioativos (LaCBio) do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Minas Gerais.

4.1 Matéria-prima

Foram utilizadas amoras (*Rubus* sp.) e mirtilos (*Vaccinium* sp.) produzidos no município de Barbacena, Minas Gerais, apresentadas nas figuras 2a. e 2b., respectivamente, além de jaboticabas (*Plinia jaboticaba* ‘Sabará’) produzidas no setor de Fruticultura do Departamento de Fitotecnia da UFV (Figura 2c.). As frutas foram colhidas, selecionadas, lavadas e armazenadas em congelador convencional a -18 °C até o momento das análises.

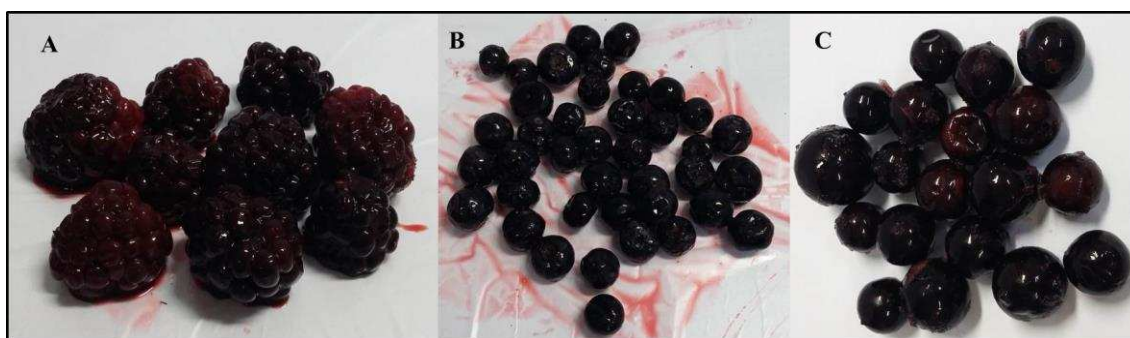


Figura 4. (a) Amora, (b) mirtilo e (c) jaboticaba utilizados para obtenção dos extratos.

4.2 Obtenção do extrato fenólico bruto

A obtenção do extrato fenólico bruto foi realizada utilizando como solvente uma solução de etanol 70% acidificada com HCl até pH 2 (SILVA, 1996). Inicialmente, foram pesados 100 g de cada fruta e, no caso da jaboticaba, 100 g de casca, que foram triturados em liquidificador e em seguida, adicionados 1000 mL de solvente, e a mistura foi posteriormente armazenada sob refrigeração ($4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) por 24 horas. Após esse período, a mistura foi filtrada em papel de filtro, Whatman nº 1, a vácuo, em funil de Büchner, e o volume completado para 1000 mL com solução extratora (etanol 70%). Posteriormente, o extrato foi concentrado em evaporador rotativo a 40 °C para remover o etanol adicionado, até se obter um volume final correspondente a 20% do volume original. Esse extrato fenólico bruto foi armazenado em frasco âmbar sob congelamento até o momento da sua análise.

4.3 Purificação do extrato fenólico bruto

4.3.1 Purificação para obtenção do extrato fenólico

Para obtenção do extrato fenólico, as amostras foram eluídas em cartucho de separação C18 (Sep-Pak Vac 35 cc – Waters), visando à remoção de interferentes (ácido ascórbico, açúcares e aminoácidos) (NORATTO et al., 2010). Inicialmente, o cartucho foi condicionado com 50 mL de metanol acidificado (0,01% de HCl) e 50 mL de água destilada acidificada (0,01% de HCl). Após isso, uma alíquota de 25 mL do extrato fenólico bruto foi eluído no cartucho de separação. Os interferentes foram, então, removidos por meio da passagem de 100 mL de água destilada acidificada (0,01% de HCl) pelo cartucho, ficando os polifenóis adsorvidos no mesmo. O extrato fenólico purificado de cada fruta foi eluído do cartucho com 50 mL de metanol (NORATTO et al., 2010).

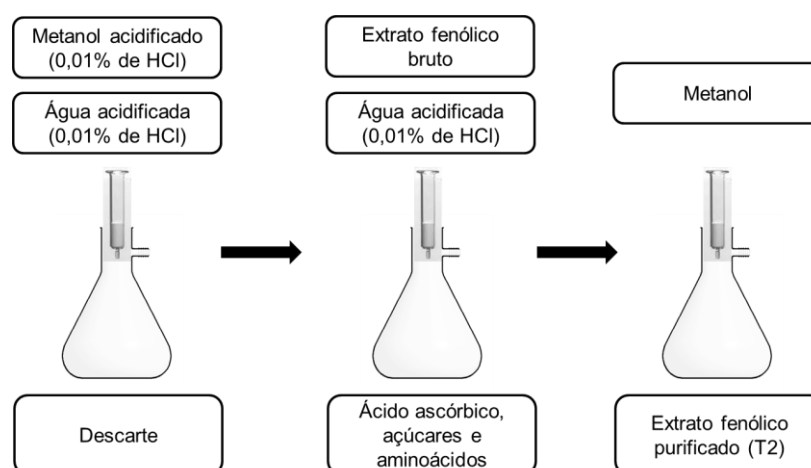


Figura 5. Esquema de purificação para obtenção do extrato fenólico purificado.

4.3.2 Purificação para obtenção do extrato antociânico

Para obtenção do extrato antociânico, as amostras foram eluídas em cartucho de separação C18 (Sep-Pak Vac 35 cc – Waters), visando a remoção de interferentes (ácido ascórbico, açúcares, aminoácidos, ácidos fenólicos e flavonóis). Inicialmente o cartucho foi condicionado com 50 mL de metanol e 75 mL de água destilada acidificada (0,01% de HCl). Após isso, uma alíquota de 25 mL do extrato fenólico bruto foi eluído no cartucho de separação. Os interferentes (ácido ascórbico, açúcares e aminoácidos) foram, então, removidos por meio da passagem de 50 mL de água destilada acidificada (0,01% de HCl) pelo cartucho, ficando os polifenóis adsorvidos no mesmo. Para

remoção dos compostos fenólicos (ácidos fenólicos e flavonóis), 50 mL de acetato de etila foram passados pelo cartucho, ficando apenas as antocianinas adsorvidas no mesmo. O extrato antociânico purificado de cada fruta foi eluído do cartucho com 50 mL de metanol (RODRIGUEZ-SAONA; WROLSTAD, 2001).

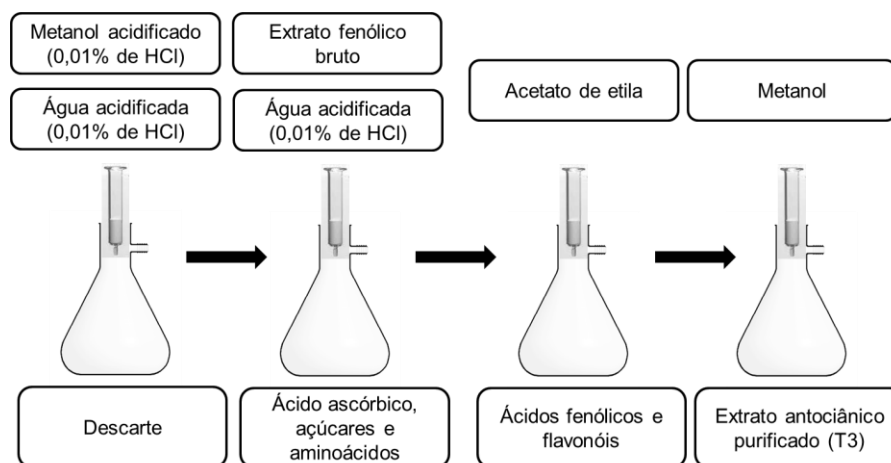


Figura 6. Esquema de purificação para obtenção do extrato antociânico.

4.4 Caracterização dos extratos obtidos

4.4.1 Determinação de Antocianinas totais

4.4.1.1 Método pH único

A determinação de antocianinas totais, pelo método pH único, foi realizada segundo o método descrito por Fuleki e Francis (1968b). Uma pequena alíquota da amostra foi diluída em etanol:HCl 1,5N (85:15) v/v e realizou-se a leitura em espectrofotômetro UV-VIS (1601Pc marca Shimadzu), em comprimento de onda de 535 nm, para obter um valor de absorvância (Abs) entre 0,200 e 0,800. O cálculo da concentração total de antocianinas baseou-se na Lei de Lambert-Beer (Equação 6) e os resultados expressos em mg de antocianinas por mL de extrato obtido. Os valores de absorvância foram contrastados com os valores dos brancos (Solução Etanol:HCL 1,5N (85:15)). O cálculo do teor de Antocianinas Totais (AntT) por mL de extrato obtido foi efetuado de acordo com a Equação 7. Foi utilizado o Coeficiente de Extinção médio ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$) de diversas antocianinas, adotando-se para o método de pH Único (pH 2,0) valor de 982.

$$A = \varepsilon \times b \times C \quad (\text{Equação 6})$$

Em que:

A= absorvância

ε = Coeficiente de absortividade molar ($98,2 \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$).

C= concentração g/L

b = espessura da cubeta em cm

$$\text{AntT} \frac{\text{mgAnt}}{\text{mL}} \text{de extrato} = \frac{A \times FD \times 100}{m \times E_{1\text{cm}}^{1\%}} \quad (\text{Equação 7})$$

Em que:

AntT = teor de antocianinas totais

A = absorvância

FD = fator de diluição

m = massa de amostra

$E_{1\text{cm}}^{1\%}$ = Coeficiente de extinção.

