



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
ESCOLA DE QUÍMICA**

**PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS
QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS**

MANUELA CRISTINA PESSANHA DE ARAUJO SANTIAGO

**AVALIAÇÃO VIA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA DO
EFEITO DA MICROFILTRAÇÃO DO SUCO DA AMORA-PRETA (*Rubus* spp.)
SOBRE A COMPOSIÇÃO DE SUAS ANTOCIANINAS MAJORITÁRIAS**

Rio de Janeiro

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

ESCOLA DE QUÍMICA

Manuela Cristina Pessanha de Araujo Santiago

Avaliação via Cromatografia Líquida de Alta Eficiência do efeito da microfiltração do suco da amora-preta (*Rubus* spp.) sobre a composição de suas antocianinas majoritárias

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências

Orientadora: Dr^a. Suely Pereira Freitas

Rio de Janeiro

2010

Manuela Cristina Pessanha de Araujo Santiago

Avaliação via Cromatografia Líquida de Alta Eficiência do efeito da microfiltração do suco da amora-preta (*Rubus* spp.) sobre a composição de suas antocianinas majoritárias

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências

Aprovada em 24 de Junho de 2010

Suely Pereira Freitas, D. Sc., EQ/ UFRJ (orientadora)

Ana Lúcia do Amaral Vendramini, D. Sc., EQ/ UFRJ

Neusa Pereira Arruda, D. Sc., IFRJ

Ronoel Luiz de Oliveira Godoy, D. Sc., Embrapa Agroindústria de Alimentos

DEDICATÓRIA

Ao Deus Pai, que por ser o meu pastor, nada me deixou faltar.

A minha filha Giovana a quem tanto amo, que mesmo sem entender, foi minha maior fonte de energia e motivação para conclusão deste trabalho.

Ao meu esposo Robson, pelo companheirismo e amor a mim dados.

Aos meus pais, por todo suporte emocional, apoio e por terem sempre me conduzido ao caminho certo.

Ao meu irmão, pelo exemplo de superação e vontade de vencer.

A todos que de certa forma renunciaram a minha presença e que me fizeram perceber e acreditar no meu potencial.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio de Janeiro, por todo apoio técnico e científico dados ao longo destes dois últimos anos.

À Escola de Química, ao Departamento de Engenharia Química, por toda a infraestrutura fornecida.

À Professora D. Sc. Suely Freitas Pereira, pela excelente orientação e dedicação com a pesquisa realizada.

Ao D. Sc. Ronoel Luiz de Oliveira Godoy pelos pertinentes conselhos dados ao longo deste estudo.

Ao D. Sc. João Oiano Neto, por todo conhecimento transmitido neste período.

Aos integrantes da banca, por toda a atenção dada ao trabalho final.

À Ana Cristina por ter compartilhado comigo todo o seu conhecimento, sabedoria e em especial a sua amizade.

À Jeane, Sidney, Isabelle e Daniel por todo apoio para a conclusão do trabalho.

Aos coordenadores do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, por toda a preocupação em organizar e manter um curso aprimorado.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, por toda a dedicação e esforço na arte de lecionar.

A todos os colegas de classe, pelo companheirismo, incentivo e troca de conhecimentos durante o período de curso das disciplinas.

A todas as pessoas de outras Instituições que de alguma forma contribuíram para a realização deste estudo seja por parceria técnica ou por troca de informações.

A todas as pessoas que auxiliaram na revisão deste trabalho, apontando possíveis erros e indicando correções para os mesmos.

A todos os pesquisadores de Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, por conseguirem através de seus estudos disponibilizarem uma série de dados que contribuem consideravelmente para a continuidade deste segmento de pesquisa.

Aos meus amigos, em especial Marília, Andressa e Mariana, que oraram por mim, me incentivaram e me apoiaram nesta etapa de minha vida, tendo entendido meus vários momentos de ausência.

Aos meus pais e ao meu irmão que me acolheram nos momentos mais difíceis com palavras de carinho e conforto.

Aos meus sogros e a minha cunhada, que me socorreram e me apoiaram em muitos momentos turbulentos.

Ao meu esposo, por todo amor que me foi dado nesses últimos dois anos de intenso estudo, tendo entendido em diversas vezes meus momentos de preocupação.

Ao Deus Pai, que me deu força quando achei que não seria mais possível seguir, que me iluminou quando achei que não havia solução para meus problemas, que me deu sabedoria para enfrentar as adversidades e que por fim me sustentou quando achei que havia chegado ao meu limite.

RESUMO

SANTIAGO, Manuela Cristina Pessanha de Araujo. Avaliação via Cromatografia Líquida de Alta Eficiência do efeito da microfiltração do suco da amora-preta (*Rubus* spp.) sobre a composição de suas antocianinas majoritárias. Rio de Janeiro, 2010. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de frutas frescas, posição que tem como suporte as condições favoráveis de clima, solo e disponibilidade territorial do País. A demanda por frutas frescas tem aumentado sistematicamente nos últimos anos devido à associação entre consumo de frutas e saúde. Neste cenário, o Brasil foi favorecido devido ao grande destaque para as frutas tropicais nos principais mercados mundiais. Paralelamente ao segmento de frutas frescas, o processamento de frutas no Brasil vem mostrando um forte crescimento do consumo. O cultivo da amora-preta (*Rubus* spp.) tem se tornado uma alternativa muito atraente, devido entre outros fatores, à elevada presença de compostos fenólicos na fruta, mais especificamente as antocianinas, e também ao baixo custo de implantação e manutenção do pomar. Este trabalho teve como objetivo geral avaliar por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência o efeito da microfiltração do suco da amora-preta sobre a composição de suas antocianinas majoritárias (cianidina-3-O-glicosídeo e cianidina-3-O-rutenosídeo) também caracterizadas no presente estudo. Para a realização do processo de microfiltração do suco da amora-preta, foi necessário realizar um pré-tratamento enzimático para hidrolisar os polissacarídeos e, como consequência, reduzir a viscosidade do suco, permitindo assim o escoamento do mesmo. As variáveis operacionais para o pré-tratamento enzimático (temperatura de 35°C e concentração do extrato enzimático (Rapidase) igual a 4mL/kg) foram definidas neste trabalho através de avaliação do comportamento reológico do suco de amora-preta integral e hidrolisado. Foram observadas perdas de, aproximadamente, 45% para a cianidina-3-O-glicosídeo e 39% para a cianidina-3-O-rutenosídeo durante o processo de microfiltração. O rompimento da parede celular durante o pré-tratamento enzimático reduziu estas perdas, uma vez que ocasionou um aumento na disponibilidade das antocianinas, sendo então esta etapa considerada fundamental para o processo.

Palavras-chave: Amora-preta. Antocianinas. Microfiltração. Tratamento enzimático.

ABSTRACT

SANTIAGO, Manuela Cristina Pessanha de Araujo. Avaliação via Cromatografia Líquida de Alta Eficiência do efeito da microfiltração do suco da amora-preta (*Rubus* spp.) sobre a composição de suas antocianinas majoritárias. Rio de Janeiro, 2010. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

Brazil is the third largest producer of fresh fruits, position supported by the favorable climate, soil and the country territorial availability. Demand for fresh fruits has grown in the recent years due to the association between consumption of fruit and health. Consumers, concerned about health, have been buying more fruit juices in recent years, with a great emphasis on Brazil at this market. In this scenario, Brazil was favored due to the large emphasis on tropical fruits in the mainly world markets. At the same time, the cultivation of blackberry (*Rubus* spp.) has become a very attractive alternative, due among other factors, to the high content of phenolic compounds in fruit, especially the anthocyanins, and also to the low cost of deployment and maintenance of orchard. The main objective of this study was to evaluate by High Performance Liquid Chromatography the effect of microfiltration, which is a unit operation widely used for industrial production of juice, on the composition of the blackberry juice majority anthocyanins (cyanidin-3-O-glucoside and cyanidin-3-O-rutenoside) which were also characterized at this study. To perform the microfiltration process of blackberry juice, it was necessary to conduct an enzymatic pretreatment for hydrolysis of polysaccharides and, consequently, reduce the juice viscosity, thereby allowing its flow. The operating variables for the enzymatic pretreatment (temperature of 35°C and concentration of the enzymatic extract (Rapidase) equal to 4mL/kg were defined in this work through rheological behavior study of raw and hydrolyzed blackberry juices. It was observed loss of 44.9% for cyanidin-3-O-glucoside and 39.3% for cyanidin-3-O-rutenosídeo during the microfiltration process. The enzymatic pretreatment prevented these values were higher, since caused an increase in the availability of anthocyanins, so been this step considered very important to the process.

Keywords: Blackberry. Anthocyanins. Microfiltration. Enzymatic pretreatment.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 3.1 – Fruto da amora-preta | 18 |
| Figura 3.2 – Núcleo Flavano | 20 |
| Figura 3.3 – Cátion flavilium | 22 |
| Figura 3.4 – Estruturas químicas das antocianinas | 23 |
| Figura 3.5 – Equilíbrio das antocianinas em solução aquosa | 25 |
| Figura 3.6 – Estrutura da cianidina-3-glicosídeo | 26 |
| Figura 3.7 – Estrutura da cianidina-3-rutenosídeo | 26 |
| Figura 3.8 – Exemplo de separação cromatográfica de carotenóides em coluna de vidro | 29 |
| Figura 3.9 – Modelo comercial de um cromatógrafo líquido | 29 |
| Figura 3.10 – Sistema básico de um cromatógrafo líquido | 30 |
| Figura 3.11 – Estrutura de fase ligada à sílica. X = OH, CN, NH ₂ , C ₈ , C ₁₈ ou C ₃₀ | 31 |
| Figura 3.12 – Modelo comercial de espectrofotômetro UV-1800 – Shimadzu | 34 |
| Figura 3.13 – Processos de separação por membrana em função do tamanho dos poros | 36 |
| Figura 3.14 – Esquemas de filtração convencional e tangencial | 37 |
| Figura 4.1 – Esquema tradicional para coleta de frações por HPLC | 41 |
| Figura 4.2 – Válvula seletora de colunas | 41 |
| Figura 4.3 – Reômetro AR-G2 | 45 |
| Figura 4.4 – Tratamento enzimático do suco | 46 |
| Figura 5.1 – Cromatograma da antocianina cianidina-3-O-glicosídeo isolada | 50 |
| Figura 5.2 – Cromatograma da antocianina cianidina-3-O-rutenosídeo isolada | 50 |
| Figura 5.3 – Espectro da antocianina cianidina-3-O-glicosídeo isolada | 51 |
| Figura 5.4 – Espectro da antocianina cianidina-3-O-rutenosídeo isolada | 51 |

| | |
|--|----|
| Figura 5.5 – Curva de calibração obtida para cianidina-3-O-glicosídeo | 52 |
| Figura 5.6 – Curva de calibração obtida para cianidina-3-O-rutenosídeo | 53 |
| Figura 5.7 – Perfil cromatográfico da cianidina-3-O-glicosídeo no início do estudo de estabilidade | 54 |
| Figura 5.8 – Perfil cromatográfico da cianidina-3-O-glicosídeo no fim do estudo de estabilidade | 55 |
| Figura 5.9 – Perfil cromatográfico da cianidina-3-O-rutenosídeo no início do estudo de estabilidade | 55 |
| Figura 5.10 – Perfil cromatográfico da cianidina-3-O-rutenosídeo no fim do estudo de estabilidade | 56 |
| Figura 5.11 – Espectro MS-MS do padrão isolado de cianidina-3-O-glicosídeo | 56 |
| Figura 5.12 – Espectro MS-MS do padrão isolado de cianidina-3-O-rutenosídeo | 57 |
| Figura 5.13 – Cromatograma do suco de amora-preta sobreposto com cromatograma do padrão de cianidina-3-O-glicosídeo | 57 |
| Figura 5.14 – Cromatograma do suco de amora-preta sobreposto com cromatograma do padrão de cianidina-3-O-rutenosídeo | 58 |
| Figura 5.15 – Amostra inicial (amora descongelada) | 60 |
| Figura 5.16 – Amora despulpada | 60 |
| Figura 5.17 – Torta do despulpamento | 60 |
| Figura 5.18 – Efeito da temperatura sobre a viscosidade do suco de amora-preta, tratado com 4mL/kg de enzima com taxa de deformação fixa em $10s^{-1}$ | 62 |
| Figura 5.19 – Efeito do tratamento enzimático sobre a viscosidade do suco de amora-preta, a $35^{\circ}C$ com taxa de deformação fixa em $10s^{-1}$ | 62 |
| Figura 5.20 – Efeito do tratamento enzimático sobre a viscosidade do suco de amora-preta, a $35^{\circ}C$ com taxa de deformação fixa em $100s^{-1}$ | 63 |
| Figura 5.21 – Efeito do tratamento enzimático sobre a viscosidade do suco de amora-preta, a $35^{\circ}C$ com taxa de deformação fixa em $1000s^{-1}$ | 63 |
| Figura 5.22 – Comportamento reológico do suco de amora-preta tratado com o extrato enzimático (Rapidase) a $35^{\circ}C$ | 65 |

- Figura 5.23 – Evolução do fator de redução volumétrica durante o processamento, por microfiltração, do suco de amora preta, previamente submetido a tratamento enzimático 67
- Figura 5.24 – Comportamento das antocianinas no suco permeado em relação ao fator de concentração volumétrico 68
- Figura 5.25 - Comportamento do fluxo permeado no processamento por microfiltração do suco de amora preta previamente submetido a tratamento com 4mL/kg do extrato enzimático (Rapidase) a 35°C 69
- Figura 5.26 – (A) Suco de amora centrifugado; (B) Suco de amora clarificado 69
- Figura 5.27 – Perfil cromatográfico das antocianinas do suco de amora-preta para todas as etapas do processo 71

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 3.1 – Principais classes e fontes de flavonóides em alimentos | 21 |
| Tabela 4.1 – Adequação do gradiente de concentração da fase móvel | 43 |
| Tabela 4.2 – Planejamento experimental para análise de viscosidade | 45 |
| Tabela 4.3 – Planejamento experimental para obtenção da curva de calibração | 49 |
| Tabela 5.1 – Pontos das curvas de calibração da cianidina-3-O-glicosídeo e cianidina-3-O-rutenosídeo | 52 |
| Tabela 5.2 – Avaliação da estabilidade das antocianinas | 54 |
| Tabela 5.3 – Áreas após diluição 1:2 da solução do extrato antociânico de amora-preta | 58 |
| Tabela 5.4 – Parâmetros físico-químicos da amora-preta | 59 |
| Tabela 5.5 – Balanço de massa da etapa de despulpamento da amora-preta | 60 |
| Tabela 5.6 – Teste de comparação de médias de Fisher ($p < 0,05$) usando o software XLSTAT (versão 2006) | 61 |
| Tabela 5.7 – Parâmetros do modelo da Lei da Potência em função da temperatura para o suco de amora-preta integral | 64 |
| Tabela 5.8 – Parâmetros do modelo da Lei da Potência em função da temperatura para o suco de amora-preta tratado com 4mL/kg do extrato enzimático Rapidase | 65 |
| Tabela 5.9 – Parâmetros da Equação de Arrhenius para o suco de amora-preta tratado com 4mL/kg do extrato enzimático (Rapidase) a 35°C | 66 |
| Tabela 5.10 – Balanço de massa da etapa de centrifugação do suco da amora-preta | 66 |
| Tabela 5.11 – Balanço de massa da etapa de microfiltração da amora-preta | 67 |
| Tabela 5.12 – Quantidade de antocianinas presentes nas correntes do processo | 70 |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 14 |
| 2 OBJETIVOS | 16 |
| 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 17 |
| 3.1 Amora-preta | 17 |
| 3.1.1 <i>Propriedades reológicas da amora-preta</i> | 18 |
| 3.2 Flavonóides | 20 |
| 3.2.1 <i>Antocianinas</i> | 25 |
| 3.2.2 <i>Antocianinas na Amora-preta</i> | 25 |
| 3.3 Procedimentos analíticos | 27 |
| 3.3.1 <i>Extração das antocianinas</i> | 27 |
| 3.3.2 <i>Isolamento das antocianinas</i> | 28 |
| 3.3.3 <i>Identificação e quantificação</i> | 28 |
| 3.3.3.1 <i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)</i> | 28 |
| 3.3.3.2 <i>Métodos espectroscópicos</i> | 32 |
| 3.3.3.3 <i>CLAE x Espectroscopia de absorção UV-Visível</i> | 34 |
| 3.4 Processos de separação por membrana | 34 |
| 3.4.1 <i>Microfiltração</i> | 37 |
| 3.4.2 <i>Tratamento enzimático</i> | 39 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 40 |
| 4.1 Amora | 40 |
| 4.2 Solventes e reagentes | 40 |
| 4.3 Isolamento de padrões | 40 |
| 4.3.1 <i>Avaliação da estabilidade dos padrões isolados</i> | 42 |
| 4.4 Caracterização das antocianinas majoritárias da amora-preta | 42 |
| 4.5 Análises físico-químicas | 44 |
| 4.5.1 <i>pH</i> | 44 |
| 4.5.2 <i>Sólidos Solúveis em °Brix</i> | 44 |
| 4.5.3 <i>Acidez total titulável</i> | 44 |
| 4.6 Análise de viscosidade | 44 |
| 4.6.1 <i>Tratamento matemático dos dados</i> | 45 |
| 4.7 Processo | 46 |
| 4.7.1 <i>Despolpamento da amora</i> | 46 |
| 4.7.2 <i>Tratamento enzimático</i> | 46 |
| 4.7.3 <i>Centrifugação</i> | 47 |
| 4.7.4 <i>Microfiltração (MF)</i> | 47 |
| 4.8 Análise das antocianinas por CLAE | 47 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 50 |
| 5.1 Isolamento de padrões | 50 |
| 5.2 Avaliação da estabilidade dos padrões isolados | 53 |
| 5.2 Caracterização das antocianinas majoritárias da amora-preta | 57 |

| | |
|--|----|
| 5.3 Análises físico-químicas..... | 59 |
| 5.4 Avaliação do processo de microfiltração | 59 |
| 5.4.1 <i>Despolpamento da amora</i> | 59 |
| 5.4.2 <i>Tratamento enzimático</i> | 61 |
| 5.4.3 <i>Centrifugação</i> | 66 |
| 5.4.4 <i>Microfiltração</i> | 66 |
| 5.5 Evolução do perfil de antocianinas ao longo do processo de clarificação de suco de amora preta | 70 |
| 6 CONCLUSÃO | 73 |
| 7 RECOMENDAÇÕES | 74 |
| 8 REFERÊNCIAS..... | 75 |
| ANEXO 1 | 87 |
| ANEXO 2 | 90 |
| ANEXO 3 | 91 |

1 INTRODUÇÃO

O cultivo da amora-preta (*Rubus* spp.) tem se tornado uma alternativa muito atraente frente ao de outras fruteiras por ter menores custos de implantação e manutenção do pomar, apresentando, por exemplo, um índice de lucratividade de cerca de 78%. Os custos mais baixos devem-se principalmente ao fato de se tratar de uma cultura rústica, com menor incidência de pragas e maior adaptação aos diferentes tipos de solo e condições climáticas. Adicionalmente, a produção pode ser destinada tanto ao mercado de frutas frescas como ao processamento da fruta, gerando produtos industrializados como sucos e geléias (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

Nos Estados do Sul, São Paulo e Sul de Minas Gerais, as condições climáticas permitem a oferta de frutas das espécies de clima temperado, como a amora-preta, por diversos meses no ano. No Rio Grande do Sul (principal produtor brasileiro) a produtividade de amora-preta pode alcançar até 10.000 kg/ha/ano (ANTUNES, 2002).

A área cultivada com amoreira-preta vem aumentando nos últimos anos, principalmente devido ao seu sabor diferenciado e às propriedades benéficas à saúde (OLIVEIRA *et al.*, 2008). Os benefícios são devidos principalmente à elevada presença de compostos fenólicos na fruta, mais especificamente as antocianinas, que são pigmentos responsáveis pela variação de cores do vermelho ao roxo de frutas, flores e folhas, e que apresentam alta atividade antioxidante (MOTA, 2007). Comparada a outros frutos ainda em relação a sua capacidade antioxidante pode-se listar, em ordem decrescente: acerola, manga, morango, uva, açaí, goiaba, amora, graviola, maracujá, cupuaçu e abacaxi (KUSKOSKI, 2006).

O interesse por sucos de frutas tem aumentado muito nos quinze últimos anos, havendo um grande destaque para o Brasil por ser o maior produtor e exportador dos países em desenvolvimento (KUSKOSKI, 2006; CHAVES *et al.*, 2004). A aplicação de processos de separação por membrana na produção de sucos é uma técnica promissora, uma vez que tem sido indicada como alternativa potencial para reduzir as perdas sensoriais e nutricionais que podem ocorrer nos processos comumente utilizados para conservação, clarificação e concentração dos mesmos (VAILLANT *et al.*, 1999; SÁ *et al.*, 2003).

Os processos de separação por membranas operam em baixas temperaturas contribuindo para a manutenção das características originais das frutas (MATTA *et al.*, 2004), havendo assim a maior preservação dos compostos termosensíveis como as antocianinas, que são nutrientes importantes à fisiologia humana.

A amora-preta normalmente apresenta uma grande concentração do polissacarídeo pectina, o que torna a sua polpa altamente viscosa. Sendo assim, para a utilização de tecnologias de membranas torna-se necessário avaliar suas propriedades reológicas e propor alternativas viáveis para reduzir sua viscosidade uma vez que esta característica está diretamente associada às propriedades de escoamento da polpa pelo sistema de membranas (HAMINIUK *et al.*, 2008).

A quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) das antocianinas majoritárias presentes nos sucos de amora-preta submetidos ao processo de separação por membrana permite avaliar o efeito da microfiltração na composição destes nutrientes e pode se tornar um parâmetro de qualidade do suco.

A quantificação do teor de antocianinas é um procedimento crítico devido às dificuldades enfrentadas durante a aquisição de padrões. Os padrões analíticos comerciais são disponibilizados em pequenas quantidades e com o grau de pureza baixo, além de serem caros. O uso da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para o isolamento das antocianinas majoritárias do açaí (cianidina-3-O-glicosídeo e cianidina-3-O-rutenosídeo), encontradas em grande teor neste fruto, é uma alternativa para superar estas dificuldades, pois possibilita o uso das mesmas como padrões analíticos na quantificação de outras matrizes onde estas duas antocianinas estejam presentes, como é o caso da amora-preta (GOUVÊA *et al.*, 2009).

2 OBJETIVOS

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo geral a avaliação, via Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do efeito da microfiltração sobre a composição das antocianinas majoritárias da amora-preta. Os objetivos específicos foram:

- Isolamento via CLAE das antocianinas cianidina-3-O-glicosídeo e cianidina-3-O-rutenosídeo a partir de amostra de açaí liofilizado para utilização como padrões analíticos;
- Caracterização das antocianinas majoritárias da amora-preta a partir de padrões isolados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência;
- Seleção das principais variáveis operacionais para o pré-tratamento enzimático do fruto, temperatura e concentração do extrato enzimático, responsáveis pela redução na viscosidade do suco de amora-preta,
- Avaliar a influência do pré-tratamento enzimático do suco de amora-preta, sobre o seu teor de antocianinas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Amora-preta

A amoreira-preta pertence à família Rosaceae, gênero *Rubus*, o qual engloba mais de trezentas espécies nativas da Europa, África, Ásia e América, inclusive do Brasil (SANTOS *et al.*, 1997). As plantas são na maioria das vezes de crescimento arbustivo de porte ereto ou rasteiro, e os frutos são do tipo agregado, com sabor ácido a doce-ácido e coloração negra. Ainda que vendidos *in natura*, os frutos são preferencialmente comercializados na forma industrializada, devido ao fato de possuírem elevada atividade respiratória e como consequência uma vida pós-colheita curta. Os frutos podem ser congelados, enlatados, processados na forma de polpa para utilização em produtos lácteos (como matéria-prima ou aditivo de cor e sabor), sucos e geléias (ANTUNES, 2002; ANTUNES, 2003).

