



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ**  
**INSTITUTO DE TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE**  
**ALIMENTOS**

**WANESSA OLIVEIRA DOS SANTOS**

**EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DA POLPA DE JAMBOLÃO (*Syzygium*  
*cumini Lamark*) COM CO<sub>2</sub> SUPERCRÍTICO**

**BELÉM**  
**2015**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ**  
**INSTITUTO DE TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE**  
**ALIMENTOS**

**WANESSA OLIVEIRA DOS SANTOS**

**EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DA POLPA DE JAMBOLÃO (*Syzygium cumini Lamark*) COM CO<sub>2</sub> SUPERCRÍTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pará, Instituto de Tecnologia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

**Orientadora:** Profa. Dra. Alessandra Santos Lopes

**Co-orientador:** Prof. Dr. Raul Nunes de Carvalho Junior

**BELÉM**  
**2015**

**WANESSA OLIVEIRA DOS SANTOS**

**EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DA POLPA DE JAMBOLÃO (*Syzygium cumini Lamark*) COM CO<sub>2</sub> SUPERCRÍTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pará, Instituto de Tecnologia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Data de Avaliação: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Nota: \_\_\_\_\_ Conceito: \_\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Alessandra Santos Lopes  
(PPGCTA/ITEC/UFPA – Orientador)

---

Prof. Dr. Raul Nunes de Carvalho Junior  
(PPGCTA/ITEC/UFPA – Co-orientador)

---

Prof. Dr. Eder Augusto Furtado Araújo  
(PPGCTA/ITEC/UFPA)

---

Profa. Dra. Nádia Cristina Fernandes Corrêa  
(PPGCTA/ITEC/UFPA)

---

Profa. Dra. Marilena Emmi Araújo  
(PPGEQ/ITEC/UFPA)

*“A descoberta consiste em ver o que  
todo mundo viu e pensar o que ninguém  
pensou”.*  
*A. Szent-Gyorgyi*

## **DEDICATÓRIA**

**A minha “grande família”, amor eterno.  
Ao grande e único amor da minha vida, Léo.**

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por intercessão de São Benedito, que me guia e ilumina.

À minha família e ao meu noivo, por todo incentivo, amor, carinho e compreensão que tanto me foram importantes, principalmente, nos momentos difíceis. Sem vocês isso tudo não teria sentido.

À minha orientadora, Dra. Alessandra Lopes, pelos ensinamentos técnico-científicos e por me oportunizar esse sonho de ingressar e finalizar o mestrado.

Ao meu co-orientador, Dr. Raul Nunes, por todo apoio e conhecimento repassado.

À banca composta pelos professores: Dra. Nádia Corrêa, Dr. Éder Araújo, Dra. Marilena Emmi, pela apreciação e colaboração no trabalho.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pará (UFPA), por ter permitido a realização deste trabalho.

Ao CNPq pelo financiamento deste trabalho através da concessão da bolsa de estudos.

Aos membros dos laboratórios: LABIOTEC, LABEX e LAFAMI, pelos momentos vivenciados, pela prática do trabalho e apoio técnico-científico.

A UEPA campus Cametá por permitir utilizar de suas estruturas no início deste trabalho.

Aos colegas pós-graduandos pela ajuda e momentos de descontração.

A amiga Carina pela parceria quando mais precisava, ao amigo Botelho pelas análises supercríticas, a amiga Thaise pelo incentivo e colaboração nas análises e a Ju pelas palavras sempre oportunas, muito obrigada!

A todos meus amigos que mesmo distantes fisicamente, sempre me apoiaram e torceram por mim!

## RESUMO

O jambolão (*Syzygium cumini Lamark*) é um fruto de fácil adaptação em diversas regiões do Brasil, entretanto, ainda pouco explorado nutricionalmente e economicamente. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a composição físico-química do fruto *in natura* e liofilizado e o efeito de diferentes ensaios de extrações sólido-líquida e por CO<sub>2</sub> supercrítico com utilização da água como cossolvente, na manutenção dos compostos bioativos (antocianinas e polifenóis totais) e na colorimetria na polpa do fruto *in natura* e liofilizado. As análises físico-químicas e de compostos bioativos do fruto *in natura* e liofilizado, demonstraram que o processo de secagem promoveu a manutenção das características do fruto *in natura*, especialmente nos teores de carboidratos (72,42%), antocianinas (212,39 mg/100g) e polifenóis totais (599,15mg/100g). Nas extrações sólido-líquida observou-se que os maiores teores de antocianinas (32,94 mg/100g) e polifenóis totais (8,68 mg/100 g) encontrados foram nos ensaios correspondentes a razão sólido/líquido de 6,5g/ 25 ml e 18,75/25 ml, respectivamente, tais condições foram realizadas na temperatura de 40°C no tempo de 4h. Os polifenóis diminuíram com as extrações na faixa de 15,28% a 17,27%. A colorimetria e capacidade antioxidante dos extratos não apresentaram significância ao nível de 5% de probabilidade. As extrações supercríticas apresentaram teores elevados de antocianinas (161,18 mg/100g<sup>-1</sup>) na condição de 50°C, 150bar, 0,7g cm<sup>-3</sup> e 2h e polifenóis totais (257,73mg/100g) na condição de 45°C, 300bar, 0,9g cm<sup>-3</sup> e 2h. As extrações (sólido-líquida e supercrítica) afetaram significativamente a manutenção dos compostos bioativos, entretanto, a extração com CO<sub>2</sub> supercrítico apresentou melhores resultados de manutenção desses componentes. Os resultados mostraram que o fruto de jambolão *in natura* e liofilizado pode ser considerado fonte de compostos bioativos e quanto maior o teor destes compostos maior a capacidade antioxidante.

**Palavras-chave:** polifenóis, antocianinas, antioxidantes.

## ABSTRACT

The jambolan (*Syzygium cumini* Lamark) is a result of easy adaptation in various regions of Brazil, however, still little explored nutritionally and economically. This study aimed to evaluate the physical and chemical composition of the fruit fresh and dried and the effect of different tests of solid-liquid extraction and supercritical CO<sub>2</sub> using water as co-solvent, the maintenance of bioactive compounds (anthocyanins and polyphenols total) and colorimetry in the pulp of fresh and lyophilized. The physico-chemical and bioactive compounds from the fruit fresh and lyophilized, showed that the drying process promoted the maintenance of fruit properties in nature, especially in carbohydrates (72.42%), anthocyanins (212.39 mg / 100g) and total polyphenols (599,15mg / 100g). In the solid-liquid extractions was observed that the highest anthocyanin content (32.94 mg / 100 g) and total polyphenols (8.68 mg / 100 g) were found in the corresponding test due to solid / liquid 6.5g / 25 and 18.75 ml / 25 ml, respectively, these conditions were held at 40 ° C in the time of 4h. Polyphenols decreased with the extractions in the range of 15.28% to 17.27%. The colorimetry and antioxidant capacity of the extracts were not significant at 5% probability. The supercritical extraction showed high levels of anthocyanins (161.18 mg / 100g<sup>-1</sup>) in the condition of 50 ° C, 150bar, 0.7g cm<sup>-3</sup> and total polyphenols and 2h (257,73mg / 100g) under the condition of 45 ° C, 300bar 0.9g cm<sup>-3</sup> and 2h. Extractions (solid-liquid and supercritical) significantly affected the maintenance of bioactive compounds, however, extraction with supercritical CO<sub>2</sub> showed a better service these components. The results showed that fresh fruit and lyophilized jambolan can be considered a source of bioactive compounds, and the higher the content thereof higher antioxidant capacity.

Keywords: polyphenols, anthocyanins, antioxidants.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Árvore de jambolão ( <i>Syzygium cumini Lamark</i> ).....	15
<b>Figura 2.</b> Frutos de jambolão desperdiçados no solo .....	16
<b>Figura 3.</b> Aspectos visuais da parte interna e externa do fruto de jambolão e sua semente....	16
<b>Figura 4.</b> Identificação estrutural das antocianidinas .....	20
<b>Figura 5.</b> Diagrama esquemático de um processo de extração supercrítica.....	27
<b>Figura 6.</b> Frutos de jambolão ( <i>Syzygium cumini Lamark</i> ) (A e B) e coleta dos frutos (C) ....	30
<b>Figura 7.</b> Polpa de jambolão ( <i>Syzygium cumini Lamark</i> ).....	31
<b>Figura 8.</b> Extração sólido-líquido da polpa de jambolão.....	35
<b>Figura 9.</b> Extratos sólido-líquido da polpa de jambolão .....	35
<b>Figura 10.</b> Polpa liofilizada de jambolão.....	36
<b>Figura 11.</b> Extratos da polpa liofilizada de jambolão por CO <sub>2</sub> supercrítico com uso de H <sub>2</sub> O como cossolvente.....	37

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Variáveis independentes e seus diferentes níveis da extração sólido-líquido .....	34
<b>Tabela 2.</b> Planejamento fatorial linear $2^3$ da extração sólido-líquida .....	34
<b>Tabela 3.</b> Características físicas e de rendimento do jambolão ( <i>Syzygium cumini Lamark</i> ) <i>in natura</i> e liofilizado .....	41
<b>Tabela 4.</b> Características físico-químicas do jambolão ( <i>Syzygium cumini Lamark</i> ) <i>in natura</i> e liofilizado.....	42
<b>Tabela 5.</b> Compostos bioativos e colorimetria da polpa de jambolão ( <i>Syzygium cumini Lamark</i> ) <i>in natura</i> e liofilizada.....	45
<b>Tabela 6.</b> Média e desvio-padrão das coordenadas de cor instrumental $L^*$ , $a^*$ e $b^*$ e $\Delta E^*$ das extrações sólido-líquida para cada ensaio do planejamento .....	48
<b>Tabela 7.</b> Média* e desvio-padrão do teor de antocianina das extrações sólido-líquida.....	49
<b>Tabela 8.</b> Efeito estimado, erro puro, coeficiente t e significância estatística de cada fator para o teor de antocianinas totais.....	50
<b>Tabela 9.</b> Análise de variância (ANOVA) do modelo para o teor de antocianinas totais da extração sólido-líquido .....	51
<b>Tabela 10.</b> Média e desvio-padrão do teor de polifenóis totais das extrações sólido/líquido .	52
<b>Tabela 11.</b> Efeito estimado, erro puro, coeficiente t e significância estatística de cada fator para o teor de polifenóis totais.....	53
<b>Tabela 12.</b> Análise de variância (ANOVA) do modelo para o teor de antocianinas totais da extração sólido-líquido .....	55
<b>Tabela 13.</b> Média* e desvio-padrão da capacidade antioxidante pelo método de DPPH extrações sólido-líquido.....	56
<b>Tabela 14.</b> Porcentagem de retenção na quantificação de antocianinas e polifenóis totais da extração sólido-líquida .....	57
<b>Tabela 15.</b> Parâmetros da caracterização dos extratos por $CO_2$ supercrítico.....	58
<b>Tabela 16.</b> Porcentagem de retenção na quantificação de antocianinas e polifenóis totais da extração supercrítica. ....	61

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>15</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICO .....	15
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>16</b>
3.1 ASPECTOS GERAIS DO JAMBOLÃO .....	16
<b>3.1.1 Origem e distribuição geográfica e características do fruto</b> .....	<b>16</b>
3.2 ANTIOXIDANTES .....	18
<b>3.2.1 Antocianinas</b> .....	<b>20</b>
3.3 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS DA MATRIZ VEGETAL .....	22
<b>3.3.1 Extração sólido-líquida</b> .....	<b>23</b>
<b>3.3.2 Extração por fluido supercrítico (SFE)</b> .....	<b>26</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
4.1 MATERIAL .....	31
<b>4.1.1 Matéria-prima</b> .....	<b>31</b>
<b>4.1.2 Processamento da matéria-prima</b> .....	<b>31</b>
4.2 MÉTODOS .....	32
<b>4.2.1 Caracterização física dos frutos de jambolão</b> .....	<b>32</b>
<b>4.2.2 Caracterização físico-química da polpa de jambolão</b> .....	<b>33</b>
<b>4.2.3 Extração de compostos bioativos da polpa de jambolão</b> .....	<b>34</b>
4.2.3.1 Extração sólido-líquida da polpa de jambolão .....	35
4.2.3.2 Extração por fluido supercrítico da polpa de jambolão.....	37
<b>4.2.4 Determinação dos compostos bioativos e colorimetria instrumental da polpa e dos extratos de jambolão</b> .....	<b>39</b>
4.2.4.1 Compostos fenólicos totais.....	39
4.2.4.2 Antocianinas Totais .....	39
4.2.4.3 Capacidade Antioxidante <i>in vitro</i> pelo método de DPPH.....	40
4.2.4.4 Colorimetria instrumental.....	41
4.3 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS RESULTADOS .....	41
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>42</b>

5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E RENDIMENTO DO JAMBOLÃO IN NATURA E LIOFILIZADO.....	42
5.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO JAMBOLÃO IN NATURA E LIOFILIZADO .....	43
5.3 COMPOSTOS BIOATIVOS, CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E COLORIMETRIA INSTRUMENTAL DO JAMBOLÃO IN NATURA E LIOFILIZADO .....	46
5.4 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS SÓLIDO/LÍQUIDO DA POLPA DE JAMBOLÃO .....	49
<b>5.4.1 Colorimetria instrumental .....</b>	<b>40</b>
<b>5.4.2 Antocianinas.....</b>	<b>50</b>
<b>5.4.3 Polifenóis Totais.....</b>	<b>53</b>
<b>5.4.4 Capacidade Antioxidante pelo método de DPPH .....</b>	<b>55</b>
5.5 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDA NA MANUTENÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DA POLPA DE JAMBOLÃO...57	
5.6 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS POR CO <sub>2</sub> SUPERCRÍTICO DA POLPA LIOFILIZADA DE JAMBOLÃO .....	58
5.7 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA EXTRAÇÃO POR CO <sub>2</sub> SUPERCRÍTICO NA MANUTENÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DA POLPA LIOFILIZADA DE JAMBOLÃO .....	61
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>63</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>64</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Em humanos, o desequilíbrio entre espécies oxidantes e antioxidantes pode provocar uma série de desordens celulares, tais como peroxidação lipídica, danos proteico-enzimáticos e alterações no DNA, as quais podem estar associadas a inúmeros processos delétricos, como o câncer, aterosclerose, diabetes *melitus*, além de envelhecimento precoce (BIANCO; SANTOS, 2010). Assim, a busca por produtos naturais com propriedades biológicas e que não ofereçam riscos aos consumidores é crescente.

Diversos benefícios à saúde são atribuídos aos alimentos ricos em compostos fenólicos e outros antioxidantes, tais como o ácido ascórbico, os tocoferóis e os carotenóides. Os polifenóis, além de atuarem como antioxidantes diretos, influenciam na atividade protetora do organismo contra danos oxidativos, protegendo as biomoléculas e as moléculas do DNA e RNA. Estes fatores têm elevado a procura por novas espécies botânicas que possuam, além dessa propriedade, uma atividade biológica complementar relevante (CÉSPEDES et al., 2008; EFRAIM; ALVES; JARDIM, 2011; FLOEGEL et al., 2011).

A espécie *Syzygium cumini* (L.) conhecida como jambolão é uma frutífera exótica da família *Myrtaceae* nativa dos trópicos, particularmente da Índia, amplamente cultivada no Brasil como árvore ornamental e de sombra. Os frutos, assim como cascas, sementes e folhas são utilizados tradicionalmente para o tratamento de diabetes e diferentes distúrbios gastrointestinais. Em comparação com outros frutos não tradicionais do Brasil, o jambolão mostrou atividade antioxidante consideravelmente elevada (RUFINO, 2008; WANG; STONER, 2008; LIN, 2009; FARIA; MARQUES; MIGLIATO et al., 2010; MERCADANTE, 2011).

O jambolão é um fruto que se destaca em função do alto teor de antocianinas, especialmente encontrados em sua casca. O conteúdo de antocianinas totais na casca da fruta madura é de  $731 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$  de peso fresco. Alimentos que contêm antocianinas, em diferentes sistemas experimentais (*in vitro*, estudos com animais, ensaios clínicos) mostram efeitos antioxidantes, anticancerígenos e imunomoduladores. (WANG; STONER, 2008; KAY; KROON; CASSIDY, 2009; SARI et al., 2009; HE ; GIUSTI, 2010; FRANK; KÖHLER; SCHUCHMANN, 2012).

Observa-se um crescente interesse no uso de antocianinas em diversos segmentos, dentre os quais se destacam as indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética, onde podem ser aplicadas, por exemplo, como corantes. E, devido à toxicidade e proibição do uso desses componentes, nota-se um crescente interesse por corantes obtidos a partir de fontes naturais

(TÜRKER; ERDOGDU, 2006; MACZ-POP; RIVAS-GONZALO; PÉREZ-ALONSO; GONZALÉZ-PARAMÁS, 2006; GIUSTI; WROLSTAD, 2013).

Desse modo, o estudo das melhores condições de extração destes compostos da matriz vegetal é de fundamental importância. Sabe-se que a extração utilizando solvente tem sido o método mais comum de extração de diversos compostos encontrados em frutas. Os compostos fenólicos são extraídos por trituração, secagem, liofilização dos frutos, ou apenas por imersão das frutas frescas em solvente (MERKEN; BEECHER, 2000). Antocianinas são moléculas polares, assim, os solventes mais utilizados em extrações são misturas aquosas de etanol, metanol ou acetona (KAHKONEN; HOPIA; HEINONEN, 2001).

