

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu*
Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos

SUELEN ÁVILA

**ANTOCIANINAS DE AMORA BRAZO:
EXTRAÇÃO, ESTABILIDADE E COPIGMENTAÇÃO**

PONTA GROSSA
2014

SUELEN ÁVILA

**ANTOCIANINAS DE AMORA BRAZO:
EXTRAÇÃO, ESTABILIDADE E COPIGMENTAÇÃO.**

Dissertação apresentada à banca examinadora como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Gilvan Wosiacki

PONTA GROSSA

2014

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

Ávila, Suelen
A958 Antocianinas de amora braço: extração,
estabilidade e copigmentação/ Suelen
Ávila. Ponta Grossa, 2014.
94f.

Dissertação (Mestrado em Ciência e
Tecnologia de Alimentos - Área de
Concentração: Ciências e Tecnologia de
Alimentos), Universidade Estadual de Ponta
Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Gilvan Wosiacki.

1. Pigmento natural. 2. Cor.
3. Metodologia de superfície de resposta.
4. Tempo de meia-vida.
5. Cianidina-3-glicosídeo. I. Wosiacki,
Gilvan. II. Universidade Estadual de
Ponta Grossa. Mestrado em Ciência e
Tecnologia de Alimentos. III. T.

CDD: 664.8

TERMO DE APROVAÇÃO

SUELEN ÁVILA

ANTOCIANINAS DE AMORA BRAZO: EXTRAÇÃO,
ESTABILIDADE E COPIGMENTAÇÃO

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora:

Orientador:


Prof. Dr. Gilvan Wosaicki – UEPG


Profa. Dra. Neiva Deliberati Rosso – UEPG


Profa. Dra. Iracema Oliveira Moraes – UNICAMP

Ponta Grossa, 13 de fevereiro de 2015.

DEDICATÓRIA

Dedico a minha família e amigos.

AGRADECIMENTOS

Venho aqui fazer meus sinceros agradecimentos às pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente nessa importante etapa da minha vida.

A Deus, pela vida e pelas oportunidades recebidas para chegar até aqui.

A minha família e meu namorado Luca Berthier pela compreensão e apoio em todos os momentos, pela amizade e amparo nos momentos de dificuldade e também pelos momentos de alegria, sempre me apoiando e incentivando-me a lutar pelos meus sonhos.

Agradeço a meu orientador Prof. Dr. Gilvan Wosiacki por toda atenção, compreensão, paciência, transmissão de todos os ensinamentos, pela grande amizade, confiança depositada em meu trabalho e prontidão em ajudar.

A minha parceira e companheira de Mestrado Vivian Ito, “irmã mais velha” que além da amizade contribuiu sem medidas para a realização de um belo trabalho, me deu muita força e coragem para que eu pudesse chegar ao fim dessa jornada.

Agradeço a todos do Laboratório do Grupo de Trabalho sobre a Maçã pela ajuda e apoio para realização das atividades, em especial ao Acácio Zielinski e a Aline Alberti.

Agradeço a Adega Porto Brazos pela doação da matéria-prima.

A todos os professores por transmitirem seus conhecimentos, pelo apoio, incentivo e, principalmente, pela base que nos forneceram para que pudéssemos nos tornar profissionais qualificados.

Aos amigos da turma, pela amizade, apoio e aprendizado adquirido por meio da personalidade de cada um, em especial a Juliane Souza e a Flávia Marena.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade e apoio institucional.

Aos componentes da banca examinadora pela disponibilidade de participação e avaliação do trabalho.

Ao CnPQ pelo apoio financeiro através da concessão da bolsa de Mestrado.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização do meu trabalho.

EPÍGRAFE

Bom mesmo é ir a luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão,
perder com classe e vencer com ousadia, pois o triunfo pertence a quem se
atreve....

E a vida é muito para ser insignificante.

(Charles Chaplin)

RESUMO

Antocianinas são corantes naturais que proporcionam cores atrativas e brilhantes à maioria das plantas, colorindo-as do vermelho vivo ao violeta. Devido à sua instabilidade frente às etapas de processamento de alimentos e a sua dificuldade de extração ainda são pouco utilizados na indústria alimentícia. Flavonóides não antociânicos, aminoácidos, nucleosídios, ácidos orgânicos e as próprias antocianinas podem agir como copigmentos viabilizando as antocianinas como corantes naturais. O objetivo do trabalho foi avaliar a composição aproximada, os compostos fenólicos totais, a atividade antioxidante de amoras Brazo (*Morus nigra L.*) e a estabilidade das suas antocianinas. Foi avaliado o efeito da adição dos ácidos orgânicos e extrato polifenólico de *Camellia sinensis* ao extrato bruto de antocianinas de amora como copigmentos. A reação de copigmentação em solução tampão pH 3,0, foi confirmada por espectrofotometria de absorção UV-Visível e por análise cromatográfica líquida de alta eficiência. Calculou-se o tempo de meia vida e a porcentagem de retenção de cor. A metodologia de superfície de resposta foi eficaz para estimar o efeito de três variáveis independentes sobre a extração de antocianinas, os ótimos valores sugeridos para a extração com ácido cítrico foram tempo de 60 min., razão de 1g / 30 mL e uma temperatura de 60°C e para a extração com ácido clorídrico foram sugeridas as mesmas condições de tempo e razão, porém a uma temperatura de 20°C. O aumento na relação copigmento/antocianinas foi evidenciado pelos efeitos batocrômico e hiperocrômico. A interação das antocianinas foi significativamente afetada pela temperatura (5±3°C e 25±3°C) e o ambiente (luz e escuro). A estabilidade das antocianinas com adição de copigmento aumentou o tempo de meia vida e a porcentagem de retenção de cor das amostras. A estabilidade máxima foi alcançada nas amostras com adição de ácido cafeico em temperatura de 5°C±3°C e no escuro. As antocianinas adicionadas de ácido cafeico e málico apresentaram tempo de meia vida de 242,40 ± 25,40 e 200,48 ± 12,15 dias, respectivamente, trazendo perspectivas para aplicação deste corante natural.

Palavras-chave: pigmento natural, cor, metodologia de superfície de resposta, tempo de meia-vida, cianidina-3-glicosídeo.

ABSTRACT

Anthocyanins are natural colorants that provide attractive and bright colors to most plants, coloring them the bright red to violet. Due to its instability facing the food processing steps and their difficulty of extraction are still little used in the food industry. Flavonoids not anthocyanins, amino acids, nucleosides, organic acids and anthocyanins themselves may act as copigments enabling the anthocyanins as natural colorants. The objective was to evaluate the approximate composition, phenolic compounds, antioxidant activity of blackberries Brazo (*Morus nigra* L.) and the stability of anthocyanins. The effect of the addition of organic acids and polyphenolic extract of *Camellia sinensis* raw extract of blackberries anthocyanins as copigments. The copigmentation reaction buffer at pH 3.0, was confirmed by UV-Visible absorption and by high high-performance liquid chromatography analysis. The calculated half-life and the color retention percentage. The response surface methodology was effective to estimate the effect of three independent variables on anthocyanins extraction, the optimal values suggested for the extraction with citric acid were time of 60 min., ratio of 1 g / 30 mL and a temperature of 60 °C and the extraction with hydrochloric acid have been suggested the same conditions of time and ratio, but at 20 ° C. The increase in relation copigmento / anthocyanins was evidenced by the bathochromic and hyperchromic effects. The interaction of anthocyanins was significantly affected by temperature (5 ± 3 ° C and 25 ± 3 ° C) and the environment (light and dark). The stability of anthocyanins with added copigmento increased half-life and the color retention percentage of sample. Maximum stability was achieved in samples with the addition of caffeic acid at a temperature of 5 ° C \pm 3 ° C in the dark. Anthocyanins added caffeic acid and malic showed half-life of 242.40 ± 25.40 and 200.48 ± 12.15 days, respectively, bringing prospects for application of this natural dye.

Keywords: natural pigment, color, response surface methodology, half cyanidin-3-glucoside.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Amoras Brazo.....	19
Figura 2: Estrutura química da cianidina-3-O-glicosídeo e da cianidina-3-O-rutenosídeo	21
Figura 3: Estrutura básica do cátion flavílio.....	26
Figura 4: Possíveis mudanças estruturais das antocianidinas em meio aquoso em função do pH.	31
Figura 5: Transformações estruturais das antocianinas em meio aquoso ácido.	32
Figura 6: Classificação dos antioxidantes	36
Figura 7: Estrutura molecular do ácido gálico.	39
Figura 8: Estrutura molecular do ácido caféico.	40
Figura 9: Estrutura molecular do ácido málico.	41
Figura 10: soluções submetidas a estabilidade em diferentes condições.	50
Figura 11: Gráficos de pareto com os efeitos significativos na variável de resposta, antocianina. Extração com ácido cítrico (A), extração com ácido clorídrico (B).....	61
Figura 12: Efeito da temperatura e do tempo no conteúdo de antocianinas e valores preditos vs. valores observados dos modelos propostos. Extração com ácido cítrico (A), extração com ácido clorídrico (B).	62
Figura 13: Otimização das antocianinas de amora com ácido cítrico usando a função de desejabilidade.....	63
Figura 14: Otimização das antocianinas de amora com ácido clorídrico usando a função de desejabilidade.....	63
Figura 15: Espectros de absorção de antocianinas de amora Brazo em diferentes concentrações de copigmentos. (A) Ácido caféico; (B) Ácido gálico; (C) Ácido málicos; (D) Extrato polifenólico de Chá Verde.	66
Figura 16: Redução dos valores de absorbância obtidos por espectrofotômetro e redução dos valores de antocianinas totais obtidos por CLAE das antocianinas dos extratos brutos de amora Brazo em solução tampão citrato pH 3,0, temperatura de $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ e $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$, presença de luz e no escuro.	69

Figura 17: Cromatograma do extrato nas condições otimizadas de antocianina de amora Brazo rota-evaporado. (A) cianidina-3-glucosídeo, (B) cianidina-3-ritinosídeo..... 73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Compostos fenólicos presentes em alguns alimentos.....	24
Tabela 2: Lista de solventes utilizados na extração de antocianinas.	29
Tabela 3: Delineamento 3 ³ aplicado para extração de antocianinas de amora Brazo.....	46
Tabela 4: Condições da análise cromatográfica - gradiente aplicado.	52
Tabela 5: Composição físico-química das amoras em base úmida ^(a)	55
Tabela 6: Composição das amoras.....	57
Tabela 7: Planejamento 3 ³ e dados experimentais para extração de antocianinas de amora com ácido cítrico e ácido clorídrico.	58
Tabela 8: Coeficientes de regressão dos modelos polinomiais para extração de antocianinas*.....	60
Tabela 9: Valores de desvios hiper-crômico e batocrômico no comprimento de onda de máxima absorção de antocianinas de amora Brazos adicionadas de co-fatores em solução tampão pH 3,0.....	67
Tabela 10: Tempo de meia vida (dias) e percentagem de retenção de cor dos extratos de amora Brazo com e sem adição de copigmento nas diferentes condições de estocagem.....	72
Tabela 11: Redução dos valores de absorvância de amora Brazo pela metodologia de CLAE.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2'-azinobis 3-tibenzotiazolina-6 ácido sulfônico
DPPH	2,2-diphenyl-1-picryl-hidrazil
TPTZ	2,4,6-tripiridil-s-triazina
TROLOX	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
BHA	Butil-hidroxi-anisol
BHT	Butil-hidroxi-tolueno
CV	Coefficiente de variação
K	Constante de velocidade de degradação de cor
CUPRAC	Cupric Reducing\ Antioxidant capacity
FRAP	Ferric reducing antioxidant Power
GP	Galato de propila
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IC	Intervalo de Confiança
ORAC	Oxygen radical absorbance capacity assay
%R	Porcentagem de retenção de cor
RMN	Ressonância magnética nuclear
T1/2	Tempo de meia-vida
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances
TBHQ	Tri-hidroxi-butilfenona
UV-vis.	Ultra violeta visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 Objetivo Geral	17
2.2 Objetivos Específicos	17
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	18
3.1 Amora-preta (<i>Rubus ssp</i>).....	18
3.1.2 Composição físico-química.....	20
3.1.3 Compostos bioativos	21
3.2 Compostos fenólicos	23
3.3 Antocianinas.....	24
3.3.1 Extração e caracterização	27
3.3.2 Estabilidade das antocianinas ao pH, temperatura, luz e copigmentação.....	30
3.4 Antioxidantes.....	35
3.4.1 Ácido gálico.....	38
3.4.2 Ácido Cafeico.....	39
3.4.3. Ácido Málico.....	40
3.4.4. <i>Camellia sinensis</i>	41
4 MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1 MATERIAIS	42
4.1.1 Matéria-prima.....	42
4.1.2 Reagentes	42
4.2 MÉTODOS	43
4.2.1 Preparo da amostra.....	43
4.2.2 Composição das amoras	43
1) Acidez, sólidos solúveis totais e pH.....	43
2) Conteúdo de umidade	43
3) Determinação de proteína	44
4) Determinação de Lipídeos.....	44
5) Determinação de fibras totais.....	45
4.2.3 Otimização da Extração das Antocianinas	45
4.2.4 Copigmentação Intermolecular	48

4.2.5 Estudo da Estabilidade	48
4.2.6. Cinética de Estudo	50
4.2.7. Determinação de Antocianinas	51
1) Método pH diferencial	51
2) Método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	52
4.2.8 Medida da Atividade Antioxidante In Vitro	53
1) Metodologia de FRAP	53
2) Metodologia de DPPH.....	53
4.2.9. Compostos fenólicos totais.....	54
4.2.10 Análises estatísticas.....	54
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
5.1 Composição aproximada	55
5.2 Otimização da extração das antocianinas.....	57
5.3 Copigmentação Intermolecular.....	65
5.4 Estudo da estabilidade	68
6 CONCLUSÕES	77
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

1 INTRODUÇÃO

Em meio às várias opções frutíferas com boas perspectivas de comercialização, temos a amora como uma das mais promissoras. A amora é uma fruta pertencente ao grupo dos pequenos frutos vermelhos, que vem sendo aos poucos adaptada às condições climáticas do Brasil.

No Brasil o cultivo das amoras iniciou-se em 1972 no Estado do Rio Grande do Sul e estendeu-se para os estados de Santa Catarina, São Paulo, Paraná e Minas Gerais. No entanto, pouco se conhece sobre o valor nutricional, e parâmetros de qualidade das diferentes variedades de amora.

Existe a necessidade de estudos sobre as propriedades biológicas e a composição química destas frutas devido à sua crescente comercialização e consumo, tanto no mercado brasileiro quanto internacional. As frutas especialmente as vermelhas e azuis escuras vem sendo alvo de estudos por possuírem fitoquímicos que exibem propriedades benéficas à saúde, como os antioxidantes com destaque para os pigmentos antociânicos e flavonóides.

As antocianinas, um dos maiores pigmentos naturais hidrossolúveis presente em frutas, flores e vegetais, ainda apresentam uso restrito como corantes alimentícios devido a problemas relacionados com estabilidade e dificuldades na sua purificação (MAZZA E BROUILLARD, 1987; FALCÃO *et al.*, 2003).