O fruto da amoreira-preta (Figura 3.1) contém, em média, 85% de água, 10% de carboidratos, além de ser fonte de compostos funcionais, como ácido elágico e antocianinas (ANTUNES *et al.*, 2002; MORENO-ALVAREZ *et al.*, 2002).

A cultura da amora-preta é muito apropriada para a agricultura familiar, uma vez que necessita de grande demanda de mão-de-obra e possui alta rentabilidade por área. No Brasil, a área cultivada é de aproximadamente 250 ha, com incremento de 5% ao ano (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

No Brasil, na década de 1970, a cultura da amora-preta foi introduzida pela Estação Experimental de Pelotas, atual Embrapa Clima Temperado, no Rio Grande do Sul. Desde então, o seu cultivo cresceu neste Estado bem como em São Paulo e Minas Gerais, com a introdução e adaptação de novas cultivares (ANTUNES, 2002).

Desde o início da cultura da amora-preta as seguintes cultivares foram lançadas no Brasil: Ébano, em 1981, Tupi, em 1988, Guarany, em 1988, e Xavante, em 2004, além das cultivares Brazos, Comanche e Cherokee nos Estados Unidos (SANTOS *et al.*, 1997). As cultivares citadas foram lançadas no Brasil pela Embrapa Clima Temperado, a qual vem conduzindo desde 1975 um programa de melhoramento genético da amoreira-preta (Oliveira *et al.*, 2008).



Figura 3.1 – Fruto da amora-preta (Fonte: websmed.portoalegre.rs.gov.br).

3.2.2 Propriedades reológicas da polpa da amora-preta

O comportamento reológico e as propriedades de fluxo de polpas de frutas desempenham um importante papel no desenvolvimento e avaliação de equipamentos de processos tais como bombas, tubulações, trocadores de calor, evaporadores, esterilizadores e agitadores. As pectinas, também presentes na amora-preta, influenciam o comportamento reológico das polpas das frutas devido as suas propriedades gelificantes. É um polissacarídeo natural, frequentemente usado como aditivo alimentar, sendo constituído, em grande parte, por unidades de ácido- α -(1-4)-D-Galacturônico com alguns grupos carboxílicos presentes na forma metil éster (HAMINIUK *et al.*, 2009).

Segundo Haminiuk *et al.* (2006), a viscosidade aparente da polpa de amora diminui com o aumento da taxa de deformação e temperatura. O efeito da temperatura sobre a viscosidade aparente pode ser representado pela equação de Arrhenius (equação 3.1), onde a ordem de grandeza da energia de ativação mostra a dependência da viscosidade com a temperatura.

$$\mu = \mu_o e^{\frac{-Ea}{RT}} \dots\dots\dots(Eq.3.1)$$

onde:

μ - viscosidade (cP);

Ea - energia de ativação do fluxo (kcal/gmol);

R - constante do gás ideal ($1,987 \times 10^{-3}$ kcal/gmol.K);

T - temperatura absoluta (K).

Segundo Branco (1995), o conhecimento dos parâmetros reológicos é importante nas aplicações industriais não só para determinar o consumo de energia necessário para bombear uma polpa de fruta altamente viscosa, mas também para resolver problemas como incorporação de ar, o que pode causar dificuldades na operação de bombeamento e reações indesejáveis como oxidação, além de contaminação.

De acordo com Ibarz *et al.* (1996) o comportamento reológico dos sucos de frutas, em geral, não pode ser descrito como o de um fluido Newtoniano. Para os fluidos não-Newtonianos a relação entre a taxa de deformação e a tensão de cisalhamento não é constante.

Todos os produtos líquidos derivados de frutas são sistemas bifásicos, compostos por partículas sólidas dispersas em um meio aquoso. A maioria escoam com características pseudoplásticas (a viscosidade aparente decresce com a taxa de deformação), mostrando, por vezes, uma resistência inicial ao escoamento (COSTELL & DURÁN, 1982).

A Lei da Potência é comumente usada para descrever o comportamento de fluidos não-Newtonianos. O modelo de Ostwald-de-Waele (equação 3.2) e o modelo de Herschel-Bulkley (equação 3.3) são os mais adequados para este tipo de fluido (FERREIRA *et al.*, 2002; MELO *et al.*, 2008).

$$\tau = k \left(\frac{dv}{dy} \right)^n \dots\dots\dots (Eq. 3.2)$$

$$\tau = \tau_o + k \left(\frac{dv}{dy} \right)^n \dots\dots\dots (eq. 3.3)$$

onde:

τ - tensão de cisalhamento (Pa);

K – índice de consistência (Pa.sⁿ);

dv/dy - taxa de deformação (s^{-1});

n – índice de comportamento do fluido (adimensional).

Geralmente, os fluidos alimentícios, como as polpas de fruta, são um caso especial da expressão de Herschel-Bulkley, na qual a tensão limite de escoamento (τ_0) é nula, ou se assume como zero, de forma que a equação 3.2 torna-se a mais utilizada (BALISCHI *et al.*, 2002).

3.2 Flavonóides

Os flavonóides são estruturas aromáticas encontradas naturalmente nas plantas, sendo classificados como metabólitos secundários destas. São pigmentos naturais presentes nos vegetais e que possuem importante ação contra agentes oxidantes, como por exemplo, aos raios ultravioleta, a poluição ambiental, a substâncias químicas presentes nos alimentos, entre outros (MARTÍNEZ-FLORES, 2002).

Dentre os compostos fenólicos de maior interesse para a saúde, os flavonóides destacam-se por apresentarem efeitos protetores contra várias doenças, como as cardiovasculares e o câncer (WALLE, 2004).

Os flavonóides apresentam uma estrutura comum composta por dois anéis aromáticos ligados por três carbonos e um átomo de oxigênio formando o núcleo flavano (Figura 3.2), que é um heterociclo oxigenado. O grau de oxidação e o padrão de substituição do anel C determinam as classes de flavonóides e dentro destas o padrão de substituição nos anéis A e B definem os compostos específicos (RHODES, 1996).

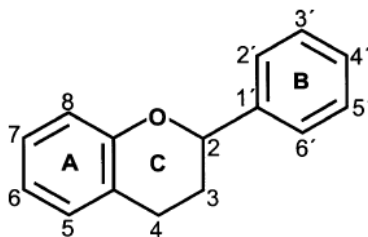


Figura 3.2 – Núcleo Flavano (BRAVO, 1998).

Os flavonóides podem ser divididos em 14 classes, sendo 6 grupos os que se incluem na dieta humana. Estes 6 são denominados por flavanóis, flavonóis, flavonas, antocianidinas, isoflavonóides e flavononas (MARTÍNEZ-FLORES, 2002; YILMAZ & TOLEDO, 2004).

Tabela 3.1 – Principais classes e fontes de flavonóides em alimentos

| Classes | Coloração | Exemplos | Comentários |
|--------------|--------------------------------|--|--|
| Antocianinas | Azul, vermelha e violeta | Cianidina Delfinidina Peonidina | As antocianinas são predominantes em frutas e flores e provavelmente foram os primeiros flavonóides a serem isolados. São usadas como corantes. |
| Flavanas | Incolor | Catequina Epicatequina Luteoforol Procianidina Theaflavina | As flavanas são encontradas em frutas e chás (verdes ou pretos). Biflavanas são encontradas em frutas, lúpulo, nozes e bebidas. O sabor peculiar de algumas bebidas, frutas, chás e vinhos é devido, principalmente, à presença de biflavanas. |
| Flavanonas | Incolor para um amarelo pálido | Hesperidina Naringenina | As flavanonas são encontradas quase que exclusivamente em frutas cítricas. |
| Flavonas | Amarelo pálido | Apiagenina Luteolina Diosmetina Tangeretina Nobiletina | As flavonas também são encontradas quase que exclusivamente em frutas cítricas. Conferem o pigmento amarelo em flores. Os compostos mais comuns são a apianina e a luteolina. |
| Flavonóis | Amarelo pálido | Quercetina Rutina Mircetina Kaempferol | Os flavonóis estão presentes em diversas fontes, sendo predominantes em vegetais e frutas. A quercetina é o principal representante da classe. |
| Isoflavonóis | Incolor | Daidzeína Genisteína | Os isoflavonóis são encontrados em abundância nos legumes, principalmente na soja. |

Fonte: (LÓPEZ *et al.*, 2000)

3.2.1 Antocianinas

As antocianinas da família dos flavonóides constituem grupo de pigmentos solúveis em água responsáveis pela maioria das cores vermelha, laranja e azul de flores e vegetais (BROUILLARD, 1982). Devido as suas propriedades antioxidantes, possuem importante papel na prevenção ou no retardamento do aparecimento de várias doenças (MARTÍNEZ-FLORES, 2002; KUSKOSKI *et al.*, 2004; DOWNHAM & COLLINS, 2000).

As antocianinas possuem espectro de cor que vai do vermelho ao azul, apresentando-se também como uma mistura de ambas as cores resultando em tons de púrpura. Muitas frutas, hortaliças, folhas e flores devem sua atrativa coloração a esses pigmentos que se encontram dispersos nos vacúolos celulares (DEGÁSPARI, 2004).

Os frutos considerados ricos em antocianinas são intensamente coloridos, com suas cores variando principalmente entre o roxo e o preto (MACHEIX *et al.*, 1990). Várias pesquisas tem sido realizadas com o intuito de se eliminar ou pelo menos reduzir o uso de corantes alimentícios sintéticos, dando lugar ao uso de corantes de fontes naturais, como as antocianinas, por exemplo (FRANCIS, 1989; ESPÍN *et al.*, 2000; HAKE & QUINN, 2008).

Durante o armazenamento, as antocianinas podem sofrer modificações devido à sensibilidade à temperatura, oxigênio, luz e ação enzimática (JACKMAN *et al.*, 1987; FRANCIS, 1989).

Na natureza, as antocianinas ocorrem glicosiladas, sendo que as agliconas são conhecidas como antocianidinas. A forma básica das antocianinas é a do cátion flavilium (Figura 3.3) (MALACRIDA & MOTTA, 2006). Além do grupo de açúcares, a molécula de antocianina pode vir, frequentemente, ligada a um grupo de ácidos orgânicos e outros substituintes.

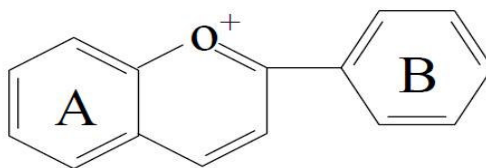


Figura 3.3 – Cátion flavilium (BOBBIO & BOBBIO,1995)

As antocianinas encontradas em alimentos são todas derivadas das agliconas pertencentes aos seguintes pigmentos básicos: malvidina, delphinidina, petunidina, peonidina, cianidina e pelargonidina, as quais diferem entre si quanto ao número de hidroxilas e ao grau de metoxilas presentes no anel B (LIMA *et al.*, 2006) (Figura 3.4). A formação do glicosídeo e a maior presença de grupos OCH₃ conferem, em geral, cor mais avermelhada e maior estabilidade à oxidação e ao calor do que o aumento das hidroxilações, que por sua vez proporcionam predomínio das cores rosa e azul (BELITZ *et al.*, 2009).

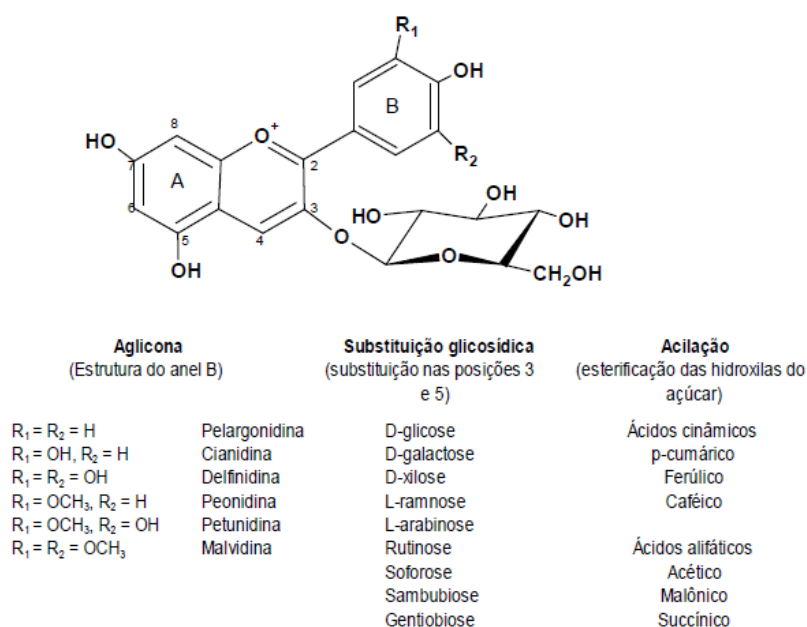
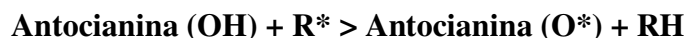


Figura 3.4 – Estruturas químicas das antocianinas (MALACRIDA & MOTTA, 2006)

As antocianinas podem prevenir danos causados pelos radicais livres através de vários mecanismos, como por exemplo, o carreamento direto do radical livre. As antocianinas são oxidadas pelos radicais, resultando em um radical menos reativo e mais estável. Em outras palavras, as antocianinas estabilizam as espécies reativas de oxigênio através de sua reação com o componente reativo do radical. O alto poder de reação do grupo hidroxil das antocianinas com o radical torna-o inativo (NIJVELDT, 2001). Esta reação pode ser observada na equação abaixo:



onde: R^* = radical livre e O^* = radical livre de oxigênio.

Este mecanismo ilustra a importância dos grupos hidroxilas para a elevada capacidade antioxidante das antocianinas, como por exemplo, das delphinidinas e cianidinas (KUSKOSKI *et al.*, 2004).

As antocianinas apresentam cores diferentes dependendo do pH do meio em que se encontram (Figura 3.5), ocorrendo a obtenção de soluções incolores ou coloridas, podendo ser vermelha, violeta, azul ou amarela (TERCI & ROSSI, 2002). Esta possibilidade de mudança de coloração é considerada uma das desvantagens das antocianinas quando comparadas aos corantes sintéticos (ANDERSEN *et al.*, 1998).

Segundo Xavier (2004), em soluções aquosas, as antocianinas se encontram comumente na forma de uma mistura de diferentes estruturas químicas em equilíbrio: cátion flavilium (vermelho), base anidra quinoidal (azul), pseudo-base carbitol (incolor), e chalcona (incolor ou levemente amarela). Em pH abaixo de 2, as antocianinas apresentam-se basicamente na forma catiônica; com o aumento do pH, ocorre uma rápida desprotonação para formar a base quinoidal. Em meio aquoso a hidratação do cátion flavilium leva ao equilíbrio entre a forma carbitol e chalcona. A temperatura ambiente, e em meio levemente acidificado, o equilíbrio entre as formas carbitol e chalcona é muito lento e leva horas para ser atingido. O aumento da temperatura desloca o equilíbrio na direção da formação da base chalcona (HEREDIA *et al.*, 1998).

O meio ácido faz com que o cátion flavilium não seja desprotonado, preservando assim a estrutura. Em pH mais alto ocorre a desprotonação das antocianinas e com isso o oxigênio fica mais reativo ficando mais fácil de ocorrer associação com outra molécula, o que pode dar origem às antocianinas poliméricas.

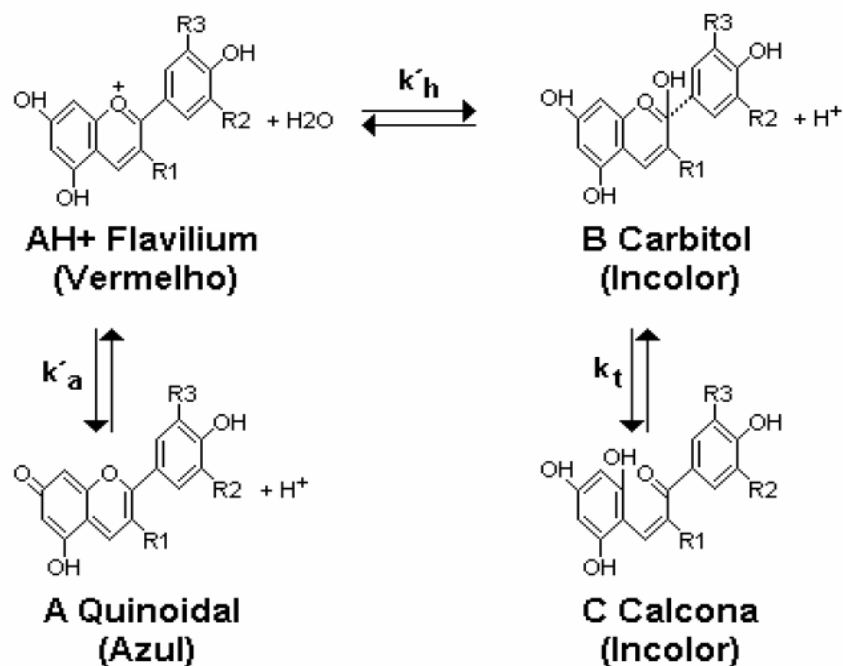


Figura 3.5 – Equilíbrio das antocianinas em solução aquosa (XAVIER, 2004).

3.2.2 Antocianinas na Amora-preta

Segundo Hassimotto *et al.* (2004), dentre os compostos fenólicos identificados em cinco cultivares de amora-preta, a cianidina foi o pigmento que predominou, correspondendo a mais de 65% das antocianinas totais.

Kuskoski *et al.* (2006) encontraram 41,8mg equivalente de cianidina-3-glucosídeo por 100g de antocianinas totais na polpa de amora.

Harbone (1958) caracteriza as principais antocianinas da amora como cianidina-3-glucosídeo (Figura 3.6) e cianidina-3-rutenosídeo (Figura 3.7).

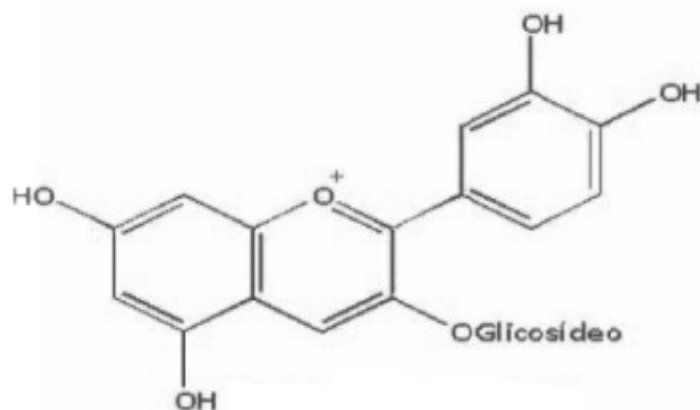


Figura 3.6 – Estrutura da cianidina-3-glicosídeo.

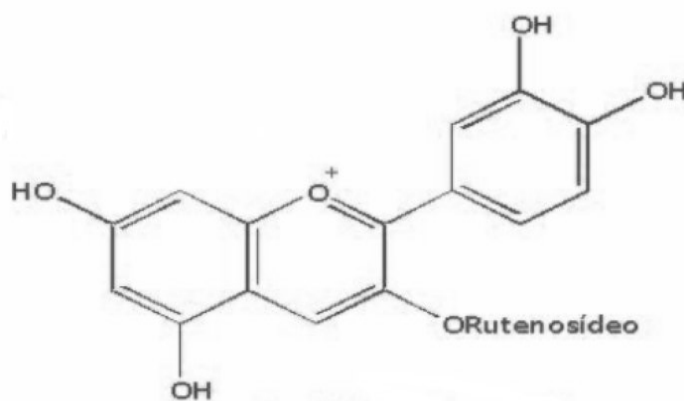


Figura 3.7 – Estrutura da cianidina-3-rutenosídeo.

Segundo Ferreira (2008), as antocianinas identificadas em amora-preta (*Rubus spp.*) cultivar Tupy foram cianidina-3-glucosídeo, cianidina-3-dioxalil-glucosídeo, cianidina-3-malonil-glucosídeo e cianidina-3-rutinosídeo, sendo a primeira a majoritária, correspondendo a aproximadamente 92,7% das antocianinas totais. Foi encontrado teor de antocianinas totais igual a $104,1 \pm 1,7$ mg/100g de fruta.

3.3 Procedimentos analíticos

Grande parte das pesquisas voltadas para a extração, purificação, separação, identificação e quantificação de antocianinas demanda equipamentos caros, além de uma etapa longa de preparo da amostra. Os métodos usados para a análise de antocianinas incluem cromatografia em papel, cromatografia em camada fina, cromatografia em coluna, extração em fase sólida, cromatografia contra-corrente, espectroscopia de absorção UV-Visível, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), espectrometria de massa (MS) e espectrometria de ressonância magnética e nuclear (TAKEOKA & DAO, 2002; SKREDE & WROLSTAD, 2002).

3.3.1 Extração das antocianinas

As antocianinas são muito solúveis em água, sendo extraídas com facilidade a partir do uso de água, metanol e etanol. Com o intuito de prevenir a oxidação destes pigmentos, a extração é realizada em meio ácido (LEE & HONG, 1992).

Apesar da sua toxicidade, o metanol é o solvente mais utilizado na extração das antocianinas. A mistura etanol/água apresenta menor eficiência na extração destes pigmentos. Em termos quantitativos, o metanol é 20% mais eficiente que o etanol, sendo este utilizado somente quando o aspecto quantitativo não é importante (TERCI, 2004).

A temperatura é outro fator que deve ser controlado na etapa de extração das antocianinas. A hidrólise completa dos açúcares ligados às antocianinas ocorre em 1 hora a 60°C na presença de etanol acidificado, ou quando o extrato etanólico é evaporado sob aquecimento com temperaturas superiores a 40°C. Para garantir a integridade das antocianinas deve-se conduzir estas operações abaixo das temperaturas citadas (OKUMURA *et al.*, 2002). O extrato bruto obtido nesta etapa contém, além das antocianinas, outros compostos fenólicos, açúcares e ácidos orgânicos. Desta forma, quando necessário, pode-se fazer a purificação do extrato para utilizá-lo em outras etapas da análise (CAMPOS, 2006).

3.3.2 Isolamento das antocianinas

A cromatografia em coluna aberta é considerada como uma técnica alternativa para o isolamento de substâncias em uma quantidade relativamente alta, as quais podem posteriormente ser usadas como padrões analíticos (PACHECO, 2009). Pelas razões citadas, esta é considerada uma técnica apropriada para o isolamento de antocianinas (CAMPOS, 2006).

Campos (2006) isolou antocianinas presentes em extrato previamente purificado pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência. As frações foram coletadas manualmente diretamente do cromatógrafo para tubos de ensaio, sendo em seguida realizadas leituras de absorvância em espectrofotômetro a 517nm. Após este procedimento, as frações foram mantidas por aproximadamente 4 horas em evaporador para eliminação do solvente.

3.3.3 Identificação e quantificação

3.3.3.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Com origem no grego “chroma + graphein”, a cromatografia ou escrita da cor, é um método contemporâneo que ganhou relevância por volta de 1903, com o botânico Mikhail Semenovich Tswett, nascido em Asti (Itália) a 14 de Maio de 1872, sendo a família originária da Rússia. Após ter estudado na Universidade de Genebra (Suíça), mudou-se para S. Petersburgo (Rússia) em 1896 onde começou a trabalhar como assistente no laboratório de botânica da Academia de Ciências dos Imperadores Russos. Foi mais tarde considerado o pai da cromatografia moderna, através dos vários trabalhos experimentais que efetuou, particularmente na separação de extratos de plantas por adsorção diferencial em colunas de vidro (Figura 3.8), tendo verificado a nítida separação de diversos pigmentos corados. Desde então, enormes avanços têm sido concretizados com elevado mérito por diversos cientistas pioneiros no desenvolvimento e aperfeiçoamento desta importante técnica de separação (ETTRE, 2000).