No entanto, há uma grande busca por tecnologias inovadoras que visem melhores retenções e extrações dos pigmentos. Sobre este propósito Perrut (2000) relata que a EFS (Extração com Fluido Supercrítico) apresenta consideráveis vantagens em relação às técnicas convencionais, pois, o solvente pode ser facilmente removido da mistura mediante redução da pressão e / ou de regulação da temperatura.

Este trabalho tem como objetivo estudar dois diferentes métodos de extração (extração sólido-líquida e através de fluido supercrítico) da polpa do jambolão (*Syzygium cumini Lamark*) e avaliar a eficiência de extração para a manutenção dos compostos bioativos presentes na polpa do fruto.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Estudar a eficiência da extração de dois diferentes métodos (por fluido supercrítico e sólido-líquido) na manutenção dos compostos bioativos da polpa de jambolão.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar a eficiência da extração sólido-líquido para os compostos bioativos do jambolão;
- Avaliar a eficiência da extração supercrítica por CO<sub>2</sub> com uso de cossolvente para os compostos bioativos do jambolão;
- Determinar os polifenóis totais, as antocianinas totais, capacidade antioxidante e cor instrumental da polpa e dos extratos (por fluido supercrítico ou sólido-líquido) do jambolão.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 ASPECTOS GERAIS DO JAMBOLÃO

##### 3.1.1 Origem, distribuição geográfica e características do fruto

O jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) (Figura 1) foi classificado botanicamente como *Eugenia jambolana* e posteriormente, reclassificado como *Syzygium cumini* (LAGO; GOMES; SILVA, 2006). Possui várias sinonímias, sendo conhecido também como jalão, cereja, azeitona preta, azeitona roxa, azeitona-doce, *jambul*, *jaman* (Ásia), *faux pistachier* (França), *indian black berry* (Inglaterra) e *jambal*, *duhat* (Finlândia) (RUFINO, 2008).



**Figura 1.** Árvore de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels). (Fonte: Sousa, 2012).

É uma árvore perenifólia de copa frondosa e densa, de 15 a 20 metros de altura, com tronco geralmente tortuoso (RUFINO, 2008). É uma planta bastante rústica e prefere o clima quente e úmido, por isso, adapta-se bem em qualquer tipo de solo, inclusive os impróprios para o cultivo comercial de outras fruteiras (DONADIO, 2007).

Segundo Sá (2008) o jambolão se propaga por todas as regiões tropicais do mundo, é uma fruta pequena, de forma elipsoide, que se torna roxa escura quando completamente madura, de pele fina, lustrosa e aderente. Sua polpa, também roxa, é carnosa e envolve uma semente única e grande. Nas épocas de safras, as suas árvores ficam carregadas de frutos e quando maduros, despençam e se acumulam no solo (Figura 2). Apesar dessa abundância,



esses frutos não são tradicionalmente consumidos por populações urbanas, sendo mais utilizados para fins medicinais.



**Figura 2.** Frutos de jambolão desperdiçados no solo. (Fonte: dados da pesquisa).

As folhas são simples, coriáceas, glabras, aromáticas, lustrosas, medindo de 8 a 14 cm de comprimento, com a nervura principal destacada e o pecíolo de 1 a 3 cm, e as flores são dominadas pelos estames de coloração branca a creme e ficam dispostas em grandes quantidades em rancemos axilares ramificados (AYYANAR; SUBASH-BABU, 2012).

Os frutos (Figura 3) são carnosos do tipo baga, elipsoides, apresentando cerca de 3 a 4 cm de comprimento e 2 cm de diâmetro, com pericarpo de coloração roxo-escuro intenso quando maduro e apresenta apenas uma semente (SÁ, 2008). O sabor, apesar de um pouco adstringente, é agradável ao paladar (FARIA; MARQUES; MERCADANTE, 2011).



**Figura 3.** Aspectos visuais da parte interna e externa do fruto de jambolão e sua semente. (Fonte: Vizzotto; Pereira, 2008).

A forma de multiplicação da árvore é através da dispersão das sementes, normalmente realizada por pássaros e pequenos animais (LORENZI et al., 2006). No Brasil geralmente a árvore floresce nos meses de agosto a novembro, e os frutos são encontrados abundantemente nos meses de outubro a dezembro.

Vários componentes fazem parte da composição química de frutas e hortaliças, os quais conferem as características de cor, sabor e flavor, além dos efeitos nutricionais e nutracêuticos, mas a grande maioria se apresenta em quantidades muito pequenas quando expressos em peso (BARCIA, 2009). Dentre os componentes mais importantes presentes no jambolão, incluem-se a água, pigmentos antocianicos, vitaminas, minerais e outros componentes resultantes do metabolismo secundário, denominados fitoquímicos (SÁ, 2008).

Estas substâncias são produzidas naturalmente pelas plantas para se protegerem do ataque de pragas e doenças e também para ajudarem a suportar as condições adversas do ambiente. Esses compostos são responsáveis por suas várias propriedades farmacológicas, e são amplamente utilizados na medicina popular (VIZZOTO; PEREIRA, 2008), por conferir ação hipoglicemiante, antimicrobiana, hipotensiva, diurética, cardiotônica, antiinflamatória, antiemética, estimulante do sistema nervoso central, antipirética, anticonvulsivante, anti-hemorrágica, carminativa e antiescorbútica (CHAUDHARY; MUKHOPADHYAY, 2012).

Na indústria alimentícia, utiliza-se o fruto de jambolão, como ingrediente de diversos produtos alimentícios, como doces, geleias, sucos, vinagres, pudins e bebidas, como o vinho (CHAUDHARY; MUKHOPADHYAY, 2012).

### 3.2 ANTIOXIDANTES

Os antioxidantes podem ser definidos como qualquer substância que, presente em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável, retardam ou inibem significativamente sua oxidação, diminuindo assim, a velocidade de reação e conseqüentemente prolongam a sua estabilidade oxidativa (MOURE et al., 2001).

Esses compostos podem ser de origem endógena ou exógena. Neste último caso, são obtidos pela dieta, e são conhecidos como antioxidantes naturais, o seu consumo aumenta a resistência aos danos provocados pela oxidação, o que causa um impacto positivo para a saúde humana (PRADO, 2009). Além disso, esses compostos podem ajudar na proteção do organismo contra os danos causados pelas espécies reativas do oxigênio (ERO's) e doenças degenerativas como câncer, doenças cardiovasculares, diabetes mellitus, entre outras (SHAHIDI, 1996).

A forma de atuação desses compostos, de modo a proporcionar tais benefícios, ocorre por vários mecanismos nos organismos vivos, tais como complexação de íons metálicos, captura de radicais livres, inibição de enzimas responsáveis pela geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e modulação de vias sinalizadoras celulares (VASCONCELOS; SILVA; GOULART, 2006).

Como os compostos antioxidantes permitem ao organismo combater o excesso de radicais livres, vários estudos estão voltados para pesquisa de frutos, como o jabolão, que possui essas propriedades, bem como o desenvolvimento de novos produtos que também proporcionem essa ação ao organismo humano (AYYANAR; SUBAHS-BABU, 2012).

Entre os mais importantes antioxidantes naturais estão os compostos fenólicos (flavonóides, ácidos fenólicos e taninos), compostos nitrogenados (alcalóides, aminoácidos, peptídeos, aminas e derivados da clorofila), carotenóides, tocoferóis e ácido ascórbico (AMAROWICZ et al., 2010).

Desses, destaca-se os compostos fenólicos, substâncias amplamente distribuídas no reino vegetal, em particular nas frutas e em outros vegetais. São conjuntos heterogêneos que apresentam em sua estrutura vários grupos benzênicos característicos, substituídos por grupamentos hidroxilas (SOARES et al., 2008).

Esses compostos têm recebido muita atenção devido a sua atividade biológica, uma vez que estudos sugerem que os alimentos vegetais que os contêm, quando ingeridos, frequentemente através da dieta, apresentam efeitos benéficos à saúde, entre os quais os de antiinflamatório, antioxidante, antimicrobiana, analgésica e vasodilatadora (EFRAIM; ALVES; JARDIM, 2011).

As frutas são alimentos essenciais para a manutenção da saúde e seu consumo vem aumentando, o que se deve ao elevado teor de compostos bioativos. Essas substâncias têm atraído a atenção dos cientistas, principalmente, pela capacidade de proteger o organismo dos danos causados pelos radicais livres atuando, dessa forma, na prevenção de doenças causadas como resultado do estresse oxidativo (KAUR; KAPOOR, 2001; NERI-NUMA et al., 2013).

Muitas dessas substâncias que dão características aos alimentos funcionais são substâncias bioativas oriundas do metabolismo secundário de plantas, também denominadas de compostos fitoquímicos, e podem ser definidas como substâncias altamente ativas do ponto de vista nutricional, fisiológico e/ou medicinal (GOLDBERG, 1994).

Gordon et al. (2011) realizaram a identificação completa, por HPLC, dos constituintes polifenólicos de frutos oriundos da região amazônica, são eles: o araçá (*Psidium guineense*), jabolão (*Syzygium cumini*), muruci (*Byrsonima crassifolia*), e cutite (*Pouteria*

*macrophylla*). Os autores observaram um grande número de compostos fenólicos, dos quais 37 estão presentes no jambolão. Esse resultado foi atribuído à presença de taninos hidrolisáveis, proantocianidinas e flavonóis nos frutos.

Os compostos antioxidantes podem ser classificados em sintéticos ou naturais. Os antioxidantes sintéticos são comumente utilizados na indústria de alimentos para aumentar a vida de prateleira dos alimentos. São exemplos de antioxidantes sintéticos: o butilhidroxitolueno (BHT), o butilhidroxianisol (BHA), o propilgalato (PG) e o terciobutilhidroxinona (TBHQ) (BARREIROS; DAVID, 2006).

O consumo dos antioxidantes sintéticos tem sido associado a malefícios a saúde (GUNDUC; EL, 2003; SVILAAS et al., 2004). Isso tem instigado a indústria de alimentos a reduzir seu uso, além de buscar outras alternativas, ainda que parciais, como os antioxidantes naturais. Existem fórmulas, já comercializadas, para adição em alimentos elaboradas a partir de substratos com alto potencial antioxidante, como os extratos de alecrim e orégano (TRINDADE, 2007). Dessa forma, pesquisas têm enfatizado o desenvolvimento e utilização de antioxidantes provenientes de fontes naturais como o tocoferol e o ácido ascórbico (VASCONCELLOS, 2007; LIMA, 2008; GIADA, 2006).

### **3.2.1 Antocianinas**

As antocianinas são flavonóides que conferem as várias nuances de cores entre vermelho e azul encontradas em frutas, vegetais, flores, folhas e raízes. Essa variedade de cores se deve a uma forte absorção de luz na região do visível, dependendo do meio em que se encontra (SÁ, 2008).

Uma das principais funções das antocianinas em flores e frutas é o poder de atrair agentes polinizadores e dispersores de sementes, além de proteger diversos tecidos da planta de processos oxidativos, durante diversas etapas de seu ciclo de vida, principalmente em fases iniciais do crescimento (HARBORNE, 1997; EIBOND; REYNERTSON; LUO; BASILE; KENNELLY, 2004).

As antocianinas são sempre lembradas como alternativas para corantes sintéticos, principalmente em alimentos e cosméticos pela coloração vermelha (TÜRKER; ERDOGDU, 2006). Devido à toxicidade de alguns corantes sintéticos e à proibição do uso de alguns destes compostos (WROLSTAD, 2004), nota-se um crescente interesse por corantes obtidos a partir de fontes naturais (TÜRKER; ERDOGDU, 2006; MACZ-POP; RIVAS-GONZALO; PÉREZ-ALONSO; GONZALÉZ-PARAMÁS, 2006; GIUSTI; WROLSTAD, 2013).

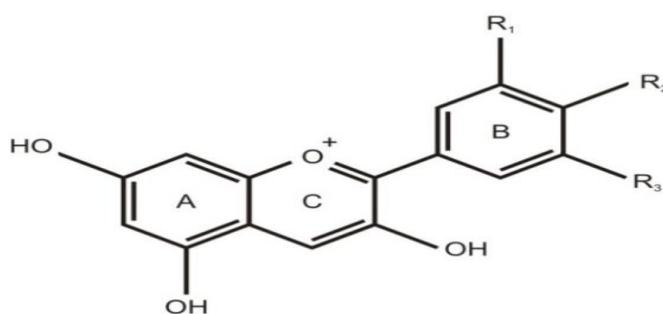
Além de sua capacidade colorífica diversas são as atividades biológicas atribuídas às antocianinas como: atividade anticarcinogênica (HAGIWARA et al., 2001), antioxidante (WANG et al., 2000) e antiviral (KAPADIA et al., 1997). Além disso, tais compostos podem atuar na inibição de enzimas oxidativas e inflamatórias demonstrando ação antialérgica, antiviral, bactericida, fungicida, antitumor e antihemorrágica (EINBOND et al., 2004; REYNERTSON et al., 2008).

Diante disso, as antocianinas representam uma alternativa atrativa como fonte de pigmentos vegetais de alto poder tintorial. Apesar dessas vantagens, a utilização de antocianinas nas indústrias de alimentos e de cosméticos ainda é restrita devido à sua baixa estabilidade em meios aquosos e pH acima de 3,0 (FALCÃO et al., 2003). Além disso, há ainda uma grande escassez desses compostos no mercado principalmente devido a falta de fontes e técnicas de produção adequadas e economicamente viáveis (BAILONI, et al., 1998).

Jie et al. (2013) relatam que o principal problema com a aplicação de corantes de antocianina é a sua baixa estabilidade sob a variação de oxigênio, luz, temperatura e condições de pH, entre outros fatores. Por conseguinte, faz-se necessário determinar e controlar estes fatores para substituir, com sucesso, os corantes sintéticos.

As antocianinas atuam na prevenção de muitas doenças degenerativas. Esse potencial é regulado por suas diferenças na estrutura química, uma vez que varia a posição e os tipos de grupos químicos em seus anéis aromáticos, dessa forma, a capacidade de aceitar elétrons desemparelhados de moléculas de radicais também varia. (VOLP et al., 2008).

De acordo com Konczak e Zhang (2004) as antocianidinas são as estruturas básicas das antocianinas. As antocianidinas ou agliconas (Figura 4) são compostas por um anel aromático [A] ligado a um anel heterocíclico [C] que contém oxigênio, que também está ligada por meio de ligações carbono-carbono a um terceiro anel aromático [B]. Quando as antocianidinas são encontradas em sua forma glicosídica (ligada a uma fração de açúcar) elas são conhecidas como antocianinas.



**Figura 4.** Identificação estrutural das antocianidinas (Fonte: Castañeda-Ovando et al., 2009).

Os açúcares mais comuns presentes na estrutura antociânica são a glicose, a galactose, a ramanose e a arabinose. Estes são geralmente ligados na posição 3 do anel C ou nas posições 5 e 7 do anel B, ocorrendo como monossacarídeo, dissacarídeo ou trissacarídeo (PEREIRA et al., 2009). O açúcar presente nas moléculas das antocianinas confere maior solubilidade e estabilidade a estas substâncias, quando comparadas às antocianidinas, além de terem efeitos determinantes nos processos de absorção e excreção destes compostos (HARBORNE, 1997).

Além da sua potencial utilização como corantes naturais, segundo Lee et al. (2009) as antocianinas constituem pigmentos com uma gama de atividades biológicas as quais incluem: atividade antioxidante (TSUDA et al., 2003), anti-inflamatória (WANG; MAZZA, 2002; YODIM et al., 2002), anticâncer (HOU, 2003), antimutagênica (PETERSON; DWYER, 1998), quimiopreventiva (ZHAO et al., 2004) e inibição da enzima *o*-glucosidase (MATSUI et al., 2001), antivirais (KAPADIA et al., 1997), dentre outras.

Além disso, podem reduzir o risco de doenças coronárias através da modulação da proteção arterial (COLANTUONI et al., 1991), inibição da agregação de plaquetas (MORAZZONI; MAGISTRETTI, 1990) ou proteção endotelial (YODIM et al., 2002).

As antocianinas são amplamente distribuídas na dieta humana, sendo encontradas no vinho tinto, certas variedades de cereais e alguns vegetais (repolho, feijão, cebola, rabanetes), porém, são encontradas com maior abundância nas frutas (WANG; CAO; PRIOR, 1997; D'ARCHIVIO et al., 2007).

O jambolão, quando comparado com outros frutos da família das *Myrtaceae*, mostrou um elevado teor de antocianinas (211mg.100g<sup>-1</sup>). A composição de antocianinas de jambolão foi marcada pela presença de diglicosídeos, que são diferentes agliconas (FARIA; MARQUES; MERCADANTE, 2011). As antocianinas majoritárias da polpa de jambolão foram identificadas como 3,5-diglicosídeos de delphinidina, petunidina e malvidina (VEIGAS et al., 2007; FARIA et al., 2011).