4.4.1.2 Método pH diferencial

A determinação de antocianinas totais, pelo método pH diferencial, foi realizada segundo o método descrito por Fuleki e Francis (1968a). Para este método, foram utilizadas soluções tampão pH 1,0 e 4,5. Preparou-se a solução pH 1,0 a partir da mistura de soluções de KCl (0,2 N) e HCl (0,2N) na proporção 25/67. O tampão pH 4,5 foi preparado a partir de solução de acetato de sódio (1N), HCl e água na proporção 100/60/90. Uma pequena alíquota da amostra foi diluída em soluções tampões pH 1,0 e pH 4,5 e realizou-se a leitura em espectrofotômetro UV-VIS (1601Pc marca Shimadzu), em comprimento de onda de 535nm, adaptando-se o valor de absorvância para a diferença de leitura entre os dois pHs, onde a leitura à pH 1 será maior que à pH 4,5, pois as antocianinas apresentam coloração intensa em pH 1, com elevada absorção de energia; já em pH 4,5 as antocianinas quase não apresentam coloração e a absorção de energia é mínima. O cálculo da concentração total de antocianinas foi baseado na Lei de Lambert-Beer (Equação 6) e os resultados expressos em mg de antocianinas por mL de extrato obtido. Os valores de absorvância foram contrastados com os valores dos respectivos brancos (soluções tampão pH 1,0 e 4,5). O cálculo do teor de antocianinas totais (AntT) por mL de extrato obtido foi efetuado de acordo com a Equação 8. Utilizou-se o Coeficiente de Extinção médio ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$) de diversas antocianinas, adotando-se para o método de pH diferencial, 873 e 775 respectivamente para os pHs 1,0 e 4,5.

$$AntT_{mg\ Ant}/_{mL\ de\ extrato} = \frac{A \times FD \times 1000}{m \times E_{1cm}^{1\%}} \quad (\text{Equação 8})$$

Em que:

AntT = teor de antocianinas totais

A = absorvância

FD = fator de diluição

m = massa de amostra

$E_{1cm}^{1\%}$ = Coeficiente de extinção.

4.4.2 Determinação de Fenólicos Totais

A determinação de fenólicos totais dos extratos foi realizada de acordo com metodologia descrita por Singleton e Rossi (1965). Os compostos fenólicos totais foram quantificados pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, utilizando o ácido gálico como padrão de referência. Em um tubo de ensaio adicionou-se 0,6 mL de cada amostra, 3 mL do reagente Folin-Ciocalteu diluído 1/10 e 2,4 mL de Na₂CO₃ 7,5%, sob agitação. A mistura foi armazenada ao abrigo de luz por 1 hora. O tubo controle continha 0,6 mL do solvente de extração (etanol 70% acidificado até pH 2,0). A absorvância foi medida a 760 nm usando um espectrofotômetro UV-VIS 1601Pc marca Shimadzu (Kyoto, Japão). Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico equivalente por mL de extrato obtido (mg EAG/mL de extrato).

4.4.3 Determinação da Capacidade Antioxidante

A capacidade antioxidante foi obtida para os três extratos através de três métodos, ABTS, DPPH e FRAP. Os métodos estão descritos a seguir.

4.4.3.1 Método ABTS

Para a formação do radical ABTS^{•+} (2,2'-azinobis-3-etil-benzotiazolína-6-sulfonado), a solução aquosa de ABTS 7 mmol.L⁻¹ foi adicionada à solução de persulfato de potássio 2,45 mmol.L⁻¹, na proporção 1:1. Esta mistura foi mantida no escuro à temperatura ambiente (25 ± 1 °C) por 12 - 16 horas. Após este tempo, corrigiu-se absorvância para 0,70 (±0,05) a 734 nm (comprimento de onda de máxima absorção) com adição de etanol 80% (RE et al., 1999) em espectrofotômetro UV-VIS 1601Pc marca Shimadzu (Kyoto, Japão).

Foi utilizado o Trolox como padrão. Para isso, realizou-se a construção de uma curva padrão, nas concentrações de 0-200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. A reação entre o antioxidante e o radical foi realizada pela homogeneização de 0,5 mL de cada concentração do antioxidante e 3,5 mL da solução do radical em tubos de ensaio, os quais foram mantidos ao abrigo da luz até estabilização da reação.

Para amostra, construiu-se uma curva de amostra, com cinco diluições sequenciais (de modo a obter, após reação, absorvância na faixa da curva padrão). A 3,5 mL da solução radical ABTS^{++} foram adicionados 0,5 mL de cada extrato, e realizada leitura espectrofotométrica após 6 minutos de reação. A partir desse dado, foi construído um gráfico de amostra: concentração (mL de extrato. L^{-1}) vs absorvância.

Para determinação da capacidade antioxidante, foi obtida a absorvância equivalente a 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ da equação da curva padrão de trolox. Esse valor foi substituído na equação da reta da curva de amostra, sendo encontrado o volume de extrato obtido (mL) equivalente a 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Esse dado foi corrigido em μmol equivalente de trolox por litro de extrato, e o resultado expresso em capacidade antioxidante equivalente ao trolox.

4.4.3.2 Método DPPH

A capacidade antioxidante foi determinada pelo método DPPH, segundo Kim et al. (2002), com modificações. Para o ensaio DPPH (2,2-difenil-1-picril hidrazina) preparou-se uma solução 0,1 mmol.L^{-1} de DPPH dissolvido em etanol 80%. Esta solução foi preparada para utilização no dia da análise.

Utilizou-se o trolox como padrão, para isso, realizou-se a construção de uma curva padrão. Para amostra, foi construída uma curva de amostra, com cinco diluições sequenciais (de modo a obter, após reação, absorvância na faixa da curva padrão). A 3,5 mL da solução de DPPH foram adicionados 0,5 mL de cada extrato, e realizou-se leitura em espectrofotômetro, UV-VIS 1601Pc marca Shimadzu (Kyoto, Japão), após 1 hora de reação. A partir desse dado, construiu-se um gráfico de amostra: concentração (mL de extrato. L^{-1}) vs absorvância.

Para determinação da capacidade antioxidante, foi obtida a absorvância equivalente a 125 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ da equação da curva padrão de trolox. Esse valor foi substituído na equação da reta da curva de amostra, sendo encontrado o volume de extrato obtido (mL) equivalente a 125 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Esse dado foi corrigido em μmol

equivalente de trolox por litro de extrato obtido, e o resultado expresso em capacidade antioxidante equivalente ao trolox.

4.4.3.3 Método FRAP

Para a avaliação de capacidade antioxidante pelo método FRAP, utilizou-se o reagente FRAP, que foi preparado a partir da combinação de 25 mL de tampão acetato $0,3 \text{ mol.L}^{-1}$, 2,5 mL de uma solução de TPTZ (2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina) 10 mmol.L^{-1} e 2,5 mL de uma solução aquosa de cloreto férrico 20 mmol.L^{-1} (LARRAURI; RUPÉREZ; SAURA-CALIXTO, 1997). Inicialmente, preparou-se uma curva padrão de sulfato ferroso. No dia da análise, foi preparada uma solução de sulfato ferroso 2 mmol.L^{-1} , e a partir dela construída uma curva variando sua concentração de $500 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ até $1500 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$. Em tubos de ensaio, foram adicionados $90 \text{ } \mu\text{L}$ das soluções diluídas de sulfato ferroso, $270 \text{ } \mu\text{L}$ de água destilada e 2,7 mL do reagente FRAP. Os tubos foram mantidos em banho-maria a $37 \text{ } ^\circ\text{C}$ por 30 minutos e após isso, realizou-se a leitura em espectrofotômetro UV-VIS 1601Pc marca Shimadzu (Kyoto, Japão), com comprimento de onda de 595 nm. O reagente de FRAP foi utilizado como branco para calibrar o espectrofotômetro.

Para análise dos extratos obtidos, foram transferidos $90 \text{ } \mu\text{L}$ das soluções diluídas do extrato, $270 \text{ } \mu\text{L}$ de água destilada e 2,7 mL do reagente FRAP, para tubos de ensaio. Os tubos foram mantidos em banho-maria a $37 \text{ } ^\circ\text{C}$ por 30 minutos e após isso, realizou-se a leitura em espectrofotômetro UV-VIS 1601Pc marca Shimadzu (Kyoto, Japão), com comprimento de onda de 595 nm.

Para determinação da capacidade antioxidante, foi obtida a absorvância equivalente a $1000 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ de padrão sulfato ferroso. Esse valor foi substituído na equação da reta da curva de amostra, sendo encontrado o volume de extrato obtido (mL) equivalente a $1000 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$. Esse dado foi corrigido em $\text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ de sulfato ferroso por mL de extrato obtido, e o resultado expresso em capacidade antioxidante equivalente ao sulfato ferroso.

4.4.4 Análise Colorimétrica

Os extratos obtidos foram caracterizados pela leitura direta de reflectância do sistema de coordenadas retangulares “L*” (luminosidade), “a*” (intensidade de vermelho e verde) e “b*” (intensidade de amarelo e azul), empregando-se a escala de

cor CIELAB, com iluminante D₆₅ e ângulo de observação de 10 °, utilizando-se colorímetro Hunter Lab, modelo Colorquest XE (Reston, USA). Os valores de C* (cromaticidade ou saturação de cor) e h (ângulo de tonalidade cromática) foram calculados a partir dos dados de a* e b*, pelas Equações 9 e 10.

$$C^* = [(a^*)^2 + (b^*)^2]^{1/2} \quad (\text{Equação 9})$$

$$h = \arctan(b^*/a^*) \quad (\text{Equação 10})$$

4.5 Delineamento Experimental e Análise Estatística

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições para os tratamentos frutas amora, mirtilo e a casca de jabuticaba, para cada extrato obtido (bruto, fenólico e antociânico) e as análises realizadas em duplicatas.

Os resultados obtidos para caracterização dos extratos foram submetidos à análise de variância através do teste F e as médias dos tratamentos comparadas entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa SAS (SAS Institute, version 9.4, Cary, NC, USA). Os extratos obtidos foram analisados separadamente e, portanto, não foram comparados entre si.

As análises de correlação entre os teores de antocianinas e fenólicos totais obtidos por espectrofotometria e a capacidade antioxidante obtida pelos métodos ABTS, DPPH e FRAP, com os valores L*, a*, b*, C* e h* do sistema CIELAB, foram estabelecidas pelo método de Pearson, ao nível de 5% de probabilidade utilizando o programa SAS (SAS Institute, version 9.4, Cary, NC, USA).

A escolha do modelo de predição através dos parâmetros colorimétricos, foram feitos, levando-se em consideração o coeficiente de determinação R², e a significância dos parâmetros, utilizando o ProcReg do SAS (SAS Institute, version 9.4, Cary, NC, USA) para regressão linear múltipla com o método *Stepwise* (passo a passo), que indicou as variáveis independentes com melhor ajuste.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização dos extratos

Os extratos bruto, fenólico e antociânico foram caracterizados, através dos parâmetros colorimétricos (L^* , a^* , b^* , C^* e h^*), do conteúdo de antocianinas, do conteúdo de fenólicos totais, e, por fim, da capacidade antioxidante.

5.1.1 Extrato Bruto

Os resultados para a caracterização dos extratos brutos de amora, mirtilo e casca de jabuticaba são apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros colorimétricos (L^* , a^* , b^* , C^* e h^*), teor de antocianinas, compostos fenólicos e capacidade antioxidante do extrato fenólico bruto de amora, mirtilo e casca de jabuticaba.