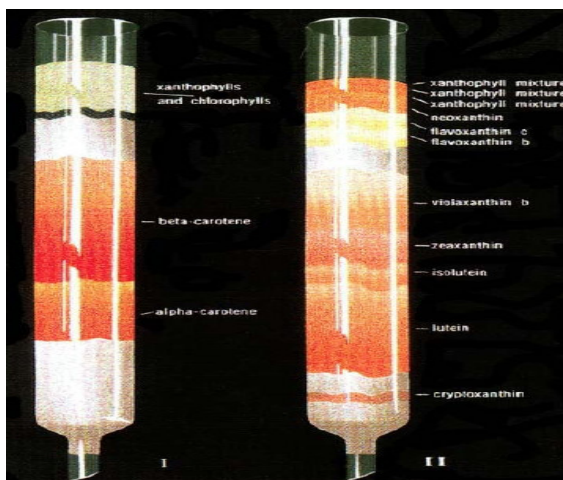


Figura 3.8 - Exemplo de separação cromatográfica de carotenóides em coluna de vidro (PACHECO, 2009).

Segundo Rosa (2005) a cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica instrumental de grande precisão, que utiliza os princípios da cromatografia líquida clássica em equipamentos (figura 3.9).



Figura 3.9 – Modelo comercial de um cromatógrafo líquido (ROSA, 2005).

Um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (Figura 3.10) é composto por um sistema de reservatório de solvente, uma bomba, um injetor de amostra, uma coluna, um detector e um computador com software de aquisição e processamento de dados (ROSA, 2005).

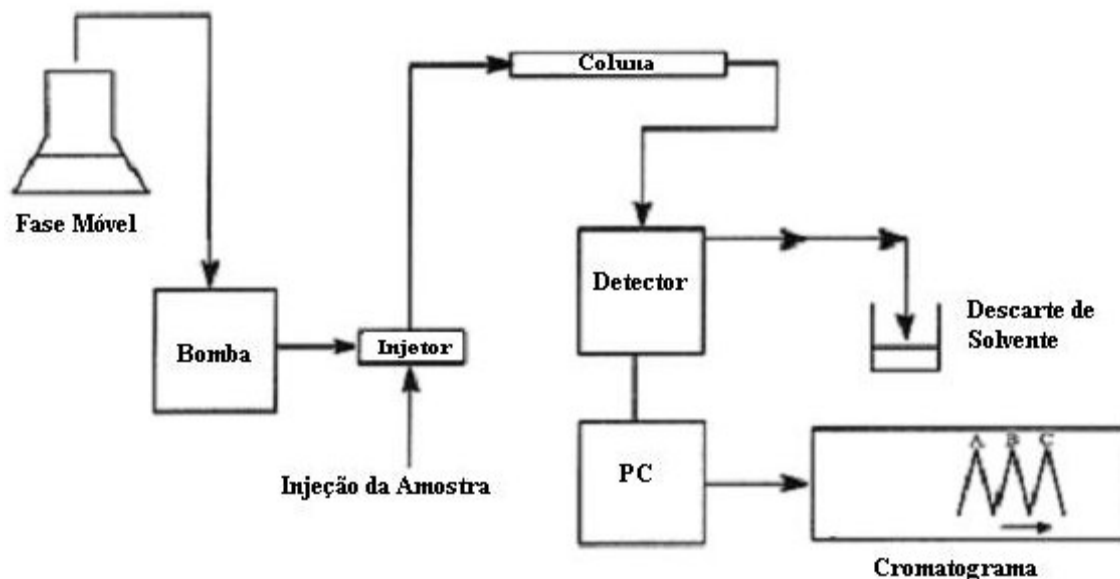


Figura 3.10 – Sistema básico de um cromatógrafo líquido (ROSA, 2005)

O perfil de antocianinas é distinto para diferentes frutas, podendo ainda variar de acordo com a cultivar analisada. Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa acoplada a um detector de arranjo de fotodiodos (DAD) tem sido a ferramenta mais usada ultimamente para a identificação e quantificação das antocianinas. Antocianinas individuais podem ser separadas por sua polaridade, o que as confere tempos de retenção diferentes. A quantificação das antocianinas pode ser realizada pela comparação com um padrão externo. Contudo, quando se usa somente um padrão analítico para quantificar diferentes antocianinas presentes na amostra, normalmente a cianidina-3-glicosídeo, as concentrações reportadas podem ser inferiores às reais (DURST *et al.*, 2005; HONG & WROLSTAD, 1990; FRANCIS 1982). Deve-se ainda ressaltar que a quantificação de antocianinas é considerada um problema crítico devido à dificuldade de se obter padrões comerciais seja pelo alto preço ou pelo baixo grau de pureza disponível no mercado (GIUSTI, 1999).

Na cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa, as colunas utilizadas são aquelas que possuem grupos funcionais apolares (C8, C18 e C30) quimicamente ligados ao suporte de sílica, como ilustrado na Figura 3.11 (ROSA, 2005).

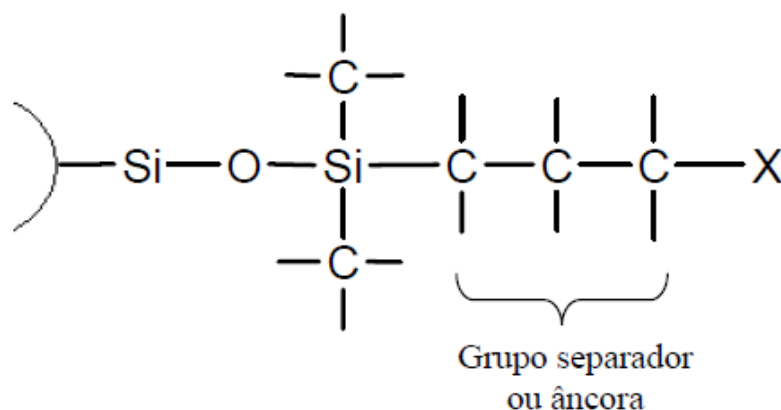


Figura 3.11 - Estrutura de uma fase ligada à sílica. X = OH, CN, NH₂, C₈, C₁₈ ou C₃₀ (ROSA, 2005).

Os mais populares detectores em CLAE são os detectores de absorvância de radiação ultra-violeta. O princípio de funcionamento dos mesmos é que a fase móvel que emerge da coluna passa através de uma pequena célula que é mantida no caminho de um feixe de radiação UV-Visível, provinda de uma lâmpada de deutério (UV), ou tungstênio (Visível). A radiação não absorvida é medida em um dispositivo denominado fotodiodo (SKOOG *et al.*, 1997).

Nos detectores de arranjo de fotodiodos a radiação policromática após passar através da amostra é dispersa por uma grade fixa (monocromadores), atingindo o arranjo de fotodiodos (de 512 a 1024 diodos). Cada diodo mede uma banda estreita de comprimento de onda no espectro, dessa forma o PDA tem uma aquisição de dados paralela, todos os pontos do espectro sendo medidos simultaneamente. A habilidade de fazer medidas de múltiplos comprimentos de onda e a alta velocidade de aquisição significa que várias técnicas de amostragem de sinal podem ser usadas para reduzir o ruído e aumentar a sensibilidade (SKOOG *et al.*, 1997). Outro ponto importante do uso do detector de arranjo de fotodiodos é que através da aquisição de espectros do componente puro e de possíveis impurezas, torna-se viável avaliar a pureza de cada pico (HARBONE, 1993).

Outra metodologia que vem sendo utilizada recentemente para a análise de antocianinas é a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectrômetro de massa. Esta combinação gera resultados para a determinação de estruturas de misturas de antocianinas (GLÄSSGEN *et al.*, 1992b).

É comum quando se trabalha com misturas naturais complexas de antocianinas com uma ampla faixa de polaridade, a necessidade de se otimizar o método cromatográfico, realizando as devidas alterações nos solventes e perfil de gradiente usados (STRACK & WRAY, 1989).

3.3.3.2 Métodos espectroscópicos

Os métodos espectroscópicos englobam a espectroscopia de absorção UV-Visível (Figura 3.12), espectrometria de massa (MS) e a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) (Takeoka & Dao 2002; Skrede & Wrolstad 2002).

O avanço rápido e contínuo nas técnicas instrumentais, em particular as que envolvem espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massa (MS), tem contribuído muito nos últimos anos para a elucidação estrutural em todos os campos da química de produtos naturais. Para as antocianinas isto significa que mesmo as maiores e mais complexas estruturas podem ser determinadas com estas técnicas. Em geral, tais determinações não requerem longas reações de derivatização ou degradação (HARBONE, 1993).

Petri *et al.* (1997) propuseram um método no qual se utiliza a técnica de espectroscopia de absorção UV-Visível para a quantificação de antocianinas, onde o cloreto de uma antocianina padrão, mais precisamente o cloreto de malvidina, é utilizado para a construção de uma curva analítica em meio ácido, onde as antocianinas apresentam-se como cátion flavílico.

Outro exemplo de método usando espectroscopia de absorção UV-Visível é o subtrativo, onde agentes oxidantes são utilizados, provocando a descoloração das antocianinas (WROLSTAD *et al.*, 1982; SOMERS & EVANS, 1974). Pela diferença entre a medida de absorvância da solução de antocianinas e da solução contendo o agente descolorante, a absorvância da antocianina é determinada e convertida em concentração através de uma curva analítica previamente preparada a partir de pigmentos purificados (JACKMAN *et al.*, 1987).

Segundo LEE *et al.* (2008) o método do pH diferencial para quantificação das antocianinas totais, o qual contempla o uso da espectroscopia de absorção UV-Visível, é validado e consiste em uma metodologia simples, rápida e confiável. Esta metodologia tem

sido muito utilizada pelas comunidades científica e industrial para a quantificação das antocianinas. Este método torna-se uma opção vantajosa quando nos extratos há a presença de produtos de degradação (açúcares e antocianidinas). Este método se baseia na obtenção de espectros das soluções em 2 valores de pH, visto que com a alteração deste parâmetro, são observadas transformações nas estruturas das antocianinas e conseqüentemente na coloração das soluções (JACKMAN *et al.*, 1987). São utilizadas soluções de pH 1,0 e 4,5 para diluição do extrato, sendo as leituras feitas em 2 comprimentos de onda (517nm = absorção máxima; 700nm = ausência de absorção). A absorvância das soluções a 517nm em pH 1,0 é proporcional à concentração das antocianinas presentes, enquanto a absorvância das soluções neste mesmo comprimento de onda, porém em pH 4,5, equivale aos produtos de degradação das antocianinas. O cátion flavílico, de coloração vermelha, é a forma predominante em pH 1,0 enquanto que o carbinol, incolor, predomina em pH 4,5. As leituras a 700nm corrigem eventuais espalhamentos de luz causados por partículas em suspensão. A concentração das antocianinas é calculada de acordo com a Equação 3.2, onde a absorvância usada é obtida pela Equação 3.3 (CAMPOS, 2006).

$$C = \frac{A \times M_M}{\epsilon \times b} \quad (Eq.3.2)$$

$$A = (A_{517nm} - A_{700nm})_{pH=1,0} - (A_{517nm} - A_{700nm})_{pH=4,5} \quad (Eq. 3.3)$$

onde:

C é a concentração de antocianinas em g/L;

A é a absorvância calculada pela equação II;

MM é a massa molar da cianidina-3-glicosídica (449,2 g.mol⁻¹);

ε é o coeficiente de absorvância molar da cianidina-3-glicosídeo;

b é o caminho óptico da cubeta usada no espectrofotômetro.

A cianidina-3-glicosídeo é largamente usada como padrão de antocianinas em diversos procedimentos experimentais devido à abundância desta antocianina em frutas vermelhas (TERCI, 2004).



Figura 3.12- Modelo comercial de espectrofotômetro UV-1800 - Shimadzu.

3.3.3.3 CLAE x Espectroscopia de absorção UV-Visível

A cromatografia líquida de alta eficiência é considerada uma técnica muito precisa para a quantificação de antocianinas. A sua principal limitação está relacionada à dificuldade de obtenção e o elevado custo dos padrões comerciais (CHANDRA *et al.*, 2001).

Os métodos espectroscópicos de absorção UV-Visível são considerados uma alternativa de baixo custo, além de não requererem o uso de padrões de antocianinas após o estabelecimento das condições de determinação das mesmas (WROLSTAD *et al.*, 1982).

Segundo Lee *et al.* (2008), o método de pH diferencial, o qual usa espectrofotômetro UV-Visível, é uma boa alternativa para os laboratórios que não possuem um cromatógrafo líquido. A cromatografia líquida de alta eficiência permite a identificação e a quantificação das antocianinas, enquanto que o método de pH diferencial permite somente a quantificação das mesmas.

3.4 Processos de separação por membrana

Uma membrana pode ser definida como uma barreira que separa duas fases e que restringe, total ou parcialmente, o transporte de uma ou várias espécies químicas presentes (CHERYAN, 1986; NOBLE, 1993). A classificação das mesmas pode ser feita a partir das suas características morfológicas como, por exemplo, a presença ou ausência de poros, o

tamanho dos mesmos e o grau de simetria, a partir de características químicas como em relação ao material que a constitui e ainda de acordo com a forma e tipo de módulo em que estão inseridas (MULDER, 1991). O tipo de força motriz utilizado e a composição da membrana definem os diferentes processos: microfiltração, ultrafiltração, nanofiltração, diálise, osmose inversa, evaporação osmótica, pervaporação, permeação de gases (PORTER, 1990).

Os processos com membranas estão sendo aplicados nos mais diferentes setores industriais, para as operações de separação, purificação ou concentração. Esta tecnologia apresenta-se adequada para certas aplicações específicas onde os métodos convencionais de separação mostram-se ineficientes, gerando grande quantidade de efluentes e/ou custo operacional elevado. O aumento da rigidez imposta pelas regulamentações ambientais nas últimas décadas também contribuiu de forma positiva para o crescente uso da tecnologia de separação por membranas. Neste sentido, a utilização de membranas possibilita redução dos desperdícios e aumento nas oportunidades de recuperação e reciclagem de substâncias, possibilidade de separação de compostos termolábeis (HABERT, BORGES & NÓBREGA, 2006).

Os modelos matemáticos visando relacionar a força motriz com o fluxo permeado são importantes para se entender os mecanismos de separação envolvidos nos processos com membranas. A força motriz, pode ser a diferença ou gradiente de pressão hidrostática, de pressão parcial, de concentração e de potencial elétrico (LOPES *et al.*, 2007; MATEUS *et al.*, 1993).

Nos processos que utilizam a diferença de pressão como força motriz o fluxo permeado (JP) é diretamente proporcional a diferença de pressão efetiva (ΔP), conforme apresentado na Equação 3.4.

$$J_p = P_H (\Delta P) \quad (\text{Eq. 3.4})$$

onde:

P_H – permeabilidade hidráulica;

ΔP – diferença de pressão aplicada entre os dois lados da membrana.

A capacidade seletiva da membrana pode ser calculada através do coeficiente de rejeição R , definido como a fração de soluto retida pela membrana, para uma dada concentração de alimentação, como descrito na Equação 3.5:

$$R(\%) = [(C_a - C_p) / C_a] \times 100 \quad (\text{Eq. 3.5})$$

onde:

C_a – concentração de soluto na alimentação;

C_p – concentração de soluto no permeado.

Os processos de micro, ultra e nanofiltração utilizam membranas porosas cuja seletividade é caracterizada pela diferença de tamanho entre as moléculas da solução e os poros da membrana; promovendo, então, um fluxo convectivo com escoamento do permeado por entre os poros. Estes processos diferem entre si pelo tamanho dos poros, que diminuem da microfiltração para a nanofiltração (0,6 μm para 100 Da) aumentando a resistência à permeação e, conseqüentemente, a diferença de pressão aplicada (Figura 3.13) (CRUZ, 2008).

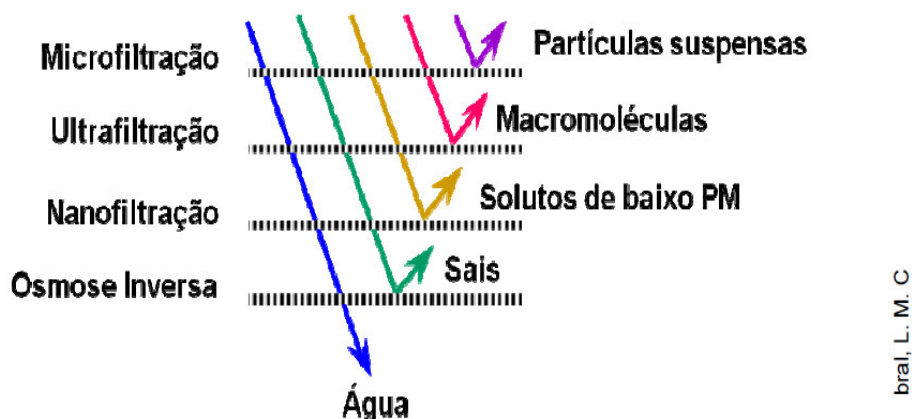


Figura 3.13 – Processos de separação por membrana em função do tamanho dos poros (CRUZ,2008).

O decréscimo no fluxo de filtrado ou permeado, é um dos principais fatores limitantes nestes processos de separação. Tal situação pode estar associada a fenômenos como a polarização por concentração, adsorção e bloqueio de poros. Estes fenômenos podem ser minimizados através de pré-tratamentos que promovam uma diminuição dos

sólidos em suspensão presentes na polpa como a centrifugação, tratamento enzimático ou refino, ou ainda através de alterações das condições de processamento (CRUZ, 2008, LOPES *et al.* 2007).

Os processos de separação por membrana podem ser operados em escoamento tangencial ou frontal (Figura 3.14). Quando ocorre o processamento de uma solução ou de uma suspensão no modo frontal, o permeado passa através da membrana e o soluto, ou os materiais em suspensão, são retidos, ficando acumulados na superfície da membrana. Trata-se de um modo de operação transiente, uma vez que a concentração do soluto próximo à membrana aumenta com o tempo. No escoamento tangencial, a solução ou suspensão escoam paralelamente à superfície da membrana enquanto o permeado é transportado transversalmente à mesma. Neste caso, o escoamento paralelo à membrana limita o acúmulo do material retido sobre a mesma (HABERT *et al.* 2006).

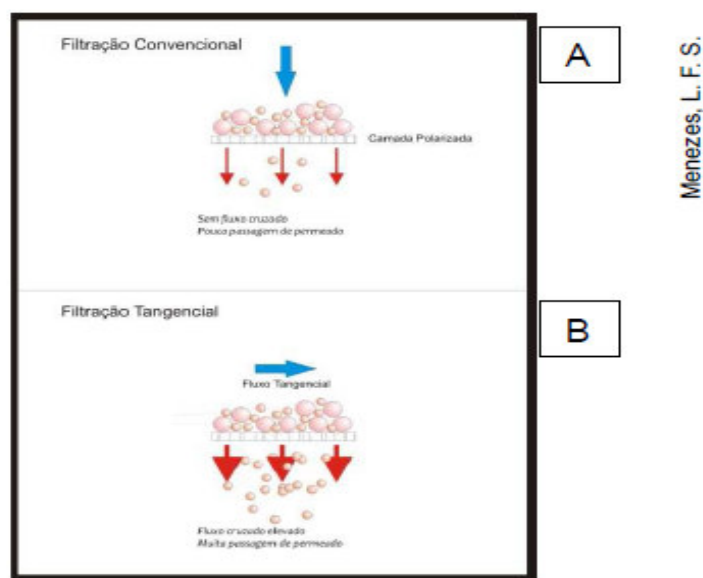


Figura 3.14 – Esquemas de filtração convencional e tangencial (CRUZ, 2008)

3.4.1 Microfiltração

Segundo Paula *et al.* (2002), a maior aplicação da tecnologia de membranas na indústria de suco de frutas tem sido para obtenção de sucos de frutas clarificados através da remoção de celulose, hemi-celulose e pectinas por microfiltração ou ultrafiltração. As substâncias responsáveis pela turbidez do suco são retidas pela membrana, e o produto

permeado é o suco clarificado. Estes processos vêm sendo testados com sucesso, como uma alternativa à clarificação enzimática, que em geral necessita de duas etapas de filtração, além de necessitar de grandes quantidades de auxiliares de filtração, o que aumenta o custo do processo e contribui para o aumento de efluentes tóxicos.

Durante a microfiltração do suco da polpa de frutas, o *fouling*, que se caracteriza pelo aumento da resistência à passagem do solvente pela membrana, podendo ser resultante tanto da diminuição da porosidade (entupimento, adsorção) quanto da polarização de concentração e formação de camada gel na superfície da membrana, pode ser causado por pectinas, taninos, proteínas, amido, hemicelulose e celulose (CARNEIRO *et al.*, 2002; CRUZ, 2008).

Segundo Preventing (2001), as perdas contínuas na capacidade do processo de microfiltração são devidas à formação de uma camada limite que surge naturalmente na superfície da membrana durante a filtração e que, em adição à queda do fluxo da membrana, age como uma membrana secundária reduzindo a seletividade da membrana original.

3.4.2 Tratamento enzimático

A principal dificuldade na produção industrial de sucos de fruta estava associada aos baixos rendimentos em consequência das dificuldades encontradas para se realizar a etapa de filtração e para se obter uma clarificação aceitável dos mesmos (BHAT, 2000). O suco resultante das frutas despulpadas é rico em partículas insolúveis e em materiais suspensos constituídos, principalmente, por substâncias pécticas, polissacarídeos em geral (como, por exemplo, celulose, hemicelulose e o amido), proteínas, taninos, metais e microorganismos (KASHYAP *et al.*, 2001; FERNANDES, 1999). Para superar estas dificuldades, as pesquisas desenvolvidas sobre os processos bioquímicos indicaram a utilização de enzimas de maceração (pectinases, celulases e hemicelulases) durante o processo de industrialização, principalmente como pré-tratamento para sucos a serem clarificados por micro ou por ultrafiltração. O tratamento enzimático reduz a viscosidade do produto, pois promove a hidrólise das macromoléculas presentes (BALISCHI *et al.*, 2002).

A redução na viscosidade de amostras complexas é, portanto, determinante para o desenvolvimento de produtos em grande escala. Possuir informações sobre o comportamento reológico destas amostras possibilita a otimização das condições das operações unitárias envolvidas no processamento (HAMINIUK, 2008).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amora

Foi utilizado como matéria prima o fruto de amora-preta mantido congelado a -18°C por aproximadamente dois meses (até o início do processo), oriundo da cidade de Antônio Prado, Rio Grande do Sul. O fruto estudado, da variedade Tupi, foi adquirido no comércio varejista do Rio de Janeiro da empresa “Mais Fruta Indústria e Comércio Ltda”.

4.2 Solventes e reagentes

Metanol e ácido fórmico, grau de pureza HPLC, da marca Tedia[®].

Água ultrapura obtida do sistema Milli-Q[®] Gradient 10A.

Padrões das antocianinas cianidina-3-O-glicosídeo e cianidina-3-O-rutenosídeo isolados segundo Gouvêa *et al.* (2009).

Enzima: A solução enzimática contendo enzimas pectinolítica utilizada para hidrólise do suco foi a Rapidase[®] TF da DSM *Food Specialities*.

4.3 Isolamento de padrões

Neste trabalho, as antocianinas cianidina-3-O-glicosídeo e cianidina-3-O-rutenosídeo foram isoladas pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência segundo metodologia descrita por Gouvêa *et al.* (2009), possibilitando o uso das mesmas como padrões analíticos para quantificações e identificações. A amostra utilizada para obtenção dos padrões por CLAE foi açaí liofilizado, onde estas duas antocianinas são majoritárias.

