

**POLLYANNA IBRAHIM SILVA**

**OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO E MICROENCAPSULAMENTO DE  
POLIFENÓIS E ANTOCIANINAS DE JABUTICABA (*Myrciaria jaboticaba*)**

Tese 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 *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2011

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S586o  
2011

Silva, Pollyanna Ibrahim, 1981-  
Otimização da extração e microencapsulamento de  
polifenóis e antocianinas de jaboticaba  
(*Myrciaria jaboticaba*) / Pollyanna Ibrahim Silva.  
– Viçosa, MG, 2011.  
xii, 159f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Paulo Cesar Stringheta.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Antocianinas - Extração. 2. Polifenóis - Extração.  
4. Microencapsulação. 4. Jaboticaba. I. Universidade Federal  
de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 664.07

POLLYANNA IBRAHIM SILVA

**OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO E MICROENCAPSULAMENTO DE  
POLIFENÓIS E ANTOCIANINAS DE JABUTICABA (*Myrciaria jaboticaba*)**

Tese 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 *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 08 de julho de 2011.

---

Prof<sup>ª</sup>. Jane Selia dos Reis Coimbra  
(Coorientadora)

---

Prof. Reinaldo Francisco Teófilo  
(Coorientador)

---

Prof<sup>ª</sup>. Tânia Toledo de Oliveira

---

Prof<sup>ª</sup>. Michele Corrêa Bertoldi

---

Prof. Paulo Cesar Stringheta  
(Orientador)

*A minha mãe Verônica, meu irmão Vinicius e minha sobrinha Luíza.  
A vocês o meu agradecimento, amor e admiração!*

*Ao meu marido André, pela generosidade, compreensão e amor.  
Muito obrigado pelas inúmeras ajudas! Esta tese também é uma conquista  
sua!*

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas bênçãos constantes em minha vida.

À minha família, que sempre se faz presente em todos os momentos. Ao André, à minha mãe, meu irmão, minha sobrinha, tios e tias, primos e primas, meu sogro, sogra e cunhados. Obrigada pelo estímulo constante!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos e à FAPEMIG, pelo financiamento do projeto. À Universidade Federal de Viçosa, instituição responsável pela minha formação, por sua excelência em ensino e pesquisa. Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, por proporcionar a realização de meu curso.

Ao Professor Dr. Paulo Cesar Stringheta, pela orientação, dedicação, apoio e incentivo constantes ao longo de tantos anos de orientação. Obrigada por tudo!

Ao Professor Dr. Reinaldo Francisco Teófilo, pela excelente coorientação e pelo auxílio nas análises estatísticas.

À Professora Dr<sup>a</sup>. Jane Selia dos Reis Coimbra, pelas valiosas sugestões ao longo do trabalho.

À Professora Dr<sup>a</sup>. Michele Corrêa Bertoldi, pelo incentivo e por estar sempre pronta a ajudar.

À Professora Dr<sup>a</sup>. Tânia Toledo de Oliveira, pelas sugestões nos artigos.

Aos colegas de trabalho do curso de Engenharia de Alimentos do “CAUFES”, especialmente à Consuelo, Mirela, Raquel e Suzana, pela amizade e incentivo, e também pelos inúmeros cafezinhos. Ao Edgard, pelo auxílio na confecção dos modelos matemáticos.

Aos colegas do Laboratório de Pigmentos Naturais e Compostos Bioativos, especialmente à Isadora, Paula Cipriano, Paula Araújo, Mayra, Flávia, Igor, Adriana e Valério, pela ajuda, companheirismo, e pela alegre convivência.

Ao professor Luiz Carlos Salomão, responsável pelo Campo Experimental da Fruticultura da UFV, pelo fornecimento de jaboticaba.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV, pela realização das análises de microscopia eletrônica de varredura.

Enfim, a todos que contribuíram para a realização deste estudo o meu muito obrigado!

## **BIOGRAFIA**

POLLYANNA IBRAHIM SILVA, filha de Geraldo Edson da Silva e Verônica Ibrahim Silva, nasceu em 21 de junho de 1981, na cidade de Brasília-DF.

Em março de 2000, iniciou o curso de Engenharia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa – MG, concluindo-o dezembro de 2004. Em março de 2005 iniciou o curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, concluindo-o em fevereiro de 2007.

Em agosto de 2008 iniciou o curso de Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa da Tese em 8 de julho de 2011.

## ÍNDICE

	<i>Página</i>
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	
1.1 Compostos fenólicos	1
1.1.1 Favonóides	2
1.1.2 Ácidos fenólicos	4
1.1.3 Taninos	5
1.2 Antocianinas	5
1.3 Jabuticaba	10
1.3.1 Informações gerais	10
1.3.2 Composição química	10
1.4 Extração de antocianinas por solventes	12
1.5 Microencapsulamento	16
1.6 Referências bibliográficas	18
<b>2 OBJETIVOS</b>	
2.1 Objetivo geral	26
2.2 Objetivos específicos	26
<b>ARTIGO Nº 1</b>	
Otimização da extração de antocianinas e polifenóis de Jabuticaba ( <i>Myrciaria jaboticaba</i> ) com soluções orgânicas usando a Metodologia de Superfície de Respostas	
1 Introdução	27
2 Material e métodos	28
2.1 Material	28
2.2 Métodos	28
2.2.1 Preparo da polpa de jabuticaba	28
2.2.2 Extração dos compostos bioativos da polpa de jabuticaba	29
2.2.3 Delineamento experimental e análises estatísticas	29
2.2.3.1 Experimento de otimização	29
2.2.3.2 Estudo comparativo do desempenho das soluções extratoras envolvidas nos planejamentos compostos centrais	31
2.2.3.3 Estudo comparativo da eficiência extratora das soluções de etanol 70% e metanol 70% e efeito do pH	31
2.2.4 Análises quantitativas	31
2.2.4.1 Teor de antocianinas	31
2.2.4.2 Conteúdo fenólico total	31
2.2.4.3 Atividade antioxidante	32
2.2.5 Análise colorimétrica	32
3 Resultados e discussão	32

3.1	Estudos de otimização	32
3.1.1	Análises quantitativas	32
3.1.1.1	Etanol	34
3.1.1.2	Metanol	37
3.1.1.3	Acetona	42
3.1.2	Análise colorimétrica	44
3.1.3	Estudo comparativo do desempenho das soluções extratoras avaliadas nos planejamentos compostos centrais	47
3.2	Estudo comparativo da eficiência extratora das soluções de etanol e metanol 70% e efeito do pH	49
3.2.1	Efeito do pH	49
3.2.2	Comparação da eficiência extratora das soluções de etanol 70% e metanol 70%	51
4	Conclusão	53
5	Referências bibliográficas	53

## **ARTIGO N° 2**

Otimização da extração de antocianinas e polifenóis antioxidantes de Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) com soluções aquosas sulfuradas empregando a Metodologia de Superfície de Respostas

1	Introdução	58
2	Material e métodos	59
2.1	Material	59
2.2	Métodos	59
2.2.1	Extração dos compostos bioativos da jaboticaba	59
2.2.2	Delineamento experimental e análises estatísticas	60
2.2.3	Análises quantitativas	61
2.2.3.1	Teor de antocianinas	61
2.2.3.2	Conteúdo fenólico total	62
2.2.3.3	Atividade antioxidante	62
2.2.4	Análise colorimétrica	62
3	Resultados e discussão	63
3.1	Análises quantitativas	63
3.2	Análise colorimétrica	68
4	Conclusão	71
5	Referências bibliográficas	72

## **ARTIGO N° 3**

Microencapsulamento por *spray dryer* de extrato de Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*): influência das condições do processo de secagem

1	Introdução	74
2	Material e métodos	76
2.1	Material	76
2.2	Métodos	76
2.2.1	Delineamentos experimentais e análises estatísticas	76

2.2.1.1	Experimento de triagem	76
2.2.1.2	Experimento de otimização	77
2.2.2	Preparo dos extratos concentrados de jaboticaba	78
2.2.3	Preparo das microcápsulas	78
2.2.4	Análises quantitativas	79
2.2.4.1	Teor de antocianinas e retenção percentual	79
2.2.4.2	Teor de umidade, sólidos totais e sólidos solúveis	80
2.2.4.3	Higroscopicidade	80
2.2.4.4	Análise de reconstituição da cor	80
2.2.4.5	Atividade antioxidante	81
2.2.5	Microscopia eletrônica de varredura	81
2.2.6	Isotermas de sorção	82
3	Resultados e discussão	83
3.1	Caracterização dos extratos antes da secagem	83
3.1.1	Experimento de triagem	83
3.1.2	Experimento de otimização	83
3.2	Análises dos pós no experimento de triagem	83
3.3	Análises dos pós no experimento de otimização	85
3.4	Microscopia eletrônica de varredura	93
3.4.1	Experimento de triagem	93
3.4.2	Experimento de otimização	95
3.5	Isotermas de sorção	97
4	Conclusão	100
5	Referências bibliográficas	100

#### **ARTIGO Nº 4**

Otimização de parâmetros para o microencapsulamento por *spray dryer* de extratos de cascas de Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) usando análise simultânea das respostas

1	Introdução	104
2	Material e métodos	106
2.1	Material	106
2.2	Métodos	107
2.2.1	Preparo dos extratos concentrados de jaboticaba	107
2.2.2	Agentes carreadores	107
2.2.3	Preparo das microcápsulas	107
2.2.4	Análises quantitativas	108
2.2.4.1	Teor de antocianinas e retenção percentual	108
2.2.4.2	Teor de umidade, sólidos totais e sólidos solúveis	109
2.2.4.3	Higroscopicidade	109
2.2.4.4	Análise de reconstituição da cor	109
2.2.4.5	Atividade antioxidante	110
2.2.5	Microscopia eletrônica de varredura	110

2.2.6	Solubilidade do pó em sistema-modelo alimentício de bebida isotônica	111
2.2.7	Análises estatísticas	112
2.2.7.1	Delineamento experimental	112
2.2.7.2	Análise de otimização pela função de desejabilidade	112
3	Resultados e discussão	114
3.1	Caracterização dos extratos antes da secagem	114
3.2	Análises quantitativas individuais	114
3.3	Otimização simultânea pela função de desejabilidade	121
3.4	Microscopia eletrônica de varredura	123
3.5	Solubilidade dos pós em sistema-modelo alimentício de bebida isotônica	126
4	Conclusão	127
5	Referências bibliográficas	128
	<b>ARTIGO N° 5</b>	
	Métodos de extração de antocianinas: uma breve revisão	
	Resumo	132
	Abstract	132
1	Introdução	133
2	Métodos de extração	136
2.1	Extração convencional com soluções orgânicas	136
2.2	Extração com soluções sulfuradas	141
2.3	Novas tecnologias de extração	144
2.3.1	Alta pressão hidrostática	144
2.3.2	Campos elétricos pulsados	146
2.3.3	Ultrassom	147
2.3.4	Microondas	148
2.3.5	Irradiação	150
3	Considerações finais	151
4	Referências bibliográficas	151
3	<b>CONCLUSÃO GERAL</b>	158

## RESUMO

SILVA, Pollyanna Ibrahim. D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2011.  
**Otimização da extração e microencapsulamento de polifenóis e antocianinas de jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba*).** Orientador: Paulo Cesar Stringheta.  
Coorientadores: Jane Selia dos Reis Coimbra e Reinaldo Francisco Teófilo.

As antocianinas pertencem ao grupo dos flavonóides e são responsáveis por grande parte das cores em flores, frutas, folhas, caules e raízes de plantas. Uma das propriedades mais importantes destes pigmentos é a sua atividade antioxidante, que está envolvida na prevenção de diversas doenças. A jabuticaba é uma fruta nativa do estado de Minas Gerais, e, apesar de largamente consumida no Brasil, seus aspectos fitoquímicos são pouco estudados. Sabe-se que suas cascas são fontes de antocianinas e de importantes compostos fenólicos, de elevada ação antioxidante. O estudo de compostos bioativos em extratos de frutos tropicais e exóticos, como a jabuticaba, é importante, uma vez que poderá se tornar viável na adição em alimentos formulados e bebidas. Nesse contexto, este estudo teve como objetivo otimizar a extração de compostos bioativos de jabuticaba, avaliando seu comportamento em diferentes condições extratoras e estudar o microencapsulamento por *spray dryer* das antocianinas da jabuticaba. Nos estudos de extração, os compostos bioativos da jabuticaba foram extraídos com solventes orgânicos (etanol, metanol e acetona) e com soluções aquosas sulfuradas. Foi utilizada a metodologia de superfície de resposta com planejamentos compostos centrais, avaliando-se, no estudo com os solventes orgânicos, o efeito do pH (2,9 a 7,1) e da concentração de solvente (39,6 a 100%) no teor de antocianinas, conteúdo fenólico total, na atividade antioxidante e nas coordenadas colorimétricas  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $h$  e  $C^*$ . No estudo com soluções aquosas sulfuradas, avaliou-se o efeito da concentração de  $SO_2$  (93 a 1607 ppm), da relação solvente:casca (5 a 15 mL.g<sup>-1</sup>) e do tempo de extração (3 a 12 h) sobre as mesmas respostas. No microencapsulamento das antocianinas de jabuticaba, foi realizada otimização usando a metodologia de superfície de respostas com planejamento composto central no efeito de diferentes fluxos de alimentação do *spray dryer* (324 a 414 mL.h<sup>-1</sup>), definido por prévio estudo de triagem (avaliação de fluxos de 180, 360 e 540 mL.h<sup>-1</sup>), e de temperaturas de entrada do ar de secagem (144 a 180 °C) nas respostas retenção de antocianinas, teor de umidade, higroscopicidade, diferença global de cor, atividade antioxidante e microestrutura. Foram obtidas isotermas de

sorção dos pós provenientes do estudo de triagem. Em outro estudo de microencapsulamento de antocianinas de jabuticaba avaliou-se o efeito de diferentes encapsulantes (maltodextrina 30%, mistura de goma arábica 25% com maltodextrina 5% e mistura de Capsul® 25% com maltodextrina 5%) e de diferentes temperaturas de entrada do ar de secagem (140, 160 e 180 °C) na retenção de antocianinas, umidade, higroscopicidade, diferença global de cor, microestrutura e solubilidade em sistema-modelo de bebida isotônica. Foi realizada a otimização simultânea das respostas utilizando-se a função estatística desejabilidade. Os resultados obtidos nos estudos de extração com solventes orgânicos mostraram que a extração de antocianinas é mais eficiente com metanol ou etanol a 70%, em pH menor que 2,5, havendo a alternativa de extração eficaz utilizando solventes puros (100%) e pH neutro. O metanol 70% mostrou-se o melhor extrator. Na extração com soluções sulfuradas, verificou-se que a melhor condição para se obter o máximo de antocianinas e de ação antioxidante foi 900 ppm de SO<sub>2</sub>, durante 9 horas de extração. No estudo de otimização do microencapsulamento, verificou-se que a associação de temperaturas de entrada elevadas (> 170 °C) com fluxos de alimentação mais baixos (< 340 mL.h<sup>-1</sup>), e de fluxos elevados (> 360 mL.h<sup>-1</sup>) com temperaturas mais baixas (150 °C) promoveram maior retenção de antocianinas e menor diferença global de cor. O modelo de GAB foi o que melhor descreveu as isotermas de sorção dos pós dos experimentos de triagem. No estudo do microencapsulamento com diferentes carreadores e temperaturas de entrada, com otimização simultânea por desejabilidade, encontrou-se como condição ideal de microencapsulamento o uso do carreador maltodextrina 30% e temperatura de entrada de 180 °C para a obtenção de pigmentos em pó de jabuticaba apresentando, ao mesmo tempo, maior retenção de antocianinas, menor diferença de cor, e menor teor de umidade e higroscopicidade. A solubilidade em sistema-modelo de bebida isotônica não apresentou variação entre os diferentes carreadores.

## ABSTRACT

SILVA, Pollyanna Ibrahim. D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2011.  
**Extraction optimization and microencapsulation of polyphenols and anthocyanins from jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba*).** Adviser: Paulo Cesar Stringheta. Co-Advisers: Jane Selia dos Reis Coimbra and Reinaldo Francisco Teófilo.

Anthocyanins belong to the flavonoids family and are responsible for most of the colors in flowers, fruits, leaves, stems and roots of plants. One of the most important properties of these pigments is their antioxidant activity, which is related to the prevention of several diseases. The jabuticaba is a fruit native from Minas Gerais state and, although widely consumed in Brazil, its phytochemical aspects are little studied. It is known that their skins are a source of anthocyanins and important phenolic compounds, which have high antioxidant activity. The study of bioactive compounds present in extracts of tropical and exotic fruits such as jabuticaba is important, since it could be feasible in addition to formulated foods and beverages. Therefore, this study aimed to optimize the extraction of bioactive compounds from jabuticaba, by assessing their behavior under different extraction conditions and to study the microencapsulation by spray-drying of anthocyanins from this fruit. In extraction studies, the bioactive compounds from jabuticaba were extracted with organic solvents (ethanol, methanol and acetone) and with aqueous sulfured solutions, using response surface methodology and central composite designs and, to evaluate, in the study of organic solvents, the effect of pH (2.9 to 7.1) and solvent concentration (39.6 to 100%) in total anthocyanins, total phenolic content, antioxidant activity and colorimetric coordinates  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$  and  $h$ . In the study of aqueous sulfured solutions, the effect of  $SO_2$  concentration (93 to 1607 ppm), ratio solvent:skin (5 to 15 mL.g<sup>-1</sup>) and extraction time (3 to 12 h) were evaluated on the same responses. On the microencapsulation of anthocyanins from jabuticaba, optimization was performed using response surface methodology and a central composite design, analyzing the effect of different spray dryer feed flow (324 to 414 mL.h<sup>-1</sup>), defined by a previous screening study (evaluation of feed flows of 180, 360 and 540 mL.h<sup>-1</sup>), and the effect of inlet temperatures (144 to 180 °C) on the responses anthocyanins retention, moisture content, hygroscopicity, overall difference of color, antioxidant activity and microstructure. Sorption isotherms were obtained using the

powders from the screening study. In another study of microencapsulation of jaboticaba anthocyanins, the effect of different carrier agents (30% maltodextrin, a mixture of arabic gum 25% with 5% maltodextrin and a mixture of Capsul<sup>®</sup> 25% with 5% maltodextrin), and the effect of different inlet temperatures (140, 160 and 180 °C) were evaluated. The responses analyzed were anthocyanins retention, moisture content, hygroscopicity, overall difference of color, microstructure and solubility in model-systems of isotonic drinks. It was performed simultaneous optimization of the responses using the statistical function *desirability*. The results obtained on the extraction studies using organic solvents showed that the extraction of anthocyanins was more efficient when using methanol or ethanol 70%, at pH lower than 2.5, with the alternative of using pure solvents (100%) and neutral pH. Methanol 70%, in the conditions of this study, was the best extraction solvent. In the extraction study using aqueous sulfured solutions, it was found that the best condition to obtain the maximum of anthocyanins content and antioxidant activity was employing 900 ppm of SO<sub>2</sub>, during nine hours of extraction. In the study of optimization of microencapsulation by central composite design, it was found that the combination of higher inlet temperatures (> 170 °C) with lower feed flows (< 340 mL.h<sup>-1</sup>), and the association of higher feed flows (> 360 mL.h<sup>-1</sup>) with lower temperatures (150 °C), promoted higher anthocyanins retention and lower overall difference in color. The GAB model was the best on the description of the sorption isotherms from the powders of screening experiments. In the study of microencapsulation employing various carriers agents and various inlet temperatures, using simultaneous optimization by *desirability*, it was found as an ideal condition of microencapsulation the use of carrier agent maltodextrin 30% and inlet temperature of 180 °C, in order to obtain powder pigments from jaboticaba that present, simultaneously, greater anthocyanins retention, minor difference in color, lower moisture content and lower hygroscopicity. The solubility of the powders in model-systems of isotonic drinks did not vary between different carriers.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são definidos como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. Estes possuem estrutura variável, o que confere a eles certo caráter multifuncional. Existem pelo menos cinco mil fenóis distintos na natureza, destacando-se os flavonóides, ácidos fenólicos, fenóis simples e taninos, dentre outros (Angelo & Jorge, 2007). O grupo dos compostos fenólicos engloba desde moléculas simples até moléculas com alto grau de polimerização, que podem estar presentes nos vegetais em sua forma livre ou ligados a açúcares e a proteínas (Angelo & Jorge, 2007).

A propriedade mais marcante dos compostos fenólicos é a ação antioxidante. Eles atuam como antioxidantes em concentrações relativamente baixas, visto que são suscetíveis à oxidação (Robards, 2003), e contribuem para a redução do risco de doenças como catarata, câncer, aterosclerose, isquemia, alterações no sistema nervoso, dentre outras (Temple, 2000).

Cada composto fenólico tem um poder antioxidante diferente em função de sua estrutura química, o que significa que os compostos fenólicos presentes em maiores concentrações em uma amostra não são necessariamente aqueles que possuem o maior potencial antioxidante (Alonso *et al.*, 2002; Alonso *et al.*, 2004).

A atividade química dos polifenóis em termos de seu potencial antioxidante ocorre por meio da doação de elétrons ou átomos de hidrogênio aos radicais livres, ou como quelantes de metais, inibindo a formação de radicais livres catalisados por metais de transição. Os radicais fenóxido formados são intermediários bastante estáveis e dificilmente iniciam uma nova reação em cadeia, pois reagem com outros radicais livres, interrompendo as reações de propagação (Pietta, 2000). A atividade antioxidante é determinada, então, pelo seu potencial de redução, pela habilidade de estabilização e deslocalização do elétron desemparelhado, pela reatividade e efeito sinérgico com outros compostos, pelo seu potencial de quelar metais de transição, como ferro e cobre, e por rearranjos estruturais (Rice-Evans *et al.*, 1997).

Os principais grupos de compostos fenólicos de maior importância são os flavonóides, ácidos fenólicos, taninos e antocianinas, e serão brevemente descritos a seguir.

### **1.1.1. Flavonóides**

Os flavonóides são compostos naturalmente presentes em frutas, vegetais e bebidas como chás e vinho, e exercem efeitos protetores no organismo contra os danos produzidos por agentes oxidantes (Martínez-Flórez *et al.*, 2002). Os flavonóides podem ser divididos em classes, baseadas na sua estrutura molecular (Nijveldt *et al.*, 2001; Martínez-Flórez *et al.*, 2002). A estrutura básica destes compostos consiste de 15 carbonos distribuídos em dois anéis aromáticos (A e B – Figura 1) interligados via carbono heterocíclico do pirano. Conforme o estado de oxidação da cadeia heterocíclica do pirano, encontram-se diferentes classes de flavonóides: antocianinas, flavonóis, flavanas, isoflavonas, flavononas e flavonas. Os grupos de flavonóides de maior importância, juntamente com suas fontes alimentares, são mostrados na Tabela 1 (Nijveldt *et al.*, 2001). A estrutura molecular de cada grupo pode ser vista na Figura 5 (Martínez-Flórez *et al.*, 2002).

Pelo fato de as antocianinas representarem um grupo polifenólico de grande importância e destaque, este grupo será descrito como um item a parte (item 1.2).

Tabela 1 - Grupos de flavonóides, seus componentes individuais e fontes alimentares (Nijveldt *et al.*, 2001; Tapiero *et al.*, 2002a)

<b>Grupos</b>	<b>Componentes Principais</b>	<b>Fonte alimentar</b>
Flavonas	Apigenina	Cascas de maçãs
	Chrisina	<i>Berries</i>
	Kaempferol	Brócolis
	Luteolina	Peles de frutas
	Miricetina	<i>Cranberries</i>
	Rutina	Uvas
	Sibelina	Alfaces
	Quercetina	Oliva
Isoflavonas	Daidzeína	Alho
	Genisteína	Soja
	Biochanina A	
Flavanonas	Fisetina	Frutas cítricas
	Hesperetina	Peles de frutas cítricas
	Narigina	
	Naringenina	
	Taxifolina	
Catequinas	Catequina	Vinho tinto
	Epicatequina	Chá
	Epigallocatequina galato	
Antocianinas	Cianidina	<i>Berries</i>
	Delfinidina	Cerejas
	Malvidina	Uvas
	Pelargonidina	<i>Raspberries</i>
	Peonidina	Uvas, jabuticaba
	Petunidina	Morangos
	Chá	
		Peles de frutas com pigmentos escuros

As flavonas são representadas principalmente pela miricetina, kaempferol, quercetina e rutina. Quercetina encontra-se particularmente abundante em cebola e chá (Tapiero *et al.*, 2002b). Flavonas menos comuns são a luteolina, identificada em flores, e a apigenina, identificada em camomila (Tapiero *et al.*, 2002b).

Isoflavonas são principalmente representadas pela daidzeína e pela genisteína, cuja fonte principal é a soja. Estas duas isoflavonas têm recebido atenção considerável devido a suas propriedades estrogênicas e a seu papel na redução do risco de câncer de mama e osteoporose (Tapiero *et al.*, 2002a).

Catequinas são os principais flavanóis abundantes em chá verde e chá preto. Estão presentes também em vinho tinto e chocolate (Tapiero *et al.*, 2002b).

As flavanonas são representadas principalmente por taxifolina, naringenina e hesperitina. As principais fontes de flavanona são frutas cítricas e a mais consumida é a hesperitina de laranjas (Tapiero *et al.*, 2002b).

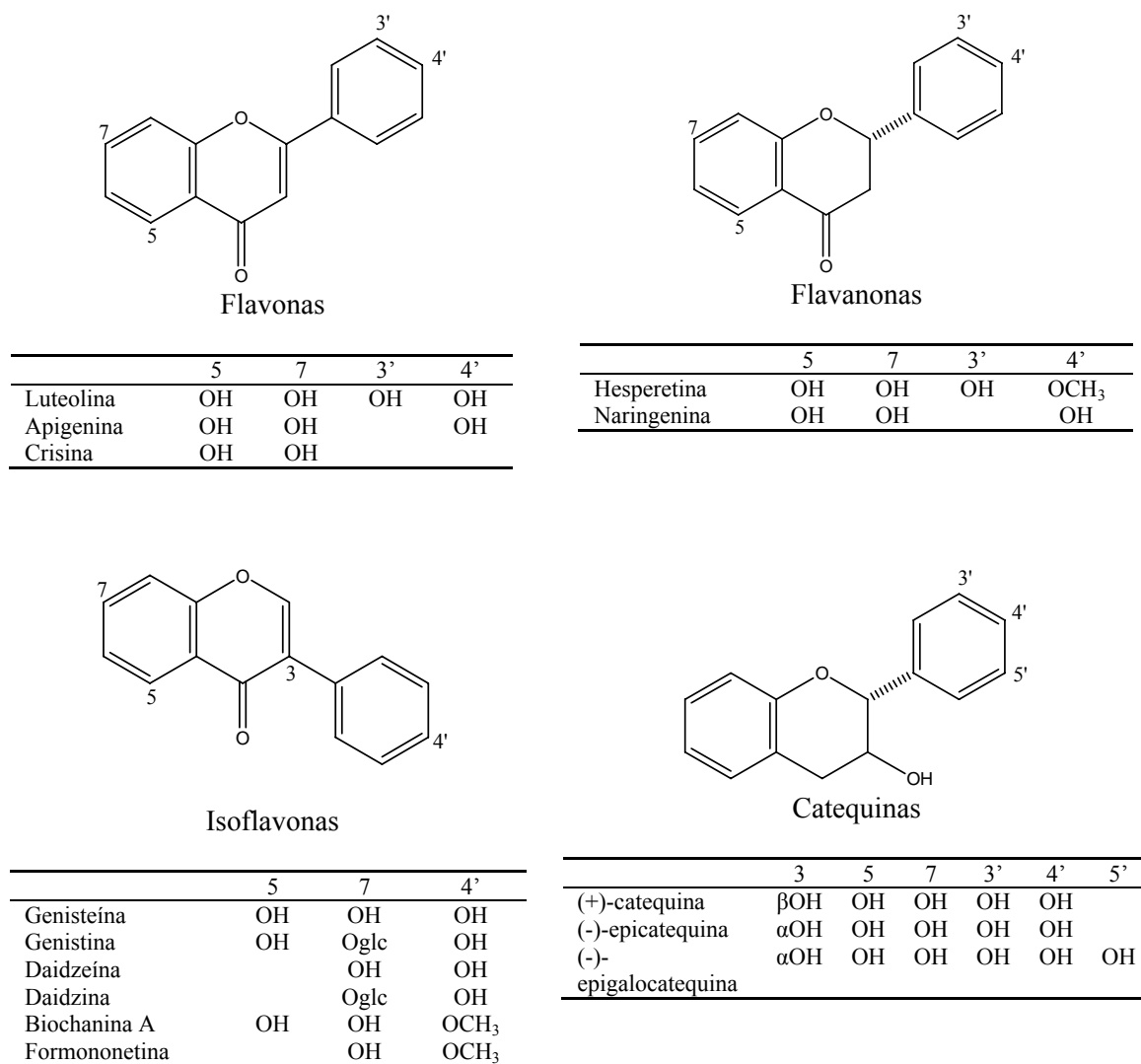
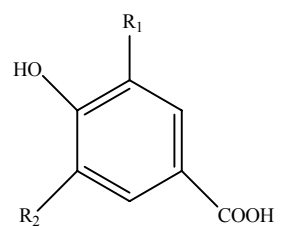


Figura 1 - Estrutura química dos principais grupos de flavonóides não antociânicos.  
Adaptado: Pietta (2000).

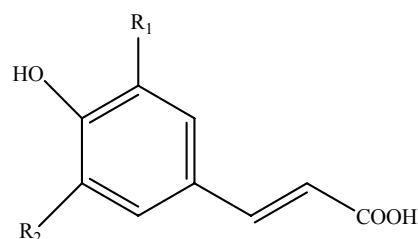
### 1.1.2. Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos consistem em dois grupos, um deles derivado do ácido hidroxibenzóico e outro derivado do ácido hidroxicinâmico (Figura 2). Os ácidos hidroxibenzóicos incluem os ácidos gálico, p-hidroxibenzóico, protocatecúico, vanílico e siríngico, que têm estrutura comum, C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>, enquanto os ácidos hidroxicinâmicos são compostos com três carbonos que formam uma cadeia lateral, e os ácidos caféico, ferúlico, p-cumárico e sináptico são os mais comuns (Angelo & Jorge, 2007).



Ácidos hidroxibenzoicos

	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Ácido p-hidroxibenzoico	H	H
Ácido protocatecuico	OH	H
Ácido vanílico	OCH <sub>3</sub>	H
Ácido siríngico	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>



Ácidos hidroxicinâmicos

	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Ácido p-cumárico	H	H
Ácido caféico	OH	H
Ácido ferúlico	OCH <sub>3</sub>	H

Figura 2 – Estrutura química dos ácidos fenólicos.

Adaptado: Pietta (2000).

### 1.1.3. Taninos

São uma classe de polifenóis que possuem maior massa molecular. Os taninos condensáveis, denominados proantocianidinas, são oligômeros e polímeros de flavan-3-ol (catequina) e/ou flavan-3,4-diol (leucocianidina) (Figura 1). As proantocianidinas são assim denominadas provavelmente pelo fato de apresentarem pigmentos avermelhados da classe das antocianidinas, como cianidina e delphinidina, e apresentam uma rica diversidade estrutural, resultante de diferentes padrões de substituição, da diversidade de posições entre suas ligações e também da estereoquímica de seus compostos (Angelo & Jorge, 2007).

### 1.2. Antocianinas

As antocianinas são compostos da família dos flavonóides e constituem grupo de pigmentos responsáveis por grande parte das cores em flores, frutas, folhas, caules e raízes de plantas (Markakis, 1982). Seu espectro de cor varia do vermelho ao azul, apresentando-se também como uma mistura de ambas as cores resultando em tons púrpura. Muitas frutas, hortaliças, folhas e flores devem sua atrativa coloração a esses pigmentos que se encontram dispersos nos vacúolos celulares (Volp *et al.*, 2008; Castañeda-Ovando *et al.*, 2009).

As antocianinas são compostos solúveis em água e sensíveis ao calor (Shahidi & Naczki, 1995). Têm como estrutura básica o cátion 2-fenilbenzopirilium, também denominado *cátion flavilium* (Figura 3). Apresentam-se, na maior parte das vezes, ligadas a açúcares, que auxiliam na estabilização da molécula (Francis, 1982). As

antocianinas, então, apresentam em sua estrutura química um resíduo de açúcar geralmente na posição 3 (Figura 4), facilmente hidrolisado por aquecimento em meio ácido. Como produtos desta hidrólise obtém-se os componentes glicídicos e as agliconas, as quais são denominadas antocianidinas (Konczak & Zhang, 2004; Castañeda-Ovando *et al.*, 2009).

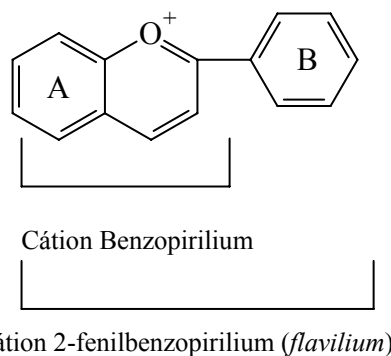
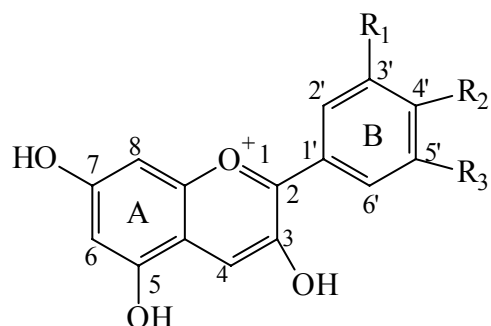


Figura 3 – Estrutura básica das antocianinas.

Adaptado: Bobbio & Bobbio (1995).

A distribuição das seis mais comuns antocianidinas em frutas e vegetais é: cianidina – 50%, delphinidina – 12%, pelargonidina – 12%, peonidina – 12%, petunidina – 7% e malvidina – 7%. Os derivados glicosídicos mais frequentes na natureza são 3-monosídeos, 3-biosídeos, 3,5- e 3,7-diglicosídeos. A presença dos derivados 3-glicosídeo é 2,5 vezes mais freqüente que os derivados 3,5-diglicosídeos e, por conseguinte, a antocianina mais comum é a cianidina-3-glicosídeo (Kong *et al.*, 2003) (Figura 4).



Antocianidinas	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Cianidina	OH	OH	H
Delfinidina	OH	OH	OH
Pelargonidina	H	OH	H
Petunidina	OMe	OH	OH
Malvidina	OMe	OMe	OMe
Peonidina	OMe	OH	H

Figura 4 – Estrutura geral das antocianidinas mais comuns.

Alternativamente, as antocianinas podem se apresentar com um ácido orgânico (alifático ou aromático) ligado à molécula do açúcar, se tornando, portanto, antocianinas aciladas (Figura 5). De acordo com Bakowska-Barczac (2005), estes pigmentos são mais estáveis, pelo empilhamento dos grupos acil com o anel *pyrilium* do cátion *flavilium*, reduzindo a possibilidade de ataque nucleofílico da água e a subsequente formação de compostos sem cor.

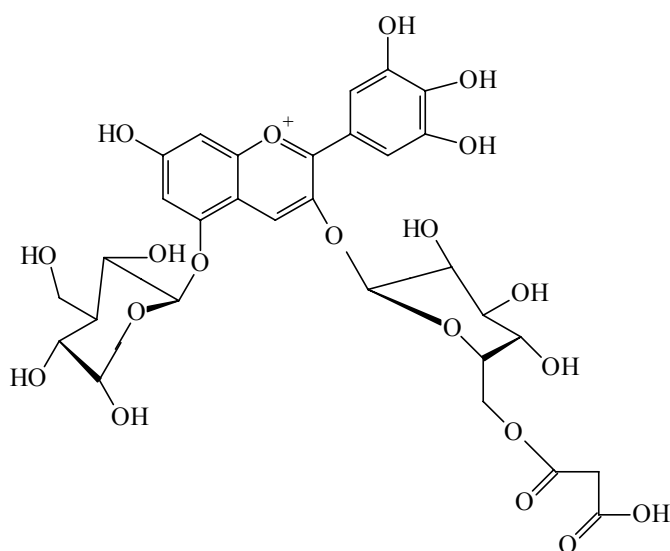


Figura 5 – Estrutura química da delfinidina-3-malonilglicosídeo-5-glicosídeo.

A propriedade mais importante das antocianinas é sua atividade antioxidante, que desempenha um papel fundamental na prevenção de doenças cardiovasculares, neurológicas, câncer e diabetes (Konczak & Zhang, 2004). Desta forma, há vários estudos sobre o efeito das antocianinas no tratamento de câncer (Lule & Xia, 2005; Nichenametla *et al.*, 2006; Hogan *et al.*, 2010), na nutrição humana (Stintzing & Carle, 2004), doenças neurológicas (Shukitt-Hale *et al.*, 2008) e atividades biológicas, como ação antioxidante e antiinflamatória (Kong *et al.*, 2003; Schauss *et al.*, 2006; Jensen *et al.*, 2008; Nisha *et al.*, 2009).

Em razão do enorme potencial das antocianinas atuarem como pigmentos com efeitos benéficos a saúde, tem havido um aumento no número de relatos na literatura em diversas áreas, como: desenvolvimento de técnicas analíticas para quantificação, separação e purificação destes pigmentos (Antolovich *et al.*, 2000; Teixeira *et al.*, 2008), aplicações em alimentos (Giusti & Wrolstad, 2003; de Rosso & Mercadante, 2007), metabolismo dos pigmentos (Mertens-Talcott *et al.*, 2008), análises quantitativas usando técnicas cromatográficas (Määttä *et al.*, 2003) e estudos de extração e estabilidade dos pigmentos (Ayed *et al.*, 1999; Montes *et al.*, 2005; Pompeu *et al.*, 2009).

As antocianinas são amplamente usadas como pigmentos naturais em alimentos, e as fontes utilizadas comercialmente são as cascas de uvas e o repolho-roxo. Paralelamente, diversas frutas de coloração escura são fontes destes pigmentos, como as jabuticabas (Reynertson *et al.*, 2008) e groselhas (Cacace & Mazza, 2002). Também estão presentes em pétalas de flores, como zínia (Rosa *et al.*, 2003) e rosele (Andrade & Flores, 2004), na inflorescência de capim-gordura (Stringheta, 1991), no açaí (Constant, 2003; Hogan *et al.*, 2010), berinjela (Azevedo *et al.*, 2007), feijão-preto (Azevedo *et al.*, 2003), batata-doce roxa (Ahmed *et al.*, 2010) e em frutos exóticos como camu-camu (Määttä *et al.*, 2003) e maria-pretinha (Nachtigall *et al.*, 2010).

Em relação à estabilidade, o pH é certamente o fator mais importante no que diz respeito à coloração das antocianinas. As soluções de antocianinas apresentam uma coloração vermelha mais intensa, em pH abaixo de 2,0. Quando se eleva o pH para a faixa de 5,0 a 6,0, a coloração vermelha tende a desaparecer. Aumentos adicionais de pH levam as antocianinas a apresentarem uma coloração azulada, as quais, após estocagem ou aquecimento, tornam-se amareladas (Mazza & Brouillard, 1987). As antocianinas estão sujeitas à mudança de cor com a variação do pH devido

à formação da estrutura hemiacetálica incolor em pH próximo a 5,0, de acordo com as reações mostradas na Figura 6. Em meio ácido, a 25 °C, quatro estruturas coexistem em equilíbrio: o cátion *flavilium*, a base quinoidal, a pseudo base ou carbinol e a chalcona. As estruturas responsáveis pela coloração das antocianinas são o cátion *flavilium* e a base quinoidal, sendo o carbinol e a chalcona incolores (Figura 6).

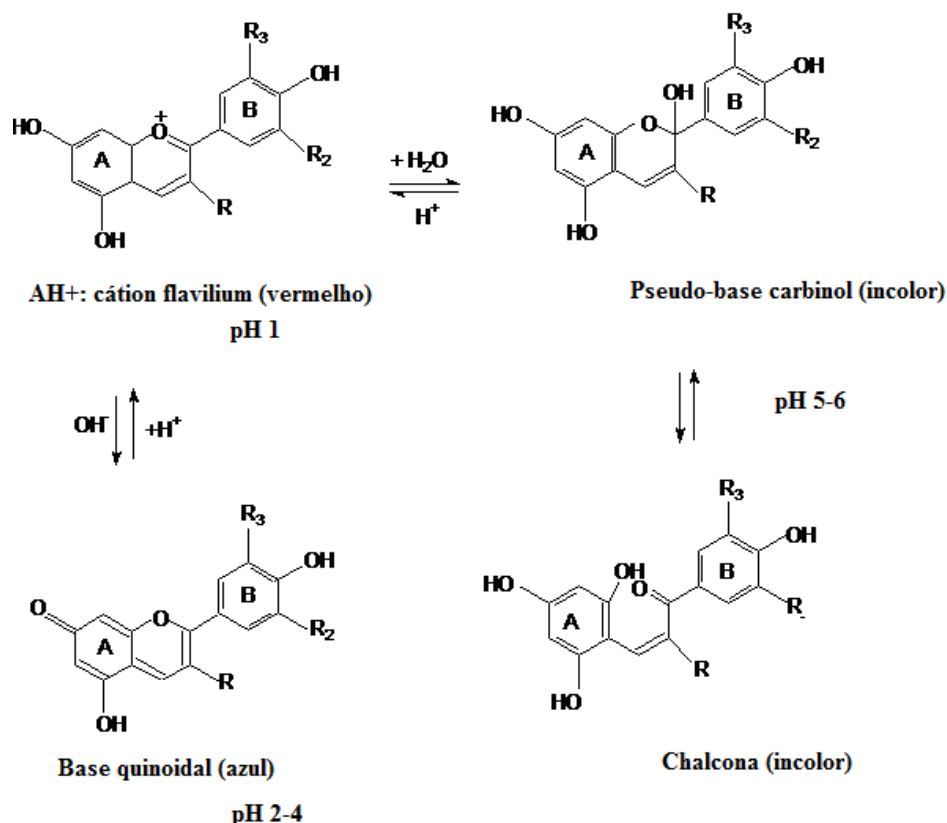


Figura 6 – Transformações estruturais das antocianinas com as mudanças de pH.  
Adaptado: Constant (2003).

As antocianinas são rapidamente destruídas pelo calor durante o processamento e estocagem dos alimentos. Os mecanismos de degradação térmica estão relacionados com a clivagem do anel heterocíclico da pseudo-base com formação da chalcona, e posterior formação de produtos derivados de coloração marrom (Schwartz *et al.*, 2010).

A luz exerce efeito duplo sobre as antocianinas: favorece sua biossíntese, mas acelera sua degradação. O oxigênio também pode apresentar efeito deletério sob as

antocianinas, acelerando sua degradação (Schwartz *et al.*, 2010). Segundo De Rosso e Mercadante (2007), em presença de ácido ascórbico a degradação do pigmento é acelerada, tanto em presença quanto em ausência de oxigênio. Alguns autores consideram que a presença de açúcares também promove a degradação mais rápida da antocianina (Sadilova *et al.*, 2009; Nachtigall *et al.*, 2010).

### **1.3. Jabuticaba**

#### **1.3.1. Informações gerais**

A jabuticaba (*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O.Berg [Myrtaceae]) é um arbusto nativo do estado de Minas Gerais. Seus frutos têm coloração arroxeada quando maduros e as cascas são ricas em antocianinas, dentre elas a cianidina-3-glicosídeo (Einbond *et al.*, 2004; Reynertson *et al.*, 2006).

Seus frutos pequenos, de casca negra e polpa branca aderida à única semente, crescem no tronco e ramos, dando uma característica peculiar à árvore. Além de consumidos *in natura*, deles se faz licor, geléia e aguardente. Por isso, a espécie é cultivada em pomares domésticos, florescendo duas vezes por ano.

A jabuticaba é utilizada para vários fins, tanto culinários, como medicinais. Entre estes é mencionada a cocção da casca seca ao sol como fitoterápico para a asma. Por sua semelhança à uva, muitos produtos, como o vinho, suco, geléia, licor e vinagre podem ser feitos com a jabuticaba. Comuns em mercados brasileiros, jabuticabas são largamente consumidas frescas, e sua popularidade têm sido ligada às das uvas nos EUA. As frutas frescas podem começar a fermentar de 3 a 4 dias após a colheita (Reynertson *et al.*, 2006).

A jabuticaba, originária do Centro-sul, pode ser encontrada desde o estado do Pará até o Rio Grande do Sul, mas é nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Espírito Santo que ocorrem as maiores produções. Dentre as espécies conhecidas destacam-se a *Myrciaria cauliflora* (DC) Berg (jabuticaba paulista ou jabuticaba açu) e a *Myrciaria jabuticaba* (Vell) Berg (jabuticaba sabará) que produzem frutos apropriados tanto para a indústria como para consumo *in natura* devido às suas características (Silva *et al.*, 2008).

#### **1.3.2. Composição química**

A jabuticaba apresenta em sua composição vitamina C com valores médios de 23 mg/100 g de polpa e minerais, em que se destacam o ferro, cálcio, fósforo e

potássio (Silva *et al.*, 2008). A Tabela 2 mostra a composição centesimal da jabuticaba.

Tabela 2 – Composição da jabuticaba por 100 g de parte comestível (Silva *et al.*, 2008)

<b>Composição</b>	<b>Quantidade</b>
Umidade	83,6
Energia (Kcal)	58
(KJ)	243
Proteína (g)	0,6
Lipídeos (g)	0,1
Colesterol (mg)	NA*
Carboidrato (g)	15,3
Fibra alimentar (g)	2,3
Cinzas (g)	0,4
Cálcio (mg)	8

\* NA – não se aplica

Os aspectos fitoquímicos da jabuticaba ainda não têm sido devidamente relatados na literatura. É reportado que a jabuticaba contém taninos e cianidina-3-glicosídeo em *M. cauliflora* (Einbond *et al.*, 2004; Reynertson *et al.*, 2006; Reynertson *et al.*, 2008). *M. jaboticaba* contém peonidina-3-glicosídeo e sua aglicona (Reynertson *et al.*, 2006). Apesar de ser uma fruta largamente consumida no Brasil, há poucos estudos abordando sua composição química. São principalmente relatados a presença de carboidratos não estruturais, estruturais, de pigmentos, de seus ácidos orgânicos (Gulab *et al.*, 2007) e de taninos (Reynertson *et al.*, 2006).

Em estudos de compostos antioxidantes e anti-câncer presentes em frutas tropicais, o extrato metanólico de jabuticaba apresentou forte atividade antioxidante no ensaio DPPH ( $IC_{50} = 35 \mu\text{g/mL}$ ) (Reynertson *et al.*, 2006) e em outro estudo, no mesmo ensaio, apresentou  $IC_{50}$  de  $19,4 \mu\text{g/mL}$  (Reynertson *et al.*, 2008).

Realizou-se, também, o isolamento de um novo depsídeo da jabuticaba, a jaboticabina (Reynertson *et al.*, 2006). Os depsídeos (Figura 7) são compostos fenólicos compostos por duas ou mais unidades aromáticas unidas por uma ligação éster, muito comuns em líquens, e ainda não tinham sido encontrados em Myrtaceae. Em geral, depsídeos apresentam atividade antibiótica, anti-HIV, antiproliferativa e antiinflamatória (Reynertson *et al.*, 2006; Reynertson *et al.*, 2008).

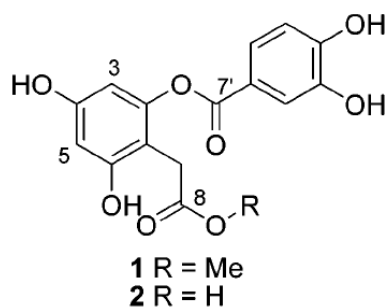


Figura 7 – Depsídeos de jaboticaba.

Fonte: Reynertson *et al.* (2006)

Piranocianina B, quercetina, isoquercetina, quercimeritrina, quercitrina, rutina, miricitrina, ácido cinâmico, ácido O-cumárico, ácido gálico, ácido protocatecúico, metil protocatecuato e ácido elágico foram identificados em Myrtaceae (Reynertson *et al.*, 2006). Em outro estudo, foram identificados e quantificados em jaboticaba a cianidina-3-glicosídeo (4,33 mg/g), delphinidina-3-glicosídeo (0,81 mg/g), ácido elágico (0,52 mg/g), miricetina (0,02 mg/g), quercetina (0,04 mg/g), quercitrina (0,11 mg/g) e rutina (0,21 mg/g) (Reynertson *et al.*, 2008). Quercetina e seus glicosídeos quercitrina e rutina prevalecem em Myrtaceae. Estes flavonóides são importantes constituintes da dieta, apresentando atividades quimiopreventivas (Formica & Regelson, 1995; Reynertson *et al.*, 2008). Segundo Reynertson *et al.* (2008), o teor de ácido elágico encontrado em jaboticaba contribui com sua atividade anti-radical.

Para um melhor aproveitamento do potencial dos compostos fenólicos biologicamente ativos de frutas são imprescindíveis maiores estudos nesta área na busca de soluções para questões como novas fontes e benefícios. O estudo de compostos fenólicos e antocianinas presentes em extratos de frutos tropicais e exóticos, como a jaboticaba, assume importância considerável, uma vez que poderá ser potencialmente viável na adição em alimentos formulados e bebidas, na forma de pó ou na forma líquida.

#### 1.4. Extração de antocianinas por solventes

A extração dos fitoquímicos de vegetais constitui um importante passo na manufatura de produtos bioativos. A aplicação de diferentes tecnologias para a obtenção de moléculas para serem usadas como aditivos em alimentos ou como

nutracêuticos pode se tornar uma estratégia racional para a exploração de uma enorme gama de vegetais (frutas e hortaliças).

O método de extração mais utilizado para a obtenção de antocianinas de frutas e hortaliças é a extração usando solventes orgânicos. Entretanto, outros métodos como o uso de alta pressão hidrostática e campos elétricos pulsados vem surgindo recentemente como alternativas para se extrair ou auxiliar na extração do pigmento da matriz vegetal, associados ou não aos solventes tradicionais (Corrales *et al.*, 2008; López *et al.*, 2008; Corrales *et al.*, 2009; Puértolas *et al.*, 2010).

A escolha do método para extração de antocianinas depende do propósito da extração e também da natureza das antocianinas. É igualmente importante que a extração e seus procedimentos posteriores, quando necessários (p.ex.: concentração do extrato, separação e purificação) não sejam complexos, demorados ou de alto custo (Garcia-Viguera *et al.*, 1998).

A extração com solventes é o método mais comum para extração de diversos compostos encontrados em frutas, incluindo os flavonóides. As antocianinas das frutas e vegetais estão localizadas nos vacúolos celulares. Os procedimentos de extração geralmente envolvem o uso de solventes acidificados, que desnaturam as membranas celulares e simultaneamente solubilizam os pigmentos. O ácido tende a estabilizar as antocianinas, mas também pode mudar a forma nativa do pigmento no tecido pela quebra das associações com metais, co-pigmentos e/ou outros compostos (Rodriguez-Saona & Wrolstad, 2001). As antocianinas são moléculas polares, portanto os solventes mais comuns usados nas extrações são misturas aquosas de etanol, metanol ou acetona (Kähkönen *et al.*, 2001; Dai *et al.*, 2009). Fuleki & Francis (1968) sugerem que o uso de água adicionada ao solvente facilita a extração das antocianinas mais hidrofílicas.

Muitos fatores, como a composição da solução extratora, tempo de extração, temperatura, pH, relação sólido/líquido e tamanho da partícula influenciam a extração sólido-líquido (Cacace & Mazza, 2002; Cacace & Mazza, 2003a; Castañeda-Ovando *et al.*, 2009; Pompeu *et al.*, 2009). A polaridade da solução extratora exerce um importante papel na extração seletiva das diferentes famílias de flavonóides (Shahidi & Naczki, 1995), bem como no rendimento da extração de antocianinas.