### 3.3 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS DA MATRIZ VEGETAL

Os extratos naturais desempenham um papel importante como aditivos ou insumos nas indústrias cosmética, farmacêutica, alimentícia, têxtil e de perfumaria proporcionando diversas características ao produto final de acordo com as suas funções e aplicações. A maioria dos extratos naturais possuem mais do que uma ou duas funções podendo ser utilizados como corantes naturais, nutracêuticos, alimentos funcionais, agentes conservantes,

aromatizadores e fragrâncias, medicamentos, suplementos vitamínicos, padrões químicos, perfumes, entre outros (HERRERO; CIFUENTES; IBAÑEZ, 2006).

Os processos de extração consistem em operações unitárias que visam à separação de determinados compostos a partir de uma matriz através de processos químicos, físicos ou mecânicos. De acordo com o estado de agregação da matriz, existem três tipos básicos de processos extrativos: extração sólido-líquido, extração líquido-líquido e extração gás-líquido (TZIA; LIADAKIS, 2003; VELASCO et al., 2007).

De acordo com Huie (2002) vários métodos de extração podem ser aplicados para a obtenção de compostos de interesse. Com relação à escolha do processo mais adequado, vários fatores devem ser considerados (AL-JABARI, 2002), como custo, rendimento, produtividade e seletividade. Os três primeiros fatores possuem implicações econômicas importantes e determinam a viabilidade da aplicação industrial do processo. Já a seletividade está intimamente relacionada com a qualidade do produto obtido (QUISPE-CONDORI, 2005).

### **3.3.1 Extração sólido-líquido**

O processo de extração sólido-líquido define-se como sendo uma operação unitária de transferência de massa multicomponente, de várias fases e sob regime transiente cuja finalidade é retirar um ou mais componentes contidos em uma fase sólida ou semi-sólida (soluto) para uma fase líquida (solvente). De acordo com o objetivo do processo a extração sólido-líquido pode ser denominada de diversas maneiras como, por exemplo, lixiviação, percolação, etc. (IBARZ; BARBOSA-CÁNOVAS, 2003; TZIA; LIADAKIS, 2003).

A extração sólido-líquido consiste em um importante processo de separação com grande utilidade na indústria de alimentos como nos processos de extração de: açúcar da cana, óleos e gorduras de sementes oleaginosas, fitoquímicos de plantas, hidrocolóides funcionais de algas, etc. Além disso, este processo extrativo pode ser utilizado também para a eliminação de componentes indesejáveis, contaminantes e/ou toxinas presentes em alimentos (TZIA; LIADAKIS, 2003).

Os processos convencionais de extração fundamentam-se na seleção do solvente associado com o uso do calor e/ou agitação. Esses processos incluem a hidrodestilação (HD – Hydrodistillation) e os processos de extração a baixa pressão (LPSE - Low Pressure Solvent Extraction), sendo o Soxhlet a técnica padrão utilizada como principal referência para avaliar

o rendimento de outros métodos de extração sólido-líquido (LUQUE DE CASTRO; GARCÍA-AYUSO, 1998).

As principais desvantagens desses processos são seus altos tempos de residência, grandes quantidades de solvente requeridas e degradação térmica, além dos seus possíveis resíduos muitas vezes proibidos em alimentos (SEBASTIÁN et al., 1998).

Neste processo de extração ocorrem as seguintes etapas: contato do solvente com o sólido, que lhe cede o componente solúvel; separação da solução do sólido remanescente por filtração; destilação ou evaporação, para recuperação do soluto dissolvido no líquido extrator (WEYNE, 2009). No final do processo, obtém-se o resíduo (substrato esgotado, refinado) e o extrato (solvente com soluto de interesse) (FERREIRA, 2013).

A extração utilizando solvente orgânico tem sido o método mais comum de extração de diversos compostos encontrados em frutas. Geralmente, os compostos fenólicos são extraídos por trituração, secagem, liofilização dos frutos, ou apenas por imersão em solvente de frutas frescas (MERKEN; BEECHER, 2000). Misturas aquosas de etanol, metanol ou acetona são os solventes mais utilizados nas extrações de antocianinas, em função da polaridade do composto (KAHKONEN; HOPIA; HEINONEN, 2001).

Segundo Fuleki e Francis (1968) a extração de antocianinas é necessariamente o primeiro passo para a determinação de seus teores totais e individuais em qualquer tipo de tecido vegetal. Além disso, o método deve permitir perdas mínimas e recuperação máxima de antocianinas com uma quantidade mínima de suplementos. Lee e Hong (1992) frisam que a extração deve ser realizada em meio ácido para prevenir a oxidação do pigmento.

As antocianinas são moléculas polares e, conseqüentemente, são mais solúveis em solventes polares do que em apolares. Além disso, a sua solubilidade depende de alguns fatores o que incluem as condições do meio tal como o valor de pH.

Os métodos mais comumente empregados são maceração, Soxhlet e extração em leito agitado (ABE – agitated bed extraction). O solvente mais comumente utilizado é o metanol, mas muitos outros tem sido utilizados como acetona (LIAZID et al., 2007), etanol (ROSTAGNO et al., 2003) ou acetonitrila (WU; PRIOR, 2005). Os ácidos utilizados podem ser fortes (ácido trifluoroacético, clorídrico, sulfúrico, etc.) ou fracos (ácido fórmico, acético, láctico, etc.), porém especial cuidado deve ser tomado a fim de evitar a hidrólise das antocianinas aciladas (KAPASAKALIDIS et al., 2006; LIAZID et al., 2007).

Em diversas pesquisas sobre extração de antocianinas, são empregados solventes alcoólicos acidificados, por exemplo, utilizam HCl (1% v/v) em metanol, visto que o ácido previne a oxidação das antocianinas. No entanto, Jackman et al. (1987) advertem que a



concentração do ácido clorídrico em metanol não deve ser superior a 0,05%. Neste sentido, Revilla et al. (1998) explicam que o uso de solventes contendo mais que 1% de ácido clorídrico pode resultar em hidrólise parcial das antocianinas aciladas e, conseqüentemente, na estimação incorreta do total de antocianinas.

Constatou-se, em extrações de antocianinas a partir de polpas de uvas, que o uso de metanol é 20% mais eficaz quando comparado ao etanol, e 73% mais eficaz do que apenas água (METIVIER; FRANCIS; CLYDESDALE, 1980). No entanto, na indústria alimentar, o etanol é preferível devido à toxicidade do metanol.

Na extração de antocianinas além do solvente, a temperatura também deve ser cuidadosamente controlada, pois esses compostos são termicamente estáveis até 60°C (TERCI, 2004; ALASALVAR; AL-FARSI; SHAHIDI, 2005). Por serem sensíveis ao aquecimento, altas temperaturas podem afetar a concentração das antocianinas nos extratos, pois, podem favorecer a extração conjunta de ácidos fenólicos e taninos, além de complexações antocianinas com proteínas, o que compromete a estabilidade dos extratos (JING; GIUSTI, 2007).

É necessário o conhecimento do comportamento dos fatores que influenciam as condições do processo para melhorar a eficiência da extração para qualquer composto bioativo. Muitos fatores, tais como composição do solvente, o tempo de extração, a temperatura, o pH, a proporção sólido-líquido e o tamanho das partículas, podem influenciar significativamente a extração sólido-líquida (AZIZAH et al., 1999; WETTASINGHE; SHAHIDI, 1999; PINELO et al., 2005).

Lin et al. (2009) ao estudarem os extratos da folha de jambolão obtidos através de diferentes solventes (hexano, acetato de etilo e metanol) acidificados a 0,1 % de ácido clorídrico, constataram teores elevados de compostos fenólicos, principalmente, antocianinas e teores insignificantes de carotenoides.

Bona et al. (2011) investigaram os efeitos do extrato da folha jambolão (ASC) obtido via extração sólido-líquida. O extrato, em condições *in vitro*, foi capaz de melhorar as alterações na adenosina deaminase (ADA), acetilcolinesterase (AChE), bem como o status antioxidante em pacientes com diabetes tipo 2.

Sumitra, Chanda e Kaneria (2011) realizaram estudo sobre o extrato a partir do pó das folhas de jambolão utilizando três diferentes métodos (decocção, maceração e percolação a frio). Observaram que o método de percolação a frio (5g de pó de folha seca foi extraída com 100 ml de 80% de solução aquosa de metanol, a 35 ° C, durante 24 h) foi mais eficaz na obtenção do extrato quando comparado aos demais métodos.

Apesar dos métodos convencionais serem os mais utilizados na obtenção de antocianinas, novas tecnologias como extração com líquido pressurizado (PLE - pressurized liquid extraction) (JU; HOWARD, 2003; AMBROGI et al., 2003), extração com fluido supercrítico (SFE - supercritical fluid extraction) (ADIL et al., 2007; JU; HOWARD, 2005; HENRY; YONKER, 2006), extração assistida por ultrassom (UAE - ultrasound-assisted extraction), extração a alta pressão (HHP - high hydrostatic pressure), extração por pulso elétrico (PEF - pulsed electric fields) (CORRALES et al., 2008), extração assistida por microondas (MAE - microwave-assisted extraction), etc., têm sido estudadas na tentativa de alcançar processos com melhores características econômicas e ambientais garantindo maior sustentabilidade, segurança e qualidade aos produtos obtidos (CORRALES et al., 2008).

### **3.3.2 Extração por fluido supercrítico (SFE)**

A aplicação de tecnologias inovadoras para obtenção de extratos vegetais vem sendo empregada em diversos estudos. Dentre os novos métodos de extração existentes, o que utiliza fluido supercrítico tem se tornado foco de estudos, já que este possui várias vantagens em relação aos demais métodos, pelas condições brandas de operação, ausência de resíduos após a extração, dentre outras (SANTOS et al., 2011).

A extração com fluido supercrítico consiste em uma forma de extração onde o solvente líquido usual é substituído por um fluido supercrítico, ou seja, uma substância em condições de temperatura e pressão acima do ponto crítico (PEREIRA; MEIRELES, 2010).

Se uma substância no estado líquido é aquecida em recipiente fechado, a pressão de vapor da substância eleva-se continuamente com o aumento da temperatura. Assim, ocorre um aumento na densidade do vapor, ao mesmo tempo em que ocorre uma diminuição da densidade do líquido, em consequência do seu aumento de volume. Há um ponto em que a densidade do vapor se iguala à do líquido remanescente e o limite entre as duas fases desaparece. O ponto que limita a região onde não há distinção entre as fases é denominado ponto crítico (NETZ; ORTEGA, 2002; ATKIN, 2003).

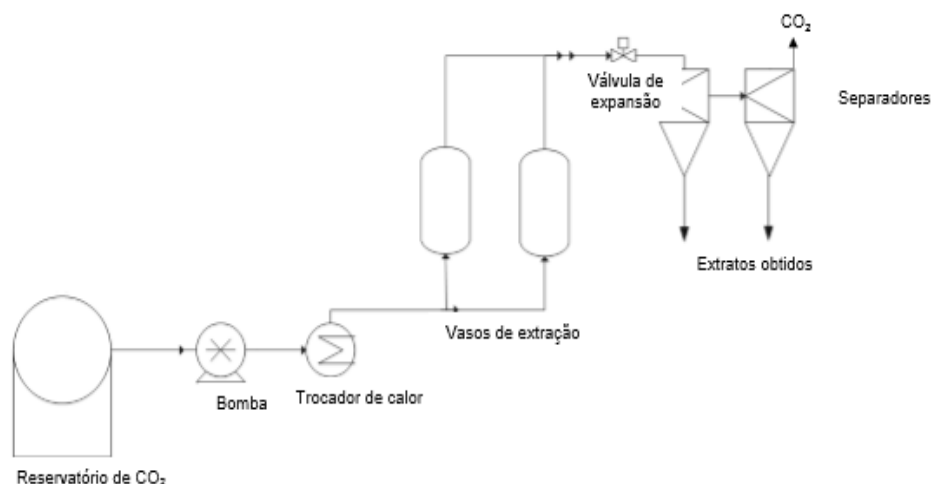
Mukhopahyay (2000) explica que o comportamento ambíguo de substâncias no estado supercrítico permite que estas possam devido à viscosidade e a difusividade análoga as de um gás, penetrar profundamente no material, e, devido à capacidade de solvatação análoga a de um líquido, extrair as substâncias de interesse presentes na matriz sólida.

O dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) é o fluido supercrítico mais utilizado como solvente na obtenção de extratos de produtos naturais, principalmente para as indústrias de alimentos e

farmacêutica. Ele é inerte, seu custo é relativamente baixo, está facilmente disponível em alta pureza, é inodor, atóxico, não inflamável e pode ser facilmente removido do produto final, sem deixar resíduos. Além disso, apresenta temperatura e pressão críticas relativamente baixas ( $T_c=31,1^\circ\text{C}$  e  $P_c=73,8\text{bar}$ ) (BERNARDO-GIL et al., 2002; KIRIAMITI et al., 2002; JOUYBAN et al., 2002; MUKHOPADHYAY, 2000).

Ademais, devido a sua relativa baixa pressão crítica, as pressões de operação não são necessariamente altas, reduzindo os custos de investimento e, conseqüentemente, os de manufatura. Essas propriedades são especialmente atrativas na extração de compostos de materiais biológicos o que torna o dióxido de carbono a escolha padrão nos processos de extração supercrítica na indústria de alimentos (BRUNNER, 2005; DEL VALLE; AGUILERA, 1999; MCHUGH; KRUKONIS, 1994; ROZZI; SINGH, 2002). Também é importante notar que fluidos supercríticos apresentam propriedades biocidas contra a maioria dos microorganismos entre fungos, bactérias e vírus (SPILIMBERGO et al., 2002), e mesmo que não possam ser considerados como agentes esterilizantes, processos com  $\text{CO}_2$  supercrítico são intrinsecamente estéreis e não aumentam a carga microbiana, devido às altas pressões empregadas e ausência de oxigênio (PERRUT; CLAVIER, 2003).

Um sistema de extração supercrítica (Figura 5) consiste basicamente nos seguintes componentes: fonte de  $\text{CO}_2$ , compressor, vaso extrator, válvula de decompressão, câmara de separação e controladores de temperatura e pressão. O  $\text{CO}_2$  (líquido) é fornecido ao sistema através do compressor, passando então por um pré-aquecedor, ocorrendo assim, a passagem do estado líquido para o supercrítico. O  $\text{CO}_2$  supercrítico, passa pela matriz sólida localizada na câmara de extração. A pressão e temperatura são reduzidas, o extrato precipita no frasco coletor. O  $\text{CO}_2$  já no estado gasoso, recircula no sistema, passando novamente pelo compressor e pelo trocador de calor antes de chegar ao vaso extrator (MUKHOPADHYAY, 2000; JACQUES, 2005; CASSEL et al., 2007; ROSA et al., 2009).



**Figura 5.** Diagrama esquemático de um processo de extração supercrítica (Fonte: Pereira; Meireles, 2010).

O dióxido de carbono, pelo fato de ser uma molécula com momento dipolo igual a zero, é uma substância apolar. Sua polaridade é semelhante a de outros solventes apolares tipicamente utilizados em processos de extração sólido-líquida, como o hexano (LUQUE DE CASTRO et al., 1992; ROSA et al., 2009). A polaridade de um solvente está intimamente ligada às propriedades físicas e químicas das moléculas, exercendo influência sobre o ponto de fusão, o ponto de ebulição e a solubilidade das mesmas em determinado solvente (MORRISON; BOYD, 1996)

Mukee (2000) afirma que compostos polares e de maior peso molecular, como ácidos fenólicos e flavonóides não glicosilados, em geral são moderadamente solúveis, enquanto compostos altamente polares e de maior peso molecular são dificilmente solúveis em CO<sub>2</sub>.

Devido a esta característica, tem sido proposto a adição de um solvente auxiliar ao CO<sub>2</sub> denominado cossolvente ou modificador. O objetivo é aumentar a solubilidade de compostos polares e também possibilitar o controle e seletividade do processo de extração, proporcionando a utilização de pressões menos elevadas (DÍAZ-REINOSO et al., 2006; SINKO, 2006; PEREIRA; MEIRELES, 2010).

A utilização de cossolventes ou modificadores é uma prática bastante comum em SFE quando se deseja extrair compostos de alta polaridade normalmente não solúveis em CO<sub>2</sub> devido à sua baixa polaridade. Os cossolventes possuem propriedades físico-químicas distintas podendo quebrar as interações entre soluto-matriz sólida através de interações moleculares como forças de Van der Waals e pontes de hidrogênio, por exemplo. O que facilita o transporte do soluto dos poros intersticiais para a superfície da matriz. Uma das explicações para tal efeito é porque a adição de um cossolvente com polaridade maior do que

a do CO<sub>2</sub> aumenta a polaridade da mistura e, portanto, aumenta a solubilidade de um certo soluto ou classe de compostos polares no fluido supercrítico (PEREIRA, 2005; ALMEIDA, 2006).

Portanto, pequenas quantidades de substâncias polares tais como etanol, acetona e água têm sido utilizadas em estudos de extração supercrítica de compostos polares com o objetivo de aumentar a solubilidade destes compostos no CO<sub>2</sub> supercrítico aumentando o rendimento de extração destes constituintes (REVERCHON; DE MARCO, 2006; PASQUEL et al., 2000; ZANCAN et al., 2002; PEREIRA et al., 2004; SOVOVÁ et al., 2004; TAKEUCHI, 2009; YODA et al., 2003; LEAL et al., 2008).