O diferencial desta metodologia é que no sistema cromatográfico a saída do detector é conectada a uma válvula seletora de colunas com seis canais Rheodyne[®]. Tal válvula é adaptada para selecionar canais de saída ao invés de possíveis colunas, substituindo o papel do tradicional coletor de frações (Figura 4.1). Para isolar as antocianinas de interesse, a válvula seletora (Figura 4.2) foi programada para direcionar a saída do detector para o canal 1 logo após o início da eluição da cianidina-3-O-glicosídeo (16,2 minutos), voltando a programação para o canal de descarte após a eluição parcial desta antocianina (18,4

minutos). O mesmo procedimento foi realizado para a cianidina-3-O-rutenosídeo, sendo que neste caso a válvula seletora foi programada para direcionar o fluxo de saída do detector para o canal 2 um pouco após a eluição desta antocianina (21,4 minutos), retornando para a posição de descarte também na eluição parcial da mesma (22,9 minutos).

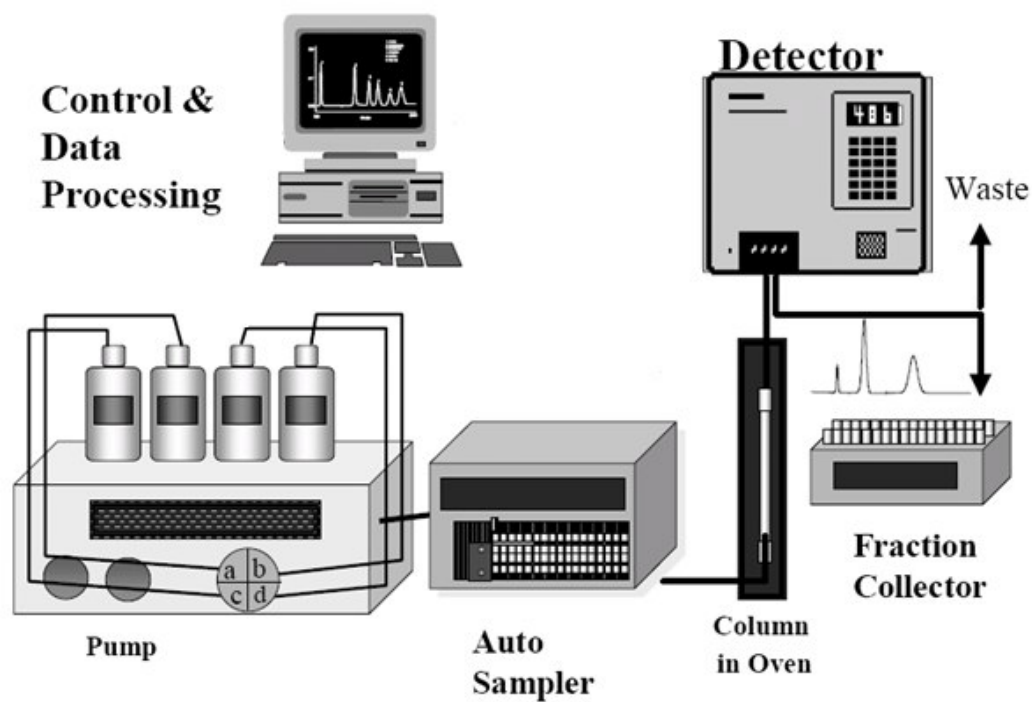


Figura 4.1– Esquema tradicional para coleta de frações por HPLC

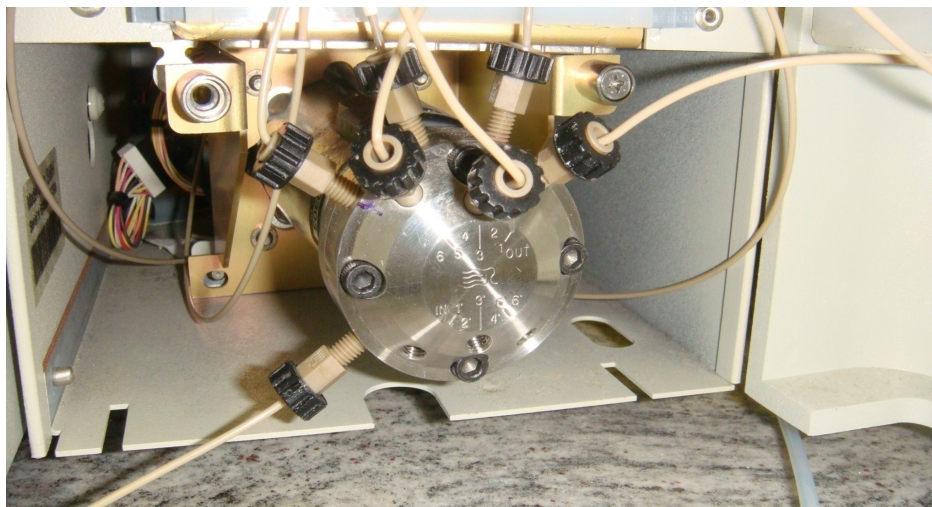


Figura 4.2 – Válvula seletora de colunas Rheodyne®

Após a coleta, uma alíquota das frações isoladas foi injetada no sistema cromatográfico para verificar o grau de pureza dos mesmos, através da avaliação da área dos picos obtidos. As frações coletadas foram concentradas em cartuchos Sep-Pak C18 Waters[®], sendo eluídos com metanol grau HPLC também da marca Tedia[®].

4.3.1 Avaliação da estabilidade dos padrões isolados

Para avaliar a estabilidade dos padrões isolados, os mesmos foram deixados na solução de injeção em vial âmbar, dentro do injetor automático, ou seja, em condição de ausência de luz e submetidos a uma atmosfera não inerte, uma vez que os vials não estavam hermeticamente fechados (o selo da tampa dos mesmos já havia sido perfurado em na injeção para verificação da pureza). Os padrões também permaneceram guardados no injetor durante todo o período do estudo, submetidos a variações da temperatura, já que tal compartimento só era refrigerado nos dias de análise, permanecendo à temperatura ambiente quando não utilizado. Este teste foi realizado por um período 90 dias, para as duas antocianinas e a concentração destes compostos foi avaliada por CLAE pela comparação das áreas obtidas para os mesmos no primeiro e no último dia de análise. A presença de compostos de degradação também foi avaliada através da inserção direta dos padrões em sistema de espectrometria de massas com fonte de ionização *electrospray* positiva.

4.4 Caracterização das antocianinas majoritárias da amora-preta

Para caracterizar as antocianinas majoritárias presentes na amora-preta foi feita a comparação com os tempos de retenção dos padrões segundo método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para determinação de antocianinas, descrito por Araujo *et al.* (2008).

Na etapa de extração uma alíquota de 1,00mL da amostra foi pesada em um tubo com tampa de rosca apropriado para utilização em centrífuga. Adicionaram-se 2,00mL de solução ácido fórmico 10% em metanol e manteve-se sob agitação durante 1 minuto. A seguir a mistura foi submetida a uma etapa de sonificação por 10 minutos e posterior centrifugação a 3000g a 20°C por igual período de 10 minutos. Transferiu-se o sobrenadante para um balão volumétrico de 10,0 mL. O precipitado da centrifugação foi re-

submetido ao processo de lavagem descrito acima até que o sobrenadante obtido perdesse sua coloração. Após as sucessivas extrações, completou-se para 10,0 mL o volume do balão volumétrico com ácido fórmico 10% em metanol. Centrifugou-se a solução obtida na microcentrífuga modelo Bransonic® na velocidade de 14000 rpm por 5 minutos. Uma alíquota de 1mL do sobrenadante obtido foi evaporada sob atmosfera de nitrogênio, realizando-se em seguida a re-suspensão com a mesma quantidade de metanol 10% em ácido fórmico 10%. O extrato ressuspendido foi transferido para um *vial* e levado ao injetor do cromatógrafo líquido.

A análise cromatográfica foi realizada em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Waters® Alliance modelo 2690/5, com detector de arranjo de fotodiodos Waters® modelo 2996, *software Empower*®, coluna *Symmetry*® C18 3,5µm (4,6 x 150mm), fluxo de 1,0 mL/min, 50µl de injeção e comprimento de onda igual a 520nm. A fase móvel utilizada foi ácido fórmico 10% em água (solvente A) e metanol (solvente B) sendo o modo de eluição do tipo gradiente linear (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 – Adequação do gradiente de concentração da fase móvel

| Solvente B (metanol) | Tempo de corrida (minutos) |
|-----------------------------|-----------------------------------|
| 5-15% | 0-20 |
| 15-25% | 20-35 |
| 25-5% | 35-40 |
| 5% | 40-45 |

Para confirmar a presença da cianidina-3-O-rutenosídeo na amora-preta, raramente relatada na literatura, utilizou-se também a técnica de adição-padrão, realizada na diluição 1:2 de uma solução de amora-preta com uma solução padrão de cianidina-3-O-rutenosídeo, avaliando-se em seguida os valores de área obtidos.

4.5 Análises físico-químicas

4.5.1 pH

As determinações de pH do suco de amora-preta integral e de outras correntes do processo foram realizadas em titulador automático *Metrohm*®, modelo 785 DMP – *Titrimo*, após calibração do aparelho com tampões de pH 4,00 e 7,00.

4.5.2 Sólidos Solúveis em °Brix

O teor de sólidos solúveis da matéria-prima e de outras correntes do processo foi determinado manualmente em refratômetro modelo *Bellingham + Stanley Limited* com correção de temperatura (20°C) e expresso em °Brix.

4.5.3 Acidez total titulável

A acidez total da matéria-prima e de outras correntes do processo foi determinada em titulador automático *Metrohm*®, modelo 785 DMP – *Titrimo*, com reagente hidróxido de sódio fatorado com biftalato de sódio. Os valores foram expressos em $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ de amostra.

4.6 Análise de viscosidade

As análises de viscosidade das amostras foram realizadas em reômetro de cilindros concêntricos AR-G2 acoplado ao software *Rheology Advantage Control AR* (Figura 4.3). A temperatura foi definida na faixa de operação típica do processo de microfiltração de sucos de frutas que leva em conta as características termolábeis dos compostos antioxidantes

Os experimentos foram conduzidos em triplicata para o suco integral de amora e para amostras previamente submetidas a um pré-tratamento enzimático, variando-se a concentração do extrato enzimático conforme planejamento apresentado na Tabela 4.2. A faixa de concentração da extrato enzimático (*Rapidase*) foi selecionada com base em dados da literatura para microfiltração de polpas de frutas ricas em pectina (VAILLANT, 2001).

Tabela 4.2 – Planejamento experimental para análise de viscosidade

| Amostras | Análise de viscosidade | | | |
|--|------------------------|------|------|------|
| | 20°C | 25°C | 30°C | 35°C |
| Suco integral | 20°C | 25°C | 30°C | 35°C |
| Suco + 2mL/kg do extrato enzimático (30 min a 35°C) | 20°C | 25°C | 30°C | 35°C |
| Suco + 4mL/kg do extrato enzimático (30 min a 35°C) | 20°C | 25°C | 30°C | 35°C |
| Suco + 6mL/kg do extrato enzimático (30 min a 35°C) | 20°C | 25°C | 30°C | 35°C |



Figura 4.3 – Reômetro AR-G2

4.6.1 Tratamento matemático dos dados

Os dados de viscosidade aparente em função da temperatura foram ajustados pela equação de Arrhenius (Equação 3.1) usando-se o método de regressão linear. A ordem de grandeza da energia de ativação avalia a sensibilidade da viscosidade com a temperatura (FOX & McDONALD, 2001).

O comportamento reológico da polpa integral e das amostras hidrolisadas foi analisado pelo modelo de potência (Equação 3.2).

O efeito da concentração do extrato enzimático na redução da viscosidade do suco foi avaliado pelo teste de comparação de médias de Fisher ($p < 0,05$) usando o software XLSTAT (versão 2006).

4.7 Processo

4.7.1 Despolpamento da amora

Após descongelamento, 8kg de amora-preta foram despolpados na despolpadeira Itametal (Modelo Compacta/ Fase 220M/ No 356/ CV 1), com um único estágio, operando por gravidade e à temperatura ambiente.

4.7.2 Tratamento enzimático

O tratamento enzimático foi realizado na condição previamente selecionada (4mL/kg extrato enzimático, a 35°C por 30 minutos), na qual se obteve maior redução a na viscosidade da polpa de amora (Figura 4.4).



Figura 4.4 – Tratamento enzimático do suco

4.7.3 Centrifugação

Após o tratamento enzimático o suco foi centrifugado em centrífuga de cesto International Equipment Company, modelo SIZE 2 com rotação de 406g para separação das fibras insolúveis.

4.7.4 Microfiltração (MF)

Limpeza: a limpeza do sistema de MF foi realizada com água destilada a 70 a 80°C, 2,5% de NaOH e 400 ppm de cloro. Essa solução foi recirculada pelo sistema por 20 minutos. Após esse tempo, aplicou-se durante 10 minutos uma pressão de 0,5 bar para a limpeza dos poros da membrana. A seguir, retirou-se a solução de limpeza e recirculou-se água filtrada até o permeado atingir pH em torno de 7,0 (medição com fita).

Teste da permeabilidade hidráulica: a permeabilidade hidráulica do módulo foi determinada para avaliar a eficiência da etapa de limpeza. Para este teste foram utilizados 4L de água destilada (aquecida a 35°C) e o fluxo foi determinado nas pressões de 2; 2,5; 3 e 4bar.

Microfiltração do suco de amora: a clarificação do suco de amora por MF foi conduzida em um sistema de membranas tubulares composto por três membranas de α -alumina em série com poros de 0,1 μ m de diâmetro e área filtrante total de 0,0165 m², a 35°C. O sistema operou com vazão de 850 L/h, pressão aplicada à membrana igual a 3bar e temperatura de 35 \pm 2°C. A vazão e o volume de permeado foram medidos em intervalos de 10 minutos para o cálculo do fluxo de permeado e do FRV (fator de redução volumétrica), respectivamente. A temperatura do processamento foi selecionada a partir dos dados reológicos.

4.8 Análise das antocianinas por CLAE

A solução, preparada a partir do padrão isolado e ressuspenso em balão volumétrico de 5 mL com a solução de injeção (metanol 10% em ácido fórmico 10%) para o sistema

cromatográfico, teve sua concentração determinada pela leitura de sua absorvância a 520nm em espectrofotômetro *Shimadzu*® UV1800.

Uma alíquota de 100µL da solução preparada com o padrão isolado foi seca sob nitrogênio e ressuspensa com 2mL da solução. Para a cianidina-3-O-glicosídeo a absorvância molar é conhecida para a solução 1% HCl em metanol ($\epsilon=34300 \text{ L/mol.cm}$), enquanto para a cianidina-3-O-rutenosídeo a absorvância molar é dada para a solução 1% HCl em água ($\epsilon=28840 \text{ L/mol.cm}$) (COHEN, 2006; GIUSTI *et al.*, 1999).

O cálculo da concentração em mg/100g das soluções preparadas de cianidina-3-O-glicosídeo e cianidina-3-O-rutenosídeo foi feito de acordo com a Lei de Lambert-Beer (Eq. 3.1), levando-se em conta a pureza da cada solução obtida por prévia injeção cromatográfica, a massa molar de cada antocianina isolada (cianidina-3-O-glicosídeo = $449,2 \text{ g.mol}^{-1}$; cianidina-3-O-rutenosídeo = 594 g.mol^{-1}) e as diluições feitas para a realização da leitura da absorvância (eq. 4.4).

$$C = \frac{P \times A \times 10^3 \times M_M \times FD}{\epsilon \times b} \dots\dots\dots(\text{Eq.4.1})$$

onde:

c é a concentração da antocianina em mg/5mL;

P é o percentual de pureza equivalente ao percentual de área da antocianina;

A é a absorvância obtida a 520nm;

10^3 é o fator para converter a concentração de g para mg;

M_M é a massa molar da antocianina;

FD é o fator de diluição (FD = 0,10);

ϵ é o coeficiente de absorvância molar da antocianina no solvente usado (L/mol.cm);

b é o caminho óptico da cubeta usada no espectrofotômetro (cm).

Com o valor da concentração conhecido, foi possível preparar, por diluição, outros pontos para construção da curva de calibração, cada um com volume final de 200µL. Os pontos foram injetados sob as mesmas condições cromatográficas descritas anteriormente,

sendo a curva de calibração feita a partir dos valores de concentração em função da área dos picos (Tabela 4.3). Para a escolha destes valores, uma amostra foi previamente injetada e observando-se a área obtida, foi possível escolher pontos do padrão que dariam áreas acima e abaixo deste valor, englobando assim a concentração da amostra na curva, uma vez que a área do pico é diretamente proporcional à concentração do analito. Cada condição experimental da curva foi realizada em triplicata.

Tabela 4.3 – Diluições da solução padrão para obtenção da curva de calibração

| | Solução padrão (µL) | Solução de injeção (µL) |
|----------------|----------------------------|--------------------------------|
| Ponto 1 | 5 | 195 |
| Ponto 2 | 10 | 190 |
| Ponto 3 | 20 | 180 |
| Ponto 4 | 30 | 170 |
| Ponto 5 | 50 | 150 |
| Ponto 6 | 100 | 100 |
| Ponto 7 | 150 | 50 |
| Ponto 8 | 200 | 0 |

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento de padrões

Os padrões de antocianinas, isolados do açaí usando método modificado por Gouvêa *et al.* (2009), apresentaram alta pureza, sendo 98,9% para a cianidina-3-O-glicosídeo e 97,2% para a cianidina-3-O-rutenosídeo. Estes valores foram obtidos a partir do percentual de área de cada pico após injeção em sistema cromatográfico dos compostos já isolados (Figuras 5.1 e 5.2). Através dos espectros de cada padrão, representados pelas figuras 5.3 e 5.4, também foi possível confirmar a pureza dos mesmos, uma vez que não foi observada alteração nas bandas.

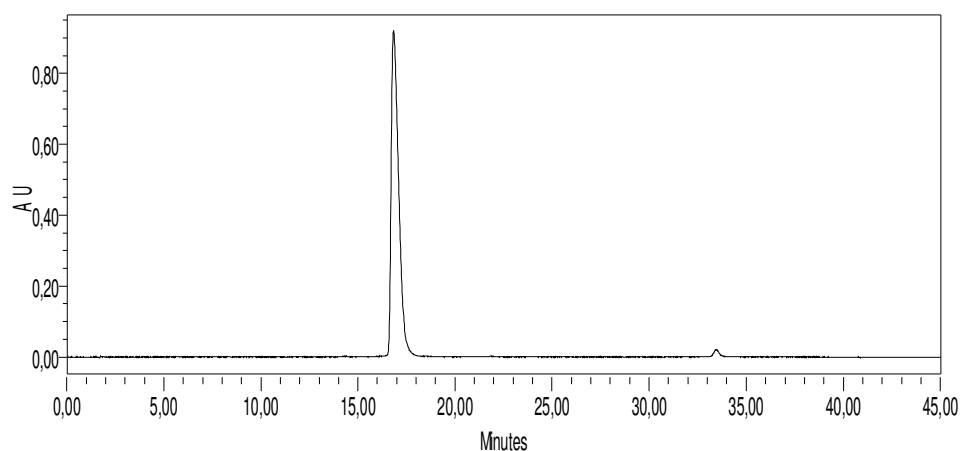


Figura 5.1 – Cromatograma da antocianina cianidina-3-O-glicosídeo isolada

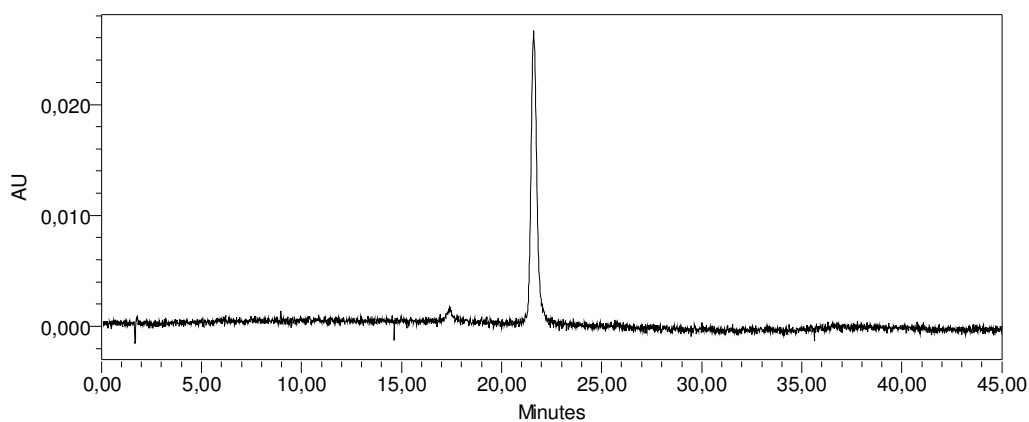


Figura 5.2 – Cromatograma da antocianina cianidina-3-O-rutenosídeo isolada

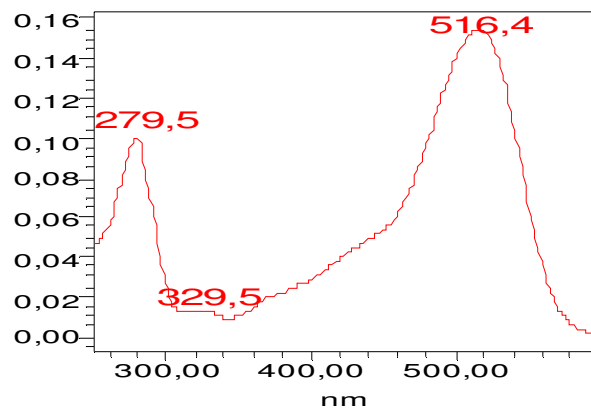


Figura 5.3 – Espectro da antocianina cianidina-3-O-glicosídeo isolada

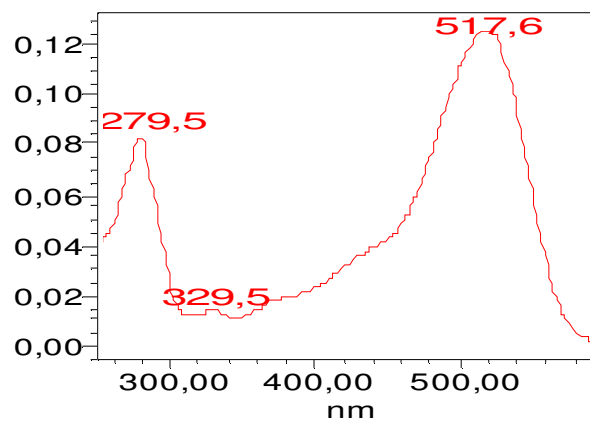


Figura 5.4 – Espectro da antocianina cianidina-3-O-rutenosídeo isolada

Na tabela 5.1 estão apresentadas as concentrações de cada ponto das curvas construídas a partir dos padrões isolados (Figuras 5.5 e 5.6), ressaltando-se que cada ponto foi injetado em triplicata.