PARÂMETRO	AMORA	MIRTILO	JABUTICABA
L^*	31,117±0,38 ^a	27,18±0,16 ^c	33,32±0,97 ^b
a^*	19,41±1,31 ^b	3,87±1,22 ^c	28,57±2,56 ^a
b^*	6,41±0,58 ^b	0,10±0,35 ^c	10,43±1,68 ^a
C^*	20,44±1,42 ^b	3,88±1,23 ^c	30,42±2,98 ^a
h^*	0,32±0,01 ^a	0,01±0,07 ^b	0,35±0,02 ^a
Antocianinas (pH único)	181,52±13,59 ^c	555,16±53,41 ^a	354,72±42,29 ^b
Antocianinas (pH diferencial)	100,04±12,90 ^b	403,91±57,41 ^a	184,18±8,02 ^b
Fenólicos totais	975,21±35,16 ^c	1437,23±110,67 ^b	4548,93±211,51 ^a
Capacidade Antioxidante (ABTS)	51,94±4,58 ^b	47,23±3,82 ^b	410,89±28,8 ^a
Capacidade antioxidante (DPPH)	40,25±9,31 ^b	21,78±6,40 ^b	355,63±53,07 ^a
Capacidade antioxidante (FRAP)	99,18±19,71 ^b	101,26±41,00 ^b	906,76±67,88 ^a

Os resultados de antocianinas pH único e pH diferencial foram expressos em mg de antocianina/L de extrato, de Fenólicos em mg equivalente de ácido gálico/L de extrato, os de ABTS e DPPH em μ M de trolox/L de extrato e os de FRAP em μ M de sulfato ferroso/L de extrato. Valores em média \pm desvio padrão (DP), n= 3. Significância ($P<0,05$): médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey.

Com relação aos parâmetros de cor, os extratos fenólicos brutos para cada fruta diferiram entre si, ao nível de 5% de probabilidade. O extrato de jabuticaba apresentou cor mais próxima de tons vermelho e amarelo que os demais (maior valor de a^* e b^*), com maior luminosidade (L^*) e saturação (C^*). O extrato de mirtilo apresentou menor ângulo de tonalidade (h^*), indicando maior intensidade de cor vermelha. Segundo Lima, Mélo e Guerra (2007), quanto menor o ângulo hue, o fruto apresenta cor vermelha mais

intensa, indicando um aumento no teor de antocianinas. O que pode ser verificado nos valores de teor de antocianinas indicado pelos métodos pH único e diferencial, também apresentados na tabela 2. No entanto, o extrato de mirtilo apresentou saturação mais baixa, indicando uma cor menos brilhante.

O conteúdo de antocianinas pelo método pH único diferiu para os três extratos fenólicos brutos ($p < 0,05$), sendo o maior conteúdo apresentado pelo extrato de mirtilo, seguido dos extratos de casca de jabuticaba e amora (tabela 2). O maior teor de antocianinas de extrato fenólico bruto de mirtilo foi comprovado pela quantificação do método pH diferencial, diferindo dos demais ($p < 0,05$). Para este método, os conteúdos de antocianinas dos extratos de amora e jabuticaba não diferiram entre si ($p > 0,05$).

A análise de antocianinas pelo método de pH único consiste na leitura direta do extrato em comprimentos de onda de maior absorvância destes compostos ($\lambda = 535$ nm). Já o método pH diferencial consiste em efetuar leitura espectrofotométrica do extrato em tampão pH 1,0 e pH 4,5, baseando-se na sensibilidade destes compostos ao pH no mesmo comprimento de onda do método anterior ($\lambda = 535$ nm). Em pH 4,5 as antocianinas praticamente não apresentam coloração, apresentando menor absorção de energia. Quando abaixa-se o pH para 1,0, os pigmentos exibem coloração intensa. A diferença de absorvância observada espectrofotometricamente possibilita, por diferença direta, estimar a fração de antocianina presente (FULEKI; FRANCIS, 1968a), sendo, portanto, um método mais confiável quando o extrato possui interferentes.

Ambos os métodos expressam a fração real de antocianinas, no entanto alguns pesquisadores, como Fuleki e Francis (1968a), Jackman e Smith (1996), Wrolstad (1976) e Teixeira; Stringheta e Oliveira (2008), concluíram haver diferença entre os métodos pH único e pH diferencial na quantificação de antocianinas, quando há interferentes no extrato, como produtos de degradação das próprias antocianinas, presença de taninos e compostos sulfurados. Apesar desses compostos não apresentarem absorção no comprimento de onda utilizado, eles contribuem para o alargamento do espectro justificando assim sua atividade interferente (TEIXEIRA; STRINGHETA; OLIVEIRA, 2008). Nesse caso, deve-se optar pelo uso do método pH diferencial, já que as características espectrais desses interferentes não são alteradas em função do pH do meio (FRANCIS, 1982) e quando se realiza a diferença da leitura em pH 1 e 4,5, o valor dos interferentes é eliminado.

Entre as frutas estudadas, a casca de jabuticaba é a que apresenta maior teor de compostos fenólicos não antociânicos, dentre os compostos fenólicos, a jabuticaba

apresenta o ácido elágico e os taninos, sendo esses compostos os interferentes mencionados anteriormente e que podem alterar a leitura espectrofotométrica de antocianinas (IBRAHIM SILVA et al., 2013). Nesse caso, recomenda-se a utilização do método de pH diferencial.

Os três extratos fenólicos brutos diferiram entre si ($p < 0,05$) para o conteúdo de fenólicos totais, sendo o de maior conteúdo, o extrato de jabuticaba, seguido dos extratos de mirtilo e amora. A capacidade antioxidante, para as metodologias ABTS, DPPH e FRAP, do extrato de jabuticaba diferiu significativamente dos demais ($p < 0,05$), sendo esse extrato, o de maior capacidade antioxidante apresentada. Já os extratos de amora e mirtilo não diferiram entre si ($p > 0,05$) para os três métodos utilizados.

A casca da jabuticaba apresenta, além de antocianinas, altos teores de taninos, ácidos fenólicos (ácido elágico) e outros flavonoides (rutina e quercetina) (IBRAHIM SILVA et al., 2013). Além disso, os compostos fenólicos se concentram na casca dos frutos e nas folhas (PAES et al., 2014) e para obtenção do extrato de jabuticaba, foram utilizadas apenas as cascas, diferentemente dos extratos de mirtilo e amora, onde se utilizou o fruto inteiro.

A jabuticaba apresenta em sua casca, conteúdo de vitamina C mais elevado que a amora e o mirtilo, sendo os valores aproximados encontrados na literatura de 250mg/100g para a casca de jabuticaba (LIMA et al., 2011), 21 mg/100g para a amora (KAUME; HOWARD; DEVAREDDY, 2012) e 190 mg/100g para o mirtilo (BARCIA et al., 2010). Segundo Oliveira (2015), o ácido ascórbico influencia nas análises de capacidade antioxidante (ABTS, DPPH e FRAP). Provavelmente, entre outros fatores, este tenha sido o fator principal para que a casca de jabuticaba apresentasse maior capacidade antioxidante que os demais frutos.

Além das antocianinas, os mirtilos também são uma boa fonte de ácido clorogênico, quercetina, kaempferol, miricetina, procianidinas, catequina, epicatequina e resveratrol (YOU et al., 2011). Todos são compostos fenólicos e provavelmente por esse motivo, o extrato fenólico bruto de mirtilo apresentou conteúdo de fenólicos entre jabuticaba e amora. Como já mencionado, apesar do mirtilo apresentar esses compostos, a casca da jabuticaba concentra maior quantidade destes, quando comparada ao mirtilo e a amora.

5.1.2 Extrato Fenólico

Os resultados de caracterização dos extratos fenólicos de amora, mirtilo e jabuticaba estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros colorimétricos (L^* , a^* , b^* , C^* e h^*), teor de antocianinas, compostos fenólicos e capacidade antioxidante do extrato fenólico de amora, mirtilo e casca de jabuticaba.

PARÂMETRO	AMORA	MIRTILO	JABUTICABA
L^*	28,25±0,20 ^a	26,68±0,03 ^b	26,90±0,13 ^b
a^*	8,40±1,21 ^a	0,49±0,14 ^b	2,00±0,72 ^b
b^*	1,55±0,37 ^a	-0,82±0,06 ^b	-0,44±0,22 ^b
C^*	8,54±1,25 ^a	0,96±0,05 ^b	2,08±0,62 ^b
h^*	0,18±0,017 ^a	-1,04±0,14 ^c	-0,27±0,24 ^b
Antocianinas (pH único)	728,45±44,10 ^b	3747,46±802,53 ^a	3363,88±403,21 ^a
Antocianinas (pH diferencial)	386,47±28,89 ^c	1993,91±209,53 ^a	1031,00±287,00 ^b
Fenólicos totais	3342,52±187,56 ^b	5052,78±367,95 ^b	21990,38±2650,25 ^a
Capacidade Antioxidante (ABTS)	1337,79±144,51 ^b	1229,90±179,63 ^b	6122,37±167,77 ^a
Capacidade antioxidante (DPPH)	823,79±80,77 ^b	1506,65±276,84 ^b	4815,25±1370,77 ^a
Capacidade antioxidante (FRAP)	2205,84±165,96 ^b	2184,59±447,73 ^b	11717,67±2266,77 ^a

Os resultados de antocianinas pH único e pH diferencial foram expressos em mg de antocianina/L de extrato, de Fenólicos em mg equivalente de ácido gálico/L de extrato, os de ABTS e DPPH em μM de trolox/L de extrato e os de FRAP em μM de sulfato ferroso/L de extrato. Valores em média \pm desvio padrão (DP), $n=3$. Significância ($P<0,05$): médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey.

As médias dos parâmetros L^* , a^* , b^* e C^* , foram significativamente ($p<0,05$) diferentes para o extrato de amora, em comparação aos outros dois extratos. E o extrato de mirtilo e jabuticaba não diferiram entre si ($p>0,05$). Os três extratos apresentaram diferença entre si ($p<0,05$) para o parâmetro de cor h^* .

Os extratos fenólicos de mirtilo e jabuticaba apresentaram coloração mais escura e tons menos vermelhos e mais próximos do azul, quando comparados com o extrato fenólico de amora, além de apresentarem menor saturação, ou seja, cores com menor pureza em relação ao branco. Já para o parâmetro h^* , o extrato de mirtilo foi o que apresentou maior intensidade de cor azul.