Com base na intensificação da cor das antocianinas em pH ácido, um método usado comumente para extração destas é a maceração do material triturado, desde

poucas horas até *overnight*, a 4°C em metanol, contendo pequenas quantidades de ácido clorídrico (<1%) (Rodríguez-Saona & Wrolstad, 2001). Este, certamente, é o método mais utilizado na extração desses pigmentos. Entretanto, em muitos casos o uso do etanol é vantajoso em relação ao metanol acidificado, por sua não-toxicidade e por ser mais barato (Fuleki & Francis, 1968; Lapornik *et al.*, 2005). Embora muitos autores prefiram utilizar o etanol (Cacace & Mazza, 2003b; Fan *et al.*, 2008; Valduga *et al.*, 2008; Dai *et al.*, 2009; Patil *et al.*, 2009; Karacabey & Mazza, 2010) ao metanol, Metivier *et al.* (1980) verificaram que o metanol foi 20% mais efetivo que o etanol e 73% mais eficiente que a água na extração e recuperação de antocianinas de casca de uva. Da mesma forma, Bridgers *et al.* (2010) avaliaram o uso de metanol e etanol, tanto acidificados quanto neutros na extração de antocianinas de batata-doce. Os autores verificaram que o metanol acidificado foi o solvente mais eficiente para a extração, quando comparado ao etanol acidificado. Já Montes *et al.* (2005) não encontraram diferença significativa entre o uso de etanol e metanol na extração de antocianinas de jabuticaba. Para estes autores o efeito mais importante foi o da concentração das soluções extratoras, sendo o metanol a 80% menos efetivo que o metanol puro.

Paralelamente, há relatos de extrações de antocianinas eficientes com água pura (Jing & Giusti, 2007), com acetona (Wrolstad & Durst, 1998) e com soluções sulfuradas (Mok & Hettiarachchy, 1991; Gao & Mazza, 1996; Bakker *et al.*, 1998; Ayed *et al.*, 1999; Cacace & Mazza, 2002). Nos estudos de extração com soluções sulfuradas observam-se elevados rendimentos de extração e a obtenção de extratos mais puros. O mecanismo exato pelo qual o SO<sub>2</sub> melhoraria a extração ainda não é conhecido, mas uma possível hipótese é a interação das antocianinas e flavonóides com o ânion HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, que levaria a uma melhora da difusão dos compostos através da parede celular da matriz vegetal, e a um aumento da solubilidade dos pigmentos (Gao & Mazza, 1996). De acordo com Langston (1985) e Timberlake & Bridle (1967), o dióxido de enxofre em concentrações de 0,05% até 0,2% reage apenas com antocianinas monoméricas, sais *flavilium* e antocianidinas, formando um complexo com o ânion HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>. O ânion HSO<sub>3</sub><sup>-</sup> se liga prontamente a grupos *flavilium*, como o das antocianinas, na posição 4 (Figura 4), para formar um complexo sem carga, incolor e estável. A reação para a formação do complexo é rápida e sua reação inversa é igualmente rápida se o SO<sub>2</sub> é removido do sistema, ou se há acidificação da solução (Timberlake & Bridle, 1967; Schwartz *et al.*, 2010).

Na extração com soluções sulfuradas, não há consenso em relação ao teor de SO<sub>2</sub> a ser utilizado. Há relatos de extração ótima de pigmentos a aproximadamente 1000 ppm (Cacace & Mazza, 2002), outros a níveis ainda maiores, como 2000 ppm (Ayed *et al.*, 1999), e ainda, resultados em menor magnitude, como os encontrados por Bakker *et al.* (1998), que ao avaliarem diferentes níveis de SO<sub>2</sub> na extração de antocianinas (0, 75 e 150 ppm) verificaram que a melhor extração foi realizada a 150 ppm, mas indicando que um aumento no teor de SO<sub>2</sub> extrairia mais antocianinas.

Quanto ao tempo de extração, na literatura encontram-se desde períodos curtos de extração, como uma hora (Rodriguez-Saona & Wrolstad, 2001), até 24 horas (Teixeira *et al.*, 2008). Lapornik *et al.* (2005) estudaram o efeito do tempo de extração (1 hora, 12 horas e 24 horas) das antocianinas de resíduos de uva, groselha preta e groselha vermelha com os solventes água, etanol 70% e metanol 70%. Verificou-se que quando se utilizou água, em tempos acima de 12 horas já havia degradação das antocianinas. Em contrapartida, quando se utilizou as soluções orgânicas, a extração foi favorecida pelos maiores tempos, entre 12 e 24 horas. Valduga *et al.* (2008) na extração de antocianinas de uva “Isabel” verificaram que o tempo que possibilitou maior rendimento em pigmentos foi de 3 horas, a pH 1, com etanol acidificado.

No tocante à temperatura de extração, Cacace & Mazza (2003b) na extração de antocianinas de groselhas com etanol, verificaram que aumentos da temperatura de extração além de 30-35°C resultaram na degradação dos pigmentos. Já a temperatura ideal de extração de antocianinas de açaí para Pompeu *et al.* (2009) foi de 58°C. Em contrapartida, a temperatura ótima de extração de antocianinas de batata-doce para Fan *et al.* (2008) foi de 80°C, por 60 minutos. Verifica-se, portanto, que não há consenso quanto à melhor temperatura a ser utilizada.

Observa-se, na extração de antocianinas, que há variáveis como o tipo de solvente, a concentração, o pH, a temperatura e o tempo de extração. Estas variáveis não atuam isoladamente, e o efeito de cada uma delas deve ser avaliado em conjunto, considerando as condições de cada estudo e principalmente a fonte de antocianinas, uma vez que a facilidade de extração não é a mesma para as diferentes matrizes vegetais.

## 1.5. Microencapsulamento

Microencapsulamento é um processo pelo qual minúsculas partículas de ingredientes ativos de gás, líquidos ou sólidos são empacotados dentro de um segundo material. O material a ser encapsulado pode ser denominado núcleo, material ativo ou fase interna. O material que forma o revestimento é denominado material de parede, carregador, membrana, casca ou revestimento (Favaro-Trindade *et al.*, 2008).

A principal finalidade do microencapsulamento na indústria de alimentos é promover proteção aos ingredientes encapsulados. Em algumas técnicas, o produto pode ser também projetado para liberar lentamente o material ativo ao longo do tempo ou até que determinada condição físico-química seja alcançada. O encapsulamento pode ser utilizado para prevenir a degradação de ingredientes pela exposição à luz e ao oxigênio, além de facilitar a manipulação de alguns produtos e mascarar aromas indesejáveis (Shahidi & Han, 1993).

Teoricamente qualquer material que necessite ser protegido, isolado ou lentamente liberado pode ser encapsulado. Em alguns sistemas alimentícios isso inclui ácidos, lipídeos, enzimas, microorganismos, *flavors*, vitaminas, minerais, água, agentes de crescimento, sais e corantes (Favaro-Trindade *et al.*, 2008).

Numerosos processos de encapsulamento têm sido empregados, e os mais comuns são a secagem por atomização (*spray drying*), resfriamento por atomização (*spray cooling* ou *spray chilling*), suspensão em ar, encapsulamento/extrusão, extrusão centrífuga, coacervação, inclusão/complexação e separação rotacional em suspensão (Favaro-Trindade *et al.*, 2008). Tradicionalmente o método mais comum de encapsulamento de ingredientes alimentícios é o *spray drying* (Popplewell *et al.*, 1995; Constant, 1999; Gharsallaoui *et al.*, 2007).

A primeira etapa do processo de microencapsulamento consiste na seleção do agente encapsulante adequado. O encapsulante ideal deve ter propriedades emulsificantes, ser capaz de formar filmes, ter baixa viscosidade a altos níveis de sólidos, exibirem baixa higroscopicidade e ser de baixo custo (Gharsallaoui *et al.*, 2007). Goma arábica, amidos modificados e amidos hidrolisados são os agentes encapsulantes mais frequentemente usados no *spray drying* (Reineccius, 1991; Constant, 1999). A escolha entre tais encapsulantes vai depender, entre outros fatores, do objetivo desejado, já que cada um apresenta propriedades e efeitos distintos.

As gomas são muito empregadas no microencapsulamento devido a sua capacidade de formar filme e propriedades emulsificantes. Entre elas, a goma arábica e a maltodextrina têm sido as mais usadas no encapsulamento de extratos e sucos de frutas (Constant, 1999; Cano-Chauca *et al.*, 2005). A goma arábica é um polímero constituído principalmente por ácido D-glucurônico, L-rhamnose, D-galactose e L-arabinose, com aproximadamente 5% de proteína. Esta fração protéica é responsável por suas propriedades emulsificantes (Reineccius, 1991). Apresenta alta solubilidade em água, baixa viscosidade, apresentando características geleificantes e é estável frente a diferentes pH. É a goma de origem vegetal de uso mais comum na indústria de alimentos. Entretanto, apresenta elevado custo e, às vezes, limitada oferta. Por este motivo, há uma busca crescente por agentes encapsulantes alternativos com propriedades similares (Constant, 1999; Cano-Chauca *et al.*, 2005).

As maltodextrinas são obtidas pela hidrólise ácida de amidos de diferentes fontes, por exemplo, de milho e de batata. Os polímeros parcialmente hidrolisados de D-glucose possuem elevada solubilidade em água, baixa viscosidade mesmo em elevada concentração de sólidos e formam soluções incolores (Obón *et al.*, 2009; Bakowska-Barczak & Kolodziejczyk, *no prelo*). São usualmente classificados de acordo com seu grau de hidrólise, expresso como dextrose equivalente (DE). Maltodextrinas normalmente apresentam DE menor que 20. As mais usadas no microencapsulamento de pigmentos possuem DE entre 10 e 20 (Obón *et al.*, 2009).

Costuma-se empregar a goma arábica associada a outro agente de parede, uma vez que, por ela formar filme semipermeável ao oxigênio, não consegue conferir suficiente proteção contra a oxidação. Usualmente se emprega a maltodextrina nesta associação, pois ela é capaz de formar barreira impermeável ao oxigênio, melhorando a estabilidade do material encapsulado e diminuindo o custo do processo (Desobry *et al.*, 1997; Constant, 1999; Valduga *et al.*, 2008).

A avaliação da eficiência do encapsulamento é feita normalmente verificando a estabilidade do produto em determinadas condições de armazenamento, o grau de proteção provido pelo material de parede, observação da superfície, forma e tamanho das microcápsulas formadas por microscopia eletrônica, entre outras determinações (Favaro-Trindade *et al.*, 2008).

Na literatura encontram-se alguns trabalhos com encapsulamento por *spray drying* de pigmentos e de sucos de frutas, principalmente na avaliação de agentes encapsulantes e da estabilidade dos pigmentos. De forma geral, não há consenso

sobre qual o melhor encapsulante, pois esta variável é dependente da matriz do pigmento, do teor de sólidos do extrato, das condições operacionais do equipamento (temperatura de entrada e fluxo de alimentação, dentre outras) e das condições de acondicionamento dos pós. Tonon *et al.* (2010) avaliaram a estabilidade de antocianinas de suco de açaí obtido por *spray drying* a diferentes temperaturas e atividades de água. Os pesquisadores observaram que o uso de maltodextrina 10 DE como agente carreador foi o que proporcionou melhor proteção aos pigmentos. Já Valduga *et al.* (2008) observaram que a melhor condição para o microencapsulamento de antocianinas de uva “Isabel” foi quando se utilizou proporções iguais de maltodextrina e goma arábica. Em relação à vida útil do pigmento, Ersus & Yurdagel (2007) estudaram a estabilidade de microcápsulas contendo antocianinas de *black carrot* e observaram perda de 33% após 64 dias de armazenamento a 25°C, enquanto a 4°C a perda foi de somente 11%.

#### 1.6. Referências bibliográficas

- Ahmed M, Akter MS, Lee J-C & Eun J-B (2010) Encapsulation by spray drying of bioactive components, physicochemical and morphological properties from purple sweet potato. *LWT - Food Science and Technology* **43**, 1307-1312.
- Alonso AM, Castro R, Rodryguez MC, Guillén DA & Barroso CG (2004) Study of the antioxidant power of brandies and vinegars derived from Sherry wines and correlation with their content in polyphenols. *Food Research International* **37**, 715-721.
- Alonso AM, Guillén DA, Barroso CG, Puertas B & García A (2002) Determination of antioxidant activity of wine byproducts and its correlation with polyphenolic content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 5832-5836.
- Andrade I & Flores H (2004) Optimization of spray drying of roselle extract (*Hibiscus sabdariffa* L.). In *14th International Drying Symposium*, pp. 597-604. São Paulo: Proceedings of the 14th International Drying Symposium.
- Angelo PM & Jorge N (2007) Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. *Revista do Instituto Adolfo Lutz* **66**, 232-240.
- Antolovich M, Prenzler P, Robards K & Ryan D (2000) Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *Analyst* **125**, 989-1009.
- Ayed N, Yu HL & Lacroix M (1999) Improvement of anthocyanin yield and shelf-life extension of grape pomace by gamma irradiation. *Food Research International* **32**, 539-543.

Azevedo L, Gomes JC, Stringheta PC, Gontijo AMMC, Padovani CR, Ribeiro LR & Salvadori DMF (2003) Black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as a protective agent against DNA damage in mice. *Food and Chemical Toxicology* **41**, 1671–1676.

Azevedo L, Lima PLAd, Gomes JC, Stringheta PC, Ribeiro DA & Salvadori DMF (2007) Differential response related to genotoxicity between eggplant (*Solanum melanogena*) skin aqueous extract and its main purified anthocyanin (delphinidin) *in vivo*. *Food and Chemical Toxicology* **45**, 852-858.

Bakker J, Bridle P, Bellworthy SJ, Garcia-Viguera C, Reader HP & Watkins SJ (1998) Effect of sulphur dioxide and must extraction on colour, phenolic composition and sensory quality of red table wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **78**, 297-307.

Bakowska-Barczak A (2005) Acylated anthocyanins as stable, natural food colorants - a review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* **14/55**, 107-116.

Bakowska-Barczak AM & Kolodziejczyk PP (*no prelo*) Black currant polyphenols: Their storage stability and microencapsulation. *Industrial Crops and Products* **In Press, Corrected Proof**. doi: 10.1016/j.physletb.2003.10.071

Bobbio PA & Bobbio FO (1995) *Química do processamento de alimentos*, 2ª ed. São Paulo: Editora Varela.

Bridgers EN, Chinn MS & Truong VD (2010) Extraction of anthocyanins from industrial purple-fleshed sweetpotatoes and enzymatic hydrolysis of residues for fermentable sugars. *Industrial Crops and Products* **32**, 613-620.

Cacace JE & Mazza G (2002) Extraction of Anthocyanins and Other Phenolics from Black Currants with Sulfured Water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 5939-5946.

Cacace JE & Mazza G (2003a) Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering* **59**, 379-389.

Cacace JE & Mazza G (2003b) Optimization of Extraction of Anthocyanins from Black Currants with Aqueous Ethanol. *Journal of Food Science* **68**, 240-248.

Cano-Chauca M, Stringheta PC, Ramos AM & Cal-Vidal J (2005) Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **6**, 420-428.

Castañeda-Ovando A, Pacheco-Hernández MdL, Páez-Hernández ME, Rodríguez JA & Galán-Vidal CA (2009) Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry* **113**, 859-871.

Constant PBL (1999) Microencapsulamento de bixina: agentes encapsulantes, avaliação da qualidade e aplicações, Universidade Federal de Viçosa.

Constant PBL (2003) Antocianinas de açaí (*Euterpis oleracea* M.): extração, caracterização, desenvolvimento de formulação e aplicação em alimentos, Universidade Federal de Viçosa.

Corrales M, García AF, Butz P & Tauscher B (2009) Extraction of anthocyanins from grape skins assisted by high hydrostatic pressure. *Journal of Food Engineering* **90**, 415-421.

Corrales M, Toepfl S, Butz P, Knorr D & Tauscher B (2008) Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: A comparison. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **9**, 85-91.

Dai J, Gupte A, Gates L & Mumper RJ (2009) A comprehensive study of anthocyanin-containing extracts from selected blackberry cultivars: Extraction methods, stability, anticancer properties and mechanisms. *Food and Chemical Toxicology* **47**, 837-847.

de Rosso VV & Mercadante AZ (2007) Evaluation of colour and stability of anthocyanins from tropical fruits in an isotonic soft drink system. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **8**, 347-352.

Desobry SA, Netto FM & Labuza TP (1997) Comparison of spray-drying, drum-drying and freeze-drying for b-carotene encapsulation and preservation. *Journal of Food Science* **62**, 1158-1162.

Einbond LS, Reynertson KA, Luo XD, Basile MJ & Kennelly EJ (2004) Anthocyanin antioxidants from edible fruits. *Food Chemistry* **84**, 23-28.

Ersus S & Yurdagel U (2007) Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* L.) by spray dryer. *Journal of Food Engineering* **80**, 805-812.

Fan G, Han Y, Gu Z & Chen D (2008) Optimizing conditions for anthocyanins extraction from purple sweet potato using response surface methodology (RSM). *LWT - Food Science and Technology* **41**, 155-160.

Favaro-Trindade CS, Pinho SCd & Rocha GA (2008) Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. *Brazilian Journal of Food Technology* **11**, 103-112.

Formica JV & Regelson W (1995) Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chemical and Toxicology* **33**, 1061-1080.

Francis FJ (1982) Analysis of anthocyanins in foods. In *Anthocyanins as Food Colors*, pp. 181-207 [P Markakis, editor]. New York: Academic Press.

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

Gao L & Mazza G (1996) Extraction of Anthocyanin Pigments from Purple Sunflower Hulls. *Journal of Food Science* **61**, 600-603.

Garcia-Viguera C, Zafrilla P & Tomás-Barberán FA (1998) The use of acetone as an extraction solvent for anthocyanins from strawberry fruit. *Phytochemical Analysis* **9**, 274-277.

Gharsallaoui A, Roudaut G, Chambin O, Voilley A & Saurel R (2007) Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: an overview. *Food Research International* **40**, 1107-1121.

Giusti MM & Wrolstad RE (2003) Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochemical Engineering Journal* **14**, 217-225.

Gulab NJ, Fernandes SA & Garcia CF (2007) Comparison of GC and HPLC for quantification of organic acids in two jaboticaba (*Myrciaria*) fruits varieties. *Química Nova* **30**, 1529-1534.

Hogan S, Chung H, Zhang L, Li J, Lee Y, Dai Y & Zhou K (2010) Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin-rich extract from açai. *Food Chemistry* **118**, 208-214.

Jensen GS, Wu X, Patterson KM, Barnes J, Carter SG, Scherwitz L, Beaman R, Endres JR & Schauss AG (2008) In Vitro and in Vivo Antioxidant and Anti-inflammatory Capacities of an Antioxidant-Rich Fruit and Berry Juice Blend. Results of a Pilot and Randomized, Double-Blinded, Placebo-Controlled, Crossover Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**, 8326-8333.

Jing P & Giusti MM (2007) Effects of Extraction Conditions on Improving the Yield and Quality of an Anthocyanin-Rich Purple Corn (*Zea mays* L.) Color Extract. *Journal of Food Science* **72**, C363-C368.

Kähkönen MP, Hopia AI & Heinonen M (2001) Berry Phenolics and Their Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**, 4076-4082.

Karacabey E & Mazza G (2010) Optimisation of antioxidant activity of grape cane extracts using response surface methodology. *Food Chemistry* **119**, 343-348.

Konczak I & Zhang W (2004) Anthocyanins—More Than Nature's Colours. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **5**, 239-240.

Kong JM, Chia LS, Goh NK, Chia TF & Brouillard R (2003) Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* **64**, 923-933.

Langston MSK (1985) Anthocyanin colorant from grape pomace. US Patent.

Lapornik B, Prosek M & Wondra AG (2005) Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering* **71**, 214-222.

López N, Puértolas E, Condón S, Álvarez I & Raso J (2008) Effects of pulsed electric fields on the extraction of phenolic compounds during the fermentation of must of Tempranillo grapes. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **9**, 477-482.

Lule SU & Xia W (2005) Food Phenolics, Pros and Cons: A Review. *Food Reviews International* **21**, 367 - 388.

Määttä KR, Kamal-Eldin A & Törrönen AR (2003) High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) Analysis of Phenolic Compounds in Berries with Diode Array and Electrospray Ionization Mass Spectrometric (MS) Detection: □ Ribes Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 6736-6744.

Markakis P (1982) Stability of anthocyanins in foods. In *Anthocyanins as food colours*, pp. 163-168. New York: Academic Press.

Martínez-Flórez S, González-Gallego J, Culebras JM & Tuñón MAJ (2002) Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria* **17**, 271-278.

Mazza G & Brouillard R (1987) Color stability and structural transformations of cyanidin 3,5-diglucoside and four 3-deoxyanthocyanins in aqueous solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **35**, 422-426.

Mertens-Talcott SU, Rios J, Jilma-Stohlawetz P, Pacheco-Palencia LA, Meibohm B, Talcott ST & Derendorf H (2008) Pharmacokinetics of Anthocyanins and Antioxidant Effects after the Consumption of Anthocyanin-Rich Açai Juice and Pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) in Human Healthy Volunteers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**, 7796-7802.

Metivier RP, Francis FJ & Clydesdale FM (1980) Solvent extraction of anthocyanins from wine pomace. *Journal of Food Science* **45**, 1099-1100.

Mok C & Hettiarachchy NS (1991) Heat Stability of Sunflower-Hull Anthocyanin Pigment. *Journal of Food Science* **56**, 553-555.

Montes C, Vicario IM, Raymundo M, Fett R & Heredia FJ (2005) Application of tristimulus colorimetry to optimize the extraction of anthocyanins from Jaboticaba (*Myrcia Jaboticaba* Berg.). *Food Research International* **38**, 983-988.

Nachtigall AM, Silva PI, Bertoldi MC & Stringheta PC (2010) Impacto da luz, pH, ácido ascórbico e glicose na estabilidade de antocianinas da fonte não usual "Maria-Pretinha" (*Solanum americanum*, Mill.). *Boletim do Ceppa* **28**, 213-222.

Nichenametla SN, Taruscio TG, Barney DL & Exon JH (2006) A Review of the Effects and Mechanisms of Polyphenolics in Cancer. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **46**, 161-183.

Nijveldt RJ, Nood EV, Hoorn DERV, Boelens PG, Norren KV & Leeuwen PAMV (2001) Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition* **74**, 418-425.

Nisha P, Abdul Nazar P & Jayamurthy P (2009) A comparative study on antioxidant activities of different varieties of *Solanum melongena*. *Food and Chemical Toxicology* **47**, 2640-2644.

Obón JM, Castellar MR, Alacid M & Fernández-López JA (2009) Production of a red-purple food colorant from *Opuntia stricta* fruits by spray drying and its application in food model systems. *Journal of Food Engineering* **90**, 471-479.

Patil G, Madhusudhan MC, Ravindra Babu B & Raghavarao KSMS (2009) Extraction, dealcoholization and concentration of anthocyanin from red radish. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* **48**, 364-369.

Pietta P-G (2000) Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products* **63**, 1035-1042.

Pompeu DR, Silva EM & Rogez H (2009) Optimisation of the solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *Euterpe oleracea* using Response Surface Methodology. *Bioresource Technology* **100**, 6076-6082.

Popplewell LM, Black JM, Norris LM & Porzio M (1995) Encapsulation system for flavors and colors. *Food Technology* **49**, 76-82.

Puértolas E, López N, Saldaña G, Álvarez I & Raso J (2010) Evaluation of phenolic extraction during fermentation of red grapes treated by a continuous pulsed electric fields process at pilot-plant scale. *Journal of Food Engineering* **98**, 120-125.

Reineccius GA (1991) Carbohydrates for flavor encapsulation. *Food Technology* **44**.

Reynertson KA, Wallace AM, Adachi S, Gil RR, Yang H, Basile MJ, D'Armiento J, Weinstein IB & Kennelly EJ (2006) Bioactive depsides and anthocyanins from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*). *J Nat Prod* **69**, 1228-1230.

Reynertson KA, Yang H, Jiang B, Basile MJ & Kennelly EJ (2008) Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. *Food Chemistry* **109**, 883-890.

Rice-Evans CA, Miller NJ & Paganga G (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science* **2**, 152-159.

Robards K (2003) Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A* **1000**, 657-691.

Rodriguez-Saona LE & Wrolstad RE (2001) Extraction, isolation and purification of anthocyanins. In *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, pp. F1.1.1-F1.1.11: John Wiley & Sons, Inc.

Rosa LCC, Stringheta PC, Stringheta ÂCO & Silva PI (2003) Carotenoides e antocianinas presentes em flores de *Zínia* (*Zínia elegans* Jacq.). *5º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos*.

Sadilova E, Stintzing FC, Kammerer DR & Carle R (2009) Matrix dependent impact of sugar and ascorbic acid addition on color and anthocyanin stability of black carrot, elderberry and strawberry single strength and from concentrate juices upon thermal treatment. *Food Research International* **42**, 1023-1033.

Schauss AG, Wu X, Prior RL, Ou B, Huang D, Owens J, Agarwal A, Jensen GS, Hart AN & Shanbrom E (2006) Antioxidant Capacity and Other Bioactivities of the Freeze-Dried Amazonian Palm Berry, *Euterpe oleracea* Mart. (Acai). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 8604-8610.

Schwartz SJ, von Helbe J & Giusti MM (2010) Corantes. In *Química de Alimentos de Fennema*, pp. 445-498 [S Damodaran, KL Parkin and OR Fennema, editors]. Porto Alegre: Artmed Editora.

Shahidi F & Han XQ (1993) Encapsulation of food ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **33**, 501-547.

Shahidi F & Naczk M (1995) *Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications*, 1 ed. Lancaster: Technomic Publishing Co.

Shukitt-Hale B, Lau FC & Joseph JA (2008) Berry Fruit Supplementation and the Aging Brain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**, 636-641.

Silva PHAd, Faria FCd, Tonon B, Mota SJD & Pinto VT (2008) Avaliação da composição química de fermentados alcoólicos de jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*). *Química Nova* **31**, 595-600.

Stintzing FC & Carle R (2004) Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends in Food Science & Technology* **15**, 19-38.

Stringheta PC (1991) Identificação da estrutura e estudo da estabilidade das antocianinas extraídas da inflorescência de capim gordura (*Melinis minutiflora*, Pal de Beauv), Universidade Estadual de Campinas.

Tapiero H, Ba GN & Tew KD (2002a) Estrogens and environmental estrogens. *Biomedical Pharmacotherapy* **56**, 1-9.

Tapiero H, Tew KD, Ba GN & Mathé G (2002b) Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomedical Pharmacotherapy* **56**, 200-207.

Teixeira LN, Stringheta PC & Oliveira FA (2008) Comparação de métodos para quantificação de antocianinas. *Revista Ceres* **55**, 297-304.

Temple NJ (2000) Antioxidants and disease: more questions than answers. *Nutrition Research* **20**, 449-459.

Timberlake CF & Bridle P (1967) Flavylum salts, anthocyanidins and anthocyanins II.—Reactions with sulphur dioxide. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **18**, 479-485.

Tonon RV, Brabet C & Rubinger MD (2010) Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried açai (*Euterpe oleracea* Mart.) juice produced with different carrier agents. *Food Research International* **43**, 907-914.

Valduga E, Lima L, do Prado R, Padilha FF & Treichel H (2008) Extração, secagem por atomização e microencapsulamento de antocianinas do bagaço da uva "Isabel" (*Vitis labrusca*). *Ciência e Agrotecnologia* **32**, 1568-1574.

Volp ACP, Renhe IRT, Barra K & Stringheta PC (2008) Flavonóides antocianinas: características e propriedades na nutrição e saúde. *Revista Brasileira de Nutrição Clínica* **23**, 141-149.

Wrolstad R & Durst R (1998) Use of anthocyanin and polyphenolic analyses in authenticating fruit juices. *Proceedings of Fruit Authenticity Workshop*, 79-96.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Otimizar a extração de polifenóis e antocianinas de jabuticaba, avaliando seu comportamento em diferentes condições extratoras e estudar o microencapsulamento por *spray dryer* dos compostos bioativos da jabuticaba.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar a extração sólido-líquido dos compostos bioativos de jabuticaba, analisando a influência de diferentes solventes e pH no teor de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante;
- Otimizar a extração sólido-líquido dos compostos bioativos da jabuticaba usando soluções sulfuradas, avaliando o efeito do tempo de extração, da concentração das soluções e da relação solvente:casca na extração de fenólicos e antocianinas;
- Otimizar o microencapsulamento de compostos bioativos do extrato de jabuticaba, analisando a influência de diferentes fluxos de alimentação e temperaturas de entrada no rendimento de antocianinas, nas características de cor e na qualidade dos pós obtidos;
- Avaliar os efeitos de diferentes matrizes encapsulantes sobre a qualidade dos extratos em pó microencapsulados, verificando sua aplicação em sistema-modelo alimentício;
- Realizar avaliações físicas, químicas e microscópicas dos extratos em pó microencapsulados.

## ARTIGO Nº 1

### OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE ANTOCIANINAS E POLIFENÓIS DE JABUTICABA (*Myrciaria jaboticaba*) COM SOLUÇÕES ORGÂNICAS USANDO A METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTAS

#### 1. Introdução

As antocianinas são compostos da família dos flavonóides e constituem grupo de pigmentos responsáveis por grande parte das cores em flores, frutas, folhas, caules e raízes de plantas (Markakis, 1982). Seu espectro de cor varia do vermelho ao azul, apresentando-se também como uma mistura de ambas as cores resultando em tons púrpura. Muitas frutas, hortaliças, folhas e flores devem sua atrativa coloração a esses pigmentos, que se encontram dispersos nos vacúolos celulares (Volp *et al.*, 2008; Castañeda-Ovando *et al.*, 2009). Uma das propriedades mais importantes destes pigmentos é a sua atividade antioxidante, que é fundamental na prevenção de doenças cardiovasculares, neurológicas, câncer e diabetes, entre outras (Konczak & Zhang, 2004).

A jaboticaba (*Myrciaria cauliflora* e *Myrciaria jaboticaba*), fonte rica em antocianinas, é uma fruta nativa do estado de Minas Gerais, sendo largamente consumida no Brasil. Apesar de seu elevado consumo, os aspectos fitoquímicos desta fruta ainda não têm sido devidamente relatados na literatura. É reportado que a jaboticaba contém taninos, flavonóides e cianidina-3-glicosídeo em *M. cauliflora* (Einbond *et al.*, 2004; Reynertson *et al.*, 2006; Reynertson *et al.*, 2008). *M. jaboticaba* contém peonidina-3-glicosídeo e sua aglicona (Reynertson *et al.*, 2006).

O passo inicial dos estudos com antocianinas e polifenóis consiste na extração destes compostos de sua matriz, quer sejam frutas, flores, sementes ou hortaliças. O tempo e a facilidade da extração dos pigmentos dependerá da matriz utilizada, e a qualidade da extração, em termos de teor total e individual de antocianinas, dependerá da escolha da solução extratora e da técnica adequada de extração. Desta forma, a extração é uma etapa comum de grande importância para estudos com diferentes finalidades.

Conhecer o comportamento dos fatores que influenciam as condições do processo de extração é necessário para aumentar a eficiência extratora dos compostos bioativos. O equilíbrio e a taxa de transferência de massa são conceitos fundamentais

que governam o processo de extração (Cacace & Mazza, 2002; Cacace & Mazza, 2003a). Muitos fatores, tais como a composição e polaridade da solução extratora, tempo de extração, temperatura, pH, relação sólido:líquido e tamanho de partícula podem influenciar na extração sólido-líquido (Pompeu *et al.*, 2009). As antocianinas são moléculas polares, portanto, os solventes mais comuns usados nas extrações são misturas aquosas de etanol, metanol ou acetona (Kähkönen *et al.*, 2001; Dai *et al.*, 2009).

A metodologia de superfície de respostas (RSM) é uma técnica estatística útil para desenvolver, melhorar e otimizar processos (Liyana-Pathirana & Shahidi, 2005; Karacabey & Mazza, 2010). Têm sido utilizada com sucesso na otimização da extração de antocianinas e fenólicos de diferentes fontes (Gao & Mazza, 1996; Cacace & Mazza, 2002; Liyana-Pathirana & Shahidi, 2005; Fan *et al.*, 2008; Pompeu *et al.*, 2009).

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi otimizar a extração de antocianinas e polifenóis de jaboticaba com diferentes soluções extratoras por meio de RSM, visando a obtenção de um maior teor destes compostos e maior atividade antioxidante.

## **2. Material e métodos**

### **2.1. Material**

As jaboticabas (*Myrciaria jaboticaba*) foram adquiridas em Cachoeira do Campo - MG, em novembro de 2009 e foram mantidas congeladas em freezer ( $-18 \pm 2$  °C) até o momento de uso.

### **2.2. Métodos**

#### **2.2.1. Preparo da polpa de jaboticaba**

Os frutos ainda congelados tiveram suas sementes retiradas. As partes restantes (casca e mesocarpo) foram pesadas (150 g) e trituradas em liquidificador com adição de 50 mL de água destilada, durante 3 minutos. A polpa homogênea resultante (90,04% de umidade) foi utilizada como matéria-prima para a realização de todos os ensaios.

### 2.2.2. Extração dos compostos bioativos da polpa de jabuticaba

As soluções extratoras utilizadas foram soluções de etanol, metanol e acetona. A concentração das soluções e o pH das mesmas variou para cada extração, conforme mostrado na Tabela 1. A acidificação das soluções foi feita utilizando HCl.

Aproximadamente 10 g de polpa de jabuticaba foram pesadas e colocadas em béqueres contendo as soluções extratoras. Os extratos foram, então, armazenados em refrigeração ( $8 \pm 2^\circ\text{C}$ ), durante 24 h. Ao término da extração, os extratos foram filtrados e transferidos para funis de separação, onde foram particionados com a mistura éter etílico:éter de petróleo (1:1, v/v), com a finalidade de se retirar interferentes como a clorofila. Em seguida, o volume dos extratos foi acertado e os mesmos acondicionados em frascos âmbar, sob refrigeração ( $10 \pm 2^\circ\text{C}$ ), para a realização das análises.

### 2.2.3. Delineamento experimental e análises estatísticas

#### 2.2.3.1. Experimento de otimização

A otimização da extração foi realizada por meio da metodologia de superfície de resposta. Foi utilizado um planejamento composto central com dois fatores. O planejamento foi constituído de quatro experimentos nos pontos fatoriais (combinação dos níveis -1 e +1), quatro experimentos nos pontos axiais (níveis  $\pm \alpha$ ) e cinco experimentos no ponto central (Teófilo & Ferreira, 2006). A otimização foi feita para cada solvente estudado, constituindo um total de 13 experimentos para cada planejamento.

As variáveis independentes estudadas foram concentração dos solventes e pH, e os níveis estudados para cada variável estão apresentados na Tabela 1. As respostas obtidas (variáveis dependentes) foram teor de antocianinas (TAC), conteúdo fenólico total (CFT), atividade antioxidante (AA) e coordenadas colorimétricas ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $h$  e  $C^*$ ).

Os modelos foram ajustados a equações polinomiais de segunda ordem. A função de respostas ( $Y$ ) foi dividida nos componentes linear, quadrático e de interação, conforme a Equação 1,

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j} \sum_j \beta_{ij} X_i X_j + e \quad (\text{Eq. 1})$$

em que:  $\beta_0$  é o coeficiente constante,  $\beta_i$  é o coeficiente linear,  $\beta_{ii}$  o coeficiente quadrático,  $\beta_{ij}$  o coeficiente de interação,  $X_i$  são os níveis das variáveis independentes,  $k$  o número de variáveis (2),  $e$  o erro experimental e  $Y$  é a resposta do modelo.

Os coeficientes de regressão foram obtidos por meio de regressão linear múltipla (MLR). Os coeficientes do modelo foram avaliados estatisticamente quanto a sua significância e interpretados de acordo com sua importância no sistema.

A análise de variância (ANOVA) foi usada para validar os modelos, e os valores de  $R^2$  dos modelos foram avaliados para checar se os mesmos estavam adequados. Os gráficos de superfície de resposta foram obtidos usando os valores preditos dos modelos ajustados.

Todos os cálculos foram realizados usando o software Statistica 7.0.

Tabela 1 – Planejamento composto central para as variáveis concentração da solução extratora e pH de extração

Ensaio	Níveis codificados		Níveis decodificados	
	$X_1$	$X_2$	pH	Solução extratora (%)
<b>Etanol/Metanol</b>				
9 (C)	0	0	5,0	70,0
1	-1	-1	3,5	50,0
8	0	+ $\alpha$	5,0	98,3
6	+ $\alpha$	0	7,1	70,0
3	+1	-1	6,5	50,0
12 (C)	0	0	5,0	70,0
7	0	- $\alpha$	5,0	41,7
10 (C)	0	0	5,0	70,0
2	-1	+1	3,5	90,0
5	- $\alpha$	0	2,9	70,0
11 (C)	0	0	5,0	70,0
4	+1	+1	6,5	90,0
13 (C)	0	0	5,0	70,0
<b>Acetona</b>				
9 (C)	0	0	5,0	70,0
1	0	+ $\alpha$	5,0	100,0
8	-1	-1	3,5	50,0
6	+ $\alpha$	0	7,1	70,0
3	+1	-1	6,5	50,0
12 (C)	0	0	5,0	70,0
7	0	- $\alpha$	5,0	39,6
10 (C)	0	0	5,0	70,0
2	-1	+1	3,5	93,0
5	- $\alpha$	0	2,9	70,0
11 (C)	0	0	5,0	70,0
4	+1	+1	6,5	93,0
13 (C)	0	0	5,0	70,0

$\alpha = \pm 1,414$  para duas variáveis independentes (Teófilo & Ferreira, 2006).

$X_1$  = variável pH;  $X_2$  = variável concentração do solvente (%).

### **2.2.3.2. Estudo comparativo do desempenho das soluções extratoras envolvidas nos planejamentos compostos centrais**

Após a obtenção das respostas com as diferentes soluções extratoras (etanol, metanol e acetona), estas foram comparadas entre si, duas a duas, para verificação da melhor solução para antocianinas, fenólicos e atividade antioxidante. Para tal, utilizaram-se testes *t* pareados, assumindo como hipótese de nulidade ( $H_0$ ) que a diferença entre as médias para cada solução extratora fosse igual a zero. Esta análise estatística foi realizada com auxílio do software Microsoft Office Excel, versão 2003.

### **2.2.3.3. Estudo comparativo da eficiência extratora das soluções de etanol 70% e metanol 70% e efeito do pH**

Com base nas informações obtidas do estudo de otimização, com o objetivo de buscar o ponto máximo da extração de antocianinas, fenólicos e da ação antioxidante, realizou-se a construção de um modelo de regressão univariado. Foram estudadas as soluções de etanol 70% e metanol 70%. Para cada solução extratora o pH foi estudado nos níveis 2,5; 2,0; 1,5 e 1,0, em duplicata. As respostas foram submetidas a comparações por testes *t* pareados, de forma semelhante ao descrito em 2.2.3.2.

## **2.2.4. Análises quantitativas**

### **2.2.4.1. Teor de antocianinas**

As antocianinas totais dos diferentes extratos produzidos foram quantificadas pelo método espectrofotométrico proposto por Francis (1982). O teor total de antocianinas foi determinado com auxílio de um espectrofotômetro Shimadzu, modelo 1601PC (Kyoto, Japan), utilizando-se o coeficiente de absorvidade molar de 98,2, que se refere à absorção a 535 nm de uma mistura de antocianinas de *cranberry* em etanol acidificado, medida em cubeta de 1 cm, na concentração de 1% (m/v).

### **2.2.4.2. Conteúdo fenólico total**

O conteúdo fenólico total dos extratos obtidos em cada experimento mostrado na Tabela 1 foi determinado pelo ensaio espectrofotométrico com o reagente Folin-

Denis, baseado na redução dos ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico em meio alcalino na presença de fenólicos, gerando um complexo de cor azul (Swain & Hillis, 1959; Naczki & Shahidi, 2004). O ácido gálico foi utilizado como padrão e o teor total de fenólicos dos extratos foi expresso como mg de ácido gálico equivalente por 100 g de casca ( $\text{mg AGE} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ).

#### **2.2.4.3. Atividade antioxidante**

A atividade anti-radical livre foi realizada para os diferentes extratos utilizando-se o método de ensaio do radical ABTS. Para a formação do radical  $\text{ABTS}^{++}$ , a solução aquosa de ABTS 7 mM foi adicionada à solução de persulfato de potássio 2,45 mM. Esta mistura foi mantida no escuro à temperatura ambiente por 16 horas. Após este tempo a absorbância foi corrigida para 0,70 ( $\pm 0,02$ ) a 734 nm com adição de etanol 80% (Re *et al.*, 1999) em espectrofotômetro. A 3,5 mL da solução radical  $\text{ABTS}^{++}$  foram adicionados 0,5 mL de cada extrato, e realizada leitura espectrofotométrica após 6 minutos de reação. Foi utilizado o Trolox como padrão e os resultados foram expressos em equivalente de Trolox ( $\mu\text{M Trolox} \cdot \text{g}^{-1}$ ).

#### **2.2.5. Análise colorimétrica**

Os extratos 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  $D_{65}$  e ângulo de observação de  $10^\circ$ , 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 3 e 4.

$$C^* = [(a^*)^2 + (b^*)^2]^{1/2} \quad (\text{Eq. 3})$$

$$h = \arctan(b^*/a^*) \quad (\text{Eq. 4})$$

### **3. Resultados e Discussão**

#### **3.1. Estudos de otimização**

##### **3.1.1. Análises quantitativas**

Os efeitos das variáveis pH, concentração da solução extratora e suas interações foram estudados para a otimização da extração de antocianinas e

polifenóis de polpa de jabuticaba. As respostas obtidas dos 13 ensaios para cada solvente, em ordem experimental aleatorizada, estão mostradas na Tabela 2. As coordenadas colorimétricas foram utilizadas qualitativamente para a caracterização dos extratos, e foram analisados L\*, h e C\*.

Tabela 2 – Respostas obtidas para os extratos etanólicos, metanólicos e acetônicos das polpas de jabuticaba

Ensaio	TAC <sup>1</sup>	CFT <sup>2</sup>	AA <sup>3</sup>	Colorimetria				
				L*	a*	b*	h	C*
<b>Etanol</b>								
9 (C)	45,08	262,71	388,04	31,52	18,95	6,73	19,55	20,11
1	52,00	335,90	450,01	30,70	24,92	9,11	20,08	26,53
8	55,35	281,77	288,43	30,65	20,44	5,81	15,87	21,25
6	41,32	278,91	366,32	28,27	9,86	4,78	25,86	10,96
3	14,63	218,51	269,53	28,96	9,22	6,12	33,58	11,07
12 (C)	50,95	293,63	389,99	31,26	19,49	6,88	19,44	20,67
7	16,54	187,10	229,88	38,00	15,04	15,40	45,68	21,53
10 (C)	45,85	283,45	382,85	31,65	19,85	7,19	19,91	21,11
2	60,72	318,92	473,29	28,85	19,96	6,12	17,05	20,88
5	59,63	339,95	459,29	29,98	24,02	8,24	18,93	25,39
11 (C)	50,92	273,15	401,11	31,47	18,38	6,93	20,66	19,64
4	43,79	185,92	216,78	33,49	14,91	6,98	25,09	16,46
13 (C)	39,06	261,15	334,76	33,07	19,71	8,37	23,01	21,41
<b>Metanol</b>								
9 (C)	60,14	366,18	555,51	39,07	18,24	15,38	40,14	23,86
1	56,81	404,35	571,25	34,61	30,85	14,83	25,67	34,23
8	66,13	419,23	514,90	39,90	15,20	10,57	34,81	18,51
6	50,10	310,92	426,87	35,15	13,61	16,13	49,84	21,10
3	23,37	285,67	408,29	28,36	10,66	7,24	34,18	12,89
12 (C)	59,72	391,93	488,88	38,86	18,51	14,87	38,78	23,74
7	37,84	315,64	417,55	33,63	14,70	11,77	38,68	18,83
10 (C)	54,62	347,46	461,73	39,83	16,58	15,37	42,83	22,61
2	63,06	404,67	564,90	32,53	28,14	10,84	21,07	30,16
5	61,70	425,38	591,03	31,73	29,14	12,33	22,93	31,64
11 (C)	54,65	360,05	493,54	38,92	17,27	14,38	39,78	22,47
4	55,27	303,70	464,15	40,88	12,85	19,89	57,14	23,68
13 (C)	52,10	345,47	453,12	38,38	18,10	14,14	38,00	22,97
<b>Acetona</b>								
9 (C)	35,02	349,99	412,99	36,21	18,00	16,41	42,35	24,36
1	13,23	199,37	362,79	34,88	15,91	16,47	45,99	22,90
8	19,55	217,47	413,04	40,01	20,89	17,13	39,35	27,02
6	30,23	319,59	602,89	29,70	13,37	8,22	31,58	15,69
3	7,25	188,68	477,23	28,74	10,27	5,91	29,92	11,85
12 (C)	35,97	334,68	703,17	36,21	18,43	16,14	41,21	24,50
7	24,79	347,11	530,29	32,61	16,17	11,90	36,35	20,08
10 (C)	32,20	299,86	496,50	36,98	17,29	17,30	45,02	24,46
2	38,56	375,18	624,93	34,98	29,02	13,61	25,13	32,05
5	38,89	376,89	628,15	33,73	29,67	13,06	23,76	32,42
11 (C)	34,87	342,13	530,42	36,44	18,60	16,83	42,14	25,08
4	13,90	258,34	586,22	30,74	14,06	9,96	35,31	17,23
13 (C)	32,78	298,64	306,95	38,53	18,49	18,79	45,46	26,36

<sup>1</sup>Teor de antocianinas (mg.100 g<sup>-1</sup>); <sup>2</sup>Conteúdo fenólico total (mg AGE.100 g<sup>-1</sup>); <sup>3</sup>Atividade antioxidante (µM Trolox.g<sup>-1</sup>); (C) Experimentos no ponto central.

### 3.1.1.1. Etanol

De acordo com a Tabela 2, o teor de antocianinas nos extratos etanólicos variou de 14,63 a 60,72 mg.100 g<sup>-1</sup> na polpa de jabuticaba. Já o conteúdo fenólico total variou de 185,92 a 339,95 mg AGE.100 g<sup>-1</sup>. A medida da atividade antioxidante dos extratos etanólicos variou desde 216,78 até 473,29 µM Trolox.g<sup>-1</sup>.

O planejamento da Tabela 1 e os dados experimentais obtidos (Tabela 2) foram usados para calcular os coeficientes das equações polinomiais de segunda ordem. A Tabela 3 sumariza os coeficientes de regressão, bem como sua significância.

Pode-se observar, de acordo com a Tabela 3, que o pH apresentou efeito linear negativo no teor de antocianinas ( $p < 0,05$ ), na atividade antioxidante ( $p < 0,04$ ) e no conteúdo fenólico total ( $p < 0,05$ ), indicando que uma diminuição desta variável aumenta linearmente estes teores, dentro dos níveis estudados. Quanto à concentração da solução extratora, observou-se efeito linear positivo no teor de antocianinas ( $p < 0,05$ ) e efeito quadrático negativo nas demais respostas da Tabela 3. Estes resultados sugerem que, quando ocorre um aumento ou diminuição demasiados, dentro dos níveis estudados da concentração da solução extratora, ocorre uma queda quadrática destas respostas.

Após a análise dos coeficientes, os modelos propostos foram avaliados quanto a seu ajuste, e a Tabela 4 apresenta a análise de variância (ANOVA) para os modelos.

Pode-se observar, pela Tabela 4, que a falta de ajuste foi não significativa para o teor de antocianinas ( $p > 0,05$ ) e para a atividade antioxidante ( $p > 0,04$ ). Pela observação da falta de ajuste não significativa e dos valores de  $R^2$  dos modelos (Tabela 3), pode-se afirmar que os mesmos são adequados para a predição do teor de antocianinas ( $R^2 = 0,90$ ) e da atividade antioxidante ( $R^2 = 0,82$ ). Entretanto, para o conteúdo fenólico total, a falta de ajuste foi significativa ( $p < 0,05$ ) (dados não mostrados) e verificou-se que o modelo encontrado não foi adequado para descrever esta resposta usando a superfície.

Tabela 3 – Coeficientes de regressão dos modelos polinomiais, erro-padrão e valores de  $p$  para os modelos construídos para as variáveis-resposta teor de antocianinas, atividade antioxidante e conteúdo fenólico total dos extratos etanólicos

	TAC <sup>1</sup>				AA <sup>2</sup>				CFT <sup>3</sup>			
	Coef.	Erro-padrão <sup>4</sup>	$t$	$p$	Coef.	Erro-padrão <sup>4</sup>	$t$	$p$	Coef.	Erro-padrão <sup>4</sup>	$t$	$p$
$\beta_0$	<b>46,37*</b>	2,20	21,05	0,0000	<b>379,35**</b>	11,54	32,87	0,0000	<b>274,82*</b>	6,18	44,45	0,0000
$\beta_1 (pH)$	<b>-10,02*</b>	1,74	-5,76	0,0045	<b>-71,06**</b>	9,12	-7,79	0,0015	<b>-42,09*</b>	4,89	-8,61	0,0010
$\beta_2 (S)$	<b>11,60*</b>	1,74	6,66	0,0026	6,67	9,12	0,73	0,5053	10,54	4,89	2,16	0,0973
$\beta_{11} (pH^2)$	1,95	1,87	1,04	0,3559	20,83	9,78	2,13	0,1003	<b>15,53*</b>	5,24	2,96	0,0415
$\beta_{22} (S^2)$	<b>-5,32*</b>	1,87	-2,85	0,0465	<b>-55,99**</b>	9,78	-5,72	0,0046	<b>-21,97*</b>	5,24	-4,19	0,0138
$\beta_{12} (pH \times S)$	5,11	2,46	2,07	0,1067	-19,01	12,90	-1,47	0,2147	-3,90	6,91	-0,56	0,6027
$R^2$	0,90				0,81				0,71			

<sup>1</sup>Teor de antocianinas (mg.100 g<sup>-1</sup>); <sup>2</sup>Atividade antioxidante ( $\mu$ M Trolox.g<sup>-1</sup>); <sup>3</sup>Conteúdo fenólico total (mg AGE.100 g<sup>-1</sup>); <sup>4</sup>Erro-padrão: erro-puro; \*Significativo a  $p < 0,05$ ; \*\*Significativo a  $p < 0,04$ .

Tabela 4 – ANOVA das regressões obtidas para as respostas teor de antocianinas e atividade antioxidante dos extratos etanólicos

Fontes	TAC <sup>1</sup>					AA <sup>2</sup>				
	SQ	GL	QM	$F$	$p$	SQ	GL	QM	$F$	$p$
Regressão	<b>2230</b>	5	446,04	13,32	0,0018*	69607	5	13921,45	5,93	0,0186**
Resíduos	234,4	7	33,49			16445	7	2349,26		
Falta de ajuste	137,4	3	45,79	1,89	0,2728	13782	3	4594,02	6,90	0,0464
Erro-puro	97,05	4	24,26			2663	4	665,69		
Total	2465	12				86052	12			

<sup>1</sup>Teor de antocianinas (mg.100 g<sup>-1</sup>); <sup>2</sup>Atividade antioxidante ( $\mu$ M Trolox.g<sup>-1</sup>); \*Significativo ( $p < 0,05$ ); \*\*Significativo ( $p < 0,04$ ).

A Figura 1 mostra os contornos das respostas, obtidos por meio dos valores preditos dos modelos ajustados.