A utilização de água como cossolvente apresenta como vantagens menor custo de processo e impacto ambiental, além da facilidade de manuseio (MEIRELES, 2003). Alguns autores estudaram o uso de etanol como cossolvente para obter extratos supercríticos e observaram que a solubilidade do extrato aumentou com o aumento da concentração deste cossolvente (DALMOLIN et al., 2010) Isso mostra que a presença de etanol afeta, positivamente, a extração de polifenóis. Este fato está relacionado com as interações covalentes (ligações de hidrogênio) e dipolo-dipolo que aumentam a solubilidade de compostos fenólicos (SERRA et al., 2010)

Na extração supercrítica de compostos fenólicos, geralmente se faz uso de pressões mais elevadas, na faixa de 150 a 450 bar, ou a adição de cossolventes polares. Neste caso, são empregadas pressões na faixa de 100 a 350 bar. Entretanto, um aumento da pressão pode resultar em uma menor seletividade. Em relação à temperatura, normalmente, são empregadas na faixa de 35 a 60°C, com objetivo de evitar a degradação térmica destes compostos. Os cossolventes mais empregados são: metanol e etanol (DÍAZ-REINOSO et al., 2006; ROSA et al., 2009; MARÓSTICA JUNIOR et al., 2010; PEREIRA; MEIRELES, 2010).

Veggi, Santos e Meireles (2011) realizaram ensaios em duas temperaturas (323 e 333K) e três pressões (10, 20 e 30 MPa) e utilizaram o etanol como modificador a 20 % v / v , para um total de seis diferentes condições de extração. A condição de extração em 323 K e 20 MPa teve a maior produção de compostos antioxidantes e com o menor custo de produção. Desse modo, estas condições foram selecionadas como eficaz para SFE com etanol para obter antioxidantes a partir do resíduo de geleia de jabuticaba.

Assim como nas demais extrações, no supercrítico deve-se ter atenção às condições de extração. Um dos fatores que influencia no rendimento da extração é o tamanho das partículas da matriz vegetal. Como uma tendência geral, a diminuição do tamanho das partículas gera um aumento do rendimento de extração. O menor tamanho de partícula facilita o acesso do

solvente de extração até o soluto, reduzindo as limitações de transferência de massa (LAROZE et al., 2010).

Outro fator determinante nesta extração é a quantidade de água disponível presente no substrato. Pois, condiciona o rendimento final do processo de extração. Sahena et al (2009) reportam que o alto teor de umidade reduz o contato da matriz com o CO<sub>2</sub>, devido à consistência pastosa que a amostra apresenta, e nesses casos a umidade atua como uma barreira para a difusão da CO<sub>2</sub> na amostra, assim como para a difusão de lipídeos para fora desta. Assim, amostras com alto teor de umidade são geralmente liofilizadas antes da extração para melhorar a sua eficiência.

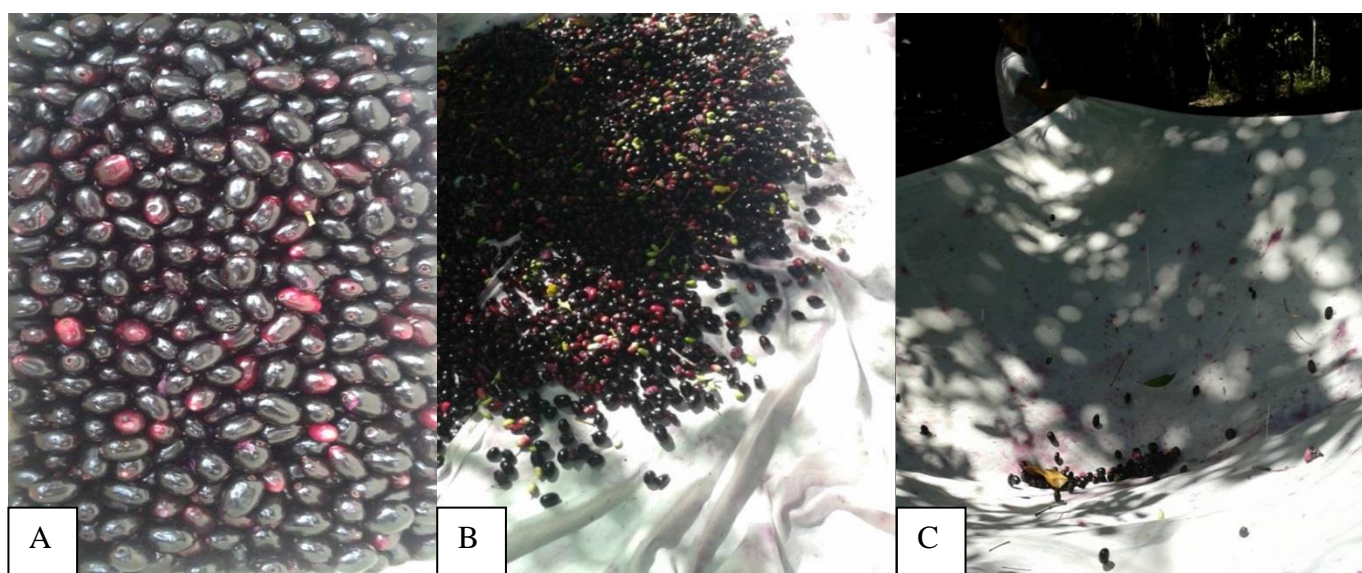
Conforme Luque de Castro (1992) a extração por CO<sub>2</sub> supercrítico mostra-se uma ferramenta importante usada na indústria, pois, tem grande apelo ambiental e de segurança. No entanto, Lopez-Sebastian et al. (1998) ponderam que as principais desvantagens são as grandes quantidades de solvente requerido, a degradação térmica e a presença de resíduos de solventes orgânicos, o que é frequentemente inaceitável na indústria de alimentos. Em contraste, o uso desta tecnologia proporciona um método mais seguro para o processo de extração.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

#### 4.1.1 Matéria-prima

Os frutos de jambolão (*Syzygium cumini Lamark*), *in natura* (Figura 6 A e B), foram coletados (Figura 6 C) no município de Cametá, Região do baixo Tocantins no Estado do Pará, segundo as coordenadas geográficas de 49° 29' 45'' W e 2° 14' 40'' S. Foram adquiridos cerca de 10 Kg de fruto no mês de fevereiro de 2014, os mesmos foram transportados ao Laboratório de Processamento de Alimentos da Universidade Estadual do Pará, no referido município, para o início do processamento.



**Figura 6.** Frutos de jambolão (*Syzygium Cumini Lamark*) (A e B) e coleta dos frutos (C) (Fonte: dados da pesquisa)

#### 4.1.2 Processamento da matéria-prima

Os frutos foram selecionados quanto o grau de maturação, ausência de podridões e danos mecânicos. Posteriormente, foram submetidos à lavagem em água corrente para a retirada de possíveis perigos físicos (poeira, terra, fragmentos de madeira, etc.) provenientes da colheita e/ou transporte contribuindo assim, para diminuição da carga microbiana superficial da matéria-prima.

Os frutos higienizados foram submetidos ao processo de sanitização em solução clorada a uma concentração de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  por 15 minutos, decorrido o tempo estabelecido, foram imersos em água destilada para remoção do excesso de cloro. Em seguida, os frutos foram despulpados manualmente um a um, onde foi realizada a retirada das sementes, uma vez que polpa e casca deste fruto são de difícil separação.

A polpa foi homogeneizada em triturador com lâminas de aço, acondicionada em embalagens plásticas envoltas com papel alumínio. Cada embalagem continha aproximadamente 20g de amostra (Figura 7) armazenada em temperatura de congelamento ( $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ ).



**Figura 7.** Polpa de jambolão (*Syzygium cumini Lamark*) (Fonte: dados da pesquisa)

Para realização experimental as polpas congeladas foram transportadas em caixas isotérmicas para manutenção da temperatura de congelamento até o Laboratório de Fontes Amiláceas e Produtos Açucarados da Universidade Federal do Pará, Campus Belém, onde permaneceram armazenadas em freezer a  $-18^\circ\text{C}$  para posteriores análises.

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Caracterização biométrica dos frutos de jambolão

Para a caracterização biométrica utilizou-se aproximadamente 50 unidades de frutos. As análises foram realizadas no Laboratório de Processamento de Alimentos da Universidade Estadual do Pará – Campus Cametá. As dimensões de comprimento transversal e longitudinal do fruto inteiro foram efetuadas por meio de um paquímetro manual (marca WORKER). A retirada das sementes foi realizada manualmente para o cálculo do rendimento em polpa do



fruto, expresso em percentual (%), a partir da diferença entre o peso dos frutos inteiros e o peso das sementes e da parte comestível (polpa e casca). Para o fruto de jambolão polpa e casca não são separadas devido à característica do fruto e, por isso, considerou-se a expressão parte comestível do fruto. A determinação do peso para o cálculo do rendimento foi realizada com auxílio balança analítica (marca QUIMIS / modelo: 318D24). As avaliações físicas foram realizadas logo após a colheita dos frutos.

#### **4.2.2 Caracterização físico-química da polpa de jambolão**

As análises físico-químicas da polpa (*in natura* e liofilizada) de jambolão e a determinação dos compostos bioativos da polpa (*in natura* e liofilizada) e dos extratos, obtidos pelos diferentes métodos, foram realizadas no Laboratório de Fontes Amiláceas e Produtos Açucarados da Universidade Federal do Pará. Para realização das análises, as polpas foram previamente descongeladas em temperatura de refrigeração ( $8^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e os resultados de lipídios, proteínas, carboidratos e cinzas expressos em base seca (b.s.). As análises foram realizadas em triplicata segundo as metodologias descritas a seguir:

##### *Umidade*

Foi determinada via método gravimétrico, por secagem em estufa a  $105^{\circ}\text{C}$ , até peso constante, sendo os resultados expressos em porcentagem (%), de acordo com o método 920.151 da AOAC (2002).

##### *Cinzas*

Foram determinadas gravimetricamente, por calcinação da amostra a  $550^{\circ}\text{C}$ , de acordo com o método 940.26 da AOAC (2002).

##### *Proteínas*

Foram determinadas a partir do nitrogênio total contido na amostra, de acordo com o método Kjeldahl, número 920.152 da AOAC (2002).

### *Lipídios*

Foram determinados por extração com mistura de solventes a frio, de acordo com o método de Bligh e Dyer (1959).

### *Carboidratos totais*

O teor de carboidrato total foi obtido por diferença, de acordo com a seguinte Equação (2):

$$E = 100 - (A + B + C + D) \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde: A - Cinzas, B - Lipídeos, C - Proteína, D – Umidade e E - Carboidratos.

### *Acidez titulável total (ATT)*

Foi determinada por titulação com NaOH 0,1 N, com auxílio de um pHMETRO, sendo os resultados expressos em mg de ácido cítrico/100 g, segundo método 942.15 da AOAC (2002).

### *Potencial hidrogeniônico (pH)*

Foi determinado em potenciômetro da marca Hanna Instruments, modelo HI9321, previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0, de acordo com o método 943.15 da AOAC (2002).

## **4.2.3 Extração de compostos bioativos da polpa de jambolão**

Os métodos de extração aplicados neste estudo foram: extração sólido-líquido e com CO<sub>2</sub> supercrítico. As condições de cada método foram baseadas em estudos presentes na literatura.

#### 4.2.3.1 Extração sólido-líquido da polpa de jambolão

A extração sólido-líquida foi realizada segundo planejamento fatorial linear  $2^3$  constituído por oito ensaios lineares nos níveis  $-1$  e  $+1$  e três ensaios no ponto central, como pode ser observado na Tabela 2. As variáveis independentes adotadas foram: a razão sólido/líquido (m/v), temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) e tempo (h) e seus níveis apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Variáveis independentes e seus diferentes níveis da extração sólido-líquida.

Fator	Codificado	níveis		
		-1	0	+1
		Razão sólido/líquido	X1	0.25
Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	X2	20	30	40
Tempo(h)	X3	2	3	4

As variáveis dependentes do planejamento apresentado são: cor instrumental, antocianinas totais, polifenóis totais e capacidade antioxidante.

A Tabela 2 apresenta os 11 ensaios experimentais do planejamento fatorial linear.

**Tabela 2.** Condições de extração sólido-líquido.

Ensaio	X1	X2	X3	Sólido/líquido (m/v)	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Tempo (h)
1	1	-1	-1	18,75g /25 ml	20	2
2	0	0	0	12,5g/ 25ml	30	3
3	-1	1	-1	6,5g/ 25 ml	40	2
4	-1	-1	1	6,5g / 25 ml	20	4
5	0	0	0	12,5g/ 25ml	30	3
6	1	1	1	18,75/ 25 ml	40	4
7	1	1	-1	18,75/ 25 ml	40	2
8	-1	1	1	6,5g/ 25 ml	40	4
9	1	-1	1	18,75g/ 25 ml	20	4
10	-1	-1	-1	6,5g/ 25 ml	20	2
11	0	0	0	12,5g/ 25ml	30	3

A polpa de jambolão, previamente triturada, foi pesada, conforme a Tabela 2, e transferida para erlenmeyer de 250 ml envolvidos com papel alumínio e adicionado 25ml de solução extratora constituída de etanol 95% acidificado com 1% de HCl (v/v), pois, segundo estudos apresentou maior valor na quantificação espectrofotométrica (visível) das antocianinas do jambolão.

Os extratos foram obtidos em banho Dubnoff da marca Quimis e modelo Q226M2, sob agitação de 16 rpm, conforme a Figuras 8.



**Figura 8.** Extração sólido-líquido da polpa de jambolão (Fonte: dados da pesquisa).

Cada ensaio permaneceu no banho, sob agitação, de acordo com os tempos do planejamento da extração. Posteriormente, os extratos (Figura 9) foram filtrados, transferidos para vidro âmbar e armazenados em temperatura de congelamento (-18 °C).



**Figura 9.** Extratos sólido-líquido da polpa de jambolão. (Fonte: dados da pesquisa).

#### 4.2.3.2 Extração por fluido supercrítico da polpa de jambolão

Para a realização da extração com fluido supercrítico, fez-se necessário submeter à polpa de jambolão (3 Kg) à liofilização dos quais se obteve ao final do processo 523,05 g de polpa liofilizada (Figura 10). Inicialmente a polpa foi congelada à temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  em freezer convencional. Para a liofilização foi utilizado um equipamento Liotop modelo L 108, a uma temperatura de  $50^{\circ}\text{C}$  e um vácuo parcial de  $38\ \mu\text{m Hg}$  durante 48 horas. Após a retirada do liofilizador, as amostras foram trituradas em multiprocessador (Arno, Magiclean Dueto LN507311). Em seguida, foram embaladas em vidros envoltos com papel alumínio e armazenados a temperatura de congelamento.



**Figura 10.** Polpa liofilizada de jambolão (Fonte: dados da pesquisa)

Para a realização das extrações, faz-se necessário a caracterização da matéria-prima (polpa liofilizada e triturada) quanto às condições de granulometria e densidade real. A análise de densidade real foi realizada por picnometria de gás hélio em picnômetro automático Quantachrome Ultrapyc 1200e, na Central Analítica do Instituto de Química da UNICAMP. A granulometria foi determinada em um jogo de 6 peneiras (mesh de 16 a 48), com agitação por 15 min e o diâmetro médio foi calculado conforme a equação:

$$d_{mg} = \log^{-1} \left[ \frac{\sum_{i=1}^n (w_i \log d_i)}{\sum_{i=1}^n w_i} \right]$$

Onde:  $d_i = (d_i \cdot d_{i+1})^{0,5}$ ;  $d_i$ : abertura nominal da  $i$ -ésima peneira (mm);  $d_{i+1}$ : abertura nominal da peneira maior que a  $i$ -ésima peneira (mm);  $w_i$ : massa do material retido na  $i$ -ésima peneira.

Os ensaios de extração com fluido supercrítico foram realizados no *Spe-ed<sup>TM</sup> SFE* (Allentown, PA, EUA) modelo 7071 da *Applied Separations*, acoplado com compressor Schulz modelo CSA 7,8 volume interno de 19,71 da Schulz S/A (Joinville, SC, Brasil), cilindro com CO<sub>2</sub> com 99.9% de pureza da Linde Gases (Belém, PA, Brasil), recirculador Polyscience F08400796 (Nilles, Illinois, EUA) e mediador de vazão de CO<sub>2</sub> na saída do sistema Alicat Scientific M 5SLPM (Tucson, AZ, EUA) sob responsabilidade do prof<sup>o</sup> Dr Raul Nunes, pesquisador da UFPA.

Nesta extração, adotaram-se as condições conforme realização de testes prévios. Assim, efetuaram-se as extrações em três distintas condições:

- **Condição 1:** 45°C, 300bar, 0,9g cm<sup>-3</sup> e 2h;
- **Condição 2:** 50°C, 150bar, 0,7g cm<sup>-3</sup> e 2h;
- **Condição 3:** 55°C, 250bar, 0,8g cm<sup>-3</sup> e 2h.