Tabela 5.1– Concentração dos pontos das curvas de calibração da cianidina-3-O-glicosídeo e cianidina-3-O-rutenosídeo

| | Solução padrão (µL) | Solução de injeção (µL) | Concentração do ponto (mg/5ml) – cianidina-3-O-glicosídeo | Concentração do ponto (mg/5ml) – cianidina-3-O-rutenosídeo |
|----------------|----------------------------|--------------------------------|--|---|
| Ponto 1 | 5 | 195 | 0,015 | 0,004 |
| Ponto 2 | 10 | 190 | 0,031 | 0,007 |
| Ponto 3 | 20 | 180 | 0,062 | 0,015 |
| Ponto 4 | 30 | 170 | 0,093 | 0,022 |
| Ponto 5 | 50 | 150 | 0,155 | 0,036 |
| Ponto 6 | 100 | 100 | 0,309 | 0,073 |
| Ponto 7 | 150 | 50 | 0,464 | 0,109 |
| Ponto 8 | 200 | 0 | 0,618 | 0,145 |

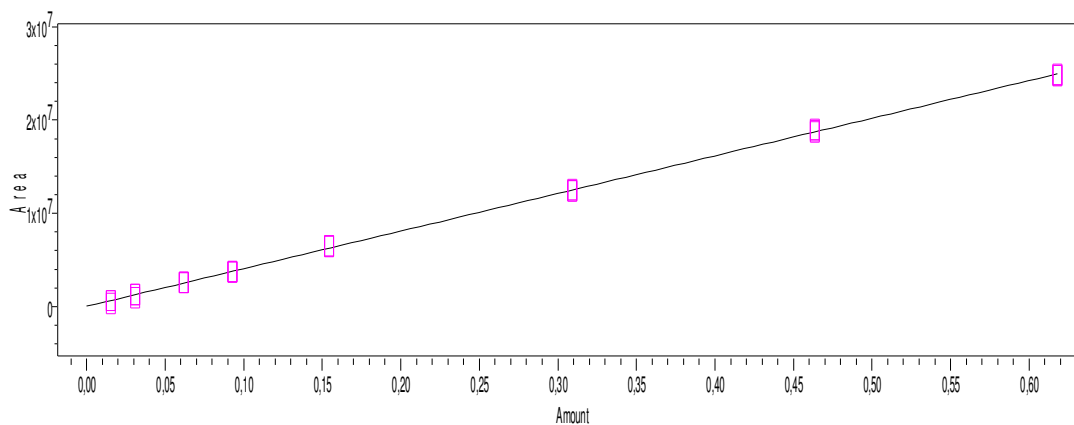


Figura 5.5 – Curva de calibração obtida para cianidina-3-O-glicosídeo

(Equação da reta: $Y=4,03 \cdot 10^7 X + 2,81 \cdot 10^4$; $R^2=0,999$)

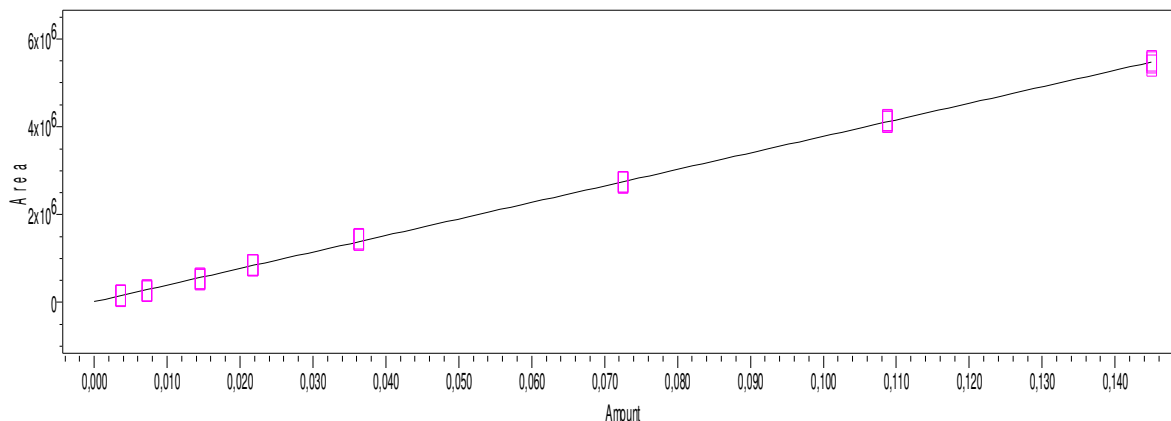


Figura 5.6 – Curva de calibração obtida para cianidina-3-O-rutenosídeo
(Equação da reta: $Y=3,76 \cdot 10^7 X + 1,75 \cdot 10^4$; $R^2=0,999$)

5.2 Avaliação da estabilidade dos padrões isolados

Na avaliação da estabilidade dos padrões isolados, não foi observada redução da concentração de cada padrão no seu respectivo vial. Os valores de área obtidos para o pico de cianidina-3-O-glicosídeo no primeiro e no último dia de teste foram 1738285 e 1789809, respectivamente (Tabela 5.2). Para a cianidina-3-O-rutenosídeo, os valores encontrados foram 4886836 e 5398895, para o primeiro e último dia de teste, respectivamente (Tabela 5.2). Observou-se um pequeno aumento na área e conseqüentemente na concentração do padrão de cianidina-3-O-glicosídeo, o que pode ser explicado pela evaporação do metanol presente no vial, uma vez que tal frasco não encontrava-se hermeticamente fechado. A ausência de degradação também foi comprovada pelo perfil cromatográfico dos dois padrões, que permaneceu inalterado para os dois dias de teste (Figuras 5.7, 5.8, 5.9 e 5.10). Além disso, nos espectros de massa das antocianinas não foi detectada a presença de possíveis compostos de degradação (Figuras 5.11 e 5.12). Estes resultados, quando comparados com injeções de padrões isolados, armazenados somente em solvente sem redução do pH, apresentam grande vantagem, uma vez que a segunda situação não é capaz de inibir a degradação das antocianinas em questão.

Tabela 5.2 – Avaliação da estabilidade das antocianinas

| | Área cianidina-3-O-glicosídeo | Área cianidina-3-O-rutenosídeo |
|------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| início do teste | 1738285 | 4886836 |
| fim do teste* | 1789809 | 5398895 |

*após 3 meses de armazenamento

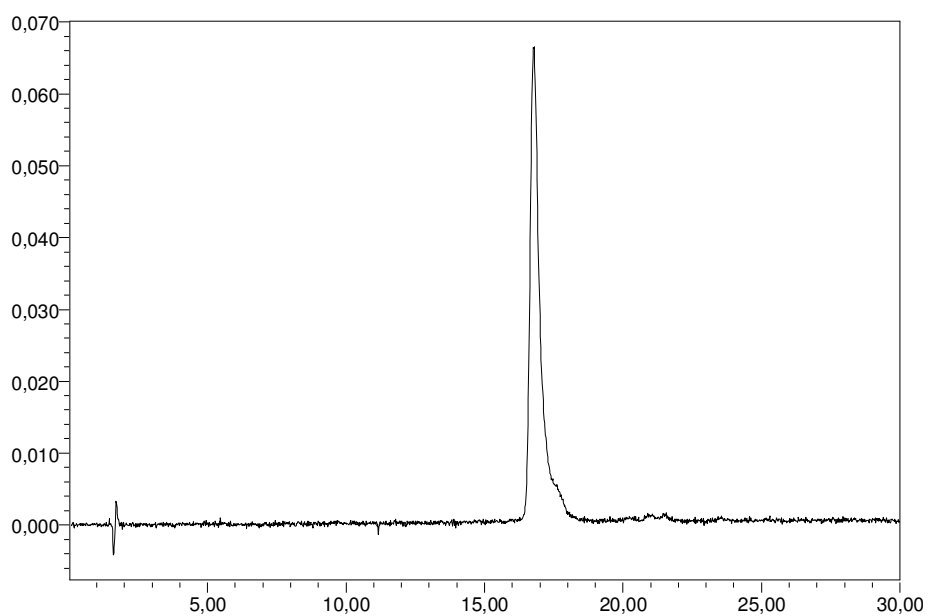


Figura 5.7 – Perfil cromatográfico da cianidina-3-O-glicosídeo no início do estudo de estabilidade (18/02/2009).

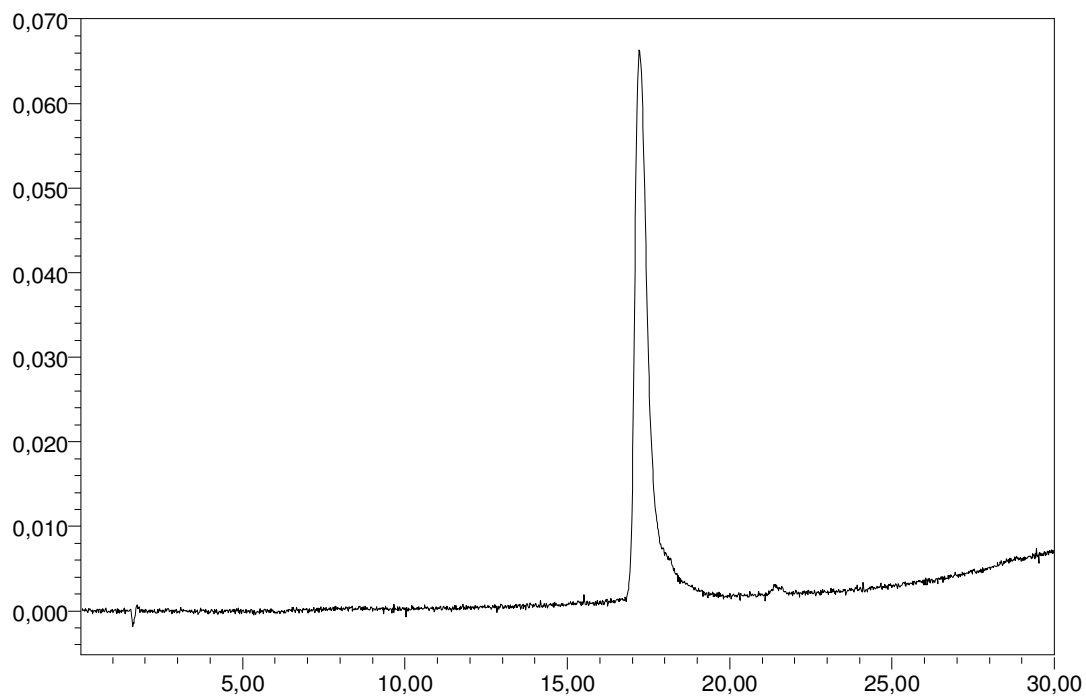


Figura 5.8 – Perfil cromatográfico da cianidina-3-O-glicosídeo no fim do estudo de estabilidade (06/05/2009)

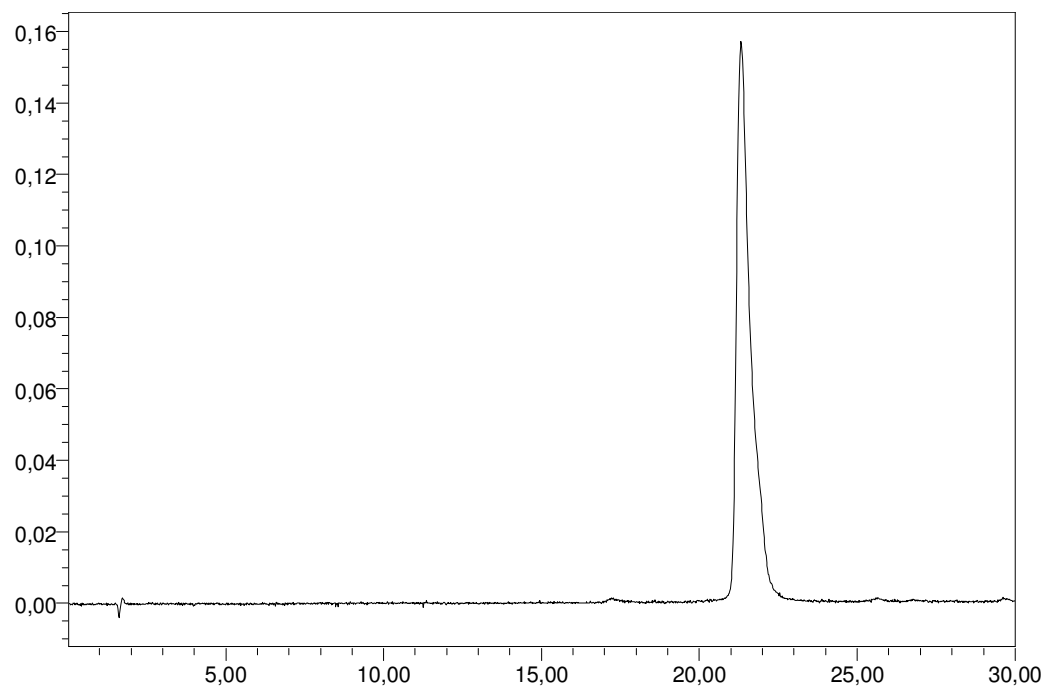


Figura 5.9 – Perfil cromatográfico da cianidina-3-O-rutenosídeo no início do estudo de estabilidade (11/02/2009)

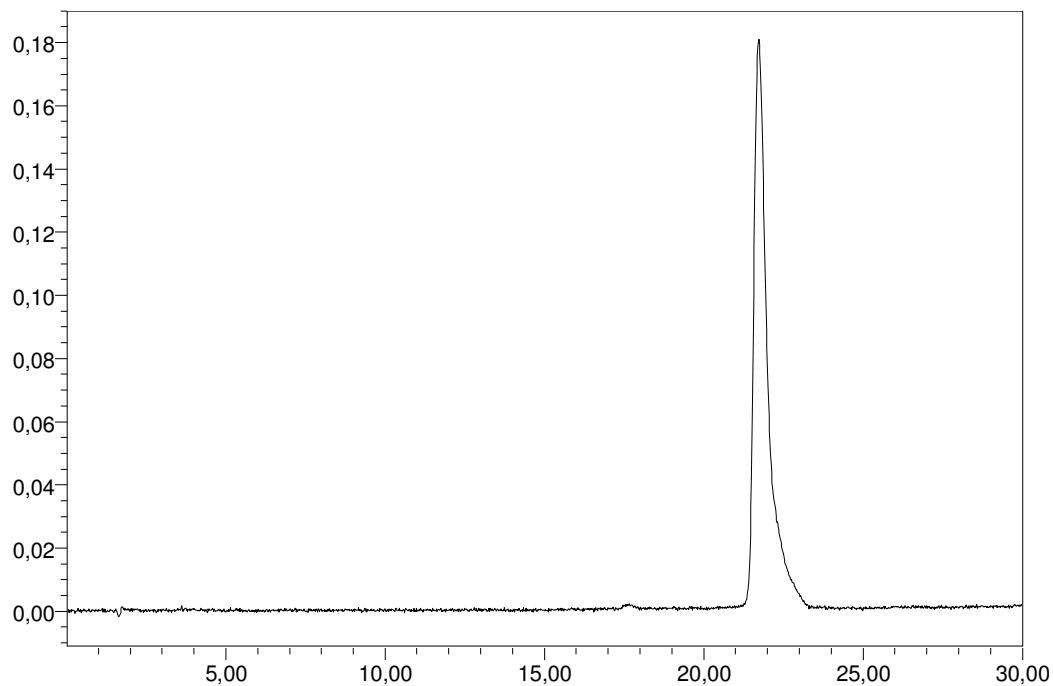


Figura 5.10 – Perfil cromatográfico da cianidina-3-O-rutenosídeo no fim do estudo de estabilidade (14/05/2009)

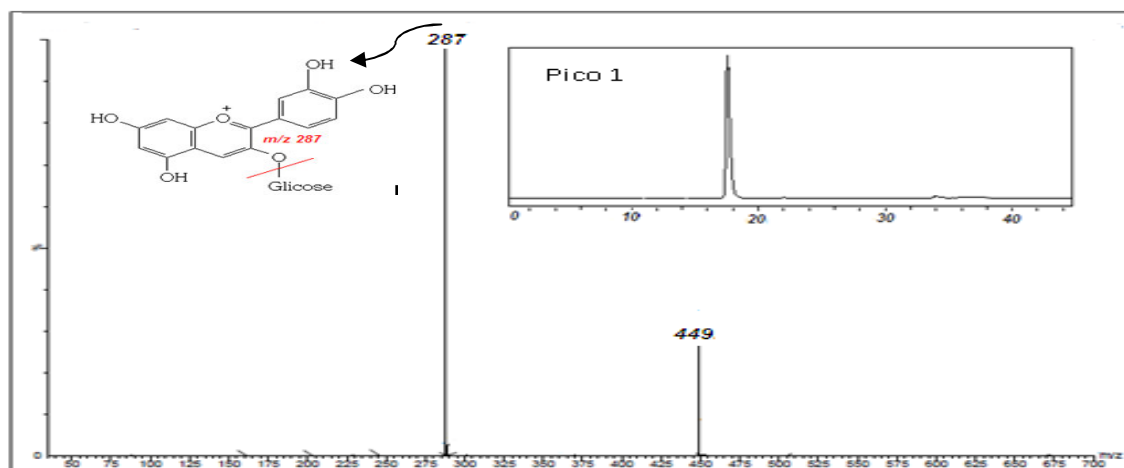


Figura 5. 11 – Espectro MS-MS do padrão isolado de cianidina-3-O-glicosídeo.

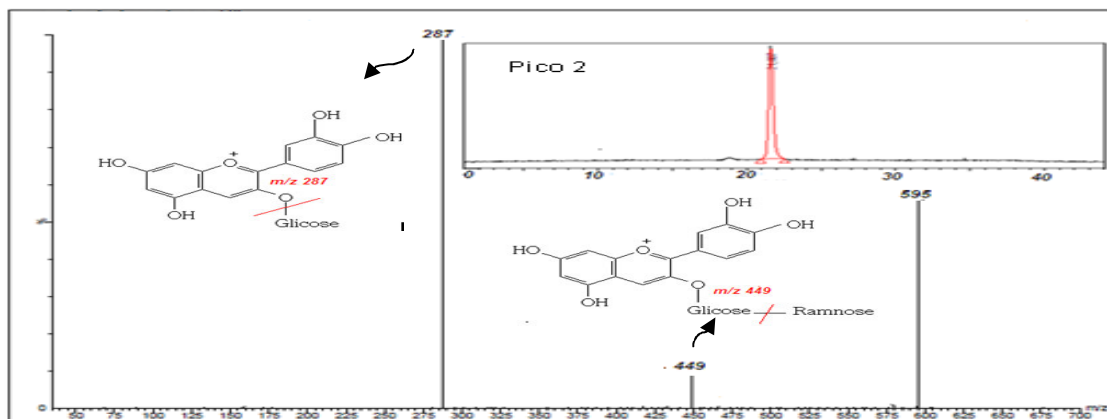


Figura 5.12 – Espectro MS-MS do padrão isolado de cianidina-3-O-rutenosídeo

5.2 Caracterização das antocianinas majoritárias da amora-preta

A identificação das duas antocianinas majoritárias da amora-preta foi confirmada através de sobreposição com os picos da cianidina-3-O-glicosídeo e cianidina-3-O-rutenosídeo do açaí, apresentadas nas figuras 5.13 e 5.14, validando assim os resultados reportados por Harbone (1958) e Kuskoski *et al.* (2006).

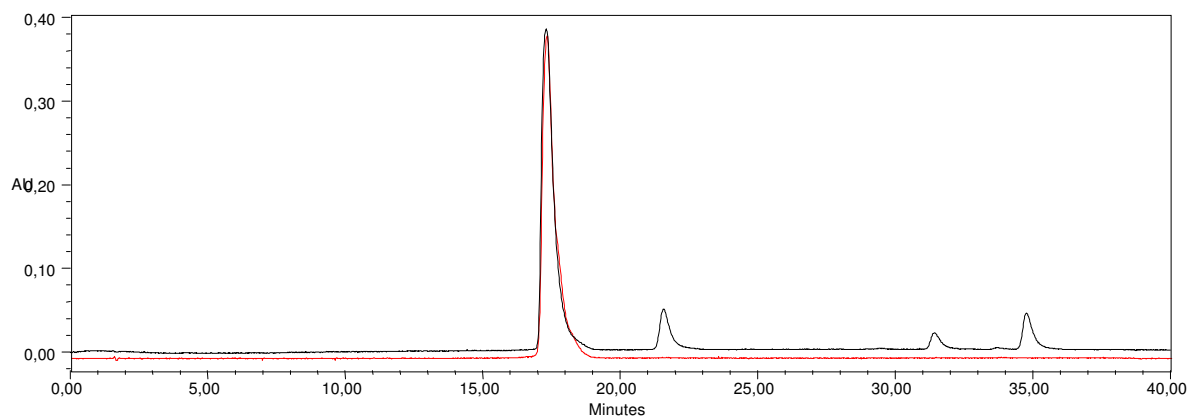


Figura 5.13 – Cromatograma do suco da amora-preta (em preto) sobreposto com cromatograma do padrão de cianidina-3-O-glicosídeo (em vermelho).

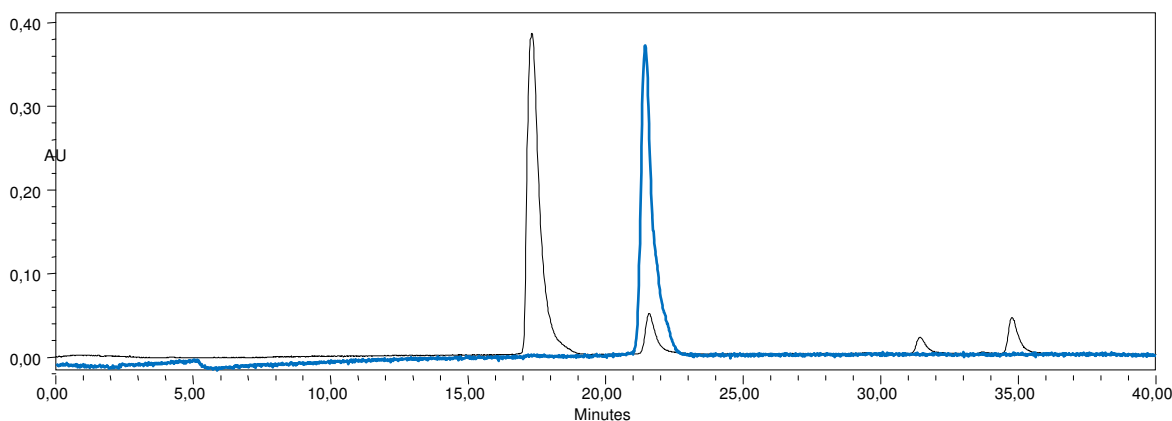


Figura 5.14 – Cromatograma do suco da amora-preta (em preto) sobreposto com cromatograma do padrão de cianidina-3-O-rutenosídeo (em azul).

Os outros picos observados no perfil cromatográfico podem estar relacionados à presença em menor quantidade de outras antocianinas já relatadas na literatura ou ainda de antocianidinas, sendo necessária a continuidade dos testes para confirmação destes dados.

Foi possível também confirmar a presença da cianidina-3-O-rutenosídeo através do procedimento de adição-padrão com o padrão previamente isolado a partir do açaí. Observou-se que após a diluição de 1:2 do extrato antociânico de amora-preta com uma solução padrão de cianidina-3-O-rutenosídeo, as áreas de todos os picos presentes no cromatograma foram reduzidas à metade, exceto a do pico com o tempo de retenção da cianidina-3-O-rutenosídeo (Tabela 5.3).

Tabela 5.3 – Áreas após diluição 1:2 da solução do extrato antociânico de amora-preta

| | Área inicial | Área após diluição com solução padrão de cianidina-3-O- rutenosídeo | % Redução de área |
|---|--------------|---|-------------------|
| Pico 1 ($T_R=17,4\text{min}$): Cianidina-3-O- glicosídeo | 44574413 | 23889649 | 46,4% |
| Pico 2 ($T_R=21,3\text{min}$): Cianidina-3-O- rutenosídeo | 4226122 | 3563667 | 15,7% |

Pode-se constatar no presente trabalho que a cianidina-3-O-glicosídeo corresponde a 81% das antocianinas totais da amora-preta, enquanto a cianidina-3-O-rutenosídeo equivale a 9%. Ferreira (2008) observou em sua pesquisa que a cianidina-3-O-glicosídeo correspondeu a 92,7% das antocianinas totais da amora-preta analisada.

5.3 Análises físico-químicas

A matéria-prima e as amostras de outras correntes do processo foram avaliadas quanto ao pH, teor de sólidos solúveis e acidez total (tabela 5.4).

O aumento observado após o tratamento enzimático da amora-preta para os parâmetros sólidos solúveis e acidez total está relacionado com a hidrólise da parede celular, o que possibilita a liberação de substâncias contidas na mesma.

Embora a acidez total tenha apresentado aumento, o pH não teve alteração significativa durante o processo devido à presença de compostos tamponantes nas frutas.