Tendo em vista a necessidade de aproveitamento das amoras como corantes naturais, torna-se importante estudar métodos adequados de extração de compostos antociânicos que permitam efetuar o processo de maneira rápida, com bom rendimento e que evite a degradação dos compostos ativos.

A estabilidade de antocianinas é influenciada por diversos fatores: temperaturas de extração e de armazenamento (KIRCA *et al.*, 2006), exposição à luz (LEE e HONG, 1992), variações de pH e ação de agentes oxidantes (KIRCA, ÖZKAN e CEMEROĞ˘LU, 2006; MACZ-POP *et al.*, 2006; TÜRKER e ERDOĞ˘DU, 2006). Outros fatores também podem influenciar a estabilidade dos extratos como a presença de oxigênio, enzimas, íons metálicos, açúcar e o pH (FOSSSEN, TORGILS *et al.*, 1998).

A cor pode ainda ser estabilizada e realçada por copigmentação, resultante de diversas interações, entre as moléculas de antocianinas por associações com compostos fenólicos, proteínas, açúcares, ácidos nucleicos, ácidos orgânicos e minerais, aminoácidos, alcaloides e outros flavonóides. Todos esses fatores levam a uma proteção efetiva contra o ataque nucleofílico pela água. A copigmentação pode ocorrer intra ou intermolecularmente (MARKAKIS, 1982) ambos os fenômenos são de mesma natureza e competem pelo meio vacuolar das plantas (ELHABIRI, 2001). A reação de copigmentação das antocianinas é estudada *in vitro* utilizando soluções tampão contendo pigmentos e copigmentos, buscando aumentar a estabilidade das antocianinas. Fatores como etanol, luz, pH, temperatura, estruturas do copigmento e antocianina, e a concentração de ambos, entre outros, influenciam significativamente na reação de copigmentação.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a composição aproximada, os compostos fenólicos totais, a atividade antioxidante de amoras Brazo e a estabilidade das suas antocianinas.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar a composição química de amora Brazo compreendendo a umidade, cinzas, lipídeos, proteínas e carboidratos.
- Determinar a acidez, pH e teor de sólidos solúveis totais(°Brix) das amoras.
- Otimizar o processo de extração de antocianinas de amoras usando soluções de etanol acidificadas com ácido clorídrico ou ácido cítrico, verificando como variáveis de entrada o efeito da proporção de sólido:líquido (g/mL), temperatura e tempo.
- Determinar antocianinas, teor de compostos fenólicos totais, assim como atividade antioxidante dos extratos.
- Investigar a ação do ácido caféico, gálico, málico e extrato polifenólico de *Camellia sinensis* como agentes de copigmentação das antocianinas de amora Brazo.
- Avaliar a estabilidade do extrato antociânico quanto aos fatores de temperatura, luz e copigmentação.
- Caracterizar as antocianinas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Amora-preta (*Rubus ssp*)

A expressão “pequenas frutas” é utilizada na literatura internacional para referenciar diversas culturas tais como a da amora-preta, morango, framboesa, groselha, mirtilo entre outras. A procura por estas frutas pelo consumidor é resultante da atratividade atribuída à cor e sabor, bem como aos benefícios para a saúde, devidos principalmente à elevada presença de compostos fenólicos, que apresentam alta atividade antioxidante, mais especificamente as antocianinas, pigmentos responsáveis pela variação de cores do vermelho ao roxo presente em frutas, flores e folhas (MOTA, 2006).

A amoreira-preta ("blackberry") pertence ao gênero *Rubus* que, segundo Ying *et al.* (1990) contém, aproximadamente, 740 espécies, divididas, de acordo com alguns autores, em 12 subgêneros ou, segundo outros, em 15 subgêneros (DAUBENY *et al.*, 1996). É uma espécie arbustiva de porte ereto ou rasteiro, que produz frutos agregados, com cerca de 4 a 7 gramas de coloração negra e sabor ácido a doce-ácido. Apresenta espinhos em suas principais cultivares comerciais, o que exige do operador da colheita muito cuidado com sua integridade física, como a da qualidade do fruto (SHOEMAKER, 1978). O fruto verdadeiro da amoreira é denominado de mini drupa ou drupete, no qual existe uma pequena semente e sua junção forma o que é chamado de fruto agregado, pertencente à família *Rosaceae* (POLING, 1996; KAUME *et al.*, 2012).

Dentre as várias opções de espécies frutíferas com boas perspectivas de cultivo e comercialização, surge a amoreira-preta (*Rubus spp*) como uma das mais promissoras. A amoreira-preta é uma das espécies que têm apresentado sensível crescimento de área cultivada nos últimos anos no Rio Grande do Sul (principal produtor brasileiro) e tem elevado potencial para os demais estados de características climáticas semelhantes. No Rio Grande do Sul, as maiores produções encontram-se nos municípios de Pelotas, Feliz, Farroupilha e Vacaria, sendo este último o maior produtor gaúcho (GIUSTI e WROLSTAD, 2001; WORSLTAD, 2001).

É uma das opções de cultivo para o sistema de produção agroecológica, devido principalmente a sua rusticidade de cultivo, ao alto rendimento (ATTILIO, 2009) e ao valor agregado (ANTUNES, 2002). O cultivo da amoreira-preta começou na segunda metade do século XIX nos Estados Unidos, onde é conhecida como blackberry. No Brasil, as primeiras cultivares foram introduzidas em 1972, no Centro de Pesquisa da Embrapa Clima Temperado, localizada em Pelotas-RS. Esta cultura apresentou boa adaptação e tem alcançado alta produtividade devido às condições climáticas desta região, a qual permite o cultivo de frutas das espécies de clima temperado. Na Figura 1 as amoras da cultivar Brazo cultivada na região de Ponta Grossa, Paraná.

Figura 1: Amoras Brazo.



Fonte: o autor.

O cultivo da amora vem sendo incentivado em função do potencial para a comercialização e industrialização. No entanto, pouco se conhece sobre o valor nutricional, e parâmetros de qualidade das diferentes variedades de amora que foram desenvolvidas/introduzidas no Brasil (HIRSCH *et al.*, 2012). A amoreira-preta, assim como a framboeseira, faz parte de um grande grupo de plantas do gênero *Rubus*, este gênero pertence à família Rosaceae, na qual existem outros gêneros de importância (*Malus*, *Prunus*, *Pyrus*, entre outros) para a fruticultura brasileira (GIUSTI e WROLSTAD, 2001; WORSLTAD, 2001).

O consumo da amora *in natura* não é muito frequente, devido a sua vida pós colheita ser relativamente curta (máx. de 7 dias à temperatura de 5°C) (ANTUNES, 2002; ANTUNES *et al.*, 2003, FERRARI *et al.*, 2012).

Infelizmente, a fragilidade e elevada taxa de respiração pós-colheita de amoras e estrutura frágil contribui significativamente para a sua deterioração nutricional e microbiológica, resultando em limitada vida útil, isso reduz a qualidade e os benefícios para saúde, sendo assim comercializados preferencialmente na forma industrializada (ANTUNES, 2002; ANTUNES *et al.*, 2003).

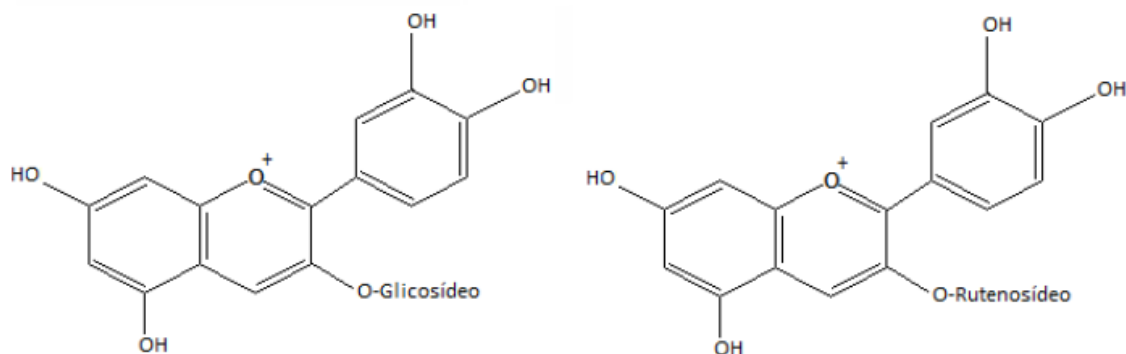
A maioria das amoras frescas é convertida em produtos congelados, secos e enlatados, ou transformados em doces, geléias, sucos e suplementos alimentares (como matéria-prima ou aditivo de cor e sabor) para um armazenamento mais longo, satisfazendo diversos mercados e exigências dos consumidores (ANTUNES, 2002; ANTUNES *et al.*, 2003; RICKMAN *et al.*, 2007; FERRARI *et al.*, 2012; KAUME *et al.*, 2012).

3.1.2 Composição físico-química

A amora-preta “*in natura*” é altamente nutritiva, contendo 85% de água, 10% de carboidratos, elevado conteúdo de fibras, minerais essenciais (cálcio e potássio), de vitaminas do complexo B, vitamina A, vitamina K e vitamina C. Além disso, a fruta é excelente fonte de compostos polifenólicos, como taninos, quercetina, ácido gálico, e principalmente antocianinas e ácido elágico que contribuem para a sua capacidade antioxidante notável (WANG e LIN, 2000; ANTUNES, 2002; ELISIA *et al.*, 2007; HAGER *et al.*, 2008; ACOSTA-MONTOYA *et al.*, 2010; SARIBURUN *et al.*, 2010).

Dentre as antocianinas identificadas em amora-preta, incluem-se a cianidina-3-glicosídeo. Em termos quantitativos, 80% do total das antocianinas são na forma de cianidina-3-glicosídeo (Figura 2) (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995a).

Figura 2: Estrutura química da cianidina-3-O-glicosídeo e da cianidina-3-O-rutenosídeo



Fonte: BRAND-WILLIAMS et al., (1995a)

Ferrari, Ribeiro e Aguirre (2012) realizaram a caracterização físico-química da polpa de amora-preta e seus resultados mostraram que a polpa de amora-preta é constituída principalmente de água e açúcares, tendo uma quantidade muito pequena de lipídios e cinzas, não tendo sido detectada quantidade significativa de proteínas. Porém, a polpa de amora-preta apresentou um alto teor de antocianinas e compostos fenólicos.

3.1.3 Compostos bioativos

Além da mudança dos hábitos alimentares, o consumo de frutas e hortaliças tem aumentado principalmente em decorrência do seu valor nutritivo e efeitos biológicos. Assim, existe a necessidade de estudos sobre as propriedades biológicas e a composição química de frutas tropicais devido à sua crescente comercialização e consumo, tanto no mercado brasileiro quanto internacional, e também à sua constante indicação como uma boa fonte de antioxidantes naturais (KUSKOSKI *et al.*, 2006).

O consumo regular de frutas e hortaliças está associado com o baixo risco de incidência e mortalidade por câncer e doenças cardíacas, devido à presença de compostos oriundos do metabolismo secundário, especialmente flavonóides e antocianinas, os quais apresentam grande capacidade de reagir com radicais livres, e, portanto, contribuem na prevenção de várias doenças.

Estes compostos apresentam ainda, atividade anti-inflamatória, antialérgica, antitrombótica, antimicrobiana e antineoplásica (KUSKOSKI *et al.*, 2005).

Algumas frutas, por possuírem altos teores de compostos fenólicos e expressiva atividade de sequestro de radicais livres, ganham importância não somente pelos benefícios proporcionados à saúde, mas também pelo potencial de utilização em indústrias processadoras de alimentos (NETZEL *et al.*, 2007). Em estudos *in vitro*, extratos de amora-preta apresentaram efeito antioxidante como “scavenger” do radical peroxinitrito, protegendo as células de disfunções e falhas vasculares induzidas por este radical (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995b). Extratos de amora-preta têm apresentado efeito anti-mutagênico (TATE *et al.*, 2006). Em muitos casos o efeito anti-carcinogênico da amora-preta ocorre devido ao efeito anti-inflamatório de seus extratos. Estudos mostram que a capacidade antioxidante do plasma aumenta em 30% após a ingestão de suco contendo amora-preta (NETZEL *et al.*, 2002).

Vários compostos lipofílicos e hidrofílicos são encontrados em *berries*, cujas propriedades biológicas têm sido atribuídas aos altos níveis e ampla diversidade de compostos fenólicos. Porém, acredita-se que o efeito complementar, aditivo e/ou, sinérgico resultante dos diversos componentes seja o responsável pelas propriedades biológicas benéficas ao invés de uma única classe ou compostos químicas. Por este motivo, as *berries* têm sido fonte de extensivos estudos, incluindo a realização de um simpósio internacional dedicado exclusivamente a estas frutas, iniciado em 2005 nos Estados Unidos (FERREIRA *et al.*, 2010).

O consumo regular de frutas e hortaliças está associado com o baixo risco de incidência e mortalidade por câncer e doenças cardíacas, devido à presença de compostos oriundos do metabolismo secundário, especialmente flavonóides e antocianinas. Os quais apresentam grande capacidade de reagir com radicais livres, e, portanto, contribuem na prevenção de várias doenças. Estes compostos apresentam ainda, atividade anti-inflamatória, antialérgica, antitrombótica, antimicrobiana e antineoplásica (KUSKOSKI, *et al.* 2005).

Diversas pesquisas vêm sendo realizadas nos diferentes segmentos visando a descoberta de novas fontes nutricionais. A importância funcional desses compostos na saúde humana tem levado inúmeros pesquisadores a

realizarem estudos buscando determinar as concentrações destes compostos nos alimentos mais consumidos e em especial nas frutas. Estudos epidemiológicos têm demonstrado o efeito protetor de dietas ricas em frutas e vegetais contra doenças cardiovasculares e certos tipos de câncer, em parte aos antioxidantes contidos nestes alimentos (RODRIGUES *et al.*, 2003; LIMA *et al.*, 2006; MELO *et al.*, 2006).

3.2 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos de origem vegetal são metabólitos secundários que frequentemente são sintetizados pelas plantas. Encontram-se amplamente distribuídos nos vegetais exercendo diversas funções sendo essenciais para o seu crescimento e reprodução como: atrativo para polinização, como agentes antioxidantes, proteção das plantas contra os raios UV e de agentes patógenos e, além disso, se formam em condições de estresse como infecções, ferimentos, radiações UV dentre outros (NACZK e SHAHIDI, 2004). Os compostos fenólicos geralmente encontrados em alimentos são os flavonóides, ácidos fenólicos e taninos como mostrados na Tabela 1. São classificados em pelo menos 10 grupos diferentes, dependendo da sua estrutura química e reatividade. Quimicamente, podem ser definidos como substâncias que possuem um anel aromático ligado a um ou mais substituintes hidroxilas, incluindo seus derivados funcionais (SHAHIDI e NACZK, 1995).

Tabela 1: Compostos fenólicos presentes em alguns alimentos.