Com relação ao conteúdo de antocianinas, os extratos de mirtilo e jabuticaba foram os que apresentaram maior conteúdo, não diferindo entre si ($p>0,05$), pelo método pH único. Já para o método pH diferencial, os três extratos diferiram entre si ($p<0,05$), sendo o de maior conteúdo de antocianinas o extrato de mirtilo, seguido do extrato de jabuticaba e de amora, respectivamente.

Assim como para o extrato bruto, o extrato fenólico dos três frutos estudados contém grande quantidade de compostos fenólicos não antocianínicos, onde o extrato fenólico de jabuticaba é o de maior conteúdo de compostos fenólicos (tabela 3). E nesse caso, também, justifica-se o uso da metodologia do pH diferencial para a quantificação de antocianinas, visto que houve diferença nos resultados para as duas metodologias, pois no método pH único os interferentes podem ter apresentado leitura, aumentando o conteúdo de antocianinas, e, igualando estatisticamente seu valor ao conteúdo de antocianinas do extrato fenólico de mirtilo.

Os extratos de mirtilo e amora também apresentam outros compostos fenólicos, além das antocianinas (JACQUES et al., 2010; PRIOR et al., 2010), o que também justifica o uso de pH diferencial. O extrato de mirtilo mostrou o mesmo comportamento nos dois tipos de extratos, sendo o que apresenta maior conteúdo de antocianinas, entre os três frutos, como já mencionado nas literaturas pesquisadas.

O extrato fenólico de jabuticaba apresentou maior conteúdo de fenólicos totais ($p < 0,05$) quando comparado com os demais extratos, de amora e mirtilo, estes dois, por sua vez, não diferiram entre si ($p > 0,05$), como pode ser observado na tabela 3.

Os três frutos estudados apresentam outros compostos, além dos fenólicos, sendo eles açúcares, ácido ascórbico, vitaminas em geral, entre outros. Quando o extrato foi purificado, estes interferentes foram eliminados, restando apenas compostos fenólicos. Esse provavelmente foi o fator que fez o conteúdo de fenólicos do mirtilo e da amora, resultarem em valores significativamente iguais, pois esses interferentes reagem assim como o ácido gálico, na análise em questão. No entanto, mantiveram a mesma tendência, mesmo não diferindo estatisticamente, o que pode ser um indício de que o teor destes compostos não fenólicos é baixo.

Assim como para os extratos brutos, na capacidade antioxidante, para as metodologias ABTS, DPPH e FRAP, o extrato fenólico de jabuticaba diferiu significativamente dos demais ($p < 0,05$), sendo esse extrato, o de maior capacidade antioxidante apresentada. Já os extratos fenólicos de amora e mirtilo não diferiram entre si ($p > 0,05$) para os três métodos utilizados, assim como no extrato fenólico bruto.

Na capacidade antioxidante, os três extratos, quando purificados, continuaram apresentando o mesmo comportamento do extrato bruto. O que pode ser um indício de que os açúcares e outros compostos redutores presentes nos frutos, não interferiram nas análises de ABTS, DPPH e FRAP no extrato fenólico bruto.

5.1.3 Extrato Antociânico

Os resultados para caracterização dos extratos antociânicos de amora, mirtilo e jabuticaba são apresentados na tabela 4.

Tabela 4. Parâmetros colorimétricos (L^* , a^* , b^* , C^* e h^*), teor de antocianinas, compostos fenólicos e capacidade antioxidante do extrato antociânico de amora, mirtilo e casca de jabuticaba.

PARÂMETRO	AMORA	MIRTILO	JABUTICABA
L^*	27,47±0,47 ^a	26,63±0,04 ^b	26,43±0,25 ^b
a^*	4,69±2,48 ^a	0,63±0,06 ^b	0,79±0,26 ^b
b^*	0,47±0,74 ^a	-0,76±0,02 ^b	-0,77±0,03 ^b
C^*	4,73±2,54 ^a	0,99±0,03 ^b	1,11±0,17 ^{ab}
h^*	0,06±0,1 ^a	-0,88±0,05 ^b	-0,79±0,18 ^b
Antocianinas (pH único)	695,01±164,48 ^b	5592,33±1187,90 ^a	3504,94±1809,08 ^{ab}
Antocianinas (pH diferencial)	360,57±92,1 ^b	4195,85±1208,43 ^a	1782,91±784,97 ^b
Fenólicos totais	6453,85±1540,89 ^a	12644,87±3519,83 ^a	16817,95±8055,61 ^a
Capacidade Antioxidante (ABTS)	6751,00±2816,94 ^a	11142,00±2953,40 ^a	8365,00±3747,75 ^a
Capacidade antioxidante (DPPH)	4642,00±1879,20 ^a	8253,00±1598,84 ^a	7021,00±2697,42 ^a
Capacidade antioxidante (FRAP)	12532,00±5304,26 ^a	20957,00±4188,82 ^a	15568,00±6513,67 ^a

Os resultados de antocianinas pH único e pH diferencial foram expressos em mg de antocianina/L de extrato, de Fenólicos em mg equivalente de ácido gálico/L de extrato, os de ABTS e DPPH em μ M de trolox/L de extrato e os de FRAP em μ M de sulfato ferroso/L de extrato. Valores em média \pm desvio padrão (DP), n= 3. Significância ($P<0,05$): médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey.

Para os parâmetros de cor L^* , a^* , b^* e h^* , os extratos de mirtilo e de jabuticaba não diferiram entre si ($p>0,05$), mas diferiram do extrato de amora ($p<0,05$). Já para o parâmetro C^* , os extratos de amora e mirtilo diferiram entre si ($p<0,05$) e o extrato de jabuticaba não diferiu dos demais ($p>0,05$). O extrato antociânico de amora apresentou maior luminosidade e cor mais próxima dos tons de vermelho e amarelo, além de coloração vermelha mais intensa e pura, indicada pelos parâmetros hue e chroma, respectivamente. E os extratos de mirtilo e jabuticaba, apresentaram maior intensidade de coloração azul.

Como pode-se observar nas figuras 7, 8 e 9, que mostram os três extratos obtidos para as frutas amora, mirtilo e para a casca de jabuticaba, respectivamente, os extratos purificados (7c, 8c e 9c), apresentaram coloração mais escura, o que é comprovado pelo valor L^* para esses extratos, que é menor. Isso ocorre porque os pigmentos são concentrados na purificação, pois os interferentes que não apresentam cor e os diluem, são eliminados. Outro fator que fica evidente, quando se observa essas figuras, é que

conforme os extratos vão sendo purificados, aumenta a tonalidade vermelha, pois segundo Lima, Mélo e Guerra (2007), quanto menor o ângulo hue, o fruto apresenta cor vermelha mais intensa, indicando um aumento no teor de antocianinas. Esse resultado é o esperado, já que o extrato antociânico contém apenas antocianinas.

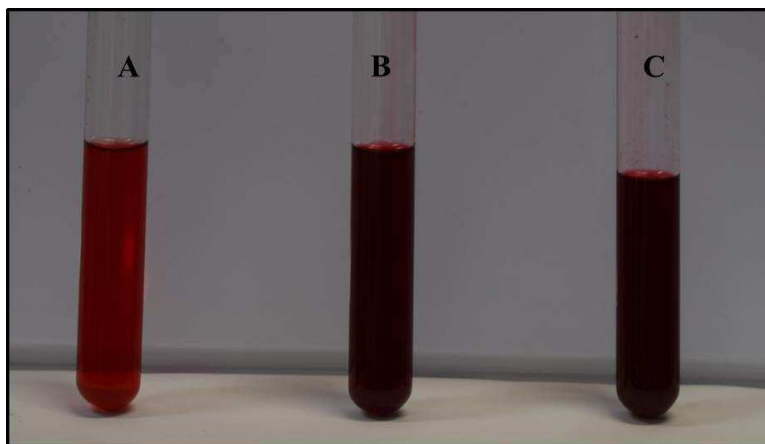


Figura 7. Extrato de amora (a) bruto (b) fenólico e (c) antociânico.

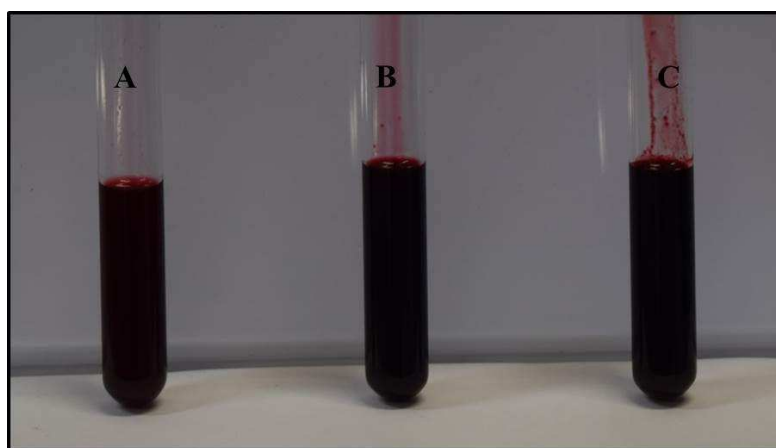


Figura 8. Extrato de mirtilo (a) bruto (b) fenólico e (c) antociânico.



Figura 9. Extrato de jaboticaba (a) bruto (b) fenólico e (c) antociânico.

Na análise de conteúdo de antocianinas pelo método pH único, os extratos antociânicos de amora e mirtilo diferiram entre si ($p < 0,05$), enquanto o extrato antociânico de jaboticaba não diferiu dos demais ($p > 0,05$). O extrato de mirtilo apresentou o maior conteúdo de antocianinas e o extrato de amora o menor. Para a metodologia de pH diferencial, o extrato antociânico de mirtilo foi o que apresentou maior conteúdo de antocianinas, diferindo dos demais extratos ($p < 0,05$), mantendo a tendência observada nos outros dois extratos.

Com relação ao conteúdo de fenólicos totais, os três extratos não diferiram entre si ($p > 0,05$). Da mesma forma que no conteúdo de fenólicos totais, os extratos antociânicos de amora, mirtilo e jaboticaba não diferiram entre si ($p > 0,05$), para as três metodologias utilizadas para determinação da capacidade antioxidante (ABTS, DPPH e FRAP).

Na caracterização dos extratos bruto e fenólico, a casca de jaboticaba apresentou maior conteúdo de compostos fenólicos e capacidade antioxidante, quando comparada aos demais frutos. Já para o extrato antociânico essas análises não diferiram estatisticamente, o que comprova que realmente a casca de jaboticaba possui muitos outros compostos fenólicos (interferentes) em maiores concentrações que a amora e o mirtilo.