Tabela 5.4 – Parâmetros físico-químicos da amora-preta

| | pH | Sólidos solúveis (°Brix) | Acidez total (mg/100g) |
|--|------|-----------------------------|---------------------------|
| Amora-preta | 3.27 | 5.27 | 14.93 |
| Amora após tratamento enzimático | 3.28 | 8.10 | 18.13 |
| Alimentação da MF (suco centrifugado) | 3.34 | 8.07 | 16.92 |
| Torta (centrifugação) | 3.28 | 8.02 | 19.26 |
| Permeado | 3.27 | 7.97 | 15.65 |
| Retido | 3.25 | 8.95 | 19.62 |

5.4 Avaliação do processo de microfiltração

5.4.1 Despolpamento da amora

Como se pode observar na Tabela 5.5, na etapa de despolpamento houve uma perda de aproximadamente 5 % da massa de matéria-prima.

Tabela 5.5 – Balanço de massa da etapa de despolpamento da amora-preta

| | Amostra inicial (amora fruta) | Amostra despolpada | Torta do despolpamento | Perda |
|----------|----------------------------------|-----------------------|---------------------------|-------|
| Processo | 8000g | 6465,1g | 1144,3g | 4,9% |



Figura 5.15 – Amostra inicial (amora descongelada)



Figura 5.16 – Amora despolpada



Figura 5.17 – Torta do despolpamento

Observou-se a mudança de coloração do fruto *in natura* após período de congelamento de aproximadamente 2 meses (Figuras 5.15, 5.15 e 5.17), provavelmente devido ao início do processo de degradação das antocianinas já nesta etapa de armazenamento.

5.4.2 Tratamento enzimático

O pré-tratamento enzimático do suco de amora reduziu drasticamente a viscosidade e tornou possível o escoamento do mesmo através da membrana de microfiltração.

Após avaliação da viscosidade do suco da amora-preta fixando a taxa de deformação em 10 s^{-1} , 100 s^{-1} e 1000 s^{-1} , observou-se que em todas as condições a viscosidade obtida com 4mL/kg do extrato enzimático é bem menor que a do suco integral e menor que a do suco tratado com 200ppm da mesma enzima. Entretanto, de 4mL/kg para 6mL/kg não houve uma redução significativa na viscosidade do suco, de acordo com teste Fisher (Tabela 5.6). Como esperado, a menor viscosidade foi obtida na maior temperatura de análise (Figura 5.18).

Tabela 5.6 – Grupos de resultados divididos por igualdade de influência usando o software XLSTAT.

| Concentração do extrato enzimático (mL/kg) | Média (cP) | Grupos |
|--|------------|--------|
| 0 | 80,000 | A |
| 2 | 5,315 | B |
| 6 | 4,260 | C |
| 4 | 4,230 | C |

Teste de Fisher para comparação de médias ($p < 0,05$) usando o software XLSTAT (versão 2006)

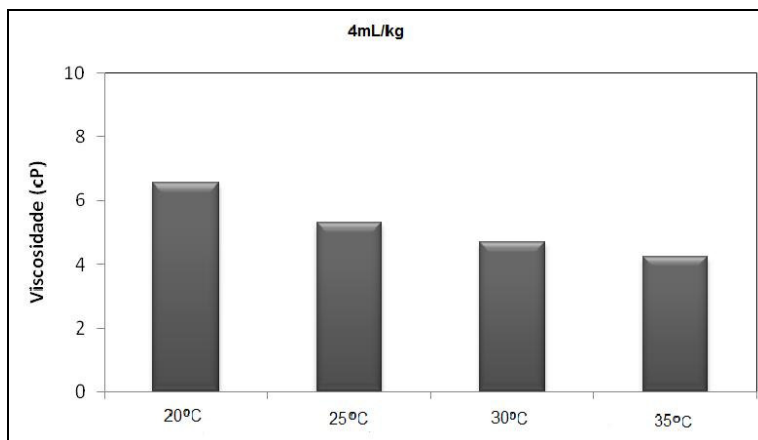


Figura 5.18 – Efeito da temperatura sobre a viscosidade do suco de amora-preta, tratado com 4mL/kg de extrato enzimático (Rapidase) com taxa de deformação fixa em $10s^{-1}$

As figuras 5.19, 5.20 e 5.21 apresentam o comportamento reológico do suco de amora tratado com 2, 4 e 6mL/kg de extrato enzimático (Rapidase) a $35^{\circ}C$ para taxas de deformação fixas em $10s^{-1}$, $100s^{-1}$ e $1000s^{-1}$, respectivamente. Além do efeito do tratamento enzimático, também é possível observar a redução da viscosidade com o aumento da taxa de deformação indicando um comportamento de fluido pseudoplástico.

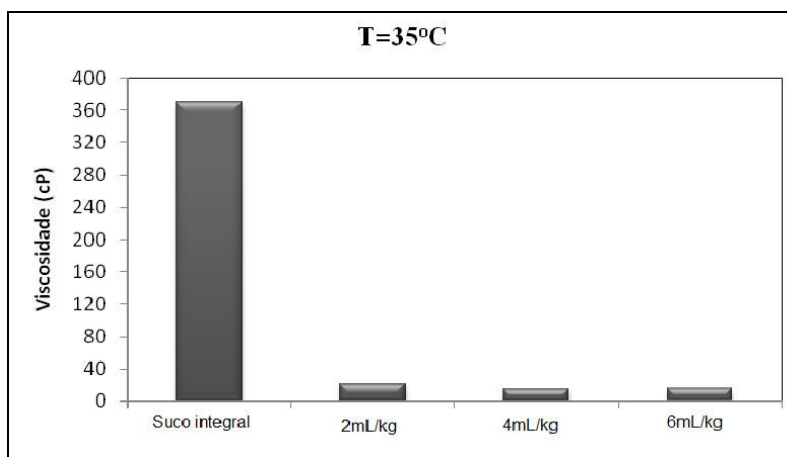


Figura 5.19 – Efeito do tratamento enzimático sobre a viscosidade do suco de amora-preta:

$T= 35^{\circ}C$ e taxa de deformação = $10s^{-1}$

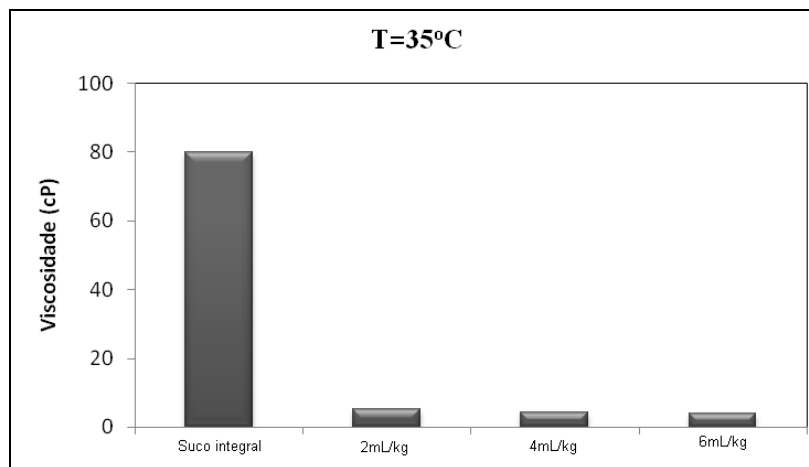


Figura 5.20 – Efeito do tratamento enzimático sobre a viscosidade do suco de amora-preta:
 $T = 35^{\circ}\text{C}$ e taxa de deformação = 100s^{-1} .

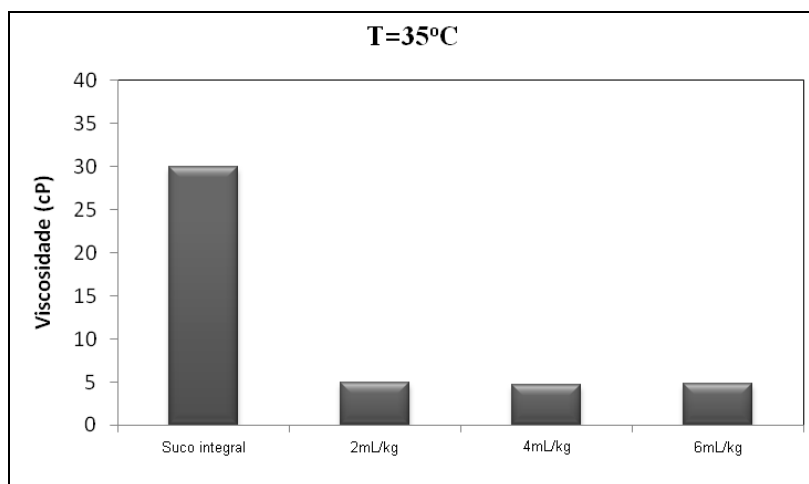


Figura 5.21 – Efeito do tratamento enzimático sobre a viscosidade do suco de amora-preta
 $T = 35^{\circ}\text{C}$ e taxa de deformação = 1000s^{-1} .

O pré-tratamento enzimático do suco nas condições selecionadas (4mL/kg do extrato enzimático, a 35°C por 30 minutos) promoveu uma redução significativa (entre 6 e 36 vezes) na viscosidade da amostra, permitindo o processamento da mesma no sistema de membranas. Este resultado reforça a hipótese de BALISCHI *et al.* (2002) que recomenda uso de enzimas de maceração, como as pectinases, para reduzir o tamanho das macromoléculas presentes em sucos de frutas para superar as dificuldades da obtenção de sucos clarificados por microfiltração. O uso de enzimas, em geral, facilita os processos industriais envolvendo membranas como um todo. Lukanin *et al.* (2003) avaliaram o processo de concentração de suco de maçã por destilação com membranas e mostraram que

o tratamento enzimático adicional realizado com protease aumentou o fluxo de permeado. Os autores atribuíram esse efeito positivo no fluxo à liquefação parcial de biopolímeros (entre eles as proteínas) presentes no suco após hidrólise enzimática.

Nas Tabelas 5.8 e 5.9 são apresentados os valores dos parâmetros dos modelos da Lei da Potência (modelo de Ostwald-de-Waele) para o suco de amora-preta integral e tratado com 4mL/kg da solução enzimática (Rapidase), respectivamente, nas temperaturas de 20, 25, 30 e 35°C, obtidos através do ajuste não linear aos dados experimentais.

O índice de comportamento (n) foi inferior a 1 (Tabela 5.9) tanto para o suco integral quanto para o tratado com 4mL/kg do extrato enzimático, indicando um comportamento não-Newtoniano com características pseudoplásticas.

O índice de consistência do suco tratado com enzima (K) reduziu significativamente com a temperatura, de acordo com teste de Fisher ($p < 0,05$). O mesmo não ocorreu para o suco integral, cujo valor de K não foi sensível à temperatura para valores de temperatura entre 25 e 35°C (Tabelas 5.7 e 5.8). Isto ocorre, provavelmente devido ao alto teor de sólidos insolúveis na amostra integral.

Tabela 5.7 – Parâmetros do modelo da Lei da Potência em função da temperatura para o suco de amora-preta integral

| Temperatura | n | $K(\text{Pa}\cdot\text{s}^n)$ |
|-------------|------|-------------------------------|
| 20°C | 0,11 | 6,43 |
| 25°C | 0,40 | 1,54 |
| 30°C | 0,36 | 1,61 |
| 35°C | 0,34 | 1,66 |

Tabela 5.8 – Parâmetros do modelo da Lei da Potência em função da temperatura para o suco de amora-preta tratado com 4mL/kg do extrato enzimático (Rapidase)

| Temperatura | n | k(Pa.s ⁿ) |
|-------------|------|-----------------------|
| 20°C | 0,28 | 0,17 |
| 25°C | 0,33 | 0,09 |
| 30°C | 0,35 | 0,08 |
| 35°C | 0,36 | 0,07 |

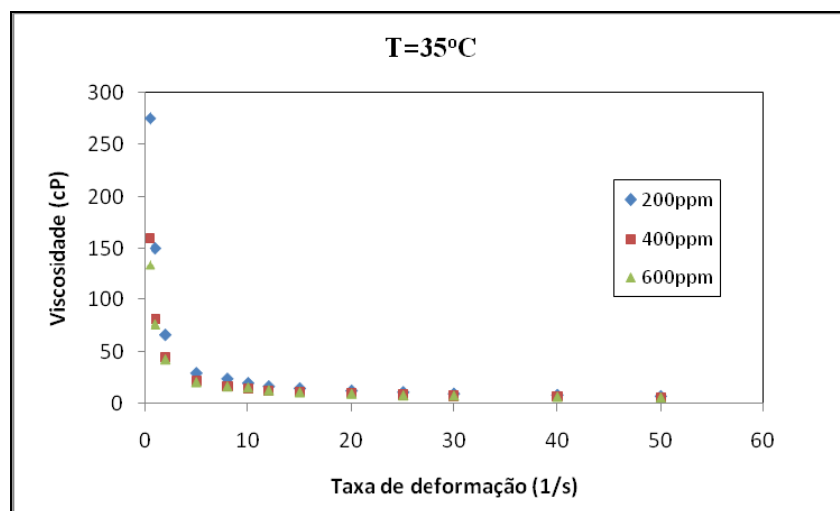


Figura 5.22 – Comportamento reológico do suco de amora-preta, tratado com a solução enzimática Rapidase.

Os parâmetros da equação de Arrhenius, apresentados na tabela 5.9, foram determinados pelo ajuste não linear aplicado aos valores de viscosidade aparente em função do inverso da temperatura, para valores específicos de taxa de deformação ($10s^{-1}$, $50s^{-1}$, $100s^{-1}$ e $1000s^{-1}$). Os valores de coeficiente de determinação (R^2) obtidos, indicam que a equação obtida representa um bom ajuste aos dados experimentais. Os valores elevados de energia de ativação (E_a) significam que a viscosidade do suco é relativamente sensível às mudanças de temperatura. Haminiuk *et al.* (2006) determinaram a energia de ativação para a amora-preta com taxa de deformação fixa em $50s^{-1}$, igual a $18,27 kJ.mol^{-1}$. Este valor foi metade daquele encontrado neste trabalho. Entretanto não é possível uma comparação

consistente devido ao fato dos resultados serem obtidos em diferentes concentrações de sólidos solúveis.

Tabela 5.9 – Parâmetros da Equação de Arrhenius para o suco de amora-preta tratado com 4mL/kg da solução enzimática Rapidase, a 35°C

| Parâmetros de Arrhenius | Taxa de deformação s ⁻¹ | | | |
|----------------------------|------------------------------------|-------|-------|-------|
| | 10 | 50 | 100 | 1000 |
| Ea (kJ.mol ⁻¹) | 28,84 | 26,08 | 24,60 | 10,28 |
| R ² | 0,91 | 0,92 | 0,93 | 0,96 |

5.4.3 Centrifugação

De acordo com a Tabela 5.10 nesta etapa de centrifugação houve uma perda de 7,2% da massa de amora.

Tabela 5.10 – Balanço de massa da etapa de centrifugação do suco da amora-preta

| | Amostra despolpada | Amostra centrifugada | Torta da centrifugação | Perda |
|----------|-----------------------|-------------------------|---------------------------|-------|
| Processo | 6465,1g | 5094,8g | 904,3g | 7,2% |

5.4.4 Microfiltração

O fator de redução volumétrica (FRV) alcançado após 90 minutos de processamento, em modo de concentração, foi aproximadamente, igual a 6 indicando que o volume de permeado é 5 vezes maior que o volume de retido (Tabela 5.11 e Figura 5.23). Este resultado é superior aos valores reportados na literatura para microfiltração de sucos de frutas brasileiras. Cruz (2008) obteve um FRV igual a 2 durante o processamento do açaí e Paillet *et al.* (2005) reportaram valores entre 2 e 3 para diferentes sucos de frutas brasileiras previamente hidrolisados.

O FRV é definido pela equação 5.1:

$$FRV = \frac{V_a}{(V_a - V_p)} \quad (Eq.5.1)$$

onde,

FRV é o fator de redução volumétrico

V_a é o volume de alimentação

V_p é o volume de permeado

Tabela 5.11 – Balanço de massa da etapa de microfiltração da amora-preta

| | Alimentação (amostra centrifugada) | Permeado | Retido | FRV |
|----------|------------------------------------|-------------------|---------------|-----|
| Processo | 5094,8 g (4000 mL) | 3354,8g (3325 mL) | 705g (675 mL) | 5,9 |

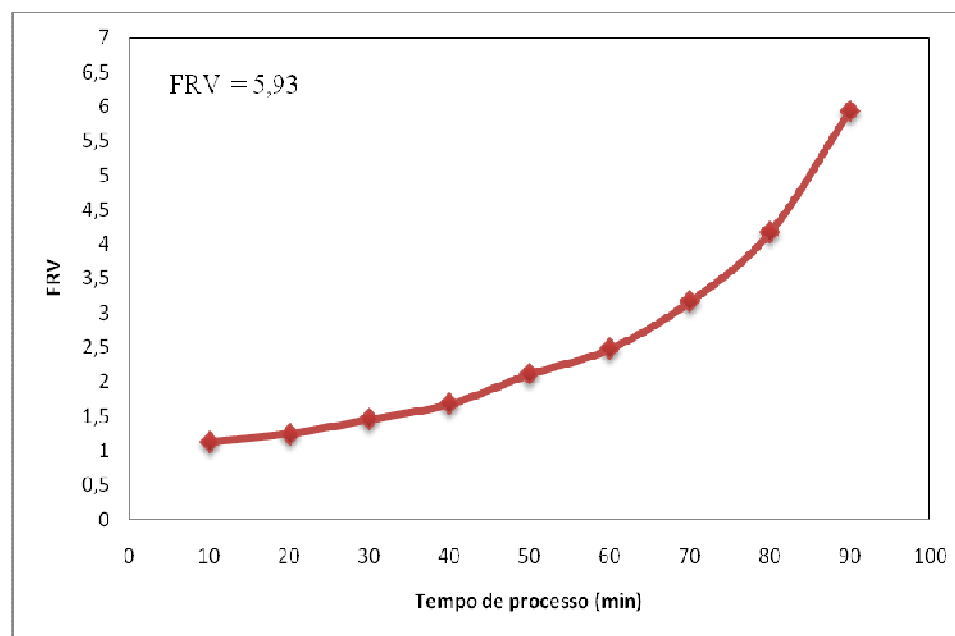


Figura 5.23 - Evolução do fator de redução volumétrica durante o processamento, por microfiltração, do suco de amora-preta, previamente submetido a tratamento enzimático com 4mL/kg da solução enzimática Rapidase a 35°C.

O teor de antocianinas no suco permeado foi avaliado para diferentes valores de FRV, como apresentado na Figura 5.24. Inicialmente, o teor de antocianinas aumenta exponencialmente para FRV entre 1 e 2, com um comportamento assintótico a partir deste valor. Este resultado indica que houve uma partição das antocianinas, favorecendo seu enriquecimento no suco clarificado (permeado).

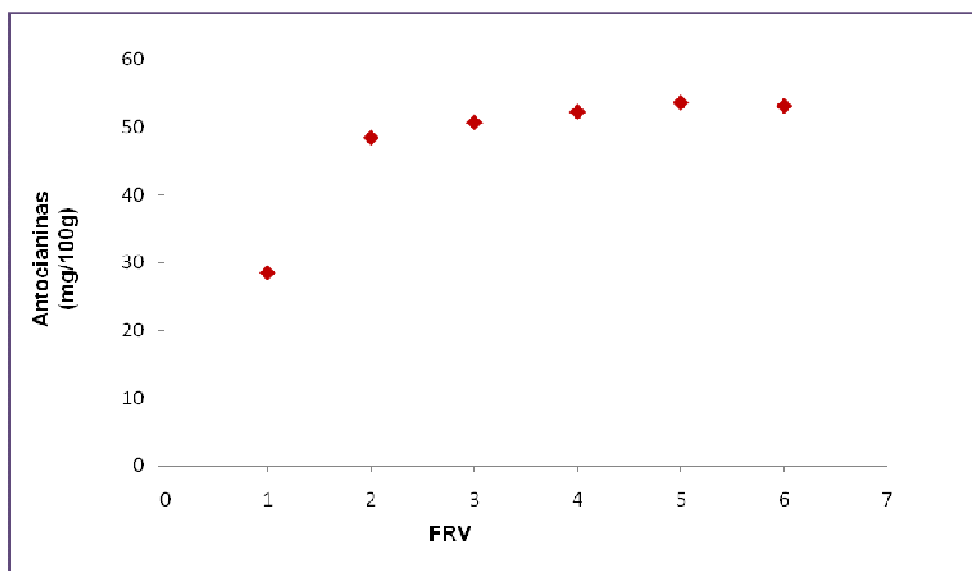


Figura 5.24 - Comportamento das antocianinas no suco permeado em relação ao fator de concentração volumétrico

A Figura 5.25 apresenta o comportamento do fluxo permeado ao longo do processo de microfiltração do suco de amora previamente tratado com 4mL/kg do extrato enzimático a 35°C. O fluxo máximo foi de 120 L/hm², superior aos dados reportados na literatura (VAILANT, 2001; PAILLET *et al.* 2005). No perfil clássico dos processos de microfiltração, onde a polarização de concentração provoca a queda inicial do fluxo permeado e o acúmulo de material retido sobre a superfície da membrana, o fluxo reduz sistematicamente ao longo do tempo de processo, fenômeno conhecido por *fouling*. Neste trabalho não se observou uma redução importante no valor do fluxo permeado o que indica que o tratamento enzimático foi eficiente na hidrólise das macromoléculas responsáveis pelo *fouling*. Este efeito também foi observado por Lukanin *et al.* (2003), onde no processo de concentração de suco de maçã por destilação com membranas observaram que o tratamento enzimático conduzido com protease aumentou o fluxo de permeado. Os autores atribuíram essa melhora no fluxo devido à redução de biopolímeros (entre eles as proteínas)

presentes no suco após hidrólise enzimática. Devido à alta viscosidade do suco integral, o processamento deste sem tratamento enzimático não foi tecnicamente viável.

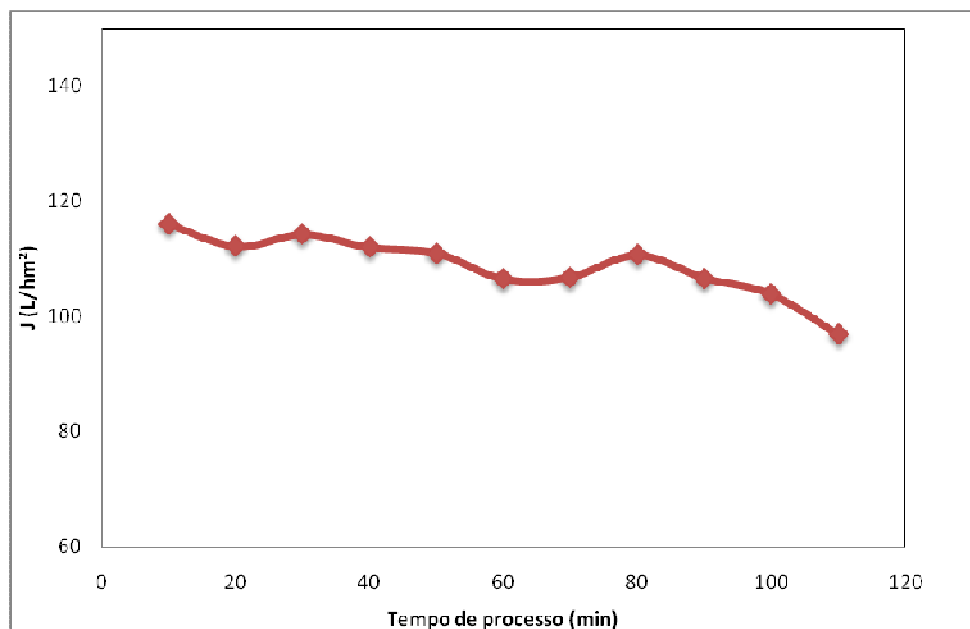


Figura 5.25 - Comportamento do fluxo permeado no processamento por microfiltração do suco de amora preta previamente submetido a tratamento com 4mL/kg da solução enzimática Rapidase a 35°C.