Fenólico		Alimentos
Flavonóides		
Antocianinas	Cianidina, delphinidina	Uva, maçã, jabuticaba
Flavanas	Catequina, luteoferol	Chá preto e verde
Flavononas	Narigenina, hesperidina	Frutas cítricas
Flavonas	Apergenina, luteonina	Pêra, vinho e chá verde
Flavonóis	Quercetina, mirecetina	Azeitona, alface e maçã
Isoflavonas	Genisteína, daidzeína	Soja e derivados
Ácidos Fenólicos		
Ac. Hidroxicinâmicos	Caféico, ferúlico, clorogênio	Cereja, pêra e laranja
Ac, Hidroxibenzóicos	Elágico, gálico	Framboesa, morango e uva
Taninos		
Condensados	Polímero de catequina e epicatequina	Lentilhas, uva, suco de maçã

Fonte: Adaptado de Amy King (1999).

A maioria dos compostos fenólicos, tais como antocianinas e taninos, estão localizados dentro de células hipodérmicas, nos vacúolos celulares (BROUILLARD, 1983). Entretanto, de acordo com Sellappan *et al.* (2002) e Jacques *et al.* (2009), variações no conteúdo total de compostos fenólicos parecem ser freqüentes entre as diferentes cultivares de amora.

3.3 Antocianinas

Um dos maiores pigmentos naturais hidrossolúveis estudados até hoje, as antocianinas são moléculas capazes de absorver a luz visível, colorir as

flores e frutas em azul, vermelho, cor-de-rosa ou laranja (DANGLES *et al.*, 1992; HARBORNE, 1995). O termo antocianinas (do grego anthos =flores; kianos = azul) foi proposto em 1835 por Marquat, referindo-se a pigmentos azuis, violetas e vermelhos encontrados em flores (MARKAKIS, 1982).

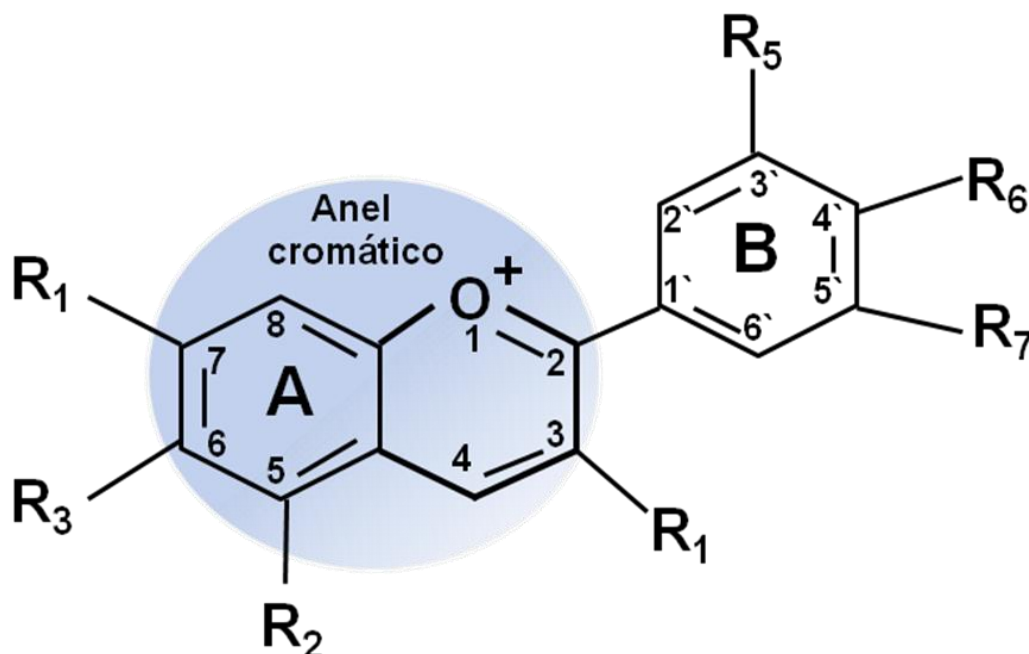
Geralmente estão localizadas nos vacúolos epidérmicos das células vegetais, que são genuínos “bolsos” d’água (BROUILLARD, 1983). A função principal das antocianinas na área da percepção visível, nas plantas parece ser atrair insetos e pássaros para propósitos de polinização (flores) e animais para disseminação das sementes de frutas, sendo por esta razão, de considerável valor, na co-evolução das interações entre plantas e animais (HARBORNE, 1967; BROUILLARD, 1983; STRACK e WRAY, 1989).

As antocianinas ocorrem na natureza como glicosídeos de antocianidinas e também podem ser aciladas com ácidos orgânicos ou alifáticos como, cumárico, caféico, ferúlico, p-hidroxibenzóico, acético, malônico, succínico, oxálico e ácidos málicos, ou ainda uma combinação de alguns desses ácidos, porém são raros os relatos de antocianinas aciladas em frutas (TÜRKER e ERDOĞ˘DU, 2006; GRIS *et al.*, 2007a).

As antocianinas fazem parte do grupo dos flavonóides, compostos fenólicos caracterizados pelo núcleo básico flavílio (cátion 2-fenilbenzopirílio) (Figura 3) que consiste de dois anéis aromáticos unidos por uma unidade de três carbonos e condensados por um oxigênio (FRANCIS, 2000). Na natureza, sempre ocorrem na forma heteroglicosídica, contendo duas ou três porções: uma aglicona (antocianina), um grupo de açúcares e, freqüentemente, um grupo de ácidos orgânicos (FRANCIS, 1989; MALACRIDA E MOTTA, 2006).

Aproximadamente 22 agliconas são conhecidas, das quais 18 ocorrem naturalmente e apenas seis (pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina e malvidina) são importantes em alimentos (FRANCIS, 2000). Sendo que, os glicosídeos de 3 antocianinas não-metiladas, cianidina, delphinidina e pelargonidina, são os mais difundidos na natureza, presentes em 80% das folhas pigmentadas, 69% dos frutos e 50% das flores (KONG *et al.*, 2003).

Figura 3: Estrutura básica do cátion flavílio.



Fonte: Adaptado de CAVALCANTI *et al.* (2011).

Apesar da larga distribuição, as antocianinas ainda apresentam uso restrito como corantes alimentícios devido a problemas relacionados com estabilidade e dificuldades na sua purificação. Muitas pesquisas têm sido efetuadas com o intuito de superar tais dificuldades e muitos avanços foram conseguidos, mostrando que o emprego de antocianinas em diversos sistemas alimentícios é possível (MAZZA e BROUILLARD, 1987a). Kuhnau e Fidanza estudaram o consumo de antocianinas nos Estados Unidos e na Itália, respectivamente, e verificaram que esses pigmentos estão livres de toxicidade (BRIDLE e TIMBERLAKE, 1997).

Os corantes sintéticos são aditivos alimentícios sem valor nutritivo, com o único objetivo de conferir cor, tornando-os mais atrativos e a aplicação destes aditivos químicos tem causado polêmica na indústria alimentícia pelo efeito negativo destes compostos ao organismo humano (PRADO e GODOY, 2003). Estão associados com distúrbios comportamentais e do sono de algumas crianças (ROWE, 1994), efeitos cancerígenos (PRADO e GODOY, 2003).

Na década de 2000 e os primeiros anos da década de 2010 a maioria das indústrias que anteriormente utilizavam compostos antioxidantes sintéticos para evitar a deterioração do valor nutricional de produtos alimentares, já focou a sua atenção para a utilização de antioxidantes obtidos a partir de fontes naturais. Esta mudança é o resultado dos efeitos benéficos atribuídos à propriedade antioxidante de antocianinas para a saúde humana (WU *et al.*, 2002), sendo os alimentos que as contem referidos como alimentos funcionais (PAREDES-LOPEZ *et al.*, 2010).

Os últimos relatórios sobre os vários benefícios potenciais para a saúde (ZHANG *et al.*, 2004), incluem a redução do risco de doença cardíaca coronária (RENAUD e LORGERIL, 1992), melhoria visual (Matsumoto *et al.*, 2003) efeitos anticancerígeno (BOMSER *et al.*, 1996; VATTEM *et al.*, 2005; SEERAM *et al.*, 2006), antimutagênico (TATE *et al.*, 2003) anti-inflamatório (ZHISHEN *et al.*, 1999; WANG e MAZZA, 2002; HU *et al.*, 2003; CHOE *et al.*, 2007; TONG *et al.*, 2008), anti-neurodegenerativos (SEERAM, 2008), propriedades antiobesidade (TSUDA *et al.*, 2002; TSUDA *et al.*, 2003) e proteção contra as inflamações associadas com a menopausa (KAUME, *et al.*, 2012).

3.3.1 Extração e caracterização

A escolha do solvente depende das características químicas quando conhecidas, da substância a ser extraída. Pode-se utilizar mais de um solvente para melhorar a eficiência do processo. O aumento da solubilidade diminui a seletividade do processo e vice-versa (GOMEZ e OSSA, 2002; DÍAZ-REINOSO *et al.*, 2006). As antocianinas são pigmentos solúveis em solventes polares e geralmente são extraídas das plantas com metanol contendo ácido clorídrico ou ácido fórmico. A presença do ácido diminui o pH da solução e previne a degradação de antocianinas não aciladas. Porém, pequenas quantidades de ácido podem causar hidrólise parcial ou total de moléculas acil de antocianinas aciladas que estão presentes em algumas plantas (DA COSTA *et al.*, 2000).

Extração constitui a medida mais importante na recuperação fitoquímica dos antioxidantes de biorresíduos de plantas, uma vez que seu

objetivo é liberar esses compostos a partir das estruturas em que se encontram (GONZÁLEZ-MONTELONGO *et al.*, 2010A; 2010B). Solventes alcoólicos, como metanol e etanol, são os mais utilizados (LEE e HONG, 1992; CHEN *et al.*, 2006; MACZ-POP *et al.*, 2006). Apesar da toxidez, solventes como metanol e acetona são muito utilizados para extração de antocianinas (DIMITRIC´ MARKOVIC´ *et al.*, 2005; GRIS *et al.*, 2007B; NICOUÉ *et al.*, 2007; SUN *et al.*, 2010; JING *et al.*, 2012; FISCHER *et al.*, 2013).

Muitos trabalhos têm empregado solventes extratores alcoólicos acidificados (MACZ-POP *et al.*, 2006) para favorecer a extração, pois auxilia a penetração do solvente nos tecidos das frutas e vegetais, além de aumentar a estabilidade dos extratos por dificultar o aparecimento de fungos que degradam as antocianinas. A extração de antocianinas de frutas com solventes contendo ácidos orgânicos ou minerais é favorável, o cátion flavilium é estável em meio ácido.

A extração dos componentes fenólicos em plantas é influenciada por sua natureza química, o método de extração empregado, tamanho da partícula, tempo e condições de armazenamento, bem como a presença de substâncias interferentes e a solubilidade desses compostos dependem do tipo de solvente utilizado, o grau de polimerização dos fenólicos, bem como a interação dos fenólicos com outros constituintes alimentares e formação de complexos insolúveis (NACZK e SHAHIDI, 2004).

Diante das limitações de uso desses solventes, a extração com etanol ou água é recomendada especialmente quando a extração se faz com fim alimentício. Entretanto, o emprego destes solventes também possui limitações de uso, como uma menor eficiência de extração em comparação aos outros solventes, além de uma menor durabilidade dos seus extratos (NICOUÉ *et al.*, 2007; FISCHER *et al.*, 2013). Na tabela 2 encontram-se exemplos das variedades de solventes extratores e concentrações usadas na extração de antocianinas demonstrando não existir um padrão de extração.

Tabela 2: Lista de solventes utilizados na extração de antocianinas.

Solvente extrator utilizado	Tempo	Temperatura	Proporção em g de amostra/mL de solvente	Referências
Metanol / HCl (0,2%)	-	4 °C	-	FOSSEN <i>et al.</i> (1998)
Metanol / HCl (0,1%)	24 horas	4 ± 1 °C	1:4	GRIS (2007b)
Metanol / HCl (1%)	-	Ambiente	1:3	ROSSO e MARCADANT E (2007)
Ácido cítrico (6%)	6 minutos	60°C	5:1	FALCÃO <i>et al.</i> (2007)
Metanol / HCl 1 N (85:15)	-	-	1:8	HOSSEINIAN <i>et al.</i> (2008)
Metanol / trifluoroacético 0,5%	24 horas	0°C	1:4	SUN <i>et al.</i> (2010)
Etanol 70%/ HCl	48 horas	30°C	-	SILVA <i>et al.</i> (2010)
Metanol/ ácido fórmico (2%)	24 horas	Ambiente	2: 3,75	ZHENG <i>et al.</i> (2011)
Etanol 96%	12 horas	-	1:3,8	ESTUPIÑAN <i>et al.</i> (2011)
Etanol 98%	1 hora	-	1:2	SARIBURUN <i>et al.</i> (2010)
Metanol / HCl (100:0,01)	20 minutos	ambiente = 25±1 °C	1:3	JING <i>et al.</i> (2012)
Etanol	24 horas	-	1:4	RUSTIONI <i>et al.</i> (2012)

Fonte: O autor.

As especiarias são ingredientes aromáticos e pungentes, portanto, o uso direto como antioxidantes é limitado. O procedimento de extração é determinado pelos tipos de compostos antioxidantes a serem extraídos. A seleção do procedimento de extração pode influenciar na concentração de antioxidante do material vegetal. Para compostos fenólicos e outros antioxidantes em materiais vegetais três técnicas de extração podem ser usadas, a extração com uso de solventes, a em fase sólida e a com uso de solventes a baixa pressão (extração supercrítica). É aconselhável para otimizar a extração, o uso de amostras secas, congeladas, ou liofilizadas, uma vez que alguns antioxidantes são instáveis e podem ser degradados pela ação da enzima em materiais de origem vegetal não desidratados (SUHAJ, 2006).

Muitas espécies de alfavaca, tomilho e orégano têm sido amplamente utilizadas na medicina popular como agentes anti-inflamatórios, antioxidantes e antissépticas (JAAFARI *et al.*, 2007).

Uma revisão na literatura indica que atualmente a técnica mais usada para a separação de antocianinas é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Março *et al.* (2008) e Costa *et al.* (2000) fizeram extensa compilação de diversos métodos analíticos que citam o uso dessa técnica. Atualmente, nota-se grande número de trabalhos de quantificação de antocianinas por métodos utilizando CLAE (PRODANOV *et al.*, 2005).

Nos últimos anos, a pesquisa sobre a estrutura química da antocianina aumentou (CABRITA *et al.*, 2000; FOSSEN e ANDERSEN, 2003; BYAMUKAMA *et al.*, 2005; MATEUS *et al.*, 2006; TIAN *et al.*, 2006; BJOROY *et al.*, 2007), no entanto, é importante estudar em profundidade as relações entre a composição química e as cores, o que pode ajudar a compreender os princípios básicos que influenciam a cor das antocianinas.