Conforme o objetivo das extrações fez-se necessário o uso de cossolvente, neste caso, de acordo com os testes, a água foi mais eficaz que o etanol uma vez que os pigmentos de interesse são altamente polares. Diferente da extração sólido-líquida não foi possível utilizar solvente acidificado, pois o equipamento não permite o uso de ácidos. As análises realizadas nos extratos (Figura 11) obtidos foram: colorimetria instrumental, antocianinas totais, polifenóis totais e capacidade antioxidante.



**Figura 11.** Extratos da polpa liofilizada de jambolão por CO<sub>2</sub> supercrítico com uso de H<sub>2</sub>O como cossolvente (Fonte: dados da pesquisa).

## 4.2.4 Determinação dos compostos bioativos e colorimetria instrumental da polpa e dos extratos de jambolão

### 4.2.4.1 Compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado pelo método descrito por Singleton e Rossi (1965) e modificado por Georgé et al. (2005), que se baseia na reação com o reagente de Folin-Ciocalteu. Este método baseia-se na redução dos ácidos Fosfomolibdênico ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) e Fosfotungístico ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ), presentes no reagente de Folin-Ciocalteu, a óxido de tungstênio ( $W_8O_{23}$ ) e óxido de molibdênio ( $Mo_8O_{23}$ ), pelos compostos fenólicos em meio alcalino, produzindo um complexo de coloração azul. Segundo Naczki e Shahidi (2004), além dos compostos fenólicos, o reagente Folin-Ciocalteu também é capaz de reduzir substâncias como o ácido ascórbico, açúcares e alguns aminoácidos. Dessa forma, esses compostos atuam como interferentes nos resultados.

A extração dos compostos fenólicos da polpa foi realizada com solução aquosa de acetona 70% (v/v). A mistura foi deixada sob agitação magnética por 30 minutos (na ausência de luz). O extrato obtido foi filtrado e, posteriormente, diluído em água destilada a fim de corrigir a concentração de acetona para 7%, obtendo-se o extrato bruto.

Uma alíquota de 0,5 mL do extrato foi submetida à reação com 2,5 mL de Folin-Ciocalteu e, após 2 minutos de repouso em temperatura ambiente, foram adicionados 2,0 mL de solução aquosa de carbonato de sódio ( $Na_2CO_3$ ) 7,5% (m/v). A mistura foi levada ao banho-maria a 50 °C por 15 minutos e, em seguida, ao banho de gelo por 30 segundos. Para o branco, a alíquota de extrato foi substituída pela mesma quantidade de acetona 7%. A quantificação foi feita por leitura espectrofotométrica a 760 nm.

Ácido gálico foi utilizado para obtenção da curva padrão. O teor de compostos fenólicos totais, expresso em mg de ácido gálico equivalente/100 g.

### 4.2.4.2 Antocianinas Totais

A análise foi realizada conforme descrito por Fuleki e Francis (1968). Utilizou-se 1 grama de amostra e 1 ml para os extratos, solução extratora, preparada com etanol 95%:HCl 1,5N (85:15, v/v), na proporção de 1:4. Após maceração e sob refrigeração por 16 horas, na ausência de luz, os extratos foram filtrados. O resíduo lavado repetidamente com o etanol acidificado, até extração completa das antocianinas. A solução resultante foi deixada em

repouso por 2 horas, ao abrigo da luz e a temperatura ambiente, para estabilização das formas antociânicas. Posteriormente realizou-se a leitura em espectrofotômetro UV-visível da SHIMADZU modelo 160-A, selecionando o comprimento de onda 535nm. Para o cálculo da concentração utilizou-se a Equação, proposta por Fuleki e Francis (1968):

$$\text{Antocianinas totais (mg.100g}^{-1} \text{ de amostra)} = \frac{\text{Abs.}\lambda_{\text{máx}} \times \text{Fd} \times 100}{E^{1\%}_{1\text{cm}}}$$

Onde:  $\text{Abs}\lambda_{\text{máx}}$  = absorvância no comprimento de onda máximo (535nm);

Fd = fator de diluição e  $E^{1\%}_{1\text{cm}}$  (absortividade molar a 535nm) = 98,2.

#### 4.2.4.3 Capacidade antioxidante *in vitro* pelo Método DPPH

A capacidade antioxidante pelo método DPPH (2,2-Difenil-1-picril-hidrazil) foi determinada de acordo com o procedimento proposto por Rufino et al. (2007). No ensaio ocorre a captura do radical DPPH pelos antioxidantes presentes na amostra, produzindo decréscimo da absorvância a 515 nm. Esse método foi idealizado por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) e modificado por Sánchez-Moreno et al. (1998), introduzindo os parâmetros cinéticos:  $\text{EC}_{50}$  (quantidade de antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH•) e  $t_{\text{EC}50}$  (tempo que essa concentração necessita para reduzir em 50% a quantidade inicial do radical) e a eficiência antirradical (AE) =  $1/(\text{EC}_{50} * t_{\text{EC}50})$ .

A partir da solução inicial de DPPH (60  $\mu\text{M}$ ), foram preparadas em balões volumétricos de 10 mL soluções variando a concentração de 10 a 60  $\mu\text{M}$ . Posteriormente, foram utilizadas todas as concentrações para geração da curva, obtendo-se suas absorvâncias no espectrofotômetro a 515 nm, utilizando metanol como branco.

Foi gerada uma cinética para determinar o tempo de estabilização da absorvância para cada amostra. Nessa etapa, foram preparadas em tubos de ensaio cinco diluições diferentes (10, 7, 6, 5 e 4 mg/mL) do extrato obtido, adicionando-se, em seguida, 3,9 mL do radical DPPH. O decréscimo da absorvância foi monitorado a cada minuto, a 515 nm, até sua estabilização. As absorvâncias obtidas foram comparadas com um controle em branco, sem antioxidantes.



Determinado o tempo de estabilização, foram preparadas cinco diluições diferentes em triplicata, a partir do extrato obtido. Uma alíquota de 100 µL de cada diluição foi adicionada a 3,9 mL de solução metanólica contendo 0,06 mM de DPPH. Todas as determinações foram acompanhadas de um controle feito substituindo-se o volume do extrato por igual volume de solvente utilizado na extração. A leitura da absorbância final para o cálculo do EC<sub>50</sub> foi feita após a estabilização da absorbância (tempo EC<sub>50</sub>).

A capacidade antioxidante foi expressa como a concentração de antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH (EC<sub>50</sub>). O decréscimo da absorbância do DPPH foi expresso como g de polpa/g de DPPH.

#### 4.2.4.4 Cor instrumental

Para determinação da cor foi realizada leitura dos parâmetros, CIElab, proposto pela Comissão Internacional de l'Eclairage (CIE) em 1971. Os parâmetros L\*, a\* e b\* foram avaliados com uso de colorímetro Konica Minolta Spectrophotometer modelo CR410, onde L\* define a luminosidade (L\* = 0 preto e L\* = 100 branco) e a\* e b\* são responsáveis pela cromaticidade (+a\* vermelho e -a\* verde, +b\* amarelo e -b\* azul). Calculou-se, a diferença total de cor (ΔE\*) de acordo com a equação:

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

onde: Δ é a diferença entre cada parâmetro de cor da amostra controle (polpa *in natura*) e as amostra submetidas à extração sólido-líquido.

### 4.3 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS RESULTADOS

As análises foram realizadas em triplicata, os dados foram tratados através do software Statistica V.1.0. Para os resultados realizou-se análise de variância (ANOVA) e a comparação entre médias (teste Tukey). Avaliou-se desvio-padrão (DP), valor da análise de variância (F) ao nível de 5% de significância.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO BIOMÉTRICA E RENDIMENTO DO JAMBOLÃO IN NATURA E LIOFILIZADO.

Os resultados da caracterização biométrica do fruto *in natura* e rendimento da polpa de jambolão *in natura* e liofilizada estão expressos na Tabela 3.

**Tabela 3.** Características físicas e de rendimento do jambolão (*Syzygium cumini Lamark*) *in natura* e liofilizado.

Parâmetro	Média* $\pm$ dp <i>in natura</i>	CV (%) <i>in natura</i>	Média* $\pm$ dp <i>liofilizada</i>	CV (%) <i>liofilizada</i>
Comprimento transversal*	1,05 $\pm$ 0,01	1,17		
Comprimento longitudinal*	1,98 $\pm$ 0,17	8,56		
Rendimento de polpa/casca (%)	62,62	-	17,43	-

\*Média e desvio padrão; comprimento transversal e longitudinal dados em cm.

Os resultados obtidos para a caracterização física do jambolão *in natura* permitem afirmar que esse fruto é pequeno, pois apresentou apenas 1,05 $\pm$ 0,01 cm de comprimento transversal e 1,98 $\pm$ 0,17 cm de comprimento longitudinal. Esses dados são inferiores aos descritos por Sá (2008) que relatou que o jambolão apresenta cerca de 3 a 4 cm de comprimento e 2 cm de diâmetro.

Em termos de rendimento porcentual de polpa, o jambolão *in natura* enquadra-se entre as espécies de frutas que a porção casca ou pele é inseparável da polpa, assim como frutas bastante populares na Amazônia Brasileira como o açaí, a bacabinha e o bacabi (CARVALHO; MULLER; SILVA, 2005). Conforme observado na Tabela 3, o rendimento do fruto foi de 62,62%, menor que os valores reportados por Sousa (2012), Benherlal e Arumughan (2007) e Lago, Gomes e Silva (2006), de 75,28%, 66,6% e 67,69% respectivamente. As características físicas dos frutos podem variar devido a diferentes fatores como a região produtora, formas de cultivo, fatores genéticos, estádios de maturação, entre

outros, o que justifica as diferenças entre os valores encontrados na literatura quando comparados aos obtidos no presente trabalho.

O rendimento de 17,43% da polpa de jambolão liofilizada pode ser explicado de acordo com o estudo de Prado (2009) ao liofilizar diversas frutas observou que a acerola, de maior umidade (94,6%), apresentou menor rendimento (6,74%), assim, os resultados sugerem que frutos com alta umidade, conseqüentemente, terão menor rendimento quando liofilizados.

## 5.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO JAMBOLÃO IN NATURA E LIOFILIZADO

O conhecimento das características físico-químicas dos alimentos é de grande importância para o conhecimento do potencial da matéria-prima a ser utilizada no preparo de alimentos bem como para o conhecimento do valor nutricional do fruto estudado.

Desse modo, os resultados da caracterização físico-química da polpa de jambolão *in natura* e liofilizada estão expressos na Tabela 4.

**Tabela 4.** Características físico-químicas do jambolão (*Syzygium cumini Lamark*) *in natura* e liofilizado.

Parâmetro	Média± dp <i>in natura</i>	CV (%) <i>in natura</i>	Média ± dp <i>liofilizada</i>	CV (%) <i>liofilizada</i>
Umidade (%)	87,31 ±0,36	0,42	18,45±0,53	2,90
Cinzas (%)	0,09 ±0,01	1,39	2,73±0,04	1,65
Proteínas (%)	0,74 ±0,02	3,42	4,82±0,07	1,52
Lipídios (%)	0,28 ±0,20	2,03	2,23±0,34	2,00
Carboidratos (%)	6,68 ±0,47	7,09	71,77±0,9	1,27
Acidez Total titulável	0,54 ±0,01	2,10	1,52±0,03	1,98
pH	3,92 ±0,01	0,27	3,68±0,01	0,27

### *Umidade*

O teor de umidade de um alimento está relacionado com sua estabilidade, qualidade e composição, e pode afetar o armazenamento, embalagens e processamento (CHAVES et al., 2004). Ao estudar o jambolão Ayyanar e Subash-Babu (2012) reportam conteúdos de umidade de 83,70% a 85,8%. Silva (2012) explica que a forte insolação e alta demanda

evaporativa que predominam na região Amazônica podem influenciar no teor de umidade apresentada neste trabalho.

O fruto liofilizado, apresentou menor valor de umidade devido a aplicação da técnica de secagem. Os resultados deste estudo foi semelhante aos reportados nos trabalhos de Oliveira et al. (2010) e Santos et al. (2012) que obtiveram umidade de 14,25% para uvaia liofilizada e de 20,69% para o fruto liofilizado de mangaba, respectivamente. A redução significativa no teor de umidade, no fruto liofilizado, implica na redução da atividade de água e conseqüentemente na diminuição da perecibilidade do produto.

### *Cinzas*

Nos alimentos, as cinzas relacionam-se ao resíduo inorgânico remanescente da queima da matéria orgânica. Sua composição corresponde à quantidade de substâncias minerais presentes nos alimentos, devido às perdas por volatilização ou mesmo pela reação entre os componentes. As cinzas são consideradas como medida geral de qualidade e frequentemente são utilizadas como critério na identificação dos alimentos (CHAVES et al., 2004). Verifica-se que o teor de cinzas é maior no fruto liofilizado. Ayyanar e Subash-Babu (2012) ao estudar o jambolão *in natura*, encontraram teores de cinzas de 0,32% a 0,40%, enquanto que Santos et al. (2012) reportam teor de 5,73% para mangaba liofilizada.

### *Proteínas*

Os resultados deste trabalho (0,75%) mostrou-se semelhante aos verificados no estudo de Ayyanar e Subash-Babu (2012) de 0,70% para o jambolão *in natura*. Santos et. al (2012) em estudo da composição química da mangaba liofilizada obteve 2,73%. Leitão (2008) ressalta que as frutas, em geral, não são boas fontes de proteína. Assim como Salinas (2002), afirma que a proteína contida nas hortaliças e frutas pode variar de 1% a 3%.

### *Lipídios*

Ayyanar e Subash-Babu (2012) obtiveram valores de lipídios de 0,15 a 0,30% e Sousa (2012) de 0,16% semelhantes aos reportados neste trabalho. Após a liofilização, assim como para os demais parâmetros, é possível constatar valor maior deste nutriente.

### *Carboidratos*

Ayyanar e Subash-Babu (2012) reportam resultado de carboidratos de 14% e Sousa (2012) de 9,89% ambos para o fruto de jabolão. Resultados, estes, superiores ao encontrado no presente trabalho. No entanto, o fruto liofilizado mostrou um teor expressivo deste composto. O jabolão liofilizado representa, portanto, fonte deste macronutriente, possivelmente, devido a diferença no preparo da matéria-prima. O fruto *in natura* seguiu a metodologia das análises em estufa convencional, enquanto que o fruto liofilizado, como se auto explica, passou por processo de secagem diferente, antes de seguir as metodologias de análise, como já explicado na metodologia deste trabalho.

### *Acidez Total titulável*

Mussi (2014) observou valor de 11,7% para o fruto de jabolão *in natura* enquanto que Santos et al. (2012) reportam valor de 23,84% para a ubaia liofilizada. A determinação de acidez pode fornecer um dado valioso na apreciação do estado de conservação de um produto alimentício. Um processo de decomposição seja por hidrólise, oxidação ou fermentação, altera quase sempre a concentração dos íons de hidrogênio (IAL, 2004).

### *pH*

O valor de pH encontrado nesta pesquisa para o fruto *in natura* e liofilizado é característico de frutas tropicais brasileiras assim como os encontrados por Rufino et al. (2010) para açaí ( $5,38 \pm 0,10$ ), jabuticaba ( $3,18 \pm 0,06$ ) e puçá preto ( $4,53 \pm 0,07$ ) e Santos (2012) para a ubaia liofilizada (2,01%).

O pH representa o inverso da concentração de íons hidrogênio (H<sup>+</sup>) e, normalmente, apresenta comportamento oposto ao da acidez. No entanto, Andrade (1991) relata que alguns frutos possuem ação tamponante, ou seja, permitem a ocorrência de grandes variações de acidez sem grandes variações no pH.

### 5.3 COMPOSTOS BIOATIVOS, CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E COR INSTRUMENTAL DO JAMBOLÃO IN NATURA E LIOFILIZADO

A capacidade antioxidante de plantas está relacionada à quantidade de compostos fenólicos (HEUNG; CHEUNG; OOI, 2003), por isso a importância de se quantificar esses compostos. Os resultados dos compostos bioativos (antocianinas e polifenóis totais), capacidade antioxidante pelo método de DPPH e colorimetria instrumental da polpa de jambolão *in natura* e liofilizada estão apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5.** Compostos bioativos e colorimetria da polpa de jambolão (*Syzygium Cumini* Lamark) *in natura* e liofilizada.

Parâmetro	Média ± dp <i>in natura</i>	CV (%) <i>in natura</i>	Média ± dp <i>liofilizada</i>	CV (%) <i>liofilizada</i>
Cor instrumental				
L*	21,92 ±0,12	0,54	21,44 ±0,27	1,27
a*	14,96 ±0,17	1,18	25,65 ±0,33	1,31
b*	-3,64 ±1,12	30,84	-3,62 ±0,08	2,23
Antocianinas (mg/ 100 g <sup>-1</sup> )	66,70 ±1,50	2,29	212,39 ±2,56	1,21
Polifenóis totais (mg/100g)	50,25 ±0,05	0,11	599,15 ±1,74	0,29
Capacidade Antioxidante (EC <sub>50</sub> )	6,31±2,03	2,35	1,59±2,06	0,17

#### *Cor instrumental*

Sabe-se que no padrão CIELAB L\*a\*b\*, a coordenada L\* expressa o grau de luminosidade da cor medida (L\* = 100 = branco; L\* = 0 = preto). A coordenada a\* expressa o grau de variação entre o vermelho e o verde (a\* mais negativo = mais verde; a\* mais positivo = mais vermelha) e a coordenada b\* expressa o grau de variação entre o azul e o amarelo (b\* mais negativo = mais azul; b\* mais positivo = mais amarelo).