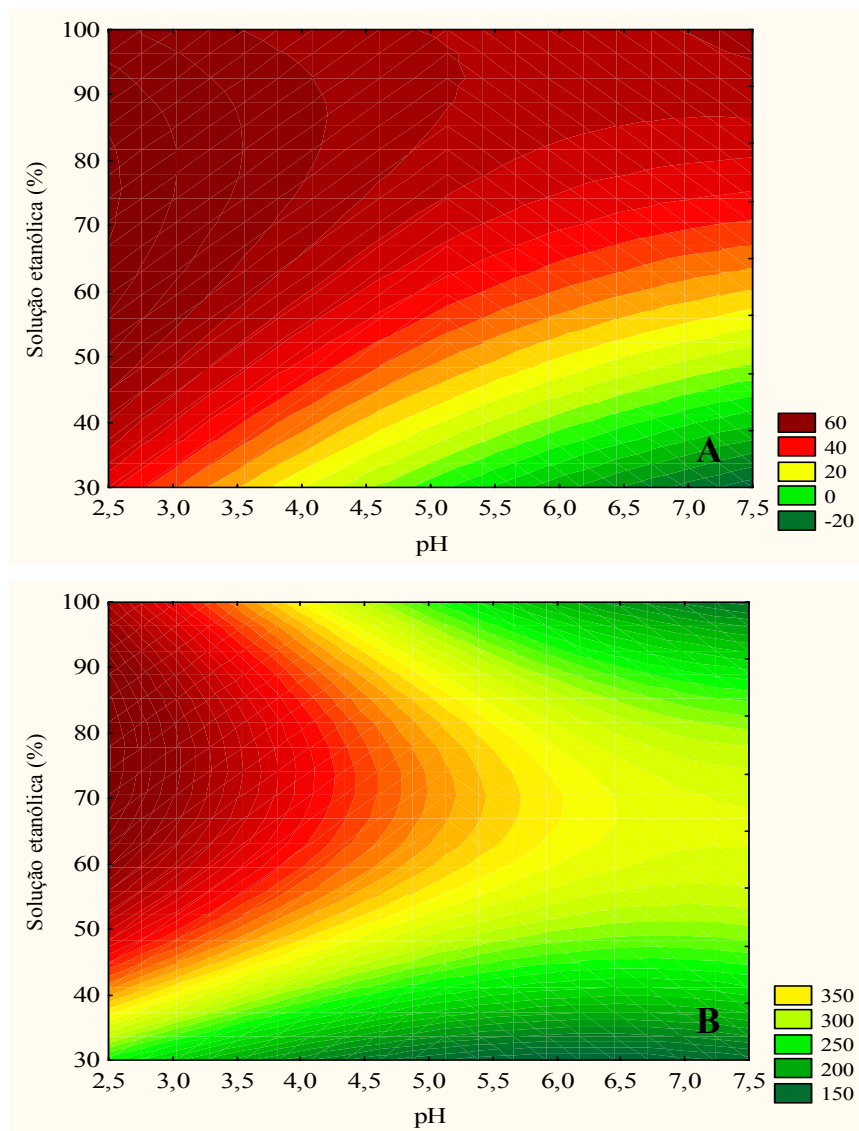


Figura 1 – Contornos das respostas para as variáveis (A) teor de antocianinas (mg.100 g<sup>-1</sup>) e (B) atividade antioxidante (μM Trolox.g<sup>-1</sup>) obtidas pela extração com o solvente etanol, em diferentes pH.

Quando se trata da extração de antocianinas para alimentos, universalmente se utiliza o etanol acidificado (Francis, 1982). As principais razões pelas quais muitos autores escolhem o etanol são pelo fato de ele não ser tóxico, por ser de baixo custo e pela alta eficiência extratora (Fuleki & Francis, 1968; Lapornik *et al.*, 2005).

Observando-se em conjunto os contornos das respostas da Figura 1, verificou-se que valores de pH mais baixos (<3,0) associados a etanol na concentração de 70 a 90% favorecem a extração de antocianinas e de compostos de ação anti-radical. Ainda, para o teor de antocianinas, notou-se que o uso de etanol absoluto (100%) a pH acima de 7,0 favoreceu a extração.

Pompeu *et al.* (2009), na otimização da extração de antocianinas e fenólicos de açaí verificou que a melhor concentração de etanol foi entre 70 e 80%. Já Karacabey & Mazza (2010), na maximização da atividade antioxidante de caules de *Vitis vinifera*, observaram que o etanol a 40% e a 55,4% possibilitaram a máxima ação antioxidante no ensaio usando ABTS e usando ORAC-fluoresceína, respectivamente. Em estudo de extração de antocianinas de jabuticaba, Montes *et al.* (2005) encontraram como melhor condição extratora o etanol (mínimo de 80%) acidificado com HCl na faixa de pH de 2,0 a 4,0. Da mesma forma, Constant (2003), na extração de antocianinas de açaí, recomendou o uso de etanol 70% a 90% em pH 2,0, concordando com dados obtidos no presente estudo.

Os principais mecanismos de atuação dos solventes orgânicos na extração de compostos bioativos de vegetais são a desnaturação das membranas celulares, permitindo a solubilização e a extração dos pigmentos, e a formação de um gradiente de concentração do interior do produto para o meio (Fuleki & Francis, 1968; Rodriguez-Saona & Wrolstad, 2001; Cacace & Mazza, 2002; Castañeda-Ovando *et al.*, 2009).

### **3.1.1.2. Metanol**

No planejamento composto central realizado para as extrações metanólicas, observou-se, pela Tabela 2, que o teor de antocianinas dos extratos variou de 23,37 a 63,06 mg.100 g<sup>-1</sup>, o conteúdo fenólico total variou de 285,67 até 425,38 mg AGE.100 g<sup>-1</sup> e a atividade antioxidante dos extratos variou de 408,29 a 591,03 µM Trolox.g<sup>-1</sup>.

A Tabela 5 apresenta os coeficientes das equações polinomiais calculados e sua significância nos modelos. Pela Tabela 5 verificou-se que o pH apresentou efeito linear e quadrático negativos na extração de antocianinas ( $p < 0,05$ ), indicando que melhores extrações ocorrem em pH baixos. Além disso, a concentração de metanol apresentou efeito linear positivo ( $p < 0,05$ ) e a interação entre a solução extratora e o pH mostra que o metanol mais concentrado associado a um pH mais elevado

aumenta a extração de antocianinas ( $p < 0,05$ ). Para a atividade antioxidante dos extratos metanólicos, observou-se efeito linear negativo do pH ( $p < 0,05$ ), indicando que a maior ação antioxidante é favorecida em pH mais ácidos. Em meio ácido, a antocianina está na forma de cátion *flavilium* e os demais fenólicos estão em sua forma hidroxilada, e, deste modo, atuam como antioxidantes, por meio da doação de elétrons ou átomos de hidrogênio aos radicais livres (Pietta, 2000). Para o conteúdo fenólico, observou-se efeito quadrático negativo do pH ( $p < 0,05$ ) e efeito linear positivo da concentração de metanol na solução ( $p < 0,05$ ).

Após a proposição dos modelos, os mesmos foram analisados quanto ao seu ajuste e, para tal, utilizou-se a ANOVA (Tabela 6).

Pôde-se observar que a falta de ajuste foi não significativa para o teor de antocianinas, para a atividade antioxidante e para o conteúdo fenólico total ( $p > 0,05$ ). Pela observação da falta de ajuste não significativa e dos elevados valores de  $R^2$  dos modelos (Tabela 5), pode-se afirmar que os mesmos foram adequados para a predição destas respostas.

Tabela 5 – Coeficientes de regressão dos modelos polinomiais, erro-padrão e valores de  $p$  para os modelos construídos para as variáveis-resposta teor de antocianinas, atividade antioxidante e conteúdo fenólico total dos extratos metanólicos

	TAC <sup>1</sup>				AA <sup>2</sup>				CFT <sup>3</sup>			
	Coef.	Erro-padrão <sup>4</sup>	$t$	$p$	Coef.	Erro-padrão <sup>4</sup>	$t$	$p$	Coef.	Erro-padrão <sup>4</sup>	$t$	$p$
$\beta_0$	<b>56,25*</b>	1,58	35,70	0,0000	<b>490,56*</b>	17,98	27,29	0,0000	<b>362,22*</b>	8,37	43,27	0,0000
$\beta_1(pH)$	<b>-7,21*</b>	1,25	-5,78	0,0044	<b>-61,98*</b>	14,21	-4,36	0,0121	<b>-47,69*</b>	6,62	-7,21	0,0020
$\beta_2(S)$	<b>9,77*</b>	1,25	7,84	0,0014	23,40	14,21	1,65	0,1750	<b>20,61*</b>	6,62	3,11	0,0357
$\beta_{11}(pH^2)$	-1,25	1,34	-0,94	0,4017	12,84	15,24	0,84	0,4471	-1,58	7,10	-0,22	0,8343
$\beta_{22}(S^2)$	-3,21	1,34	-2,40	0,0741	-8,53	15,24	-0,56	0,6057	-1,94	7,10	-0,27	0,7979
$\beta_{12}(pH \times S)$	<b>6,41*</b>	1,76	3,64	0,0220	15,55	20,10	0,77	0,4822	4,43	9,36	0,47	0,6607
$R^2$	0,89				0,82				0,83			

<sup>1</sup>Teor de antocianinas (mg.100 g<sup>-1</sup>); <sup>2</sup>Atividade antioxidante ( $\mu$ M Trolox.g<sup>-1</sup>); <sup>3</sup>Conteúdo fenólico total (mg AGE.100 g<sup>-1</sup>); <sup>4</sup>Erro-padrão: erro-puro; \*Significativo a  $p < 0,05$ .

Tabela 6 - ANOVA das regressões obtidas para as respostas teor de antocianinas e atividade antioxidante dos extratos metanólicos

Fontes	TAC <sup>1</sup>					AA <sup>2</sup>					CFT <sup>3</sup>				
	SQ	GL	QM	$F$	$p$	SQ	GL	QM	$F$	$p$	SQ	GL	QM	$F$	$p$
Regressão	<b>1420</b>	5	283,97	12,1	0,0024*	<b>37965</b>	5	7593,08	6,66	0,0136*	<b>21762</b>	5	4352,40	6,72	0,0133*
Resíduos	164,3	7	23,47			7983	7	1140,45			4533	7	647,55		
Falta de ajuste	114,7	3	38,23	3,08	0,1526	1520	3	506,68	0,31	0,8160	3131	3	1043,78	2,98	0,1595
Erro-puro	49,61	4	12,40			6463	4	1615,78			1401	4	350,37		
Total	1584	12				45949	12				26295	12			

<sup>1</sup>Teor de antocianinas (mg.100 g<sup>-1</sup>); <sup>2</sup>Atividade antioxidante ( $\mu$ M Trolox.g<sup>-1</sup>); <sup>3</sup>Conteúdo fenólico total (mgAGE.100g<sup>-1</sup>); \* Significativo a  $p < 0,05$ .

A Figura 2 mostra as curvas de nível obtidas por meio dos valores preditos dos modelos ajustados. Analisando-se as curvas da Figura 2 de forma simultânea, percebe-se que a região que possibilita um maior teor de antocianinas, maior conteúdo fenólico e maior atividade antioxidante ocorre próximo ao nível de 70% de metanol e em pH mais ácidos (aprox. 2,5). Para o teor de antocianinas isoladamente verificou-se que melhores extrações ocorrem com solução metanólica 60 a 80% associado a baixos pH (aprox. 2,5) e também com metanol absoluto associado a pH acima de 7,0. No presente trabalho, portanto, observou-se que é possível extrair antocianinas com pH mais neutros, utilizando maior proporção de solvente. Isto indica que as reações de transformação da forma catiônica *flavilium* das antocianinas em direção às formas incolores pseudo-base carbinol e chalcona, podem ser reversíveis em pH neutro.

Embora muitos autores prefiram utilizar o etanol (Cacace & Mazza, 2003b; Fan *et al.*, 2008; Valduga *et al.*, 2008; Dai *et al.*, 2009; Patil *et al.*, 2009; Karacabey & Mazza, 2010) ao metanol, Metivier *et al.* (1980) verificaram que o metanol foi 20% mais efetivo que o etanol e 73% mais eficiente que a água na extração e recuperação de antocianinas de casca de uva. Da mesma forma, Bridgers *et al.* (2010) avaliaram o uso de metanol e etanol, tanto acidificados quanto neutros na extração de antocianinas de batata-doce. Os autores verificaram que o metanol acidificado foi a solução extratora mais eficiente para a extração, quando comparado ao etanol acidificado. No presente estudo, comparando-se as Figuras 1 e 2, observou-se comportamentos parecidos do etanol e do metanol como soluções extradoras de antocianinas. Para o conteúdo fenólico total, o metanol em concentrações mais elevadas e pH mais ácidos favorecem a extração (Figura 2). Liyana-Pathirana & Shahidi (2005), na extração de fenólicos de trigo, ao avaliar o poder extrator do metanol e do etanol em concentrações de 0 a 100%, verificaram que o melhor solvente foi o etanol a 50% e não o metanol. Já Montes *et al.* (2005) não encontraram diferença significativa entre o uso de etanol e metanol na extração de antocianinas de jabuticaba. Para estes autores o efeito mais importante foi o da concentração dos solventes, sendo o metanol a 80% menos efetivo que o metanol puro. No presente estudo, em pH mais ácidos, misturas de metanol e água foram mais eficientes na extração que o metanol absoluto.

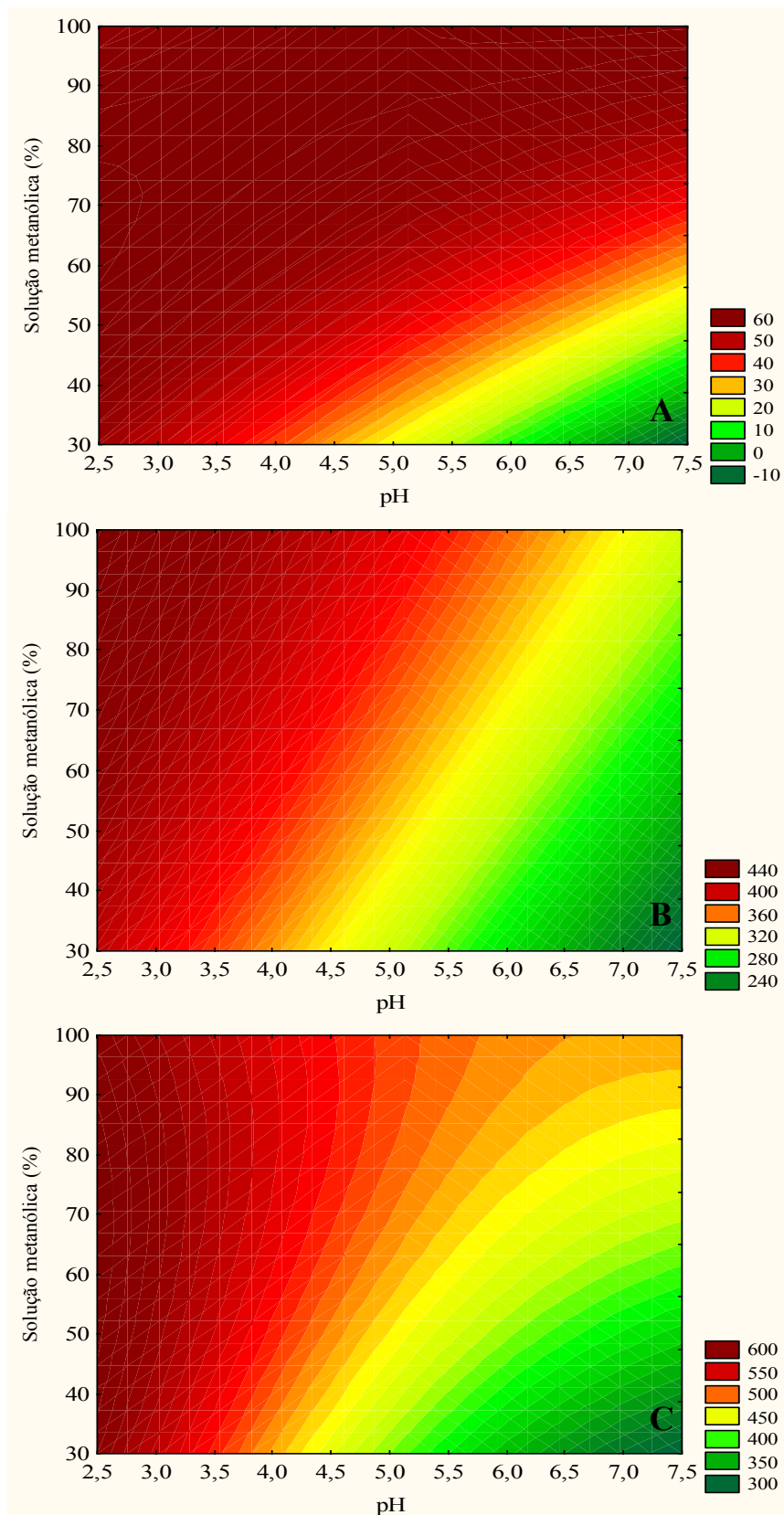


Figura 2 – Contornos das respostas para as variáveis (A) teor de antocianinas (mg.100 g<sup>-1</sup>), (B) conteúdo fenólico total (mg AGE.100 g<sup>-1</sup>) e (C) atividade antioxidante (μM Trolox.g<sup>-1</sup>) dos extratos obtidos com metanol, em diferentes pH.

### 3.1.1.3. Acetona

De acordo com a Tabela 2, o teor de antocianinas nos extratos acetônicos variou de 7,25 a 38,89 mg.100g<sup>-1</sup> na polpa de jabuticaba. Já o conteúdo fenólico total variou de 188,68 a 376,89 mg AGE.100 g<sup>-1</sup>. A medida da atividade antioxidante dos extratos acetônicos variou desde 362,79 até 628,15 µM Trolox.g<sup>-1</sup>.

Os dados experimentais obtidos das extrações com acetona (Tabela 2) foram usados para calcular os coeficientes das equações polinomiais de segunda ordem e a Tabela 7 sumariza os coeficientes de regressão, bem como sua significância. Observou-se, pelos coeficientes do modelo, que para o teor de antocianinas a solução extratora apresentou efeito quadrático negativo ( $p < 0,05$ ). Para a variável-resposta atividade antioxidante nenhum dos coeficientes apresentou significância ( $p > 0,05$ ). Para o conteúdo fenólico total observou-se que o aumento do pH propiciou um menor teor de fenólicos no extrato ( $p < 0,05$ ), e que um aumento ou diminuição excessivos do teor de acetona em água provocou queda acentuada dos fenólicos ( $p < 0,05$ ).

No entanto, a avaliação dos modelos propostos realizada pela ANOVA da regressão mostrou que nenhum deles foi adequado para descrever as respostas, dado que a falta de ajuste foi significativa em todos (dados não mostrados). Os valores de  $R^2$  mostrados na Tabela 7 confirmam estes resultados.

A extração com acetona não se mostrou satisfatória, nos níveis de solução extratora e pH estudados. Estes resultados diferem de alguns estudos, em que a extração utilizando acetona como solução extratora se mostra promissora (Rodriguez-Saona & Wrolstad, 2001). Garcia-Viguera *et al.* (1998) ressaltam que o uso de acetona permitiu uma extração mais eficiente e mais reprodutível de antocianinas de morango, quando comparado ao metanol acidificado com ácido fórmico e ácido clorídrico e à água. De forma similar, Wrolstad & Durst (1998) compararam o uso da acetona com o metanol acidificado na extração de antocianinas de amostras líquidas e em pó de sucos, corantes e preparações nutracêuticas de *cranberry* e *elderberry*. Os autores verificaram que a recuperação de antocianinas foi 30% maior com o uso da acetona, contrário ao comportamento observado no presente estudo.

Tabela 7 – Coeficientes de regressão dos modelos polinomiais, erro-padrão e valores de  $p$  para os modelos construídos para as variáveis-resposta teor de antocianinas, atividade antioxidante e conteúdo fenólico total dos extratos acetônicos

	TAC <sup>1</sup>				AA <sup>2</sup>				CFT <sup>3</sup>			
	Coef.	Erro-padrão <sup>4</sup>	$t$	$p$	Coef.	Erro-padrão <sup>4</sup>	$t$	$p$	Coef.	Erro-padrão <sup>4</sup>	$t$	$p$
$\beta_0$	33,88*	3,63	9,32	0,0000	486,23*	65,78	7,39	0,0018	321,64*	10,81	29,75	0,0000
Linear												
$\beta_1(pH)$	-6,27	2,88	-2,18	0,0658	-2,16	52,07	-0,04	0,9689	-29,12*	8,56	-3,40	0,0272
$\beta_2(S)$	0,35	2,89	0,12	0,9064	9,24	52,28	0,18	0,8683	-1,17	8,59	-0,14	0,8979
Quadrático												
$\beta_{11}(pH^2)$	-1,47	3,08	-0,48	0,6482	62,05	55,75	1,11	0,3281	-0,37	9,16	-0,04	0,9696
$\beta_{22}(S^2)$	-8,91*	3,10	-2,87	0,0239	-16,99	56,12	-0,30	0,7772	-33,93*	9,22	-3,68	0,0212
Interação												
$\beta_{12}(pH \times S)$	-3,30	4,06	-0,81	0,4430	-25,13	73,46	-0,34	0,7495	-22,52	12,08	-1,86	0,1356
$R^2$	0,66				0,21				0,32			

<sup>1</sup>Teor de antocianinas (mg.100 g<sup>-1</sup>); <sup>2</sup>Atividade antioxidante ( $\mu$ M Trolox.g<sup>-1</sup>); <sup>3</sup>Conteúdo fenólico total (mg AGE.100 g<sup>-1</sup>); <sup>4</sup>Erro-padrão: erro-puro; \*Significativo a  $p < 0,05$ .

### 3.1.2. Análise colorimétrica

A *Colorimetria Triestímulos* é uma ferramenta útil na caracterização da cor de extratos ricos em pigmentos.  $L^*$  está relacionado com a transmissão da luz ( $L^*=0$ , amostra totalmente preta;  $L^*=100$ , amostra totalmente branca). Na análise do ângulo de tonalidade,  $h=0^\circ$  quando fixado no eixo horizontal, no extremo da coordenada  $a^*$  (vermelho). Girando no sentido anti-horário, tem-se  $h=90^\circ$  (amarelo),  $h=180^\circ$  (verde) e  $h=270^\circ$  (azul) (Alves *et al.*, 2008).

A Tabela 8 apresenta os coeficientes de regressão e sua significância, obtidos para as coordenadas colorimétricas  $L^*$ ,  $h$  e  $C^*$ , para os extratos obtidos com os solventes etanol, metanol e acetona.

Para a luminosidade no extrato etanólico, o pH apresentou efeito quadrático negativo ( $p<0,01$ ) (Tabela 8). Para o extrato metanólico, observou-se a significância da solução extratora (linear e quadrática), do pH (efeito quadrático) e da interação entre o pH e a solução extratora ( $p<0,01$ ). Para o extrato acetônico, verificou-se que o pH apresentou efeitos linear e quadrático, a solução extratora apresentou efeito quadrático e a interação entre a solução extratora e o pH teve efeito positivo ( $p<0,05$ ). Como  $L^*$  está relacionada à transmissão de luz, na extração de pigmentos, valores de  $L^*$  mais baixos seriam desejáveis, pois estariam relacionados a uma maior eficiência de extração (Montes *et al.*, 2005). No presente estudo, obteve-se, para os extratos etanólicos,  $L^*$  variando de 28,27 a 38,00; para os extratos metanólicos,  $L^*$  variou de 28,36 a 40,88 e para os extratos acetônicos, de 28,74 a 36,98 (Tabela 2). Para os extratos etanólicos, pela Tabela 2, verificou-se que o maior valor de  $L^*$  correspondeu a um ponto experimental onde foi obtido baixo teor de antocianinas e de fenólicos totais, ou seja, uma menor extração de bioativos possibilitou a obtenção de um extrato mais claro.

Tabela 8 – Coeficientes de regressão dos modelos polinomiais, erro-padrão e valores de  $p$  para os modelos construídos para as respostas luminosidade, ângulo de tonalidade cromática e saturação de cor, obtidos para os extratos etanólicos, metanólicos e acetônicos

	<b>L*<sup>1</sup></b>				<b>h<sup>2</sup></b>				<b>C*<sup>3</sup></b>			
	Coef.	Erro-padrão <sup>4</sup>	$t$	$p$	Coef.	Erro-padrão <sup>4</sup>	$t$	$p$	Coef.	Erro-padrão <sup>4</sup>	$t$	$p$
	<b>Etanol</b>				<b>Etanol</b>				<b>Etanol</b>			
$\beta_0$	<b>31,79**</b>	0,33	97,79	0,0000	<b>20,51*</b>	0,66	31,14	0,0000	<b>20,59*</b>	0,32	63,78	0,0000
$\beta_1$ (pH)	0,06	0,26	0,23	0,8263	3,92*	0,52	7,52	0,0017	<b>-5,04*</b>	0,26	-19,74	0,0000
$\beta_2$ (S)	-0,96	0,26	-3,75	0,0199	<b>-6,71*</b>	0,52	-12,88	0,0002	-0,08	0,26	-0,32	0,7663
$\beta_{11}$ (pH <sup>2</sup> )	<b>-1,64**</b>	0,28	-5,95	0,0040	0,28	0,56	0,51	0,6397	<b>-1,47*</b>	0,27	-5,37	0,0058
$\beta_{22}$ (S <sup>2</sup> )	0,96	0,28	3,48	0,0253	<b>4,47*</b>	0,56	8,00	0,0013	0,14	0,27	0,50	0,6419
$\beta_{12}$ (pHxS)	1,6	0,36	4,39	0,0118	-1,36	0,74	-1,85	0,1378	2,76	0,36	7,66	0,0016
R <sup>2</sup>	0,60				0,80				0,98			
	<b>Metanol</b>				<b>Metanol</b>				<b>Metanol</b>			
$\beta_0$	<b>39,01**</b>	0,35	110,29	0,0000	<b>39,91**</b>	0,82	48,49	0,0000	<b>23,13**</b>	0,29	80,85	0,0000
$\beta_1$ (pH)	0,87	0,28	3,10	0,0173	<b>10,33**</b>	0,65	15,88	0,0001	<b>-5,34**</b>	0,23	-23,61	0,0000
$\beta_2$ (S)	<b>2,41**</b>	0,28	8,63	0,0001	1,61	0,65	2,47	0,0687	0,78	0,23	3,47	0,0257
$\beta_{11}$ (pH <sup>2</sup> )	<b>-3,04**</b>	0,30	-10,13	0,0000	-2,27	0,70	-3,26	0,0312	<b>2,30**</b>	0,24	9,48	0,0007
$\beta_{22}$ (S <sup>2</sup> )	<b>-1,38**</b>	0,30	-4,59	0,0025	-2,09	0,70	-3,00	0,0400	<b>-1,55**</b>	0,24	-6,39	0,0031
$\beta_{12}$ (pHxS)	<b>3,65**</b>	0,40	9,23	0,0000	<b>6,89**</b>	0,92	7,49	0,0017	<b>3,72**</b>	0,32	11,62	0,0003
R <sup>2</sup>	0,97				0,91				0,89			
	<b>Acetona</b>				<b>Acetona</b>				<b>Acetona</b>			
$\beta_0$	<b>36,92*</b>	0,44	84,43	0,0000	<b>43,45*</b>	0,84	51,56	0,0000	<b>25,02*</b>	0,37	66,78	0,0000
$\beta_1$ (pH)	<b>-2,59*</b>	0,35	-7,49	0,0017	1,65	0,67	2,47	0,0692	<b>-6,70*</b>	0,30	-22,60	0,0000
$\beta_2$ (S)	-0,07	0,35	-0,21	0,8428	0,42	0,67	0,62	0,5680	<b>1,65*</b>	0,30	5,53	0,0052
$\beta_{11}$ (pH <sup>2</sup> )	<b>-2,36*</b>	0,37	-6,37	0,0031	<b>-8,32*</b>	0,71	-11,65	0,0003	-0,65	0,32	-2,04	0,1109
$\beta_{22}$ (S <sup>2</sup> )	<b>-1,41*</b>	0,37	-3,79	0,0192	-1,81	0,72	-2,52	0,0656	<b>-1,88*</b>	0,32	-5,87	0,0042
$\beta_{12}$ (pHxS)	1,67*	0,49	3,42	0,0269	4,80*	0,94	5,10	0,0070	0,03	0,42	0,07	0,9453
R <sup>2</sup>	0,84				0,86				0,96			

<sup>1</sup>L\*: luminosidade; <sup>2</sup>h: ângulo de tonalidade cromática; <sup>3</sup>C\*: saturação de cor; \*Significativo ( $p < 0,05$ ); \*\*Significativo ( $p < 0,01$ ); <sup>4</sup>Erro-padrão: erro puro.

Verificou-se que os ângulos de tonalidade cromática dos extratos etanólicos, metanólicos e acetônicos situaram-se na faixa entre o vermelho e amarelo ( $0^\circ$  a  $90^\circ$ ), porém mais próximos do vermelho (Tabela 2). Para h, observou-se efeitos lineares positivos do pH nos modelos para os extratos obtidos com etanol ( $p < 0,05$ ) e metanol ( $p < 0,01$ ) (Tabela 8). Quanto maior o pH, maior o ângulo de tonalidade cromática, e mais amarelados se tornam os extratos. De maneira análoga, quanto mais baixo o pH, mais os extratos se aproximam do vermelho. Esta é uma das razões pelas quais as extrações de antocianinas são comumente realizadas em meios ácidos. Para extratos ricos em antocianinas, obtidos tradicionalmente com solventes acidificados, onde a forma predominante do pigmento é o cátion *flavilium*, h deve estar situado próximo ao vermelho, ou entre o vermelho e o azul ( $270^\circ$ ). Montes *et al.* (2005), na avaliação colorimétrica de antocianinas de jabuticaba utilizando sistemas solventes etanólicos e metanólicos em meios ácidos, encontraram valores de h de 13 a  $24^\circ$ .

Para a extração de pigmentos, elevados valores de  $C^*$  são desejáveis, pois este parâmetro é a expressão quantitativa da cromaticidade dos extratos, relacionando-se com a sensação visual de “quantidade de cor”. Em geral, quanto mais compostos os solventes são capazes de extrair, maiores serão os valores de  $C^*$  dos respectivos extratos. Montes *et al.* (2005) encontrou valores de  $C^*$  para extratos de jabuticaba na ordem de 22,8 a 54,3.  $C^*$ , no presente estudo, variou de 10,96 a 26,53 para os extratos etanólicos, de 12,89 a 34,23 para os extratos metanólicos e de 11,85 a 32,42 para os extratos acetônicos. Os maiores valores de  $C^*$  dos solventes mencionados anteriormente, de acordo com a Tabela 2, são de extratos contendo altos teores de antocianinas e elevado conteúdo fenólico. No estudo de Fan *et al.* (2008) foram encontrados valores de  $C^*$  de 7,05 a 7,77. As discrepâncias entre os diferentes estudos podem ser por causa das diferentes condições de extração utilizadas em cada um deles.

A falta de ajuste foi testada para todos os modelos por ANOVA (dados não mostrados). Para os extratos etanólicos, verificou-se que para  $L^*$  e h as faltas de ajuste foram significativas ( $p < 0,05$ ), portanto os modelos não foram considerados adequados para descrever estes parâmetros do sistema. Já o parâmetro  $C^*$  foi adequado, pela falta de ajuste ter sido não significativa ( $p > 0,05$ ), associada ao elevado  $R^2$  (Tabela 8). Já para os extratos metanólicos, verificou-se que as regressões foram significativas ( $p < 0,05$ ) e as faltas de ajuste não significativas ( $p > 0,05$ ) para  $L^*$  e h (dados não mostrados). Para os extratos acetônicos, pela ANOVA observou-se

que as regressões foram significativas e as faltas de ajuste foram não significativas (dados não mostrados) para  $L^*$ ,  $h$  e  $C^*$ , e associadas aos elevados valores de  $R^2$  obtidos, indicaram a obtenção de modelos robustos para prever os parâmetros cromáticos  $L^*$ ,  $h$  e  $C^*$ . A Figura 3 mostra os gráficos dos valores observados *versus* os valores estimados dos parâmetros cromáticos.

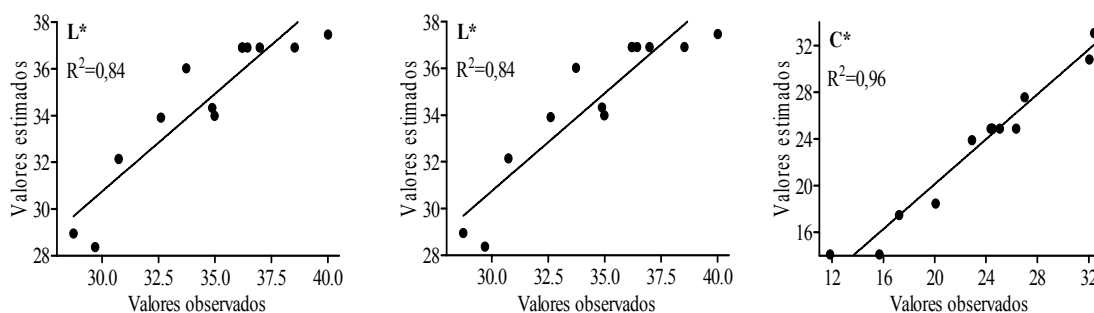


Figura 3 – Representação gráfica dos valores estimados *versus* observados para  $L^*$ ,  $h$  e  $C^*$ , dos extratos produzidos com acetona.

### 3.1.3. Estudo comparativo do desempenho das soluções extratoras avaliadas nos planejamentos compostos centrais

Os três estudos empregando planejamento composto central, utilizando como solventes extratores etanol, metanol e acetona, em diferentes concentrações e diferentes pH, foram comparados entre si, na eficiência extratora de antocianinas, fenólicos e ação antioxidante. A Tabela 9 apresenta as diferenças entre cada par de soluções extratoras, para as diferentes variáveis-resposta, bem como sua significância.

Tabela 9 – Comparação pareada das respostas dos planejamentos compostos centrais com as soluções extratoras metanol, etanol e acetona, em relação ao teor de antocianinas, conteúdo fenólico total e atividade antioxidante

	TAC <sup>1</sup>					
	Etanol	Metanol	Metanol	Acetona	Etanol	Acetona
<b>Média</b>	44,30	53,50*	53,50*	27,48	44,30*	27,48
<b>Variância</b>	205,38	132,01	132,01	113,44	205,38	113,44
<b>Correlação</b>	0,94	-	0,53	-	0,50	-
<b>t<sub>0</sub></b>	1,78	-	1,78	-	1,78	-
<b>p</b>	9,47x10 <sup>-6</sup>	-	1,14x10 <sup>-6</sup>	-	0,0004	-
	CFT <sup>2</sup>					
	Etanol	Metanol	Metanol	Acetona	Etanol	Acetona
<b>Média</b>	270,85	360,05*	360,05*	300,61	270,85	300,61
<b>Variância</b>	2442,60	2186,87	2186,87	4225,52	2442,60	4225,52
<b>Correlação</b>	0,82	-	0,22	-	0,19	-
<b>t<sub>0</sub></b>	1,78	-	1,78	-	1,78	-
<b>p</b>	4,50x10 <sup>-8</sup>	-	0,0059	-	0,0787	-
	AA <sup>3</sup>					
	Etanol	Metanol	Metanol	Acetona	Etanol	Acetona
<b>Média</b>	357,71	493,21*	493,21	513,51	357,71*	513,51
<b>Variância</b>	7171,00	3829,05	3829,05	13546,53	7171,00	13546,53
<b>Correlação</b>	0,74	-	0,01	-	0,15	-
<b>t<sub>0</sub></b>	1,78	-	1,78	-	1,78	-
<b>p</b>	8,55x10 <sup>-7</sup>	-	0,2848	-	0,0006	-

t<sub>0</sub>: unicaudal; <sup>1</sup>Teor de antocianinas (mg.100g<sup>-1</sup>); <sup>2</sup>Conteúdo fenólico total (mg AGE.100g<sup>-1</sup>); <sup>3</sup>Atividade antioxidante (µM Trolox.g<sup>-1</sup>). \*Significativamente maior a p<0,05.

Pela Tabela 9 notou-se que, de maneira geral, o metanol foi a solução extratora mais eficiente na extração de antocianinas, nas condições deste estudo, seguido do etanol e da acetona (p<0,05). Este dado confirma o relato de Fuleki & Francis (1968), em que a extração de antocianinas de fontes vegetais deve ser realizada por macerações repetidas do material em solução resfriada de metanol: HCl 1%. De acordo com Jackman & Smith (1996), o metanol é a solução extratora mais eficiente para a extração destes pigmentos; no entanto, devido à sua toxicidade, o etanol é preferencialmente utilizado, embora seja menos eficiente e mais difícil de ser concentrado, em relação ao metanol (Constant, 2003).

Na extração de fenólicos totais, o metanol também foi a solução extratora mais eficiente. Shahidi & Naczk (2004) afirmam que o metanol, etanol, acetona, água, acetato de etila e, em menor extensão, o propanol, a dimetilformamida e suas combinações são freqüentemente usadas para a extração de compostos fenólicos. Há relatos na literatura do uso freqüente de soluções aquosas de etanol (Cacace & Mazza, 2003a; Yang *et al.*, 2009; Karacabey & Mazza, 2010) e de metanol (Arts *et al.*, 2000; Tomás-Barberán *et al.*, 2001; Mattila *et al.*, 2006) na extração de polifenóis, principalmente da família dos flavonóides (Shahidi & Naczk, 2004).

Na atividade antioxidante, observou-se que extratos acetônicos obtiveram desempenhos iguais aos extratos metanólicos ( $p > 0,05$ ) e superiores aos extratos etanólicos ( $p < 0,05$ ) (Tabela 9). Estes dados indicam que a acetona possivelmente extrairia outros compostos que contribuem para a atividade antioxidante do sistema, além dos polifenóis e antocianinas. É recomendado o uso de acetona na extração prévia dos compostos bioativos de frutas para a posterior determinação de atividade antioxidante total, conforme descrito em Rufino *et al.* (2007).

Neste estudo, quando se utilizou o etanol como extrator, verificou-se elevada correlação de Pearson significativa ( $p < 0,05$ ) entre a ação antioxidante e o conteúdo fenólico total ( $R = 0,92$ ), e entre a ação antioxidante e o teor de antocianinas ( $R = 0,74$ ). Observou-se, quando se utilizou o metanol, correlações significativas positivas ( $p < 0,05$ ) entre a atividade antioxidante e o conteúdo fenólico total ( $R = 0,87$ ), e entre a atividade antioxidante e o teor de antocianinas ( $R = 0,71$ ), indicando que os compostos fenólicos responderam em maior proporção pela ação antioxidante dos extratos etanólicos e metanólicos da jabuticaba. Na literatura há trabalhos que apresentam correlação da atividade antioxidante tanto com o teor de antocianinas (Oki *et al.*, 2002; Pompeu *et al.*, 2009), quanto com o conteúdo fenólico total (Ahmed *et al.*, 2010; Rufino *et al.*, 2010), bem como correlação com ambos os compostos bioativos (Huang *et al.*, 2006), como parece ser o caso do presente estudo.

### **3.2. Estudo comparativo da eficiência extratora das soluções de etanol e metanol 70% e efeito do pH**

#### **3.2.1. Efeito do pH**

Estudou-se as solventes etanol e metanol, na concentração otimizada de 70% pelo planejamento composto central, conforme mostrado em 3.1.1, nos pH de 2,5, 2,0, 1,5 e 1,0. Verificou-se que, nesta condição, abaixando-se o pH, poderia se elevar a extração de antocianinas, compostos fenólicos e aumentar a atividade antioxidante dos sistemas (Figuras 1 e 2).

A Figura 4 apresenta gráficos gerados dos experimentos obtidos com o etanol e metanol 70%, em função do pH. Os dados obtidos dos teores de antocianinas, conteúdo fenólico total e atividade antioxidante foram ajustados a modelos lineares quando se utilizou metanol como solução extratora. Os dados obtidos para o conteúdo de antocianinas, fenólicos totais e a atividade antioxidante, quando se

utilizou o etanol 70%, foram ajustados a modelos polinomiais de segundo grau (TAC) e a modelos cúbicos (CFT e AA), e os  $R^2$  encontram-se expostos nos respectivos gráficos.

De acordo com a Figura 4, observa-se que o teor de antocianinas tende a aumentar com a diminuição do pH, tanto para o etanol quanto para o metanol. Para o conteúdo fenólico total, na extração com o metanol, verificou-se que o maior teor foi encontrado em pH 2,5, concordando com a Figura 2. Notou-se semelhança entre as curvas dos dados para conteúdo fenólico total e atividade antioxidante, mais pronunciadamente na extração com metanol, indicando serem estes compostos os que contribuem majoritariamente para a atividade antioxidante, corroborando as correlações encontradas no item 3.1.3 deste estudo.

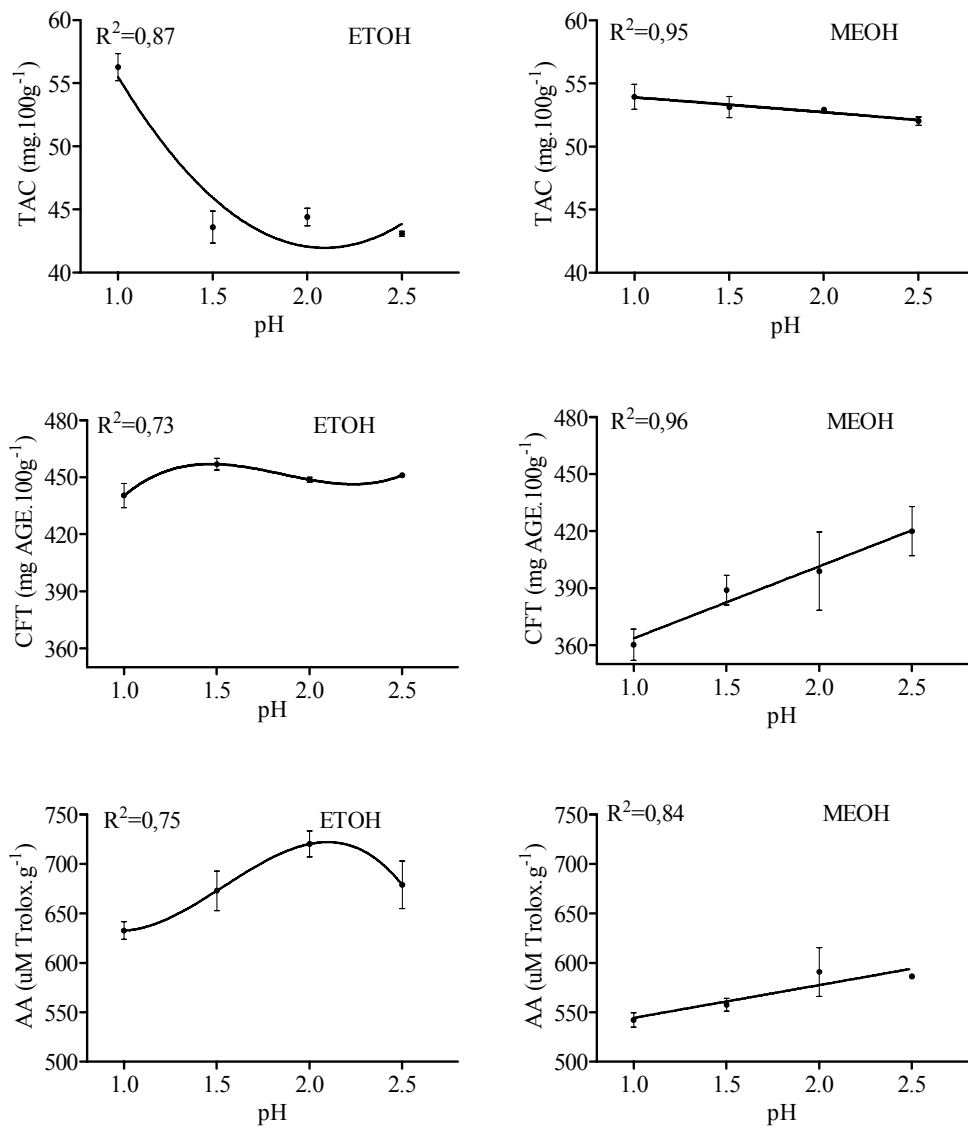


Figura 4 – Teor de antocianinas (mg.100g<sup>-1</sup>), conteúdo fenólico total (mg AGE.100g<sup>-1</sup>) e atividade antioxidante (μM Trolox.g<sup>-1</sup>) dos extratos de jabuticaba obtidos com etanol 70% e metanol 70% em diferentes pH.

### 3.2.2. Comparação da eficiência extratora das soluções de etanol 70% e metanol 70%

Neste estudo, comparou-se a eficiência extratora das soluções de etanol 70% e metanol 70% na extração de antocianinas, conforme mostrado na Tabela 10.

Tabela 10 – Comparação de médias da eficiência extratora das soluções de metanol 70% e etanol 70%, em relação ao teor de antocianinas, conteúdo fenólico total e atividade antioxidante, nos diferentes pH

		TAC <sup>1</sup>		CFT <sup>2</sup>		AA <sup>3</sup>	
		Metanol 70%	Etanol 70%	Metanol 70%	Etanol 70%	Metanol 70%	Etanol 70%
pH 2,5	<b>Média</b>	52,02*	43,07	419,96	451,04	586,44	678,94*
	<b>Variância</b>	0,21	0,08	333,80	0,67	4,43	1157,26
	<b>t</b>	23,19	-	-2,40	-	-3,83	-
	<b>p</b>	0,0009	-	0,0690	-	0,0383	-
pH 2,0	<b>Média</b>	52,93*	44,39	398,96	448,72	590,86	720,30*
	<b>Variância</b>	0,01	0,98	840,08	3,43	1225,71	348,71
	<b>t</b>	12,12	-	-2,42	-	-4,61	-
	<b>p</b>	0,0034	-	0,0681	-	0,0219	-
pH 1,5	<b>Média</b>	52,63*	43,59	388,90	456,90*	557,57	672,93*
	<b>Variância</b>	3,59	3,26	121,93	19,88	84,26	812,51
	<b>t</b>	4,88	-	-8,07	-	-5,45	-
	<b>p</b>	0,0197	-	0,0075	-	0,0160	-
pH 1,0	<b>Média</b>	52,95	56,26	360,22	440,37*	542,26	632,65*
	<b>Variância</b>	7,88	2,31	136,61	80,03	108,97	157,94
	<b>t</b>	-1,47	-	-7,70	-	-7,82	-
	<b>p</b>	0,1395	-	0,0082	-	0,0079	-

<sup>1</sup>Teor de antocianinas (mg.100g<sup>-1</sup>); <sup>2</sup>Conteúdo fenólico total (mg AGE.100g<sup>-1</sup>); <sup>3</sup>Atividade antioxidante (µM Trolox.g<sup>-1</sup>). \*Significativamente maior a  $p < 0,05$ .

Pela Tabela 10 observou-se que, para o teor de antocianinas, a solução extratora mais eficiente foi o metanol 70%, exceto quando em pH 1,0, em que as duas soluções extratoras não apresentaram diferença na extração ( $p > 0,05$ ). Estes dados concordam com os estudos de Metivier *et al.* (1980) e de Bridgers *et al.* (2010), que afirmaram que o metanol é o melhor extrator para antocianinas, provavelmente devido ao fato de que esta solução sob acidificação promoveria maior desnaturação protéica das membranas das células vegetais, lixiviando os pigmentos para o meio. Concordam, também, com os resultados obtidos no item 3.1.3, quando se comparou as soluções extratoras dos experimentos de otimização por planejamento composto central.

Para o conteúdo fenólico total, observou-se que as soluções extratoras obtiveram desempenhos semelhantes, exceto quando em pH 1,5 e 1,0. Já para a atividade antioxidante, verificou-se que os extratos etanólicos foram os que extraíram maior proporção de compostos com ação anti-radical nos pH estudados ( $p < 0,05$ ).

#### 4. Conclusão

Os planejamentos compostos centrais utilizados, associados aos experimentos univariados com diferentes valores de pH, foram bem sucedidos na otimização da extração de antocianinas, fenólicos e atividade antioxidante para as soluções extratoras etanol e metanol. As duas variáveis investigadas no estudo (concentração da solução extratora e pH) atuaram de forma marcante na extração de bioativos da casca e polpa da jabuticaba.

Nas condições do estudo, a solução extratora mais eficiente foi o metanol, seguido do etanol, de forma global. A acetona, nos níveis avaliados, não apresentou bom desempenho como solução extratora. A atividade antioxidante dos extratos etanólicos e metanólicos apresentou elevada correlação positiva com o conteúdo fenólico total e, em menor magnitude, com o teor de antocianinas, indicando serem os compostos fenólicos totais os contribuintes majoritários para o potencial anti-radical destes extratos.

Com este trabalho, puderam-se confirmar os relatos da literatura de que as extrações de antocianinas mais eficientes são aquelas realizadas tradicionalmente com metanol ou etanol a 70%, em pH acidificados. Ainda, a alternativa de uma extração eficiente de antocianinas utilizando soluções extratoras puras (a 100%) e pH neutro foi sugerida pelo estudo, para a fonte antociânica jabuticaba.

Os extratos obtidos, pelo seu elevado teor de antocianinas e polifenóis, poderiam ser utilizados como corantes em alimentos líquidos e como parte de formulações de alimentos funcionais, em face de sua elevada ação anti-radical.

#### 5. Referências bibliográficas

- Adjé F, Lozano YF, Lozano P, Adima A, Chemat F & Gaydou EM (2010) Optimization of anthocyanin, flavonol and phenolic acid extractions from *Delonix regia* tree flowers using ultrasound-assisted water extraction. *Industrial Crops and Products* **32**, 439-444.
- Ahmed M, Akter MS, Lee J-C & Eun J-B (2010) Encapsulation by spray drying of bioactive components, physicochemical and morphological properties from purple sweet potato. *LWT - Food Science and Technology* **43**, 1307-1312.
- Alves CCO, Resende JVD, Cruvinel RSR & Prado MET (2008) Estabilidade da microestrutura e do teor de carotenóides de pós obtidos da polpa de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) liofilizada. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* **28**, 830-839.