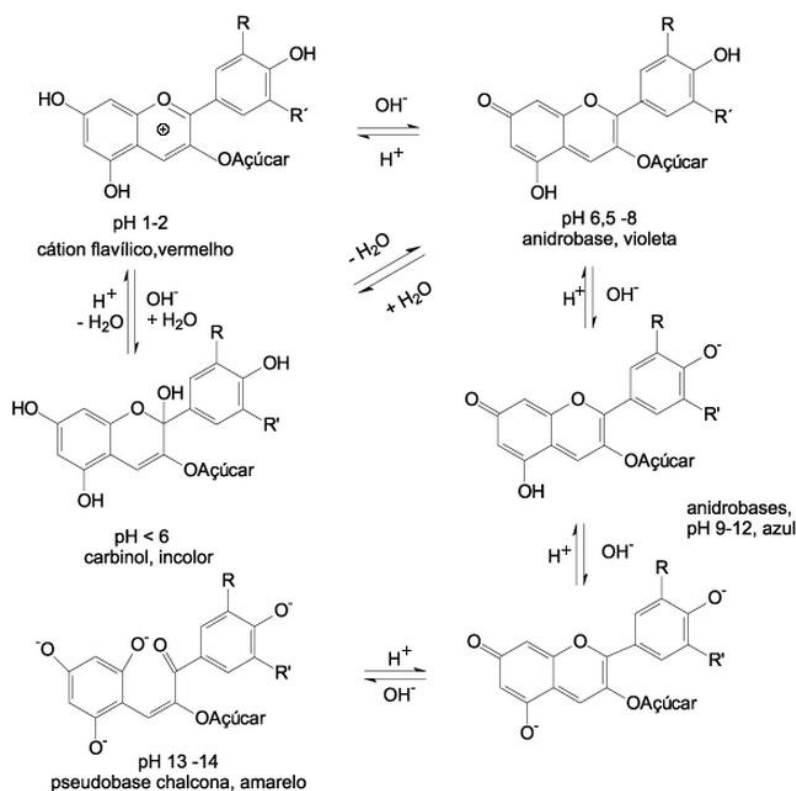
3.3.2 Estabilidade das antocianinas ao pH, temperatura, luz e copigmentação

A estabilidade de antocianinas é influenciada por diversos fatores: temperaturas de extração e de armazenamento (KIRCA *et al.*, 2006), exposição à luz (LEE e HONG, 1992), variações de pH e ação de agentes oxidantes ((KIRCA *et al.*, 2006; MACZ-POP *et al.*; TÜRKER e ERDOĞ˘DU, 2006), a presença de oxigênio, enzimas, íons metálicos, açúcar e o pH (FOSSEN *et al.*, 1998).

A presença de um grupo glicosídico na posição C-3 do cátion flavilium conforme Figura 3 proporciona maior estabilidade à cor quando comparado a antocianidina hidroxilada nesta mesma posição. Esta última submete-se rapidamente a um rearranjo em seu equilíbrio quando em soluções aquosas conduzindo rapidamente para a forma carbinol incolor (BRIDLE e TIMBERLAKE, 1997).

A um determinado pH as antocianinas-3-glucósido são mais coradas que as antocianinas-3,5-diglucósido. Da mesma forma as antocianinas podem ser coradas ou não consoante o pH do meio, a sua concentração e a presença ou não de co-pigmentação (MAZZA e BROUILLARD, 1987a). A molécula de antocianina é esterificada em uma ou mais posições por açúcares (mono ou dissacarídeos) acilados ou não, conferindo estabilidade e solubilidade à glicona, ou antocianidina. As antocianinas são solúveis em água e a acidez influi na cor, por causar mudanças na estrutura química como pode ser observado na Figura 4.

Figura 4: Possíveis mudanças estruturais das antocianidinas em meio aquoso em função do pH.



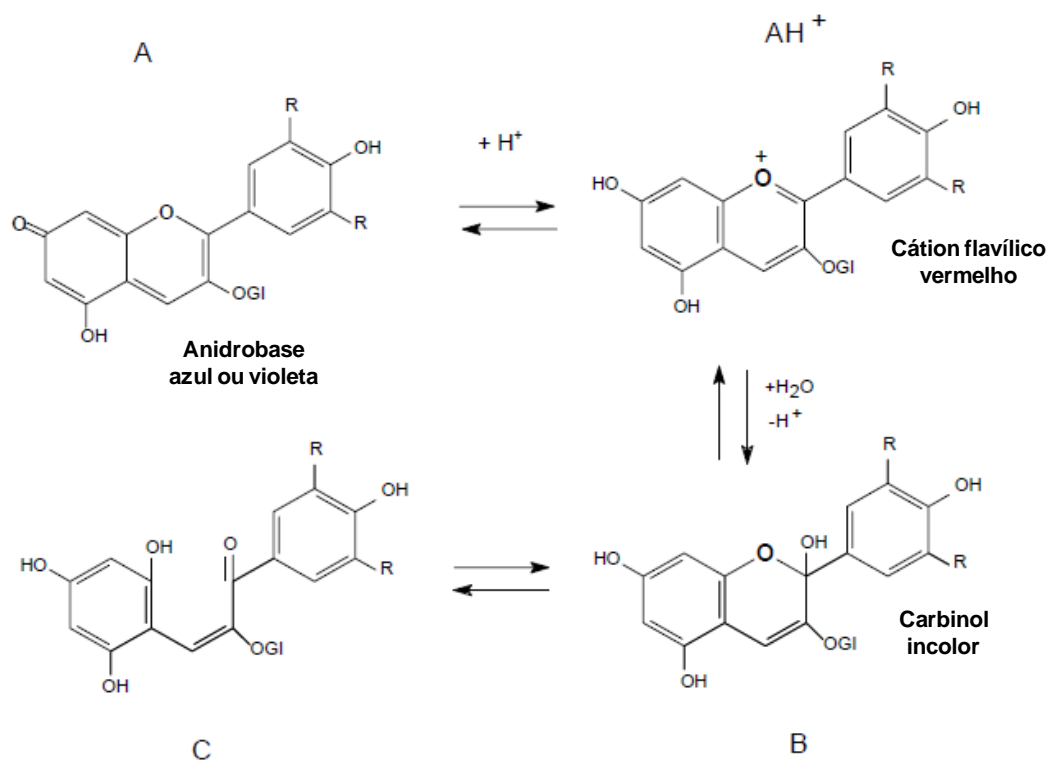
Fonte: Terzi e Rossi (2002).

A propriedade das antocianinas apresentarem cores diferentes, dependendo do pH do meio em que elas se encontram, faz com que esses pigmentos possam ser utilizados como indicadores naturais de pH. As mudanças estruturais que ocorrem com a variação do pH são responsáveis pelo aparecimento das espécies com colorações diferentes. A cor, incluindo

amarela em meio fortemente alcalino, são explicadas pelo esquema das principais transformações ilustradas na Figura 5 (TERCI e ROSSI, 2002).

Com o aumento do pH ocorre uma competição cinética e termodinâmica entre a reação de hidratação do cátion flavilium, e a reação de transferência de prótons associada aos grupos acidificados das hidroxilas da aglicona. Enquanto a primeira reação produz a pseudobase incolor (carbinol) que pode converter-se em chalcona, a segunda reação produz as bases quinoidais (BROUILLARD, 1981; FOSSEN, *et al.*, 1998). A Figura 5 apresenta um esquema simplificado das transformações estruturais das antocianinas em meio aquoso ácido.

Figura 5: Transformações estruturais das antocianinas em meio aquoso ácido.



Fonte: Francis (1992).

Fossen, *et al.* (1998), verificaram que o efeito do pH está intimamente relacionado com a estrutura das antocianinas, como o caso da petunidina – antocianina acilada extraída de batatas roxas, a qual foi avaliada em uma faixa de pH de 1-9 e apresentou maior estabilidade em pH 8,1. E salientaram que a

principal desvantagem das antocianinas frente aos corantes sintéticos, deve-se à mudança de coloração decorrente de reações químicas dos produtos alimentícios, pois as antocianinas possuem grupos cromóforos que são bastante sensíveis às alterações de pH do meio. Durante a preparação dos alimentos, o conteúdo de antocianinas pode decrescer em até 50%, seja durante a lavagem com água, devido à sua solubilidade, seja pela remoção de porções dos alimentos que sejam ricas em flavonóides.

Cabrita *et al.* (2000) avaliaram a estabilidade de seis antocianidinas 3-monoglicosídeos frente as temperaturas de 10 e 23 °C em diferentes valores de pH, durante 60 dias de estocagem e em pH 3,2 e presença de ar. As antocianinas estudadas apresentaram acima de 80% da cor inicial quando mantidas a 10 °C e 35% (em média) da cor inicial quando estocadas a 23 °C. Fossen, T., Cabrita, L. e Andersen, O. M. (1998) verificaram que a antocianina acilada petanina, extraída de batatas roxas (*Solanum tuberosum* var. "Congo"), apresentou sua coloração mais intensa em pH 8,1, sendo relativamente estável sob temperatura de refrigeração, o que estende seu uso para produtos levemente alcalinos como produtos de panificação, ovos, etc.

Calvo e Salvador (2000) estudaram aplicação de diferentes corantes naturais (clorofila, carmim de cochonilha, curcumina e urucum) em gelatina e misturas de géis (gomos xantana e locusta) buscando avaliar a influência da concentração de açúcar e a estabilidade dos corantes naturais em comparação a géis comerciais coloridos artificialmente. Após 36 dias sob temperatura de 22°C concluíram que os corantes naturais, carmim de cochonilha e curcumina podem substituir os corantes artificiais comumente utilizados em geléias. O mecanismo de degradação fotoquímica das antocianinas não é completamente compreendido e o conhecimento da estabilidade das antocianinas à luz é limitado (CARLSEN e STAPELFELDT, 1997).

Dyrby *et al.* (2001) compararam a estabilidade das antocianinas do extrato bruto de repolho roxo com antocianinas de outras fontes em solução tampão e em solução modelo de bebida não carbonatada sob diferentes temperaturas. A partir deste estudo concluíram que o extrato bruto de repolho roxo apresenta excelentes propriedades para aplicação como corante em alimentos, uma vez que apresenta baixa sensibilidade a fotodegradação entre

pH 3,0-7,0 e estabilidade frente ao tratamento à quente. Os pesquisadores sugeriram que a estabilidade do extrato antociânico de repolho roxo deve-se à sua composição majoritariamente formada por antocianinas naturalmente copigmentadas (di-aciladas).

A cor pode ainda ser estabilizada e realçada por copigmentação, resultante de diversas interações. A copigmentação pode ser influenciada pelo pH do meio e pela quantidade de antocianinas (GONNET, 1999). A copigmentação intramolecular é possivelmente responsável pela estabilidade dos cromóforos de antocianinas poliaciladas (Brouillard *et al.*, 1981). Os resíduos aromáticos de grupos acil se alinham com o anel pirilium do cátion flavilium dificultando a adição da água nas posições de carbonos 2 e 4 do anel (Brouillard *et al.*, 1981).

Os mecanismos mais importantes de copigmentação são as interações intermoleculares (entre antocianinas e/ou entre antocianinas e outros flavonóides) e as interações intramoleculares entre antocianinas. Fenômenos de copigmentação geram deslocamento batocrômico, tornando as soluções de antocianinas com coloração tendendo ao azul ou em um efeito hiperacrômico, em que a intensidade da cor da solução das antocianinas é aumentada pela copigmentação (ASEN *et al.*, 1972a). Nesta interação predominam, provavelmente, forças de Van der Waals e efeitos hidrofóbicos em meio aquoso, resultados do empilhamento p-p entre a molécula de antocianina e copigmento. As formas coloridas das antocianinas (A e AH⁺, Figura 5) ao contrário das formas incolores (B e C, Figura 5), são cromóforos planos com forte deslocamento de elétrons, o que permite um bom contato molecular com o copigmento. Então, o copigmento passa a competir com a água, devido à sua interação com o cromóforo flavilium e com isso, desloca o equilíbrio entre as formas coloridas e incolores interagindo com as formas coloridas e reconstituindo parcialmente a cor. Isso modifica a natureza do copigmento. A copigmentação (assim como a complexação metálica) é, portanto, um processo seletivo das formas coloridas. Um efeito hiperacrômico não é devido ao aumento no coeficiente de absorção, mas a um aumento da concentração de moléculas coloridas e, um efeito batocrômico, pode ser explicado por uma redução local

na polaridade do cromóforo flavilium do tipo hidrofóbico com o copigmento (BROUILLARD, 1983).

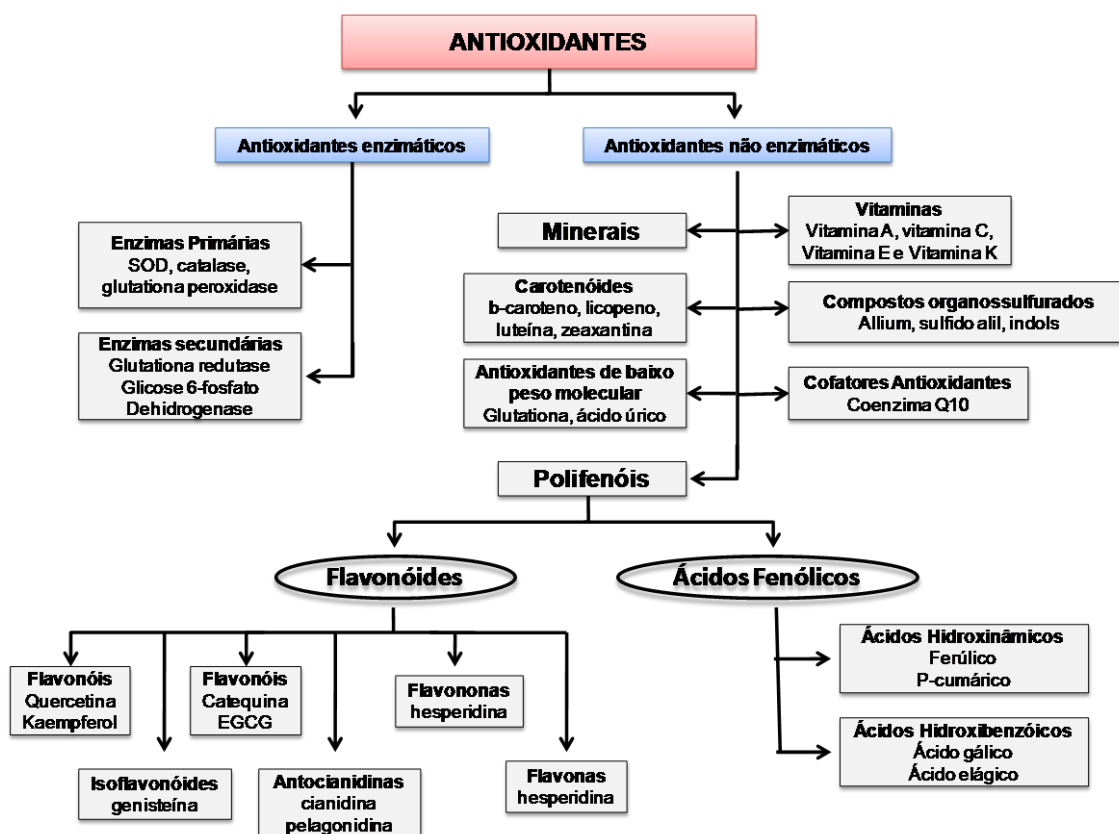
Também podem ocorrer por associações com outros compostos fenólicos, proteínas, açúcares, ácidos nucleicos, ácidos orgânicos e minerais, aminoácidos, alcaloides e outros flavonóides. Todos esses fatores levam a uma proteção efetiva contra o ataque nucleofílico pela água, principalmente nas posições 2 e 4, sendo confirmada por espectros de RMN-H (GRIS *et al.*, 2007a). A complexação é dependente da concentração do copigmento e da concentração da antocianina e, à medida que se aumenta a relação copigmento/antocianina, aumenta a absorvância da amostra e o deslocamento batocrômico no comprimento de onda de máxima absorção. A copigmentação intermolecular pode resultar em um sensível aumento na estabilidade das antocianinas (ASEN *et al.*, 1972a).