Assim, Hamm et al (2008) determinou os parâmetros de cor instrumental do jambolão e encontrou valores de L\*, a\* e b\* situados entre 33,08 e 41,14 (L\*), 1,69 a 4,86 (a\*) e -1,88 a -5,14 (b\*), respectivamente. Ao comparar com os resultados obtidos neste trabalho, verifica-se que há menor intensidade de luminosidade (L\*) para a fruta *in natura* e liofilizada. O valor da coordenada a\* apresentou maior intensidade de vermelho (+a\*). A cor é um parâmetro

crítico de qualidade, e a sua determinação é muito útil para correlacionar com a concentração de pigmentos presentes nas frutas (CHIM, 2008).

### *Antocianinas*

As antocianinas encontradas na polpa *in natura* do fruto de jambolão nesta pesquisa ( $66,70 \pm 1,5$ ) mostrou-se superior aos valores encontrados por Jacques et al. (2009) para pitanga vermelha de 9,6mg de cianidina 3-glicosídeo. $100 \text{ g}^{-1}$ , Calvete et al. (2008) para o morango de 21mg. $100 \text{ g}^{-1}$  de cianidina 3-glicosídeo. $100 \text{ g}^{-1}$ , Moyer et. al. (2002), de 34mg. $100 \text{ g}^{-1}$  para o mirtilo. Bem como para os frutos de jambolão de três diferentes cidades do Rio Grande do Sul encontrado por Teixeira (2009) de 13,018mg. $100 \text{ g}^{-1}$  (Pelotas), 7,429mg. $100 \text{ g}^{-1}$  (Santa Vitória do Palmar) e 16,948mg. $100 \text{ g}^{-1}$  (Capão do Leão). As médias deste estudo, mostraram-se inferiores ao relatado por Kuskoski et al. (2006) de 108 mg. $100 \text{ g}^{-1}$  e Brito et al. (no prelo) de  $296,54 \pm 20,11 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$  ambos para o jambolão. No entanto, para o fruto liofilizado (212,39%) obteve-se valores expressivos e superiores ao reportado por Kuskoski et al. (2006). Resultado este que corrobora aos descritos no item acima para cor instrumental referente a coordenada  $a^*$  que apresentou maior intensidade de vermelho no fruto liofilizado.

A quantidade e a identidade das antocianinas nos vegetais estão relacionadas a fatores genéticos e ambientais, como: condições de cultivo, tempo de plantio, exposição à luz UV e método de colheita. Por esse motivo, a comparação de teores destes compostos entre diferentes culturas de um mesmo vegetal, como frutas, ou dentre culturas e vegetais diferentes pode gerar resultados bastante distintos. Estudos indicam que, mesmo sob iguais condições de cultivo, crescimento e fertilização podem-se observar variações de identidade e quantidade das antocianinas (FAVARO, 2008).

Desse modo, o fruto pode ser recomendado para consumo *in natura* ou liofilizado, além de ser utilizado na indústria de alimentos, pois esses pigmentos além de suas cores características, também apresentam excelentes propriedades antioxidantes, participando na inibição da peroxidação lipídica, na desagregação de plaquetas e na ação antitumoral e antimutagênica (ANGELO; JORGE, 2007).

### *Compostos fenólicos totais*

A quantificação de compostos fenólicos totais é uma estimativa do conteúdo de todos os compostos pertencentes às subclasses de compostos fenólicos presentes em uma amostra.

Assim, o resultado alcançado nesta pesquisa ( $50,25 \pm 0,05$ ) mostra-se abaixo da faixa dos valores encontrados por Jacques et al. (2009) de  $55,8 \text{ mg}/100\text{g}^{-1}$  para nêspera e Kuskoski et al. (2006) de  $229,6 \text{ mg}/100\text{g}^{-1}$  para o jabolão.

Rufino et al. (2010) ao verificar as propriedades funcionais de frutas tropicais brasileiras não tradicionais, obtiveram um conteúdo de compostos fenólicos superior ao encontrado nesta pesquisa, que foi de  $185,4 \pm 3,8 \text{ mg}/100\text{g}^{-1}$  para o extrato acetônico/metanólico de jabolão. Esses mesmos autores encontraram  $440,4 \pm 9,9 \text{ mg}/100\text{g}^{-1}$  para jaboticaba. Esses mesmos resultados ao serem comparados com o fruto liofilizado ( $599,15 \text{ mg}/100\text{g}^{-1}$ ) desta pesquisa, mostram-se inferiores. A utilização de diferentes solventes extratores pode ser explicação para variação nos valores.

#### *Capacidade antioxidante pelo método de DPPH*

O potencial antioxidante do extrato é inversamente proporcional ao valor do  $EC_{50}$ , ou seja, quanto menor o valor de  $EC_{50}$  apresentado pelo extrato, menor quantidade de amostra no extrato é necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do DPPH e, dessa forma, maior sua atividade antioxidante.

Os resultados presentes na Tabela 6 estão relacionados aos obtidos nos compostos bioativos (antocianinas e polifenóis totais), pois, os maiores teores de antocianinas e polifenóis puderam ser observados na polpa liofilizada. Jiménez-Escrig et al. (2001) explicam que a goiaba apresenta elevada capacidade antioxidante, pois, o conteúdo significativo de compostos fenólicos contribuem para essa característica.

Ao comparar os dados expostos de  $EC_{50}$  para a polpa de jabolão *in natura* e liofilizada, observa-se resultados semelhantes em diversos estudos. Prado (2009) ao avaliar extratos de frutas tropicais encontraram valores de  $EC_{50}$  para acerola de 0,1 mg/ml, pitanga de 1,19mg/ml, maracujá de 1,62mg/ml, goiaba de 2,36 mg/ml, manga de 8mg/ml, abacaxi de 7,0mg/ml e melão 6,14 mg/ml.

Entre os métodos químicos aplicados para determinar a capacidade antioxidante de um composto em capturar radicais livres, o método dpph é um dos mais utilizados por ser considerado prático, rápido e estável. (ESPIN et al.,2000)

Diante dos resultados é possível observar que o processo de secagem de alimentos por liofilização concentra as características originais do produto *in natura*, destacando-se, os teores elevados de carboidratos e compostos bioativos (antocianinas e polifenóis totais) e com isso eleva a capacidade antioxidante.



## 5.4 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS SÓLIDO-LÍQUIDO DA POLPA DE JAMBOLÃO

Conforme o planejamento fatorial linear  $2^3$ , definido nesta pesquisa, obteve-se as variáveis dependentes para cada ensaio. Os resultados de cor instrumental, antocianinas, polifenóis totais e capacidade antioxidante estão dispostos a seguir.

### 5.4.1 Cor instrumental

Os valores médios e desvios-padrão das análises dos parâmetros de cor instrumental das extrações da polpa de jambolão são mostrados na Tabela 6.

**Tabela 6.** Média\* e desvio-padrão das coordenadas de cor instrumental  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  e  $\Delta E^*$  das extrações sólido-líquida para cada ensaio do planejamento.

Amostra Extrações	Parâmetros de cor instrumental			
	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$\Delta E^*$
18,75g /25 ml/ 20°C/2h	29,10±0,00	7,38±0,06	2,90±0,00	15,08±1,29
12,5g/25ml/30°C/3h	28,92±0,47	7,84±0,22	3,08±0,00	14,40±1,46
6,5g/ 25 ml/40°C/2h	29,17±0,00	7,26±0,05	2,99±0,00	15,25±1,15
6,5g / 25 ml/20°C/4h	29,62±0,00	8,68±0,03	3,65±0,01	14,21±0,93
12,5g/ 25ml/30°C/3h	29,27±0,00	8,25±0,01	3,18±0,01	15,23±0,78
18,75/ 25 ml/40°C/4h	28,97±0,02	6,07±0,01	2,68±0,01	16,46±1,25
18,75/ 25 ml/40°C/2h	28,89±0,01	6,44±0,00	2,70±0,02	15,08±1,29
6,5g/ 25 ml/40°C/4h	29,36±0,00	7,87±0,02	3,24±0,01	14,76±1,16
18,75g/ 25 ml/20°C/4h	29,06±0,00	6,94±0,03	2,77±0,01	15,60±1,29
6,5g/ 25 ml/20°C/2h	29,74±0,01	9,46±0,01	3,89±0,00	13,73±0,63
12,5g/ 25ml/30°C/3h	29,05±0,00	6,73±0,02	2,73±0,00	15,82±1,24

Na análise colorimétrica para as coordenadas para  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  os maiores níveis foram apresentados na condição de 6,5g/25 ml/20°C/2h e para o  $\Delta E^*$  no ensaio de 18,75/25 ml/40°C/4h. Os menores níveis para  $L^*$  foi no ensaio 18,75/25 ml/40°C/2h e para as coordenadas  $a^*$  e  $b^*$  no ensaio de condição 18,75/ 25 ml/40°C/4h, enquanto que para  $\Delta E^*$  foi no ensaio 6,5g/ 25 ml/20°C/2h.

Ao avaliar a cor e as condições de extração, tem-se como objetivo a mínima alteração, portanto, quanto menor a diferença total de cor ( $\Delta E^*$ ) melhor será o resultado esperado, pois, infere-se que a cor está próxima da polpa da fruta *in natura*.

No entanto, todos as respostas apresentadas na Tabela 6 referentes aos parâmetros de cor instrumental  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  e  $\Delta E^*$ , utilizados para avaliação estatística do planejamento fatorial linear  $2^3$  não constituíram respostas relevantes, pois, não foram observados os efeitos significativos das variáveis independentes estudadas.

#### 5.4.2 Antocianinas

Os valores médios dos teores de antocianinas totais encontrados para cada ensaio realizado a partir do planejamento deste estudo são mostrados na Tabela 7.

**Tabela 7.** Média\* e desvio-padrão do teor de antocianina das extrações sólido-líquida.

Extrações	Antocianinas totais (mg/100g <sup>-1</sup> )
18,75g /25 ml/ 20°C/2h	10,09±0,01
12,5g/ 25ml/30°C/3h	11,02±0,16
6,5g/ 25 ml/40°C/2h	14,59±0,01
6,5g / 25 ml/20°C/4h	24,11±1,18
12,5g/ 25ml/30°C/3h	11,19±0,52
18,75g/ 25 ml/40°C/4h	12,14±0,11
18,75g/ 25 ml/40°C/2h	11,72±0,01
6,5g/ 25 ml/40°C/4h	32,94±0,27
18,75g/ 25 ml/20°C/4h	10,70±0,00
6,5g/ 25 ml/20°C/2h	23,85±0,28
12,5g/ 25ml/30°C/3h	10,20±0,28

Conforme a Tabela 7 é possível verificar os níveis máximos e mínimos dos teores de antocianinas totais nos ensaios cujas condições foram: 18,75g / 25 ml/40°C/4h e 6,5g /25 ml/ 20°C/4h, respectivamente. A relação sólido/líquido mostra-se inversamente proporcional ao aumento desse composto, pois, quanto menor a concentração sólido/líquido maior o teor de antocianinas totais, o contrário pode ser observado nas variáveis temperatura e tempo que são diretamente proporcionais ao aumento do teor dos pigmentos.

Assim, os resultados da análise estatística aplicada aos dados experimentais para o teor de antocianinas totais são apresentados na Tabela 8, considerando o erro puro. Os efeitos dos fatores lineares, quadráticos e da interação, em negrito, são significativos no nível de 95% de confiança ( $p \leq 0,05$ ) ou valores próximos.

**Tabela 8.** Efeito estimado, erro puro, coeficiente t e significância estatística de cada fator para o teor de antocianinas totais.

Fatores	Efeito estimado	Erro puro	t(2)	Significância estatística (p)
<b>Efeitos principais</b>				
Sólido/líquido	<b>-12,7100</b>	<b>0,374322</b>	<b>-33,9548</b>	<b>0,000866</b>
Temperatura	0,6600	0,374322	1,7632	0,219922
Tempo	<b>4,9100</b>	<b>0,374322</b>	<b>13,1171</b>	<b>0,005762</b>
<b>Efeito de interação</b>				
Sólido/líquido x temperatura	0,8750	0,374322	2,3376	0,144398
Sólido/líquido x tempo	<b>-4,3950</b>	<b>0,374322</b>	<b>-11,7412</b>	<b>0,007176</b>
Temperatura x tempo	<b>4,4750</b>	<b>0,374322</b>	<b>11,9550</b>	<b>0,006924</b>

Observa-se na Tabela 8, os efeitos significativos a 95% de confiança foram: relação sólido/líquido, tempo e as interações sólido/líquido x tempo e temperatura x tempo. O efeito positivo indica que o aumento da variável provoca um aumento na resposta, enquanto que o efeito negativo mostra que com um aumento da variável ocorre a diminuição na resposta.

De acordo com Box e Wetz (1973), uma regra prática que pode ser empregada é considerar a regressão como útil para fins preditivos caso o valor  $M_{Q_{regressão}}/M_{Q_{resíduo}}$  seja, pelo menos, quatro a cinco vezes maior que o  $F_{tabelado}$ , e o F da falta de ajuste em relação ao erro puro deve apresentar o menor valor possível e sempre menor que o F da falta de ajuste tabelado, pois um valor alto e maior que o  $F_{tabelado}$  para a falta de ajuste indica que os dados não estão ajustados ao modelo obtido.

Dessa forma, a Tabela 9 (ANOVA) apresenta um coeficiente de correlação ( $R^2$ ) de 0,76, o que explicou 76,27% da variação dos dados experimentais no modelo, bem como indica um aceitável ajuste do modelo aos dados avaliados.

**Tabela 9.** Análise de variância (ANOVA) do modelo para o teor de antocianinas totais da extração sólido-líquida.

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F <sub>calculado</sub>	F <sub>tabelado</sub> (p≤0,05)	R <sup>2</sup>
Regressão	452,3964	6	75,3994	2,143848	6,163132	76,27
Resíduos	140,6805	4	35,1701			
F.Ajuste	140,12	2	70,0631	250,0468	19	
E.Puro	0,5605	2	0,2802			
Total	593,0769	10				

SQ: soma quadrática GL: graus de liberdade MQ: média quadrática

O valor  $F_{\text{calculado}}$  da regressão foi de 2,14, inferior ao  $F_{\text{Tabelado}}$ , evidenciando que a regressão não foi estatisticamente significativa ao nível de significância ( $p$ ) de 5% o que indica que o modelo não é preditivo. A falta de ajuste foi significativa ( $F_{\text{calculado}}$  maior que o  $F_{\text{Tabelado}}$ ), ratificando que os dados experimentais não podem ser ajustados ao modelo. Portanto, as superfícies de resposta não foram geradas.

Ao extrair pigmentos antociânicos com solução extratora contendo etanol e ácido clorídrico, assim como no presente trabalho, Faria, Marques e Mercadante (2011), Vizzoto e Pereira (2008) e Kuskoski et al. (2006), reportam, para o fruto de jambolão, resultados superiores ao desta pesquisa, de  $210 \pm 9,1 \text{ mg}/100\text{g}^{-1}$ ,  $141,80 \pm 50,4 \text{ mg}/100\text{g}^{-1}$  e  $108 \text{ mg}/100\text{g}^{-1}$ , respectivamente.

Malmann et al. (2011) ao avaliar as antocianinas para a casca da berinjela, variou o volume do solvente, tempo de extração e número de extrações e alcançou os teores de 23,96 a  $36,70 \text{ mg}/100\text{g}^{-1}$  de antocianinas. Mas, o planejamento foi influenciado de forma significativa e positiva pelo volume do solvente. Caccace e Mazza (2002) ao extrair compostos fenólicos e antocianinas da groselha preta, observaram que o aumento do volume do solvente tornou maior o conteúdo de antocianinas e conseqüentemente o tempo de extração diminuiu.

Sabe-se que as antocianinas são rapidamente destruídas pelo aquecimento, principalmente acima de  $60^{\circ}\text{C}$ , durante o processamento ou estocagem de alimentos. Muitos estudos demonstram a relação logarítmica entre a destruição das antocianinas e o aumento aritmético da temperatura. Por isso, para melhor retenção dos pigmentos, têm sido recomendados processos que utilizem a condição de alta temperatura por tempo curto (MALACRIDA; MOTTA, 2006).

### 5.4.3 Polifenóis Totais

Os valores médios dos teores de polifenóis totais encontrados para cada ensaio realizado a partir do planejamento deste estudo são mostrados na Tabela 10.