A presença de compostos fenólicos não-antociânicos e outras impurezas, interferem na avaliação das atividades biológicas dos extratos de antocianinas brutos, obtidos a partir do mirtilo *in natura* (WANG et al., 2014). No caso do extrato antociânico, pode-se observar que a purificação fez com que esses compostos e impurezas não interferissem na avaliação da capacidade antioxidante do mirtilo, sendo

esse a fruta que apresentou maior conteúdo de antocianinas e capacidade antioxidante igual à dos demais frutos.

Além disso, segundo Oliveira (2015), o ácido ascórbico e compostos fenólicos não-antociânicos interferem nas análises de capacidade antioxidante (ABTS, DPPH e FRAP). Como os frutos analisados apresentam em sua composição o ácido ascórbico e uma grande variedade de compostos fenólicos não-antociânicos, esses podem ter sido os compostos que influenciaram a diferença significativa da capacidade antioxidante para os três frutos no extrato bruto, mas não influenciou no extrato antociânico, que não apresentou diferença significativa, pois foram eliminados na purificação.

5.2 Correlação entre os teores de antocianinas, fenólicos totais, e capacidade antioxidante com as coordenadas colorimétricas

5.2.1 Extrato Bruto

Os resultados para correlação entre os parâmetros de cor, conteúdo de antocianinas, conteúdo de fenólicos e capacidade antioxidante, obtidos para o extrato bruto, são apresentados na tabela 5.

Como já esperado, os parâmetros de cor (L^* , a^* , b^* , C^* e h^*), apresentaram forte correlação entre si ($p < 0,01$). Além disso, os parâmetros L^* , a^* , b^* e C^* apresentaram correlação significativa, ao nível de 5% de probabilidade com os resultados obtidos para conteúdo de antocianinas pH diferencial, conteúdo de fenólicos totais e para todos os métodos de capacidade antioxidante, que são as correlações mais importantes para o presente trabalho. Isso mostra uma probabilidade alta de existir um modelo matemático para prever o teor de antocianinas, de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante utilizando esses parâmetros colorimétricos. O parâmetro hue demonstrou forte correlação ($p < 0,01$) para as duas metodologias utilizadas para quantificar o conteúdo de antocianinas (pH único: $r = -0,85$ e pH diferencial: $r = -0,86$).

As correlações entre os parâmetros de cor e o conteúdo de antocianinas foram, em todos os casos, negativas, demonstrando que à medida que o conteúdo de antocianinas aumenta, os parâmetros de cor diminuem. Cesa et al. (2017) também encontraram correlação negativa entre conteúdo de antocianinas de extratos de mirtilo e parâmetros de cor, principalmente com o parâmetro hue, mostrando que o resultado encontrado para o extrato bruto segue a mesma tendência que os encontrados na literatura. Além disso, Lima, Mélo e Guerra (2007), também encontraram correlação

negativa entre os parâmetros de cor L*, b*, C* e h*, e não para o parâmetro a*, e o conteúdo de antocianinas em polpas de acerola.

Por fim, os compostos fenólicos, conferem às frutas alta capacidade antioxidante, demonstrando correlação entre esse parâmetro e o conteúdo total de fenólicos (FERRARI; GERMER; DE AGUIRRE, 2012; SARIBURUN et al., 2010). Como pode-se observar na tabela 4, para o extrato bruto, o conteúdo de compostos fenólicos totais apresentou forte correlação ($p < 0,01$) com os três métodos utilizados para determinar a capacidade antioxidante, ABTS ($r = 0,99$), DPPH ($r = 0,98$) e FRAP ($r = 0,99$), indicando que valores mais elevados de compostos fenólicos estão relacionados à elevada capacidade antioxidante, e, que nos frutos estudados, a capacidade antioxidante se deve, principalmente, aos compostos fenólicos.

Como apresentado no tópico de caracterização, pode-se observar nas figuras 7a, 8a e 9a, que os extratos brutos apresentam coloração mais clara e límpida que os demais. Provavelmente, a diluição dos compostos fenólicos foi o fator que influenciou a correlação entre conteúdo de fenólicos e capacidade antioxidante com os parâmetros de cor.

5.2.2 Extrato Fenólico

Os resultados para correlação entre os parâmetros de cor, conteúdo de antocianinas, conteúdo de fenólicos e capacidade antioxidante, obtidos para o extrato fenólico, são apresentados na tabela 6.

Para o extrato fenólico, os parâmetros de cor também apresentaram forte correlação entre si ($p < 0,01$) e como ocorreu para o extrato bruto, e foi descrito por outros estudos, os compostos fenólicos correlacionaram ($p < 0,01$) com a capacidade antioxidante para as três metodologias utilizadas, ABTS ($r = 0,99$), DPPH ($r = 0,94$) e FRAP ($r = 0,97$).

O conteúdo de antocianinas totais quantificado pelos métodos pH único (L*: $r = -0,95$, a*: $r = -0,95$, b*: $r = -0,95$, C*: $r = -0,94$, h*: $r = -0,81$) e pH diferencial (L*: $r = -0,83$, a*: $r = -0,86$, b*: $r = -0,84$, C*: $r = -0,83$, h*: $r = -0,95$) apresentou correlação negativa significativa ($p < 0,01$) com os parâmetros de cor. Esta forte correlação, provavelmente, se deve ao fato da retirada dos interferentes do extrato, concentrando-o mais e purificando sua cor, como apresentado nas figuras 7b, 8b e 9b. Esta correlação foi melhor, quando comparada com a correlação encontrada no extrato fenólico bruto.

5.2.3 Extrato Antociânico

Os resultados para correlação entre os parâmetros de cor, conteúdo de antocianinas, conteúdo de fenólicos e capacidade antioxidante, obtidos para o extrato antociânico, são apresentados na tabela 7.

Assim como nos extratos fenólico bruto e fenólico, os parâmetros de cor obtidos para o extrato antociânico apresentaram forte correlação ($p < 0,01$); e o conteúdo de fenólicos totais correlacionou-se com a capacidade antioxidante ($p < 0,05$) obtida pelos métodos ABTS ($r = 0,68$) e DPPH ($r = 0,69$). Mas, apenas o parâmetro hue apresentou correlação, de elevada significância ($p < 0,01$), com o conteúdo de antocianinas totais pelo método pH único ($r = -0,84$). O parâmetro hue, que é o ângulo de tonalidade, do extrato antociânico ainda apresentou correlação ($p < 0,05$) com o conteúdo de antocianinas obtido pelo método pH diferencial ($r = -0,75$) e o conteúdo de fenólicos totais ($r = -0,68$). Os parâmetros a^* ($r = -0,72$), b^* ($r = -0,71$) e C^* ($r = -0,70$) demonstraram correlação significativa ($p < 0,05$) com o conteúdo de antocianinas obtido pelo método pH único.

O que chama atenção no caso do extrato antociânico, é que o conteúdo de fenólicos apresentou correlação negativa significativa ($p < 0,05$) com a tonalidade do extrato (parâmetro hue de cor), diferentemente de outras correlações do conteúdo de fenólicos com outros parâmetros de cor nos extrato bruto e fenólico, que não apresentaram correlações negativas significativas. Pode-se atribuir este tipo de correlação ao conteúdo de antocianinas, que apresentou correlação negativa em todos os extratos com os parâmetros de cor e para o extrato antociânico é o único composto fenólico presente.

Tabela 5. Correlação de Pearson (r) entre os parâmetros estudados para o extrato bruto.

	L	a	b	C	h	AntTúni.	AntTdif.	Fenólicos	ABTS	DPPH	FRAP
L	1,000	0,998**	0,999**	0,998**	0,936**	-0,665	-0,773*	0,676*	0,752*	0,761*	0,739*
a		1,000	0,997**	1,000**	0,941**	-0,655	-0,765*	0,691*	0,771*	0,780*	0,757*
b			1,000	0,998**	0,928**	-0,640	-0,750*	0,699*	0,772*	0,778*	0,758*
C				1,000	0,939**	-0,651	-0,761*	0,695*	0,773*	0,782*	0,759*
h					1,000	-0,849**	-0,862**	0,440	0,546	0,566	0,524
AntTúni.						1,000	0,928**	0,082	-0,042	-0,073	-0,022
AntTdif.							1,000	-0,129	-0,252	-0,289	-0,247
Fenólicos								1,000	0,990**	0,979**	0,989**
ABTS									1,000	0,995**	0,998**
DPPH										1,000	0,993**
FRAP											1,000

AntTúni. = Conteúdo de Antocianinas totais pelo método pH único; AntTdif. = Conteúdo de Antocianinas totais pelo método pH diferencial. A correlação foi estabelecida pelo método de Pearson. * indica correlação significativa à 5% de probabilidade, ** indica correlação significativa à 1% de probabilidade e os demais são não significativos.

Tabela 6. Correlação de Pearson (r) entre os parâmetros estudados para o extrato fenólico.

	L	a	b	C	h	AntTúni.	AntTdif.	Fenólicos	ABTS	DPPH	FRAP
L	1,000	0,998**	0,998**	0,999**	0,836**	-0,954**	-0,831**	-0,450	-0,366	-0,519	-0,387
a		1,000	0,999**	0,999**	0,862**	-0,946**	-0,855**	-0,405	-0,317	-0,480	-0,343
b			1,000	0,999**	0,847**	-0,954**	-0,841**	-0,434	-0,346	-0,505	-0,371
C				1,000	0,836**	-0,945**	-0,834**	-0,443	-0,357	-0,511	-0,380
h					1,000	-0,812**	-0,948**	0,057	0,159	-0,088	0,093
AntTúni.						1,000	0,807**	0,455	0,359	0,507	0,387
AntTdif.							1,000	-0,001	-0,118	0,038	-0,101
Fenólicos								1,000	0,988**	0,936**	0,974**
ABTS									1,000	0,927**	0,977**
DPPH										1,000	0,978**
FRAP											1,000

AntTúni. = Conteúdo de Antocianinas totais pelo método pH único; AntTdif. = Conteúdo de Antocianinas totais pelo método pH diferencial. A correlação foi estabelecida pelo método de Pearson. * indica correlação significativa à 5% de probabilidade, ** indica correlação significativa à 1% de probabilidade e os demais são não significativos.

Tabela 7. Correlação de Pearson (r) entre os parâmetros estudados para o extrato antociânico.