3.4 Antioxidantes

Segundo Bianchi e Antunes (1999), os antioxidantes podem ser definidos genericamente como “qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada a do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz”.

Os antioxidantes podem ser divididos em duas classes: os que apresentam atividade enzimática e os que não apresentam atividade enzimática. Na primeira, estão incluídos os compostos capazes de bloquear a iniciação da oxidação, ou seja, as enzimas que removem as espécies reativas ao oxigênio, moléculas de baixo peso molecular e cofatores enzimáticos. Na segunda classe, estão incluídas moléculas que interagem com as espécies radicalares, as quais são consumidas durante a reação; incluindo os antioxidantes naturais e sintéticos, muitos são obtidos de fontes dietéticas e estes podem ser classificados em várias classes, na qual temos os polifenóis, um grande grupo em que consiste de ácidos fenólicos e flavonoides (Figura 6) (MOREIRA e MANCINI-FILHO, 2004; RATNAM *et al.*, 2006).

Figura 6: Classificação dos antioxidantes



Fonte: adaptado de Ratnam *et al.* (2006).

Os antioxidantes sintéticos utilizados pelas indústrias de alimentos são: o butil-hidróxi-tolueno (BHT), o butil-hidróxi-anisol (BHA), terc-butil-hidroquinona (TBHQ), tri-hidroxi-butil-fenona (THBP) e galato de proprila (GP) (JARDINI e MANCINI FILHO, 2007; SOUSA *et al.*, 2007). Estudos têm relatado que os antioxidantes de origem natural são mais eficazes que os sintéticos e as propriedades antioxidantes naturais encontradas em algumas frutas, ervas e condimentos estão relacionadas com a presença de compostos fenólicos (LEJA *et al.*, 2007). A atividade antioxidante está relacionada à sua capacidade de liberação de hidrogênio que reage e elimina a ação negativa do oxigênio singlet. Em relação à saúde humana, os compostos fenólicos presentes nas plantas, dentre eles, as antocianinas, flavan-3-óis, procianidinas, flavonóis e ácidos fenólicos, são os responsáveis, juntamente com os carotenóides e a vitamina C, pela diminuição do risco de várias doenças associadas com o estresse oxidativo (ZARDO *et al.*, 2009).

As antocianinas apresentam uma estrutura adequada para atuar como antioxidantes, pois são capazes de doar hidrogênios (MILLER e RICE-EVANS, 1997) ou elétrons (RAMIREZ- TORTOSA, 2001) a radicais livres. Substituições de grupo metoxilas diminuem a atividade antioxidante das antocianinas. Para as cianidinas, um aumento do número de unidades glicosídicas na posição 3 resulta numa redução da atividade antioxidante (SEERAM e NAIR, 2002). Sua melhor atividade antioxidante ocorre na presença de grupos hidroxilas na posição 3` e 4` do anel B, conferindo uma estabilidade ao radical formado (SANCHEZ-MORENO, 2002). Os grupos hidroxilas livres nas posições 3 do anel C e na posição 5 do anel A são doadores de elétrons conforme Figura 3 (RICE-EVANS *et al.*, 1996). Wang *et al.* (1997) relatou que Cianidina-3-glucósido tem a capacidade antioxidante mais elevada de 14 antocianinas diferentes testadas, em estudos *in vitro* e *in vivo* se demonstrou como um potente antioxidante (HEINONEN *et al.*, 1998; SEERAM *et al.*, 2001; SERRAINO *et al.*, 2003).

É importante conhecer a capacidade antioxidante dos alimentos antes de se avaliar seus efeitos biológicos. Para isto têm sido desenvolvidas várias metodologias para estimar a capacidade antioxidante não enzimática dos alimentos de origem vegetal e seus derivados, e assim, dispor de uma ferramenta para poder recomendar o consumo de alimentos que mostrem uma alta capacidade antioxidante (ARAYA L *et al.*, 2006).

Evidências epidemiológicas crescentes do papel de alimentos antioxidantes na prevenção de certas doenças têm conduzido ao desenvolvimento de grande número de métodos para determinar a capacidade antioxidante (Pérez-Jiménez e Saura-Calixto, 2006). Estes métodos podem ser baseados na captura do radical peroxila ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay), TRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), poder de redução do metal FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), CUPRAC (Cupric Reducing/Antioxidant Capacity), captura do radical hidroxila (método de desoxirribose), captura do radical orgânico ABTS (2,2'-azinobis (3-tilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico), DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl- hidrazil), quantificação de produtos formados durante a peroxidação de lipídios TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances), oxidação do LDL, co-oxidação do β -

caroteno) (Aruoma, 2003). Dentre estes métodos, ABTS, FRAP, DPPH e ORAC são alguns dos mais usados atualmente (PÉREZ-JIMÉNEZ e SAURACALIXTO, 2006).

O número de contribuições para os métodos de isolamento, técnicas, e testes de atividade antioxidante de origem vegetal tem aumentado significativamente nos últimos anos, tendo em vista que a oxidação é uma das principais causas de deterioração química, resultando na deterioração da qualidade nutricional, cor, textura, sabor e segurança dos alimentos (Rosa *et al.*, 2010).

Ácidos hidroxibenzoicos são caracterizados por sua estrutura C6-C1, que são uma classe de ácidos fenólicos mais representativos encontrados em uvas e vinhos. Por causa de seus papéis significativos no reforço e estabilização de cor vinho tinto, grandes interesses estão sendo focados em suas habilidades como co-fatores (MALAJ *et al.*, 2013). Estudos têm sido feitos das reações de copigmentação de ácidos fenólicos com malvidina 3,0-glicosídeo, malvidina 3,5-glicosídeo, cianidina 3-glicosídeo, cianidina 3,5-glicosídeo e pelargonidina 3-glicosídeo (BROUILLARD *et al.*, 1989; MAZZA e BROUILLARD, 1990; DAVIES e MAZZA, 1993; DIMITRIC *et al.*, 2005; SUN *et al.*, 2010; MALAJ *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2015).

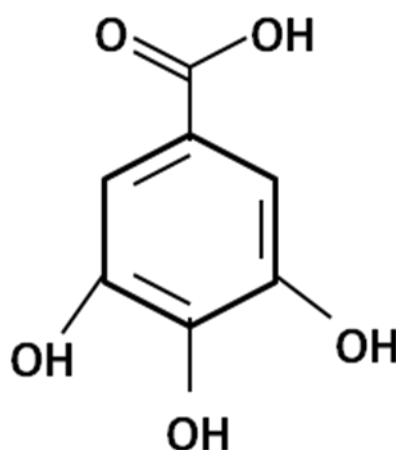
3.4.1 Ácido gálico

O ácido gálico, Figura 7(ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico - AG) é um fitoquímico bioativo que ocorre frequentemente em uma vasta gama de plantas terrestres e pode ser obtido a partir de hidrólise ácida ou alcalina de taninos. Seus ésteres n-alquílicos, também conhecidos como galatos, em especial o galato de propila, octila e dodecila, são utilizados como aditivos antioxidantes em alimentos, para prevenir mudanças no sabor e no valor nutritivo devido à oxidação de gorduras insaturadas (VAN *et al.*, 1986; ARUOMA *et al.*, 1993; KUBO *et al.*, 2002).

A ação anti-hiperlipidêmica de ácido gálico em ratos induzidos a uma dieta de alta gordura revelou uma diminuição dos triglicerídios e lipoproteínas de colesterol de baixa densidade e um aumento da lipoproteína de colesterol

de alta densidade. Além disso, a ação cardioprotetora na isoprenalina cardiotoxicidade em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina revelou um efeito protetor do ácido gálico que respeita vários parâmetros bioquímicos e histopatológicos. Os efeitos antihiperlipidemia, antilipídica peroxidativa e antioxidante poderia ser o provável mecanismo de ação responsável pela atividade cardioprotetora do ácido gálico. Em um estudo de toxicidade sub-aguda, verificaram segurança do ácido gálico, indicando ausência de toxicidade (ZANWAR *et al.*, 2014).

Figura 7: Estrutura molecular do ácido gálico.



Fonte: O autor.

3.4.2 Ácido Cafeico

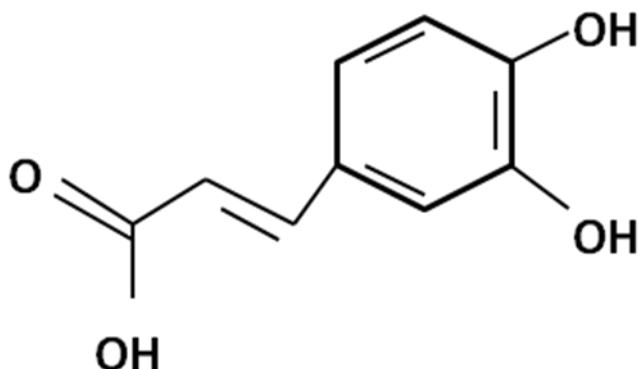
Ácido 3,4-di-hidroxicinnâmico (Figura 8) é um composto fenólico generalizado a partir do grupo de hidroxicinnamates que é derivado biossinteticamente de fenilalanina em plantas. Ocorre naturalmente em muitos produtos agrícolas, como frutas, legumes, vinho, azeite e café (Clifford, 1999).

O ácido caféico e seus ésteres têm atraído considerável atenção devido a suas várias atividades biológicas e farmacológicas, como anti-inflamatória, anti-carcinogênica, antiviral e atividades antioxidantes (NARDINI *et al.*, 1995; WU *et al.*, 2007; MARINOVA *et al.*, 2009; TOUAIBIA *et al.*, 2011; MEDINA *et al.*, 2012).

Dimitric-Markovic *et al.* (2000) avaliaram a reação de copigmentação intermolecular in vitro de malvidina 3,5 di glicosídeo com ácido caféico usando

espectrofotometria UV-Vis e verificaram que o ácido orgânico possui a capacidade de participar de reações de copigmentação com antocianinas e que este processo é dependente do pH do meio, da temperatura e da concentração de copigmento.

Figura 8: Estrutura molecular do ácido caféico.

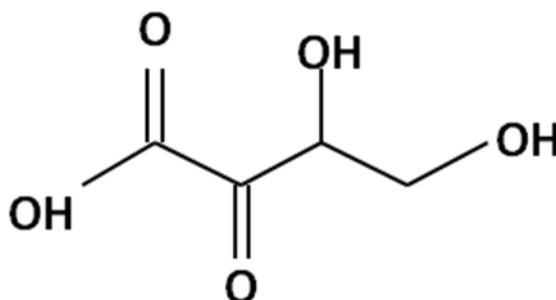


Fonte: O autor.

3.4.3. Ácido Málico

De fórmula geral $\text{COOH-CHOH-CH}_2\text{-COOH}$ conforme a Figura 9, o ácido málico é o mais encontrado no reino vegetal, encontra-se nas folhas e nos frutos. Trata-se de um ácido frágil, facilmente metabolizado, isto é, degradado pelas células. Os sais deste ácido são todos solúveis no mosto e no vinho. Apresenta-se em grande quantidade na uva verde. Durante a maturação da uva diminui pouco a pouco. Nas uvas maduras, as quantidades variam conforme o ano e as variedades, e em função do estado de maturação OREGLIA (1978).

Figura 9: Estrutura molecular do ácido málico.



Fonte: o autor.

3.4.4. *Camellia sinensis*

A composição das folhas do chá depende de uma variedade de fatores, incluindo clima, estação, processo utilizado na horticultura, além do tipo e idade da planta. O chá verde contém componentes polifenólicos, que incluem flavanóis, flavandióis, flavonóides e ácidos fenólicos, que totalizam cerca de 30% do peso seco das folhas. A maioria dos polifenóis do chá verde se apresentam como flavanóis, e dentre estes, predominam as catequinas (Mukhtar e Ahmad, 2000). As duas principais catequinas do chá verde são: (-)-epigalocatequina (EGC) e 3-galato de epigalocatequina (GEGC) (HASLER, 2002).

Os chás são ricos em compostos biologicamente ativos que, ao serem adicionados à dieta, desencadeiam processos metabólicos ou fisiológicos; são eles: os flavonóides, as catequinas, os polifenóis e os alcalóides que contribuem para a prevenção e o tratamento de várias doenças. O chá verde tem sido muito utilizado devido à presença desses compostos; sua folha contém cerca de 30% de compostos fenólicos, que contribuem para o sabor, o aroma e a coloração dos vegetais em geral. Os principais componentes químicos da planta *Camellia sinensis* são as catequinas, as teaflavinas e os flavonoides. São potentes antioxidantes, seqüestradores de radicais livres, quelantes de metais (o que reduziria sua absorção) e inibidores de lipoperoxidação (SCHIMITZ, 2005).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Matéria-prima

Foi utilizada a amora-preta Brazo colhida na cidade de Ponta Grossa, PR, safra de 2013. As frutas foram selecionadas por meio de avaliação visual, com mesmo grau de maturação, sem presença de injúrias e infecções aparentes. Após, foram lavadas em água corrente, secas ao ar à temperatura ambiente e mantidas a - 18 °C até a sua utilização.

4.1.2 Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. As soluções foram preparadas com água ultra pura e as soluções de ácido e base foram padronizadas.

Hexano (Vetec) foi utilizado para extração de lipídeos, ácido sulfúrico (Vetec) para digestão das amostras de proteínas e para determinação do conteúdo de proteínas os reagentes, ácido bórico (Vetec), indicador misto, solução vermelho de metila 0,1% e bromocresol 0,1%.

Etanol 99,5%, ácido cítrico e ácido clorídrico foram utilizados na extração de antocianinas e os reagentes ácido fórmico e acetonitrila de grau espectroscópico para análise de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) das antocianinas.

Reagente de Folin Ciocalteu (Sigma Aldrich), carbonato de sódio (Merck) e ácido gálico monohidratado (Sigma Aldrich) foram utilizados para determinação de compostos fenólicos. A atividade antioxidante foi determinada pelo método de Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) com os reagentes 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) (Sigma Aldrich), cloreto de ferro(III) hexahidratado (Synth) e sulfato de ferro(II) heptahidratado (Vetec). Para o método de DPPH (2,2-difenil-1-picryl-hydrazyl) (Sigma Aldrich).