**Tabela 10.** Média\* e desvio-padrão do teor de polifenóis totais das extrações sólido-líquida.

<b>Extrações</b>	<b>Polifenóis Totais (mg/100g)</b>
18,75g /25 ml/ 20°C/2h	8,33
12,5g/ 25ml/30°C/3h	8,28
6,5g/ 25 ml/40°C/2h	8,29
6,5g / 25 ml/20°C/4h	7,68
12,5g/ 25ml/30°C/3h	8,42
18,75/ 25 ml/40°C/4h	8,68
18,75/ 25 ml/40°C/2h	8,50
6,5g/ 25 ml/40°C/4h	8,21
18,75g/ 25 ml/20°C/4h	8,44
6,5g/ 25 ml/20°C/2h	8,36
12,5g/ 25ml/30°C/3h	8,28

De acordo com a Tabela 10 observa-se os níveis máximos e mínimos dos teores de polifenóis totais nos ensaios de condições 18,75/25ml/40°C/4h e 6,5g /25ml/20°C/4h, respectivamente.

A tabela 11 apresenta os efeitos dos fatores lineares, quadráticos e da interação, em negrito, são significativos no nível de 95% de confiança ( $p \leq 0,05$ ) ou valores próximos considerando-se o erro puro.

**Tabela 11.** Efeito estimado, erro puro, coeficiente t e significância estatística de cada fator para o teor de polifenóis totais.

Fatores	Efeito estimado	Erro puro	t(2)	Significância estatística (p)
<b>Efeitos principais</b>				
Sólido/líquido	<b>0,352500</b>	<b>0,057155</b>	<b>6,1675</b>	<b>0,025296</b>
Temperatura	0,217500	0,057155	3,8055	0,062636
Tempo	-0,117500	0,057155	-2,0558	0,176115
<b>Efeito de interação</b>				
Sólido/líquido x temperatura	-0,012500	0,057155	-0,2187	0,847169
Sólido/líquido x tempo	<b>0,262500</b>	<b>0,057155</b>	<b>4,5928</b>	<b>0,044282</b>
Temperatura x tempo	0,167500	0,057155	2,9306	0,099379

Como pode ser observado na Tabela 11, os efeitos significativos no nível de 95% de confiança foram: razão sólido/líquido e a interação sólido/líquido x tempo, considerando o erro puro. Estes efeitos foram positivos o que significa que essas variáveis exercem influência no nível de polifenóis totais.

O modelo estatístico ajustado aos dados experimentais testados para a polifenóis totais no extrato de jambolão, está representado na Equação:

$$PT = 8,31 + 0,35x_1 + 0,21x_2 - 0,11x_3 - 0,01x_1 \cdot x_2 + 0,26x_1 \cdot x_3 + 0,16x_2 \cdot x_3$$

Onde: PT: polifenóis totais; x1: relação sólido/líquido; x2: temperatura e x3: tempo

A Tabela 12 (ANOVA) apresenta um coeficiente de correlação ( $R^2$ ) de 0,92, o que explicou 92,06% da variação dos dados experimentais no modelo, o que indica um bom ajuste do modelo aos dados avaliados.

**Tabela 12.** Análise de variância (ANOVA) do modelo para o teor de polifenóis totais da extração sólido-líquida.

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F <sub>calculado</sub>	F <sub>tabelado</sub> (p≤0,05)	R <sup>2</sup>
Regressão	0,564975	6	0,094163	7,734404	6,163132	92,06
Resíduos	0,048698	4	0,012175	2,726793	19	
F.Ajuste	0,035631	2	0,017816			
E.Puro	0,013067	2	0,006534			
Total	0,613673	10				

SQ: soma quadrática GL: graus de liberdade MQ: média quadrática

O valor  $F_{\text{calculado}}$  da regressão foi de 7,73, superior ao  $F_{\text{Tabelado}}$ , evidenciando que a regressão foi estatisticamente significativa ao nível de significância ( $p$ ) de 5%. O  $F_{\text{calculado}}$  da falta de ajuste (2,72) foi menor que o  $F_{\text{Tabelado}}$  (19), evidenciando a não significância da falta de ajuste

A extração de compostos fenólicos em meio alcoólico proporcionou resultados diversificados dentre vários autores. Sousa (2012) ao analisar os teores de polifenóis de extrato etanólico do jambolão encontrou resultado de  $87,85 \pm 22$  mg/100g de amostra, valor superior ao deste estudo.

Semelhante a presente pesquisa, Caccace e Mazza (2002) extraíram compostos fenólicos e antocianinas a partir de groselha preta e observaram que a extração era afetada pelo volume do solvente e pela temperatura, os pesquisadores esclareceram que ao aumentar o volume do solvente aumenta-se a taxa de difusão, o que favorece a extração.

Borges et al. (2011) que otimizaram o processo de extração de antocianinas nos frutos de juçara utilizaram 13 solventes diferentes e o tempo de extração variou de 1-24h e o volume de solvente de 10 a 50 ml/g. A análise estatística demonstrou que os termos lineares de volume de solvente e tempo de extração e a interação entre eles foi altamente significativos para os extratos. E ainda que o volume do solvente exerceu efeito mais significativo do que as outras variáveis, ratificando, portanto, o exposto nesta pesquisa.

#### 5.4.4 Capacidade Antioxidante pelo método de DPPH

Os valores médios de  $EC_{50}$  encontrados para cada ensaio realizado a partir do planejamento deste estudo são mostrados na Tabela 13.

**Tabela 13.** Média\* e desvio-padrão da capacidade antioxidante pelo método de DPPH extrações sólido-líquida.

<b>Extrações</b>	<b>DPPH (EC<sub>50</sub> expresso em g polpa/g)</b>
18,75g /25 ml/ 20°C/2h	58,67
12,5g/ 25ml/30°C/3h	58,45
6,5g/ 25 ml/40°C/2h	57,56
6,5g / 25 ml/20°C/4h	58,23
12,5g/ 25ml/30°C/3h	57,89
18,75/ 25 ml/40°C/4h	58,79
18,75/ 25 ml/40°C/2h	56,45
6,5g/ 25 ml/40°C/4h	57,32
18,75g/ 25 ml/20°C/4h	58,14
6,5g/ 25 ml/20°C/2h	58,21
12,5g/ 25ml/30°C/3h	58,19

As respostas apresentadas na Tabela 13 referentes aos dados de capacidade antioxidante, pelo método de DPPH, utilizados para avaliação estatística do planejamento fatorial linear 2<sup>3</sup> não constituíram respostas relevantes, pois, não foram observados os efeitos significativos das variáveis independentes estudadas.

De acordo com Sousa (2012) os extratos orgânicos de jamelão apresentaram atividade antioxidante pela redução do radical DPPH• que variaram de 24,58% ± 2,78 (extrato aquoso na concentração de 50 µg.mL<sup>-1</sup>) a 92,57% ± 0,99 (extrato acetônico na concentração de 150 µg.mL<sup>-1</sup>). E que na concentração de 100 µg.mL<sup>-1</sup> os extratos aquosos, etanólico e acetônico apresentaram percentuais de sequestro de 36,24 ± 1,45; 54,46 ± 3,60; e 81, 34 ± 1,78, respectivamente.

Em concordância com o percentual de proteção, os resultados do EC<sub>50</sub> dos extratos orgânicos de jamelão, demonstram que o extrato acetônico foi o mais eficiente para capturar o radical livre DPPH• (43,54 ± 2,02 µg.mL<sup>-1</sup>), seguido pelo extrato etanólico (102,54 ± 2,78 µg.mL<sup>-1</sup>) e aquoso (208,86 ± 6,15 µg.mL<sup>-1</sup>).

Isso mostra que os valores de EC<sub>50</sub> apresentados neste trabalho são maiores que os estudo em discussão, sendo assim, os extratos obtidos nesta pesquisa demonstram menor capacidade antioxidante. Essa capacidade de sequestro dos radicais livres é diferenciada entre



frutos e entre extratos do mesmo fruto devido à diversidade dos compostos bioativos extraídos.

### 5.5 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDA NA MANUTENÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DA POLPA DE JAMBOLÃO.

Foi possível constatar que a extração sólido-líquida afetou a manutenção dos compostos bioativos ao comparar os teores de antocianinas e polifenóis totais do fruto *in natura* e dos extratos. A Tabela 14 mostra as porcentagens de retenção na quantificação de antocianinas e polifenóis totais para cada ensaio da extração sólido-líquida quando comparadas aos teores do fruto *in natura*.

**Tabela 14.** Porcentagem de retenção na quantificação de antocianinas e polifenóis totais da extração sólido/líquida.

Ensaio/ extrações	Retenção de antocianinas em %	Retenção de polifenóis totais em %
18,75g /25 ml/ 20°C/2h	35,75	16,03
12,5g/ 25ml/30°C/3h	15,62	16,57
6,5g/ 25 ml/40°C/2h	21,87	16,49
6,5g / 25 ml/20°C/4h	17,57	16,91
12,5g/ 25ml/30°C/3h	36,14	15,28
18,75/ 25 ml/40°C/4h	16,1	16,79
18,75/ 25 ml/40°C/2h	49,38	16,33
6,5g/ 25 ml/40°C/4h	18,2	17,27
18,75g/ 25 ml/20°C/4h	16,52	16,47
6,5g/ 25 ml/20°C/2h	16,77	16,75
12,5g/ 25ml/30°C/3h	15,29	16,47

É possível verificar na Tabela 14, que as condições de maior manutenção dos teores de antocianinas e polifenóis totais foram nos ensaios de condição 18,75/ 25 ml/40°C/2h e 6,5g/ 25 ml/40°C/4h, respectivamente. Para as antocianinas a maior relação sólido/líquido, maior temperatura e menor tempo mantiveram esses pigmentos em maior porcentagem, enquanto que para os polifenóis totais a menor relação sólido/líquido, maior temperatura e tempo foram responsáveis para maior manutenção dos fitoquímicos.

No geral, nível da variável temperatura de 40°C foi responsável pela maior porcentagem de manutenção dos compostos bioativos (antocianinas e polifenóis totais), ou seja, extração mais eficaz. No entanto, o ponto central do planejamento realizado nesta pesquisa, a condição de 0,5 (sólido/líquido), 30°C e 3h apresentou a menor manutenção dos compostos de interesse.

## 5.6 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS POR CO<sub>2</sub> SUPERCRTICO DA POLPA LIOFILIZADA DE JAMBOLÃO

Os valores médios dos parâmetros de colorimetria instrumental, antocianinas totais, polifenóis totais e capacidade antioxidante pelo método de DPPH encontrados para cada condição realizada são mostrados na Tabela 16.

**Tabela 15.** Parâmetros da caracterização dos extratos por CO<sub>2</sub> supercrítico.

Amostra	Parâmetros*						
	L*	a*	b*	$\Delta E^*$	Antocianinas (mg/100g <sup>-1</sup> )	Polifenóis totais (mg/100g)	DPPH (EC <sub>50</sub> expresso em g polpa/g)
45°C/300bar/2h	28,18	0,49	0,94	34,84	128,73±3,1	257,73±0,2	1,10±0,1
50°C/150bar/2h	28,61	1,82	1,21	33,23±0,4	161,18±1,8	254,15	1,34±1,7
55°C/250bar/2h	27,90	1,31	1,13±	33,28±0,5	101,52±1,8	241,22	1,28

\*Média e desvio-padrão das coordenadas de cor instrumental L\*, a\* e b\* e  $\Delta E^*$ , antocianinas totais, polifenóis totais e DPPH das extrações por CO<sub>2</sub> supercrítico usando a água como cossolvente.

### *Cor instrumental*

Na Tabela 15 estão apresentados os atributos de cor L\*, a\*, b\* e  $\Delta E^*$  dos extratos supercríticos obtidos. É possível observar que o parâmetro de luminosidade apresentou valores entre 28,18 a 27,90 indicando que todos os extratos supercríticos apresentaram coloração relativamente escura (L\*=0, preto).

O parâmetro a\* apresentou valor positivo (+) para todas as condições analisadas indicando que os extratos apresentaram coloração avermelhada. Além disso, este parâmetro demonstra sofrer um aumento em seu valor com o aumento da temperatura e posterior

decréscimo na maior temperatura da extração, indicando que os extratos obtidos a 50°C apresentaram coloração vermelha mais intensa que os extratos obtidos a 45 e 55°C, fator este que pode ser explicado pelo teor de antocianinas ser maior nesta temperatura (50°C). O parâmetro  $b^*$  dos extratos apresentaram valores positivos (+) indicando coloração azul. A variação de cor foi menor na condição de 50°C/150bar/2h.

Cavalcanti (2013) avaliou a colorimetria para o extrato da polpa de jabuticaba por CO<sub>2</sub> supercrítico utilizando etanol, isopropanol e água como cossolvente. O autor obteve os seguintes valores para  $L^*$  de 3,75 a 13,54,  $a^*$  de 5,90 a 10,15 e  $b^*$  de 0,05 a 1,08. Apenas o atributo  $b^*$  é semelhante ao resultado deste trabalho, os valores de  $L^*$  e  $a^*$  mostram-se inferiores e superiores, respectivamente. Segundo o autor, os maiores valores de  $a^*$  foram obtidos utilizando água como cossolvente seguido em ordem decrescente de intensidade pelo etanol e isopropanol.

#### *Antocianinas*

Os resultados de antocianinas foram bastante superiores aos da extração sólido-líquido e a condição de menor pressão mostrou-se mais eficaz para este composto. Cavalcanti (2013) considerou os melhores rendimentos de antocianinas da jabuticaba para os processos com fluido supercrítico, em ordem decrescente, ao utilizar etanol (60°C e 15-30 Mpa), isopropanol (60°C e 20 Mpa) e água (60°C e 30 Mpa). A pressão mais eficaz para a jabuticaba coincidiu com o resultado deste trabalho para o jambolão, no entanto, o comportamento da extração para o cossolvente foi o oposto, pois, os testes prévios para o jambolão realizados com etanol não foram satisfatórios, por isso, optou-se pela utilização da água como cossolvente.

Os resultados do teor de antocianinas reportados na literatura são bastante diversos variando não só com os métodos de extração, solventes e condições operacionais utilizados como também com a variedade da matéria-prima, época da colheita e tipos de pré-tratamento utilizados na matéria-prima utilizados.

#### *Polifenóis Totais*

Os compostos fenólicos totais mostram-se bastante superiores aos observados na extração sólido-líquido, assim como, em comparação a diversos estudos. Cavalcanti (2013) observou a variação de 18,08 a 73,48 ppm de GAE nos extratos, valores inferiores aos reportados neste estudo. O mesmo autor observa que, em geral, foram alcançados melhores

rendimentos de compostos fenólicos a 60°C do que a 50°C utilizando os cossolventes etanol, isopropanol e água em todas as pressões estudadas. Santos e Meireles (2011) estudaram a otimização da obtenção de compostos bioativos a partir da casca de jabuticaba utilizando dióxido de carbono a alta pressão obtendo valor máximo (14,4 mg EAG/ g material seco) a 80°C e 13,5 MPa.

Enquanto que nesta pesquisa o maior teor foi encontrado na maior pressão (300bar) e menor temperatura (45°C) das condições efetuadas. O teor desses fitoquímicos varia nas extrações devido às condições aplicadas favorecerem ou não a polaridade dessa classe de compostos.

#### *Capacidade Antioxidante pelo método de DPPH*

Cavalcanti (2013) observou que os valores de EC<sub>50</sub> variaram de 0,41(60°C 300bar) a 5,55 (50°C por 100 bar) os extratos utilizando água como cossolvente apresentaram aumento crescente de capacidade antioxidante com o aumento da pressão, resultado semelhante ao deste estudo que em maior pressão (300bar) apresentou maior capacidade antioxidante.

No entanto, quanto maior a concentração do extrato menor a capacidade antioxidante, esse comportamento é típico de atividade pró-oxidante e faz parte do mecanismo de ação das substâncias antioxidantes. Dail e Mumper (2010) afirmam que antioxidantes fenólicos se comportam como pró-oxidantes nas condições que favoreçam a sua auto-oxidação, por exemplo, em pH elevado, com altas concentrações de íons de metal de transição e em presença de oxigênio. Estudos têm revelado efeitos pró-oxidantes das vitaminas antioxidantes e várias classes de polifenóis derivados de plantas, tais como flavonoides, taninos e curcumina (LASTRA;VILLEGAS, 2007).

#### *Granulometria e Densidade real*

De acordo com Oliveira (2010), esse parâmetro é muito importante, pois, está relacionado com a resistência interna à transferência de massa. Pois, para extração ser mais eficaz, deve-se reduzir o tamanho das partículas, com a finalidade de aumentar a área de contato entre o sólido e o solvente, diminuindo, desta forma, a distância que o soluto percorre no interior da partícula porosa para a superfície.

Porém, a redução da granulometria do sólido não pode ser realizada de forma indefinida, pois partículas muito pequenas tendem a formar aglomerados e interromper a

passagem do solvente pelo leito, além de proporcionar perda de compostos voláteis em matrizes vegetais ricas em óleos essenciais, por exemplo. O diâmetro médio das partículas encontrado neste estudo foi de 1,46mm. Santos (2012) reportou a granulometria de 0,48mm, portanto, o resultado desta pesquisa, encontra-se dentro da faixa ótima, pois de um modo geral, são utilizadas partículas com diâmetro médio entre 0,25 e 2 mm. A densidade real foi de 1,55g/cm<sup>3</sup>.

### 5.7 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA EXTRAÇÃO POR CO<sub>2</sub> SUPERCRÍTICO NA MANUTENÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DA POLPA LIOFILIZADA DE JAMBOLÃO.