- Arts ICW, van de Putte B & Hollman PCH (2000) Catechin Contents of Foods Commonly Consumed in The Netherlands. 2. Tea, Wine, Fruit Juices, and Chocolate Milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**, 1752-1757.
- Bridgers EN, Chinn MS & Truong VD (2010) Extraction of anthocyanins from industrial purple-fleshed sweetpotatoes and enzymatic hydrolysis of residues for fermentable sugars. *Industrial Crops and Products* **32**, 613-620.
- Cacace JE & Mazza G (2002) Extraction of Anthocyanins and Other Phenolics from Black Currants with Sulfured Water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 5939-5946.
- Cacace JE & Mazza G (2003a) Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering* **59**, 379-389.
- Cacace JE & Mazza G (2003b) Optimization of Extraction of Anthocyanins from Black Currants with Aqueous Ethanol. *Journal of Food Science* **68**, 240-248.
- Castañeda-Ovando A, Pacheco-Hernández MdL, Páez-Hernández ME, Rodríguez JA & Galán-Vidal CA (2009) Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry* **113**, 859-871.
- Constant PBL (2003) Antocianinas de açaí (*Euterpis oleracea* M.): extração, caracterização, desenvolvimento de formulação e aplicação em alimentos, Universidade Federal de Viçosa.
- Dai J, Gupte A, Gates L & Mumper RJ (2009) A comprehensive study of anthocyanin-containing extracts from selected blackberry cultivars: Extraction methods, stability, anticancer properties and mechanisms. *Food and Chemical Toxicology* **47**, 837-847.
- Einbond LS, Reynertson KA, Luo XD, Basile MJ & Kennelly EJ (2004) Anthocyanin antioxidants from edible fruits. *Food Chemistry* **84**, 23-28.
- Fan G, Han Y, Gu Z & Chen D (2008) Optimizing conditions for anthocyanins extraction from purple sweet potato using response surface methodology (RSM). *LWT - Food Science and Technology* **41**, 155-160.
- Francis FJ (1982) Analysis of anthocyanins in foods. In *Anthocyanins as Food Colors*, pp. 181-207 [P Markakis, editor]. New York: Academic Press.
- Fuleki T & Francis FJ (1968) Quantitative methods for anthocyanins. 1. Extraction and determination of total anthocyanin in cranberries. *Journal of Food Science* **33**, 72-77.
- Gao L & Mazza G (1996) Extraction of Anthocyanin Pigments from Purple Sunflower Hulls. *Journal of Food Science* **61**, 600-603.
- Garcia-Viguera C, Zafrilla P & Tomás-Barberán FA (1998) The use of acetone as an extraction solvent for anthocyanins from strawberry fruit. *Phytochemical Analysis* **9**, 274-277.

- Huang YC, Chang YH & Shao YY (2006) Effects of genotype and treatment on the antioxidant activity of sweet potato in Taiwan. *Food Chemistry* **98**, 529-538.
- Jackman RL & Smith JL (1996) Anthocyanins and betalains. In *Natural Food Colorants*, pp. 280-296 [GA Hendry and JD Houghton, editors]. Glasgow: Blackie Academic & Professional.
- Kähkönen MP, Hopia AI & Heinonen M (2001) Berry Phenolics and Their Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**, 4076-4082.
- Karacabey E & Mazza G (2010) Optimisation of antioxidant activity of grape cane extracts using response surface methodology. *Food Chemistry* **119**, 343-348.
- Konczak I & Zhang W (2004) Anthocyanins—More Than Nature's Colours. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **5**, 239-240.
- Lapornik B, Prosek M & Wondra AG (2005) Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering* **71**, 214-222.
- Liyana-Pathirana C & Shahidi F (2005) Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chemistry* **93**, 47-56.
- Markakis P (1982) Stability of anthocyanins in foods. In *Anthocyanins as food colours*, pp. 163-168. New York: Academic Press.
- Mattila P, Hellström J & Törrönen R (2006) Phenolic Acids in Berries, Fruits, and Beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 7193-7199.
- Metivier RP, Francis FJ & Clydesdale FM (1980) Solvent extraction of anthocyanins from wine pomace. *Journal of Food Science* **45**, 1099-1100.
- Montes C, Vicario IM, Raymundo M, Fett R & Heredia FJ (2005) Application of tristimulus colorimetry to optimize the extraction of anthocyanins from Jaboticaba (*Myrcia Jaboticaba* Berg.). *Food Research International* **38**, 983-988.
- Naczki M & Shahidi F (2004) Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A* **1054**, 95-111.
- Oki T, Matsuda M, Furuta S, Nishiba Y, Terahara N & Suda I (2002) Involvement of anthocyanins and other phenolic compounds in radical-scavenging activity of purple fleshed sweet potato cultivars. *Journal of Food Science* **67**, 1752-1756.
- Patil G, Madhusudhan MC, Ravindra Babu B & Raghavarao KSMS (2009) Extraction, dealcoholization and concentration of anthocyanin from red radish. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* **48**, 364-369.

- Pietta P-G (2000) Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products* **63**, 1035-1042.
- Pompeu DR, Silva EM & Rogez H (2009) Optimisation of the solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *Euterpe oleracea* using Response Surface Methodology. *Bioresource Technology* **100**, 6076-6082.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M & Rice-Evans C (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* **26**, 1231-1237.
- Reynertson KA, Wallace AM, Adachi S, Gil RR, Yang H, Basile MJ, D'Armiento J, Weinstein IB & Kennelly EJ (2006) Bioactive depsides and anthocyanins from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*). *J Nat Prod* **69**, 1228-1230.
- Reynertson KA, Yang H, Jiang B, Basile MJ & Kennelly EJ (2008) Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. *Food Chemistry* **109**, 883-890.
- Rodriguez-Saona LE & Wrolstad RE (2001) Extraction, isolation and purification of anthocyanins. In *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, pp. F1.1.1-F1.1.11: John Wiley & Sons, Inc.
- Rufino MSM, Alves RE, Brito ES, Morais SMD, Sampaio GG, Pérez-Jiménez J & Saura-Calixto F (2007) Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS<sup>+</sup>. In *Comunicado técnico on-line*, pp. 1-4. Fortaleza: Embrapa.
- Rufino MSM, Alves RE, de Brito ES, Pérez-Jiménez J, Saura-Calixto F & Mancini-Filho J (2010) Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry* **121**, 996-1002.
- Shahidi F & Naczki M (2004) Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A* **1054**, 95-111.
- Swain T & Hillis WE (1959) The phenolics constituents of *Prunus domestica*: the quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **10**, 63-68.
- Teófilo RF & Ferreira MMC (2006) Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. *Química Nova* **29**, 338-350.
- Tomás-Barberán FA, Gil MI, Cremin P, Waterhouse AL, Hess-Pierce B & Kader AA (2001) HPLC-DAD-ESIMS Analysis of Phenolic Compounds in Nectarines, Peaches, and Plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**, 4748-4760.
- Valduga E, Lima L, do Prado R, Padilha FF & Treichel H (2008) Extração, secagem por atomização e microencapsulamento de antocianinas do bagaço da uva "Isabel" (*Vitis labrusca*). *Ciência e Agrotecnologia* **32**, 1568-1574.

- Volp ACP, Renhe IRT, Barra K & Stringheta PC (2008) Flavonóides antocianinas: características e propriedades na nutrição e saúde. *Revista Brasileira de Nutrição Clínica* **23**, 141-149.
- Wrolstad R & Durst R (1998) Use of anthocyanin and polyphenolic analyses in authenticating fruit juices. *Proceedings of Fruit Authenticity Workshop*, 79-96.
- Yang B, Liu X & Gao Y (2009) Extraction optimization of bioactive compounds (crocin, geniposide and total phenolic compounds) from Gardenia (*Gardenia jasminoides* Ellis) fruits with response surface methodology. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **10**, 610-615.

## ARTIGO Nº2

### OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE ANTOCIANINAS E POLIFENÓIS ANTIOXIDANTES DE JABUTICABA (*Myrciaria jaboticaba*) COM SOLUÇÕES AQUOSAS SULFURADAS EMPREGANDO A METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTAS

#### 1. Introdução

As antocianinas são compostos da família dos flavonóides e constituem um grupo de pigmentos responsáveis por grande parte das cores vermelha a púrpura em flores, frutas, folhas, caules e raízes de plantas (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009). Uma das propriedades mais importantes destes pigmentos é sua atividade antioxidante, que desempenha um papel fundamental na prevenção de doenças cardiovasculares, neurológicas, câncer e diabetes, entre outras (Konczak & Zhang, 2004).

A jaboticaba é uma fonte rica em antocianinas ainda pouco estudada, apesar de ser largamente consumida no Brasil. Comum em mercados brasileiros é consumida principalmente na forma fresca, ou na forma de produtos como geleias e licores. Os pigmentos encontram-se concentrados em sua casca, que é um resíduo desta fruta, com potencial de ser utilizado na extração comercial de pigmentos. A jabuticabeira (*Myrciaria cauliflora* e *Myrciaria jaboticaba* [Myrtaceae]) é um arbusto nativo do estado de Minas Gerais. Seus frutos têm coloração arroxeada quando maduros e as cascas são ricas em antocianinas como a cianidina-3-glicosídeo (Einbond *et al.*, 2004; Reynertson *et al.*, 2006), taninos, ácidos fenólicos como ácido elágico e flavonoides como rutina e quercetina (Einbond *et al.*, 2004; Reynertson *et al.*, 2006; Reynertson *et al.*, 2008).

Em estudos de compostos antioxidantes e anti-câncer presentes em frutas tropicais, o extrato metanólico de jaboticaba apresentou forte atividade antioxidante no ensaio DPPH ( $IC_{50} = 35 \mu\text{g/mL}$ ) (Reynertson *et al.*, 2006) e em outro estudo, no mesmo ensaio, apresentou  $IC_{50}$  de  $19,4 \mu\text{g/mL}$  (Reynertson *et al.*, 2008).

O uso de soluções sulfuradas como solução extratora para antocianinas representa uma redução no uso de soluções extratoras orgânicas como metanol, bem como reduz o custo da extração do pigmento (Gao & Mazza, 1996). Não há relatos na literatura da extração de pigmentos de jaboticaba utilizando soluções sulfuradas,

portanto torna-se importante otimizar as condições gerais da extração, como tempo, relação matéria-prima:solvente e concentrações de SO<sub>2</sub>, determinando o maior rendimento da obtenção de antocianinas, compostos fenólicos ou as condições que proporcionam maior ação antioxidante do extrato.

A metodologia de superfície de resposta (RSM) tem sido utilizada com sucesso para a otimização da extração de antocianinas de girassol (Gao & Mazza, 1996), de groselhas pretas (Cacace & Mazza, 2002), de batata-doce (Fan *et al.*, 2008) e de açaí (Pompeu *et al.*, 2009), e de compostos fenólicos de trigo (Liyana-Pathirana & Shahidi, 2005), dentre outros. A RSM é uma ferramenta estatística útil para desenvolver e otimizar processos, nos quais uma resposta de interesse sofre influência de vários fatores. Esta técnica não somente demonstra o efeito das variáveis independentes, mas também produz modelos matemáticos para prever o processo (Pompeu *et al.*, 2009).

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi otimizar a extração de antocianinas e polifenóis de jaboticaba, por meio da RSM, visando a obtenção de um maior teor destes compostos e maior atividade antioxidante.

## **2. Material e métodos**

### **2.1. Material**

As jaboticabas (*Myrciaria jaboticaba*) foram adquiridas em Cachoeira do Campo - MG, em novembro de 2010. As cascas de jaboticaba foram obtidas por meio do descascamento dos frutos congelados, imediatamente antes do experimento.

### **2.2. Métodos**

#### **2.2.1. Extração dos compostos bioativos da jaboticaba**

As soluções extratoras utilizadas foram soluções aquosas de dióxido de enxofre, preparadas pela dissolução de metabissulfito de sódio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) em água. Os pH das soluções foram ajustados para 3,5, para que o equilíbrio da dissociação do metabissulfito de sódio em meio aquoso estivesse deslocado para a formação do ânion bissulfito (HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>) (Machado *et al.*, 2006). As concentrações das soluções foram expressas em equivalente de SO<sub>2</sub> (ppm).

Foram pesadas aproximadamente 10 g de casca de jaboticaba, e colocadas em béqueres contendo as soluções extratoras. Em seguida foram trituradas durante 2

minutos com auxílio de triturador Ultra-turrac marca Marconi, modelo TE102. Os extratos foram, então, armazenados a 20°C até o momento das análises.

A concentração das soluções sulfuradas, o tempo de extração e a relação solvente:casca variaram para cada extração.

### 2.2.2. Delineamento experimental e análises estatísticas

A otimização da extração foi realizada por meio de metodologia de superfície de resposta. Foi utilizado um planejamento composto central com três fatores e cinco níveis de cada fator, constituindo um total de 19 experimentos casualizados, sendo oito fatoriais (combinação dos níveis -1 e +1), seis axiais (uma variável no nível  $\pm \alpha$  e as outras no nível zero) e cinco repetições no ponto central (três variáveis no nível zero) (Teófilo & Ferreira, 2006).

As variáveis independentes foram concentração de SO<sub>2</sub>, tempo de extração e relação solvente:casca, e seus níveis estão apresentados na Tabela 1. As respostas obtidas foram teor de antocianinas (TAC), conteúdo fenólico total (CFT), atividade antioxidante (AA) e coordenadas colorimétricas (L\*, a\*, b\*, h e C\*).

Tabela 1 – Planejamento composto central para as variáveis teor de SO<sub>2</sub>, tempo de extração e relação solvente:casca

Ensaio	Níveis codificados			Níveis decodificados		
	$x_1$	$x_2$	$x_3$	Tempo/h (T)	Solv: casca/mL.g <sup>-1</sup> (SC)	SO <sub>2</sub> /ppm (SO <sub>2</sub> )
6	+1	-1	+1	10,0	7	1300
8	+1	+1	+1	10,0	13	1300
16 C	0	0	0	7,5	10	850
12	0	+ $\alpha$	0	7,5	15	850
11	0	- $\alpha$	0	7,5	5	850
7	+1	+1	-1	10,0	13	400
19 C	0	0	0	7,5	10	850
15 C	0	0	0	7,5	10	850
10	+ $\alpha$	0	0	12,0	10	850
14	0	0	+ $\alpha$	7,5	10	1607
3	-1	+1	-1	5,0	13	400
2	-1	-1	+1	5,0	7	1300
13	0	0	- $\alpha$	7,5	10	93
18 C	0	0	0	7,5	10	850
17 C	0	0	0	7,5	10	850
9	- $\alpha$	0	0	3,0	10	850
1	-1	-1	-1	5,0	7	400
5	+1	-1	-1	10,0	7	400
4	-1	+1	+1	5,0	13	1300

$\alpha = \pm 1,682$  para três variáveis independentes (Teófilo & Ferreira, 2006).

$x_1 =$  variável tempo (h);  $x_2 =$  variável solvente:casca (mL.g<sup>-1</sup>);  $x_3 =$  variável teor de SO<sub>2</sub> (ppm).

Para se fazer a codificação/decodificação dos níveis das variáveis empregou-se a Equação 1, conforme descrito em Teófilo & Ferreira (2006),

$$x_i = \frac{z_i - \bar{z}}{\frac{\Delta z}{2}} \quad (\text{Eq. 1})$$

em que:  $x_i$  é o valor codificado do planejamento composto central,  $z_i$  é o valor experimental do nível,  $\bar{z}$  é o valor do nível zero (0), e  $\Delta z$  é a diferença entre os níveis mais (+) e menos (-).

Os dados obtidos foram analisados por meio do software Statistica 7.0 (Tulsa, USA) e foram ajustadas as equações polinomiais de segunda ordem. A função de respostas ( $y$ ) é dividida nos componentes linear, quadrático e de interação, conforme a Equação 2,

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i x_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^k \beta_{ij} x_i x_j + e \quad (\text{Eq. 2})$$

onde:  $\beta_0$  é o coeficiente constante (intercepto),  $\beta_i$  é o coeficiente linear,  $\beta_{ii}$  o coeficiente quadrático,  $\beta_{ij}$  o coeficiente de interação,  $X_i$  são os níveis das variáveis independentes e  $e$  o erro experimental.

Os coeficientes de regressão foram obtidos por meio de regressão linear múltipla (MLR). Os coeficientes do modelo foram avaliados estatisticamente quanto a sua significância e interpretados de acordo com sua importância no sistema.

A análise de variância (ANOVA) e os valores de correlação foram usados para validar os modelos e verificar se os mesmos estavam adequados. Os gráficos de superfície de resposta foram obtidos usando os valores preditos dos modelos ajustados, mantendo-se a variável independente de menor influência em um nível fixado.

### 2.2.3. Análises quantitativas

#### 2.2.3.1. Teor de antocianinas

As antocianinas totais dos diferentes extratos produzidos foram quantificadas pelo método espectrofotométrico proposto por Francis (1982). O teor total de antocianinas foi determinado com auxílio de um espectrofotômetro Shimadzu, modelo 1601PC (Kyoto, Japan), utilizando-se o coeficiente de absorvidade molar de 98,2, que se refere à absorção a 535 nm de uma mistura de antocianinas de

*cranberry* em etanol acidificado, medida em cubeta de 1 cm, na concentração de 1% (m/v).

### 2.2.3.2. Conteúdo fenólico total

O conteúdo fenólico total dos extratos obtidos em cada experimento mostrado na Tabela 1 foi determinado pelo ensaio espectrofotométrico com o reagente Folin-Denis, baseado na redução dos ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico em meio alcalino na presença de fenólicos, gerando um complexo de cor azul (Swain & Hillis, 1959; Naczki & Shahidi, 2004). O ácido gálico foi utilizado como padrão e o teor total de fenólicos dos extratos foi expresso como mg de ácido gálico equivalente por 100 g de casca ( $\text{mg AGE} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ).

### 2.2.3.3. Atividade antioxidante

A atividade anti-radical livre foi realizada para os diferentes extratos utilizando-se o método de ensaio do radical ABTS. Para a formação do radical  $\text{ABTS}^{*+}$ , a solução aquosa de ABTS 7 mM foi adicionada à solução de persulfato de potássio 2,45 mM. Esta mistura foi mantida no escuro à temperatura ambiente por 16 horas. Após este tempo a absorbância foi corrigida para 0,70 ( $\pm 0,02$ ) a 734 nm com adição de etanol 80% (Re *et al.*, 1999) em espectrofotômetro. A 1 mL da solução radical  $\text{ABTS}^{*+}$  foram adicionados 0,5 mL de cada extrato, e realizada leitura espectrofotométrica após 6 minutos de reação. Foi utilizado o Trolox como padrão e os resultados foram expressos em equivalente de Trolox ( $\mu\text{M Trolox} \cdot \text{g}^{-1}$ ).

### 2.2.4. Análise colorimétrica

Os extratos 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 D<sub>65</sub> 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 3 e 4.

$$C^* = [(a^*)^2 + (b^*)^2]^{1/2} \quad (\text{Eq. 3})$$

$$h = \arctan(b^*/a^*) \quad (\text{Eq. 4})$$

### 3. Resultados e Discussão

Os efeitos das variáveis teor de SO<sub>2</sub>, tempo, relação solvente:casca e suas interações foram estudados para a otimização da extração de antocianinas e polifenóis de jabuticaba. As respostas obtidas dos 19 ensaios, em ordem experimental aleatorizada, estão mostradas na Tabela 2 para todas as respostas. As coordenadas colorimétricas a\* e b\* foram utilizadas para o cálculo dos parâmetros h e C\*, e para a caracterização dos extratos, foram analisados L\*, h e C\*.

Tabela 2 – Respostas obtidas para os extratos aquosos sulfurados de casca de jabuticaba

Ensaio	TAC <sup>1</sup>	CFT <sup>2</sup>	AA <sup>3</sup>	Colorimetria				
				L*	a*	b*	h	C*
6	223,95	408,78	1149,07	47,70	11,53	19,16	58,96	22,36
8	244,50	1916,98	1346,53	45,20	11,27	18,38	58,48	21,56
16 C	229,34	1516,60	1256,35	45,17	12,06	17,18	54,93	20,99
12	213,30	1623,80	1178,04	45,10	10,72	17,60	58,65	20,61
11	224,27	1788,92	1132,62	44,50	12,15	16,53	53,68	20,51
7	213,04	857,38	996,20	43,97	16,69	15,51	42,90	22,78
19 C	228,53	1598,03	1559,71	46,56	11,61	17,34	56,20	20,87
15 C	251,70	1609,93	1272,85	45,20	13,64	17,67	52,33	22,32
10	235,06	1572,87	1227,37	43,68	14,04	16,98	50,41	22,03
14	213,78	1839,86	1340,99	47,93	8,93	18,79	64,58	20,80
3	162,03	551,53	750,88	47,03	14,59	15,09	45,97	20,99
2	165,95	404,02	811,99	47,91	13,68	16,13	49,70	21,15
13	111,01	729,09	641,46	42,62	20,68	13,77	33,66	24,85
18 C	226,04	1460,84	1112,76	47,68	10,63	17,14	58,19	20,17
17 C	260,73	1566,57	1319,18	43,47	13,49	16,77	51,19	21,52
9	174,08	1276,42	1031,53	51,22	6,93	17,07	67,90	18,42
1	177,47	706,01	1025,32	46,48	15,11	15,29	45,34	21,50
5	237,31	793,23	994,44	42,04	20,07	15,10	36,96	25,12
4	160,56	423,41	1264,65	52,13	4,52	19,08	76,67	19,61

<sup>1</sup>Teor de antocianinas (mg.100 g<sup>-1</sup>); <sup>2</sup>Conteúdo fenólico total (mg AGE.100 g<sup>-1</sup>); <sup>3</sup>Atividade antioxidante (µM Trolox.g<sup>-1</sup>).

#### 3.1. Análises quantitativas

De acordo com a Tabela 2, o teor de antocianinas nos diferentes ensaios variou de 111,01 a 239,27 mg.100 g<sup>-1</sup> nas cascas de jabuticaba. Já o conteúdo fenólico total variou de 404,02 a 1916,98 mg AGE.100 g<sup>-1</sup>. A medida da atividade antioxidante dos extratos variou desde 641,46 até 1346,53 µM Trolox.g<sup>-1</sup>.

Usando o planejamento apresentado na Tabela 1 e as respostas mostradas na Tabela 2, os coeficientes dos modelos e suas avaliações estatísticas foram calculados. Os resultados são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Coeficientes de regressão dos modelos polinomiais, erro-padrão e valores de  $p$  para os modelos construídos para as variáveis-resposta teor de antocianinas, atividade antioxidante e conteúdo fenólico total

	TAC <sup>1</sup>				AA <sup>2</sup>				CFT <sup>3</sup>			
	Coef.	Erro-padrão <sup>4</sup>	$t$	$p$	Coef.	Erro-padrão <sup>4</sup>	$t$	$p$	Coef.	Erro-padrão <sup>4</sup>	$t$	$p$
$\beta_0$	<b>239,21*</b>	10,48	22,82	0,0000	<b>1304,81*</b>	72,59	17,97	0,0000	<b>1560,90*</b>	234,77	6,65	0,0001
$\beta_1(T)$	<b>25,04*</b>	6,16	4,06	0,0028	<b>68,09*</b>	42,67	1,59	0,1091	167,47	137,98	1,21	0,2557
$\beta_2(SC)$	-3,16	6,37	-0,49	0,6317	33,43	44,10	0,76	0,4202	85,72	142,61	0,60	0,5626
$\beta_3(SO_2)$	<b>13,03*</b>	6,34	2,05	0,0701	<b>145,11*</b>	43,93	3,30	0,0051	154,73	142,06	1,09	0,3044
$\beta_{11}(T^2)$	-10,04	5,68	-1,76	0,1107	-61,06	39,33	-1,55	0,1177	-155,76	127,19	-1,22	0,2518
$\beta_{22}(SC^2)$	-6,47	6,46	-1,00	0,3430	-63,25	44,77	-1,41	0,1499	-102,33	144,77	-0,71	0,4976
$\beta_{33}(SO_2^2)$	<b>-26,29*</b>	6,37	-4,13	0,0026	<b>-119,91*</b>	44,09	-2,72	0,0142	-246,73	142,59	-1,73	0,1176
$\beta_{12}(T \times SC)$	2,14	8,29	0,26	0,8022	2,62	57,40	0,05	0,9605	213,43	185,63	1,15	0,2799
$\beta_{13}(T \times SO_2)$	3,89	8,29	0,47	0,6502	25,57	57,40	0,44	0,6316	138,16	185,63	0,74	0,4757
$\beta_{23}(SC \times SO_2)$	6,86	8,29	0,83	0,4293	<b>115,35*</b>	57,40	2,01	0,0519	202,24	185,63	1,09	0,3043
$R^2$	0,82				0,79				0,53			

<sup>1</sup>Teor de antocianinas (mg.100 g<sup>-1</sup>); <sup>2</sup>Atividade antioxidante ( $\mu$ M Trolox.g<sup>-1</sup>); <sup>3</sup>Conteúdo fenólico total (mg AGE.100 g<sup>-1</sup>); <sup>4</sup>Erro-padrão: soma quadrática dos resíduos; \*Significativo a  $p < 0,11$ . Graus de liberdade: 9.

Tabela 4 – ANOVA das regressões obtidas para as respostas teor de antocianinas e atividade antioxidante

Fontes	TAC <sup>1</sup>					AA <sup>2</sup>				
	SQ	GL	QM	$F$	$p$	SQ	GL	QM	$F$	$p$
Regressão	<b>24774,12</b>	9	2752,70	10,91	0,0007*	<b>709351,32</b>	9	78816,81	3,38	0,0419*
Resíduos	2269,94	9	252,22			209744,51	9	23304,95		
Falta de ajuste	1265,81	5	253,16	1,01	0,5109	104311,87	5	20862,37	0,79	0,6064
Erro-puro	1004,13	4	251,03			105432,64	4	26358,16		
Total	27044,06	18				919095,83	18			

<sup>1</sup>Teor de antocianinas (mg.100 g<sup>-1</sup>); <sup>2</sup>Atividade antioxidante ( $\mu$ M Trolox.g<sup>-1</sup>); \*Significativo ( $p < 0,11$ ).

Pode-se observar, de acordo com a Tabela 3, que a variável relação solvente:casca, nos níveis estudados, não exerceu influência no teor de antocianinas ( $p>0,11$ ), compostos fenólicos totais ( $p>0,11$ ) e atividade antioxidante ( $p>0,11$ ), não sendo significativa pelo teste *t*. Estes resultados corroboram os dados de Karacabey & Mazza (2010), onde a relação solvente:casca não foi significativa na otimização da atividade antioxidante de caules de *Vitis vinifera*. Em contrapartida, o teor de antocianinas e atividade antioxidante foram influenciados ( $p<0,11$ ) pelo tempo de extração (efeito linear) e pela concentração de SO<sub>2</sub> (efeitos linear e quadrático). A concentração de SO<sub>2</sub> apresentou efeito significativo ( $p<0,11$ ) sobre a atividade antioxidante dos extratos (efeitos linear e quadrático). Ainda, a interação entre as variáveis relação solvente:casca e concentração de SO<sub>2</sub> foi significativa na atividade antioxidante ( $p<0,11$ ) (Tabela 3). Desta forma, a variável concentração de SO<sub>2</sub>, nos níveis estudados, se mostra a mais importante variável do sistema, tendo seus coeficientes de regressão significativos para as respostas TAC e AA.

Os resultados obtidos sugerem que, quando se aumenta a concentração de SO<sub>2</sub>, o teor de antocianinas e a atividade antioxidante aumentam linearmente. Entretanto, um aumento ou diminuição demasiada na concentração de SO<sub>2</sub>, dentro dos níveis estudados, provoca uma queda quadrática destas respostas. Ainda, pode-se observar que quando há aumento no tempo de extração, o teor de antocianinas e a atividade antioxidante tendem a aumentar linearmente. Os coeficientes quadráticos do tempo indicam um comportamento parecido ao da concentração de SO<sub>2</sub>.

Verifica-se, pela interação entre a relação solvente:casca e concentração de SO<sub>2</sub>, que maiores proporções solvente:casca associadas a níveis mais elevados de SO<sub>2</sub> aumentam o potencial antioxidante dos extratos (Tabela 3). Geralmente, um aumento na relação solvente:casca favorece a extração de compostos bioativos pela formação de um maior gradiente de concentração e, com isso, gera-se aumento da taxa de difusão dos compostos para o meio (Cacace & Mazza, 2002).

Para o conteúdo fenólico total, verificou-se que nenhum coeficiente de regressão foi significativo ( $p>0,11$ ).

Após a análise dos coeficientes de regressão, os modelos foram avaliados quanto ao seu ajuste. A Tabela 4 mostra os resultados obtidos da Análise de Variância (ANOVA) das regressões para teor de antocianinas e atividade antioxidante.

Pode-se observar, pela Tabela 4, que a falta de ajuste foi não significativa para o teor de antocianinas ( $p > 0,11$ ) e para a atividade antioxidante ( $p > 0,11$ ), e o erro puro de ambas as respostas foi baixo, indicando elevada precisão experimental. Pela observação da falta de ajuste não significativa e dos valores de  $R^2$  dos modelos (Tabela 3), pode-se afirmar que os mesmos são adequados para a predição do teor de antocianinas ( $R^2 = 0,82$ ) e da atividade antioxidante ( $R^2 = 0,79$ ). Entretanto, para o conteúdo fenólico total, a falta de ajuste foi significativa ( $p < 0,10$ ) (dados não mostrados), e o modelo encontrado não foi adequado para descrever esta resposta.

A Figura 1 mostra as superfícies de resposta obtidas por meio dos valores preditos dos modelos ajustados. Como a variável relação solvente:casca não apresentou efeito significativo, esta foi mantida no nível de  $10 \text{ mL.g}^{-1}$  para a geração das superfícies.

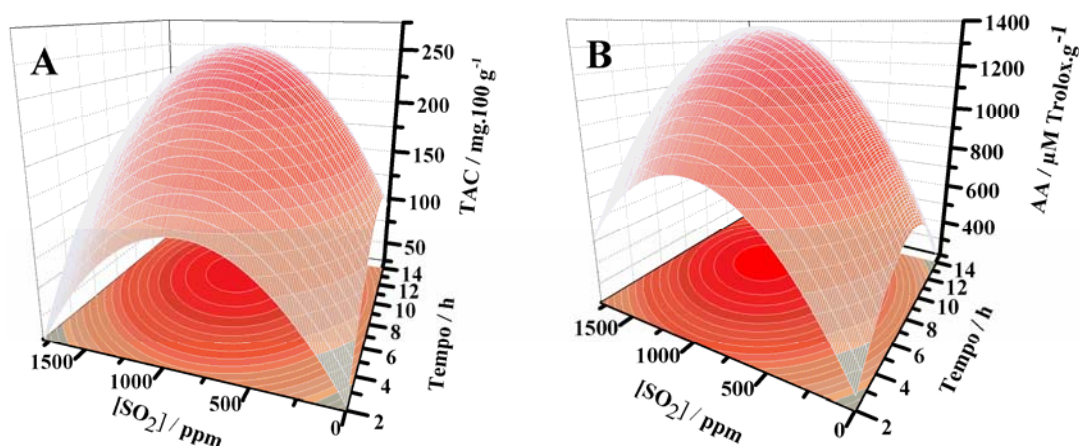


Figura 1 – Superfícies de resposta obtidas para as variáveis (A) teor de antocianinas ( $\text{mg.100 g}^{-1}$ ) e (B) atividade antioxidante ( $\mu\text{M Trolox.g}^{-1}$ ), obtidas pela extração com diferentes concentrações de  $\text{SO}_2$  em tempos distintos.

Observou-se que a associação de elevadas concentrações de  $\text{SO}_2$  e curtos tempos de extração não foi eficiente na extração dos compostos bioativos das cascas de jabuticaba, e, conseqüentemente, não contribuiu para o aumento da ação antioxidante dos extratos (Figura 1). Pompeu *et al.* (2009), na extração de antocianinas e polifenóis de açaí, verificou que o tempo necessário para a extração completa dos polifenóis a  $29,5 \text{ }^\circ\text{C}$  foi de 8 horas. Como as extrações do presente estudo foram realizadas a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ , nota-se uma concordância entre os dados. As extrações insuficientes com tempos curtos podem ser explicadas pela difusão

incompleta dos compostos do interior da matriz para o solvente. Entretanto, observam-se, na literatura, discrepâncias entre efeitos do tempo de extração. Cacace & Mazza (2002) atingiram uma concentração constante de fenólicos e antocianinas provenientes de groselhas pretas em aproximadamente 25 minutos de extração, a 1100 ppm de SO<sub>2</sub>. Já nos estudos de Cacace & Mazza (2003a) e de Fan *et al.* (2008), foram necessários 60 minutos para extrair fenólicos de bagas trituradas e antocianinas de batata-doce, respectivamente.

No presente estudo, o uso de baixas concentrações de SO<sub>2</sub> tanto em tempos curtos como em tempos muito longos (Figura 1) foi pouco eficiente na extração de antocianinas e de compostos com ação antioxidante, sendo ressaltada a maior importância da variável concentração de SO<sub>2</sub> em detrimento ao tempo de extração, em concordância com Fan *et al.* (2008). Estes dados discordam daqueles obtidos por Gao & Mazza (1996), em que na extração de antocianinas de girassol, as condições ótimas foram apenas 200 ppm de SO<sub>2</sub> e 5 minutos de extração. De acordo com Cacace & Mazza (2002), o passo limitante da extração com baixas concentrações de SO<sub>2</sub> seria a baixa solubilização dos compostos no meio.

O mecanismo exato pelo qual o SO<sub>2</sub> melhoraria a extração ainda não é conhecido, mas possíveis hipóteses são a interação das antocianinas e flavonóides com o ânion HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, que levaria a uma melhora da difusão dos compostos através da parede celular da matriz vegetal, e a um aumento da solubilidade dos pigmentos (Gao & Mazza, 1996). De acordo com Langston (1985) e Timberlake & Bridle (1967), o dióxido de enxofre em concentrações de 0,05% até 0,2% reage apenas com antocianinas monoméricas, sais *flavilium* e antocianidinas, formando um complexo com o ânion HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>. O ânion HSO<sub>3</sub><sup>-</sup> se liga prontamente a grupos *flavilium*, como o das antocianinas, na posição 4, para formar um complexo sem carga, incolor e estável. A reação para a formação do complexo é rápida e sua reação inversa é igualmente rápida se o SO<sub>2</sub> é removido do sistema, ou se há acidificação da solução (Timberlake & Bridle, 1967; Schwartz *et al.*, 2010).

Verificou-se, de acordo com a Figura 1, que a região ótima para a extração de antocianinas (teores acima de 240 mg.100g<sup>-1</sup>) situa-se na faixa de concentração de SO<sub>2</sub> de 900 a 1150 ppm, combinadas com um tempo de extração de 9 a 10 horas. Para se atingir um máximo de potencial antioxidante do sistema (valores acima de 1200 µM Trolox.g<sup>-1</sup>), recomenda-se a extração com concentrações de SO<sub>2</sub> variando de 900 a 1010 ppm, combinadas a tempos de extração de 8 a 11 horas.

Uma tendência de concordância entre as melhores condições para a extração de antocianinas e para a obtenção de maior ação antioxidante foi observada no presente estudo. Em geral, a ação antioxidante apresenta boa correlação com compostos fenólicos (Rufino *et al.*, 2010), e/ou com o teor de antocianinas (Pompeu *et al.*, 2009), já que estes compostos, por sua natureza, contribuem para este potencial. Observou-se, neste estudo, correlação significativa ( $p < 0,05$ ) entre a atividade antioxidante e o teor de antocianinas ( $R = 0,72$ ).

Pela análise simultânea das condições ótimas para as duas variáveis, é indicada a utilização de SO<sub>2</sub> na concentração de 900 ppm, conduzindo-se a extração por 9 horas, e como a relação solvente:casca não teve efeitos significativos, recomenda-se a utilização de um valor intermediário, como 10 mL.g<sup>-1</sup>. Estes resultados se aproximam daqueles obtidos por Cacace & Mazza (2002), em que na otimização da extração de antocianinas e fenólicos de groselhas, foi obtida a faixa ótima de 1000 a 1200 ppm de SO<sub>2</sub>, na relação solvente:fruto de 19 mL.g<sup>-1</sup>. Entretanto, observa-se que não há consenso quanto ao teor médio de SO<sub>2</sub> a ser utilizado na extração. Há relatos de extração ótima a 1000 – 1200 ppm (Cacace & Mazza, 2002; 2003a), outros a níveis ainda maiores, como 2000 ppm (Ayed *et al.*, 1999), e ainda, resultados em menor magnitude, como os encontrados por Bakker *et al.* (1998), que ao avaliarem diferentes níveis de SO<sub>2</sub> na extração de antocianinas (0, 75 e 150 ppm) verificaram que a melhor extração foi realizada a 150 ppm, mas indicando que um aumento no teor de SO<sub>2</sub> extrairia mais antocianinas.

Pela utilização dos níveis otimizados de concentração de SO<sub>2</sub>, tempo e relação solvente:casca nos modelos ajustados para TAC e AA (Tabela 3 e Equação 2), verificou-se que ao se extrair antocianinas de cascas de jabuticaba com 900 ppm de SO<sub>2</sub>, durante 9 h, na relação solvente:casca de 10 mL.g<sup>-1</sup>, o extrato teria teor de antocianinas estimado de 255,36 mg.100 g<sup>-1</sup> e atividade antioxidante estimada de 1360,31 µM Trolox.g<sup>-1</sup>.

### 3.2. Análise colorimétrica

A *Colorimetria Triestímulo* é uma ferramenta útil na caracterização da cor de extratos ricos em pigmentos. L\* está relacionado com a transmissão da luz (L\*=0, amostra totalmente preta; L\*=100, amostra totalmente branca). Na análise do ângulo de tonalidade, h=0° quando fixado no eixo horizontal, no extremo da coordenada a\*

(vermelho). Girando no sentido anti-horário, tem-se  $h=90^\circ$  (amarelo),  $h=180^\circ$  (verde) e  $h=270^\circ$  (azul) (Alves *et al.*, 2008).

A Tabela 5 apresenta os coeficientes de regressão e sua significância, obtidos para as coordenadas colorimétricas  $L^*$ ,  $h$  e  $C^*$ .

Pela análise da Tabela 5, observou-se que, para a coordenada  $L^*$ , o tempo apresentou efeito linear negativo ( $p<0,05$ ), ou seja, quanto maior o tempo de extração menor o valor de  $L^*$ . Como  $L^*$  está relacionada à transmissão de luz, na extração de pigmentos valores de  $L^*$  mais baixos seriam desejáveis, pois estariam relacionados a uma maior eficiência de extração (Montes *et al.*, 2005).

Verificou-se que os ângulos de tonalidade cromática situaram-se na região intermediária entre vermelho e amarelo (Tabela 2), típicos da extração aquosa com soluções sulfuradas, já que a formação do complexo antocianina- $\text{HSO}_3^-$  leva a uma perda temporária da cor (Timberlake & Bridle, 1967), e os extratos tornam-se amarelados. Uma redução do pH eliminaria o  $\text{HSO}_3^-$  e a antocianina retornaria à forma catiônica, alterando o padrão de cor ( $h$ ). Para extratos ricos em antocianinas, obtidos tradicionalmente com solvente acidificado, onde a forma predominante é o cátion *flavilium*,  $h$  deve estar situado próximo ao vermelho, ou entre o vermelho e azul. Montes *et al.* (2005), em extratos de jabuticaba, obtiveram valores de  $h$  de  $13^\circ$  a  $24^\circ$ . Pelo modelo obtido no presente estudo (Tabela 5), verificou-se que o tempo apresentou efeito linear negativo ( $p<0,05$ ), enquanto a concentração de  $\text{SO}_2$  apresentou efeito linear positivo ( $p<0,05$ ), ou seja, quanto maior a concentração de  $\text{SO}_2$ , maior valor de  $h$ .

A cromaticidade ou saturação de cor,  $C^*$ , foi influenciada pela concentração de  $\text{SO}_2$ , linear e quadraticamente. O tempo de extração teve efeito linear positivo ( $p<0,05$ ) (Tabela 5). Verificou-se que quanto maior o tempo de extração e maior a concentração de  $\text{SO}_2$ , mais saturadas foram as cores dos extratos. Para extração de pigmentos, elevados valores de  $C^*$  são desejáveis, pois este parâmetro é a expressão quantitativa da cromaticidade dos extratos, e se relaciona com a sensação visual de “quantidade de cor”. Montes *et al.* (2005) encontrou valores de  $C^*$  para extratos de jabuticaba na ordem de 22,8 a 54,3.  $C^*$ , no presente estudo, variou de 18,42 a 25,12. Já no estudo de Fan *et al.* (2008) foram encontrados valores de 7,05 a 7,77 para  $C^*$ .

Tabela 5 – Coeficientes de regressão dos modelos polinomiais, erro-padrão e valores de  $p$  para os modelos construídos para as respostas luminosidade, ângulo de tonalidade cromática e saturação de cor

	$L^{*1}$				$h^2$				$C^{*3}$			
	Coef.	Erro-padrão <sup>1</sup>	$t$	$p$	Coef.	Erro-padrão <sup>1</sup>	$t$	$p$	Coef.	Erro-padrão <sup>1</sup>	$t$	$p$
$\beta_0$	<b>45,60*</b>	0,68	66,64	0,0000	<b>54,58*</b>	2,28	23,95	0,0000	<b>21,16*</b>	0,40	53,43	0,0000
$\beta_1 (T)$	<b>-1,95*</b>	0,40	-4,84	0,0009	<b>-3,58*</b>	1,34	-2,67	0,0255	<b>1,04*</b>	0,23	4,47	0,0015
$\beta_2 (SC)$	0,38	0,42	0,92	0,3802	3,05	1,39	2,20	0,0551	-0,37	0,24	-1,54	0,1576
$\beta_3 (SO_2)$	<b>1,64*</b>	0,41	3,95	0,0033	<b>9,13*</b>	1,38	6,61	0,0001	<b>-0,92*</b>	0,24	-3,82	0,0041
$\beta_{11} (T^2)$	0,70	0,37	1,87	0,0936	0,97	1,24	0,78	0,4545	-0,19	0,21	-0,88	0,4042
$\beta_{22} (SC^2)$	-0,12	0,42	-0,28	0,7844	-0,04	1,41	-0,03	0,9805	-0,08	0,24	-0,32	0,7527
$\beta_{33} (SO_2^2)$	0,05	0,42	0,12	0,9107	-2,52	1,39	-1,82	0,1028	<b>0,72*</b>	0,24	2,99	0,0152
$\beta_{12} (T \times SC)$	-0,67	0,54	-1,23	0,2486	-2,77	1,80	-1,53	0,1593	-0,14	0,31	-0,43	0,6751
$\beta_{13} (T \times SO_2)$	0,05	0,54	0,08	0,9355	0,32	1,80	0,17	0,8651	-0,28	0,31	-0,90	0,3926
$\beta_{23} (SC \times SO_2)$	-0,10	0,54	-0,18	0,8645	2,49	1,80	1,38	0,2005	0,06	0,31	0,20	0,8478
$R^2$	0,83				0,88				0,84			

<sup>1</sup> $L^*$ : luminosidade; <sup>2</sup> $h$ : ângulo de tonalidade cromática; <sup>3</sup> $C^*$ : saturação de cor.  
Significativo ( $p < 0,05$ )

<sup>1</sup>Erro-padrão: soma quadrática dos resíduos; Graus de liberdade: 9.

A falta de ajuste foi testada para todos os modelos colorimétricos por ANOVA, sendo não significativa (dados não mostrados). Um indicativo da qualidade dos modelos pode ser visto na Figura 2. Os valores estimados *versus* medidos mostram que os dados foram bem ajustados aos modelos, com elevados  $R^2$ .

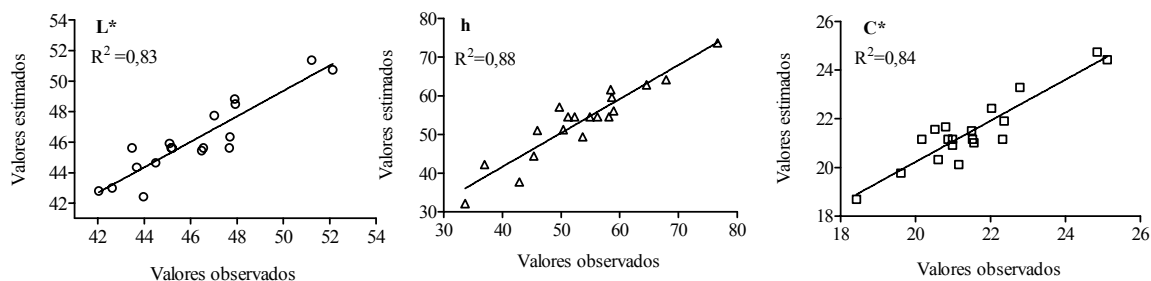


Figura 2 – Representação gráfica dos valores estimados *versus* observados para  $L^*$ ,  $h$  e  $C^*$ , dos extratos obtidos pela extração com soluções de  $SO_2$  em tempos distintos.

Pela utilização dos níveis otimizados de concentração de  $SO_2$ , tempo e relação solvente:casca nos modelos ajustados para  $L^*$ ,  $h$  e  $C^*$  (Tabela 5 e Equação 2), verificou-se que ao se extrair antocianinas de cascas de jabuticaba com 900 ppm de  $SO_2$ , durante 9 h, na relação solvente:casca de  $10 \text{ mL.g}^{-1}$ , o extrato teria como caracterização colorimétrica estimada: luminosidade de 45,78, ângulo de tonalidade cromática de  $53,45^\circ$  e saturação de cor de 21,69.

#### 4. Conclusão

O planejamento experimental utilizado foi bem sucedido na otimização da extração de antocianinas e na maximização da ação antioxidante dos extratos de cascas de jabuticaba. Das três variáveis investigadas no presente estudo, a concentração de  $SO_2$  foi a que afetou de forma mais marcante a extração de antocianinas e o potencial antioxidante dos extratos. O tempo de extração apresentou menor efeito, embora significativo. A relação solvente:casca não afetou a extração de antocianinas e a atividade antioxidante dos extratos, nos níveis estudados. A atividade antioxidante correlacionou-se positivamente com o teor de antocianinas, indicando que estes pigmentos, no extrato de jabuticaba, contribuíram majoritariamente para um maior potencial anti-radical.

## 5. Referências bibliográficas

- Adjé F, Lozano YF, Lozano P, Adima A, Chemat F & Gaydou EM (2010) Optimization of anthocyanin, flavonol and phenolic acid extractions from *Delonix regia* tree flowers using ultrasound-assisted water extraction. *Industrial Crops and Products* **32**, 439-444.
- Alves CCO, Resende JVd, Cruvinel RSR & Prado MET (2008) Estabilidade da microestrutura e do teor de carotenóides de pós obtidos da polpa de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) liofilizada. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* **28**, 830-839.
- Ayed N, Yu HL & Lacroix M (1999) Improvement of anthocyanin yield and shelf-life extension of grape pomace by gamma irradiation. *Food Research International* **32**, 539-543.
- Bakker J, Bridle P, Bellworthy SJ, Garcia-Viguera C, Reader HP & Watkins SJ (1998) Effect of sulphur dioxide and must extraction on colour, phenolic composition and sensory quality of red table wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **78**, 297-307.
- Cacace JE & Mazza G (2002) Extraction of Anthocyanins and Other Phenolics from Black Currants with Sulfured Water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 5939-5946.
- Cacace JE & Mazza G (2003) Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering* **59**, 379-389.
- Castañeda-Ovando A, Pacheco-Hernández MdL, Páez-Hernández ME, Rodríguez JA & Galán-Vidal CA (2009) Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry* **113**, 859-871.
- Einbond LS, Reynertson KA, Luo XD, Basile MJ & Kennelly EJ (2004) Anthocyanin antioxidants from edible fruits. *Food Chemistry* **84**, 23-28.
- Fan G, Han Y, Gu Z & Chen D (2008) Optimizing conditions for anthocyanins extraction from purple sweet potato using response surface methodology (RSM). *LWT - Food Science and Technology* **41**, 155-160.
- Francis FJ (1982) Analysis of anthocyanins in foods. In *Anthocyanins as Food Colors*, pp. 181-207 [P Markakis, editor]. New York: Academic Press.
- Gao L & Mazza G (1996) Extraction of Anthocyanin Pigments from Purple Sunflower Hulls. *Journal of Food Science* **61**, 600-603.
- Karacabey E & Mazza G (2010) Optimisation of antioxidant activity of grape cane extracts using response surface methodology. *Food Chemistry* **119**, 343-348.
- Konczak I & Zhang W (2004) Anthocyanins—More Than Nature's Colours. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **5**, 239-240.
- Langston MSK (1985) Anthocyanin colorant from grape pomace. US Patent.

- Liyana-Pathirana C & Shahidi F (2005) Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chemistry* **93**, 47-56.
- Machado RMD, Toledo MCF & Vicente E (2006) Sulfitos em Alimentos. *Brazilian Journal of Food Technology* **9**, 265-275.
- Montes C, Vicario IM, Raymundo M, Fett R & Heredia FJ (2005) Application of tristimulus colorimetry to optimize the extraction of anthocyanins from Jaboticaba (*Myrcia Jaboticaba* Berg.). *Food Research International* **38**, 983-988.
- Naczki M & Shahidi F (2004) Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A* **1054**, 95-111.
- Pompeu DR, Silva EM & Rogez H (2009) Optimisation of the solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *Euterpe oleracea* using Response Surface Methodology. *Bioresource Technology* **100**, 6076-6082.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M & Rice-Evans C (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* **26**, 1231-1237.
- Reynertson KA, Wallace AM, Adachi S, Gil RR, Yang H, Basile MJ, D'Armiento J, Weinstein IB & Kennelly EJ (2006) Bioactive depsides and anthocyanins from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*). *J Nat Prod* **69**, 1228-1230.
- Reynertson KA, Yang H, Jiang B, Basile MJ & Kennelly EJ (2008) Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. *Food Chemistry* **109**, 883-890.
- Rufino MSM, Alves RE, de Brito ES, Pérez-Jiménez J, Saura-Calixto F & Mancini-Filho J (2010) Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry* **121**, 996-1002.
- Schwartz SJ, von Helbe J & Giusti MM (2010) Corantes. In *Química de Alimentos de Fennema*, pp. 445-498 [S Damodaran, KL Parkin and OR Fennema, editors]. Porto Alegre: Artmed Editora.
- Swain T & Hillis WE (1959) The phenolics constituents of *Prunus domestica*: the quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **10**, 63-68.
- Teófilo RF & Ferreira MMC (2006) Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. *Química Nova* **29**, 338-350.
- Timberlake CF & Bridle P (1967) Flavylum salts, anthocyanidins and anthocyanins II.—Reactions with sulphur dioxide. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **18**, 479-485.

**MICROENCAPSULAMENTO POR *SPRAY DRYER* DE EXTRATO DE JABUTICABA (*Myrciaria jaboticaba*): INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DO PROCESSO DE SECAGEM**

**1. Introdução**

A jabuticaba é uma fruta nativa brasileira, de amplo consumo, e pode ser encontrada com frequência nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais (Silva *et al.*, 2008). As cascas da jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba*) possuem cor arroxeada intensa pelo elevado teor de antocianinas (Silva *et al.*, 2010), dentre elas a cianidina-3-glucosídeo (Einbond *et al.*, 2004; Reynertson *et al.*, 2006). Possui também importantes compostos fenólicos como a rutina, o ácido elágico e a quercetina (Reynertson *et al.*, 2006; Reynertson *et al.*, 2008).

As antocianinas e demais compostos fenólicos da jabuticaba apresentam como principal função biológica a elevada capacidade de seqüestro de radicais livres. Em estudos de compostos antioxidantes e anti-câncer presentes em frutas tropicais, o extrato metanólico da jabuticaba apresentou forte atividade antioxidante no ensaio DPPH ( $IC_{50} = 35 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (Reynertson *et al.*, 2006) e em outro estudo, no mesmo ensaio apresentou  $IC_{50}$  de  $19,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (Reynertson *et al.*, 2008).

Pesquisas com polifenóis e antocianinas de frutas tropicais vêm despertando interesse de pesquisadores pela diversidade e quantidade de compostos bioativos presentes, e pelo crescente interesse das indústrias na busca de extratos de fontes ricas em compostos bioativos, com comprovada ação antioxidante, tanto na forma líquida quanto na forma de pós microencapsulados. A jabuticaba é uma fruta ainda pouco estudada quanto a seus aspectos fitoquímicos, quanto às formas de obtenção de seus compostos bioativos e quanto à aplicação destes em sistemas alimentícios.

A tecnologia de microencapsulamento por *spray dryer* é utilizada na indústria alimentícia com objetivo de promover proteção a ingredientes sensíveis à degradação pela ação da luz, do oxigênio e de radicais livres. Com esta técnica, os compostos bioativos são protegidos por um material de parede (Ahmed *et al.*, 2010; Bakowska-Barczak & Kolodziejczyk, *no prelo*).