Ácido gálico, ácido cafeico e ácido málico de grau analítico e *Camellia sinensis* foram utilizados para avaliar o efeito de copigmentação das antocianinas.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Preparo da amostra

Foram retiradas as amoras (-18°C) para descongelamento em geladeira (5°C) conforme a necessidade para realização das análises em diferentes tempos. Foram trituradas em liquidificador e a polpa homogênea foi utilizada como matéria-prima.

4.2.2 Composição das amoras

Todas as análises de composição centesimal foram realizadas em triplicata, calculados a média \pm desvio padrão e os resultados expressos em base úmida.

1) Acidez, sólidos solúveis totais e pH

A acidez total titulável das amoras foi determinada de acordo com os métodos do Ial (2005) por titulometria com solução 0,1 mol L⁻¹ de NaOH sendo calculada para ser expressa em massa de ácido málico por 100 g de amora (g.100 g⁻¹). Os valores do pH em pHmetro TEC-3MP (Tecnal, Piracicaba, Brasil) e o teor de sólidos solúveis expresso como °Brix, em refratômetro de bancada 2AWJ (Biobrix, Ribeirão Preto, Brasil).

2) Conteúdo de umidade

O conteúdo de umidade da amora-preta foi determinada de acordo com a metodologia descrita pela AOAC (2000).

3) Determinação de proteína

O conteúdo de proteínas foi determinado segundo o método de Kjeldhal conforme descrito pela AOAC (2000). Em tubos de digestão foram adicionados 0,5 g de amora seca em estufa. As amostras foram digeridas (Marconi BTC-9090) com ácido sulfúrico e mistura catalisadora contendo sulfato de cobre e sulfato de potássio. No processo, o nitrogênio das proteínas foi reduzido e transformado em sulfato de amônio e todo o carbono e hidrogênio foram oxidados a gás carbônico e água. Foi destilada a amostra digerida em meio básico por adição de hidróxido de sódio 12,5 mol L⁻¹ para liberação da amônia. A amônia foi recolhida em solução de ácido bórico 0,3235 mol L⁻¹. O teor de nitrogênio foi determinado a partir da Equação 1.

$$\%N = \frac{V_{HCl} \times C_{HCl} \times FC_{HCl} \times 1,4008}{P} \quad (1)$$

Onde:

V_{HCl} = volume em mL necessário para titulação

C_{HCl} = concentração do ácido clorídrico expresso em mol L⁻¹

FC_{HCl} = fator de correção do ácido clorídrico (razão da N_{real} pela $N_{teórica}$).

P = peso da amostra

O teor de nitrogênio foi convertido em conteúdo de proteínas. O fator de conversão de 5,95 foi multiplicado pelo teor de nitrogênio, segundo a Equação 2. O resultado foi expresso em g 100 g⁻¹ de amora preta (%).

$$\% \text{ proteína} = \%N \times \text{fator de conversão (5,95)} \quad (2)$$

4) Determinação de Lipídeos

De acordo com AOAC (2000), 2 gramas de amostra em papel de filtro, previamente seca em estufa a 105°C, foram colocadas no aparelho extrator tipo Soxhlet, extraídos com hexano num processo contínuo por 10 horas. O solvente foi recuperado e após o peso constante o teor de extrato etéreo ou

gordura bruta foi determinado a partir da Equação 3. O resultado foi expresso em g 100 g⁻¹ de amora (%).

$$100 \times N/P \quad (3)$$

Onde, N= n^o de gramas de lipídios

P= n^o de gramas de amostra

5) Determinação de fibras totais

O conteúdo de fibras totais foi determinado segundo método descrito pela Aoac (2000). Em amostra de 1 grama de amora previamente secas colocadas em balão de fundo chato, foi adicionado 50 mL de uma solução H₂SO₄ 1,5 mol L⁻¹ e deixado em ebulição durante 30 minutos. Após resfriamento durante 5 minutos foram adicionados 25 mL de uma solução NaOH 1,5 mol L⁻¹, retornando ao aquecimento durante 30 minutos. Em seguida, a amostra foi lavada 3 vezes com 5 mL de álcool etílico. Por fim, o cadinho foi colocado em estufa a 105°C durante 12 horas, resfriado e pesado.

4.2.3 Otimização da Extração das Antocianinas

As condições de extração foram baseadas na proposta por Francis (1989); Francis (1992) com modificações. As amoras inteiras foram submetidas a um branqueamento de 90 °C/2 min e resfriamento com água gelada. Após foram maceradas e submetidas a extração.

A fim de otimizar as condições de extração de antocianinas da amora, foi utilizado um planejamento 3³ (tabela 3).

Tabela 3: Delineamento 3³ aplicado para extração de antocianinas de amora Brazo.

Corridas	Fatores		
	Quantidade de solvente/ grama (mL)	Temperatura (°C)	Tempo (min.)
1	-1	-1	-1
2	0	-1	-1
3	+1	-1	-1
4	-1	-1	0
5	0	-1	0
6	+1	-1	0
7	-1	-1	+1
8	0	-1	+1
9	+1	-1	+1
10	-1	0	-1
11	0	0	-1
12	+1	0	-1
13	-1	0	0
14(C)	0	0	0
15	+1	0	0
16	-1	0	+1
17	0	0	+1
18	+1	0	+1
19	-1	+1	-1
20	0	+1	-1
21	+1	+1	-1
22	-1	+1	0
23	0	+1	0
24	+1	+1	0
25	-1	+1	+1
26	0	+1	+1
27	+1	+1	+1
28(C)	0	0	0
29(C)	0	0	0
Valores Reais			
-1	05	20	20
0	10	40	40
+1	15	60	60

Os fatores estudados (variáveis independentes) para extração de antocianinas foram efeito da temperatura de extração (°C, X_2), tempo de extração (minutos, X_3) e da proporção de sólido:líquido (g de amostra mL⁻¹ de solvente, X_1), sendo que o mesmo planejamento foi feito utilizando como

solvente etanol: ácido clorídrico concentrado 12,23 mol L⁻¹ (99:1(v,v)) e depois etanol: ácido cítrico 2 mol L⁻¹ (99:1(v,v)), para avaliação dos mesmos efeitos, em três níveis de variação. Foram maceradas 250 gramas de amostra. Em cada experimento, foram utilizados 2 gramas de amora e volume de solvente pré estabelecido pelo planejamento experimental em tubos da centrífuga hermeticamente fechados. O recipiente foi envolto em papel alumínio, com agitação a 600 rpm usando uma incubadora com agitação, equipado com um controlador de tempo e temperatura digital. As amostras foram centrifugadas a 3400 g durante 10 min. O resíduo foi re-extraído por 3 vezes com 5 mL do mesmo solvente utilizado para extração e centrifugado. A combinação de sobrenadante foi filtrado a vácuo através de uma membrana millipore 0,45 µm.

As vinte e sete corridas foram conduzidas para analisar o padrão de resposta e estabelecer modelos para a extração de antocianinas. A Equação geral de segunda ordem do modelo polinomial utilizada na análise de superfície de resposta é mostrada na Equação 4.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} X_i X_j \quad (4)$$

Onde Y é a resposta prevista, β_0 é constante, β_i , β_{ii} e β_{ij} são os coeficientes de regressão linear, quadrático e de interação, respectivamente. X_i e X_j são as variáveis independentes (BRUNS et al., 2006).

A significância estatística dos termos nas equações de regressão foi examinada por meio da ANOVA para cada resposta. Os termos com resultados estatisticamente não significativos foram excluídos do modelo inicial e os dados experimentais foram testados novamente apenas para os parâmetros significativos ($p < 0,05$).

As condições otimizadas das variáveis dependentes foram ainda aplicadas para validar o modelo, utilizando procedimento experimental similar ao anterior, a fim de verificar na prática o poder de previsão dos modelos e comparar os dados previstos teóricos aos dados experimentais. Triplicatas da proporção otimizada foram preparadas e analisadas.

4.2.4 Copigmentação Intermolecular

A reação de copigmentação intermolecular foi conduzida de acordo com as metodologias de Eiro e Heinonen (2002) e Yawadio e Morita (2007) com algumas modificações, utilizando o ácido gálico, ácido caféico, ácido málico e extrato polifenólico de *Camellia sinensis* como copigmentos. O extrato de antocianina de amoras Brazo foi dissolvido em solução tampão citrato Dyrby, Westergard e Stapelfeldt (2001) (ácido cítrico - citrato de sódio 0,1 mol L⁻¹, Merck), pH 3,0 e em seguida adicionado cada copigmento nas concentrações de 0, 0,7, 1,4, 2,1, 2,8, 3,5 mg mL⁻¹ (quando necessário o pH foi corrigido para 3,0 com NaOH 1 N ou HCl 1N, conforme Huang e Von Elbe (1987). A solução modelo de antocianina natural (sem copigmento) foi ajustada visando obter valores de absorvância no comprimento de onda de máxima absorção (515-520 nm), situados entre 0,6-0,7. Posteriormente, as soluções foram mantidas sobre agitação durante 10 minutos e em seguida mantidos sob-reposo protegidos da luz, por duas horas para atingir o equilíbrio Fuleki e Francis (1968b). Os espectros de absorção de soluções modelo foram monitorizados usando um espectrofotômetro UV-Visível, a digitalização do intervalo visível foi feito no comprimento de onda de 400 a 700 nm.

O extrato de *Camellia sinensis* foi obtido conforme Zielinski (2013), onde foi adicionado 100 mL de água destilada a 80°C em 4g de folhas secas e ficou sobre agitação e controle de temperatura durante 7,5 min.

4.2.5 Estudo da Estabilidade

Para estudo da estabilidade em função do tempo selecionou-se a melhor concentração dos ácidos, em função de sua solubilidade e da presença de efeito hipercrômico e/ou batocrômico no comprimento de onda de máxima absorção das antocianinas (FALCÃO, 2003). Para o preparo de amostras controle (sistema modelo sem copigmento) e amostras testes (sistemas modelo com ácido caféico, ácido gálico, ácido málico e extrato polifenólico de *Camellia sinensis*) o extrato antociânico da amora Brazo foi diluído em solução tampão citrato (Dyrby, Westergard e Stapelfeldt, 2001) (ácido cítrico - citrato de sódio

0,1 mol L⁻¹, Merck), pH 3,0 visando obter valores de absorvância, no comprimento de onda de máxima absorção, situados entre 1.0 e 1.2 unidades. De acordo com Asen *et al.* (1972b) e Brouillard, R. *et al.* (1989) a copigmentação ocorre entre as formas coloridas de antocianinas (cátion flavilium e base quinoidal) e certos copigmentos. Então os valores de absorvância das amostras foram padronizadas (absorvância no “tempo zero”) no pH 3,0 visando padronizar o efeito de copigmentação.

Amostras controle e testes (sistema modelo com antioxidante) foram preparados em balões volumétricos e o extrato cru de antocianinas foi adicionado com 0,05% de sorbato de potássio (p/v) para prevenir o crescimento microbiano. O volume foi então completado com sistema modelo de tampão citrato (citrato de sódio-ácido cítrico, 0,1 mol L⁻¹, Merck), em pH 3.0. Os antioxidantes (ácido caféico, ácido gálico, ácido málico e extrato polifenólico de *Camellia sinensis*) foram adicionados nas amostras testes. As soluções foram agitadas por 30 minutos e então transferidas para tubos de ensaio e ficaram em repouso por 2 horas no escuro em temperatura de 25 ± 3°C para atingir o equilíbrio (FULEKI e FRANCIS, 1968b).

Amostras controle e testes foram mantidos sob as seguintes condições: em 5 ± 3°C e 25 ± 3°C, sob lâmpada fluorescente (20 W) e em ausência de luz, todas as amostras foram mantidas em presença de oxigênio atmosférico. Para cada condição de todo o experimento os valores de absorvância das amostras foram monitoradas usando 3 tubos de ensaio com tampas rosqueáveis contendo sistemas modelo Figura 10. Os espectros de absorvância foram monitorados através de espectro de absorção UV-Vis no visível na Microplaca (Epoch, Synergy-BIOTEK, USA) em intervalos regulares de tempo de 36 horas, até 70% ou mais dos pigmentos serem degradados. Depois de equilíbrio no escuro (2 horas), os sistemas modelos foram lidos em comprimento de onda máximo de antocianinas, sendo esta absorvância caracterizada como “zero hora”. Água ultra-pura foi utilizada como branco em todos os experimentos (FULEKI e FRANCIS, 1968a; GIUSTI *et al.*, 1999).

Figura 10: soluções submetidas a estabilidade em diferentes condições.



Fonte: O autor.

4.2.6. Cinética de Estudo

Para todas as amostras os cálculos da constante de velocidade de degradação (k) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) foram calculados de acordo com Kirca e Cemeroglu (2003) e a percentagem de retenção de cor (%R) de acordo com Katsaboxakis *et al.* (1998). Estes parâmetros são utilizados para analisar a degradação dos pigmentos antociânicos em função do tempo conforme as Equações 5,6 e 7:

$$\ln (A_t / A_0) = -k \times t \quad (5)$$

$$t_{1/2} = -\ln 0.5 \times k^{-1} \quad (6)$$

$$\% R = \frac{A_t}{A_0} \times 100 \quad (7)$$

Onde,

A_t = absorvância em relação ao tempo.

A_0 = absorvância no tempo zero.

k = constante de velocidade (hs^{-1}).

t = tempo (dias, horas, minutos, segundos)

$t_{1/2}$ = tempo de meia vida.

%R= Percentagem de retenção de cor.

4.2.7. Determinação de Antocianinas

1) Método pH diferencial

O conteúdo de antocianinas totais foi determinado pelo método da diferença de pH (Worsltad, 2001), em que se dissolve a amostra em dois sistemas-tampão: cloreto de potássio pH 1,0 (0,025 mol L⁻¹) e acetato de sódio pH 4,5 (0,4 mol L⁻¹), sendo as leituras feitas em 2 comprimentos de onda: $A_{\text{max. vis}}$ = absorção máxima e $A_{700\text{nm}}$ = ausência de absorção. A absorbância das soluções a $A_{\text{max. vis}}$ em pH 1,0 é proporcional à concentração das antocianinas presentes, enquanto a absorbância das soluções neste mesmo comprimento de onda, porém em pH 4,5, equivale aos produtos de degradação das antocianinas. O cátion flavílico, de coloração vermelha, é a forma predominante em pH 1,0 enquanto que o carbinol, incolor, predomina em pH 4,5. As leituras a 700 nm corrigem eventuais espalhamentos de luz causados por partículas em suspensão. O cálculo de teor de antocianinas totais por 100 g de amora foi obtido de acordo com as equações 8 e 9:

$$DO = (A_{\text{max. vis}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}1,0} - (A_{\text{max. vis}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}4,5} \quad (8)$$

$$AT = \frac{DO \cdot V_{\text{Ec}} \cdot V_{\text{Ed}} \cdot 100}{\text{Val.m.}\mathcal{E}} \quad (9)$$

V_{Ec} = volume total do extrato concentrado

V_{Al} = volume da alíquota do extrato primário a ser diluída

V_{Ed} = volume total do extrato diluído

m = massa de amostra

100 = fator de correção para que o resultado seja expresso em 100g de amostra

\mathcal{E} = coeficiente de absorvidade molar da cianidina

DO = absorbância calculada pela Equação 8.