Após o processo de microfiltração, foi possível observar visualmente a redução da turbidez do suco de amora em relação à amostra inicial (Figura 5.26).

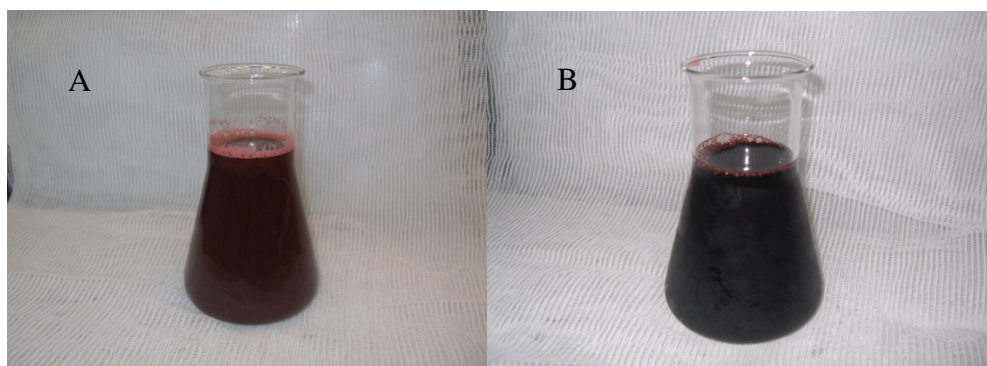


Figura 5.26 – (A) Suco de amora centrifugado; (B) Suco de amora clarificado.

5.5 Evolução do perfil de antocianinas ao longo do processo de clarificação de suco de amora preta

Após análise em das antocianinas majoritárias da amora por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, foram obtidos os seguintes resultados, apresentados na Tabela 5.12. Pode-se observar que houve uma perda substancial entre a alimentação e as correntes de saída do processo. No caso da Cianidina-3-O-glicosídeo, a perda foi de aproximadamente 45 %, enquanto para Cianidina-3-O-rutenosídeo esta perda foi cerca de 39 %.

Tabela 5.12 – Quantidade de antocianinas presentes nas correntes do processo

| | Cianidina-3-O-glicosídeo (mg) | Cianidina-3-O-rutenosídeo (mg) |
|-------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| Amora Integral (despolpada) | 2126,34 | 148,70 |
| Amora após trat. Enzimático | 3595,20 | 264,42 |
| Alimentação (Amora centrifugada) | 1731,79 | 173,23 |
| Torta 2 (centrifugação) | 618,70 | 35,17 |
| Permeado (FCV=5,9) | 746,49 | 89,24 |
| Retido (FCV=5,9) | 207,69 | 15,93 |

Os cromatogramas obtidos apresentaram boa resolução dos picos, o que favoreceu a integração dos mesmos (Figura 5.27). Todas as amostras apresentaram o mesmo perfil cromatográfico, variando somente na magnitude dos picos, o que está diretamente relacionado à concentração das antocianinas.

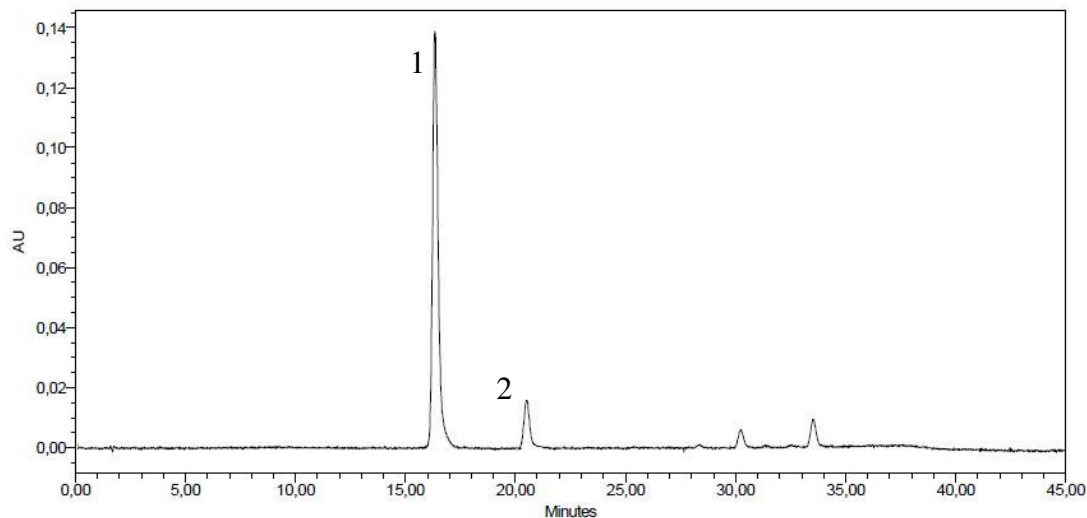


Figura 5.27 – Perfil cromatográfico das antocianinas do suco da amora-preta para todas as etapas do processo (Pico 1: cianidina-3-O-glicosídeo; Pico 2: cianidina-3-O-rutenosídeo).

Após avaliação dos resultados e realização do balanço de massa nas diferentes correntes do processo, foi possível observar que o tratamento enzimático da amora ocasionou aumento na disponibilidade das duas antocianinas majoritárias do fruto no suco, em relação ao produto proveniente do despulpamento. Observou-se um aumento de 69 % no teor de cianidina-3-O-glicosídeo após o tratamento enzimático, enquanto para a cianidina-3-O-rutenosídeo foi observado um aumento de 78 %. Resultados similares foram observados por Granada *et al.* (2001), que registraram um aumento na extração de antocianinas do suco de amora preta clarificado após utilização de enzimas. A influência das enzimas pectinolíticas no aumento das concentrações de alguns componentes de sucos também foi reportada por Nogueira *et al.* (2003), onde o uso das mesmas ocasionou uma melhora no rendimento da extração do suco de maçã devido à degradação das pectinas do meio, proporcionando uma obtenção duas vezes maior dos teores de ácido.

Observa-se que na etapa de centrifugação, ocorreram perdas das duas antocianinas cianidina-3-O-glicosídeo e da cianidina-3-O-rutenosídeo, 34,6 % e 21,2 % respectivamente.

Na microfiltração, 43,1 % da cianidina-3-O-glicosídeo da corrente de alimentação permearam através da membrana, enquanto 12% ficaram na fração retida, indicando uma perda de 45 % desta antocianina no processo. Em relação à cianidina-3-O-rutenosídeo, 51,5 % permaneceram na fração permeada (suco clarificado) e 9,2 % no suco retido, indicando uma perda de 39,3 % desta antocianina durante esta etapa. Estes valores podem ser

confirmados pelos índices de retenção calculados para cada uma das duas antocianinas, pela equação 5.2:

Índice de Retenção - IR

$$IR = \frac{\text{Concentração de i no retido}}{\text{Concentração de i na alimentação}} * 100 \dots\dots\dots (Eq.5.2)$$

As perdas observadas de antocianinas ao longo do processo podem ser atribuídas ao fato do mesmo ter sido conduzido em escala semi-piloto, onde as condições de operações não são ideais quando se trata de preservar compostos bioativos. Exemplo disto é a oxigenação presente na etapa de alimentação, o que resulta na oxidação das antocianinas e de outros compostos.

Uma maior estabilidade das antocianinas poderia ser alcançada no processo de microfiltração caso o volume do permeado fosse reduzido, sendo para isso necessário trabalhar com um valor de FRV menor. Neste caso, deve ser fazer uma avaliação do quanto se quer produzir em relação ao quanto se quer preservar do teor de antocianinas. Em alguns casos, o volume de suco clarificado pode ser mais importante do que a estabilidade das mesmas. Prudencio (2006) durante a elaboração do queijo Petit Suisse adicionado de antocianinas, não constatou influência do FRV sobre a composição físico-química do produto, ou seja, não detectou degradação das antocianinas até este valor.

Foi possível observar a partir dos dados experimentais, que o tratamento enzimático não só é importante para possibilitar o escoamento do suco durante o processo, mas também para se obter teores consideráveis de antocianinas no final do mesmo. O fato do tratamento aumentar a disponibilidade das antocianinas no meio, minimiza o efeito das perdas no teor destas no produto final de interesse, neste caso o suco clarificado.

6 CONCLUSÃO

A metodologia descrita por Gouvêa et al. (2009) para isolamento de padrões de antocianinas, demonstrou ser satisfatória, tendo sido possível isolar padrões com boa estabilidade e alta pureza (98,9% para a cianidina-3-O-glicosídeo e 97,2% para a cianidina-3-O-rutenosídeo).

A partir dos padrões isolados, foi possível caracterizar pela técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência as antocianinas majoritárias da amora-preta (cianidina-3-O-glicosídeo e cianidina-3-O-rutenosídeo).

Concluiu-se, adicionalmente, que o pré-tratamento enzimático nas condições operacionais selecionadas neste estudo (35°C e 4mL/kg do extrato enzimático) foi fundamental para o processamento da amora-preta por microfiltração, uma vez que a elevada viscosidade do suco não tratado impossibilitava o seu escoamento através da membrana.

Também foi possível detectar que o pré-tratamento enzimático do suco de amora-preta ocasionou um incremento na disponibilidade das suas antocianinas majoritárias (69% para a cianidina-3-O-glicosídeo e 77,80% para a cianidina-3-O-rutenosídeo) quando comparado ao produto proveniente da etapa de despulpamento e, como consequência, contribuiu para reduzir as perdas das antocianinas majoritárias durante o processo de microfiltração do suco de amora-preta.

Observou-se que a microfiltração foi mais seletiva para a cianidina-3-O-rutenosídeo, uma vez que o permeado possui aproximadamente 5,6 vezes mais cianidina-3-O-rutenosídeo que o retido, sendo esta comparação igual a 3,6 vezes para a cianidina-3-O-glicosídeo.

7 RECOMENDAÇÕES

As recomendações sugeridas para complementar este trabalho são:

- Prosseguir na caracterização das outras antocianinas presentes em menor quantidade no fruto da amora-preta para se ter um perfil cromatográfico completo;
- Dar continuidade ao estudo de estabilidade dos padrões analíticos isolados;
- Realizar acompanhamento sensorial e instrumental para se avaliar a alteração de cor do fruto da amora-preta durante o período de congelamento;
- Continuar com os testes para se encontrar condições de operação para a microfiltração nas quais a estabilidade das antocianinas seja mais preservada.

8 REFERÊNCIAS

ARAUJO, M. C. P.; GOUVÊA, A. C. M. S.; ROSA, J. S.; PACHECO, S.; OIANO-NETO, J.; GODOY, R. L. O. Adaptação de um método por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para determinação de antocianinas em suco de açaí (*Euterpe oleraceae* Mart.). In: XII Congresso Latino Americano de Cromatografia e Técnicas Afins (2008). **Anais eletrônicos...** Florianópolis, 2008.

ANDERSEN O.M.; CABRITA L.; FOSSEN T., Colour and stability of pure anthocyanins influenced by pH including the alkaline region. **Food Chemistry**, v.63, n.4, p. 435-440, 1998.

ANTUNES, L. E.C. Amora-preta: nova opção de cultivo no Brasil, **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.1, p.151-158, 2002.

ANTUNES, L.E.C.; DUARTE FILHO, J.; SOUZA, C.M. Conservação pós-colheita de frutos de amoreira-preta. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 3, p. 413-419, 2003.

BALISCHI L.; PEREIRA, N. C.; LIMA, O. C. M.; BARROS, S. T. D.; DAMASCENO, J. W. e MENDES, E. S. Influência do tratamento enzimático sobre as características reológicas e microscópicas da polpa de acerola. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 24, n. 6, p. 1649-1658, 2002.

BELITZ, H.-D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. **Food Chemistry**. 3. ed. Garching: Springer, 2004.

BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnol. Adv.**, New York, v.18, p. 355- 383, 2000.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Química do Processamento de Alimentos**. 2^a. edição. São Paulo: Varela, p.111, 1995.

BRANCO, I. G. 1995. **Suco de laranja concentrado – comportamento reológico a baixas temperaturas**. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 91 p., 1995.

BRITO, E. S.; ARAUJO, M. C. P.; ALVES, R. E.; CARKEET, C., CLEVIDENCE, B. A.; NOVOTY, J. A. Anthocyanins Present in Selected Tropical Fruits: acerola, jambolão, jussara and guajiru. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.55, p. 9389-9394, 2007.

BROUILLARD, R. Chemical structure of anthocyanins. In: MARKAKIS, P. (Ed.) **Anthocyanins as Food Colors**. New York: Academic Press, p. 1-40, 1982.

CAMPOS, D. D. P. **Extração, purificação e isolamento de antocianinas de jambolão e avaliação dos seus efeitos biológicos (*Syzygium cumini*)**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Campinas, SP, 2006.

CARNEIRO, L.; SA, I.S.; GOMES, F. S.; MATTA, V. M. & CABRAL, L.M. C. Cold sterilization and clarification of pineapple juice by tangencial microfiltration. **Desalination**, v. 148, p. 93-98, 2002.

CAVALCANTE, P. B. **Frutas comestíveis da Amazônia**. 5. ed. Belém: CEJUP, 1991. 279 p. (Coleção Adolpho Ducke).

CHANDRA, A.; RANA, J.; LI, Y. Separation, identification, quantification, and method validation of anthocyanins in supplement raw materials by HPLC and HPLC-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, 3515, 2001.

CHAVES, M. C. V.; GOUVEIA, J. P. G.; ALMEIDA, F. A. C.; SILVA, F. L. H. **Carcaterização físico-química do suco de acerola**. Revista de Biologia e Ciências da Terra, v.4, n.2, 2004.

CHERYAN, M. **Ultrafiltration Handbook**. Lancaster, Technomic Publishing Company, 1986.

CIANCI, F. C.; SILVA, L. F. M.; CABRAL, L. M. C. e MATTA, V. M. Clarificação e concentração de suco de caju por processos com membranas. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 25, n. 3, pp. 579-583, 2005.

COHEN, K. O.; ALVES, S. DE M., Açaí. In: **Sistemas de Produção**. Embrapa Amazônia Oriental, v.4, 2006. Disponível em : <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Acai/SistemaProducaoAcai_2ed/index.htm>. Acesso em: 18 nov. 2009.

COSTELL, E.; DURÁN, L. Reologia y fisico-química de los zumos y purés de frutas. **Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos**, Valencia, v.22, n.1, p.81-94, 1982.

CRUZ, A. P. G. 2008. **Avaliação do efeito da extração e da microfiltração do açaí sobre sua composição e atividade antioxidante**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

DEGÁSPARI C.H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, v.5, n.1, p.33-40, 2004.

DOMINIQUE PALLET et al. Applications des technologies membranaires aux traitements de jus de fruits brésiliens. **Cahiers d'études et de recherches francophones/Agricultures**, v. 14, n.1, p.159-163, 2005.

DOWNHAM, A.; COLLINS, P. Colouring our foods in the last and next millennium. **International Journal of Food Science Technology**, v.35, n.1, p.5-22, 2000.

DURST, R. W.; WROLSTAD. R. E. Unit F1.2: Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. In R.E. Wrolstad (Ed.), **Handbook of Analytical Food Chemistry**, p. 33-45. New York: John Wiley & Sons, 2005.

ESPÍN, J. C.; SOLER-RIVAS, C.; WICHERS, H. J.; GARCÍA-VIGUERA, C. Anthocyanin-Based Natural Colorants: A New Source of Antiradical Activity for Foodstuff. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, n.5, p. 1588-1592, 2000.

ETTRE, L.S. Chromatography: the separation technique of the 20th century. **Chromatographia**, v.51, p. 7-17, 2000.

FERNANDES, L.M. **Clarificação do suco de acerola por processos com membranas**. 1999. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 1999.

FERREIRA, D. S. 2008. **Compostos bioativos em amora-preta e encapsulação do seu extrato antociânico por gelificação térmica com curdiana**. Dissertação (Mestrado) - Universidade estadual de Campinas, 2008.

FERREIRA, G.; QUEIROZ, A. J. M.; CONCEIÇÃO, R. S.; GASPARETTO, C. A. Efeito da temperatura no comportamento reológico das polpas de caju e goiaba. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v.4, n.2, jul./dez. 2002.

FETT, R. Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v.24, n.4, p.691-693, 2004.

FOX, ROBERT W.; MCDONALD, ALAN T. **Introdução à mecânica dos fluidos**. 5. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2001.

FRANCIS, F. Analysis of anthocyanins. In Markakis, P. (Ed.), **Anthocyanins as Food Colors**. New York: Academic press, 1982.

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

GALLORI, S.; BERGONIZI, M.; BARBOSA, W.; VINCIERI, F. Polyphenolic constituents of fruit pulp of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí palm). **Chromatographia**, v. 59, p. 739-743, 2004.

GIUSTI, M. M.; RODRIGUEZ-SAONA, L. E.; WROLSTAD, R. E. Molar Absorptivity and Color Characteristics of Acylated and Non-Acylated Pelargonidin-Based Anthocyanins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, no. 11, p. 4631-4637, nov. 1999.

GLÄSSGEN, W. E., SEITZ, H. U.; METZGER, J. W. **Biological Mass Spectrometry**, v.21, p.271-277, 1992.

GOUVÊA, A. C. M. S.; ARAUJO, M. C. P.; PACHECO, S.; GODOY, R. L. O.; OIANO-NETO, J.; ROSA, J. S.; CABRAL, L. M. C. Anthocyanins standards (cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-rutinoside) isolation from freeze-dried açaí (*Euterpe oleracea* mart.) by HPLC. In: III Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (2009). **Anais eletrônicos...**Córdoba, 2009.

GRANADA, G. L.; VENDRUSCOLO, J. L.; TREPTOW, R.O. Caracterização química e sensorial de sucos clarificados de amora-preta (*Rubus* spp. L.) **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 7, n. 2, p. 143-147, 2001.

HABERT, A. C.; BORGES, C. P.; NÓBREGA, R. **Processos de Separação com Membranas**. Rio de Janeiro: Escola Piloto em Engenharia Química/COPPE/ UFRJ, 2006, p.9-21.

HAKE, S.; QUINN, J. Anthocyanin colorants from fruits and vegetables. **ACS symposium series**, v.983, p. 69-81, 2008.

HAMINUK, C. H.I.; SIERAKOWSKI, M. R.; IZIDORO, D. R.; MACIEL, G. M.; SCHEER, A. P.; MASSON, M. L. **Comportamento reológico de sistemas pécticos de polpas de frutas vermelhas**. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 29, p. 225-231, 2009.

HAMINUK, C. H.I.; SIERAKOWSKI, M. R.; IZIDORO, D. R.; MACIEL, G. M.; SCHEER, A. P.; MASSON, M. L. Effect of Heat Treatment on Pectic Fractions and Apparent Viscosity of Whole Blackberry (*Rubus spp.*) Pulp. **International Journal of Food Engineering**, v.4,n.4, article 13,2008.

HAMINUK, C. H.I.; SIERAKOWSKI, M. R.; IZIDORO, D. R.; MASSON, M. L. Rheological Characterization of Blackberry Pulp. **Journal of Food Technology**, v.9, n.4, p. 291-296, out./dez. 2006.

HARBONE, J. B. The chromatographic identification of anthocyanin pigments. **Journal of Chromatography**, v.1, p. 473-488, 1958.

HARBORNE, J. B. 1993. **The flavonoids - advances in research since 1986**. London: Chapman & Hall, p. 3-6.

HASSIMOTTO, N.M.A.; GOMEZ, M.L.P.A.; MOTA, R.V.; CORDENUNSI, B.R.; LAJOLO, F.M. Compostos antioxidantes da amora-preta (*Rubus sp.*). In: XIX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos: estratégia para o desenvolvimento. 2004, Recife: **Anais (cd-rom) XIX CBCTA**, n. 424.

HEREDIA, F. J.; F., FRANCIA-ARICHA, E., RIVAS-GONZALO, J., VICARIO, I., SANTOS-BUELGA, C. Chromatic characterization of anthocyanins from red grapes, pH effect. **Food Chemistry**, v. 63, n. 4, p. 491-498, 1998.

HONG, V.; WROLSTAD, R. E. Use of HPLC separation / photodiode array detection for characterization of anthocyanins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.38, p.708-715, 1990.

IBARZ, A.; GONZALS, C.; ESPLUGAS, S. Rheology of clarified passion fruit juice. **Fruit Processing**, Chicago, v.6, n.8, p.330-333, 1996.

JACKMAN, R. L.; YADA, R. Y.; TUNG, M. A. A review: separation and chemical properties of anthocyanins used for their qualitative and quantitative analysis. **Journal of Food Biochemistry**, v.11, 279, 1987.

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

KASHYAP, D.R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Biorsource Technology**, Elsevier Science Ltda, v.77, p. 215-227, 2001.

KAYA, A.; SÖZER, N. Rheological behavior of sour pomegranate juice concentrates (*Punica granatum* L.). **International Journal of Food Science and Technology**, v. 40, p. 223-227, 2005.

KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A. G.; GARCIA-PARILLA, M. C.; TRONCOSO, A. M.; FETT, R. Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 691-693, 2004.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; MORALES, M. T. e FETT, R. Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Ciência Rural**, vol. 36, no. 4, pp. 1283-1287, 2006.

LEE, H.S.; HONG, V. Chromatographic analysis of anthocyanins. **Chromatografia**, v.624, p.221-234; 1992.

LEE, J.; RENNAKER, C.; WROLSTAD, R. E. Correlation of two anthocyanin quantification method: HPLC and spectrophotometric methods. **Food Chemistry**, v.110, p.782-786, 2008.

LIMA, V.L.A.G.; PINHEIRO, I.O.; NASCIMENTO, M.S.; GOMES, P.B.; GUERRA, N.B. Identificação de antocianidinas em acerolas do banco ativo de germoplasma da Universidade Federal Rural de Pernambuco. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.4, p.927-935, 2006.

LOPES, F. L. G.; SEVERO, J. B.; SANTANA, J. C. C.; SOUZA, R. R.; TAMBOURGI, E. B. Avaliação de fenômenos redutores do fluxo de permeado em microfiltrações do suco do abacaxi (*Ananias comosus* L. Merrill). **Exacta**, v.5, n.2, p. 329-334, 2007.

LÓPEZ O.P.; JIMÉNEZ A.R.; VARGAS F.D.. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains – characteristics, biosynthesis, processing, and stability. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.40, n.3, p.173-289, 2000.

LUKANIN, O. S.; GUNKO, S. M.; BRYK, M. T.; NIGMATULLIN, R. R. The effect of content of apple juice biopolymers on the concentration by membrane distillation. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 60, n. 3, p. 275-280, 2003.

MACHEIX, J.-J.; FLEURIET, A.; BILLOT, J. **Fruit Phenolics**, CRC Press: Boca Raton, 1990.

MALACRIDA, C.R.; MOTTA, S. Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.4, p.659-664, 2005.

MARTÍNEZ-FLÓREZ, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J.M.; TUÑÓN, M.J. Los flavonóides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutritional Hospital**, v.17, n.6, p-271-278, 2002.

MATEUS, M.; SANTOS, J. A. L.; CABRAL, J. M. S. Membrane Separation processes. In: KENNEDY, J. F.; CABRAL, J. M. S. **Recovery processes for biological materials**. New York: John Wiley & Sons Ltd, 1993.

MATTA, V. M.; CABRAL, L. M. C. e SILVA, L. F.M. Suco de acerola microfiltrado: avaliação da vida-de-prateleira, **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v.24, n.2, Campinas, Abr./Jun.,2004.

MATTA, V. M.; MORETI, R. H. e CABRAL, L. M. C. Microfiltration and reverse osmosis for clarification and concentration of acerola juice. **Journal of Food Engineering**, v. 61, p. 477-482, 2004.

MELLO, K. S.; FIGUEIRÊDO, R. M. F.; QUEIROZ, A. J. M. Comportamento reológico da polpa de buriti com leite. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.8,n.2, 2008.

MENEZES, E.M.S. 2005. **Efeito da alta pressão hidrostática em polpa de açaí pré-congelada (*Euterpe oleracea*, Mart.)**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 83pp., 2005.