Foi possível constatar que a extração supercrítica afetou a manutenção dos compostos bioativos ao comparar os teores de antocianinas e polifenóis totais do fruto liofilizado e dos extratos. A Tabela 16 mostra as porcentagens de retenção na quantificação de antocianinas e polifenóis totais para cada condição da extração.

**Tabela 16.** Porcentagem de retenção na quantificação de antocianinas e polifenóis totais da extração supercrítica.

Ensaio/ extrações	Retenção de antocianinas em %	Retenção de polifenóis totais em %
45°C/300bar/0,9g cm <sup>-3</sup> /2h	60,61	46,09
50°C/150bar/0,7g cm <sup>-3</sup> /2h;	75,88	45,45
55°C/250bar/0,8g cm <sup>-3</sup> /2h.	47,79	43,14

É possível verificar na Tabela 16, que as condições de maior manutenção dos teores de antocianinas e polifenóis totais foram 50°C/150bar/0,7g cm<sup>-3</sup>/2h e 45°C/300bar/0,9g cm<sup>-3</sup>/2h, respectivamente. Para as antocianinas a condição intermediária de pressão e temperatura foi mais eficaz na manutenção dos compostos. Enquanto que para os polifenóis totais a menor temperatura e maior pressão foram responsáveis para maior manutenção dos fitoquímicos.

Ainda sobre os polifenóis totais, ressaltando a variável temperatura, foi possível observar o oposto da condição da extração sólido-líquido, pois, a maior temperatura mostrou-

se mais eficaz. A manutenção desses compostos não sofreu variação significativa para as três diferentes condições. Todavia, os resultados obtidos para as antocianinas foram bastante divergentes conforme as condições estudadas.

No geral, ao comparar com a extração sólido-líquido os compostos bioativos (polifenóis totais e antocianinas) mantiveram-se, em maior porcentagem nas condições de extração supercrítica. Resultados que corroboram com a literatura exposta neste trabalho, pois a extração por fluido supercrítico tem a característica de ser mais seletiva que os métodos de extração convencionais.

## 6 CONCLUSÃO

As extrações sólido-líquido apresentaram valores significativos de compostos bioativos (antocianinas e polifenóis totais), apesar de não manter os teores apresentados no fruto *in natura*, e mostraram-se inferiores quando comparados a diversas pesquisas.

Conforme os resultados expostos pôde-se inferir que para as coordenadas de cor e variação de cor o ensaio 10 (6,5/20°C/2h) apresenta os melhores resultados. Para a extração de antocianinas totais o ensaio mais eficaz foi de 6,5/40°C/4h e o teor de polifenóis totais foi maior no ensaio de condição 18,75/ 25 ml/40°C/4h.

Assim, ao considerar apenas os compostos bioativos (antocianinas e polifenóis totais) com o aumento do tempo e da temperatura observaram-se os maiores níveis desses compostos, enquanto que a menor relação sólido/líquido facilita a extração de antocianinas totais e o contrário ocorre para a extração de polifenóis totais. Isto sugere que a extração para os polifenóis totais promoveu a extração de outras substâncias de comportamento diferente aos das antocianinas e, por isso, as condições de extração diferiram-se para a variável sólido/líquido.

A condição mais eficaz na extração de antocianinas com CO<sub>2</sub> supercrítico foi de 50°C/150bar/0,7g cm<sup>-3</sup>/2h, enquanto que a condição de 45°C/300bar/0,9g cm<sup>-3</sup>/2h favoreceu a extração de polifenóis totais.

Os resultados da extração por fluido supercrítico implicou no resultado maior de capacidade antioxidante em comparação com a extração sólido-líquido. Assim, pode-se considerar a extração pela metodologia supercrítica, por ser mais seletiva, manteve de forma mais eficaz os compostos bioativos em comparação à extração sólido-líquido.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMAROWICZ R, ESTRELLA I, HERNANDEZ T, ROBREDO S, TROSZYNSKA A, Kosinska A, Pegg RB Treatment of common diseases with drug liquors. **Food Chemistry**. 121:705, 2010.
- ATKINS, P.W. Físico-química-Fundamentos, 3ed. Rio de Janeiro: LTC Editora, 2003.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis**. Edited by Patricia Cunniff . 16<sup>a</sup> ed., 3 rd, v. 2, cap. 37, 1997.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of AOAC international**. 17<sup>a</sup> ed., Washington, 2002.
- BARCIA, Milene Teixeira. Composição centesimal e de fitoquímicos em jambolão (*Syzygium Cumini*) **Dissertação (mestrado)** Pelotas, 2009.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.
- BONA, Karine Santos de; BELLE, Luziane Potrich; BITTENCOURT, Paula Eliete Rodrigues; BONFANTI, Gabriela; CARGNELLUTI, Lariane Oliveira; PIMENTEL, Victor Camera; RUVIARO, Amanda Roggia; SCHETINGER, Chitolina; EMANUELLI Tatiana &
- BRITO, Brenda de Nazaré do Carmo; CHISTÉ, Renan Campos; PEREIRA; Luciana Ferreira E; PENA, Rosinelson da Silva; LOPES, Alessandra Santos. The Efficiency of different solvents on the extraction of anthocyanins from *syzygium cumini* (L.) Skeels. coletados em Belém, Pará. 2009. No prelo.
- CALVETE, E.O., MARIANI, F., WESP, C.L., NIENOW, A.A., CASTILHOS, T., CECCHETTI, D. Fenologia, Produção e Teor de Antocianinas de Cultivares de Morangueiro em Ambiente Protegido. **Revista Brasileira Fruticultura**, v.30, n.2, p. 396-401, 2008.
- CASSEL, E.; VARGAS, R.M.F.; BEDINOT, C. Unidad piloto de extracción supercrítica automatizada. In: CASSEL, E.; VARGAS, R.M.F (org.). *Aplicaciones Industriales de los Taninos Vegetales*. Porto Alegre, 2007.
- CASTAÑEDA-OVANDO, A., PACHECO-HERNÁNDEZ, M. L., PÁEZ-HERNÁNDEZ, M. E., RODRÍGUEZ, J. A., & GALÁN-VIDAL, C. A. Chemical Studies of Anthocyanins: A review. **Food Chemistry**. 113(4), p. 859–871, 2009.
- CAVALCANTI, Rodrigo Nunes. Extração de antocianinas de resíduo de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) utilizando líquido pressurizado e fluido supercrítico: caracterização química, avaliação econômica e modelagem matemática. **Tese (Doutorado)** Campinas, 2013.
- CÉSPEDA, C. L.; EL-HAFIDI, M.; PAVON, N.; ALARCON, J. Antioxidant and cardioprotective activities aff phenolic extracts from fruits of Chilean blackberry *Aristotelia chilensis* (Elaeocarpaceae), Maqui. **Food Chemistry**. v.107, p. 820-829, 2008.



CHISTE, R. C., LOPES, A. S., & de FARIA, L. J. G. Thermal and light degradation kinetics of anthocyanin extracts from mangosteen peel (*Garcinia mangostana* L.). **International Journal of Food Science and Technology**. v.45, p. 1902–1908, 2010.

DAI, J.; MUMPER, R.J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, Switzerland, v.15, p. 7313-7352, 2010.

ESPIN, 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**, Easton, v.48, p. 1588-1592, 2000.

FARIA, A. F.; MARQUES, M. C.; MERCADANTE, A. Z. Identification of bioactive compounds from jambolão (*Syzygium cumini*) and antioxidant capacity evaluation in different pH conditions **Food Chemistry**. 2011.

FAVARO, Martha Maria Andreotti. Extração, estabilidade e quantificação de antocianinas de frutas típicas brasileiras para aplicação como corantes. **Dissertação (Mestrado)**, Campinas, 2008.

FLOEGEL, A.; KIM, D.; CHUNG, S.; KOO, S. I.; CHUN, O. K. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, p. 1043–1048, 2011.

FRANK, Kerstin; KÖHLER, Karsten e SCHUCHMANN, Heike Petra. Stability of anthocyanins in high pressure homogenization **Food Chemistry**, p. 716–719, 2012.

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

GEORGÉ, S.; BRAT, P.; ALTER, P.; AMIOT, M. J. Rapid Determination of Polyphenols and Vitamin C in Plant-Derived Products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 5, p. 1370-1373, 2005.

GORDON, André; JUNGFER, Elvira; SILVA, Bruno Alexandre da; MAIA, José Guilherme S. e MARX, Friedhelm. Phenolic Constituents and Antioxidant Capacity of Four Underutilized Fruits from the Amazon Region. **Journal Agricultural Food Chemistry**. v. 59, p. 7688–7699, 2011.

HANSON, C.; **Recent Advances in Liquid-Liquid Extraction**, Ed. Pergamon Press: Oxford, 1975.

HE, J. A., & GIUSTI, M. M. Anthocyanins: Natural colorants with healthpromoting properties. **Annual Review of Food Science and Technology**. p. 163–186, 2010.

JACQUES, A.C.; PERTUZATI, P.B.; BARCIA, M. T. Nota científica: Compostos Bioativos em Pequenas Frutas Cultivadas na região Sul do Estado do Rio Grande do Sul. **Brazilian Journal Food Technology**, v.12, n.2, p.123-127, 2009.

JACQUES, R.R. Caracterização Química da erva-mate (*Ilex paraguariensis*): aplicação de diferentes processos de extração e influência das condições de plantio sobre a composição química. **Tese (doutorado)**. Porto alegre, 2005.

JIE, Li; XIAO-DING, Li; YUN, Zhang; ZHENG-DONG, Zheng; ZHI-YA, Qu; MENG Liu; SHAO-HUA, Zhu, SHUO, Liu; MENG, Wang & LU, Qu. Identification and thermal stability of purple-fleshed sweet potato anthocyanins in aqueous solutions with various pH values and fruit juices. **Food Chemistry**. v. 136, p. 1429–1434, 2013.

JIMÉNZ-ESCRIG, A.; RINCÓN, M.; PULIDO, R.; SAURA-CALIXTO, F. Gava fruit (*Psidium guajava* L.) a new source of antioxidant dietary fiber. **Journal of agricultural and food chemistry**, Easton, v. 49, p. 5489-5493, 2001.

KAHKONEN, M. P; HOPIA, A. I.; HEINONEN, M. Berry phenolics and their antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.49, n. 8, p. 4076–4082, 2001.

KAY, C. D., KROON, P. A., & CASSIDY, A. The bioactivity of dietary anthocyanins is likely to be mediated by their degradation products. **Molecular Nutrition & Food Research**. n. 92, p. 101, 2009.

KONCZAK, I.; ZHANG, W. Anthocyanins-more than nature's colours. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. n.5, p. 239–240, 2004.

KUSKOSKI, E.M.; MARQUES, P.T.; FETT, R.; Estudo comparativo da estabilidade das antocianinas do baguaçu, jabolão e da uva. **Revista Brasileira de Corantes Naturais**. v.4, n.1 e 2, p.73-76, 2000.

L. L.; Lin, Y. M. Antioxidant tannins from *Syzygium cumini* fruit. Afr. **Journal of Biotechnology**. n. 8, p. 2301–2309, 2009.

LOPEZ-SEBASTIAN S., RAMOAS E., IBANEZ E., BUENO J.M., BALLESTER L., TABERA J. Reglero G. Dearomatization of Antioxidant Rosemary Extracts by Treatment with Supercritical Carbon Dioxide. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. n. 46, p. 13- 19, 1998.

LUQUE DE CASTRO, M. D., García-Ayuso, L. E. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta* 1998; 369: 1-10. Shimada K, Fujikawa K, Yahara K, Nakamura T **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. n. 40, p. 945, 1992.

MALACRIDA C.R.; MOTTA, S. Antocianinas em suco de uva: composição e estabilidade. **Boletim do CEPPA**. Curitiba, v.24, n.1, p. 59-82, 2006.

MARÓSTICA JUNIOR, M.R.; LEITE, A.V.; DRAGANO, N.R.V. **Supercritical fluid extraction and stabilization of phenolic compounds from natural sources-review**. *Open chemical engineering journal*, v.4, p. 51-60, 2010.

MERKEN, H. M.; BEECHER, G. R. Measurement of food flavonoids by highperformance liquid chromatography: A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 48, n. 3, p. 577–599, 2000.

METIVIER, R.P.; FRANCIS, F.J.; CLYDESDADE, F.M. Solvent extraction of anthocyanins from wine pomace. **Journal of Food Science**.v.45, n. 4, p 1099, 1980.

MIGLIATO, K. F.; Mello, J. C. P.; Higa, O. Z.; Rodas, A. C. D.; Correa, M. A.; Mendes-Giannini, M. J. S.; Fusco-Almeida, A. M.; Pizzolitto, A. C.; Salgado, H. R. N. Antimicrobial and cytotoxic activity of fruit extract from *Syzygium cumini* Skeels. **Latin American Journal of Pharmacy**. n. 29, p. 725–730, 2010.

MORETTO, Maria Beatriz. Erythrocytic enzymes and antioxidant status in people with type 2 diabetes: Beneficial effect of *Syzygium cumini* leaf extract in vitro. **Diabetes Research and Clinical Practice**. p. 84–90, 2011.

MUKHOPADHYAY, M. Natural Extracts Using Supercritical Carbon Dioxide. Boca Raton: CRC Press, 2000.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1-2, p. 95-111, 2004.

NETZ, P.A.; ORTEGA, G.G. Fundamento de Físico-Química: uma abordagem, conceitual para as ciências farmacêuticas. Porto Alegre: Artmed, 2002.

OLIVEIRA, D.A. **Caracterização fitoquímica e biológica de extratos obtidos de bagaço de uva (*Vitis Vinífera*) das variedades merlot e syrah**. Dissertação (Mestrado), Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

OLIVEIRA, P.A. **Estudo da estabilidade e estabilização das antocianinas do Bagaço de Uva Seibel 2**. Campinas, p. 103, 2001.

PEREIRA, C.G.; MEIRELES, M.A.A. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: fundamentals, applications and economic perspectives. **Food and Bioprocess Technology**, v.3, p.340-372, 2010.

PERRUT, M. Supercritical fluid applications: industrial developments and economic issues. **Industrial and Engineering Chemistry Research**. n. 39, p. 4531-4535, 2000.

ROSA, P.T.V.; PARAJÓ, J.C.; DOMÍNGUEZ, H.; MOURE, A.; DÍAZ-REINOSO, B.; SMITH JR., R.L.; TOYOMIZU, M.; FLORUSSE, L.J.; PETERS, C.J.; GOTO, M.; LUCAS, S.; MEIRELES, M.A.A. (Ed.) *Extracting bioactive compounds for food products: theory and applications*. Boca Raton: CRC Press, p. 269-401, 2009.

REVILLA, E.; RYAN, J. M.; MARTIN-ORTEGA, G. Comparison of several procedures used for the extraction of anthocyanins from red grape. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 46, p. 4592-4597, 1998.

RUFINO, Maria do Socorro Moura. Propriedades funcionais de frutas tropicais brasileiras não tradicionais. **Tese (doutorado)**, Mossoró, 2008.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; PEREZ-JIMENEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade

Antioxidante Total em Frutas Pela Captura do Radical Livre ABTS. Embrapa Agroindustrial Tropical: Comunicado Técnico 127. Fortaleza-CE, p. 4, 2007

SANTOS, D.T.; MEIRELES, M.A.A. Optimization of bioactive compounds extraction from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) skins assisted by high pressure CO<sub>2</sub>. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 12, n. 3, 2011, p. 398-406.

SARI, Puspita; WIJAYA, Christofora Hanny; SAJUTHI, Dondin; SUPRATMAN, Unang. Colour properties, stability, and free radical scavenging activity of jambolan (*Syzygium cumini*) fruit anthocyanins in a beverage model system: Natural and copigmented anthocyanins. **Food Chemistry**, 2012, 132, 1908–1918. Zhang, L. L.; Lin, Y. M. Antioxidant tannins from *Syzygium cumini* fruit. **Journal Food Biochemistry**. n. 8, p. 2301–2309, 2009.

SHIPP, J., & ABDEL-AAL, E. M. Food applications and physiological effects of anthocyanins as functional food ingredients. **The Open Food Science Journal**. n. 4, p. 7–22, 2010.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolic with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American journal of enology and viticulture**. V. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

SINKO, P.J. Martin's Physical Pharmacy and Pharmaceutical Sciences: Physical Chemical and Biopharmaceutical Principles in the Pharmaceutical Sciences, 5.ed. Philadelphia, 2006.

SIRIMANNE, S. R.; BARR, J. R.; PATTERSON JR, D.G.; *Anal. Chem.* 68, 1556. 1996.

SOUSA, Mariana de Moraes. **Compostos Bioativos e Atividade Antioxidante do Fruto e do Licor de Jamelão (*Syzygium cumini*)**. dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Piauí – UFPI, Piauí, 2012.

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

VEGGI, Priscilla C.; SANTOS, Diego T.; MEIRELES, M. Angela A. Anthocyanin extraction from Jaboticaba (*Myrciaria Cauliflora*) skins by different techniques: economic evaluation. **Food Science**. 1725-1731, 2011.

WANG, L. S., & STONER, G. D. Anthocyanins and their role in cancer prevention. **Cancer Letters**. p. 281–290, 2008.