Foi utilizado um coeficiente de absorvidade molar da cianidina com valor de 98,2, de acordo com Francis (1989). A cianidina-3-glicosídeo é

largamente usada como padrão de antocianinas em diversos procedimentos experimentais devido a abundância desta antocianina em frutas vermelhas.

2) Método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O perfil das antocianinas foi determinado utilizando a CLAE Alliance 2695 (Waters, Miliford, MA, EUA), com um grupo de detectores de fotiodo PDA 2998 (Waters, Miliford, MA, EUA), bomba quaternária e amostrador automático, com uso de padrões de antocianinas para comparação dos resultados dos métodos espectrofotométricos. Foi utilizada uma coluna (4,6 x 150 mm, 3,5 μ m) Symmetry C₁₈ (Waters, Miliford, MA, EUA) a 20°C. Os resultados foram tratados com o programa *Empower*. Os extratos de antocianinas foram previamente filtrados em um filtro de 0,22 μ m e 20 μ L da amostra foram injetados no aparelho.

As condições de análise cromatográficas foram as seguintes: sistema de eluição binária, com fase móvel composta por solvente A (solução de ácido fórmico 2,5 % diluído com água ultra pura (v/v)) e do solvente B (acetonitrila (Carlo Erba, grau CLAE)); início: 1 mL.min⁻¹; volume de injeção: 10 μ L; temperatura da coluna: 20°C; faixa de detecção: espectro de 200 a 600 nm. O gradiente aplicado pode ser visualizado na Tabela 4.

Tabela 4: Condições da análise cromatográfica - gradiente aplicado.

Tempo (min.)	Ac. Fórmico 2,5%	Acetonitrila	Forma do gradiente
0	97	3	Linear
5	78	22	Linear
15	65	35	Linear
24	15	85	Linear
29	15	85	Linear
30	97	3	Linear

A identificação e a quantificação das antocianinas foram realizadas comparando o tempo de retenção e os espectros com os padrões cianidina-3-glucosídeo (cloreto de kuromanina) e cianidina-3-rutinosídeo (cloreto de queracianina), os quais foram diluídos em metanol. O padrão cianidina-3-

glucosídeo nas concentrações de $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$ a $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$ com Equação da curva padrão sendo $y = 25482x - 20152$ ($R^2 = 0,999$) e cianidina-3-rutinosídeo de $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$ a $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ com Equação da curva padrão sendo $y = 10158x + 21596$ ($R^2 = 0,998$). As antocianinas foram detectadas a 520 nm e a área dos picos foi utilizada para os cálculos.

4.2.8 Medida da Atividade Antioxidante In Vitro

1) Metodologia de FRAP

O potencial antioxidante total dos extratos foi determinado usando o poder antioxidante de redução do ferro pelo ensaio FRAP de acordo com o método proposto por Benzie e Strain (1996). O ensaio baseia-se no poder redutor do antioxidante presente nos extratos, no qual um antioxidante potencial reduz o íon férrico (Fe^{3+} ao íon ferroso (Fe^{2+}), com formação de um complexo azul ($\text{Fe}^{2+}/\text{TPTZ}$). Brevemente, o reagente FRAP foi preparado por uma mistura de tampão acetato ($300 \mu\text{M}$, pH 3,6), uma solução de $10 \mu\text{M}$ de TPTZ em $40 \mu\text{M}$ de HCl e FeCl_3 $20 \mu\text{M}$, na proporção de 10:1:1 (v/v/v), respectivamente. A leitura foi realizada em microplaca (Epoch microplate spectrophotometer, Synergy- BIOTEK, Winooski, VT, USA), onde em cada poço adicionou $10 \mu\text{L}$ da amostra diluída e $300 \mu\text{L}$ do reativo de FRAP e após 30 minutos a absorbância foi medida a 593 nm . Para calcular a capacidade antioxidante, a variação de absorbância entre o reagente FRAP e a mistura, após 30 minutos de reação foi correlacionado com uma curva de calibração ($y = 1,190x - 0,22$, $R^2 = 0,999$, $p < 0,001$) do Trolox ($0,1$ - $1,0 \text{ mmol/L}$).

2) Metodologia de DPPH

Desenvolvido por Brand-Williams *et al.* (1995a), o método DPPH tem como base a redução da absorbância na região visível de comprimento de onda de 515 nm do radical DPPH \cdot por antioxidantes. Realizada em microplaca, adicionou $5 \mu\text{L}$ de amostra seguido por $195 \mu\text{L}$ da solução metanólica de DPPH $125 \mu\text{mol/L}$, após repousar por 30 minutos no escuro, a absorbância foi medida

(Epoch, Synergy-BIOTEK, USA) a 517 nm. Os resultados foram expressos em mmol de trolox equivalente/ 100g. Todas as determinações foram feitas em oitoplicatas.

4.2.9. Compostos fenólicos totais

Os compostos fenólicos totais foram determinados por análise colorimétrica utilizando reagente Folin-Ciocalteu como descrito por Singleton e Rossi (1965). Num tubo de ensaio, foram adicionados 8,4 mL de água destilada, 100 mL de reagente Folin-Ciocalteu 500 μ L. Após 3 minutos foi adicionado 1,0 mL de carbonato de sódio 20 % a cada tubo e em seguida foi agitado em vórtice (Vision Scientific CO., Coreia). Após 1 hora, a absorbância foi medida em espectrofotômetro (Mini-UV 1240, Shimadzu, Tóquio, Japão) a 720 nm, sendo os resultados expressos em ácido málico [mg L^{-1}].

4.2.10 Análises estatísticas

As análises estatísticas dos dados da composição química das amoras e da estabilidade foram analisados por análise de variância (ANOVA) e as diferenças entre as médias foram testadas pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$). Os dados obtidos do planejamento experimental foram avaliados com o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Em seguida, estimou-se a homogeneidade para todas as variáveis pelo teste de Hartley (Software Statistic 7.0, StatSoft Inc., EUA). Foi realizada análise de variância unifatorial (ANOVA). Foram realizadas análise de regressão e falta de ajuste ($P_{\text{lack of fit}}$). O valor de $P_{\text{lack of fit}}$ foi utilizado para verificar a adequação do modelo, sendo que modelos com $P_{\text{lack of fit}} > 0,05$ indicam que o modelo pode ajustar adequadamente os dados experimentais. O modelo matemático proposto inclui apenas os coeficientes de regressão que apresentam significância estatística ($P \leq 0,05$). E adequabilidade do modelo também foi avaliada pela % de variância e explicada (R^2 e R^2 ajustado) e pela sua significância (p -modelo valor).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Composição aproximada

Os resultados das análises físico-químicas, relativos à composição nutricional das cultivares de amora-preta estão apresentados na Tabela 5. A amora-preta apresentou alto conteúdo de água, o que foi confirmado pelos resultados de umidade. Apresentou baixas quantidades de gorduras e proteínas, seguindo o mesmo padrão de outros frutos regionais, como o mirtilo, a framboesa e o morango (ANTUNES, 2002) e uma quantidade considerável de cinzas, representando o conteúdo de minerais presentes no fruto.

O teor de acidez, representado principalmente pela presença do ácido málico, que é o ácido orgânico majoritário nestes frutos (KAFKAS *et al.*, 2006) e o valor do pH (Tabela 6), apresentou-se similar aos dados reportados por MOTA (2006) ao estudar amoras. Em estudo feito por Kafkas (2006) com cinco cultivares de amoras, a concentração de ácido málico variou de 0,6 a 1,1 (mg g^{-1}).

Devido a curta vida de prateleira de 7 dias as cultivares de amora são colhidas e armazenadas imediatamente a 2°C. Veazie e Collins (2002) avaliaram suas características no decorrer do armazenamento em atmosfera controlada e os valores das amostras controle no tempo zero para sólidos solúveis foram 8,7-12,1 °BRIX, acidez 0,82-1,00 %, pH 3,37-3,32 e antocianinas 122,1- 107,7 $\text{mg } 100\text{g}^{-1}$ corroboram os determinados no trabalho.

Tabela 5: Composição físico-química das amoras em base úmida ^(a).

Determinações ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$)	Amora Brazo
Umidade	89,76 ± 0,2
Proteínas	1,02 ± 0,12
Lipídeos	0,20 ± 0,01
Cinzas	0,74 ± 0,40
Fibra alimentar	3,45 ± 0,32
Carboidratos ^(b)	4,81

Fonte: O autor.

^(a) Os resultados são a média ± desvio padrão (n=3). ^(b) Calculados por diferença (100 – (proteínas, lipídeos, cinzas, fibras e umidade)).

Siriwoharn (2004) observaram que o conteúdo total de antocianinas ($131 - 256 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$) e compostos fenólicos totais ($682-1056 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$) variou entre as 11 cultivares de amoras estudadas.

A cultivar Brazo apresentou um teor de antocianinas total inferior ($47,13 \pm 0,24 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$) aos valores médios encontrados em estudos com cultivares como a Choctaw ($125,6 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$), Thornless ($146,8 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$), Cherokee ($123 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$), Arapaho ($122,1 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$) e Navaho ($107,7- 126 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$) (MOYER *et al.*, 2002; VEAZIE e COLLINS, 2002; SIRIWOHARN *et al.*, 2004; PANTELIDIS *et al.*, 2007) e aos dados reportados por Moyer, Hummer e Finn (2002) para a cultivar obtida pelo cruzamento entre Cherokee x *R. caucasicus* ($80 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$).

A relação brix/acidez é usada como índice de palatabilidade dos frutos e indica o grau de equilíbrio entre o teor de açúcares e ácidos orgânicos do fruto estando diretamente relacionada à sua qualidade quanto ao atributo sabor, sendo um importante parâmetro a ser considerado para o consumo in natura. MOTA (2006) trabalhou com sete cultivares de amora-preta e obteve uma relação de brix/acidez média de 7,58 e ANTUNES *et al.* (2003) trabalharam com a conservação pós-colheita de amora-preta das cultivares Brazos e Comanche, obtendo relações de 8,89 e 7,98, respectivamente, resultados superiores ao obtido no presente trabalho.

O pH está superior aos relatados para as cultivares Guarani, Tupy e Cherokee, obtidos do banco de germoplasma da extação experimental da EPAMIG em Caldas, Minas Gerais que foram 3,38, 3,26 e 3,39, respectivamente (MOTA, 2006).

O teor de sólidos solúveis totais, SST das amostras, indicativo do teor de açúcar foi de $8,23 \text{ }^\circ\text{BRIX}$, está de acordo com os valores encontrados por Hassimotto *et al.* (2008) para cultivares Tupy e Guarani ($6,9$ e $9,2^\circ \text{ BRIX}$), podendo estar relacionado com as características diferentes de clima da região de cultivo.

O teor de cinzas, representando o conteúdo de minerais está superior aos valores reportados por Hirsch *et al.* (2012) que encontraram valores $0,27-0,49 \%$, porém o valor determinado para fibra bruta foi inferior as cultivares de

amoras que foram produzidas em Pelotas, eles determinaram 5,5-5,7 % de fibra alimentar.

Tabela 6: Composição das amoras.

Determinações	Amora Brazo
BRIX	8,23 ± 0,25
pH	3,91 ± 0,01
Acidez (mg g ⁻¹)	1,85 ± 0,27
BRIX / Acidez	4,45
Antocianina (mg 100 g ⁻¹)	47,13 ± 0,15
Fenóis (mg 100 g ⁻¹)	185,22 ± 15,94
FRAP (mmol 100 g ⁻¹)	7,31 ± 0,55
DPPH (mmol 100 g ⁻¹)	1,71 ± 0,08

Fonte: O autor.

Os resultados são a média ± desvio padrão (n=3).

As propriedades antioxidantes estão relacionadas ao tipo de fruta, ou seja, espécie ou cultivares dentro da mesma espécie, às condições de cultivo das plantas como ambiente e técnicas de manejo, grau de maturidade na colheita, sendo que, quanto mais madura as frutas, menor o teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante (WANG e LIN, 2000; SIRIWOHARN *et al.*, 2004; SCALZO *et al.*, 2005; CASTREJON *et al.*, 2008).

O valor de atividade antioxidante por FRAP foi superior ao valor encontrado para amoras do oeste da Transilvânia de acordo com Diaconeasa *et al.* (2014) (4,8 mmol 100 g⁻¹). Koca *et al.* (2009), observaram valores de atividade antioxidante pelo método FRAP em frutos de amoreiras silvestres (4 mmol 100 g⁻¹) comparadas com frutos de cultivares de amoreiras cultivadas (6 mmol 100 g⁻¹).

5.2 Otimização da extração das antocianinas

O planejamento 3³ foi utilizado para avaliar o efeito das combinações de três variáveis independentes (temperatura, tempo e proporção sólido-líquido) na extração das antocianinas de amora. A variável de resposta foi o conteúdo de antocianinas, os valores médios estão representados na Tabela 7.

Tabela 7: Planejamento 3³ e dados experimentais para extração de antocianinas de amora com ácido cítrico e ácido clorídrico.

Variáveis Independentes				Variáveis Respostas*	
Originalis					
Ensaio	Quantidade de solvente/ grama	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Antocianinas	Antocianinas
	(mL)			Ác. Cítrico mg 100g ⁻¹	Ác. Clorídrico mg 100g ⁻¹
1	5	20	20	26,07 ± 1,09 ^f	33,64 ± 1,58 ^{fg}
2	10	20	20	16,60 ± 1,38 ^{ij}	34,73 ± 0,34 ^f
3	15	20	20	20,98 ± 1,89 ^{gh}	41,64 ± 0,48 ^e
4	5	20	40	15,21 ± 1,72 ^j	44,49 ± 1,01 ^d
5	10	20	40	15,08 ± 2,03 ^j	46,25 ± 1,59 ^{cd}
6	15	20	40	21,89 ± 2,41 ^g	46,55 ± 1,23 ^{bcd}
7	5	20	60	27,31 ± 3,93 ^f	47,46 ± 1,94 ^{bc}
8	10	20	60	26,40 ± 2,14 ^f	48,61 ± 0,64 ^b
9	15	20	60	18,98 ± 3,00 ^{ghi}	61,10 ± 2,23 ^a
10	5	40	20	20,82 ± 2,50 ^{gh}	14,67 ± 2,04 ^m
11	10	40	20	19,25 ± 2,06 ^{ghi}	16,49 ± 0,73 ^m
12	15	40	20	25,99 ± 1,13 ^f	25,26 ± 4,03 ^j
13	5	40	40	17,46 ± 1,94 ^{hij}	24,06 ± 1,02 ^{jk}
14(C)	10	40	40	18,61 ± 0,64 ^{ghij}	24,06 ± 0,48 ^{jk}
15	15	40	40	28,37 ± 2,17 ^f	29,64 ± 1,92 ^{hi}
16	5	40	60	26,67 ± 1,38 ^f	31,82 ± 1,67 ^{gh}
17	10	40	60	27,15 ± 0,87 ^f	32,91 ± 1,16 ^{fg}
18	15	40	60	32,36 ± 2,26 ^e	33,22 ± 2,11 ^{fg}
19	5	60	20	34,06 ± 1,02 ^{de}	20,31 ± 0,54 ^f
20	10	60	20	35,40 ± 0,92 ^{de}	20,91 ± 2,01 ^f
21	15	60	20	39,31 ± 1,82 ^c	25,03 ± 2,01 ^j
22	5	60	40	37,16 ± 0,86 ^{cd}	23,88 ± 1,06 ^{jk}
23	10	60	40	37,58 ± 1,71 ^{cd}	22,61 ± 1,43 ^{kl}
24	15	60	40	40,00 ± 2,68 ^c	28,61 ± 1,57 ⁱ
25	5	60	60	46,59 ± 3,57 ^b	29,64 ± 1,85 ^{hi}
26	10	60	60	51,22 ± 1,95 ^a	30,37 ± 0,24 ^{hi}
27	15	60	60	40,46 ± 2,35 ^c	31,62 ± 1,89 ^{gh}
28(C)	10	40	40	20,12 ± 2,91 ^{ghi}	21,63 ± 0,61 ^f
29(C)	10	40	40	15,12 ± 1,47 ^j	25,93 ± 1,89 ^j
P					
(Hartley)				0,95	0,34
P					
(ANOVA)				< 0,001	< 0,001

Fonte: O autor.