	L	a	b	C	h	AntTúni.	AntTdif.	Fenólicos	ABTS	DPPH	FRAP
L	1,000	0,955**	0,959**	0,951**	0,883**	-0,608	-0,520	-0,583	-0,428	-0,487	-0,479
a		1,000	0,999**	0,999**	0,892**	-0,719*	-0,641	-0,608	-0,602	-0,665	-0,659
b			1,000	0,997**	0,892**	-0,710*	-0,628	-0,611	-0,583	-0,650	-0,638
C				1,000	0,868**	-0,696*	-0,621	-0,592	-0,603	-0,656	-0,660
h					1,000	-0,842**	-0,751*	-0,678*	-0,531	-0,663	-0,583
AntTúni.						1,000	0,953**	0,730*	0,805**	0,714*	0,816**
AntTdif.							1,000	0,529	0,796*	0,589	0,805**
Fenólicos								1,000	0,682*	0,690*	0,660
ABTS									1,000	0,757*	0,989**
DPPH										1,000	0,814**
FRAP											1,000

AntTúni. = Conteúdo de Antocianinas totais pelo método pH único; AntTdif. = Conteúdo de Antocianinas totais pelo método pH diferencial. A correlação foi estabelecida pelo método de Pearson. * indica correlação significativa à 5% de probabilidade, ** indica correlação significativa à 1% de probabilidade e os demais são não significativos.

5.3 Modelos matemáticos de predição dos extratos obtidos

As equações obtidas para a predição dos extratos bruto, fenólico e antociânico são apresentadas na tabela 8.

Foi possível obter um modelo matemático para prever todas as variáveis dependentes (antocianinas totais, fenólicos totais e capacidade antioxidante) utilizando o extrato fenólico bruto. No entanto, para o extrato fenólico, apenas foi possível obter um modelo matemático para predição apenas para o conteúdo de antocianinas totais obtido por pH único e diferencial, e, para o extrato antociânico, foi possível obter um modelo matemático para predição para os dois métodos empregados para o conteúdo de antocianinas totais e, para a capacidade antioxidante obtida pelos parâmetros DPPH e FRAP (Tabela 8).

Para quantificação de antocianinas, a melhor equação de predição para o método pH único foi a do extrato bruto, que apresentou $r^2=0,99$, os demais apresentaram $r^2=0,98$ e $r^2=0,71$, para o extrato fenólico e antociânico, respectivamente. Já para o método de pH diferencial, a melhor equação foi a encontrada para o extrato fenólico, com $r^2=0,90$. Dessa forma, não há necessidade da purificação do extrato fenólico bruto para prever o teor de antocianinas totais de frutas de amora, mirtilo e casca de jaboticaba utilizando parâmetros colorimétricos, pois a equação encontrada para o pH diferencial no extrato bruto, apresentou um $r^2=0,74$, e, a obtenção de extratos purificados demanda custos e tempo de análise elevados.

O método pH único, para quantificação de antocianinas, é influenciado por interferentes, no caso dos frutos em estudo, como já discutido no tópico de caracterização dos extratos, e este obteve maior coeficiente de correlação que o método de pH diferencial, que leva em consideração os interferentes. Além disso, é interessante observar que, à medida que os extratos foram purificados, o coeficiente de correlação r^2 diminuiu. Portanto, uma observação interessante que pode ser feita é que os interferentes influenciaram positivamente na predição das variáveis dependentes, de forma que o extrato fenólico bruto apresentou um modelo matemático de predição para todas essas variáveis e os demais extratos não tiveram o mesmo êxito.

Vale ressaltar que a amora, o mirtilo e a jaboticaba apresentam grande quantidade de outros agentes redutores em sua composição, como açúcares, alguns aminoácidos e vitaminas, o que pode ter influenciado na obtenção de um modelo de predição encontrada para o extrato bruto utilizando os parâmetros de cor (variáveis

independentes) e o conteúdo de antocianinas, compostos fenólicos e capacidade antioxidante, e a falta de correlação nos extratos fenólico e antociânico, onde esses interferentes não estão presentes. Os agentes redutores (interferentes) participam da reação das análises realizadas, alterando o resultado.

Para as variáveis dependentes, conteúdo de fenólicos totais e capacidade antioxidante, as melhores equações foram as encontradas para o extrato bruto, com conteúdo de compostos fenólicos apresentando $r^2=0,86$, ABTS com $r^2=0,99$, DPPH com $r^2=0,97$ e FRAP com $r^2=0,98$. As outras equações de predição dessas variáveis dependentes foram encontradas para DPPH ($r^2=0,69$) e FRAP ($r^2=0,66$) no extrato antociânico. Mais uma vez, pelos resultados apresentados, pode-se concluir que não há a necessidade da purificação dos extratos para obter uma boa equação de predição para as variáveis em estudo.

Foram utilizados para predição dois métodos para determinação do conteúdo de antocianinas (pH único e pH diferencial) e, três métodos para determinação da capacidade antioxidante. Alguns pesquisadores, como Fuleki e Francis (1968a), Jackman e Smith (1996), Wrolstad (1976) e Teixeira; Stringheta e Oliveira (2008), concluíram haver diferença entre os métodos pH único e pH diferencial na quantificação de antocianinas, por esse motivo optou-se neste trabalho por predizer os dois métodos. Além disto, os métodos de análise de capacidade antioxidante são muito utilizados em várias pesquisas (BAGETTI et al., 2011; FLOEGEL et al., 2011; LOU et al., 2012; MÜLLER; FRÖHLICH; BÖHM, 2011; WOOTTON-BEARD; MORAN; RYAN, 2011) e na indústria de alimentos, e, por isso, atendem uma gama maior do público alvo desta pesquisa.

Os frutos estudados, mirtilo, amora e casca de jabuticaba, são muito utilizados na indústria e para consumo *in natura*, devido ao seu alto conteúdo de compostos bioativos. E as análises escolhidas para predição são as mais utilizadas para determinar a quantidade de compostos bioativos presentes nestes frutos. Por isso, a predição encontrada nesse estudo se mostra muito promissora na área de corantes e compostos bioativos.

Os três extratos, bruto, fenólico e antociânico, apresentaram um modelo matemático de predição para o teor de antocianinas totais, que são compostos de extrema relevância nos frutos estudados. Além disso, análises mais complexas e que demandam maior tempo e gasto com reagentes, como as análises de conteúdo de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante, apresentaram um modelo

matemático de predição para o extrato bruto. Isso demonstra que as predições encontradas são muito satisfatórias no que diz respeito ao objetivo deste trabalho, que é a determinação do conteúdo de compostos bioativos.

Recentemente, foi realizado no Laboratório de Corantes Naturais e Compostos Bioativos - UFV, uma pesquisa sobre predição de conteúdo de antocianinas e compostos fenólicos e capacidade antioxidante de 13 frutas e hortaliças usando as coordenadas colorimétricas. O trabalho ainda não foi publicado, mas os resultados apresentados mostraram que não foi possível prever sobre o conteúdo de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante através da colorimetria. Porém, o trabalho utilizou uma variedade de frutas e hortaliças maior e a predição foi estudada apenas para extratos fenólicos brutos, diluídos ou não. Nesse sentido, houve a necessidade de se investigar quais eram os fatores que influenciaram estes resultados. Com isso, neste trabalho, decidiu-se utilizar frutos com grande quantidade de compostos fenólicos e relevantes quanto a esses compostos, e, purificar seus extratos para a eliminação de possíveis interferentes.

Pace et al. (2013), realizaram estudos correlacionando atividade antioxidante e compostos fenólicos (variáveis dependentes) de cenouras, de diferentes variedades, com os parâmetros colorimétricos (variáveis independentes), obtendo-se modelos matemáticos de predição com r^2 pouco significativos, em torno de 0,5.

Mariani et al. (2015), realizou um estudo de predição de antocianinas em jabuticabas intactas, utilizando espectroscopia por infravermelho próximo e um método estatístico chamado intervalo parcial dos mínimos quadrados (iPLS) e algoritmo genético. O estudo obteve resultados muito promissores na predição e correlação entre o teor de antocianinas totais medido e o predito entre 0,65 e 0,89.

Seguindo a mesma linha de pesquisa do estudo anterior, Rasines-Perea et al. (2015), realizaram predição da concentração de antocianinas individuais com espectroscopia por infravermelho em vinhos de diferentes safras obtendo equações matemáticas com r^2 variando entre 0,60 e 0,86.

Utilizando espectroscopia de infravermelho, Oliveira (2015) realizou predição do teor de antocianinas e fenólicos totais e capacidade antioxidante em extratos fenólicos brutos de uva violeta e repolho roxo. Para a uva violeta, foi encontrado um modelo matemático de predição apenas para capacidade antioxidante pelo método DPPH ($r^2=0,99$). Já para o repolho roxo, obteve-se um modelo matemático de predição

para antocianinas, fenólicos e capacidade antioxidante, com $r^2=0,99$ para todas as variáveis.

Hosu, Cristea e Cimpoi (2014), estudaram predição de capacidade antioxidante para vinhos, utilizando redes neurais artificiais, correlacionando essas variáveis com uma combinação de compostos fenólicos, flavonoides, antocianinas e taninos, obtida dos vinhos analisados. Foram encontrados coeficientes de determinação $r^2=0,99$ para capacidade antioxidante em relação ao ácido ascórbico e $r^2=0,96$ para capacidade antioxidante em relação ao trolox.

Lou et al. (2012), realizaram um estudo de predição não destrutivo, utilizando frutos de amoreira em diferentes estádios de maturação, onde avaliou a qualidade nutricional, utilizando para a predição parâmetros de fluorescência de clorofila e valores de intensidade de vermelho, verde e azul (RGB). Este estudo, encontrou equações de regressão linear múltipla, pelo método Stepwise, mesmo método utilizado no presente trabalho, utilizando como variáveis dependentes os parâmetros RGB. As variáveis dependentes foram conteúdo de flavonoides ($r^2=0,97$), conteúdo de compostos fenólicos ($r^2=0,93$), ABTS ($r^2=0,93$) e DPPH ($r^2=0,95$). Valores muito parecidos com os encontrados para o extrato bruto no presente trabalho.

Tabela 8. Equações de regressão linear múltipla, ajustada para predição do teor de antocianinas, compostos fenólicos e capacidade antioxidante dos frutos de amora, mirtilo e casca de jabuticaba usando parâmetros colorimétricos obtidas para os três extratos.