Numerosos materiais de parede ou agentes encapsulantes estão disponíveis para uso em alimentos, sendo que as maltodextrinas estão entre os mais comuns. As maltodextrinas são obtidas de amido de milho, via hidrólise ácida, e apresentam elevada solubilidade em água, baixa viscosidade mesmo em altas concentrações de sólidos, e formam soluções incolores (Bakowska-Barczak & Kolodziejczyk, *no prelo*). São muito utilizadas no encapsulamento de antocianinas e fenólicos, com graus de dextrose equivalente (DE) entre 10 e 20 (Ersus & Yurdagel, 2007; Tonon *et al.*, 2008; Ahmed *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2010; Tonon *et al.*, 2010). No estudo do microencapsulamento de antocianinas de jaboticaba, Silva *et al.* (2010), verificaram que os pigmentos apresentaram maior estabilidade à luz, a 25 °C, quando se utilizou a maltodextrina na proporção de 30%, quando comparado a misturas de maltodextrina e goma arábica.

Em produtos desidratados, medidas de propriedades físicas são importantes para prever o comportamento do produto durante a estocagem e processamento. Uma das medidas físicas de grande destaque é a determinação das isotermas de sorção, que ilustram a capacidade de um pó de reter ou liberar água para o meio, quando colocado em atmosferas de umidade relativa controlada a uma dada temperatura (Medeiros *et al.*, 2006). A tendência de um material em adsorver água do ambiente onde se encontra define a sua higroscopicidade, que é parâmetro fundamental de qualidade de produtos alimentícios desidratados (Tonon, 2009). A migração da umidade do ambiente para o pó pode representar alguns inconvenientes, como a formação de agregados de alta consistência ou *caking* (Costa *et al.*, 2003). O contrário (migração de umidade do pó para o ambiente) também pode ser prejudicial em determinados alimentos, podendo influenciar em características físicas, como solubilidade e densidade. Desta forma, o estudo da higroscopicidade e das isotermas de sorção faz-se importante ao se trabalhar com produtos desidratados em pó.

A metodologia de superfície de respostas (RSM) é uma técnica estatística útil para desenvolver, melhorar e otimizar processos (Liyana-Pathirana & Shahidi, 2005). Na literatura ainda existem poucos trabalhos empregando esta técnica no microencapsulamento de pigmentos, embora tenha sido utilizada com êxito na otimização das condições de microencapsulamento de antocianinas de açaí (Tonon *et al.*, 2008), de rosele (Andrade & Flores, 2004), de acerola (Moreira *et al.*, 2010) e de betalainas de *cactus pear* (Saénz *et al.*, 2009).

Neste contexto, o objetivo principal deste estudo foi otimizar as condições de microencapsulamento por *spray dryer* de extratos de jaboticaba, por meio de RSM, avaliando o efeito do fluxo de alimentação e da temperatura de entrada do processo, visando a obtenção de pós com elevada retenção de antocianinas, atividade antioxidante e menor perda de cor. Paralelamente, foram traçadas isotermas de sorção de amostras obtidas por diferentes fluxos de alimentação, a fim de verificar sua estabilidade frente a diferentes condições de armazenamento.

## **2. Material e métodos**

### **2.1. Material**

As jaboticabas (*Myrciaria jaboticaba*) foram coletadas no Campo Experimental da Fruticultura, na Universidade Federal de Viçosa, nas safras de 2006 e de 2009. Estas foram despulpadas e as cascas foram submetidas à secagem em secador de bandejas, a 65°C, por cerca de 8 horas. Após a secagem, as cascas foram armazenadas em freezer (-18 ± 2 °C) até o momento das análises.

### **2.2. Métodos**

#### **2.2.1. Delineamentos experimentais e análises estatísticas**

##### **2.2.1.1. Experimento de triagem**

Para selecionar a condição de fluxo de alimentação em torno da qual o estudo de otimização seria realizado, um experimento variando diferentes fluxos de alimentação foi conduzido em duplicata. Foram investigados os fluxos de alimentação de 180 mL.h<sup>-1</sup>, 360 mL.h<sup>-1</sup> e 540 mL.h<sup>-1</sup>, correspondentes às capacidades de bombeamento do equipamento de 10%, 20% e 30%, respectivamente. A temperatura do ar de entrada do *spray dryer* foi fixada em 180 °C. As respostas medidas nos pós produzidos neste experimento foram temperatura de saída (TS), retenção percentual de antocianinas (RA), teor de umidade (U), higroscopicidade (H) e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Após a obtenção das respostas com os diferentes fluxos de alimentação, estas foram comparadas entre si, duas a duas, para verificação do melhor fluxo de alimentação em torno do qual se deveria realizar o experimento de otimização. Para tal, utilizaram-se testes *t* pareados, assumindo como hipótese de nulidade ( $H_0$ ) diferença zero entre as respostas dos diferentes fluxos de alimentação. Esta análise estatística foi realizada com auxílio do software Microsoft Office Excel, versão 2003.

Foram obtidas também, isotermas de sorção de cada condição de fluxo de alimentação avaliada, a fim de se analisar o comportamento dos pós, para futura aplicação em sistemas-modelo alimentícios. Regressões não lineares foram usadas para determinar os parâmetros dos modelos, baseadas em modelos matemáticos pré-definidos (Silva *et al.*, 2004).

### 2.2.1.2. Experimento de otimização

A otimização do microencapsulamento de antocianinas de jabuticaba foi realizada por meio de metodologia de superfície de resposta. Foi utilizado um planejamento composto central com dois fatores e cinco níveis de cada fator, constituindo um total de 11 experimentos casualizados, sendo quatro fatoriais (combinação dos níveis -1 e +1), quatro axiais (uma variável no nível  $\pm \alpha$  e a outra no nível zero) e três repetições no ponto central (duas variáveis no nível zero) (Teófilo & Ferreira, 2006).

As variáveis independentes foram fluxo de alimentação e temperatura de entrada do ar de secagem, e seus níveis estão apresentados na Tabela 1. As respostas obtidas foram temperatura de saída do ar (TS), teor de antocianinas (TAC), retenção de antocianinas nos pós (RA), teor de umidade (U), sólidos totais (ST), higroscopicidade (H), variação global de cor ( $\Delta E$ ) e atividade antioxidante (AA).

Tabela 1 – Planejamento composto central para as variáveis temperatura de entrada e fluxo de alimentação

Ensaio	Níveis codificados		Níveis decodificados	
	$X_1$	$X_2$	Temp. entrada (°C)	Fluxo de alimentação (mL.h <sup>-1</sup> )
3	+1	-1	175	342
9 (C)	0	0	162	378
2	-1	+1	150	414
10 (C)	0	0	162	378
6	+ $\alpha$	0	180	378
7	0	- $\alpha$	162	324
4	+1	+1	175	414
11 (C)	0	0	162	378
8	0	+ $\alpha$	162	432
1	-1	-1	150	342
5	- $\alpha$	0	144	378

$\alpha = \pm 1,414$  para duas variáveis independentes (Teófilo & Ferreira, 2006).

$X_1$  = variável temperatura de entrada (°C);  $X_2$  = variável fluxo de alimentação (mL.h<sup>-1</sup>).

Os dados obtidos foram ajustados a equações polinomiais de segunda ordem. A função de respostas ( $Y$ ) foi dividida nos componentes linear, quadrático e de interação, conforme a Equação 1,

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j} \sum_j \beta_{ij} X_i X_j + e \quad (\text{Eq. 1})$$

em que:  $\beta_0$  é o coeficiente constante (intercepto),  $\beta_i$  é o coeficiente linear,  $\beta_{ii}$  o coeficiente quadrático,  $\beta_{ij}$  o coeficiente de interação,  $X_i$  são os níveis das variáveis independentes,  $k$  o número de variáveis (2) e  $e$  o erro experimental.

Os coeficientes de regressão foram obtidos por meio de regressão linear múltipla (MLR). Os coeficientes do modelo foram avaliados estatisticamente quanto a sua significância e interpretados de acordo com sua importância no sistema.

A análise de variância (ANOVA) e os valores de  $R^2$  foram usados para validar os modelos e verificar se os mesmos estavam adequados. Os gráficos de superfície de resposta foram obtidos usando os valores preditos dos modelos ajustados.

### **2.2.2. Preparo dos extratos concentrados de jabuticaba**

Para os experimentos de otimização, cerca de 20 g de cascas desidratadas de jabuticaba da safra 2009 foram pesadas, trituradas e colocadas em maceração com etanol 70% acidificado a pH 2,0 com HCl concentrado. A extração dos pigmentos foi realizada durante 24 h, à temperatura de refrigeração ( $8 \pm 2$  °C). Após a extração, o extrato foi filtrado e levado a um evaporador rotatório para concentração a vácuo, em temperatura máxima de 40°C, com objetivo de se retirar o etanol do sistema.

Foram realizadas dez bateladas de extrações para produção dos extratos concentrados, a fim de que se obtivesse o volume de extrato necessário à realização do experimento. Ao final da produção dos extratos concentrados, os mesmos foram combinados e armazenados em recipiente único em refrigeração até a realização da secagem.

Para os experimentos de triagem, foram utilizadas cascas desidratadas de jabuticaba da safra de 2006, e o respectivo extrato concentrado foi preparado conforme descrito anteriormente, em quantidade suficiente para a obtenção de adequada massa de pó para a realização das análises.

### **2.2.3. Preparo das microcápsulas**

Os extratos concentrados obtidos em 2.2.2. foram adicionados de soluções 30% de maltodextrina 10 DE (MOR-REX<sup>®</sup> 1910, Corn Products Brasil), previamente preparadas, na proporção de uma parte de extrato concentrado para três partes das soluções de maltodextrina (v/v). As misturas resultantes foram mantidas a 30 °C e submetidas à secagem em *spray dryer*.

Os pós foram obtidos utilizando um mini *spray dryer* da marca Buchi, modelo B-191 (Flawil, Switzerland), com fluxo de ar operando em contracorrente. As temperaturas de entrada e os fluxos de alimentação variaram conforme a Tabela 1, para os experimentos de otimização. Para o experimento de triagem, seguiu esquema descrito em 2.2.1.1. As temperaturas de saída variaram em função das temperaturas de entrada. O equipamento operou em todos os experimentos com vácuo de 20 mBar e aspiração de 28 m<sup>3</sup>.h<sup>-1</sup>.

Os pós obtidos foram acondicionados em embalagens de polietileno contendo camada laminada, e as respectivas embalagens armazenadas em dessecadores até o momento da realização das análises.

## **2.2.4. Análises quantitativas**

### **2.2.4.1. Teor de antocianinas e retenção percentual**

As antocianinas totais do extrato concentrado e dos pós produzidos foram quantificadas pelo método espectrofotométrico proposto por Francis (1982). O teor total de antocianinas foi determinado com auxílio de um espectrofotômetro Shimadzu, modelo 1601PC (Kyoto, Japan), utilizando-se o coeficiente de absorvidade molar de 98,2, que se refere à absorção a 535 nm de uma mistura de antocianinas de *cranberry* em etanol acidificado, medida em cubeta de 1 cm, na concentração de 1% (m/v). Os teores foram calculados em base seca.

O preparo das amostras em pó para a determinação de antocianinas envolveu pesagem de cerca de 0,5 g de pó e diluição em 8,0 mL de água acidificada. Após a total solubilização dos pós, alíquotas foram diluídas de forma conveniente para a análise, e transferidas para balões contendo solução de Etanol:HCl 1,5 M (85:15, v/v). Estas últimas, por sua vez, foram centrifugadas com auxílio de centrífuga Eppendorf, modelo 5804R (Hamburg, Germany), a 25 °C, durante 10 minutos, à força centrífuga relativa de 4868 g, antes da leitura espectrofotométrica.

Para o cálculo da retenção de antocianinas em cada condição de atomização, o conteúdo total de antocianinas do extrato antes de atomizar foi determinado em

mg.100 g<sup>-1</sup> de matéria seca e este foi comparado com os teores de antocianinas obtidos em cada condição de atomização, de acordo com Tonon *et al.* (2008).

#### **2.2.4.2. Teor de umidade, sólidos totais e sólidos solúveis**

As análises de umidade foram conduzidas conforme as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985), em estufa a 70 °C, vácuo ≤ 100 mm Hg, por 6 horas, no extrato antes de ser desidratado e nos pós produzidos. O teor de sólidos totais foi obtido por diferença. O teor de sólidos solúveis (° Brix) foi obtido para os extratos antes de atomizar, pela leitura direta em refratômetro marca Leica, modelo AR 200 (New York, USA).

#### **2.2.4.3. Higroscopicidade**

A higroscopicidade das amostras em pó foi determinada com base em Cai & Corke (2000) e Tonon *et al.* (2008). Amostras de cada pó foram acondicionadas em dessecadores à temperatura ambiente contendo soluções saturadas de NaCl (75% de umidade relativa, A<sub>w</sub> = 0,75). Após uma semana, as amostras foram pesadas e a higroscopicidade foi expressa como gramas de umidade absorvida por 100 g de sólidos secos.

#### **2.2.4.4. Análise de reconstituição da cor**

As análises foram realizadas 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 D<sub>65</sub> e ângulo de observação de 10°, utilizando-se colorímetro Hunter Lab, modelo Colorquest XE (Reston, USA).

A perda da cor resultante do processo de secagem foi calculada mediante a Equação 2,

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

onde  $\Delta E$  é a diferença global de cor,  $\Delta L$  é a variação da coordenada L\*,  $\Delta a$  é a variação da coordenada a\* e  $\Delta b$  é a variação da coordenada b\*.

Para essa medida, foram coletadas amostras do extrato antes de atomizar, cuja leitura foi realizada em duplicata. Após a secagem, e em função do teor de sólidos solúveis do extrato, os pós foram reconstituídos com água para a condição inicial de

entrada no *spray dryer* e, desta forma, foram obtidas as leituras correspondentes de  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ .

#### **2.2.4.5. Atividade antioxidante**

A atividade anti-radical livre foi realizada para os extratos e para os pós produzidos, utilizando-se o método de ensaio do radical ABTS. Para a formação do radical  $ABTS^{++}$ , a solução aquosa de ABTS 7 mM foi adicionada à solução de persulfato de potássio 2,45 mM. Esta mistura foi mantida no escuro à temperatura ambiente por 16 horas. Após este tempo a absorbância foi corrigida para 0,70 ( $\pm 0,02$ ) a 734 nm com adição de etanol 80% (Re *et al.*, 1999) em espectrofotômetro. 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. Foi utilizado o Trolox como padrão e os resultados foram expressos em equivalente de Trolox ( $\mu M$  Trolox  $g^{-1}$ ).

O preparo das amostras em pó antes da análise seguiu procedimento descrito em 2.2.4.1.

#### **2.2.5. Microscopia eletrônica de varredura**

O tamanho e a morfologia das microcápsulas foram avaliados por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de acordo com metodologia modificada descrita por Shu *et al.* (2006). Pequenas quantidades de amostra foram colocadas na superfície de fitas dupla face, fixadas em *stubs*. Em seguida, foram recobertas com fina camada de ouro sob vácuo, com o auxílio de um metalizador marca Balzers, modelo FDU-010. Para observação, foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura marca LEO, modelo 1430 VP (Cambridge, UK). As amostras foram observadas sistematicamente a 1000, 3000, 5000, 7000 e 10000 vezes de magnificação. As análises foram conduzidas no Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV.

Para a análise de MEV, foram selecionadas as amostras dos experimentos de triagem (fluxos de alimentação de 180  $mL.h^{-1}$ , 360  $mL.h^{-1}$  e 540  $mL.h^{-1}$ ), para verificar se houve efeito do fluxo de alimentação no tamanho e morfologia das partículas. Foram, também, selecionadas amostras provenientes do experimento de otimização, tendo fluxo de alimentação fixo de 378  $mL.h^{-1}$ , nas temperaturas de 144, 162 e 180 °C (experimentos 5, 10 e 6, respectivamente – Tabela 1), com objetivo de se verificar a influência da temperatura na morfologia e tamanho das partículas.

### 2.2.6. Isotermas de sorção

Os pós produzidos no experimento de triagem, nos diferentes fluxos de alimentação, foram submetidos a diferentes condições de armazenamento (umidade relativa e atividade de água), para que fossem determinadas suas isotermas de sorção, em duplicata. Previamente à análise, os pós foram secos em estufa a 70 °C, com vácuo  $\leq 100$  mm Hg, durante 24 horas.

Para a determinação das isotermas, utilizou-se o método estático dos dessecadores, que consiste na exposição de pequenas amostras do produto a várias atmosferas de umidade relativa constante, geradas por soluções saturadas, com base em Costa *et al.* (2003). Os dessecadores foram preparados conforme o esquema mostrado na Tabela 2. Após atingir o equilíbrio, os teores de umidade de equilíbrio dos pós foram determinados gravimetricamente. Os dessecadores foram armazenados a temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C).

Tabela 2 – Sais utilizados nas isotermas e respectivas atividades de água das soluções saturadas

Dessecador n°	Sal	Atividade de água*
1	LiCl.H <sub>2</sub> O	0,11
2	MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,33
3	Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,53
4	NaCl	0,75
5	KCl	0,85
6	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,97

\*Atingidas quando em soluções saturadas dos respectivos sais

Na modelagem das isotermas, os dados obtidos foram ajustados aos modelos matemáticos tri-paramétricos de GAB (Guggenheim-Anderson-de Boer) e de BET (Brunauer-Emmett-Teller) modificado (Equações 3 e 4, respectivamente), que são modelos de ampla aplicação em amostras alimentícias (Costa *et al.*, 2003; Stencl, 2004; Medeiros *et al.*, 2006; Goula *et al.*, 2008; Tonon *et al.*, 2009).

$$X_e = \frac{X_M C_{GAB} K_{GAB} A_W}{(1 - K_{GAB} A_W)(1 - K_{GAB} A_W + C_{GAB} K_{GAB} A_W)} \quad \text{Eq. 3}$$

$$X_e = \frac{X_M C_{BET} A_W [1 - (n+1)A_W^n + n(A_W)^{n+1}]}{(1 - A_W)[1 + (C_{BET} - 1)A_W - C_{BET}(A_W)^{n+1}]} \quad \text{Eq. 4}$$

em que:  $X_e$ : teor de umidade de equilíbrio ( $\text{g.g}^{-1}$ );  $C_{GAB}$ ,  $K_{GAB}$ : constantes da equação de GAB;  $C_{BET}$ : constante da equação de BET;  $X_M$ : teor de umidade da monocamada ( $\text{g.g}^{-1}$ );  $A_w$ : atividade de água;  $n$ : número de camadas adsorvidas.

### **3. Resultados e Discussão**

#### **3.1. Caracterização dos extratos antes da secagem**

##### **3.1.1. Experimento de triagem**

O extrato adicionado da solução de maltodextrina, imediatamente antes da secagem, apresentou 27,23 mg.100 g<sup>-1</sup> de antocianinas totais, 81,68% de umidade, 18,32% de sólidos totais e 20 °Brix.

##### **3.1.2. Experimento de otimização**

O extrato adicionado da solução de maltodextrina, imediatamente antes da secagem, apresentou 57,19 mg.100 g<sup>-1</sup> de antocianinas totais, 81,53% de umidade, 18,47% de sólidos totais e 18° Brix. Como caracterização colorimétrica, obteve-se  $L^*=31,99$ ,  $a^*=21,39$  e  $b^*=7,51$ . A atividade anti-radical foi de 14,28 mM de equivalente Trolox.

Observou-se grande redução nos teores de antocianinas das cascas de jaboticaba da safra de 2006 (experimento de triagem) para as da safra de 2009 (experimento de otimização). Apesar de desidratadas e armazenadas sob congelamento, observou-se degradação acentuada dos pigmentos (aproximadamente 50%) com o tempo, talvez por ação de enzimas ainda ativas nas cascas da safra de 2006, que degradam as antocianinas e compostos fenólicos, como as polifenoloxidasas, por exemplo.

#### **3.2. Análises dos pós no experimento de triagem**

O efeito dos diferentes fluxos de alimentação (180, 360 e 540 mL.h<sup>-1</sup>), à temperatura constante de 180 °C foi avaliado, no microencapsulamento de extratos de cascas de jaboticaba. As respostas obtidas dos diferentes experimentos estão mostradas na Tabela 3.

Tabela 3 – Temperatura de saída, umidade, retenção de antocianinas e higroscopicidade de pós encapsulados em diferentes fluxos de alimentação

Respostas	Fluxos de alimentação		
	180 mL.h <sup>-1</sup>	360 mL.h <sup>-1</sup>	540 mL.h <sup>-1</sup>
Temperatura de saída (°C)	92	75	58
Umidade (%)	2,76 ± 0,42	4,49 ± 0,02	5,09 ± 0,61
Retenção de antocianinas (%)	73,25 ± 2,00	79,85 ± 0,18	74,79 ± 2,73
Higroscopicidade (mg H <sub>2</sub> O.100g <sup>-1</sup> )	13,64 ± 0,65	10,46 ± 0,43	4,97 ± 0,12

Pela Tabela 3, notou-se que no fluxo mais baixo (180 mL.h<sup>-1</sup>), a temperatura de saída do compartimento onde ficam os pós secos foi elevada. Esta condição poderia levar a uma degradação dos pigmentos. Observou-se que à temperatura de saída intermediária de 75 °C, a retenção do pigmento foi a mais elevada. Para a umidade, notou-se que as amostras mais úmidas foram aquelas com fluxo de alimentação mais elevado, e o inverso também ocorreu, quando se atomizou o extrato a 180 mL.h<sup>-1</sup>, obtendo-se baixo teor de umidade. Verificou-se, também, a relação contrária entre umidade e higroscopicidade, ou seja, quanto mais secas as amostras, maior tendência em se absorver umidade do ambiente.

A Tabela 4 apresenta as comparações pareadas das respostas dos experimentos em diferentes fluxos de alimentação, pelo teste *t*.

Tabela 4 – Comparação de médias dos fluxos de alimentação de 180, 360 e 540 mL.h<sup>-1</sup>, em relação ao teor de umidade, retenção de antocianinas e higroscopicidade

	Umidade					
	180 mL.h <sup>-1</sup>	360 mL.h <sup>-1</sup>	180 mL.h <sup>-1</sup>	540 mL.h <sup>-1</sup>	360 mL.h <sup>-1</sup>	540 mL.h <sup>-1</sup>
<b>Média</b>	2,76	4,49*	2,76	5,09*	4,49	5,09
<b>Variância</b>	0,18	0,00	0,18	0,37	0,00	0,37
<b><i>t</i></b>	-5,77	-	-4,44	-	-1,38	-
<b><i>p</i></b>	0,0143	-	0,0235	-	0,1504	-
	Retenção de antocianinas					
	180 mL.h <sup>-1</sup>	360 mL.h <sup>-1</sup>	180 mL.h <sup>-1</sup>	540 mL.h <sup>-1</sup>	360 mL.h <sup>-1</sup>	540 mL.h <sup>-1</sup>
<b>Média</b>	73,25	79,85*	73,25	74,79	79,85*	74,79
<b>Variância</b>	4,00	0,03	4,00	7,47	0,03	7,47
<b><i>t</i></b>	-4,64	-	-0,64	-	2,62	-
<b><i>p</i></b>	0,0216	-	0,2935	-	0,0600	-
	Higroscopicidade					
	180 mL.h <sup>-1</sup>	360 mL.h <sup>-1</sup>	180 mL.h <sup>-1</sup>	540 mL.h <sup>-1</sup>	360 mL.h <sup>-1</sup>	540 mL.h <sup>-1</sup>
<b>Média</b>	13,64*	10,76	13,24*	5,05	10,76*	5,05
<b>Variância</b>	0,42	0,18	0,42	0,01	0,18	0,01
<b><i>t</i></b>	5,24	-	18,39	-	18,39	-
<b><i>p</i></b>	0,0172	-	0,0015	-	0,0015	-

\* Significativamente maior a  $p < 0,07$ .

Pela análise da Tabela 4, observou-se que as médias dos teores de umidade entre os fluxos de alimentação de 360 mL.h<sup>-1</sup> e 540 mL.h<sup>-1</sup> não diferiram

estatisticamente ( $p > 0,07$ ). Para a retenção de antocianinas, verificou-se que entre os fluxos de  $180 \text{ mL.h}^{-1}$  e  $360 \text{ mL.h}^{-1}$  houve diferença estatística ( $p < 0,07$ ), indicando que a maior retenção foi obtida quando se utilizou a alimentação de  $360 \text{ mL.h}^{-1}$ , dada pela diferença positiva entre as médias. De maneira análoga, foi detectada diferença estatística para a retenção entre os fluxos de  $360 \text{ mL.h}^{-1}$  e  $540 \text{ mL.h}^{-1}$  ( $p < 0,07$ ). Para a higroscopicidade, os valores obtidos foram muito distintos (Tabela 3), apresentando diferença estatística entre todas as médias testadas ( $p < 0,07$ ).

Pela análise conjunta das Tabelas 3 e 4, e pelo comportamento das amostras durante a secagem em *spray dryer*, optou-se por realizar o estudo de otimização na região do fluxo de alimentação de  $360 \text{ mL.h}^{-1}$ . Esta escolha se deu devido aos seguintes resultados: (i) maior valor de retenção de antocianinas (79,85%) ter sido encontrado nesta condição experimental; (ii) os pós obtidos nesta condição apresentaram teores intermediários de umidade e de higroscopicidade e (iii) a temperatura de saída não foi tão elevada como a observada no menor fluxo ( $180 \text{ mL.h}^{-1}$ ). Verificou-se que no fluxo de  $540 \text{ mL.h}^{-1}$  o extrato passou mais rápido pela câmara de secagem e, conseqüentemente, trocou menos calor durante o processo, gerando pós com umidade mais elevada, fato observado por Tonon *et al.* (2008), quando trabalhou com maiores fluxos de alimentação no encapsulamento de suco de açaí. No presente estudo, ao final do processo, a câmara de secagem ficou impregnada de amostra que não foi seca adequadamente. Além disso, no estudo de otimização ocorre uma variação simultânea dos fluxos de alimentação e das temperaturas de entrada. Com isso, supôs-se que algumas combinações de fluxos elevados e temperaturas baixas de secagem poderiam gotejar do bico atomizador para a câmara e não desidratar adequadamente.

### **3.3. Análises dos pós no experimento de otimização**

Os efeitos das variáveis fluxo de alimentação, temperatura de entrada e suas interações foram estudados para a otimização do microencapsulamento de extratos de jabuticaba. As respostas obtidas dos 11 ensaios, em ordem experimental randomizada, são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 – Respostas analisadas dos pós provenientes da secagem em *spray dryer* dos extratos de jabuticaba a partir dos experimentos realizados de acordo com a Tabela 1

Ensaio	TS (°C)	TAC (mg.100g <sup>-1</sup> )	RA (%)	U (%)	ST (%)	H (g.100g <sup>-1</sup> )	ΔE	AA (mM Trolox.g <sup>-1</sup> )
3	68	59,34	95,76	6,41	93,59	11,73	2,69	6,81
9 (C)	67	56,23	88,26	4,91	95,08	9,27	6,39	7,87
2	53	57,47	90,41	6,41	93,59	8,39	1,68	7,20
10 (C)	69	57,69	91,17	4,93	95,07	10,38	6,01	7,75
6	90	60,39	91,22	3,72	96,28	8,26	5,15	8,23
7	69	56,02	88,59	7,14	92,86	13,18	7,66	7,73
4	78	55,04	84,49	5,07	94,93	8,08	10,39	7,57
11 (C)	65	54,77	85,36	4,90	95,10	6,77	8,76	7,79
8	75	55,78	85,92	4,67	95,33	11,73	6,52	7,30
1	67	54,05	88,63	5,46	94,54	9,48	4,78	6,65
5	63	55,54	93,33	5,05	94,95	7,98	3,37	7,19

TS: temperatura de saída; TAC: teor de antocianinas; RA: retenção de antocianinas; U: teor de umidade; ST: teor de sólidos totais; H: higroscopicidade; ΔE: diferença global de cor; AA: atividade antioxidante.

A temperatura do ar de saída variou de acordo com a temperatura do ar de entrada, ou seja, geralmente, quanto maior a temperatura de entrada, maior a temperatura do ar de saída e do produto na saída.

Algumas variáveis dependentes do estudo são complementares a outras. A análise do teor de umidade é complementar à de sólidos totais. Por sua vez, a análise do teor de antocianinas apresentou comportamento similar em magnitude aos da análise da retenção de antocianinas. Portanto, por estes motivos, neste estudo, optou-se por discutir a retenção de antocianinas e o teor de umidade.

A Tabela 6 apresenta os coeficientes das equações polinomiais, calculados a partir da Tabela 1 e das respostas mostradas na Tabela 5.

De acordo com a Tabela 6, na retenção de antocianinas, observou-se efeito quadrático positivo da temperatura de entrada do ar, efeito linear negativo do fluxo e interação negativa entre a temperatura de entrada e o fluxo ( $p < 0,07$ ), indicando que a associação de temperaturas mais elevadas e menores fluxos proporcionam maior retenção dos pigmentos nos pós. De fato, a associação de menor fluxo de alimentação a temperaturas elevadas possibilita uma secagem quase instantânea do material, e, desta forma, os compostos bioativos seriam pouco afetados pelo curto tempo de exposição ao calor. Por outro lado, a associação de temperaturas baixas e fluxos maiores também promoveriam maior retenção de pigmentos, de acordo com o modelo encontrado (Tabela 6).

Tabela 6 – Coeficientes de regressão dos modelos polinomiais, erro-padrão e valores de  $p$  para os modelos construídos para retenção de antocianinas, teor de umidade, higroscopicidade, diferença global de cor e atividade antioxidante

	RA <sup>1</sup>				U <sup>2</sup>				H <sup>3</sup>				ΔE <sup>4</sup>				AA <sup>5</sup>			
	Coef.	Erro-padrão <sup>6</sup>	$t$	$p$	Coef.	Erro-padrão <sup>6</sup>	$t$	$p$	Coef.	Erro-padrão <sup>6</sup>	$t$	$p$	Coef.	Erro-padrão <sup>6</sup>	$t$	$p$	Coef.	Erro-padrão <sup>7</sup>	$t$	$p$
$\beta_0$	<b>88,23*</b>	1,21	73,16	0,0000	<b>4,89**</b>	0,41	11,89	0,0001	<b>9,73*</b>	1,02	9,56	0,0002	<b>7,07*</b>	0,92	7,69	0,0006	<b>7,81*</b>	0,03	234,48	0,0000
$\beta_1$ (TE)	-0,14	0,74	-0,19	0,8574	-0,28	0,25	-1,11	0,3160	0,81	0,62	1,30	0,2501	1,07	0,56	1,90	0,1156	<b>0,24*</b>	0,02	11,56	0,0074
$\beta_{11}$ (TE <sup>2</sup> )	<b>2,05*</b>	0,88	2,33	0,0672	-0,08	0,30	-0,26	0,8086	0,71	0,74	0,96	0,3811	<b>-1,57*</b>	0,67	-2,35	0,0655	<b>-0,19*</b>	0,02	-7,89	0,0157
$\beta_2$ (F)	<b>-1,72*</b>	0,74	-2,33	0,0669	<b>-0,50**</b>	0,25	-1,97	0,1062	-0,51	0,62	0,82	0,4504	0,43	0,56	0,76	0,4814	<b>0,09*</b>	0,02	4,35	0,0490
$\beta_{22}$ (F <sup>2</sup> )	-0,48	0,88	-0,54	0,6103	<b>0,67*</b>	0,30	2,24	0,0749	-0,94	0,74	1,26	0,2634	-0,18	0,67	-0,27	0,7979	<b>-0,28*</b>	0,02	-11,72	0,0072
$\beta_{12}$ (TE*F)	<b>-3,29*</b>	1,21	73,16	0,0000	-0,56	0,36	-1,56	0,1796	1,11	0,88	1,26	0,2628	<b>2,73*</b>	0,80	3,43	0,0186	0,06	0,03	2,21	0,1581
R <sup>2</sup>	0,82				0,73				0,60				0,81				0,48			

TE: temperatura de entrada (°C); F: fluxo de alimentação (mL.h<sup>-1</sup>); <sup>1</sup>RA: retenção de antocianinas (%); <sup>2</sup>U: teor de umidade (%); <sup>3</sup>H: higroscopicidade (g H<sub>2</sub>O.100 g<sup>-1</sup>); <sup>4</sup>ΔE: diferença global de cor; <sup>5</sup>AA: atividade antioxidante (mM Trolox.g<sup>-1</sup>); <sup>6</sup>Erro-padrão: soma quadrática dos resíduos; <sup>7</sup>Erro-padrão: erro puro; \*Significativo a  $p < 0,07$ ; \*\*Significativo a  $p < 0,11$ .

Tabela 7 – ANOVA das regressões obtidas para as respostas retenção de antocianinas e diferença global de cor

Fontes	RA <sup>1</sup>					ΔE <sup>2</sup>				
	SQ	GL	QM	F	$p$	SQ	GL	QM	F	$p$
Regressão	<b>95,28</b>	5	19,0556	4,11	0,0734*	<b>55,58</b>	5	11,1165	4,40	0,0647*
Resíduos	23,16	5	4,6329			12,62	5	2,5235		
Falta de ajuste	6,29	3	2,0955	0,25	0,8586	8,176	3	2,7254	1,23	0,4784
Erro-puro	16,88	2	8,4390			4,441	2	2,2206		
Total	118,4	10				68,2	10			

<sup>1</sup>RA: retenção de antocianinas (%); <sup>2</sup>ΔE: diferença global de cor; \*Significativo a  $p < 0,075$ .

No presente estudo, o uso de temperaturas baixas associado a fluxos de alimentação mais elevados não promoveu secagem adequada dos pós, impregnando a câmara de secagem de extrato e promovendo o gotejamento do extrato pelo bico atomizador. Portanto, a possível razão para a maior retenção de antocianinas nesta condição seria que, com a saída de um pó mais úmido, de certa forma, a matriz encapsulante ainda úmida protegeu as antocianinas da degradação. De acordo com Quek *et al.* (2007) e Tonon *et al.* (2008), pós produzidos a temperaturas mais baixas têm uma tendência de aglomeração, devido ao seu teor de umidade mais elevado. Esta aglomeração reduz a exposição do pó ao oxigênio, o que daria proteção ao pigmento contra a oxidação.

No teor de umidade (Tabela 6) observou-se que um aumento do fluxo de alimentação gera um aumento linear e quadrático da umidade do pó ( $p < 0,11$ ). Tonon *et al.* (2008), na avaliação das temperaturas de entrada e dos fluxos de alimentação no encapsulamento de antocianinas de açaí, verificaram que o teor de umidade dos pós foi influenciado negativamente pelo aumento da temperatura de entrada, ou seja, quanto maior a temperatura de entrada, maior o gradiente de temperatura formado entre o líquido e o ar de secagem, resultando em pós com menor teor de umidade. Este comportamento foi similar ao observado na Tabela 5 para esta resposta.

Na resposta higroscopicidade (Tabela 6) não se observou efeito significativo da temperatura de entrada e do fluxo de alimentação, dentro dos níveis estudados ( $p > 0,07$ ). É relatado que a maltodextrina é um agente carreador eficiente por ser um pó de baixa higroscopicidade (Tonon *et al.*, 2008). Em geral, quanto menor o teor de umidade dos pós, maior sua capacidade de absorver umidade do ambiente e, portanto, maior sua higroscopicidade (Goula *et al.*, 2004; Tonon *et al.*, 2008). Ao contrário dos resultados encontrados no presente estudo, Tonon *et al.* (2008) verificaram influência da temperatura de entrada e do fluxo de alimentação na higroscopicidade de pós provenientes de suco de açaí, indicando que quanto menor o fluxo de alimentação e maior a temperatura de entrada, maior a higroscopicidade do pó. No presente estudo, os fluxos de alimentação variaram em faixa estreita, de 324 a 432 mL.h<sup>-1</sup> ou de 18 a 24% da capacidade máxima de alimentação do equipamento (1800 mL.h<sup>-1</sup>), por limitações operacionais. Este pode ser um dos motivos pelos quais não se conseguiu um modelo adequado para esta resposta.

Para a diferença global de cor, observou-se efeito quadrático negativo da temperatura de entrada ( $p < 0,07$ ) e positivo de interação. Verifica-se, portanto, que um aumento ou diminuição demasiada na temperatura de entrada provoca queda quadrática na diferença global de cor, e, quanto menor a diferença global de cor, menor o efeito danoso do processamento sobre o pó.

Para a atividade antioxidante, verificou-se que as duas variáveis do estudo exerceram influência linear e quadrática nesta resposta ( $p < 0,07$ ). Observou-se que os pós continham elevada atividade anti-radical (Tabela 6), e que os diferentes níveis em estudo não afetaram em magnitude estes valores, que variaram pouco, de 6,65 a 8,23 mM Trolox.g<sup>-1</sup>. Silva *et al.* (2010) encontraram atividades anti-radical para pós de jabuticaba da ordem de 36,11 µM Trolox.g<sup>-1</sup>, utilizando como fonte um extrato rico em pigmentos antes da secagem na concentração de 8,0 °Brix. No presente estudo, foram obtidas concentrações equivalentes de Trolox mais elevadas nos pós, partindo-se de um extrato rico em pigmentos antes da secagem na concentração de 18 °Brix. Esta poderia ser a razão da diferença entre os dois estudos, além das diferentes condições de extração e concentração utilizadas.

Após análise dos coeficientes, os modelos foram analisados quanto a seu ajuste. A Tabela 7 mostra os resultados obtidos da análise de variância (ANOVA) das regressões para retenção de antocianinas e diferença global de cor.

Pela Tabela 7, observa-se que a falta de ajuste foi não significativa para a retenção de antocianinas e para a diferença global de cor, e as regressões foram significativas. Pode-se, portanto, afirmar que os modelos encontrados foram adequados para a predição destas variáveis-resposta. Os valores de  $R^2$  destas respostas ( $R^2=0,82$  para retenção de antocianinas e  $R^2=0,81$  para diferença global de cor) confirmam o ajuste.

Para a atividade antioxidante e para a higroscopicidade, pela análise de variância, verificou-se que, nas condições do presente estudo, não foi possível encontrar modelos adequados para descrever estas respostas, uma vez que a falta de ajuste foi significativa e a regressão foi não significativa (dados não mostrados). Além disso, os valores de  $R^2$  encontrados foram baixos ( $R^2=0,60$  para higroscopicidade e  $R^2=0,48$  para atividade antioxidante), o que mostra que os modelos não explicaram grande parte da variação dos dados.

A Figura 1 apresenta os valores estimados *versus* observados para o teor de umidade, bem como os valores observados experimentalmente *versus* os resíduos.

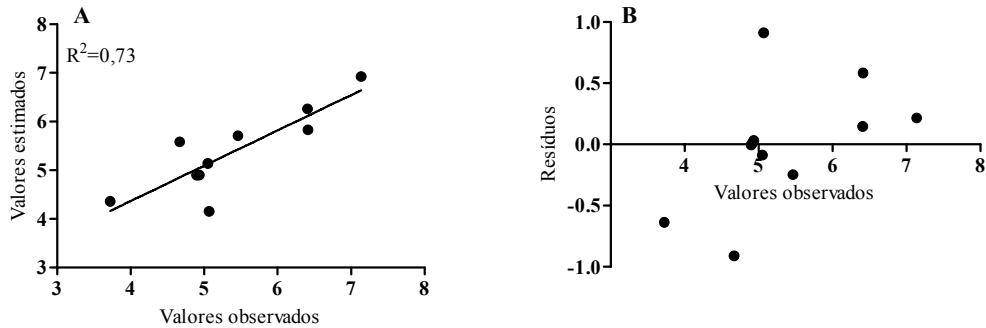


Figura 1 – Representação gráfica dos valores estimados *versus* observados (A) e dos valores observados *versus* resíduos (B) para a resposta teor de umidade (%).

Pela análise da Figura 1, verificou-se que o modelo encontrado foi capaz de prever o teor de umidade das amostras e que os resíduos estavam distribuídos de maneira aleatória. Desta forma, este seria um indicativo da qualidade satisfatória do modelo encontrado para a resposta teor de umidade.

A Figura 2 mostra as superfícies de resposta obtidas por meio dos valores preditos dos modelos ajustados, para as variáveis-resposta retenção de antocianinas e diferença global de cor.

Analisando as superfícies da Figura 2, verificou-se concordância entre a retenção de antocianinas e a diferença global de cor. Para a retenção de antocianinas, o desejável é que ela seja maximizada, e para a diferença global de cor, que seja minimizada, ou seja, que a cor dos pós apresentem maior semelhança com os extratos antes da secagem em *spray dryer*. Para se obter diferença de cor próxima a zero, deveriam ser utilizadas temperaturas próximas a 170 °C e fluxos de alimentação menores que 340 mL.h<sup>-1</sup>, ou temperaturas menores que 150 °C combinadas com fluxos de alimentação maiores que 360 mL.h<sup>-1</sup>. De forma análoga, pela Figura 2, verifica-se que, para a retenção de antocianinas ser maior que 95%, as mesmas condições de secagem (temperatura de entrada e fluxo de alimentação) devem ser atendidas.

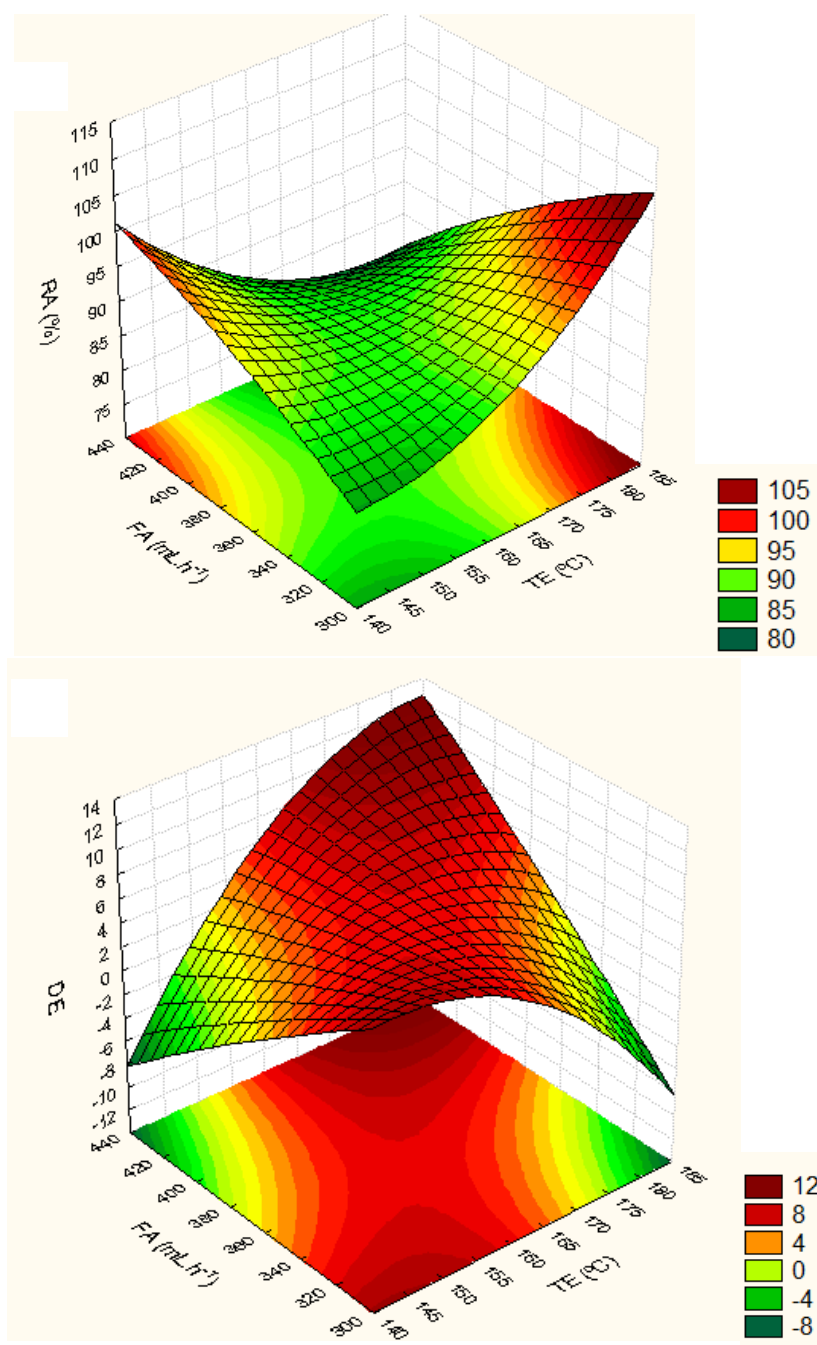


Figura 2 – Superfícies de resposta obtidas para as variáveis (A) retenção de antocianinas e (B) diferença global de cor, dos pós produzidos por *spray dryer* a diferentes temperaturas de entrada e fluxos de alimentação.

Observou-se, no presente estudo, que as retenções de antocianinas foram elevadas (acima de 84%) em todas as condições experimentais avaliadas. Moreira *et al.* (2010) trabalhando com extratos de acerola, encontraram retenção de antocianinas

acima de 95% usando temperatura de entrada de 170 °C. Ersus & Yurdagel (2007), no encapsulamento de antocianinas de cenoura preta, encontraram como melhor condição para retenção de antocianinas a utilização de maltodextrina 20 DE e temperatura de entrada de 160 °C, aliado a fluxo de alimentação de 382 mL.h<sup>-1</sup>, em concordância com os dados obtidos no presente estudo.

Apesar de o *spray dryer* utilizar elevadas temperaturas na secagem, a alta relação superfície/volume das gotículas do produto faz com que a secagem seja quase instantânea, e o fluxo de ar operando na câmara faz com que o tempo de residência das gotículas seja muito pequeno, da ordem de 1 a 2 segundos. Logo, o produto é removido da câmara de secagem antes que sua temperatura exceda 100 °C e, deste modo, a ocorrência de dano térmico é reduzida (Dziezak, 1988; Moreira *et al.*, 2010). Na literatura, alguns autores ressaltam o efeito danoso do aumento da temperatura de entrada nos teores e na retenção de antocianinas (Ersus & Yurdagel, 2007), de betalaínas (Cai & Corke, 2000) e de licopeno (Goula & Adamopoulos, 2005), demonstrando a susceptibilidade dos pigmentos naturais. No presente estudo, no entanto, o uso de elevadas temperaturas de entrada não provocou dano térmico às antocianinas, quando em combinação com fluxo de alimentação adequado. Neste caso, a matriz de polissacarídeo utilizada (maltodextrina) na proporção de 3:1 (encapsulante:núcleo) pode ter exercido efeito protetor aos pigmentos e às suas propriedades de cor. Ao contrário dos resultados encontrados neste estudo, Silva *et al.* (2010) observaram degradação das antocianinas de jabuticaba após a secagem em *spray dryer* utilizando maltodextrina como agente carreador e Quek *et al.* (2007) observaram degradação dos pigmentos de suco de melancia ao se elevar a temperatura de secagem. Andrade & Flores (2004), na otimização da secagem por *spray dryer* de extratos de rosele, encontraram como condições ideais para características de cor e umidade a temperatura de entrada de 178-190 °C, fluxo de alimentação de 9,5 a 15% (ou 171 a 270 mL.h<sup>-1</sup>) e pressão do atomizador de 5 a 6 bar. Silva *et al.* (2010), na formulação de corantes em pó de jabuticaba, verificaram que pós produzidos com maltodextrina foram aqueles com maior saturação de cor, parâmetro relacionado à sensação de “quantidade de cor”.

### 3.4. Microscopia eletrônica de varredura

#### 3.4.1. Experimento de triagem

A análise estrutural das partículas dos pós provenientes dos experimentos de triagem, em que se variou os fluxos de alimentação da solução para o *spray dryer*, na temperatura de secagem de 180 °C, foi realizada por meio de microscopia eletrônica de varredura. A Figura 3 mostra as fotomicrografias dos pós obtidos com o uso dos fluxos de alimentação de 180 mL.h<sup>-1</sup>, 360 mL.h<sup>-1</sup> e 540 mL.h<sup>-1</sup>.

Pela análise da Figura 3, pode-se observar a presença de micropartículas esféricas, porém com morfologia irregular. Em geral, observou-se tamanho médio das partículas como sendo menor que 10 µm, sugerindo-se que o processo encaixou-se na escala “micro”, caracterizando o microencapsulamento. Conforme relatado em Barros & Stringheta (2006), o processo de encapsulação é classificado como micro quando o diâmetro das partículas varia de 0,2 a 5000 µm.

Obón *et al.* (2009), em pós provenientes de pigmentos de frutos de *Opuntia stricta*, observaram na análise de MEV que quando se utilizou menores fluxos de alimentação no *spray dryer*, foram obtidos pós com maior pegajosidade (*stickiness*), o que não foi verificado no presente estudo (Figura 3), mesmo quando analisando as micrografias dos aumentos intermediários (não mostradas). Os autores afirmaram ainda que a obtenção de partículas de maior diâmetro com o uso de maiores fluxos de alimentação era esperada. Este fato não concordou com os dados do presente estudo, conforme pode ser observado na Figura 3, uma vez que não se observou grandes diferenças quanto a tamanho de partícula nos diferentes fluxos de alimentação.

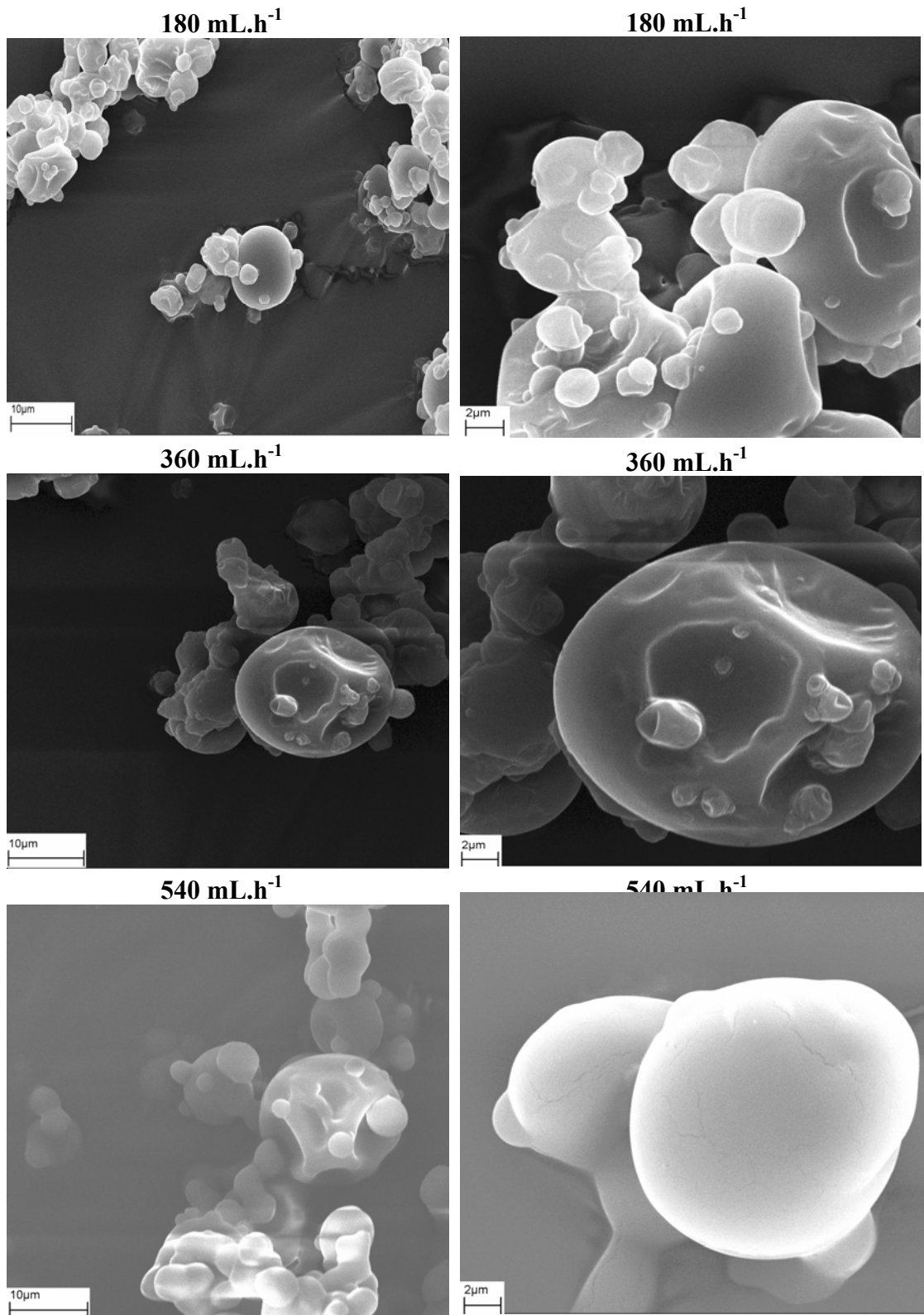


Figura 3 - Micrografias das partículas de pós provenientes de extrato de jaboticaba, submetidos à secagem em *spray dryer* em diferentes fluxos de alimentação, à temperatura de 180 °C. Magnificação de 3000 vezes (esquerda) e 7000 vezes (direita).