MORENO-ALVAREZ, M. J.; MATOS, A. V.; LÓPEZ, E.; BELÉN, D. Estabilidade de antocianinas em jugos pasteurizados de mora (*Rubus glaucus* Benth). **ALAN**, Caracas, v. 52, n. 2, 2002.

MOTA, R. V. Características Químicas e Aceitabilidade de Geléias de Amora-preta de Baixo Teor de Sólidos Solúveis. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 10, n. 2, p. 116-121, abr./jun. 2007.

MULDER, M. **Basic principles of membrane technology**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991.

NIJVELDT, R.J.; NOOD, E.; HOORN, D.E.; BOELEN, P.G.; NORREN, K.; LEEUWEN, P. A. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.74, n.4, p. 418-25, 2001.

NOBLE, R. D.; WAY, J. D. Description of facilitate transport and enviromental applications: membrane processes in separation and purification. **Nato ASI Series**, v.272. London: Kluwer Academic Publishers, 1993.

NOGUEIRA, A.; SANTOS, L.D.; WIECHETECK, F.V.B.; GUYOT, S.; WOSIACKI, G. Efeito do processamento no teor de compostos fenólicos em suco de maçã. **Ciências Exatas da Terra**, Ponta Grossa, n. 9, v. 3, p.7-14, 2003.

NOGUEIRA, O. L.; CARVALHO, C. J. R.; MULLER, C. H.; GALVÃO, E. U. P.; SILVA, H. M. E.; RODRIGUES, J. E L. F.; OLIVEIRA, M. S. P.; CARVALHO, J. E. U.; ROCHA NETO, O. G.; NASCIMENTO, W. M.O.; CALZAVARA, B. B. G. **A cultura do açaí**. Brasília: Embrapa, 49 p., 1995.

OLIVEIRA, R. P.; NINO, A. F. P.; FERREIRA, L. V. Potencial de multiplicação in vitro de cultivares de amoreira-preta. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 3, pp. 585-589, 2008.

OLIVEIRA, R.P.; NINO, A.F.P.; SILVA, F.O.X. **Produção de mudas de amora-preta por meio de cultura de tecidos**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 23p., 2004.

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

PACHECO, S. 2009. **Validação da metodologia de determinação de carotenóides por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Departamento de Ciência e tecnologia de Alimentos, Rio de Janeiro, 2009.

PAULA, B. de; GOMES, F. S.; SILVA, L. F. M.; MATTA, V. M.; CABRAL, L. M. C. Association of the enzymatic hydrolysis to the microfiltration process of the passion - fruit juice. **Revista Universidade Rural**, Série Ciências Exatas e da Terra, v.21, n. 2, p. 45-48, 2002.

PETERSON, J.; DWYER J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research**, v.18, n.12, p.1995-2018, 1998.

PETRI, G.; KRAWCZYK, U.; KÉRY, À. Spectrophotometric and chromatographic investigation of bilberry anthocyanins for quantification purposes. **Microchemistry Journal**, v.55, 12, 1997.

PIMENTEL, B. M. V.; FRANCKI, M.; GOLLUCKE, B. P. **Alimentos funcionais: introdução às principais substâncias bioativas em alimentos**. São Paulo: Editora Varela, 2005.

PORTER, M. C. Microfiltration In: PORTER, M. C (Ed) **Handbook of industrial membrane technology**. New Jersey, Noyes Publications, 1990, p. 62 – 135.

PREVENTING Membrane fouling. **Filtration & Separation**, p. 20-21, jan/feb 2001.

PRUDENCIO, I. D. 2006. **Propriedades físicas de queijo petit suisse elaborado com retentado de soro de queijo e estabilidade de antocianinas e betalainas adicionadas**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

RODHES, M. J. C. Physiologically-active compounds in plant foods: an overview **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 55, p. 371-397, 1996.

ROGEZ, H. 2000. **Açaí: Preparo, Composição e Melhoramento da Conservação**. Ed. Universidade Federal do Pará – EDUPA, Belém, Pará. 360pp., 2000.

ROSA, J. S. **Desenvolvimento de um método rápido para análise de vitamina C por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência utilizando coluna de troca iônica**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Departamento de Ciência e tecnologia de Alimentos, Rio de Janeiro, 2005.

SÁ, I. S.; MATTA, V.M.; CABRAL, L.M.C. Concentração de suco de abacaxi através dos processos com membranas. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 6, p. 53-62, 2003.

SANTOS, A.M.; RASEIRA, M.C.B.; MADAIL, J.C.M. **Amora-preta**. 2.ed. Brasília: Embrapa-SPI; Pelotas: Embrapa-CPACT, 61p., 1997.

SILVA, O. F.; LOPES, D.; SILVA, A. J. R. Polifenóis da polpa de açaí (*Euterpe oleracea*). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA. 29, 2006, São Paulo. [Resumos...]. São Paulo.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Principles of instrumental analysis**. 5. ed. Fort Worth: Saunders College Publishing, 1997. 849p.

SKREDE, G.; WROLSTAD, R. E. 2002. Chapter 3: Flavonoids from berries and grapes. In Shi, J., Mazza, G., & Maguer, M. L. (Ed.), **Functional Foods: biochemical and processing aspects**, p. 71-133. New York: CRC press LLC.

SOMERS, T. C.; EVANS, M. E. Wine quality: Correlations with colour density and anthocyanin equilibria in a group of young red wines. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.25, 1369, 1974.

SOUTO, R.N.M. 2001. **Uso da radiação γ , combinada à refrigeração, na conservação de polpa de açaí (*Euterpe oleracea*, Mart.)**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 95pp., 2001.

STRACK, D.; WRAY, V. In **Methods in Plant Biochemistry** (Ed. J. B. Harborne), v. 1, Academic Press, London, p. 325-356, 1989.

TAKEOKA, G.; DAO, L. 2002. Anthocyanins. In Hurst, W. J. (Ed.), **Methods of analysis for functional foods and nutraceuticals**, p. 219-241. Boca Raton, FL: CRC Press LLC.

TERCI, D.B.L. **Aspectos analíticos e didáticos de antocianinas extraídas de frutas**, 2004. Tese de Doutorado, Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, 2004.

VAILLANT, F.; MILLAN, A.; DORNIER, M.; DECLOUX, M.; REYNES, M. Strategy for economical optimisation of the clarification of pulpy fruit juices using crossflow microfiltration. **Journal of Food Engineering**, v.48, p.83-90, 2001.

VAILLANT, F.; MILLAN, P.; O'BRIEN, G.; DORNIER, M.; DECLOUX, M.; REYNES, M. Cross flow microfiltration of passion fruit juice partial enzymatic liquefaction. **Journal of Food Engineering**, n.42, p.215- 224, 1999.

WALLE, T. Serial review: flavonoids and isoflavones (phytoestrogens): absorption, metabolism, and bioactivity. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 36, n.7, 829-837, 2004.

WROLSTAD, R. E.; CULBERTSON, J. D.; CORNWELL, C. J.; MATTICK, L. R. Detection of adulteration in blackberry juice concentrates and wines. **Journal Assoc. Off. Anal. Chem.**, v.65, 1417, 1982.

YILMAZ, Y.; TOLEDO, R. T. Health aspects of functional grape seed constituents. **Trends in Food Science and Technology**, v. 15, n. 9, p. 422-433, 2004

XAVIER, M. F. 2004. **Estudo da extração de antocianinas em colunas recheadas**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química, Florianópolis, 2004.

ANEXO 1 – TRABALHO APRESENTADO NO CONGRESSO ANALÍTICA LATIN AMERICA

AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DOS PADRÕES CIANIDINA-3-O-GLICOSÍDEO E CIANIDINA-3-O-RUTENOSÍDEO ISOLADOS POR CLAE

Manuela Cristina Pessanha de Araujo, Embrapa Agroindústria de Alimentos, manuela@ctaa.embrapa.br/ Ana Cristina Miranda Senna Gouvêa, UFRRJ, acristinagouvea@hotmail.com/ Ronoel Luiz de Oliveira Godoy, Embrapa Agroindústria de Alimentos, ronoel@ctaa.embrapa.br/ Lourdes Maria Corrêa Cabral, Embrapa Agroindústria de Alimentos, lcabral@ctaa.embrapa.br/ Suely Pereira Freitas, UFRJ, freitasp@eq.ufrj.br

Resumo:

Este trabalho teve como objetivo avaliar a estabilidade das antocianinas cianidina-3-O-glicosídeo e cianidina-3-O-rutenosídeo isoladas do açaí (*Euterpe oleraceae* mart.) pela técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Tais compostos foram isolados com o intuito de serem posteriormente usados como padrões analíticos, uma vez que devido à alta diversidade dos compostos antocianínicos seus padrões comerciais são escassos e extremamente dispendiosos. A avaliação foi realizada dentro de um período de aproximadamente três meses, onde as duas antocianinas em meio acidificado foram submetidas a condições adversas a sua conservação. O resultado obtido não mostrou mudança no perfil cromatográfico dos compostos armazenados em tal meio durante o período avaliado, o que indica ser esta uma forma mais confiável de armazenar estes padrões.

Palavras-chave:

Estabilidade, antocianinas, CLAE, padrões

1. Introdução:

As antocianinas da família dos flavonóides constituem um grupo de pigmentos solúveis em água responsáveis pela maioria das cores vermelha, roxa e azul de flores e vegetais. Devido as suas propriedades antioxidantes, possuem importante papel na prevenção ou no retardamento do aparecimento de várias doenças. Durante o armazenamento, as antocianinas podem sofrer modificações devido à sensibilidade ao efeito da temperatura, oxigênio, luz e ação enzimática (JACKMAN *et al.*, 1987; FRANCIS, 1989)., As antocianinas apresentam-se na forma catiônica em pH abaixo de 2, ocorrendo preservação da estrutura; com o aumento do pH, ocorre uma rápida desprotonação para formar a base quinoidal, ficando o oxigênio mais reativo, o que facilita a formação dos compostos de degradação.

2. Objetivo:

O objetivo deste trabalho foi avaliar a estabilidade das antocianinas cianidina-3-O-glicosídeo e cianidina-3-O-rutenosídeo isoladas por CLAE, para sua utilização como padrões analíticos.

3. Metodologia:

Após isolamento dos padrões por cromatografia líquida de alta eficiência, seguindo-se as condições analíticas descritas por Brito *et al.* (2007), os mesmos foram concentrados e ressuspensos em uma solução metanol/ ácido fórmico/ água (10:10:80), a qual é a solução de injeção usada no método cromatográfico seguido. Os padrões foram deixados na solução de injeção em vial âmbar, dentro

do injetor automático, ou seja, em condição de ausência de luz e submetidos a uma atmosfera não inerte, uma vez que os vials não estavam hermeticamente fechados. Os padrões também permaneceram guardados no injetor durante todo o período do estudo, submetidos a variações da temperatura, já que tal compartimento só era refrigerado nos dias de análise, permanecendo à temperatura ambiente quando não utilizado. Este teste foi realizado por um período 90 dias, para as duas antocianinas, tendo sido a concentração destes compostos avaliada por CLAE pela comparação das áreas obtidas para os mesmos no primeiro e no último dia de análise. A presença de compostos de degradação também foi avaliada através da inserção direta dos padrões em sistema de espectrometria de massas com fonte de ionização electrospray positiva.

4. Resultados e Discussão:

Não foi observada redução da concentração presente de cada padrão no seu respectivo vial. Os valores de área obtidos para o pico de cianidina-3-O-glicosídeo no primeiro e no último dias de teste foram 1738285 e 1789809, respectivamente. Para a cianidina-3-O-rutenosídeo, os valores encontrados foram 4886836 e 5398895, para o primeiro e último dias de teste, respectivamente. Observou-se um pequeno aumento na área e conseqüentemente na concentração do padrão de cianidina-3-O-glicosídeo, o que pode ser explicado pela evaporação do metanol presente no vial, uma vez que tal frasco não encontrava-se hermeticamente fechado, estando inclusive com o selo de sua tampa perfurado decorrente da injeção do primeiro dia de teste. A ausência de degradação também foi comprovada pelo perfil cromatográfico dos dois padrões, que permaneceu inalterado para os dois dias de teste. Além disso, nos espectros de massa das antocianinas não foi detectada a presença de possíveis compostos de degradação. Estes resultados, quando comparados com injeções de padrões isolados, armazenados somente em solvente sem redução do pH, apresentam grande vantagem, uma vez que a segunda situação não é capaz de inibir a degradação das antocianinas em questão.

5. Conclusão:

Os resultados encontrados nos permitem concluir que fatores como presença de oxigênio e pequenas variações de temperaturas não foram tão críticos a ponto de causar a degradação destas antocianinas quando as mesmas se encontravam armazenadas em meio acidificado na ausência de luz durante o período de aproximadamente três meses. Desta forma, torna-se mais confiável e garantido o armazenamento dos padrões isolados em laboratório, sendo possível ampliar o tempo de uso dos mesmos, e conseqüentemente reduzir custos da análise devido a menor uso de insumos e tempo de pessoal para isolá-los. Pretende-se dar continuidade ao teste, ampliando o tempo de estudo, bem como passando a englobar outros parâmetros, como refrigeração e presença de luz.

6. Referências:

BRITO, E.S.; ARAUJO, M.C.P.; ALVES, R.E.; CARKEET, C.; CLEVIDENCE, B.A.; NOVOTNY, J.A. Anthocyanins present in selected tropical fruits: acerola, jambolão, jussara, and guajiru. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.9389 – 9394, 2007.

FRANCIS, F.J., Food Colorants, **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v.28, n.4, p.273-314, 1989.

JACKMAN, R.L.; YADA, R.Y.; TUNG, M.A.; SPEERS, R.A., Anthocyanins as food colorants. - A Review. **J. Food Biochem.** v.11, p.201-247, 1987.

7. Caso o trabalho seja selecionado para apresentação oral:

Concordo em apresentar

ANEXO 2 – TRABALHO APRESENTADO NO 8º SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

CARACTERIZAÇÃO DAS ANTOCIANINAS MAJORITÁRIAS DA AMORA-PRETA (*Rubus spp.*) A PARTIR DE PADRÕES ISOLADOS POR CLAE E IDENTIFICADOS POR MS-MS

ARAUJO, M. C. P (1), GOUVÊA, A. C. M. S (2); GODOY, R. L. O. (1); CABRAL, L. M. C. (1); FREITAS, S. P.(3)

(1) Embrapa Agroindústria de Alimentos - Rio de Janeiro, RJ. (2) UFRRJ, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos – Seropédica, RJ. (3) UFRJ, Escola de Química – Rio de Janeiro, RJ. E-mail: manuela@ctaa.embrapa.br

A caracterização das antocianinas presentes nas mais diversas matrizes é um procedimento difícil devido à baixa disponibilidade de padrões analíticos comerciais. O objetivo deste trabalho foi caracterizar as antocianinas majoritárias da amora-preta (*Rubus spp.*) a partir de padrões previamente isolados por procedimento adaptado para cromatografia líquida de alta eficiência e posteriormente identificados pelo sistema de espectrometria de massas Synapt da Waters[®]. Para tal foram utilizados frutos congelados provenientes do estado de Minas Gerais. Foi possível identificar na amora-preta a presença das antocianinas cianidina-3-O-glicosídeo e cianidina-3-O-rutenosídeo, as quais foram obtidas a partir do açai (*Euterpe oleraceae* mart.). A identificação destas duas antocianinas na amora-preta através da comparação com os padrões isolados e identificados no laboratório confirmou o que alguns trabalhos presentes na literatura relatam. Além da comparação com o tempo de retenção dos padrões, a identificação também foi confirmada pela técnica de adição padrão. A quantificação das mesmas foi realizada pela técnica de padronização externa, onde uma curva de calibração foi elaborada para cada um dos dois padrões isolados. A concentração dos padrões foi obtida por espectrofotometria UV-Visível, uma vez que o valor da absorvidade molar de cada padrão isolado é conhecido. A concentração encontrada de cianidina-3-O-glicosídeo, a qual equivale a aproximadamente 88% das antocianinas totais da amora-preta foi de 44,2mg/100g. Para a cianidina-3-O-rutenosídeo, composto equivalente a aproximadamente 5% das antocianinas totais deste fruto, foi determinada uma concentração igual a 2,8mg/100g. A partir dos resultados obtidos, observa-se ser possível isolar padrões de diferentes matrizes, para caracterizar outras amostras, com confiabilidade e economia.

Palavras Chave: antocianinas, amora, padrões

**ANEXO 3 – TRABALHO APRESENTADO NA VII
CONFERÊNCIA IBERO-AMERICANA DE CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE MEMBRANA**

**Efeito do pré-tratamento enzimático no teor de antocianinas do suco
de amora-preta processado por microfiltração**

Manuela Araujo^{a*}, Ana C. Gouvêa^b, Daniel Couto^b, Lourdes Cabral^a, Ronoel
Godoy^a, Suely Freitas^{c*}

^{a*} *Embrapa Agroindústria de Alimentos, Av. das Américas, 29501, RJ, Brasil
manuela@ctaa.embrapa.br*

^b *Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, Brasil*

^{c*} *Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil – freitasp@eq.ufrj.br*

INTRODUÇÃO: O fruto da amoreira-preta (*Rubus spp.*) contém 85% de água, 10% de carboidratos, além de ser fonte de compostos funcionais, como ácido elágico e antocianinas [1,2]. Além da função como pigmento, as antocianinas apresentam atividade antioxidante, sendo bastante estudadas nos últimos anos devido a esta propriedade funcional [3]. O grande mercado para produtos de amora-preta é gerado a partir do suco clarificado e concentrado; base da elaboração de uma vasta gama de produtos, como caldas para sorvetes, geléias, xaropes, bebidas alcoólicas e refrescos [4].

Há relatos que em frutas como morangos, cerejas, amoras e ameixas, o suco está retido dentro da estrutura celular e precisa ser liberado. Preparados enzimáticos, quando adicionados à fruta, promovem a quebra da parede celular e hidrolisam os compostos pectolíticos, facilitando o transporte do suco [4]. Esta característica pode aumentar o rendimento de algumas substâncias presentes no fruto quando submetido ao processo de clarificação. O objetivo deste trabalho foi avaliar pela técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) a influência do pré-tratamento enzimático na concentração das antocianinas majoritárias da amora-preta, cianidina-3-O-glicosídeo e cianidina-3-O-rutenosídeo, no suco microfiltrado deste fruto.

MATERIAIS E MÉTODOS: O tratamento enzimático do suco de amora foi realizado antes da etapa de centrifugação do mesmo, com 400ppm da enzima Rapidase, a 35°C por 30 minutos. Após o tratamento enzimático o suco foi centrifugado em centrífuga de cesto. A microfiltração visando à clarificação do suco de amora foi conduzida em um sistema de membranas tubulares composto por três membranas de α -alumina em série com poros de 0,1 μ m de diâmetro e área filtrante total de 0,0165m², a 35 °C.

A avaliação das antocianinas majoritárias pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência foi realizada por metodologia adaptada por Araújo e colaboradores

[5]. A quantificação das mesmas foi realizada por padronização externa a partir de padrões analíticos isolados e identificados por Gouvêa e colaboradores [6].

RESULTADOS: O pré-tratamento enzimático do fruto promoveu uma redução significativa na viscosidade do suco com conseqüente aumento no fluxo permeado, na etapa de microfiltração. De fato, sem o tratamento enzimático o fluxo permeado foi tão baixo que sua determinação ficou inviável. A figura 1 apresenta o comportamento do fluxo permeado ao longo do processo de microfiltração do suco de amora previamente enzimado. A avaliação das antocianinas permitiu que fosse observado um aumento na concentração de antocianinas no suco submetido ao pré-tratamento enzimático quando comparado ao suco in natura (Tabela 1). O tratamento enzimático da amora ocasionou aumento na disponibilidade das duas antocianinas majoritárias do fruto no suco, em relação à amostra integral. Observou-se um aumento de 69% no teor de cianidina-3-O-glicosídeo após o pré-tratamento, enquanto para a cianidina-3-O-rutenosídeo foi observado um aumento de 77,8%.

No processo de microfiltração, 43,1% da cianidina-3-O-glicosídeo da corrente de alimentação passaram para o permeado, enquanto 12% ficaram retidas pela membrana. Em relação à cianidina-3-O-rutenosídeo, 51,5% permearam e 9,2% foram retidas. O balanço de massa do processo demonstrou uma perda de 44,9% e de 39,3% das antocianinas cianidina-3-O-glicosídeo e cianidina-3-O-rutenosídeo, respectivamente, durante o processo.

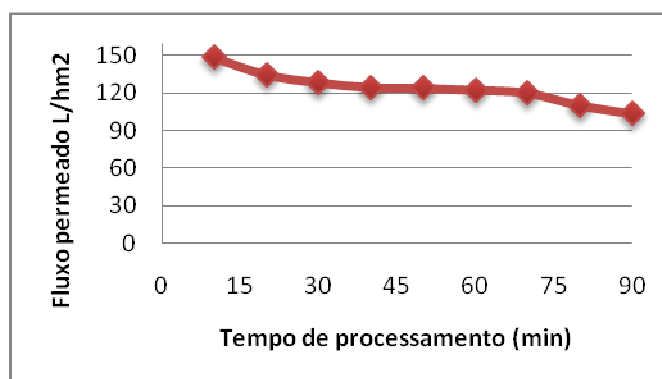


Fig.1. Comportamento do fluxo permeado no processamento por microfiltração do suco de amora preta previamente submetido a um tratamento enzimático.

Tabela 1: Teor de antocianinas nas correntes de suco integral e suco tratado enzimaticamente.

| | Cianidina-3-O-glicosídeo (mg/100g) | Cianidina-3-O-rutenosídeo (mg/100g) |
|---------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| Suco integral | 32,89 | 2,30 |
| Suco após tratamento enzimático | 55,61 | 4,09 |

CONCLUSÕES:

O tratamento com 400 ppm de enzima hidrolítica resultou no decréscimo da viscosidade do suco e viabilizou o processo de clarificação deste suco por microfiltração. Foi observado também que o tratamento enzimático aumentou a concentração das antocianinas no suco de amora. A maior disponibilidade das antocianinas no suco tratado enzimaticamente proporciona o aumento das mesmas nas demais correntes, atenuando o efeito das perdas associadas ao processamento. Por outro lado, os resultados verificados no processo de clarificação indicam a importância de melhorar as condições do processo para evitar as perdas observadas e permitir que o suco clarificado de amora apresente valores destas antocianinas semelhantes ao do suco integral.

REFERÊNCIAS

- [1] L. E. C. Antunes, Amora-preta: Nova opção de cultivo no Brasil. *Ciência Rural* 32 (2002) 151-158.
- [2] M. J. Moreno-Alvarez et al., Estabilidade de antocianinas em jugos pasteurizados de mora (*Rubus glaucus* Benth), *ALAN* 52 (2002) online.
- [3] R. V. Mota, Características Químicas e Aceitabilidade de Geléias de Amora-preta de Baixo Teor de Sólidos Solúveis, *Braz. J. Food Technol.* 10 (2007) 116-121.
- [4] G. L. Granada, J. L. Vendruscolo, R. O. Treptow, Caracterização química e sensorial de sucos clarificados de amora-preta (*Rubus* spp. L.), *Rev. Bras. 144 de Agrociência* 7 (2001) 143-147.
- [5] M. C. P. Araujo, A. C. M. S. Gouvêa, J. S. Rosa, S. Pacheco, J. Oiano-Neto, R. L. O. Godoy, Adaptação de um método por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para determinação de antocianinas em suco de açaí (*Euterpe oleraceae* Mart.). In: XII Congresso Latino Americano de Cromatografia e Técnicas Afins (2008).
- [6] A. C. M. S. Gouvêa, M. C. P. Araujo, S. Pacheco, R. L. O. Godoy, J. Oiano-Neto, J. S. Rosa, L. M. C. Cabral. Anthocyanins standards (cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-rutinoside) isolation from freeze-dried açaí (*Euterpe oleraceae* mart.) by HPLC. In: III Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (2009).