	Parâmetros	Equação	R²
Extrato Bruto	Antocianinas pH único	$AntT_{\text{único}}=15269-555,03L^*-553,3^{a*}+651,19C^*-1209,72h^*$	0,9969
	Antocianinas pH diferencial	$AntT_{\text{diferencial}}=391,78-720h^*$	0,7438
	Fenólicos	$CF=278378-10212L^*+6344,09b^*$	0,8613
	ABTS	$CA_{ABTS}=15945-599,78L^*+168,99b^*+103,49C^*-1328,17h^*$	0,9886
	DPPH	$CA_{DPPH}=9106,18-349,75L^*+111,64C^*-1429,72h^*$	0,9697
	FRAP	$CA_{FRAP}=21036-807,13L^*+266,85C^*-3925,46h^*$	0,9805
Extrato Fenólico	Antocianinas pH único	$AntT_{\text{único}}=-10231+1349,46^{a*}-13362b^*+2381,58C^*$	0,9792
	Antocianinas pH diferencial	$AntT_{\text{diferencial}}=671,07-1240,97h^*$	0,8981
Extrato Antociânico	Antocianinas pH único	$AntT_{\text{único}}=934,64-4340,6h^*$	0,7093
	Antocianinas pH diferencial	$AntT_{\text{diferencial}}=531,03-51,71h^*$	0,5636
	DPPH	$CA_{DPPH}=-216659+8520,09L^*-2664,5^{a*}$	0,6948
	FRAP	$CA_{FRAP}=-421955+16807L^*-5659,51C^*$	0,6626

Os $AntT_{\text{único}}$ e $AntT_{\text{diferencial}}$ = mg de antocianina/L de extrato, CF = mg equivalente de ácido gálico/L de extrato, CA = μ M de trolox/L de extrato e CAF = μ M de sulfato ferroso/L de extrato.

6. CONCLUSÃO

O teor de antocianinas totais de extratos fenólico bruto, fenólico e antociânico de amora, mirtilo e casca de jabuticaba pode ser obtido através de equações de regressão linear múltipla, utilizando parâmetros colorimétricos, tanto pelo método pH único, quanto pelo pH diferencial, sendo essas análises as que obtiveram melhor correlação com os parâmetros de cor.

O extrato fenólico bruto obteve correlação entre os parâmetros de cor e todas as análises realizadas, resultando em equações de regressão linear múltipla para a predição com elevado r^2 para as análises de conteúdo de antocianinas, de fenólicos totais e as três metodologias de capacidade antioxidante, apresentando os melhores resultados.

O extrato fenólico apresentou predição para conteúdo de antocianinas e o extrato antociânico, para conteúdo de antocianinas, compostos fenólicos, DPPH e FRAP, com r^2 pouco significativo. O que nos leva a concluir que não há necessidade de realizar purificação para estudos de predição destes parâmetros.

Dessa forma, a predição dos teores de antocianinas e compostos fenólicos totais, e, capacidade antioxidante das três frutas, amora, mirtilo e casca de jabuticaba, utilizando os parâmetros colorimétricos é viável e muito promissora do ponto de vista da diminuição de custos e de tempo.

REFERÊNCIAS

ALEZANDRO, M. R. et al. Comparative study of chemical and phenolic compositions of two species of jaboticaba: *Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg and *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg. **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 468–477, 2013.

ANDRIANJAKA-CAMPS, Z.-N. et al. Prediction of raspberries puree quality traits by Fourier transform infrared spectroscopy. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, p. 1056–1062, 2015.

BAGETTI, M. et al. Physicochemical characterization and antioxidant capacity of pitanga fruits (*Eugenia uniflora* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 1, p. 147–154, 2011.

BARBA, F. J.; ESTEVE, M. J.; FRIGOLA, A. Physicochemical and nutritional characteristics of blueberry juice after high pressure processing. **Food Research International**, v. 50, n. 2, p. 545–549, 2013.

BARCIA, M. T. et al. Determinação de ácido ascórbico e tocoferóis em frutas por CLAE. **Ciências agrárias**, v. 31, n. 2, p. 381–390, 2010.

BOBINAIT, R.; VIŠKELIS, P.; VENSKUTONIS, P. R. Variation of total phenolics, anthocyanins, ellagic acid and radical scavenging capacity in various raspberry (*Rubus* spp.) cultivars. **Food Chemistry**, v. 132, n. 3, p. 1495–1501, 2012.

BOUAYED, J.; HOFFMANN, L.; BOHN, T. Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. **Food Chemistry**, v. 128, n. 1, p. 14–21, 2011.

BOWEN-FORBES, C. S.; ZHANG, Y.; NAIR, M. G. Anthocyanin content, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer properties of blackberry and raspberry fruits. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, n. 6, p. 554–560, 2010.

BUNEA, A. et al. Anthocyanin determination in blueberry extracts from various cultivars and their antiproliferative and apoptotic properties in B16-F10 metastatic murine melanoma cells. **Phytochemistry**, v. 95, p. 436–444, 2013.

CAVALCANTI, R. N. **Extração de antocianinas de resíduo de jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) utilizando líquido pressurizado e fluido supercrítico: caracterização química, avaliação econômica e modelagem matemática.** [s.l.] Unicamp, 2013.

CESA, S. et al. Evaluation of processing effects on anthocyanin content and colour modifications of blueberry (*Vaccinium* spp.) extracts: Comparison between HPLC-DAD and CIELAB analyses. **Food Chemistry**, v. 232, p. 114–123, 2017.

CHAVARRIA, G. et al. Relações hídricas, rendimento e compostos fenólicos de uvas cabernet sauvignon em três tipos de solo. **Bragantia**, v. 70, n. 3, p. 481–487, 2011.

CHEN, S. et al. Predicting the anthocyanin content of wine grapes by NIR hyperspectral imaging. **Food Chemistry**, v. 172, p. 788–793, 2015.

CHIABRANDO, V.; GIACALONE, G. Shelf-life extension of highbush blueberry using 1-methylcyclopropene stored under air and controlled atmosphere. **Food Chemistry**, v. 126, n. 4, p. 1812–1816, 2011.

CIPRIANO, P. DE A. **ANTOCIANINAS DE AÇAÍ (*Euterpe oleracea* Mart.) E CASCA DE JABUTICABA (*Myrciaria jaboticaba*) NA FORMULAÇÃO DE BEBIDAS ISOTÔNICAS**. [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, 2011.

DAWIDOWICZ, A. L.; WIANOWSKA, D.; OLSZOWY, M. On practical problems in estimation of antioxidant activity of compounds by DPPH method (Problems in estimation of antioxidant activity). **Food Chemistry**, v. 131, n. 3, p. 1037–1043, 2012.

DE SOUZA, V. R. et al. Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. **Food Chemistry**, v. 156, p. 362–368, 2014.

DEL RIO, D. et al. Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, n. 14, p. 1818–1892, 2013.

DESSIMONI-PINTO, N. A. V. et al. Jaboticaba peel for jelly preparation: an alternative technology. **Ciencia E Tecnologia De Alimentos**, v. 31, n. 4, p. 864–869, 2011.

DYKES, L. et al. Prediction of total phenols, condensed tannins, and 3-deoxyanthocyanidins in sorghum grain using near-infrared (NIR) spectroscopy. **Journal of Cereal Science**, v. 60, p. 138–142, 2014.

EKICI, L. et al. Effects of Temperature, Time, and pH on the Stability of Anthocyanin Extracts: Prediction of Total Anthocyanin Content Using Nonlinear Models. **Food Analytical Methods**, v. 7, n. 6, p. 1328–1336, 2014.

FERRARI, C. C.; GERMER, S. P. M.; DE AGUIRRE, J. M. Effects of Spray-Drying Conditions on the Physicochemical Properties of Blackberry Powder. **Drying**

Technology, v. 30, n. 2, p. 154–163, 2012.

FLOEGEL, A. et al. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 7, p. 1043–1048, 2011.

FRANCIS, F. J. Analysis of anthocyanins in foods. In: **Anthocyanins as Food Colors**. New York: Academic Press, 1982. p. 181–207.

FULEKI, T.; FRANCIS, F. J. Quantative methods for analysis. 1. Extraction and Determination of Total Anthocyanin in Cranberries. **Journal of Food Science**, v. 33, p. 72–77, 1968a.

FULEKI, T.; FRANCIS, F. J. Quantitative Methods for Anthocyanins. 2. Determination of Total Anthocyanin and Degradation Index for Cranberry Juice. **Journal of Food Science**, v. 33, p. 78–83, 1968b.

GORDILLO, B. et al. Application of Differential Colorimetry to Evaluate Anthocyanin-Flavonol-Flavanol Ternary Copigmentation Interactions in Model Solutions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 35, p. 7645–7653, 2015.

GOUVÊA, A. C. M. S. et al. Anthocyanins standards (cyanidin-3-O-glucoside and cyanidin-3-O-rutinoside) isolation from freeze-dried açai (Euterpe oleraceae Mart.) by HPLC. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 32, n. 1, p. 43–46, 2012.

GUIMARÃES, W.; ALVES, M. I. R.; FILHO, N. R. A. Antocianinas em extratos vegetais: Aplicação em titulação ácido-base e identificação via cromatografia líquida/espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 35, n. 8, p. 1673–1679, 2012.

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

HIRSCH, G. E. et al. Caracterização físico-química de variedades de amora-preta da região sul do Brasil. **Ciência Rural**, v. 42, n. 5, p. 942–947, 2012.

HOSU, A.; CRISTEA, V. M.; CIMPOIU, C. Analysis of total phenolic, flavonoids, anthocyanins and tannins content in Romanian red wines: Prediction of antioxidant activities and classification of wines using artificial neural networks. **Food Chemistry**, v. 150, p. 113–118, 2014.

HUANG, W. et al. Survey of antioxidant capacity and phenolic composition of blueberry, blackberry, and strawberry in Nanjing. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B**, v. 13, n. 2, p. 94–102, 2012.

IBRAHIM SILVA, P. et al. Parameter optimization for spray-drying microencapsulation of jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) peel extracts using simultaneous analysis of responses. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 538–544, 2013.

INÁCIO, M. R. C. et al. Total anthocyanin content determination in intact açai (*Euterpe oleracea* Mart.) and palmitero-juçara (*Euterpe edulis* Mart.) fruit using near infrared spectroscopy (NIR) and multivariate calibration. **Food Chemistry**, v. 136, p. 1160–1164, 2013.

JACKMAN, R. L.; SMITH, J. L. Anthocyanins and betalains. In: HENDRY GAF & HOUGHTON JD (Ed.). . **Natural Food Colorants**. 2nd. ed. [s.l.] Chapman & Hall, 1996. p. 245–309.