### 3.4.2. Experimento de otimização

A análise da superfície das partículas dos pós obtidos a partir do experimento de otimização da secagem em *spray dryer* foi realizada em caráter tridimensional pelo uso de microscopia eletrônica de varredura. A Figura 4 apresenta as fotomicrografias dos pós obtidos com as temperaturas de entrada de 144, 162 e 180 °C, com fluxo de alimentação de 378 mL.h<sup>-1</sup>. Os pós escolhidos foram aqueles provenientes dos experimentos em nível mínimo (-1), zero (0) e máximo (+1) da variável temperatura de entrada.

Pode-se observar, pela Figura 4, que as morfologias dos pós são semelhantes para as temperaturas de entrada de 162 e 180 °C, conforme se verifica no aumento de 7000 vezes. Com o uso da temperatura de 144 °C notou-se a formação de partículas mais heterogêneas. As partículas apresentaram geometria esférica irregular, com presença de algumas depressões na superfície. A formação destas depressões nas superfícies das partículas provenientes da secagem em *spray dryer* geralmente é atribuída à retração das partículas pela drástica perda de umidade seguida de resfriamento no processo (Saéñz *et al.*, 2009; Tonon, 2009). Percebeu-se também, forte aderência das partículas menores à superfície das partículas maiores, fato também observado por Cano-Chauca *et al.* (2005a).

Obón *et al.* (2009), ao analisar o efeito da temperatura no tamanho médio das partículas por MEV, verificaram que quanto maior a temperatura de entrada do ar de secagem, menor o tamanho de partícula. Estes autores, quando trabalharam a 160 °C, obtiveram partículas com diâmetro médio de 2-4 µm. No presente estudo, no entanto, pela observação da Figura 4, notou-se que a 160 °C algumas partículas apresentaram esta dimensão, porém ressaltando que a distribuição de tamanho não apresentou-se uniforme.

Tonon *et al.* (2008), ao analisar a microestrutura de pós oriundos de suco de açaí, observaram que o aumento das temperaturas de secagem permitiu a obtenção de maior número de cápsulas mais homogêneas, sem reentrâncias. De acordo com os autores, este fato está relacionado com diferenças na taxa de secagem, que é maior quanto maior for a temperatura de secagem, o que ocasiona evaporação mais rápida, levando à formação de uma crosta homogênea e mais firme. Ao contrário, o uso de baixas temperaturas de secagem levaria à formação de uma crosta mais flexível, que se retrai após o resfriamento.

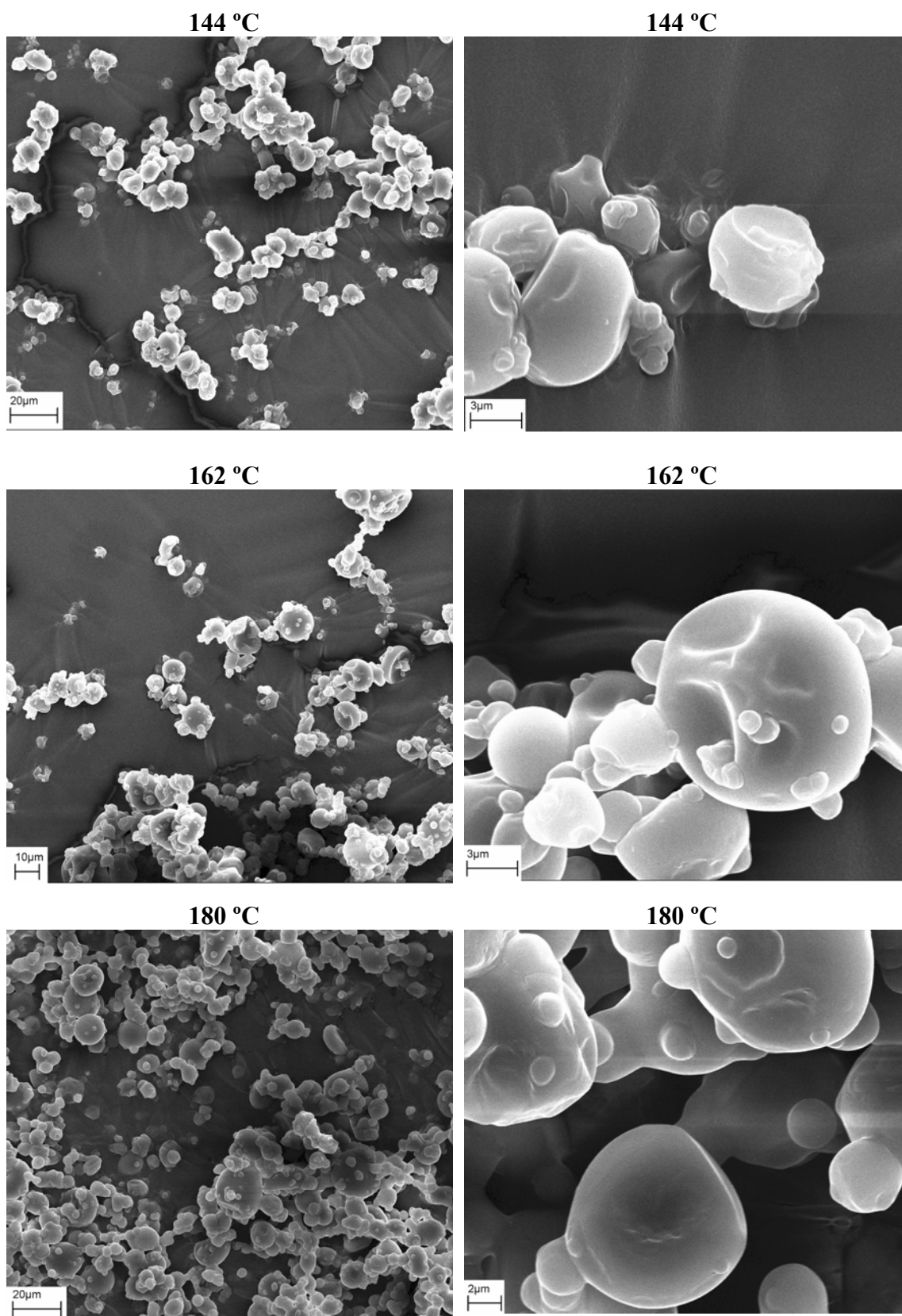


Figura 4 – Micrografias das partículas de pós provenientes de extrato de jaboticaba, submetidos a diferentes temperaturas de entrada de secagem em *spray dryer*. Magnificação de 1000 vezes (esquerda) e 7000 vezes (direita).

### 3.5. Isotermas de sorção

Foram obtidas isotermas de sorção das amostras obtidas para a condição de fluxo de alimentação de 180 mL.h<sup>-1</sup>, 360 mL.h<sup>-1</sup> e 540 mL.h<sup>-1</sup>, a 180 °C de temperatura de entrada do ar de secagem (experimentos de triagem). O interesse teórico e prático de se conhecer as isotermas de produtos desidratados é de estabelecer condições ideais de conservação, de transformação e do dimensionamento de equipamentos de secagem e transporte (Medeiros *et al.*, 2006).

Variados modelos matemáticos estão disponíveis na literatura para descrever as isotermas de sorção de produtos de várias naturezas. Dentre os modelos disponíveis, os de maior destaque e aplicação em alimentos são o de GAB e o de BET modificado (Tonon *et al.*, 2009). O modelo de GAB é considerado o mais versátil modelo de sorção disponível na literatura (Medeiros *et al.*, 2006).

A Tabela 8 mostra os valores dos parâmetros dos modelos de GAB e BET modificado, ajustados para as condições de atividade de água estudadas. A Figura 5 apresenta os gráficos com as isotermas de sorção traçadas para os pós obtidos em diferentes fluxos de alimentação. As isotermas foram traçadas utilizando-se os valores de atividade de água *versus* umidade relativa de equilíbrio.

Tabela 8 – Valores dos parâmetros para os modelos de GAB e BET modificado para descrever as isotermas dos pós obtidos com diferentes fluxos de alimentação

Fluxos de alimentação	GAB				BET modificado			
	$X_M$	$C_{GAB}$	$K_{GAB}$	$R^2$	$X_M$	$C_{BET}$	$n$	$R^2$
180 mL.h <sup>-1</sup>	0,039	11,593	0,969	97,60	9,757	0,001	11,625	93,35
360 mL.h <sup>-1</sup>	0,032	0,981	0,979	99,72	2,319	0,003	16,532	99,17
540 mL.h <sup>-1</sup>	0,021	18,843	0,993	97,90	0,021	23,579	95,764	97,91

Pela análise conjunta da Tabela 8 e da Figura 5, percebeu-se que a condição em que houve melhor ajuste entre os dados e os modelos matemáticos foi ao se utilizar o fluxo de alimentação de 360 mL.h<sup>-1</sup> (GAB:  $R^2 = 99,72$ ). O modelo mais adequado para descrever os dados foi o de GAB, pelos maiores valores de  $R^2$  em todas as condições. De forma semelhante, na determinação das isotermas de sorção de *Calendula officinalis*, Silva *et al.* (2004) recomendaram o uso dos modelos de GAB na temperatura de 30 °C. Medeiros *et al.* (2006), ao traçar isotermas de sorção de produtos de cacau e cupuaçu, verificaram que o modelo de GAB foi o que melhor

se ajustou para suas amostras. Já Tonon *et al.* (2009) recomendou ambas as equações para a modelagem de isothermas de suco de açaí em pó.

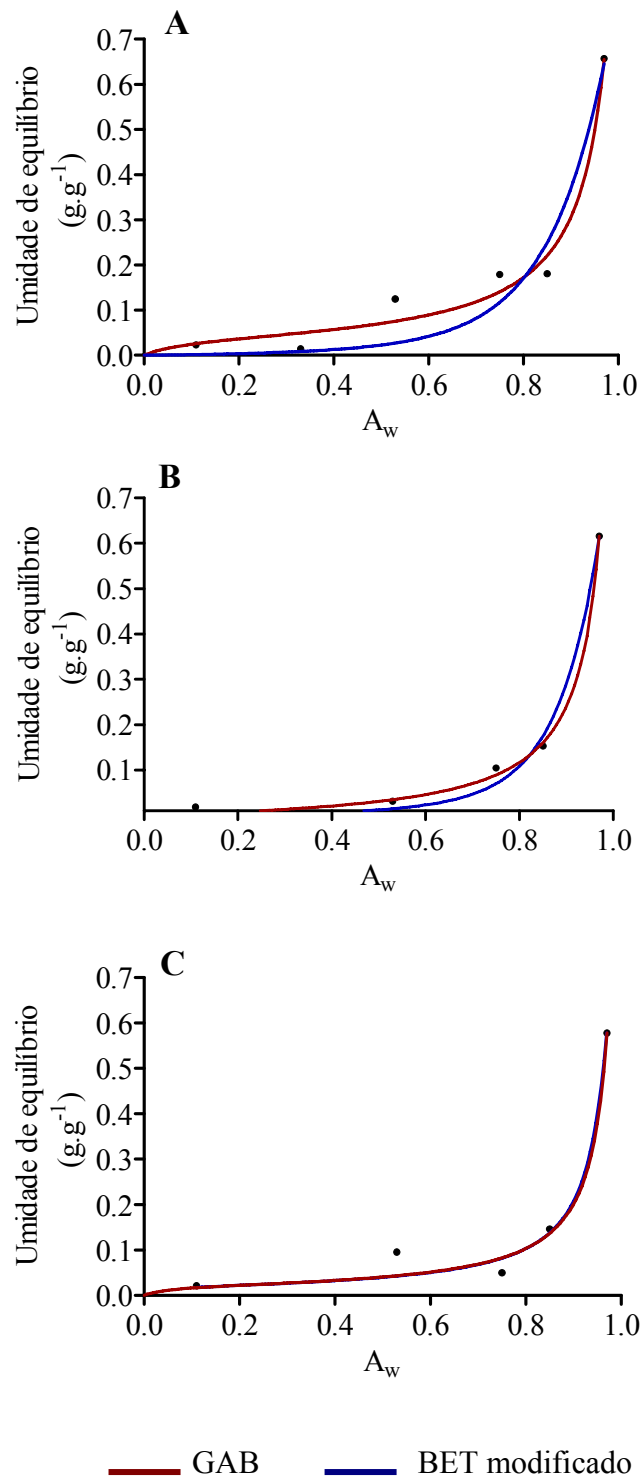


Figura 5 – Isothermas de sorção de umidade de pós de extrato de jaboticaba, obtidos por secagem em *spray dryer*, a diferentes fluxos de alimentação: (A) 180 mL.h<sup>-1</sup>; (B) 360 mL.h<sup>-1</sup>; (C) 540 mL.h<sup>-1</sup>.

O perfil de uma isoterma de sorção é característico da higroscopicidade do produto alimentício, e o comportamento de sorção do produto é dependente da temperatura. Geralmente produtos altamente higroscópicos exibem isotermas com aumentos repentinos da umidade relativa de equilíbrio. Ao contrário, produtos com higroscopicidade limitada exibem isotermas com traçados mais horizontais ao longo dos diferentes valores de atividade de água (Medeiros *et al.*, 2006). De acordo com Labuza (1968) e Tonon (2009), uma isoterma de sorção pode ser dividida em três regiões, dependendo do estado físico da água presente. A primeira região cobriria uma faixa de atividade de água entre zero e 0,35 e representaria a adsorção de um filme de água monomolecular. A segunda região compreenderia uma faixa entre 0,35 a 0,60 de atividade de água e representaria a adsorção das camadas adicionais de água acima da monocamada. Por fim, a terceira região, com atividade de água acima de 0,60, representaria a água condensada nos poros do material seguida pela dissolução de materiais solúveis presentes.

O valor de  $X_M$  (teor de umidade na monocamada) calculado pelos modelos de BET e GAB é de grande interesse, uma vez que indica a quantidade de água que está fortemente adsorvida aos sítios específicos na superfície do alimento, sendo considerado como o valor ótimo para assegurar sua estabilidade (Fennema, 1996; Goula *et al.*, 2008; Tonon *et al.*, 2009). Em valores abaixo de  $X_M$ , as reações de deterioração, exceto a oxidação de lipídios, são mínimas (Goula *et al.*, 2008). Pela Tabela 8, observou-se, para os modelos de GAB ajustados, que os valores de  $X_M$  variaram de 2,1 a 3,9%. Já para os modelos de BET ajustados, com os fluxos de alimentação de 180 mL.h<sup>-1</sup> e 360 mL.h<sup>-1</sup>, foram encontrados valores incorretos para  $X_M$  e, por este motivo, o modelo de BET modificado não foi adequado a estes dados. Tonon *et al.* (2009) encontraram valores para  $X_M$  de suco de açaí em pó pelo modelo de GAB variando de 3,2 a 6,3%.

De acordo com Medeiros *et al.* (2006), a constante  $C$  ( $C_{GAB}$  e  $C_{BET}$ ) mostra o formato característico da isoterma. Se  $C$  é menor que 10, a isoterma é do tipo III, caso contrário, é do tipo II, conforme a classificação de Brunauer *et al.* (1938), para os tipos de isoterma mais comuns em alimentos. No presente estudo, no modelo de GAB ajustado aos dados do fluxo de alimentação de 360 mL.h<sup>-1</sup>, verificou-se que a isoterma foi do tipo III. As demais, neste modelo, foram do tipo II. As isotermas do

tipo II são de forma sigmóide e as de tipo III em forma de “J”, características de alimentos contendo açúcares (Medeiros *et al.*, 2006).

#### 4. Conclusão

Combinações de vários níveis de temperatura de entrada e de fluxo de alimentação no microencapsulamento por *spray dryer* de antocianinas de jabuticaba foram investigadas neste estudo. Baseado em estudo prévio de triagem, decidiu-se trabalhar a otimização em torno do fluxo de alimentação de 360 mL.h<sup>-1</sup>, principalmente pela elevada retenção de antocianinas obtida.

A associação de temperaturas de entrada elevadas (acima de 170 °C) com fluxos de alimentação mais baixos (menores que 340 mL.h<sup>-1</sup>), ou a associação de temperaturas mais baixas (150 °C) com fluxos de alimentação mais elevados (maiores que 360 mL.h<sup>-1</sup>) possibilitaram uma maior retenção de antocianinas e menor diferença global de cor, em relação ao extrato original, antes de sofrer a secagem.

De forma geral, as retenções de antocianinas foram elevadas em todas as condições experimentais, indicando que, para esta resposta, as condições já estavam otimizadas. No entanto, para a higroscopicidade e para a atividade antioxidante, sugere-se a realização de novos estudos, visando encontrar modelos adequados para descrever estas respostas, modificando-se os níveis das variáveis empregadas.

Em relação às isotermas de sorção, o modelo de GAB foi o que melhor descreveu a adsorção de umidade de extratos de jabuticaba em pó produzidos em diferentes fluxos de alimentação.

Sugere-se a realização de mais estudos como este, já que são importantes para se analisar o comportamento dos pigmentos em pó produzidos por microencapsulamento por *spray dryer*, visto que estes produtos podem ter amplas possibilidades de aplicações, tanto como corantes em sistemas alimentícios, quanto como fitoterápicos, por sua ação antioxidante e atividade biológica pronunciada de seus pigmentos.

#### 5. Referências bibliográficas

Ahmed M, Akter MS, Lee J-C & Eun J-B (2010) Encapsulation by spray drying of bioactive components, physicochemical and morphological properties from purple sweet potato. *LWT - Food Science and Technology* **43**, 1307-1312.

- Andrade I & Flores H (2004) Optimization of spray drying of roselle extract (*Hibiscus sabdariffa* L.). In *14th International Drying Symposium*, pp. 597-604. São Paulo: Proceedings of the 14th International Drying Symposium.
- Bakowska-Barczak AM & Kolodziejczyk PP (*no prelo*) Black currant polyphenols: Their storage stability and microencapsulation. *Industrial Crops and Products* **In Press, Corrected Proof**. doi: 10.1016/j.physletb.2003.10.071
- Barros FARd & Stringheta PC (2006) Microencapsulamento de antocianinas - uma alternativa para o aumento de sua aplicabilidade como ingrediente alimentício. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento* **36**, 18-24d.
- Brunauer S, Emmett PH & Teller E (1938) Adsorption of gases in multimolecular layers. *Journal of the American Chemists' Society* **60**, 309-319.
- Cai YZ & Corke H (2000) Production and properties of spray-dried *Amaranthus* betacyanin pigments. *Journal of Food Science* **65**, 1248-1252.
- Cano-Chauca M, Stringheta PC, Ramos AM & Cal-Vidal J (2005) Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **5**, 420-428.
- Costa JMCd, Medeiros MFDd & Mata ALMd (2003) Isotermas de adsorção de pós de beterraba (*Beta vulgaris* L.), abóbora (*Cucurbita moschata*) e cenoura (*Daucus carota*) obtidos pelo processo de secagem em leito de jorro: estudo comparativo. *Revista Ciência Agronômica* **34**, 5-9.
- Dziezak JD (1988) Microencapsulation and encapsulated ingredients. *Food Technology* **42**, 136-151.
- Einbond LS, Reynertson KA, Luo XD, Basile MJ & Kennelly EJ (2004) Anthocyanin antioxidants from edible fruits. *Food Chemistry* **84**, 23-28.
- Ersus S & Yurdagel U (2007) Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* L.) by spray dryer. *Journal of Food Engineering* **80**, 805-812.
- Fennema OR (1996) Water and ice. In *Food Chemistry*, pp. 17-94 [OR Fennema, editor]. New York: Marcel Dekker.
- Francis FJ (1982) Analysis of anthocyanins in foods. In *Anthocyanins as Food Colors*, pp. 181-207 [P Markakis, editor]. New York: Academic Press.
- Goula AM & Adamopoulos KG (2005) Stability of lycopene during spray drying of tomato pulp. *Lebensmittel Weiss und Technology* **38**, 479-487.
- Goula AM, Adamopoulos KG & Kazakis NA (2004) Influence of spray drying conditions on tomato powders properties. *Drying Technology* **22**, 1129-1151.

- Goula AM, Karapantsios TD, Achilias DS & Adamopoulos KG (2008) Water sorption isotherms and glass transition temperature of spray dried tomato pulp. *Journal of Food Engineering* **85**, 73-83.
- Labuza TP (1968) Sorption phenomena in foods. *Food Technology* **22**, 263-272.
- Liyana-Pathirana C & Shahidi F (2005) Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chemistry* **93**, 47-56.
- Lutz IA (1985) *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz*, 3<sup>a</sup> ed. São Paulo.
- Medeiros ML, Bartolomeu Ayrosa AMI, de Moraes Pitombo RN & da Silva Lannes SC (2006) Sorption isotherms of cocoa and cupuassu products. *Journal of Food Engineering* **73**, 402-406.
- Moreira GÉG, De Azeredo HMC, De Medeiros MDEFD, De Brito ES & De Souza ACR (2010) Ascorbic acid and anthocyanin retention during spray drying of acerola pomace extract. *Journal of Food Processing and Preservation* **34**, 915-925.
- Obón JM, Castellar MR, Alacid M & Fernández-López JA (2009) Production of a red-purple food colorant from *Opuntia stricta* fruits by spray drying and its application in food model systems. *Journal of Food Engineering* **90**, 471-479.
- Quek SY, Chok NK & Swedlund P (2007) The physicochemical properties of spray-dried watermelon powder. *Chemical Engineering and Processing* **46**, 386-392.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M & Rice-Evans C (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* **26**, 1231-1237.
- Reynertson KA, Wallace AM, Adachi S, Gil RR, Yang H, Basile MJ, D'Armiento J, Weinstein IB & Kennelly EJ (2006) Bioactive depsides and anthocyanins from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*). *J Nat Prod* **69**, 1228-1230.
- Reynertson KA, Yang H, Jiang B, Basile MJ & Kennelly EJ (2008) Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. *Food Chemistry* **109**, 883-890.
- Saéñz C, Tapia S, Chávez J & Robert P (2009) Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chemistry* **114**, 616-622.
- Shu B, Yu W, Zhao Y & Liu X (2006) Study on microencapsulation of lycopene by spray-drying. *Journal of Food Engineering* **76**, 664-669.
- Silva Fd, Park KJ, Magalhães PM & Pozitano M (2004) Desorption isotherms of *Calendula officinalis* L. 14<sup>th</sup> International Drying Symposium, 1569-1576.

- Silva GJFd, Constant PBL, Figueiredo RWd & Moura SM (2010) Formulação e estabilidade de corantes de antocianinas extraídas das cascas de jaboticaba (*Myrciaria ssp.*). *Alimentos e Nutrição* **21**, 429-436.
- Silva PHAd, Faria FCd, Tonon B, Mota SJD & Pinto VT (2008) Avaliação da composição química de fermentados alcoólicos de jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*). *Química Nova* **31**, 595-600.
- Stencl J (2004) Modelling the water sorption isotherms of yoghurt powder spray. *Mathematics and Computers in Simulation* **65**, 157-164.
- Teófilo RF & Ferreira MMC (2006) Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. *Química Nova* **29**, 338-350.
- Tonon RV (2009) Secagem por atomização do suco de açaí: influência das variáveis de processo, qualidade e estabilidade do produto, Universidade Estadual de Campinas.
- Tonon RV, Baroni AF, Brabet C, Gibert O, Pallet D & Hubinger MD (2009) Water sorption and glass transition temperature of spray dried açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) juice. *Journal of Food Engineering* **94**, 215-221.
- Tonon RV, Brabet C & Rubinger MD (2008) Influence of process conditions on the physicochemical properties of açaí (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced by spray drying. *Journal of Food Engineering* **88**, 411-418.
- Tonon RV, Brabet C & Rubinger MD (2010) Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) juice produced with different carrier agents. *Food Research International* **43**, 907-914.

## ARTIGO N° 4

### OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS PARA O MICROENCAPSULAMENTO POR *SPRAY DRYER* DE EXTRATOS DE CASCAS DE JABUTICABA (*Myrciaria jaboticaba*) USANDO ANÁLISE SIMULTÂNEA DAS RESPOSTAS

#### 1. Introdução

As antocianinas são classificadas quimicamente como flavonóides e formam um grupo de pigmentos responsáveis por grande parte das cores vermelha a púrpura em flores, frutas, folhas, caules e raízes de plantas (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009). Uma das propriedades mais importantes destes pigmentos é sua atividade antioxidante, propriedade que desempenha um papel fundamental na prevenção de doenças cardiovasculares, neurológicas, de câncer e de diabetes, entre outras (Konczak & Zhang, 2004). O corante natural antocianina é comercialmente aplicado em doces, produtos de confeitaria, pós para refrescos e gelatinas. Para aplicação geral, é utilizado em alimentos de pH mais baixo, até pH 3,5, pela sua maior estabilidade em condições ácidas (Barros & Stringheta, 2006).

A jabuticaba é uma fonte rica em antocianinas que, embora largamente consumida pela população brasileira, é ainda pouco estudada. Os pigmentos encontram-se concentrados em sua casca, que é um resíduo desta fruta, com potencial de ser utilizado na produção industrial de corantes. A jabuticabeira (*Myrciaria cauliflora* e *Myrciaria jaboticaba* [Myrtaceae]) é um arbusto nativo do estado de Minas Gerais. Seus frutos têm coloração arroxeada quando maduros e as cascas são ricas em antocianinas (cianidina-3-glicosídeo) (Einbond *et al.*, 2004; Reynertson *et al.*, 2006), taninos, ácidos fenólicos (ácido elágico) e flavonóides (rutina e quercetina) (Einbond *et al.*, 2004; Reynertson *et al.*, 2006; Reynertson *et al.*, 2008).

Estudos com extratos de frutas tropicais vêm despertando interesse de pesquisadores pela diversidade e quantidade de compostos presentes, e pelo crescente interesse das indústrias na busca de extratos de fontes ricas em compostos bioativos, com comprovada ação antioxidante. A jabuticaba é uma fruta ainda pouco estudada quanto a seus aspectos fitoquímicos, quanto às formas de obtenção de seus compostos bioativos, principalmente de suas antocianinas, e quanto à aplicação

destas em sistemas alimentícios. Normalmente, extratos provenientes de frutas são aplicados tanto em forma líquida quanto na forma de pós microencapsulados.

A tecnologia de microencapsulamento por *spray dryer* é utilizada na indústria alimentícia com objetivo de promover proteção a ingredientes sensíveis à degradação pela ação da luz, do oxigênio e de radicais livres. Com esta técnica, os compostos bioativos são protegidos por um material de parede (Barros & Stringheta, 2006; Ahmed *et al.*, 2010; Bakowska-Barczak & Kolodziejczyk, *no prelo*).

Numerosos materiais de parede ou agentes encapsulantes estão disponíveis para uso em alimentos. O encapsulante ideal deve ter propriedades emulsificantes, ser capaz de formar filmes, ser biodegradável, resistente ao trato gastrointestinal, ter baixa viscosidade a elevados teores de sólidos, ser pouco higroscópico e de baixo custo (Constant, 1999; Barros & Stringheta, 2006). Entretanto, dificilmente um agente encapsulante apresentará de forma isolada todas as propriedades mencionadas. Desta forma, é comum empregar mistura de dois ou mais componentes (Constant, 1999; Barros & Stringheta, 2006; Silva *et al.*, 2010).

Goma arábica, amidos modificados e amidos hidrolisados são os agentes encapsulantes mais frequentemente empregados no *spray-drying* (Shahidi & Han, 1993; Constant, 1999). Dentre estes agentes, as maltodextrinas estão entre os mais comuns. São obtidas de amido de milho, via hidrólise ácida, e apresentam elevada solubilidade em água, baixa viscosidade mesmo em altas concentrações de sólidos, e formam soluções incolores (Bakowska-Barczak & Kolodziejczyk, *no prelo*). São muito utilizadas no encapsulamento de antocianinas e fenólicos, com graus de dextrose equivalente (DE) entre 10 e 20 (Ersus & Yurdagel, 2007; Tonon *et al.*, 2008; Ahmed *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2010; Tonon *et al.*, 2010). A goma arábica, além da cadeia de polissacarídeo, possui uma fração protéica, o que confere a ela certa ação emulsificante. É também empregada sozinha ou associada a outros encapsulantes na produção de pós provenientes de extratos de pigmentos (Barros & Stringheta, 2006; Pitalua *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2010). Um possível agente encapsulante para proteção de pigmentos é o Capsul<sup>®</sup>, amido modificado quimicamente pela incorporação de um componente lipofílico (succinato de octanil), o que promove boa retenção de voláteis e excelente estabilidade e capacidade de emulsão (Aburto *et al.*, 1998). O Capsul<sup>®</sup> foi utilizado para proteção de agentes sensíveis, com óleo essencial de laranja (Aburto *et al.*, 1998) e ácido ascórbico

(Finotelli & Rocha-Leão, 2005). Não foram encontrados relatos de seu uso como encapsulante de pigmentos.

Para realizar o microencapsulamento por *spray dryer*, alguns parâmetros precisam ser otimizados para se obter um pó com as características desejáveis. Porém, encontrar uma condição de compromisso entre as respostas (variáveis dependentes) que fornecem o pó desejável exige metodologias estatísticas que manipulam várias respostas simultaneamente. O objetivo é a obtenção do melhor equilíbrio entre as diversas respostas. Uma função que otimiza simultaneamente várias respostas é a função chamada desejabilidade (do inglês, *desirability*), proposta por Derringer & Suich (1980). A função de desejabilidade realiza a otimização simultânea de múltiplas respostas de um processo, sugerindo os níveis das variáveis independentes que fornecem as respostas desejáveis para o produto ou processo. Esta metodologia torna a análise experimental mais simples, convertendo um problema de otimização de múltiplas respostas em uma otimização como uma única resposta, de mais fácil interpretação (Derringer & Suich, 1980; Islam *et al.*, 2009).

A função de desejabilidade foi utilizada com sucesso em várias áreas, como na otimização da extração de compostos bioativos de frutos de *Gardenia jasminoides* (Yang *et al.*, 2009), na remoção de pesticidas de soluções aquosas e no tratamento de resíduos de cervejaria (Shi *et al.*, 2010), dentre outras aplicações.

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi otimizar o efeito de diferentes parâmetros de microencapsulamento visando a obtenção de pigmentos de jaboticaba em pó produzidos por *spray dryer*, com características desejáveis para todas as respostas investigadas. Para tal, foi estudado o efeito de diferentes agentes encapsulantes (maltodextrina, goma arábica e Capsul<sup>®</sup>) e de diferentes temperaturas de secagem, visando a obtenção de pós com elevada retenção de antocianinas, melhores características físico-químicas e menor perda de cor.

## **2. Material e métodos**

### **2.1. Material**

As jaboticabas (*Myrciaria jaboticaba*) foram coletadas no Campo Experimental da Fruticultura, na Universidade Federal de Viçosa, na safra de 2009. Estas foram despulpadas e as cascas foram submetidas à secagem em secador de

bandejas, a 65°C, por cerca de 8 horas. Após a secagem, as cascas foram armazenadas em freezer ( $-18 \pm 2$  °C) até o momento das análises.

## **2.2. Métodos**

### **2.2.1. Preparo dos extratos concentrados de jabuticaba**

Cerca de 20 g de cascas desidratadas de jabuticaba foram pesadas, trituradas e colocadas em maceração com etanol 70% acidificado a pH 2,0 com HCl concentrado. A extração dos pigmentos foi realizada durante 24 h, à temperatura de refrigeração ( $8 \pm 2$  °C). Após a extração, o extrato foi filtrado e levado a um evaporador rotatório para concentração a vácuo, em temperatura máxima de 40 °C, com objetivo de se retirar o etanol do sistema.

Foram realizadas cerca de quinze bateladas de extrações para produção dos extratos concentrados, a fim de que se obtivesse o volume de extrato necessário à realização do experimento. Ao final da produção dos extratos concentrados, os mesmos foram combinados e armazenados em recipiente único em refrigeração até a realização das análises.

### **2.2.2. Agentes carreadores**

Os agentes carreadores utilizados foram: maltodextrina 10 DE (Corn Products, Brasil), goma arábica (Vetec, Brasil) e amido modificado Capsul<sup>®</sup> (National Starch, USA).

Os agentes carreadores foram preparados em soluções na concentração final de 30% (m/v), antes da adição dos extratos de jabuticaba. Foram avaliados: (i) maltodextrina 30% (controle), (ii) mistura de goma arábica 25% com maltodextrina 5% e (iii) mistura de Capsul<sup>®</sup> 25% com maltodextrina 5%.

### **2.2.3. Preparo das microcápsulas**

Os extratos concentrados obtidos em 2.2.1. foram adicionados dos agentes carreadores preparados conforme 2.2.2, na proporção de uma parte de extrato concentrado para três partes das soluções carreadoras (v/v). As misturas resultantes foram homogeneizadas em agitador magnético, mantidas a 30 °C e submetidas à secagem em *spray dryer*.

Os pós foram obtidos utilizando um mini *spray dryer* da marca Buchi, modelo B-191 (Flawil, Switzerland), com fluxo de ar operando em contracorrente. As temperaturas de entrada (TE) avaliadas, para cada matriz encapsulante, foram de 140, 160 e 180 °C. As temperaturas de saída (TS) variaram em função das temperaturas de entrada. O equipamento operou em todos os experimentos com vácuo de 20 mBar e aspiração de 28 m<sup>3</sup>.h<sup>-1</sup>. O fluxo de alimentação dos extratos foi de 360 mL.h<sup>-1</sup>, equivalente a 20% da capacidade total de bombeamento do equipamento.

Os pós obtidos foram acondicionados em embalagens de polietileno contendo camada laminada, e as respectivas embalagens armazenadas em ambiente protegido da luz. Todos os experimentos foram realizados em duas repetições, totalizando 18 ensaios.

#### **2.2.4. Análises quantitativas**

##### **2.2.4.1. Teor de antocianinas e retenção percentual**

As antocianinas totais do extrato concentrado e dos pós produzidos foram quantificadas pelo método espectrofotométrico proposto por Francis (1982). O teor total de antocianinas foi determinado com auxílio de um espectrofotômetro Shimadzu, modelo 1601PC (Kyoto, Japan), utilizando-se o coeficiente de absorvidade molar de 98,2, que se refere à absorção a 535 nm de uma mistura de antocianinas de *cranberry* em etanol acidificado, medida em cubeta de 1 cm, na concentração de 1% (m/v). Os teores foram calculados em base seca.

O preparo das amostras em pó para a determinação de antocianinas envolveu pesagem de cerca de 0,5 g de pó e diluição em 8,0 mL de água acidificada. Após a total solubilização dos pós, alíquotas foram diluídas de forma conveniente para a análise, e transferidas para balões contendo solução de Etanol:HCl 1,5 mol.L<sup>-1</sup> (85:15, v/v). Estas últimas, por sua vez, foram centrifugadas com auxílio de centrífuga Eppendorf, modelo 5804R (Hamburg, Germany), a 25 °C, durante 10 minutos, à força centrífuga relativa de 4868 g, antes da leitura espectrofotométrica.

Para o cálculo da retenção de antocianinas (RA) em cada condição de atomização, o conteúdo total de antocianinas do extrato antes de atomizar foi determinado em mg.100 g<sup>-1</sup> de matéria seca e este foi comparado com os teores de antocianinas obtidos em cada pó produzido, de acordo com Tonon *et al.* (2008).

#### 2.2.4.2. Teor de umidade, sólidos totais e sólidos solúveis

As análises de umidade (U) foram conduzidas conforme as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985), em estufa a 70 °C, vácuo  $\leq 100$  mm Hg, por 6 horas, no extrato antes de ser desidratado e nos pós produzidos. O teor de sólidos totais (ST) foi obtido por diferença. O teor de sólidos solúveis totais (°Brix) foi obtido para os extratos antes de atomizar, pela leitura direta em refratômetro marca Leica, modelo AR 200 (New York, USA).

As respostas teor de umidade e sólidos totais são complementares. Portanto, nas análises estatísticas considerou-se apenas o teor de umidade das amostras.

#### 2.2.4.3. Higroscopicidade

A higroscopicidade (H) das amostras em pó foi determinada com base em Cai & Corke (2000) e Tonon *et al.* (2008), com modificações. Amostras de cada pó foram acondicionadas em dessecadores à temperatura ambiente contendo soluções saturadas de NaCl (75% de umidade relativa,  $A_w = 0,75$ ). Após uma semana, as amostras foram pesadas e a higroscopicidade foi expressa como gramas de umidade absorvida por 100 g de sólidos secos.

#### 2.2.4.4. Análise de reconstituição da cor

As análises foram realizadas 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 D<sub>65</sub> e ângulo de observação de 10°, utilizando-se colorímetro Hunter Lab, modelo Colorquest XE (Reston, USA).

A perda da cor resultante do processo de secagem foi calculada mediante a Equação 1,

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

em que  $\Delta E$  é a diferença global de cor,  $\Delta L$  é a variação da coordenada L\*,  $\Delta a$  é a variação da coordenada a\* e  $\Delta b$  é a variação da coordenada b\*.

Para essa medida, foram coletadas amostras do extrato antes da adição das matrizes, diluídos na razão 1/3 com água, cuja leitura foi realizada em duplicata. Após a secagem, e em função do teor de sólidos solúveis do extrato, os pós foram reconstituídos com água para a condição inicial de entrada no *spray dryer* e, desta forma, foram obtidas as leituras correspondentes de  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ .

#### **2.2.4.5. Atividade antioxidante**

A atividade anti-radical livre (AA) foi realizada para os extratos e para os pós produzidos, utilizando-se o método de ensaio do radical ABTS. Para a formação do radical  $ABTS^{•+}$ , a solução aquosa de ABTS 7 mM foi adicionada à solução de persulfato de potássio 2,45 mM. Esta mistura foi mantida no escuro à temperatura ambiente por 16 horas. Após este tempo a absorbância foi corrigida para 0,70 ( $\pm 0,02$ ) a 734 nm com adição de etanol 80% (Re *et al.*, 1999) em espectrofotômetro. 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. Foi utilizado o Trolox como padrão e os resultados foram expressos em equivalente de Trolox ( $\mu M$  Trolox. $g^{-1}$ ).

O preparo das amostras em pó antes da análise seguiu procedimento descrito em 2.2.4.1.

#### **2.2.5. Microscopia eletrônica de varredura**

O tamanho e a morfologia das microcápsulas produzidas com os diferentes agentes encapsulantes na temperatura de 180 °C foram avaliados por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de acordo com metodologia modificada descrita por Shu *et al.* (2006). Pequenas quantidades de amostra foram colocadas na superfície de fitas dupla face, fixadas em *stubs*. Em seguida, foram recobertas com fina camada de ouro sob vácuo, com o auxílio de um metalizador marca Balzers, modelo FDU-010. Para observação, foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura marca LEO, modelo 1430 VP (Cambridge, UK). As amostras foram observadas sistematicamente a 1000, 3000, 5000, 7000 e 10000 vezes de magnificação. As análises foram conduzidas no Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV.

### 2.2.6. Solubilidade do pó em sistema-modelo alimentício de bebida isotônica

Foram desenvolvidas em laboratório bebidas isotônicas adicionadas de aromatizante idêntico ao natural, no sabor morango. Como ingredientes, foram utilizados sacarose, monofostato de potássio e cloreto de sódio, e como conservante, sorbato de potássio.

Após o preparo da bebida isotônica, com a incorporação dos pigmentos de jabuticaba em pó, foram medidos o pH e a osmolalidade da mesma, esta última com auxílio de um crioscópio marca ITR, modelo MK 540 (Esteio, Brasil), com o objetivo de se verificar se a incorporação do pigmento em pó possibilitou a manutenção da característica “isotônica” da bebida. Para tal, foram medidos 2,5 mL de cada amostra de isotônico incorporado com o pigmento em pó e feita a leitura direta do abaixamento do ponto de congelamento. De posse dos valores de crioscopia em °C, a Equação 2 foi utilizada para o cálculo da concentração em  $mOsmol.kg^{-1}$ ,

$$mOsmol.kg^{-1} = \frac{\Delta T_c}{K_c} \times 1000 \quad \text{Eq. 2}$$

em que:

$\Delta T_c$  = Abaixamento do ponto de congelamento

$K_c$  = 1,86 °C/mol/Kg (constante crioscópica da água)

A solubilidade nos isotônicos preparados conforme item 2.2.6. foi realizada para os pós obtidos com os diferentes agentes carreadores na temperatura de entrada intermediária de 160 °C. A solubilidade foi determinada conforme o método de Eastman & Moore (1984) e Singh & Singh (2003), com algumas modificações. Em 100 mL de bebida isotônica, adicionou-se 1 g de cada pó, misturando-se a alta velocidade em um mixer, durante 5 minutos. A solução foi colocada em tubos e centrifugada a 1200g por 10 minutos. Uma alíquota de 25 mL do sobrenadante foi colocada em placas de Petri previamente pesadas e logo após foram secas em estufa a 105 °C, por 5 horas. Por diferença de peso foi calculada a solubilidade (%).

## 2.2.7. Análises estatísticas

### 2.2.7.1. Delineamento experimental

Neste estudo, foi utilizada uma ANOVA fatorial com duas variáveis (*two way*), três níveis para cada variável e em duplicata. Os cálculos foram feitos com auxílio do software Microsoft Office Excel, versão 2003 e do software Statística 7.0.

Para a realização dos cálculos e geração das superfícies, os diferentes níveis das variáveis foram codificados em números (1, 2 e 3). A Tabela 1 apresenta as variáveis e níveis estudados. As análises de desejabilidade foram feitas com auxílio do software Statística 7.0.

Tabela 1 – Variáveis e níveis estudados nas análises de desejabilidade

Variável	Níveis		
	1	2	3
Carreador	Maltodextrina 30% (MD)	Goma arábica 25% + Maltodextrina 5% (GA/MD)	Capsul <sup>®</sup> 25% + Maltodextrina 5% (CP/MD)
Temperatura	140 °C	160 °C	180 °C

### 2.2.7.2. Análise de otimização pela função de desejabilidade

A função de desejabilidade é uma técnica estatística útil para a determinação dos níveis das variáveis independentes que propiciam a otimização simultânea das variáveis-resposta (dependentes) do estudo, transformando-as em uma única medida (Derringer & Suich, 1980; Islam *et al.*, 2009).

O procedimento adotado para a função de desejabilidade envolveu duas etapas, que foram: (i) encontrar os níveis das variáveis independentes que simultaneamente produziram as respostas mais desejadas nas variáveis dependentes e (ii) obter, de posse das respostas mais desejadas de cada variável dependente, a desejabilidade global, considerando todas as variáveis dependentes.

Esta função transforma cada resposta estimada  $\hat{y}_i$ , calculada pelo ajuste do modelo associado à ANOVA fatorial, em um valor desejável  $d_i$ , usando as seguintes equações:

$$d_i = \begin{cases} 0 & \hat{y}_i \leq y_{i\min} \\ \left[ \frac{\hat{y}_i - y_{i\min}}{y_{i\max} - y_{i\min}} \right] & y_{i\min} < \hat{y}_i < y_{i\max} \\ 1 & \hat{y}_i \geq y_{i\max} \end{cases}, \quad \text{para } i = 1, 2, \dots, k \text{ (Eq. 3)}$$

em que os valores  $y_{i\min}$  e  $y_{i\max}$  são os valores mínimos e máximos aceitáveis de  $\hat{y}_i$ , respectivamente. Os valores de  $d_i$  variam no intervalo de  $0 \leq d_i \leq 1$ , aumentando quando a desejabilidade da correspondente resposta aumenta (maximização), ou diminuindo quando a desejabilidade da correspondente resposta aumenta (minimização). Em outras palavras, a minimização de  $\hat{y}_i$ , equivale à maximização de  $-\hat{y}_i$ .

As desejabilidades individuais são então combinadas usando a média geométrica (Equação 4) que fornece a desejabilidade global,  $D$ .

$$D = (d_1 \times d_2 \times \dots \times d_k)^{1/k} \quad (\text{Eq. 4})$$

O valor de  $D$  é uma resposta-compromisso, uma vez que seus valores contêm informações das respostas que se deseja minimizar e maximizar. A desejabilidade global é utilizada como resposta e a ANOVA fatorial é realizada sobre ela.

Neste trabalho, quatro respostas precisaram ser otimizadas para fornecer um pó com propriedades desejáveis. As respostas foram: (1) retenção de antocianinas, (2) diferença global de cor, (3) higroscopicidade e (4) umidade. Antes da otimização simultânea, modelos quadráticos foram ajustados aos dados de cada resposta do estudo.

Na otimização simultânea, foi definido para cada resposta, de acordo com as características desejáveis do pó, se a mesma deveria ser maximizada ou minimizada. De posse destas informações, de acordo com Islam *et al.* (2009) e Shi *et al.* (2010), considerou-se diferentes parâmetros para maximização e minimização. Usando a Equação 3, pôde-se chegar às seguintes condições:

- Maximização:
  - $d_i = 0$ , se a resposta é menor que o valor mínimo
  - $0 \leq d_i \leq 1$ , se a resposta varia entre o valor mínimo e máximo
  - $d_i = 1$ , se a resposta é maior que o valor máximo
- Minimização:
  - $d_i = 1$ , se a resposta é menor que o valor mínimo
  - $1 \leq d_i \leq 0$ , se a resposta varia entre o valor mínimo e máximo
  - $d_i = 0$ , se a resposta é maior que o valor máximo

Para este estudo, a resposta retenção de antocianinas foi maximizada, enquanto as demais foram minimizadas, já que o objetivo foi produzir pós com elevado teor de antocianinas, cor mais parecida com seu extrato original, com baixa umidade e baixa higroscopicidade, para facilitar sua conservação.

### **3. Resultados e Discussão**

#### **3.1. Caracterização dos extratos antes da secagem**

Os extratos adicionados das soluções de MD, GA/MD e CP/MD, imediatamente antes da secagem, apresentaram valor médio de antocianinas totais de 60,57 mg.100 g<sup>-1</sup>, 82,59% de umidade, 17,41% de sólidos totais e 20 °Brix. Estas determinações, para os três tipos de extrato, apresentaram resultados muito semelhantes. Por este motivo, os resultados foram apresentados como valor médio. Como caracterização colorimétrica, obteve-se L\*=34,83, a\*=30,30 e b\*=12,50 (MD), L\*=30,95, a\*=17,56 e b\*=5,65 (GA/MD) e L\*=31,25, a\*=16,41 e b\*=4,25 (CP/MD). A atividade anti-radical foi de 16,44 mM de equivalente Trolox nos extratos antes da incorporação das matrizes.

#### **3.2. Análises quantitativas individuais**

Foram avaliados o efeito de diferentes misturas de agentes carreadores em diferentes temperaturas no microencapsulamento de antocianinas de jabuticaba. A Tabela 2 apresenta os dados obtidos dos ensaios com cada carreador a cada temperatura avaliada.

Tabela 2 – Efeito dos carreadores à base de maltodextrina, goma arábica e Capsul<sup>®</sup>, em diferentes temperaturas de secagem em *spray dryer*, na produção de pós de extrato de jabuticaba

Respostas	MD			GA/MD			CP/MD		
	140 °C	160 °C	180 °C	140 °C	160 °C	180 °C	140 °C	160 °C	180 °C
<i>TS</i>	56	64	89	48	56	77	58	66	79
<i>ΔE</i>	4,60 ± 0,81	3,80 ± 0,34	3,81 ± 0,25	12,16 ± 0,47	14,28 ± 0,43	12,15 ± 0,00	9,44 ± 1,40	12,99 ± 1,73	10,42 ± 0,38
<i>RA</i>	83,21 ± 2,64	99,02 ± 1,17	86,63 ± 2,82	95,32 ± 4,18	100,23 ± 0,93	83,04 ± 0,74	82,60 ± 1,84	79,92 ± 1,50	80,11 ± 0,96
<i>AA</i>	8,65 ± 0,98	9,73 ± 1,40	9,03 ± 1,79	9,73 ± 1,19	9,80 ± 2,33	6,52 ± 0,49	8,10 ± 1,31	8,21 ± 0,86	7,37 ± 0,15
<i>H</i>	14,81 ± 0,73	13,85 ± 0,01	13,98 ± 0,60	17,75 ± 0,30	17,55 ± 0,83	17,96 ± 0,04	13,29 ± 0,29	13,70 ± 0,07	12,75 ± 0,21
<i>U</i>	5,31 ± 0,19	4,84 ± 1,19	2,11 ± 0,12	5,45 ± 1,68	6,76 ± 0,34	3,33 ± 0,48	4,46 ± 0,64	5,33 ± 0,07	5,66 ± 1,26
<i>ST</i>	94,70 ± 0,19	95,16 ± 1,19	97,90 ± 0,12	94,55 ± 1,68	93,24 ± 0,34	96,67 ± 0,48	95,55 ± 0,64	94,67 ± 0,07	94,34 ± 1,26

Resultados expressos em média ± desvio-padrão

*TS*: temperatura de saída (°C); *ΔE*: diferença global de cor; *RA*: retenção de antocianinas (%); *AA*: atividade antioxidante (μM Trolox.g<sup>-1</sup>); *H*: higroscopicidade (g H<sub>2</sub>O.100g<sup>-1</sup>); *U*: teor de umidade (%); *ST*: sólidos totais (%)

Pela Tabela 2 pode-se observar, quanto às temperaturas de saída, que estas variaram em função das temperaturas de entrada, ou seja, nas temperaturas mais baixas como a 140 °C, foram obtidas temperaturas brandas de saída, como próximas a 50 °C. Já quando se utilizou 180 °C como temperatura de entrada, como no experimento utilizando somente MD como agente carreador, a temperatura de saída foi de 89 °C, o que teoricamente poderia ser danoso aos pigmentos.

Os dados da Tabela 2 foram submetidos a análises de variância e os resultados para diferença global de cor e retenção de antocianinas são mostrados na Tabela 3. A Figura 1 mostra as médias marginais da retenção de antocianinas e da diferença global de cor obtidas com os diferentes encapsulantes nas várias temperaturas.

Tabela 3 – ANOVA das respostas diferença global de cor ( $\Delta E$ ) e retenção de antocianinas ( $RA$ ): efeito das variáveis carreador, temperatura e suas interações

<i>FV</i>	<i>AE</i>					<i>RA (%)</i>				
	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
Carreador	<b>256,43</b>	2	128,21	182,77*	0,0000	<b>461,35</b>	2	230,68	49,69*	0,0000
Temperatura	<b>10,20</b>	2	5,10	7,27*	0,0132	<b>292,98</b>	2	146,49	31,56*	0,0001
Interações	<b>10,17</b>	4	2,54	3,63*	0,0502	<b>306,32</b>	4	76,58	16,50*	0,0004
Resíduo	6,31	9	0,70			41,78	9	4,64		
Total	283,11	17				1102,43	17			

\*Significativo ( $p < 0,05$ ).

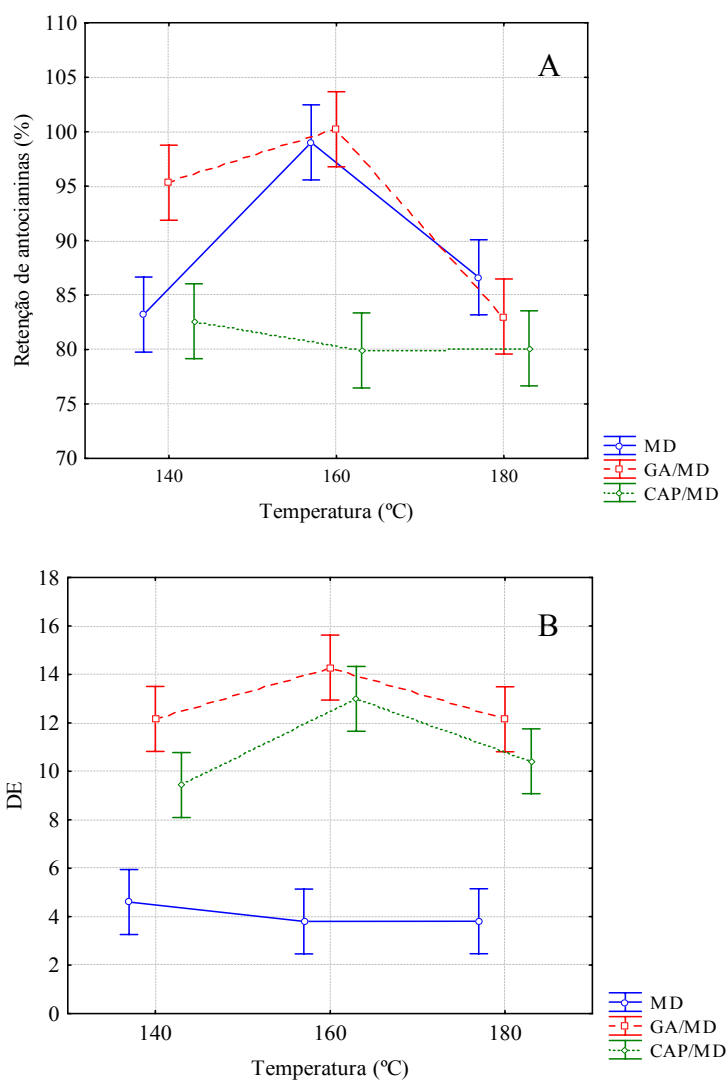


Figura 1 – Gráfico de médias marginais para retenção de antocianinas (A) e  $\Delta E$  (B) dos pós obtidos com diferentes carreadores e temperaturas.

Para a diferença global de cor, pela ANOVA da Tabela 3, verificaram-se efeitos significativos da matriz encapsulante (carreador), da temperatura de entrada e

da interação entre os dois fatores ( $p < 0,05$ ). Pela presença de interação significativa, constatou-se que a matriz e a temperatura não atuaram em separado.

Observou-se, pela Figura 1, que os carreadores GA/MD e CP/MD originaram pós com elevadas  $\Delta E$ . GA/MD foi o encapsulante que originou pós com maior  $\Delta E$ . Para a diferença global de cor, baixos valores de  $\Delta E$  são altamente desejáveis, pois indicam que o pigmento em pó, após reconstituído, mantém a cor do extrato do qual se originou. Silva *et al.* (2010), de forma semelhante ao encontrado no presente estudo, verificaram que extratos de jabuticaba microencapsulados com goma arábica 30% apresentaram menores valores em sua saturação de cor,  $C^*$ , e no ângulo de tonalidade cromática,  $h$ , quando comparados aos parâmetros  $C^*$  e  $h$  dos extratos produzidos somente com maltodextrina 30%, indicando que houve perda de cor quando se utilizou goma arábica.

Uma diferença global de cor de 0 a 1,5 pode ser considerada pequena e a amostra quase idêntica à original pela observação visual. Quando  $\Delta E$  se situa na faixa de 1,5 a 5 a diferença na cor já pode ser distinguida, e esta diferença torna-se evidente para  $\Delta E$  maior que 5 (Obón *et al.*, 2009). Moßhammer *et al.* (2006), trabalhando com betalaínas de *cactus pear*, usando uma razão maltodextrina 19DE/suco de 1,5, associado a 165 °C de temperatura de entrada do *spray dryer*, obtiveram  $\Delta E$  do produto de apenas 2,3. Rodríguez-Hernández *et al.* (2005), na produção de pós de sucos da mesma matéria-prima, *cactus pear*, com maltodextrina 10DE à temperatura de secagem de 215 °C, obtiveram  $\Delta E$  significativa do produto de 7,6. Os autores observaram influência da concentração de maltodextrina na diferença global de cor.

Quanto à retenção de antocianinas, pela Tabela 2, verificou-se que esta resposta foi elevada em todas as condições experimentais, apresentando valores acima de 80%, o que é bastante importante em termos da produção industrial do pigmento, já que o extrato de jabuticaba mostra-se uma fonte estável de antocianinas. A retenção foi elevada mesmo quando as temperaturas de saída estavam altas, indicando que as antocianinas presentes, de certa forma, resistiram ao calor. Resultados semelhantes foram encontrados por Tonon *et al.* (2008), que encontraram retenções de antocianinas da ordem de 77 a 86%, provenientes de suco de açaí submetidos à secagem em *spray dryer*. Para esta resposta, pela Tabela 3, verificou-se

efeito significativo do carreador, da temperatura e da interação entre as duas variáveis independentes.

Pela Figura 1, pode-se notar que a retenção de antocianinas foi maior na temperatura de 160 °C, para os carreadores MD e GA/MD. Em valores absolutos, a maior retenção foi obtida com o uso de goma arábica, concordando com os dados obtidos por Silva *et al.* (2010), no encapsulamento de antocianinas de jabuticaba. Tonon *et al.* (2010) verificaram que pós produzidos com maltodextrina e goma arábica não diferiram em relação ao conteúdo de antocianinas e à atividade antioxidante. Já Valduga *et al.* (2008), estudando o microencapsulamento de antocianinas de uva, utilizando maltodextrina 20DE e goma arábica como agentes encapsulantes, observaram uma maior retenção de antocianinas utilizando a maltodextrina.

Ao contrário, a retenção mais baixa de pigmentos foi aquela obtida com o carreador CP/MD, na temperatura de 160 °C. Finotelli & Rocha-Leão (2005), ao contrário do encontrado no presente estudo, verificaram que a retenção de ácido ascórbico submetido ao microencapsulamento com o Capsul<sup>®</sup> foi de 100%. Os autores, quando avaliaram a estabilidade do ácido ascórbico encapsulado com CP:MD (1:1), observaram que após 60 dias de armazenamento a 28 °C, houve redução de apenas 7% deste composto e, portanto, os autores recomendaram o uso do Capsul<sup>®</sup> no microencapsulamento de produtos alimentícios em geral.

Para a variável-resposta atividade antioxidante, pela Tabela 2, pode-se observar que a faixa de valores encontrada foi estreita para todas as condições experimentais, variando de 6,52 (GA/MD a 180 °C) até 9,73 (MD a 160 °C e GA/MD a 140 °C). Pela ANOVA desta resposta, verificou-se que nenhuma das variáveis foi significativa para descrever o comportamento da atividade antioxidante dos pós ( $p>0,05$ ) (dados não mostrados), e nas condições do presente estudo, pode-se afirmar que a atividade antioxidante dos pós nas diferentes condições de secagem variou de forma aleatória.

Silva *et al.* (2010), no microencapsulamento de antocianinas de jabuticaba, verificaram que os extratos atomizados com GA 30% apresentaram maior atividade antioxidante e maior teor de antocianinas, quando comparados com extratos atomizados com MD 15%/GA 15% e somente MD 30%. Corroborando em partes os dados do presente estudo, Bakowska-Barczak & Kolodziejczyk (*no prelo*), não

verificaram efeito do aumento das temperaturas de secagem (150, 160 e 180 °C) na atividade antioxidante (ABTS) de polifenóis de groselhas pretas, utilizando-se maltodextrinas de diferentes DE e inulina como agentes encapsulantes. No entanto, quando se elevou a temperatura de secagem para 205 °C, as atividades antioxidantes foram significativamente reduzidas. Já Dib-Taxi *et al.* (2003), observaram que a goma arábica foi mais eficiente que a maltodextrina, melhorando a retenção de atividade antioxidante de suco de camu-camu em pó produzido por *spray dryer*.

A Tabela 4 mostra as análises de variância realizadas para as respostas umidade e higroscopicidade, calculadas a partir dos dados da Tabela 2. A Figura 2 apresenta as médias marginais da umidade e da higroscopicidade obtidas com os diferentes encapsulantes nas várias temperaturas.

Tabela 4 – ANOVA das respostas umidade e atividade antioxidante: efeito das variáveis carreador, temperatura e suas interações

FV	U (%)					H (g H <sub>2</sub> O.100g <sup>-1</sup> )				
	SQ	gl	QM	F	p	SQ	gl	QM	F	p
Carreador	4,68	2	2,34	3,17	0,0909	<b>67,58</b>	2	33,79	168,29*	0,0000
Temperatura	<b>11,99</b>	2	5,99	8,12*	0,0097	0,46	2	0,23	1,15	0,3596
Interação	<b>13,51</b>	4	3,38	4,57*	0,0273	1,69	4	0,42	2,10	0,1628
Resíduo	6,64	9	0,74			1,81	9	0,20		
Total	36,81	17				71,54	17			

\*Significativo ( $p < 0,05$ ).

Para a resposta umidade, pela Tabela 4, observou-se o efeito da temperatura do ar de secagem e da interação entre a temperatura e o carreador ( $p < 0,05$ ). De fato, quanto maior a temperatura de entrada, maior o gradiente de temperatura formado entre o líquido e o ar de secagem, resultando em pós com menor teor de umidade (Tonon *et al.*, 2008).

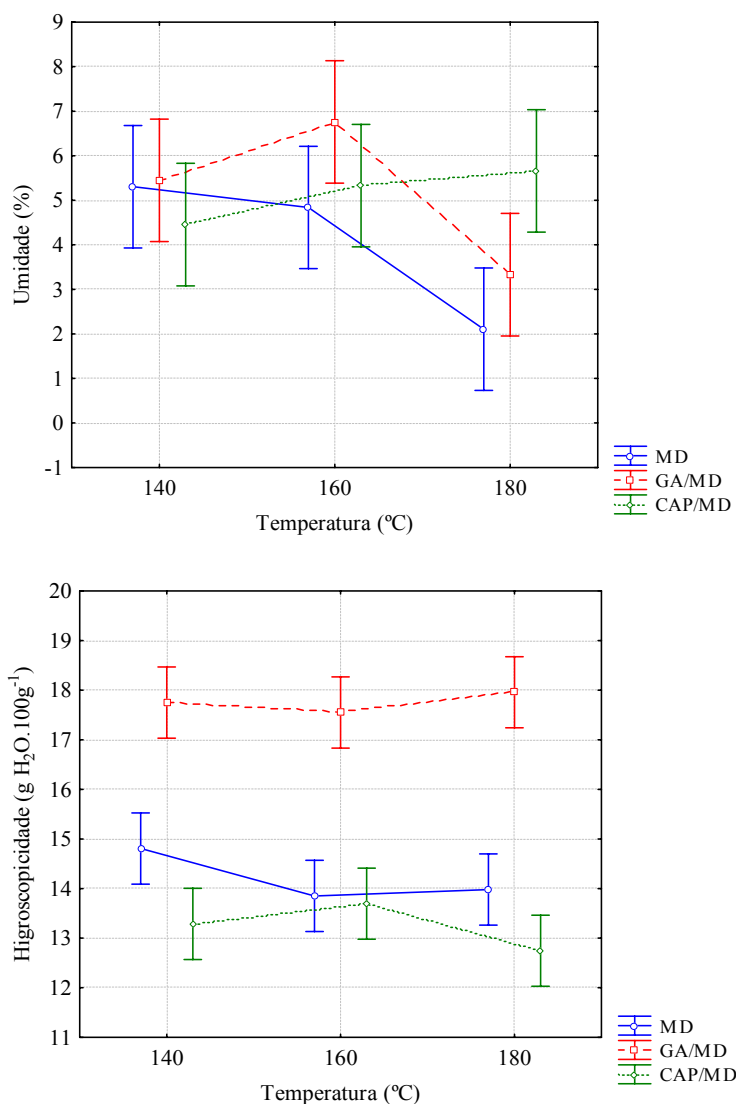


Figura 2 – Gráfico de médias marginais para teor de umidade (%) (A) e higroscopicidade ( $\text{g H}_2\text{O}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ) (B) dos pós obtidos com diferentes carreadores e temperaturas.

Para a resposta higroscopicidade, observou-se, pela Tabela 4, que somente o carreador exerceu influência ( $p < 0,05$ ). De fato, os carreadores diferem entre si em suas estruturas químicas, e as interações de cada um deles com a umidade do ambiente variaram entre si. A maltodextrina 10 DE (dextrose equivalente) é um polissacarídeo, obtida de amido de milho, via hidrólise ácida, contendo unidades de  $\alpha$ -D-glicose unidas principalmente por ligações glicosídicas (1 $\rightarrow$ 4). Esta molécula apresenta cadeia mais longa, exercendo, conseqüentemente maior proteção, quando comparada a outras maltodextrinas, como a 20 DE, por exemplo. As maltodextrinas com menor DE, ou menor grau de hidrólise, são mais resistentes a elevadas

temperaturas (Ersus & Yurdagel, 2007) e menos higroscópicas (Tonon, 2009). A goma arábica é um heteropolissacarídeo de estrutura ramificada, cuja cadeia principal é formada por unidades de D-galactopirranose, unidas por ligações glicosídicas em  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 3). Contém cadeias laterais com diferentes estruturas químicas formadas por D-galactopirranose, L-ramnose, L-arabinofuranose e ácido D-glucurônico, que estão ligadas à cadeia principal por ligações  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 6) (Tonon, 2009). O Capsul<sup>®</sup> é um amido industrial, modificado quimicamente pela incorporação de um componente lipofílico (succinato de octanil) em sua estrutura (Aburto *et al.*, 1998). O uso dos diferentes agentes encapsulantes afetou de forma distinta a higroscopicidade e umidade dos extratos. Corroborando dados obtidos por Tonon (2009), no presente estudo verificou-se que o uso de MD possibilita a obtenção de pós com higroscopicidade baixa.

Observou-se, pela Figura 2, que GA/MD foi a matriz que gerou pós mais higroscópicos. Ao contrário, CP/MD gerou pós com menor higroscopicidade, talvez pela modificação inserida em sua estrutura. Pós com menor higroscopicidade são desejáveis em termos de conservação, pois absorveriam menos umidade do ambiente. O carreador ideal seria aquele pouco higroscópico, ou seja, que permita que o pigmento fique protegido da umidade do ambiente. Esta umidade poderia causar posterior solubilização e amolecimento da microcápsula e o consequente contato do pigmento com o ar atmosférico e radicais livres, levando-o à degradação. Observou-se, no presente trabalho, que os pós com menor umidade foram obtidos na temperatura de 180 °C.

### **3.3. Otimização simultânea pela função de desejabilidade**

As respostas avaliadas no estudo ( $\Delta E$ ,  $U$ ,  $H$  e  $RA$ ) foram ajustadas a modelos e os modelos foram validados estatisticamente, todos apresentando-se significativos ( $p < 0,05$ ). Os  $R^2$  ajustados para as respostas  $\Delta E$ ,  $H$  e  $RA$  foram  $R^2=0,96$ ;  $R^2=0,95$  e  $R^2=0,93$ , respectivamente. A variável-resposta umidade foi a que obteve o ajuste mais baixo ( $R^2=0,66$ ), embora significativo.

O objetivo foi encontrar as condições ideais para a produção de pigmentos de jabuticaba em pó que apresentassem elevada retenção do pigmento em relação ao extrato antes da secagem e, que ao mesmo tempo, apresentassem coordenadas de cor mais parecidas com o respectivo extrato original. Ainda, estes pós deveriam conter o

menor teor de umidade sem, contudo, serem higroscópicos, facilitando, assim, sua conservação e a preservação do pigmento. Para a otimização simultânea das respostas  $RA$ ,  $\Delta E$ ,  $U$  e  $H$ , utilizou-se a função de *desejabilidade*.

Para atender aos requisitos acima listados, a resposta  $RA$  foi maximizada, enquanto as demais respostas foram minimizadas, conforme descrito em 2.2.7.2.

Após obter a *desejabilidade* global a ANOVA fatorial foi aplicada sobre esta resposta e o resultado é apresentado na Figura 3.

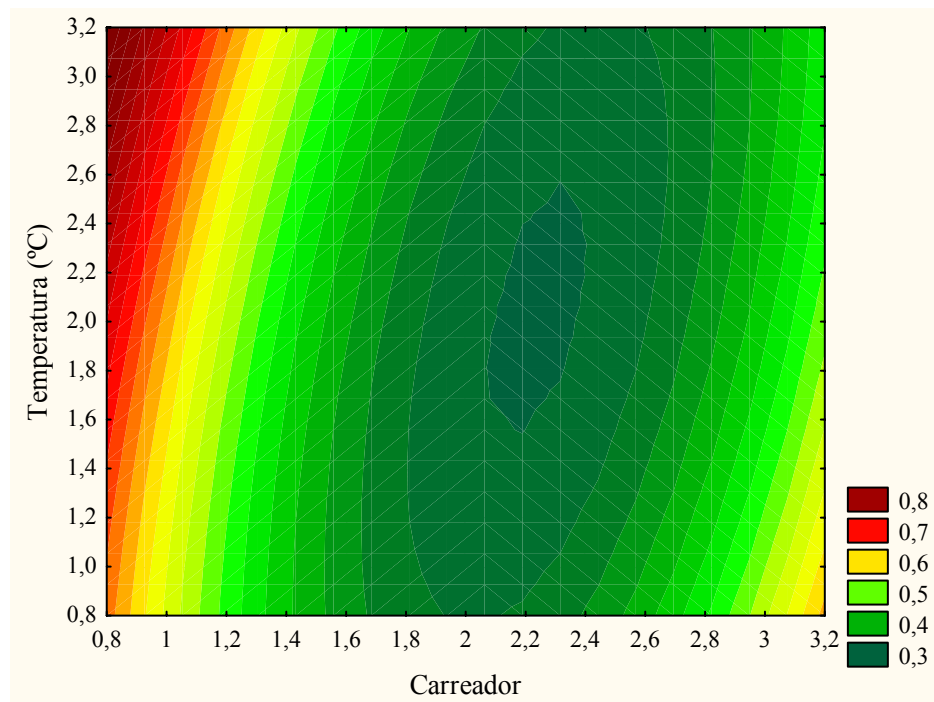


Figura 3 – Curva de nível para a *desejabilidade* global. Carreador: MD (1), GA/MD (2) e CP/MD (3); Temperatura: 140°C (1), 160°C (2) e 180°C (3).

De acordo com a legenda da Figura 3, nota-se que a função *desejabilidade* varia entre zero e um. As respostas foram simultaneamente otimizadas e verificou-se, que a região que possibilitou *desejabilidade* mais elevada (0,7 a 0,8) foi quando se utilizou o carreador MD 30% (codificado pelo nível 1), à temperatura de entrada do ar de secagem de 180 °C (codificada pelo nível 3). Tonon *et al.* (2010), apesar de afirmarem que não houve diferença entre o desempenho da MD e da GA na produção de pigmentos em pó, verificaram que as partículas produzidas com MD foram as mais estáveis ao tempo, demonstrando que este foi o agente encapsulante

que exerceu a maior proteção ao pigmento, sendo um encapsulante vantajoso para uso em suco de açaí em pó.

Sabe-se que a maltodextrina é um agente encapsulante já largamente utilizado na indústria de alimentos. Possui a vantagem de ser de baixo custo, de elevada solubilidade e baixa higroscopicidade (Saéñz *et al.*, 2009), quando comparada aos outros agentes do presente estudo. Desta forma, o resultado obtido demonstra a viabilidade e maior facilidade do microencapsulamento de pigmentos de jabuticaba com este agente carreador.

Possíveis aplicações para os pigmentos em pó de jabuticaba produzidos com a maltodextrina 30% a 180 °C seriam a utilização destes como pigmentos em alimentos e bebidas, como parte integrante da formulação de alimentos funcionais, e na produção de fitoterápicos.

A temperatura ótima para obter pós com elevada retenção de pigmentos, com menor diferença de cor, menor umidade e menor higroscopicidade foi de 180 °C, contrariando as observações de Ersus & Yurdagel (2007), que verificaram que temperaturas de entrada do ar de secagem de 160 a 180 °C causaram perdas nas antocianinas de cenoura preta produzidas por *spray dryer*, e elegeram como temperatura ótima 160 °C para a produção de pós com adequada atividade antioxidante, coordenadas de cor, umidade e higroscopicidade. Já Andrade & Flores (2004), em concordância com o presente estudo, verificaram que 190 °C foi a melhor temperatura de entrada do ar de secagem para a produção de pigmentos em pó de *Hibiscus sabdariffa* com melhores características de cor.

#### **3.4. Microscopia eletrônica de varredura**

A análise da superfície das partículas dos pós obtidos com diferentes agentes encapsulantes foi realizada em caráter tridimensional pelo uso de microscopia eletrônica de varredura. A Figura 5 apresenta as fotomicrografias dos pós obtidos com a temperatura de entrada de 180 °C, com as matrizes MD, GA/MD e CAP/MD.

Pela observação da Figura 5, pode-se notar que o agente encapsulante que possibilitou a formação de cápsulas mais homogêneas foi a maltodextrina. Observou-se que as esferas apresentaram menos rugosidades em suas superfícies, notadamente no aumento de 3000 vezes. As micropartículas obtidas com GA/MD apresentaram estrutura semelhante àquelas obtidas com MD, com poucas rugosidades e

apresentando superfícies lisas. Já as partículas obtidas com o encapsulante CP/MD apresentaram superfícies irregulares, de formato anguloso, com muitas reentrâncias. A formação destas reentrâncias nas superfícies das partículas provenientes da secagem em *spray dryer* geralmente é atribuída à retração das partículas pela drástica perda de umidade seguida de resfriamento no processo (Saéñz *et al.*, 2009; Tonon, 2009).

Percebeu-se também, a aderência de partículas pequenas à superfície das partículas de maior tamanho nos tratamentos com MD e GA/MD, fato também observado por Cano-Chauca *et al.* (2005a), e, em menor extensão, no tratamento com CP/MD. Em relação ao tamanho médio das partículas, pode-se perceber, pela Figura 5, que CP/MD foi o encapsulante que possibilitou a obtenção das menores partículas, em comparação com os demais.

De acordo com Barros & Stringheta (2006), quanto mais intacta e regular estiver a parede das microesferas, mais perfeito foi o processo de microencapsulação, o que leva a crer que CP/MD, nesta consideração, foi o agente encapsulante menos eficiente na análise microestrutural, ao passo que MD e GA/MD foram os mais eficientes, o que foi verificado para estas as matrizes em todas as magnificações observadas (micrografias não mostradas). De fato, de acordo com Tonon (2009), partículas com superfície rugosa podem apresentar problemas em suas propriedades de escoamento, e este se torna mais fácil quanto menor o número de depressões na microesfera. Além disso, segundo a autora, as partículas com superfície rugosa apresentam maior superfície de contato do que aquelas com superfície lisa, o que pode torná-las mais susceptíveis a reações de degradação como a oxidação.

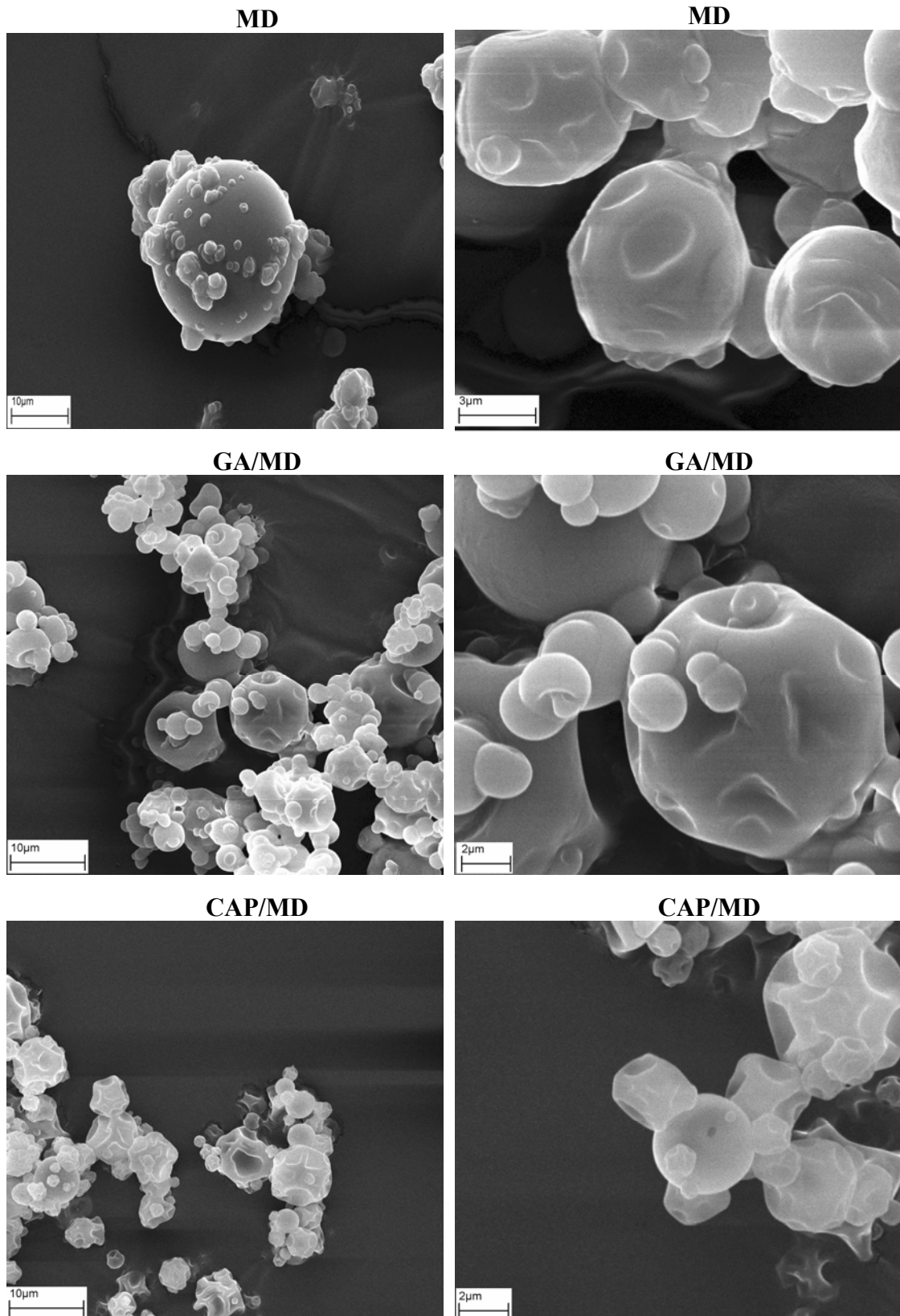


Figura 5 - Micrografias das partículas de pós provenientes de extrato de jaboticaba, formulados com diferentes agentes carreadores. Magnificação de 3000 vezes (esquerda) e 10000 vezes (direita).

### 3.5. Solubilidade dos pós em sistema-modelo alimentício de bebida isotônica

A solubilidade dos pós produzidos com os diferentes agentes encapsulantes à temperatura de trabalho intermediária de 160 °C foi avaliada em sistema-modelo de bebida isotônica. A Tabela 5 apresenta os dados de solubilidade dos diferentes pós e, como caracterização da bebida isotônica, o valor do pH, do abaixamento do ponto de congelamento e da osmolalidade após a incorporação dos pós.

Tabela 5 – Solubilidade dos pós obtidos com diferentes encapsulantes no sistema-modelo de bebida isotônica e caracterização da bebida

Carreadores	Análises			
	Solubilidade (%)	pH	$\Delta T_c$	mOsmol.kg <sup>-1</sup>
MD	90,52 ± 0,13	3,20 ± 0,02	-0,522 ± 0,00	280,64 ± 0,76
GA/MD	90,61 ± 0,05	3,85 ± 0,03	-0,516 ± 0,00	277,41 ± 1,52
CP/MD	90,51 ± 0,10	3,16 ± 0,00	-0,525 ± 0,00	282,26 ± 0,00

Pela Tabela 5 pode-se observar que a solubilidade dos extratos em pó de jabuticaba foram muito semelhantes, apesar dos diferentes agentes encapsulantes empregados no processo de microencapsulamento. Os pós produzidos foram altamente solúveis neste sistema-modelo alimentício, indicando que sua alta solubilidade é uma característica positiva para uso de pigmentos de jabuticaba microencapsulados em alimentos líquidos. Observando-se a osmolalidade das bebidas isotônicas adicionadas dos pigmentos, observa-se que elas permaneceram na faixa de 280 a 340 mOsmol.kg<sup>-1</sup>, que é a faixa característica para bebidas isotônicas (Petrus & Faria, 2005), ou seja, a adição do pigmento não alterou a osmolalidade da bebida, de forma que ela manteve a característica “isotônica”. O isotônico adicionado do pigmento da formulação GA/MD apresentou valor mais baixo de osmolalidade, porém, observando-se o desvio-padrão desta medida, considerou-se como pertencente à referida faixa.

Cano-Chauca *et al.* (2005a), na avaliação da solubilidade de suco de manga em pó com o uso de diferentes carreadores, observaram que a solubilidade em água dos pós contendo somente maltodextrina e goma arábica tiveram valores superiores a 90%, em concordância com o presente estudo. Da mesma forma, Tonon (2009), ao avaliar a solubilidade em água de pós produzidos com maltodextrinas 10 e 20 DE e goma arábica verificaram que esta foi muito elevada, acima de 94%.

Cano-Chauca *et al.* (2005) ressaltam que tratamentos com maltodextrina possibilitam elevado grau de solubilidade, e por esta e outras propriedades físicas favoráveis, este é um dos carreadores mais utilizados em *spray drying*.

Não foram encontrados na literatura trabalhos avaliando especificamente a solubilidade do pó em sistemas-modelo alimentícios. O que se encontrou com elevada frequência foram trabalhos avaliando a estabilidade dos pigmentos em sistemas-modelo alimentícios, ao longo do tempo e em diferentes condições de armazenamento, para antocianinas encapsuladas (Constant, 2003; Barros & Stringheta, 2006; Ersus & Yurdagel, 2007; Silva *et al.*, 2010; Tonon *et al.*, 2010), licopeno encapsulado (Shu *et al.*, 2006), betalaínas encapsuladas (Obón *et al.*, 2009; Saéñz *et al.*, 2009; Pitalua *et al.*, 2010) e polifenóis (Bakowska-Barczak & Kolodziejczyk, *no prelo*).

#### **4. Conclusão**

No microencapsulamento de extratos de jabuticaba com diferentes carreadores e temperaturas de secagem, maximizando-se a resposta retenção de antocianinas e minimizando-se as respostas diferença global de cor, umidade e higroscopicidade, foi recomendado, como condição de otimização simultânea, o uso do carreador maltodextrina 30%, associado à temperatura do ar de secagem de 180 °C.

A aplicação da função de desejabilidade foi bem sucedida na otimização do carreador e da temperatura do ar de secagem para produção de pigmentos em pó provenientes de extratos de cascas de jabuticaba com propriedade desejável para todas as respostas.

Pela análise estrutural das microesferas obtidas com os diferentes carreadores, verificou-se que o uso de maltodextrina e de goma arábica possibilitou a obtenção de partículas mais homogêneas, o que é recomendado no processo de microencapsulamento por *spray dryer*.

Os pós obtidos com os diferentes carreadores apresentaram solubilidades elevadas e semelhantes em sistemas-modelo de bebida isotônica, e não influenciaram na osmolalidade destas bebidas, indicando a viabilidade da aplicação destes pigmentos neste e em outros alimentos.

Estudos como este são importantes, pois são o passo inicial para uma possível produção industrial de pigmentos em pó, com elevado conteúdo de antocianinas e com características físico-químicas benéficas à conservação e favoráveis para futura aplicação em ampla gama de produtos alimentícios.

## 5. Referências bibliográficas

Aburto LC, Tavares DQ & Martucci ET (1998) Microencapsulação de óleo essencial de laranja. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* **18**, 45-48.

Ahmed M, Akter MS, Lee J-C & Eun J-B (2010) Encapsulation by spray drying of bioactive components, physicochemical and morphological properties from purple sweet potato. *LWT - Food Science and Technology* **43**, 1307-1312.

Andrade I & Flores H (2004) Optimization of spray drying of roselle extract (*Hibiscus sabdariffa* L.). In *14th International Drying Symposium*, pp. 597-604. São Paulo: Proceedings of the 14th International Drying Symposium.

Bakowska-Barczak AM & Kolodziejczyk PP (*no prelo*) Black currant polyphenols: Their storage stability and microencapsulation. *Industrial Crops and Products* **In Press, Corrected Proof**. doi: 10.1016/j.physletb.2003.10.071

Barros FARd & Stringheta PC (2006) Microencapsulamento de antocianinas - uma alternativa para o aumento de sua aplicabilidade como ingrediente alimentício. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento* **36**, 18-24d.

Cai YZ & Corke H (2000) Production and properties of spray-dried *Amaranthus* betacyanin pigments. *Journal of Food Science* **65**, 1248-1252.

Cano-Chauca M, Stringheta PC, Ramos AM & Cal-Vidal J (2005) Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **5**, 420-428.

Castañeda-Ovando A, Pacheco-Hernández MdL, Páez-Hernández ME, Rodríguez JA & Galán-Vidal CA (2009) Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry* **113**, 859-871.

Constant PBL (1999) Microencapsulamento de bixina: agentes encapsulantes, avaliação da qualidade e aplicações, Universidade Federal de Viçosa.

Constant PBL (2003) Antocianinas de açaí (*Euterpis oleracea* M.): extração, caracterização, desenvolvimento de formulação e aplicação em alimentos, Universidade Federal de Viçosa.

Derringer G & Suich R (1980) Simultaneous optimization of several response variables. *Journal of Quality Technology* **12**, 214-219.

- Desobry SA, Netto FM & Labuza TP (1997) Comparison of spray-drying, drum-drying and freeze-drying for b-carotene encapsulation and preservation. *Journal of Food Science* **62**, 1158-1162.
- Dib-Taxi CMA, Menezes HC, Santos AB & Grosso CRF (2003) Study of the microencapsulation of camu-camu (*Myrciaria dubia*) juice. *Journal of Microencapsulation* **20**, 443-448.
- Einbond LS, Reynertson KA, Luo XD, Basile MJ & Kennelly EJ (2004) Anthocyanin antioxidants from edible fruits. *Food Chemistry* **84**, 23-28.
- Ersus S & Yurdagel U (2007) Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* L.) by spray dryer. *Journal of Food Engineering* **80**, 805-812.
- Finotelli PV & Rocha-Leão MHM (2005) Microencapsulation of ascorbic acid in maltodextrin and capsul using spray-drying. In *Empromer/2<sup>nd</sup> Mercosur Congress on Chemical Engineering/4<sup>th</sup> Mercosur Congress on Process Systems Engineering*, pp. 1-11. Costa Verde - RJ.
- Formica JV & Regelson W (1995) Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chemical and Toxicology* **33**, 1061-1080.
- Francis FJ (1982) Analysis of anthocyanins in foods. In *Anthocyanins as Food Colors*, pp. 181-207 [P Markakis, editor]. New York: Academic Press.
- Islam MA, Sakkas V & Albanis TA (2009) Application of statistical design of experiment with desirability function for the removal of organophosphorus pesticide from aqueous solution by low-cost material. *Journal of Hazardous Materials* **170**, 230-238.
- Konczak I & Zhang W (2004) Anthocyanins—More Than Nature's Colours. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **5**, 239-240.
- Lutz IA (1985) *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz*, 3<sup>a</sup> ed. São Paulo.
- Moßhammer MR, Stintzing FC & Carle R (2006) Evaluation of different methods for the production of juice concentrates and fruit powders from cactus pear. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **7**, 275-287.
- Obón JM, Castellar MR, Alacid M & Fernández-López JA (2009) Production of a red-purple food colorant from *Opuntia stricta* fruits by spray drying and its application in food model systems. *Journal of Food Engineering* **90**, 471-479.
- Petrus RR & Faria JAF (2005) Processamento e avaliação de estabilidade de bebida isotônica em garrafa plástica. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* **25**, 518-524.
- Pitalua E, Jimenez M, Vernon-Carter EJ & Beristain CI (2010) Antioxidative activity of microcapsules with beetroot juice using gum arabic as wall material. *Food and Bioprocess Processing* **88**, 253-258.

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

Reineccius GA (1991) Carbohydrates for flavor encapsulation. *Food Technology* **44**.

Reynertson KA, Wallace AM, Adachi S, Gil RR, Yang H, Basile MJ, D'Armiento J, Weinstein IB & Kennelly EJ (2006) Bioactive depsides and anthocyanins from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*). *J Nat Prod* **69**, 1228-1230.

Reynertson KA, Yang H, Jiang B, Basile MJ & Kennelly EJ (2008) Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. *Food Chemistry* **109**, 883-890.

Rodríguez-Hernández GR, González-García R, Grajales-Lagunes A, Ruiz-Cabrera MA & Abud-Archila M (2005) Spray-Drying of Cactus Pear Juice (*Opuntia streptacantha*): Effect on the Physicochemical Properties of Powder and Reconstituted Product. *Drying Technology: An International Journal* **23**, 955 - 973.

Saénz C, Tapia S, Chávez J & Robert P (2009) Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chemistry* **114**, 616-622.

Shahidi F & Han XQ (1993) Encapsulation of food ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **33**, 501-547.

Shi XY, Jin DW, Sun QY & Li WW (2010) Optimization of conditions for hydrogen production from brewery wastewater by anaerobic sludge using desirability function approach. *Renewable Energy* **35**, 1493-1498.

Shu B, Yu W, Zhao Y & Liu X (2006) Study on microencapsulation of lycopene by spray-drying. *Journal of Food Engineering* **76**, 664-669.

Silva GJFd, Constant PBL, Figueiredo RWd & Moura SM (2010) Formulação e estabilidade de corantes de antocianinas extraídas das cascas de jaboticaba (*Myrciaria ssp.*). *Alimentos e Nutrição* **21**, 429-436.

Singh J & Singh N (2003) Studies on the morphological and rheological properties of granular cold water soluble corn and potato starches. *Food Hydrocolloids* **17**, 63-72.

Tonon RV (2009) Secagem por atomização do suco de açaí: influência das variáveis de processo, qualidade e estabilidade do produto, Universidade Estadual de Campinas.

Tonon RV, Brabet C & Rubinger MD (2008) Influence of process conditions on the physicochemical properties of açaí (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced by spray drying. *Journal of Food Engineering* **88**, 411-418.

Tonon RV, Brabet C & Rubinger MD (2010) Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) juice produced with different carrier agents. *Food Research International* **43**, 907-914.

Valduga E, Lima L, do Prado R, Padilha FF & Treichel H (2008) Extração, secagem por atomização e microencapsulamento de antocianinas do bagaço da uva "Isabel" (*Vitis labrusca*). *Ciência e Agrotecnologia* **32**, 1568-1574.

Yang B, Liu X & Gao Y (2009) Extraction optimization of bioactive compounds (crocin, geniposide and total phenolic compounds) from Gardenia (*Gardenia jasminoides* Ellis) fruits with response surface methodology. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **10**, 610-615.

## ARTIGO N° 5

### MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE ANTOCIANINAS: UMA BREVE REVISÃO

#### RESUMO

As antocianinas são pigmentos naturais atrativos para uso em alimentos que, além de abranger uma ampla gama de cores, apresentam potencial benéfico à saúde, principalmente por sua ação promissora no tratamento de algumas doenças e por sua atividade antioxidante. Desta forma, uma extração satisfatória das antocianinas é a etapa fundamental para o estudo do comportamento e posterior aplicação desses pigmentos. Na presente revisão, foram analisados os trabalhos mais importantes no tocante aos métodos de extração de antocianinas, visando ao conhecimento das principais metodologias utilizadas, desde as tradicionais técnicas de extração, como a convencional por solventes, até o uso de técnicas emergentes, como alta pressão, campos elétricos pulsados, ultrassom e microondas.

**Palavras-chave:** antocianinas, métodos, extração

### EXTRACTION METHODS OF ANTHOCYANINS: A BRIEF REVIEW

#### ABSTRACT

Anthocyanins are natural pigments attractive for use in foods. Besides they cover a wide range of colors, they have potential benefits to health, especially for their promising action on treatment of some diseases and for their antioxidant activity. Thus, a satisfactory extraction of the anthocyanins is the fundamental step for study of the behavior of these pigments and for its further application. In this review, the most important researches on extraction methods of anthocyanins were analysed in order to know the main methodologies used, since from traditional extraction techniques, like conventional solvent extraction, until the use of emerging techniques such as high pressure, pulsed electric fields, ultrasound and microwave.

**Keywords:** anthocyanins, methods, extraction

## 1. Introdução

As antocianinas são compostos da família dos flavonóides e constituem grupo de pigmentos responsáveis por grande parte das cores em flores, frutas, folhas, caules e raízes de plantas (Markakis, 1982). Seu espectro de cor varia do vermelho ao azul, apresentando-se também como uma mistura de ambas as cores resultando em tons púrpura. Muitas frutas, hortaliças, folhas e flores devem sua atrativa coloração a esses pigmentos que se encontram dispersos nos vacúolos celulares (Volp *et al.*, 2008; Castañeda-Ovando *et al.*, 2009)

As antocianinas são compostos solúveis em água e sensíveis ao calor (Shahidi & Naczk, 1995). Têm como estrutura básica o cátion 2-fenilbenzopirilium, também denominado *cátion flavilium* (Figura 1). Apresentam-se, na maior parte das vezes, ligadas a açúcares, que auxiliam na estabilização da molécula (Francis, 1982). As antocianinas, então, apresentam em sua estrutura química um resíduo de açúcar geralmente na posição 3, facilmente hidrolisado por aquecimento em meio ácido. Como produtos desta hidrólise obtém-se os componentes glicídicos e as agliconas, as quais são denominadas antocianidinas (Konczak & Zhang, 2004; Castañeda-Ovando *et al.*, 2009).

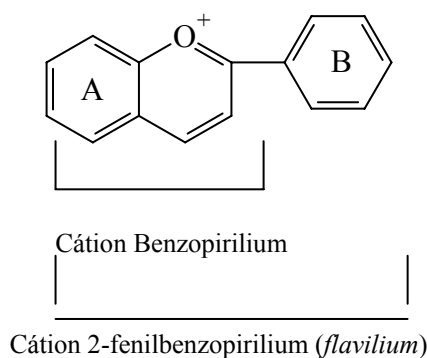
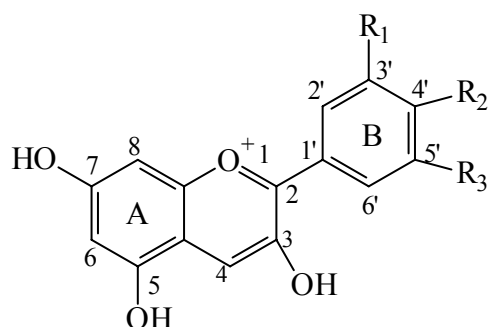


Figura 1 – Estrutura básica das antocianinas.

Adaptado: Bobbio & Bobbio (1995).

A distribuição das seis mais comuns antocianidinas em frutas e vegetais é: cianidina – 50%, delphinidina – 12%, pelargonidina – 12%, peonidina – 12%, petunidina – 7% e malvidina – 7%. Os derivados glicosídicos mais frequentes na natureza são 3-monosídeos, 3-biosídeos, 3,5- e 3,7-diglicosídeos. A presença dos derivados 3-glicosídeo é 2,5 vezes mais freqüente que os derivados 3,5-diglicosídeos

e, por conseguinte, a antocianina mais comum é a cianidina-3-glicosídeo (Kong *et al.*, 2003) (Figura 2).



<b>Antocianidinas</b>	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>
Cianidina	OH	OH	H
Delfinidina	OH	OH	OH
Pelargonidina	H	OH	H
Petunidina	OMe	OH	OH
Malvidina	OMe	OMe	OMe
Peonidina	OMe	OH	H

Figura 2 – Estrutura geral das antocianidinas mais comuns.

Alternativamente, as antocianinas podem se apresentar com um ácido orgânico (alifático ou aromático) ligado à molécula do açúcar, se tornando, portanto, antocianinas aciladas (Figura 3). De acordo com Bakowska-Barczac (2005), estes pigmentos são mais estáveis, pelo empilhamento dos grupos acil com o anel *pirilium* do cátion *flavilium*, reduzindo a possibilidade de ataque nucleofílico da água e a subsequente formação de compostos sem cor.

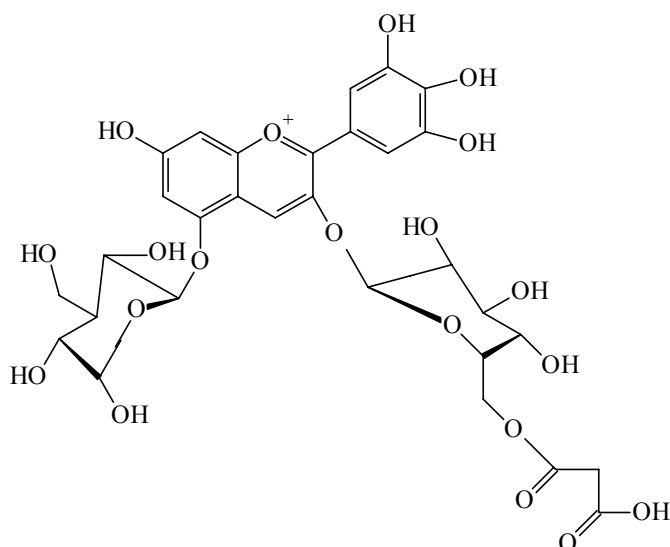


Figura 3 – Estrutura química da delphinidina-3-malonilglicosídeo-5-glicosídeo. Adaptado: Bakowska-Barczac (2005).

A propriedade mais importante das antocianinas é sua atividade antioxidante, que desempenha um papel fundamental na prevenção de doenças cardiovasculares, neurológicas, câncer e diabetes (Konczak & Zhang, 2004). Desta forma, há vários estudos sobre o efeito das antocianinas no tratamento de câncer (Lule & Xia, 2005; Nichenametla *et al.*, 2006; Hogan *et al.*, 2010), na nutrição humana (Stintzing & Carle, 2004), doenças neurológicas (Shukitt-Hale *et al.*, 2008) e atividades biológicas, como ação antioxidante e antiinflamatória (Kong *et al.*, 2003; Schauss *et al.*, 2006; Jensen *et al.*, 2008; Nisha *et al.*, 2009).

Em razão do enorme potencial das antocianinas atuarem como pigmentos com efeitos benéficos a saúde, tem havido um aumento no número de relatos na literatura em diversas áreas, como: desenvolvimento de técnicas analíticas para quantificação, separação e purificação destes pigmentos (Antolovich *et al.*, 2000; Teixeira *et al.*, 2008), aplicações em alimentos (Giusti & Wrolstad, 2003; de Rosso & Mercadante, 2007), metabolismo dos pigmentos (Mertens-Talcott *et al.*, 2008), análises quantitativas usando técnicas cromatográficas (Määttä *et al.*, 2003) e estudos de extração e estabilidade dos pigmentos (Ayed *et al.*, 1999; Montes *et al.*, 2005; Pompeu *et al.*, 2009).

O passo inicial dos estudos com antocianinas consiste na extração destes compostos de sua matriz, quer sejam frutas, flores, sementes ou hortaliças. O tempo e a facilidade da extração dos pigmentos dependerá da matriz utilizada, e a qualidade

da extração, em termos de teor total e individual de antocianinas, dependerá da escolha do solvente e da técnica adequada de extração. Desta forma, a extração é uma etapa comum de grande importância para estudos com diferentes finalidades.

Neste contexto, o presente estudo tem como objetivo sumarizar os mais importantes trabalhos científicos referentes à extração de antocianinas de diferentes fontes, realizada por diferentes metodologias, dado que não foi encontrado na literatura trabalho de revisão bibliográfica abordando especificamente a etapa de extração destes pigmentos.

## **2. Métodos de extração**

A extração dos fitoquímicos de vegetais constitui um importante passo na manufatura de produtos bioativos. A aplicação de diferentes tecnologias para a obtenção de moléculas para serem usadas como aditivos em alimentos ou como nutracêuticos pode se tornar uma estratégia racional para a exploração de uma enorme gama de vegetais (frutas e hortaliças).

O método de extração mais utilizado para a obtenção de antocianinas de frutas e hortaliças é a extração usando solventes. Entretanto, outros métodos como o uso de alta pressão hidrostática e campos elétricos pulsados vem surgindo recentemente como alternativas para se extrair ou auxiliar na extração do pigmento da matriz vegetal, associados ou não aos solventes tradicionais.

A escolha do método para extração de antocianinas depende do propósito da extração e também da natureza das antocianinas. É igualmente importante que a extração e seus procedimentos posteriores, quando necessários (p.ex.: concentração do extrato, separação e purificação) não sejam complexos, demorados ou de alto custo (Garcia-Viguera *et al.*, 1998).

A seguir, serão descritos distintos métodos de extração utilizados para frutas e vegetais ricos em antocianinas.

### **2.1. Extração convencional com soluções orgânicas**

A extração com soluções orgânicas é o método mais comum para extração de diversos compostos encontrados em frutas, incluindo os flavonóides. Os compostos fenólicos têm sua extração facilitada pela moagem, secagem ou liofilização dos frutos, ou apenas por imersão das frutas frescas com subsequente extração com

solventes (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009). Os métodos de extração devem ser tais que possibilitem a máxima recuperação de antocianinas, mínima quantidade de interferentes e mínima perda dos pigmentos pela ação enzimática e não-enzimática (Fuleki & Francis, 1968).

As antocianinas das frutas e vegetais estão localizadas nos vacúolos celulares. Os procedimentos de extração geralmente envolvem o uso de soluções acidificadas, que desnaturam as membranas celulares e simultaneamente solubilizam os pigmentos. O ácido tende a estabilizar as antocianinas, mas também pode mudar a forma nativa do pigmento no tecido pela quebra das associações com metais, co-pigmentos e/ou outros compostos (Rodríguez-Saona & Wrolstad, 2001). As antocianinas são moléculas polares, portanto as soluções mais comuns usadas nas extrações são misturas aquosas de etanol, metanol ou acetona (Kähkönen *et al.*, 2001; Dai *et al.*, 2009). Fuleki & Francis (1968) sugerem que o uso de água adicionada ao solvente facilita a extração das antocianinas mais hidrofílicas.

As metodologias usuais de extração utilizando solventes implicam na co-extração de substâncias não fenólicas como açúcares, ácidos orgânicos e proteínas, requerendo processos posteriores de purificação, como a extração em fase sólida, por exemplo (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009). Pode-se, alternativamente, após a extração, particionar o extrato com éter de petróleo, éter dietílico ou acetato de etila, com o objetivo de remover lipídios, clorofilas e polifenóis indesejados.