JACQUES, A. C. et al. Estabilidade de compostos bioativos em polpa congelada de amora-preta (*Rubus fruticosus*) cv. Tupy. **Quimica Nova**, v. 33, n. 8, p. 1720–1725, 2010.

JACQUES, A. C.; ZAMBIAZI, R. C. Fitoquímicos em amora-preta (*Rubus* spp) Phytochemicals in blackberry. **Ciências agrárias**, v. 32, n. 1, p. 245–260, 2011.

KATALINIĆ, V. et al. Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). **Food Chemistry**, v. 119, n. 2, p. 715–723, 2010.

KAUME, L.; HOWARD, L. R.; DEVAREDDY, L. The blackberry fruit: A review on its composition and chemistry, metabolism and bioavailability, and health benefits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 23, p. 5716–5727, 2012.

KECHINSKI, C. P. et al. Degradation Kinetics of Anthocyanin in Blueberry Juice during Thermal Treatment. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 2, p. 173–176, 2010.

KEDARE, S. B.; SINGH, R. P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. **Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 4, p. 412–422, 2011.

KIM, D.-O. et al. Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) of Phenolic Phytochemicals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 13, p. 3713–3717, jun. 2002.

KORIFI, R. et al. CIEL*a*b* color space predictive models for colorimetry devices - Analysis of perfume quality. **Talanta**, v. 104, p. 58–66, 2013.

LARRAURI, J. A.; RUPÉREZ, P.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of Drying Temperature on the Stability of Polyphenols and Antioxidant Activity of Red Grape Pomace Peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 4, p. 1390–1393, abr. 1997.

LEITE-LEGATTI, A. V. et al. Jaboticaba peel: Antioxidant compounds, antiproliferative and antimutagenic activities. **Food Research International**, v. 49, p. 596–603, 2012.

LIMA, A. D. J. B. et al. Anthocyanins, pigment stability and antioxidant activity in jaboticaba [*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg]. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 3, p. 877–887, 2011.

LIMA, C. P. et al. Polyphenolic content and antioxidant capacity of fruits of Juçara (*Euterpe edulis* Martius) palm tree. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 2, p. 321–326, 2012.

LIMA, V. L. A. G. DE; MÉLO, E. DE A.; GUERRA, N. B. Correlação entre o Teor de Antocianinas e Caracterização Cromática de Polpas de Diferentes Genótipos de Aceroleira. **Brazilian Journal of Food Technology**, p. 51–55, 2007.

LOU, H. et al. Nondestructive evaluation of the changes of total flavonoid, total phenols, ABTS and DPPH radical scavenging activities, and sugars during mulberry (*Morus alba* L.) fruits development by chlorophyll fluorescence and RGB intensity values. **LWT - Food Science and Technology**, v. 47, n. 1, p. 19–24, 2012.

MACHADO, A. P. D. F. et al. Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from blackberry (*Rubus fruticosus* L.) residues: A comparison with conventional methods. **Food Research International**, v. 77, p. 675–683, 2015.

MARIANI, N. C. T. et al. NIRS and iSPA-PLS for predicting total anthocyanin content in jaboticaba fruit. **Food Chemistry**, v. 174, p. 643–648, 2015.

MARTINS, G. B. C.; SUCUPIRA, R. R.; SUAREZ, P. A. Z. A Química e as Cores. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 4, p. 1508–1534, 2015.

MORO, L. **Regulação hormonal da biossíntese de antocianinas em framboesas (*Rubus idaeus*) no período pós-colheita**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2013.

MOTTA, J. D. et al. Índice de cor e sua correlação com parâmetros físicos e físico-químicos de goiaba, manga e mamão. **Comunicata Scientiae**, v. 6, n. 1, p. 74–82, 2015.

MÜLLER, L.; FRÖHLICH, K.; BÖHM, V. Comparative antioxidant activities

of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (α TEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay. **Food Chemistry**, v. 129, n. 1, p. 139–148, 2011.

NORATTO, G. D. et al. Anticarcinogenic Effects of Polyphenolics from Mango (*Mangifera indica*) Varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 4104–4112, 2010.

NUNES, J. S. et al. Obtenção e caracterização físico-química de polpa de jabuticaba (*Myrciaria Cauliflora* Berg.) congelada. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 9, n. 1, p. 234–237, 2014.

OLIVEIRA, I. R. N. DE. **Antocianinas extraídas de Capim-gordura (*Melinis minutiflora*): Atividade antioxidante, microencapsulamento por atomização e estabilidade**. [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, 2011.

OLIVEIRA, I. R. N. DE. **Aplicação de espectroscopia de infravermelho e métodos multivariados para avaliação de características funcionais em extratos de antocianinas**. [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, 2015.

PACE, B. et al. Multiple regression models and Computer Vision Systems to predict antioxidant activity and total phenols in pigmented carrots. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 1, p. 74–81, 2013.

PAES, J. et al. Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.) residues using supercritical CO₂ and pressurized liquids. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 95, p. 8–16, 2014.

PELEGRINE, D. H. G. et al. Geleia de Mirtilo elaborada com frutas da variedade climax: desenvolvimento e análise dos parâmetros sensoriais. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 14, n. 3, p. 225–231, 2012.

PEREIRA, A. S. **Teores de carotenóides em cenoura (*Daucus Carota* L.) e sua relação com a coloração das raízes**. [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, 2002.

PORTINHO, J. A.; ZIMMERMANN, L. M.; BRUCK, M. R. Efeitos Benéficos do Açaí. **International Journal of Nutrology**, v. 5, n. 1, p. 15–20, 2012.

PRIOR, R. L. et al. Purified blueberry anthocyanins and blueberry juice alter development of obesity in mice fed an obesogenic high-fat diet. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 7, p. 3970–3976, 2010.

QUEIROZ, A. J. DE M. **Evolução das antocianinas, atividade antioxidante e parâmetros de cor no Vinho do Porto ao longo do seu envelhecimento**. [s.l.] Universidade do Porto, 2015.

RAMOS, E. M. **Avaliação da qualidade de carnes: fundamentos e metodologias**. Viçosa - MG: Editora UFV, 2007.

RASINES-PEREA, Z. et al. Fast determination of anthocyanins in red grape musts by Fourier transform mid-infrared spectroscopy and partial least squares regression. **European Food Research and Technology**, v. 240, n. 5, p. 897–908, 2015.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9–10, p. 1231–1237, maio 1999.

ROCHA, W. S. et al. Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 4, p. 1215–1221, 2011.

RODRIGUES, E. et al. Phenolic compounds and antioxidant activity of blueberry cultivars grown in Brazil. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 31, n. 4, p. 911–917, 2011.

RODRIGUES, S. et al. Ultrasound extraction of phenolics and anthocyanins from jabuticaba peel. **Industrial Crops and Products**, v. 69, p. 400–407, 2015.

RODRIGUEZ-SAONA, L. E.; WROLSTAD, R. E. Extraction, Isolation, and Purification of Anthocyanins. In: **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2001.

SARIBURUN, E. et al. Phenolic content and antioxidant activity of raspberry and blackberry cultivars. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 4, p. 328–335, 2010.

SÉFORA BEZERRA SOUSA, M.; MORAIS VIEIRA, L.; LIMA, A. DE. Fenólicos totais e capacidade antioxidante in vitro de resíduos de polpas de frutas tropicais. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 14, n. 3, p. 202–210, 2011.

SILVA, M. C. et al. Use of the jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) depulping residue to produce a natural pigment powder with functional properties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 55, n. 1, p. 203–209, 2014.

SILVA, S. R. **Extração e estabilidade de pigmentos antociânicos de frutos de maria-pretinha (*Solanum americanum*, mil.)**. [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, 1996.

SILVA, G. J. F. DA et al. Formulação e estabilidade de corantes de antocianinas extraídas das cascas de jabuticaba (*Myrciaria* ssp.). **Alim. Nutr., Araraquara**, v. 21, n. 3, p. 429–436, 2010.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. J. Colorimetry of Total Phenolics with

Phosmolybdic-phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144–158, 1965.

STEVENSON, D.; SCALZO, J. Anthocyanin composition and content of blueberries from around the world. **Journal of Berry Research**, v. 2, n. 4, p. 179–189, 2012.

STÜLP, M.; GNAS, B. B. B.; CLEMENTE, E. Conservation and Nutritional Quality. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 38, n. 4, p. 361–366, 2014.

TEIXEIRA, L. N.; STRINGHETA, P. C.; OLIVEIRA, F. A. DE. Comparação de métodos para quantificação de antocianinas. **Revista Ceres**, v. 55, n. 4, p. 297–304, 2008.

TIWARI, B. K. et al. Effect of ultrasound processing on anthocyanins and color of red grape juice. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 17, n. 3, p. 598–604, 2010.

TRINDERUP, C. H. et al. A Comparison of Meat Colour Measurements From a Colorimeter and Multispectral Images . **Hyperspectral Imaging**, n. 2009, p. 749–757, 2013.

VEBERIC, R. et al. Anthocyanin composition of different wild and cultivated berry species. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 1, p. 509–517, 2015.

VEITCH, N. C.; GRAYER, R. J. Flavonoids and their glycosides, including anthocyanins. **Natural Product Reports**, v. 28, n. 10, p. 1626, 2011.

VIEIRA, L. M. et al. Fenólicos totais e capacidade antioxidante in vitro de polpas de frutos tropicais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 3, p. 888–897, 2011.

VIEITES, R. L. et al. Caracterização físico-química, bioquímica e funcional da jabuticaba armazenada sob diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 2, p. 362–375, 2011.

VIZZOTTO, M. et al. Teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante em diferentes genótipos de amoreira-preta (*Rubus* sp.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, n. 3, p. 853–858, 2012.

VIZZOTTO, M.; PEREIRA, M. C. Amora-preta (*Rubus* sp.): otimização do processo de extração para determinação de compostos fenólicos antioxidantes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 4, p. 1209–1214, 2011.

WANG, E. et al. Isolation of high-purity anthocyanin mixtures and monomers from blueberries using combined chromatographic techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 1327, p. 39–48, 2014.

WOOTTON-BEARD, P. C.; MORAN, A.; RYAN, L. Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin-Ciocalteu methods. **Food Research International**, v. 44, n. 1, p. 217–224, 2011.

WROLSTAD, R. E. Colors and pigment analysis in fruit products. **Coravallis, Oregon Agricultural Experimental Station.**, p. 17p., 1976.

YOU, Q. et al. Comparison of anthocyanins and phenolics in organically and conventionally grown blueberries in selected cultivars. **Food Chemistry**, v. 125, n. 1, p. 201–208, 2011.