Conhecer o comportamento dos fatores que influenciam as condições do processo de extração é necessário para aumentar a eficiência da mesma em compostos bioativos. Os dois parâmetros fundamentais que definem o processo de extração são o equilíbrio e a taxa de transferência de massa. Estes fenômenos controlam o quanto e quão rapidamente os compostos de interesse foram extraídos dos tecidos do vegetal. A concentração de um composto no interior do tecido vegetal entrará em equilíbrio com a concentração que está disponível no solvente.

De acordo com Cacace & Mazza (2002; 2003a), a extração dependerá da velocidade que o composto se difundirá para o meio e atingirá a concentração de equilíbrio no líquido. A taxa de extração pode ser aumentada com o aumento do gradiente de concentração, por um maior coeficiente de difusão ou por um menor tamanho de partícula.

Muitos fatores, como a composição da solução extratora, tempo de extração, temperatura, pH, relação sólido/líquido e tamanho da partícula influenciam a extração sólido-líquido (Cacace & Mazza, 2002; 2003a; Castañeda-Ovando *et al.*, 2009; Pompeu *et al.*, 2009).

A polaridade do solvente extrator exerce um importante papel na extração seletiva das diferentes famílias de flavonóides (Shahidi & Naczk, 1995), bem como no rendimento da extração de antocianinas.

O cátion *flavilium* das antocianinas apresenta coloração vermelha e é estável em meios altamente ácidos (Figura 4), e esta característica provavelmente levou os pesquisadores de todo o mundo a usar soluções contendo ácidos minerais ou orgânicos para a extração de antocianinas provenientes de vegetais (Revilla *et al.*, 1998; Bridgers *et al.*, 2010). Na medida em que o pH aumenta, as antocianinas passam por transformações que vão desde a formação de uma base quinoidal azul até formas incolores degradadas, como as chalconas (Figura 4).

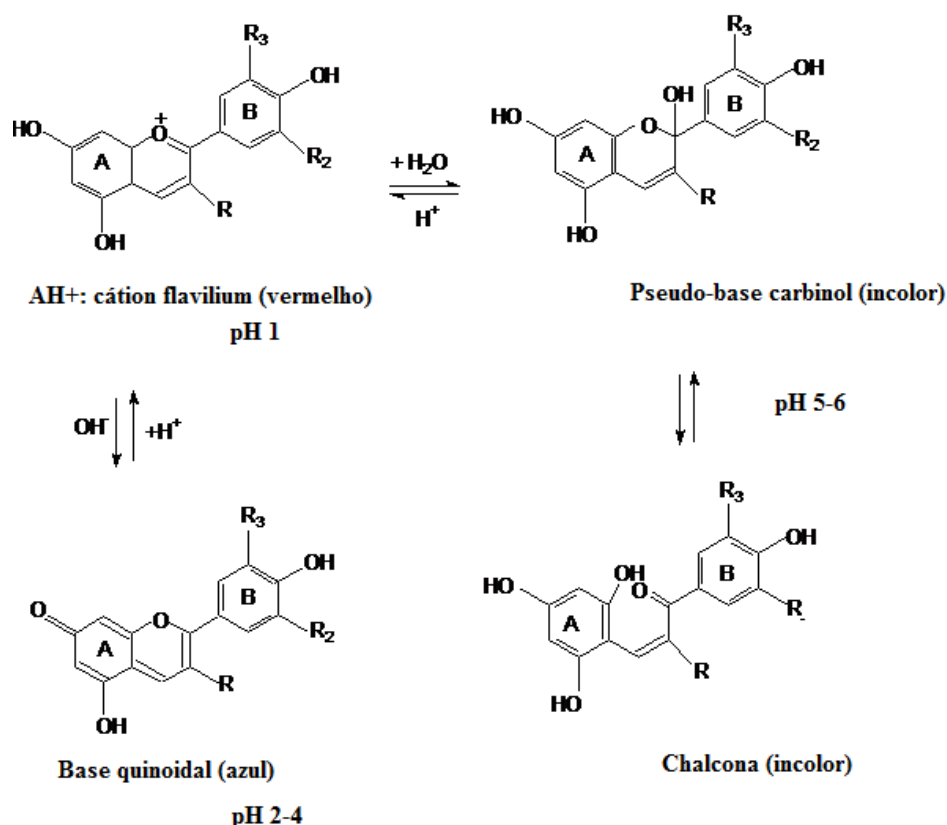


Figura 4 – Transformações estruturais das antocianinas com as mudanças de pH.

Com base na intensificação da cor das antocianinas em pH ácido, um método usado comumente para extração destas é a maceração do material triturado, desde poucas horas até *overnight*, a 4°C em metanol, contendo pequenas quantidades de ácido clorídrico (<1%) (Rodriguez-Saona & Wrolstad, 2001). Este, certamente, é o método mais utilizado na extração desses pigmentos.

Contudo, a extração com solventes contendo ácido clorídrico pode resultar em degradação do pigmento durante a etapa subsequente de concentração. Há relato de que a extração de antocianinas aciladas em condições ácidas pode causar sua hidrólise total ou parcial (Revilla *et al.*, 1998). Além disso, o uso de soluções acidificadas para a extração de antocianinas pode produzir a geração de antocianidinas, provenientes de compostos que podem estar presentes no vegetal, como as proantocianidinas e flavanóis. Esta reação pode resultar em superestimação do teor de antocianinas totais, conforme discutido no estudo de Revilla *et al.* (1998).

Para minimizar a decomposição de pigmentos, o uso de ácidos orgânicos mais fracos (p.ex.: ácido fórmico, acético, cítrico ou tartárico) ou pequenas quantidades (0,5 a 3%) de ácidos mais voláteis (p.ex.: ácido trifluoroacético), que podem ser removidos durante a concentração do pigmento foram propostos por Rodriguez-Saona & Wrolstad (2001). De acordo com esses pesquisadores, as alternativas que têm sido usadas com sucesso para a extração de antocianinas incluem 3% de ácido trifluoroacético, 5% de ácido acético, e 0,01% a 2,5% de ácido cítrico.

Apesar da possibilidade de superestimação dos teores de antocianinas, muitos autores continuam a utilizar a extração com soluções contendo ácido clorídrico para a extração desses pigmentos das mais diversas fontes (Montes *et al.*, 2005; Zanatta *et al.*, 2005; Fan *et al.*, 2008; Teixeira *et al.*, 2008; Dai *et al.*, 2009; Patil *et al.*, 2009; Pompeu *et al.*, 2009).

Quando se trata da extração desses pigmentos para alimentos, universalmente se utiliza o etanol acidificado (Francis, 1982). Este é preferido em relação ao metanol acidificado por sua não-toxicidade, por ser mais barato e pela eficiência extratora, comparável à do metanol (Fuleki & Francis, 1968; Lapornik *et al.*, 2005). Embora muitos autores prefiram utilizar o etanol (Cacace & Mazza, 2003b; Fan *et al.*, 2008; Valduga *et al.*, 2008; Dai *et al.*, 2009; Patil *et al.*, 2009; Karacabey & Mazza, 2010) ao metanol, Metivier *et al.* (1980) verificaram que o metanol foi 20% mais efetivo

que o etanol é 73% mais eficiente que a água na extração e recuperação de antocianinas de casca de uva. Da mesma forma, Bridgers *et al.* (2010) avaliaram o uso de metanol e etanol, tanto acidificados quanto neutros na extração de antocianinas de batata-doce. Os autores verificaram que o metanol acidificado foi o solvente mais eficiente para a extração, quando comparado ao etanol acidificado. Já Montes *et al.* (2005) não encontraram diferença significativa entre o uso de etanol e metanol na extração de antocianinas de jabuticaba. Para estes autores o efeito mais importante foi o da concentração dos solventes, sendo o metanol a 80% menos efetivo que o metanol puro.

Em contrapartida, Jing & Giusti (2007) verificaram que a água pura a 50°C foi mais eficiente na extração de antocianinas de milho púrpura, quando comparada à água acidificada e ao etanol. Observa-se, portanto, que a eficiência relativa entre diferentes solventes de extração varia com os diferentes materiais vegetais, não havendo consenso sobre qual a melhor solução extratora de forma global.

Um procedimento alternativo relatado por Rodriguez-Saona & Wrolstad (2001) consiste na extração usando acetona como solvente, seguida pela partição com clorofórmio. Wrolstad & Durst (1998) compararam este método com o método mais comum (metanol acidificado) em amostras líquidas e em pó de sucos, corantes e preparações nutracêuticas de *cranberry* e *elderberry*. Verificou-se que a recuperação de antocianinas foi 30% maior com o uso da acetona. Uma vantagem deste método é que a mistura clorofórmio/acetona irá particionar lipídios, clorofilas e outros materiais insolúveis em água, provenientes da amostra, aumentando, desta forma, a recuperação das antocianinas. Da mesma forma, Garcia-Viguera *et al.* (1998), na extração de antocianinas de morango, verificaram que o uso de acetona permitiu uma extração mais eficiente e mais reprodutível quando comparado ao metanol acidificado com ácido fórmico e ácido clorídrico e à água.

Além do sistema solvente, outros fatores como temperatura e tempo são importantes na extração de antocianinas. De acordo com Dai *et al.* (2009) temperaturas elevadas melhoram a eficiência da extração devido ao aumento da solubilidade e da taxa de difusão dos compostos para o solvente. Entretanto, temperaturas elevadas podem acelerar a degradação de antocianinas durante o processo de extração. Cacace & Mazza (2003b) na extração de antocianinas de groselhas com etanol, verificaram que aumentos da temperatura de extração além de

30-35°C resultaram na degradação dos pigmentos. Concordando com estes dados, Patil *et al.* (2009) realizaram a extração de antocianinas de rabanete à temperatura ambiente, com a finalidade de evitar degradação. Entretanto, Fan *et al.* (2008) utilizando etanol acidificado na extração de antocianinas de batata-doce encontraram como condições ótimas de extração a temperatura de 80°C, durante 60 minutos, na relação sólidos:solvente de 1:32 (v/v). Por outro lado, a temperatura ideal de extração de antocianinas de açaí para Pompeu *et al.* (2009) foi de 58°C, combinado com a ação de etanol 80%, acidificado com HCl 0,074 mol.L<sup>-1</sup>.

No tocante ao tempo de extração, este deve ser otimizado para evitar a oxidação e degradação dos compostos causada por períodos prolongados do processo (Shahidi & Naczk, 1995). Entretanto, na literatura, encontram-se desde períodos curtos de extração, como uma hora (Rodriguez-Saona & Wrolstad, 2001), até 24 horas (Teixeira *et al.*, 2008). Lapornik *et al.* (2005) estudaram o efeito do tempo de extração (1 hora, 12 horas e 24 horas) das antocianinas de resíduos de uva, groselha preta e groselha vermelha com as soluções extratoras água, etanol 70% e metanol 70%. Verificou-se que quando se utilizou água, em tempos acima de 12 horas já havia degradação das antocianinas. Em contrapartida, quando se utilizou os solventes orgânicos, a extração foi favorecida pelos maiores tempos, entre 12 e 24 horas. Valduga *et al.* (2008) na extração de antocianinas de uva “Isabel” verificaram que o tempo que possibilitou maior rendimento em pigmentos foi de 3 horas, a pH 1, com etanol acidificado.

Percebe-se, então, que na extração de antocianinas as variáveis tempo de extração, temperatura, tipo de solvente e tipo de ácido, não atuam isoladamente. O efeito destas deve ser avaliado em conjunto, considerando as condições de cada estudo e principalmente a fonte de antocianinas, uma vez que a facilidade de extração não é a mesma para as diferentes matrizes vegetais.

## **2.2. Extração com soluções sulfuradas**

Os termos “agente sulfitante” e “sulfito” referem-se ao dióxido de enxofre gasoso ou aos sais de sódio, potássio e cálcio de sulfito hidrogênio (bissulfito), dissulfito (metabissulfito) ou íons de sulfito (Machado *et al.*, 2006). Soluções de metabissulfito de sódio formam SO<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O, HSO<sub>3</sub><sup>-</sup> e SO<sub>3</sub><sup>2-</sup> na presença de água, gerando o ânion HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, que atuará na extração das antocianinas.

O mecanismo exato pelo qual o SO<sub>2</sub> melhoraria a extração ainda não é conhecido, mas possíveis hipóteses são a interação das antocianinas e flavonóides com o ânion HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, que levaria a uma melhora da difusão dos compostos através da parede celular da matriz vegetal, e a um aumento da solubilidade dos pigmentos (Gao & Mazza, 1996). De acordo com Langston (1985) e Timberlake & Bridle (1967), o dióxido de enxofre em concentrações de 0,05% até 0,2% reage apenas com antocianinas monoméricas, sais *flavilium* e antocianidinas, formando um complexo com o ânion HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>. O ânion HSO<sub>3</sub><sup>-</sup> se liga prontamente a grupos *flavilium*, como o das antocianinas, na posição 4 (Figura 5), para formar um complexo sem carga, incolor e estável. A reação para a formação do complexo é rápida e sua reação inversa é igualmente rápida se o SO<sub>2</sub> é removido do sistema, ou se há acidificação da solução (Timberlake & Bridle, 1967; Schwartz *et al.*, 2010), conforme demonstrado na Equação 2:

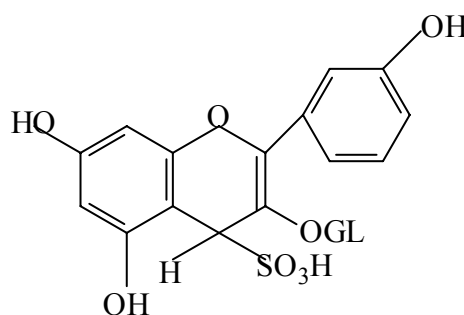


Figura 5 – Complexo antocianina-SO<sub>3</sub>H.

Adaptado: (Schwartz *et al.*, 2010).

Pela adição de etanol acidificado ao complexo antocianina-HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, ocorre a quebra da ligação entre a antocianina e o HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, formando um pigmento carregado que pode ser separado e purificado posteriormente usando resinas trocadoras de íons (Langston, 1985).

Outro mecanismo para explicar a melhora na extração quando se utiliza SO<sub>2</sub> no meio, de acordo com Cacace & Mazza (2002; 2003a), é que um aumento da concentração do SO<sub>2</sub> promove uma redução da constante dielétrica da água, o que

reduziria a energia requerida para separar as moléculas do solvente e permitiria que as moléculas do soluto penetrassem no solvente mais facilmente, facilitando o processo e diminuindo o tempo necessário de extração.

Em um processo de extração aquosa desenvolvido para antocianinas de girassol, demonstrou-se que a extração com água sulfurada (1000 ppm de SO<sub>2</sub> equivalente) foi melhor que uma extração tradicional utilizando ETOH:HOAc:H<sub>2</sub>O. Também foi demonstrado que uma hora de extração foi suficiente para alcançar a extração completa dos pigmentos, contrastando com o longo tempo necessário quando se utiliza técnicas tradicionais, de até 24 horas de duração (Fuleki & Francis, 1968). Dessa forma, sugeriu-se que uma das possíveis razões para a melhora na extração com SO<sub>2</sub> está na interação das antocianinas com os íons HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, os quais aumentam a solubilidade e difusão das antocianinas através da parede celular (Boussetta *et al.*, 2009).

Mok & Hettiarachchy (1991) realizaram a extração de antocianinas de girassol utilizando SO<sub>2</sub> aquoso em várias concentrações. A concentração que apresentou melhor efeito na extração dos pigmentos e também em sua estabilidade foi de 1000 ppm de SO<sub>2</sub>. De forma semelhante, Cacace & Mazza (2002) otimizaram a extração de antocianinas de groselhas por meio de água sulfurada, e verificou-se que os maiores rendimentos da extração destas antocianinas foram obtidos com concentrações variando de 1000-1200 ppm de SO<sub>2</sub>, na relação solvente:sólidos de 19:1 (L/Kg). De acordo com esses autores, o aumento da relação solvente:sólidos favorece a extração das antocianinas pela modificação do gradiente de concentração, e portanto, pelo aumento da taxa de difusão. Para se atingir a extração em tempo mínimo, o uso de 900 ppm de SO<sub>2</sub> e 65°C foi indicado. Entretanto, os autores ressaltaram que para a extração de antocianinas é recomendado utilizar temperaturas até 35°C, devido à menor taxa de degradação.

Há relatos de extração ótima de pigmentos a aproximadamente 1000 ppm (Cacace & Mazza, 2002), outros a níveis ainda maiores, como 2000 ppm (Ayed *et al.*, 1999), e ainda, resultados em menor magnitude, como os encontrados por Bakker *et al.* (1998), que ao avaliarem diferentes níveis de SO<sub>2</sub> na extração de antocianinas (0, 75 e 150 ppm) verificaram que a melhor extração foi realizada a 150 ppm, mas indicando que um aumento no teor de SO<sub>2</sub> extrairia mais antocianinas. Neste sentido, Gao & Mazza (1996), observaram que a melhor concentração de SO<sub>2</sub> para a extração

de antocianinas de semente de girassol foi de 200 ppm, durante 5 minutos a 22°C, sendo a água sulfurada o solvente que obteve melhor resultado de extração, quando comparado a ácido acético 0,01M. Observa-se, portanto, que não há consenso quanto ao teor médio de SO<sub>2</sub> a ser utilizado na extração, devendo ser analisadas as condições particulares de cada estudo e cada matéria-prima.

### **2.3. Novas tecnologias de extração**

O efeito de tecnologias emergentes como alta pressão hidrostática e campos elétricos pulsados ainda é pouco investigado na extração de pigmentos. Entretanto, são destacados os benefícios da utilização associada de moderadas temperaturas (60°C – 70°C) para uma extração ótima, partindo-se do princípio que o aumento da temperatura possibilita aumento no fenômeno de transferência de massa (Cacace & Mazza, 2003a). Ainda, estes tratamentos térmicos moderados pode também romper as ligações da matriz fenólica e modificar a estrutura da membrana das células vegetais, tornando-as menos seletivas pela coagulação de suas lipoproteínas (Corrales *et al.*, 2008). Assim, o uso de tecnologias emergentes que são capazes de aumentar a ruptura das células, combinadas com temperaturas moderadas, podem representar uma alternativa econômica para a extração de pigmentos, promovendo uma extração mais rápida com uso de menos solvente extrator.

Alta pressão hidrostática (APH), campos elétricos pulsados (CEP) e ultrassom são tecnologias ecologicamente sustentáveis e energeticamente eficientes no sentido de aumentar o processo de transferência de massa dentro do tecido vegetal, afetando a permeabilidade das membranas (Toepfl *et al.*, 2006; Corrales *et al.*, 2008).

#### **2.3.1. Alta pressão hidrostática**

De acordo com Corrales *et al.* (2009), as características positivas da alta pressão hidrostática para propósito de extração de antocianinas de frutas parecem irrefutáveis. Os autores ressaltam ainda que, com os resultados de pesquisas empregando o uso da alta pressão, é possível encontrar alternativas ecológicas para a extração e recuperação de metabólitos secundários de frutas, aumentando o uso de solventes não agressivos ao meio ambiente.

Durante a extração por APH, as lacunas de ar presentes nos tecidos das frutas e vegetais são parcialmente preenchidas com líquido. Quando a pressão é liberada na etapa subsequente, ocorre a saída do ar ocluso nos poros, causando dano à membrana das células. Além disso, a APH pode causar desprotonação de grupos carregados e rompimento de pontes salinas e interações hidrofóbicas, resultando em mudanças conformacionais e desnaturação de proteínas, tornando as membranas celulares cada vez menos seletivas, e conseqüentemente tornando os compostos bioativos mais acessíveis à extração até atingir o equilíbrio (Barbosa-Cánovas *et al.*, 2005).

Corrales *et al.* (2009), investigando a influência da APH, da concentração de solvente, do tempo e da temperatura na extração de antocianinas de casca de uva verificaram que a melhor combinação para a extração de antocianinas totais foi o uso de etanol 100%, a 50°C e 600 MPa. Os rendimentos na extração foram 23% mais elevados em relação à extração usando solvente a pressão atmosférica. Os pesquisadores verificaram, ainda, que a extração das antocianinas por APH foi seletiva, na medida em que os maiores níveis de antocianinas monoglicosiladas foram obtidos quando se utilizou pressões mais baixas, da ordem de 200 MPa. Ao contrário, quando se utilizou pressões mais elevadas da ordem de 600 MPa, obteve-se conteúdo elevado de antocianinas aciladas. O estudo de Corrales *et al.* (2008) demonstra que o tratamento por APH promove a redução do pH do solvente durante a extração, principalmente por causa da desprotonação de moléculas presentes no extrato, e os autores consideram que este decréscimo no pH pode favorecer a extração de antocianinas aciladas. Em  $\text{pH} < 4$ , grupos diacil das antocianinas estão empilhadas sobre o núcleo *flavilium* e exercem proteção contra o ataque nucleofílico da água, o que levaria à formação de compostos incolores (chalconas), conforme mostrado na Figura 4.

Corrales *et al.* (2009) ressaltam que as diferenças entre estruturas químicas das antocianinas e, conseqüentemente, em sua polaridade, governaram a extração seletiva por APH, em ordem crescente de concentração: malvidina > peonidina > petunidina > delphinidina > cianidina. Quanto maior o número de grupos metoxila e, em seguida, de grupos hidroxila na estrutura da antocianidina, maior foi a extração por APH.

Observa-se que mais estudos do efeito da APH na extração de antocianinas e antocianidinas são necessários, haja vista a vantagem da extração seletiva destes

compostos, de grande interesse para fins analíticos e para estudos de estabilidade e atividade biológica.

### 2.3.2. Campos elétricos pulsados

A aplicação dos campos elétricos pulsados (CEP) aumenta a transferência de massa pela eletroporação das membranas das células vegetais, melhorando, desta forma, a textura do tecido (Corrales *et al.*, 2008). Isto pode ser demonstrado pelo fato de que cenouras, batatas e maçãs tratadas por CEP e posteriormente submetidas a desidratação osmótica perderam água mais rapidamente que amostras não tratadas por CEP (Lebovka *et al.*, 2007). Da mesma forma, o tratamento com CEP induziu a permeabilização dos tecidos de uvas, havendo, conseqüentemente, a migração das antocianinas intracelulares para o meio, aumentando sua extração (Tedjo *et al.*, 2002).

Corrales *et al.* (2008), em estudo comparativo da extração de antocianinas de casca de uva por ultrassom, APH e CEP, verificaram que o rendimento da extração de antocianinas por meio de CEP ( $3 \text{ kV.cm}^{-1}$ ) foi 10% superior ao rendimento por APH (600 MPa) e 17% superior ao rendimento pela extração convencional por solvente [ETOH:H<sub>2</sub>O 50:50 (v/v)] e por ultrassom (35 KHz), estas últimas estatisticamente semelhantes. De maneira semelhante, Esthiaghi & Knorr (2000), em um estudo com uvas, verificaram aumento da extração de sólidos solúveis e pigmentos no suco, após a desintegração das células vegetais por CEP. Corroborando estes dados, Corrales *et al.* (2008) relatam estudo em que se observou uma maior extração de antocianinas de batata-roxa tratada por meio de CEP.

De forma semelhante ao ocorrido na extração por APH, Corrales *et al.* (2008) observaram que a melhora da extração de antocianinas individuais por CEP foi dependente do tipo de tratamento e do padrão de substituição do anel B da estrutura do cátion *flavilium* (Figura 2), bem como dos diferentes padrões de glicosilação nos anéis A e C. De acordo com os autores, quando uma glicose estava ligada covalentemente ao grupo -OH do anel heterocíclico (Figura 2), formando antocianinas monoglicosiladas, a extração destas foi favorecida pela utilização de CEP ( $10,25 \text{ mg.g}^{-1}$ ), ao passo que nas extrações controle (ETOH:H<sub>2</sub>O), por APH e por ultrassom os teores de antocianinas monoglicosiladas encontrados foram de  $7,46 \text{ mg.g}^{-1}$ ,  $6,04 \text{ mg.g}^{-1}$  e  $4,84 \text{ mg.g}^{-1}$ , respectivamente. Ainda, quando comparados com

antocianinas monoglicosiladas, os teores de antocianinas aciladas foram menores. Corrales *et al.* (2008) ressaltam que antocianinas aciladas parecem estar fisicamente “presas” dentro da matriz ou parecem formar ligações de hidrogênio com os polissacarídeos das paredes celulares e, conseqüentemente, foram extraídas em menor proporção.

Outro estudo investigou a influência do tempo e da temperatura de maceração no teor de antocianinas de vinhos rosé, provenientes de uvas *Cabernet Sauvignon* tratadas por CEP (5 kV.cm<sup>-1</sup>; 50 pulsos) (Puértolas *et al.*). Os vinhos oriundos das uvas tratadas por CEP apresentaram maiores teores de antocianinas, quando comparados aos de uvas não tratadas. Ao tempo de 2 horas de maceração, para se atingir um teor de antocianinas de 50 mg.L<sup>-1</sup>, o tratamento com CEP permitiu a redução da temperatura da maceração de 20°C para 4°C, redução essa importante para prevenção de oxidação de compostos fenólicos e de aroma e, portanto, contribuindo para o aumento da qualidade dos vinhos.

Estudos recentes têm demonstrado que a aplicação de CEP em bagaço de uva antes da etapa de maceração-fermentação aumenta a extração de compostos fenólicos, incluindo antocianinas, durante a vinificação em diferentes variedades de uva (López *et al.*, 2008; Puértolas *et al.*, 2010). Desta forma, vantagens são observadas na aplicação de CEP na extração de pigmentos, visto que além de possibilitar extração seletiva de antocianinas, parece aumentar o rendimento da extração.

### **2.3.3. Ultrassom**

O método de extração assistida por ultrassom tem sido usado freqüentemente com o intuito de aumentar o fenômeno de transferência de massa e, conseqüentemente, diminuir o tempo de extração de compostos bioativos. A tecnologia de ultrassom aumenta as taxas de transferência de massa durante a extração sólido/líquido por meio de forças de cavitação, em que ocorre o colapso de bolhas e, por conseguinte, ocorre geração de pressão localizada, causando a ruptura do tecido e a conseqüente migração de substâncias do meio intracelular para o solvente (Knorr *et al.*, 2002; Corrales *et al.*, 2008).

Chen *et al.* (2007) em um estudo de otimização da extração assistida por ultrassom de antocianinas de framboesa, verificaram que as melhores condições

foram: relação sólidos:solvente de 4:1 (mL/g), tempo de extração de 200 segundos e potência ultrassônica de 400 W. Nessas condições, o teor de antocianinas obtido foi de 34,5 mg.100 g<sup>-1</sup>. Comparando com a extração convencional por solventes [ETOH:HCl 1,5M (85:15), durante 60 minutos], a extração assistida por microondas foi mais eficiente e rápida para a extração das antocianinas, por causa do forte rompimento da estrutura do tecido submetido a cavitação acústica das microondas, verificada por microscopia eletrônica de varredura.

Adjé *et al.*(2010), na extração de polifenóis e antocianinas de flores de *Delonix regia* verificaram que o uso de ultrassom tornou o tempo de maceração três vezes mais curto, quando comparado à extração convencional. Entretanto, não possibilitou maior extração de fenólicos e antocianinas em relação à maceração convencional com agitação. De forma semelhante, Ghafoor *et al.* (2009) observaram redução no tempo necessário para a extração de antocianinas de uva usando ultrassom a 40 KHz e 250 W.

A característica marcante observada nos estudos acima discutidos foi a redução do tempo de extração, o que é muito importante, pois, em geral, quanto maior o tempo de extração, mais os compostos bioativos ficam susceptíveis a degradação, seja por ação enzimática ou por ação da luz e temperatura.

#### **2.3.4. Microondas**

A extração assistida por microondas utiliza a energia das microondas para causar movimento molecular e rotação de líquidos com um dipolo permanente, levando ao rápido aquecimento da solução e da amostra. As vantagens do uso de microondas sobre as técnicas convencionais de extração por solvente são: (i) melhor eficiência, (ii) menor tempo de extração, (iii) menor consumo de solvente e (iv) alto nível de automação (Eskilsson & Björklund, 2000; Yang & Zhai, 2010). Paralelamente a estas vantagens, uma ampla gama de solventes pode ser usada na extração assistida por microondas.

De acordo com Yang & Zhai (2010), a extração assistida por microondas é um processo rápido onde a energia é eficientemente transferida através de interações moleculares em um campo eletromagnético, para possibilitar a extração por solvente do material vegetal. Além disso, a interação direta das microondas com solventes

também resulta em ruptura das células vegetais e uma rápida liberação dos compostos que estavam no interior das células para o meio.

Yang & Zhai (2010) otimizaram a extração por solvente assistida por microondas das antocianinas de milho púrpura (*Zea mays* L.) e obtiveram o teor mais elevado de antocianinas (185,1 mg.100g<sup>-1</sup>) em apenas 19 minutos de extração, usando uma relação sólidos:solvente de 1:20 e com a irradiação das microondas na potência de 555 W. Em comparação com a extração convencional por solvente, em 60 minutos de extração, o teor de antocianinas correspondeu apenas a 85,6% do teor encontrado quando se usou microondas, sendo que este teor não aumentou com o tempo.

Liazid *et al.* (2011) desenvolveram um novo método para extração de antocianinas de uvas em 5 minutos, a 100°C, usando MEOH:H<sub>2</sub>O (40:60) assistido por microondas na potência de 500 W. Pelo novo método os autores puderam quantificar as antocianinas aciladas malvidina-3-cumaroilglicosídeo, malvidina-3-cafeoilglicosídeo e petunidina-3-p-cumaroilglicosídeo, as quais não foram detectadas na extração convencional usando apenas soluções extratoras (MEOH:ácido fórmico (95:5) v/v, durante 5 h). Observa-se que a utilização de microondas, por sua eficiente transferência de energia, provavelmente promoveu ruptura da estrutura celular das frutas, liberando as antocianinas aciladas para o solvente.

Sun *et al.* (2007) verificaram que as condições ótimas para a extração de antocianinas de framboesa assistida por microondas foram: tempo de 12 minutos, relação solvente:sólidos 4:1 (ml/g), com a potência de microondas de 366 W. Nestas condições os autores encontraram 43,42 mg.100 g<sup>-1</sup> de antocianinas totais nos frutos. Comparado à extração tradicional [ETOH:HCl 1,5 M (85:15) por até 60 minutos], a extração assistida por microondas foi mais eficiente e mais rápida. De acordo com os autores a utilização de microondas provocou grande ruptura no tecido, facilitando a extração. Entretanto, a composição de antocianinas nos dois métodos foi similar, discordando dos resultados de Liazid *et al.* (2011).

Conforme visto, a extração assistida por microondas, de forma semelhante ao observado na extração por ultrassom, apresenta como características de destaque a diminuição no tempo de extração e a possibilidade da extração seletiva de antocianinas, liberando as antocianinas aciladas, naturalmente mais “presas” à matriz celular, para o meio.

### 2.3.5. Irradiação

A irradiação de um alimento é realizada pela exposição do produto a uma fonte de energia ionizante. É um método físico de processamento que envolve a exposição do produto a raios gama (Cobalto-60), raios X ou elétrons (Tiwari *et al.*, 2009).

O uso de radiações ionizantes se tornou método eficiente na conservação de alimentos, principalmente por reduzir a microbiota do meio, e, conseqüentemente, aumentar a vida-de-prateleira do alimento (Mladenova *et al.*, 2010). Entretanto, há escassez de estudos do uso deste método na melhora da extração de antocianinas de matrizes vegetais. A maior parte dos trabalhos disponíveis trata da avaliação da estabilidade dos pigmentos provenientes de fontes irradiadas (Alighourchi *et al.*, 2008; Mladenova *et al.*, 2010). É, também, ressaltado o efeito negativo que a irradiação possa exercer sobre os pigmentos de forma geral, degradando-os, gerando radicais livres e seus produtos combinados (Mladenova *et al.*, 2010). Contudo, de acordo com Tiwari *et al.* (2009), os efeitos da irradiação nas antocianinas dependem da sua natureza, uma vez que diglicosídeos são relativamente estáveis à irradiação, quando comparados aos monoglicosídeos.

Em contrapartida, Ayed *et al.* (2000) investigaram o efeito da radiação gama, aplicada nas doses de 0 a 9 kGy, combinado com água ou solução sulfurada na extração de antocianinas de bagaço de uva. Os autores verificaram que a irradiação a 6 kGy, combinada com o uso de 2000 ppm de SO<sub>2</sub>, a 60°C por 15 minutos possibilitou o maior rendimento em antocianinas, explicado pela migração do pigmento do interior das células para o meio, possibilitada pelo dano causado pela irradiação às paredes celulares.

Observa-se, portanto, que são necessários mais estudos da extração de antocianinas utilizando-se como ferramenta a irradiação, visto que, ao mesmo tempo em que poderia haver aumento do rendimento do processo, as antocianinas poderiam ser degradadas pela ação dos radicais livres gerados pela fonte de energia.

### 3. Considerações finais

Estudos recentes ressaltam o potencial da aplicação das antocianinas como pigmentos bioativos. Com isso, uma melhor extração destes pigmentos de suas fontes é o primeiro passo para sua utilização, seja industrial ou analítica.

Observou-se, para algumas tecnologias emergentes, vantagens como uma grande diminuição no tempo de extração (utilização de microondas e de ultrassom), extração seletiva de antocianinas (utilização de APH), e diminuição da temperatura de extração (utilização de CEP). Para as técnicas convencionais, as grandes vantagens são o baixo custo, fácil condução do processo, obtenção de extratos relativamente puros, (dependendo do solvente utilizado), facilidade de recuperação do solvente (na maioria dos casos) e a disponibilidade de estudos científicos, para fins de conhecimento e comparação de dados.

Os vários processos de extração de antocianinas, tanto convencionais como emergentes, podem ser escolhidos partindo do objetivo da extração, da eficiência desejada, da pureza do extrato, do custo do processo, da facilidade de recuperação dos solventes, dentre outros fatores. As tecnologias emergentes apresentam grande potencial para a extração de pigmentos, entretanto os fatores como eficiência de extração, seletividade de compostos e custo elevado ainda não estão bem equacionados.

Recomenda-se a realização de mais estudos que culminem com o desenvolvimento de procedimentos eficientes de extração de antocianinas, baseando-se na associação de técnicas já tradicionais, como a extração por solventes orgânicos, a tecnologias emergentes, visando uma maior eficiência do processo de forma global.

### 4. Referências bibliográficas

Adjé F, Lozano YF, Lozano P, Adima A, Chemat F & Gaydou EM (2010) Optimization of anthocyanin, flavonol and phenolic acid extractions from *Delonix regia* tree flowers using ultrasound-assisted water extraction. *Industrial Crops and Products* **32**, 439-444.

Alighourchi H, Barzegar M & Abbasi S (2008) Effect of gamma irradiation on the stability of anthocyanins and shelf-life of various pomegranate juices. *Food Chemistry* **110**, 1036-1040.

Antolovich M, Prenzler P, Robards K & Ryan D (2000) Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *Analyst* **125**, 989-1009.

Ayed N, Yu HL & Lacroix M (1999) Improvement of anthocyanin yield and shelf-life extension of grape pomace by gamma irradiation. *Food Research International* **32**, 539-543.

Ayed N, Yu HL & Lacroix M (2000) Using gamma irradiation for the recovery of anthocyanins from grape pomace. *Radiation Physics and Chemistry* **57**, 277-279.

Bakker J, Bridle P, Bellworthy SJ, Garcia-Viguera C, Reader HP & Watkins SJ (1998) Effect of sulphur dioxide and must extraction on colour, phenolic composition and sensory quality of red table wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **78**, 297-307.

Bakowska-Barczac A (2005) Acylated anthocyanins as stable, natural food colorants - a review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* **14/55**, 107-116.

Barbosa-Cánovas GV, Tapia MS & Cano MP (2005) *Novel Food Processing Technologies*, 1 ed. USA: CRC Press.

Bobbio PA & Bobbio FO (1995) *Química do processamento de alimentos*, 2ª ed. São Paulo: Editora Varela.

Boussetta N, Lanoisellé JL, Bedel-Cloutour C & Vorobiev E (2009) Extraction of soluble matter from grape pomace by high voltage electrical discharges for polyphenol recovery: Effect of sulphur dioxide and thermal treatments. *Journal of Food Engineering* **95**, 192-198.

Bridgers EN, Chinn MS & Truong VD (2010) Extraction of anthocyanins from industrial purple-fleshed sweetpotatoes and enzymatic hydrolysis of residues for fermentable sugars. *Industrial Crops and Products* **32**, 613-620.

Cacace JE & Mazza G (2002) Extraction of Anthocyanins and Other Phenolics from Black Currants with Sulfured Water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 5939-5946.

Cacace JE & Mazza G (2003a) Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering* **59**, 379-389.

Cacace JE & Mazza G (2003b) Optimization of Extraction of Anthocyanins from Black Currants with Aqueous Ethanol. *Journal of Food Science* **68**, 240-248.

Castañeda-Ovando A, Pacheco-Hernández MdL, Páez-Hernández ME, Rodríguez JA & Galán-Vidal CA (2009) Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry* **113**, 859-871.

Chen F, Sun Y, Zhao G, Liao X, Hu X, Wu J & Wang Z (2007) Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins in red raspberries and identification of anthocyanins in extract using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Ultrasonics Sonochemistry* **14**, 767-778.

Corrales M, García AF, Butz P & Tauscher B (2009) Extraction of anthocyanins from grape skins assisted by high hydrostatic pressure. *Journal of Food Engineering* **90**, 415-421.

Corrales M, Toepfl S, Butz P, Knorr D & Tauscher B (2008) Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: A comparison. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **9**, 85-91.

Dai J, Gupte A, Gates L & Mumper RJ (2009) A comprehensive study of anthocyanin-containing extracts from selected blackberry cultivars: Extraction methods, stability, anticancer properties and mechanisms. *Food and Chemical Toxicology* **47**, 837-847.

de Rosso VV & Mercadante AZ (2007) Evaluation of colour and stability of anthocyanins from tropical fruits in an isotonic soft drink system. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **8**, 347-352.

Eskilsson CS & Björklund E (2000) Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A* **902**, 227-250.

Esthiaghi MN & Knorr D (2000) Anwendung elektrischer Hochspannungsimpulse zum Zellaufschluss bei der Saftgewinnung am Beispiel von Weintrauben. *LWT* **45**, 23-27.

Fan G, Han Y, Gu Z & Chen D (2008) Optimizing conditions for anthocyanins extraction from purple sweet potato using response surface methodology (RSM). *LWT - Food Science and Technology* **41**, 155-160.

Francis FJ (1982) Analysis of anthocyanins in foods. In *Anthocyanins as Food Colors*, pp. 181-207 [P Markakis, editor]. New York: Academic Press.

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

Gao L & Mazza G (1996) Extraction of Anthocyanin Pigments from Purple Sunflower Hulls. *Journal of Food Science* **61**, 600-603.

Garcia-Viguera C, Zafrilla P & Tomás-Barberán FA (1998) The use of acetone as an extraction solvent for anthocyanins from strawberry fruit. *Phytochemical Analysis* **9**, 274-277.

Ghafoor K, Choi YH, Jeon JY & Jo IH (2009) Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds, Antioxidants, and Anthocyanins from Grape (*Vitis vinifera*) Seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**, 4988-4994.

Giusti MM & Wrolstad RE (2003) Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochemical Engineering Journal* **14**, 217-225.

Hogan S, Chung H, Zhang L, Li J, Lee Y, Dai Y & Zhou K (2010) Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin-rich extract from açai. *Food Chemistry* **118**, 208-214.

Jensen GS, Wu X, Patterson KM, Barnes J, Carter SG, Scherwitz L, Beaman R, Endres JR & Schauss AG (2008) In Vitro and in Vivo Antioxidant and Anti-inflammatory Capacities of an Antioxidant-Rich Fruit and Berry Juice Blend. Results of a Pilot and Randomized, Double-Blinded, Placebo-Controlled, Crossover Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**, 8326-8333.

Jing P & Giusti MM (2007) Effects of Extraction Conditions on Improving the Yield and Quality of an Anthocyanin-Rich Purple Corn (*Zea mays* L.) Color Extract. *Journal of Food Science* **72**, C363-C368.

Kähkönen MP, Hopia AI & Heinonen M (2001) Berry Phenolics and Their Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**, 4076-4082.

Karacabey E & Mazza G (2010) Optimisation of antioxidant activity of grape cane extracts using response surface methodology. *Food Chemistry* **119**, 343-348.

Konczak I & Zhang W (2004) Anthocyanins—More Than Nature's Colours. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **5**, 239-240.

Kong JM, Chia LS, Goh NK, Chia TF & Brouillard R (2003) Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* **64**, 923-933.

Langston MSK (1985) Anthocyanin colorant from grape pomace. US Patent.

Lapornik B, Prosek M & Wondra AG (2005) Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering* **71**, 214-222.

Lebovka NI, Shynkaryk NV & Vorobiev E (2007) Pulsed electric field enhanced drying of potato tissue. *Journal of Food Engineering* **78**, 606-613.

Liazid A, Guerrero RF, Cantos E, Palma M & Barroso CG (2011) Microwave assisted extraction of anthocyanins from grape skins. *Food Chemistry* **124**, 1238-1243.

López N, Puértolas E, Condón S, Álvarez I & Raso J (2008) Effects of pulsed electric fields on the extraction of phenolic compounds during the fermentation of must of Tempranillo grapes. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **9**, 477-482.

Lule SU & Xia W (2005) Food Phenolics, Pros and Cons: A Review. *Food Reviews International* **21**, 367 - 388.

Määttä KR, Kamal-Eldin A & Törrönen AR (2003) High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) Analysis of Phenolic Compounds in Berries with Diode

Array and Electrospray Ionization Mass Spectrometric (MS) Detection: □ Ribes Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 6736-6744.

Machado RMD, Toledo MCF & Vicente E (2006) Sulfitos em Alimentos. *Brazilian Journal of Food Technology* **9**, 265-275.

Markakis P (1982) Stability of anthocyanins in foods. In *Anthocyanins as food colours*, pp. 163-168. New York: Academic Press.

Mertens-Talcott SU, Rios J, Jilma-Stohlawetz P, Pacheco-Palencia LA, Meibohm B, Talcott ST & Derendorf H (2008) Pharmacokinetics of Anthocyanins and Antioxidant Effects after the Consumption of Anthocyanin-Rich Açai Juice and Pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) in Human Healthy Volunteers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**, 7796-7802.

Metivier RP, Francis FJ & Clydesdale FM (1980) Solvent extraction of anthocyanins from wine pomace. *Journal of Food Science* **45**, 1099-1100.

Mladenova RB, Firzov C & Yordanov ND (2010) EPR study of free radicals in non- and gamma-irradiated nutritive supplements containing anthocyanins concentrate from lyophilized red wine. *Radiation Physics and Chemistry* **79**, 990-993.

Mok C & Hettiarachchy NS (1991) Heat Stability of Sunflower-Hull Anthocyanin Pigment. *Journal of Food Science* **56**, 553-555.

Montes C, Vicario IM, Raymundo M, Fett R & Heredia FJ (2005) Application of tristimulus colorimetry to optimize the extraction of anthocyanins from Jaboticaba (*Myrcia Jaboticaba* Berg.). *Food Research International* **38**, 983-988.

Nichenametla SN, Taruscio TG, Barney DL & Exon JH (2006) A Review of the Effects and Mechanisms of Polyphenolics in Cancer. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **46**, 161-183.

Nisha P, Abdul Nazar P & Jayamurthy P (2009) A comparative study on antioxidant activities of different varieties of *Solanum melongena*. *Food and Chemical Toxicology* **47**, 2640-2644.

Patil G, Madhusudhan MC, Ravindra Babu B & Raghavarao KSMS (2009) Extraction, dealcoholization and concentration of anthocyanin from red radish. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* **48**, 364-369.

Pompeu DR, Silva EM & Rogez H (2009) Optimisation of the solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *Euterpe oleracea* using Response Surface Methodology. *Bioresource Technology* **100**, 6076-6082.

Puértolas E, López N, Saldaña G, Álvarez I & Raso J (2010) Evaluation of phenolic extraction during fermentation of red grapes treated by a continuous pulsed electric fields process at pilot-plant scale. *Journal of Food Engineering* **98**, 120-125.

Puértolas E, Saldaña G, Álvarez I & Raso J Experimental design approach for the evaluation of anthocyanin content of rosé wines obtained by pulsed electric fields. Influence of temperature and time of maceration. *Food Chemistry In Press*, **Accepted Manuscript**.

Revilla E, Ryan JM & Martín-Ortega G (1998) Comparison of Several Procedures Used for the Extraction of Anthocyanins from Red Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**, 4592-4597.

Rodriguez-Saona LE & Wrolstad RE (2001) Extraction, isolation and purification of anthocyanins. In *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, pp. F1.1.1-F1.1.11: John Wiley & Sons, Inc.

Schauss AG, Wu X, Prior RL, Ou B, Huang D, Owens J, Agarwal A, Jensen GS, Hart AN & Shanbrom E (2006) Antioxidant Capacity and Other Bioactivities of the Freeze-Dried Amazonian Palm Berry, *Euterpe oleracea* Mart. (Acai). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 8604-8610.

Schwartz SJ, von Helbe J & Giusti MM (2010) Corantes. In *Química de Alimentos de Fennema*, pp. 445-498 [S Damodaran, KL Parkin and OR Fennema, editors]. Porto Alegre: Artmed Editora.

Shahidi F & Naczki M (1995) *Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications*, 1 ed. Lancaster: Technomic Publishing Co.

Shukitt-Hale B, Lau FC & Joseph JA (2008) Berry Fruit Supplementation and the Aging Brain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**, 636-641.

Stintzing FC & Carle R (2004) Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends in Food Science & Technology* **15**, 19-38.

Sun Y, Liao X, Wang Z, Hu X & Chen F (2007) Optimization of microwave-assisted extraction of anthocyanins in red raspberries and identification of anthocyanin of extracts using high-performance liquid chromatography – mass spectrometry. *European Food Research and Technology* **225**, 511-523.

Tedjo W, Esthiaghi MN & Knorr D (2002) Einsatz, nicht-thermischer verfahren zur zell-permeabilisierung von weintrauben und gewinnung von inhaltsstoffen. *Fluessiges Obst*. **9**, 578-583.

Teixeira LN, Stringheta PC & Oliveira FA (2008) Comparação de métodos para quantificação de antocianinas. *Revista Ceres* **55**, 297-304.

Timberlake CF & Bridle P (1967) Flavylium salts, anthocyanidins and anthocyanins II.—Reactions with sulphur dioxide. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **18**, 479-485.

Tiwari BK, O'Donnell CP & Cullen PJ (2009) Effect of non thermal processing technologies on the anthocyanin content of fruit juices. *Trends in Food Science & Technology* **20**, 137-145.

Toepfl S, Mathys A, Heinz V & Knorr D (2006) Review: Potential of High Hydrostatic Pressure and Pulsed Electric Fields for Energy Efficient and Environmentally Friendly Food Processing. *Food Reviews International* **22**, 405-423.

Valduga E, Lima L, do Prado R, Padilha FF & Treichel H (2008) Extração, secagem por atomização e microencapsulamento de antocianinas do bagaço da uva "Isabel" (*Vitis labrusca*). *Ciência e Agrotecnologia* **32**, 1568-1574.

Volp ACP, Renhe IRT, Barra K & Stringheta PC (2008) Flavonóides antocianinas: características e propriedades na nutrição e saúde. *Revista Brasileira de Nutrição Clínica* **23**, 141-149.

Wrolstad R & Durst R (1998) Use of anthocyanin and polyphenolic analyses in authenticating fruit juices. *Proceedings of Fruit Authenticity Workshop*, 79-96.

Yang Z & Zhai W (2010) Optimization of microwave-assisted extraction of anthocyanins from purple corn (*Zea mays* L.) cob and identification with HPLC-MS. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **11**, 470-476.

Zanatta CF, Cuevas E, Bobbio FO, Winterhalter P & Mercadante AZ (2005) Determination of Anthocyanins from Camu-camu (*Myrciaria dubia*) by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 9531-9535.

### 3. CONCLUSÃO GERAL

A otimização da extração de antocianinas e polifenóis de jabuticaba por meio da metodologia de superfície de respostas utilizando planejamentos compostos centrais foi bem sucedida. Tanto nas extrações com soluções orgânicas (metanol e etanol) como com soluções aquosas sulfuradas, verificou-se que foram obtidos extratos ricos em antocianinas e compostos fenólicos, e que apresentaram elevada ação anti-radical. Nas extrações com solventes orgânicos, verificou-se que a concentração da solução extratora e o pH se mostraram de grande importância, atuando de forma marcante na extração de bioativos da casca e polpa da jabuticaba. Nas extrações com soluções aquosas sulfuradas, a concentração de SO<sub>2</sub> afetou de forma mais marcante a extração de antocianinas e o potencial antioxidante dos extratos, seguida do tempo de extração.

Verificou-se, também, na extração dos pigmentos, que o solvente extrator mais eficiente foi o metanol, seguido do etanol, de forma global, enquanto a acetona não apresentou bom desempenho como solvente extrator. Pôde-se confirmar que a melhor condição extratora para as antocianinas de jabuticaba foi o uso de metanol 70% em pH menor que 2,5, condição extratora já utilizada por pesquisadores de todo o mundo para extração de antocianinas de diversas fontes. Ainda, com o presente trabalho foi possível sugerir a alternativa de uma extração eficiente de antocianinas de jabuticaba utilizando solventes puros e pH neutro.

A otimização de variáveis do processo de microencapsulamento por *spray dryer* de antocianinas de jabuticaba também foi realizada com sucesso pela associação de um planejamento composto central com a metodologia de superfície de respostas. A associação de elevadas temperaturas de entrada do ar de secagem com fluxos de alimentação mais baixos, e de temperaturas mais baixas e fluxos de alimentação mais elevados promoveram uma maximização da retenção de antocianinas e minimização da diferença global de cor, em relação ao extrato original.

Na avaliação de diferentes carreadores e temperaturas do ar de secagem para produção de pigmentos em pó de jabuticaba por *spray dryer*, verificou-se que utilizando-se o carreador maltodextrina 30% e temperatura de entrada do ar de

secagem de 180 °C foi possível alcançar um balanceamento favorável das características físico-químicas e tecnológicas dos pós, obtendo-se retenção de antocianinas maximizada, e diferença global de cor, umidade e higroscopicidade minimizadas, pela aplicação da função estatística de *desejabilidade*. Os pós obtidos no estudo apresentaram solubilidades elevadas e semelhantes quando aplicados em sistemas-modelo de bebida isotônica, indicando a viabilidade da aplicação destes pigmentos neste e em outros alimentos.

Sugere-se a realização de mais estudos com a jabuticaba, já que esta se mostrou uma excelente fonte de antocianinas e polifenóis ainda pouco estudada, com elevado potencial antioxidante. Estudos podem ser direcionados à ciência de alimentos, com a identificação e isolamento das antocianinas e polifenóis individuais desta fruta, avaliando-se suas atividades biológicas. Podem se direcionar, também, à parte tecnológica, com a produção de pigmentos em pó com elevado teor de antocianinas, avaliando sua estabilidade frente a diferentes condições de armazenamento e sua aplicação em ampla gama de produtos alimentícios, visando seu uso industrial. Como possíveis aplicações dos extratos líquidos e em pó obtidos, sugere-se: (i) o uso como corantes em alimentos e bebidas, principalmente de pH mais baixos, (ii) o uso como parte integrante da formulação de alimentos funcionais e (iii) uso dos extratos na produção de fitoterápicos, pela sua elevada ação anti-radical e pelas atividades biológicas já conhecidas das antocianinas.