(C) = pontos centrais; * Valores expressos como média ± desvio padrão (n=3); ** Valor obtido pelo teste de Hartley, *** Valor obtido por análise de variância unifatorial (ANOVA). Letras diferentes na mesma coluna representam resultados com diferença estatística, de acordo com o teste de Duncan (p≤0,05).

As médias dos resultados das coordenadas referentes ao ponto central das variáveis dependentes estudadas neste experimento foram: 17,95 mg 100 g⁻¹ (CV=14,28%) para antocianinas do extrato com ácido cítrico e 23,87 mg 100 g⁻¹ (CV=9,03%) para antocianinas do extrato com ácido clorídrico.

O conteúdo de antocianinas para o planejamento com o ácido cítrico variou estatisticamente ($p < 0,05$) de $15,08 \pm 2,03$ (ensaio 5) a $51,22 \pm 1,95$ (ensaio 26) mg 100 g⁻¹. O maior valor observado no ensaio 26 foi nas seguintes condições: proporção de 1 g para 10 mL de solvente, temperatura de 60°C durante um tempo de 60 minutos. A análise de regressão múltipla mostrou que o modelo foi significativo ($p < 0,05$), e ajustou adequadamente os dados experimentais, com $P_{\text{lack off it}} = 0,32$ e $R^2_{\text{ajustado}} = 0,86$. Mesmo apresentando falta de ajuste, o modelo construído foi capaz de explicar 86% da variância total.

O efeito da temperatura (x_2) e o tempo (x_3) proporcionou diminuição no conteúdo de antocianinas, Tabela 7 e 8. A temperatura no modelo quadrático (x_2^2) e o tempo no modelo quadrático (x_3^2) tendem a aumentar significativamente o conteúdo de antocianinas. Este comportamento foi observado a partir da Equação 13.

$$Y = 41,64 - 0,94 x_2 + 0,02 x_2^2 - 0,77 x_3 + 0,01 x_3^2 \quad (13)$$

O conteúdo de antocianinas para o planejamento com o ácido clorídrico variou estatisticamente ($p < 0,05$) de $14,67 \pm 2,04$ (ensaio 10) a $61,10 \pm 2,23$ (ensaio 9) mg 100g⁻¹. O maior valor observado no ensaio 9 foi nas seguintes condições: proporção de 1g para 15 mL de solvente, temperatura de 20°C durante um tempo de 60 minutos. A análise de regressão múltipla mostrou que o modelo foi significativo ($p < 0,05$), e ajustou adequadamente os dados experimentais, com $P_{\text{lack off it}} = 0,49$ e $R^2_{\text{ajustado}} = 0,95$. Mesmo apresentando falta de ajuste, o modelo construído foi capaz de explicar 95% da variância total.

O efeito da proporção de solvente modelo linear (x_1), a temperatura no modelo quadrático (x_2^2) e o tempo no modelo linear (x_3) aumentaram significativamente o conteúdo de antocianinas, Tabela 7 e 8. Temperatura (x_2) e a interação entre temperatura e tempo (x_2x_3) proporcionou diminuição no

conteúdo de antocianinas. Este comportamento foi observado a partir da Equação 14.

$$Y = 58,65 + 0,29 x_1 - 2,29 x_2 + 0,03 x_2^2 + 0,49 x_3 - 0,01 x_2x_3 \quad (14)$$

Para todas as variáveis de resposta, a temperatura e o tempo foram os fatores que apresentaram maiores efeitos, Tabela 7 e 8. Os gráficos de pareto, Figura 11, mostram os fatores significativos ($P \leq 0,05$) para a variável resposta: antocianinas obtidas no modelo linear (L) e quadrático (Q).

Pompeu *et al.* (2009) observou ao estudar frutos de açaí que as variáveis estudadas poderiam ser classificadas em termos de influência na realização de extração dos compostos fenólicos (avaliando antocianinas totais e compostos fenólicos totais): temperatura > proporção de etanol >> concentração de ácido hidrocloreídrico.

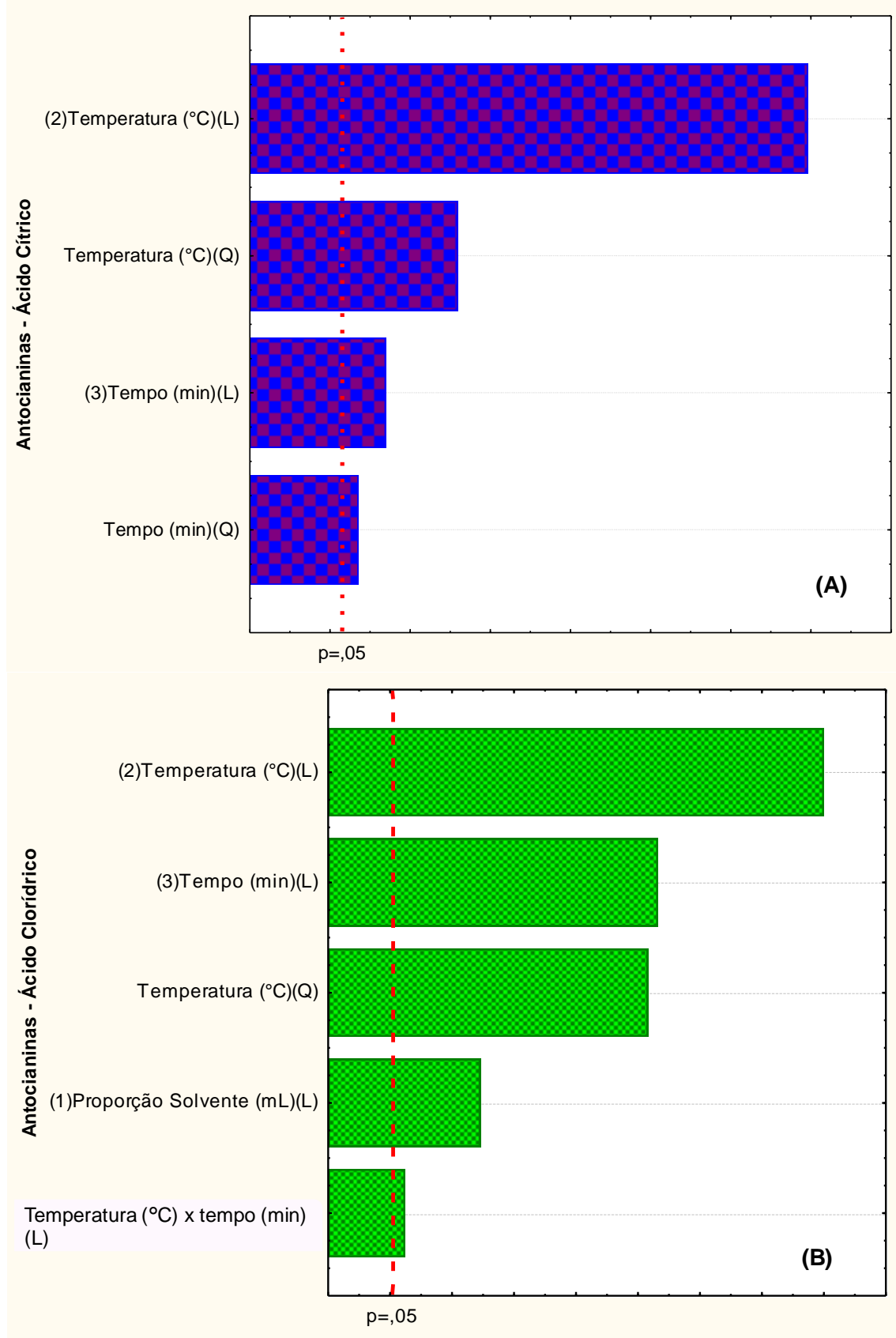
Tabela 8: Coeficientes de regressão dos modelos polinomiais para extração de antocianinas*.

Parâmetros	Coeficiente de Regressão	Erro padrão	-95% IC	+95% IC	F-valor	P-valor
Antocianinas (mg 100 g⁻¹) extração com Ácido Cítrico						
x2	-0,939	0,313	-1,585	-0,294	-3,006	0,006
x22	0,018	0,004	0,010	0,026	4,598	0,000
x3	-0,768	0,313	-1,414	-0,123	-2,458	0,022
x32	0,012	0,004	0,004	0,020	3,014	0,006
Antocianinas (mg 100 g⁻¹) extração com Ácido Clorídrico						
x1	0,293	0,060	0,170	0,416	4,916	0,000
x2	-2,293	0,209	-2,725	-1,861	-10,980	0,000
x22	0,025	0,002	0,020	0,030	10,331	0,000
x3	0,498	0,079	0,335	0,661	6,327	0,000
x2x3	-0,005	0,002	-0,008	-0,001	-2,489	0,020

Fonte: o autor.

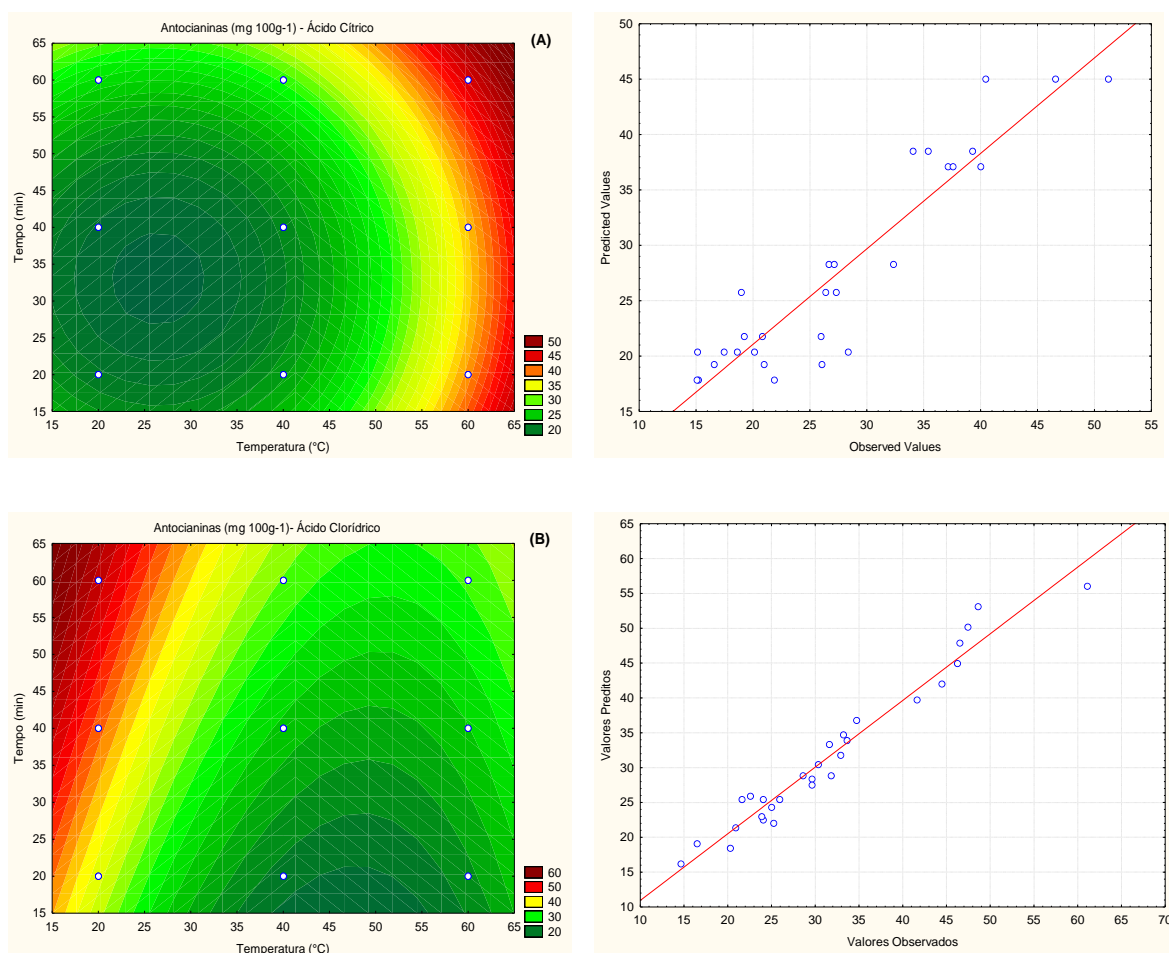
*Variáveis significativas com nível de probabilidade de 0,05; IC-95% de intervalo de confiança. x₁= proporção de solvente, x₂= temperatura, x₃= tempo.

Figura 11: Gráficos de pareto com os efeitos significativos na variável de resposta, antocianina. Extração com ácido cítrico (A), extração com ácido clorídrico (B).



As superfícies de resposta, Figura 12, mostram os efeitos da temperatura e do tempo sobre o teor de antocianinas. A elevação de temperatura para etanol acidificado com ácido cítrico favorece a extração das antocianinas de amora, já um menor tempo e menor temperatura favorecem a extração das antocianinas com ácido clorídrico. Isto pode ocorrer devido a volatilidade do ácido clorídrico ser maior que o ácido cítrico. O ácido clorídrico tem uma maior tendência a evaporação é um ácido forte com ponto de ebulição de -85°C , já o ácido cítrico é um ácido fraco com ponto de ebulição de 175°C .

Figura 12: Efeito da temperatura e do tempo no conteúdo de antocianinas e valores preditos vs. valores observados dos modelos propostos. Extração com ácido cítrico (A), extração com ácido clorídrico (B).



Fonte: O autor.

Figura 13: Otimização das antocianinas de amora com ácido cítrico usando a função de desejabilidade.

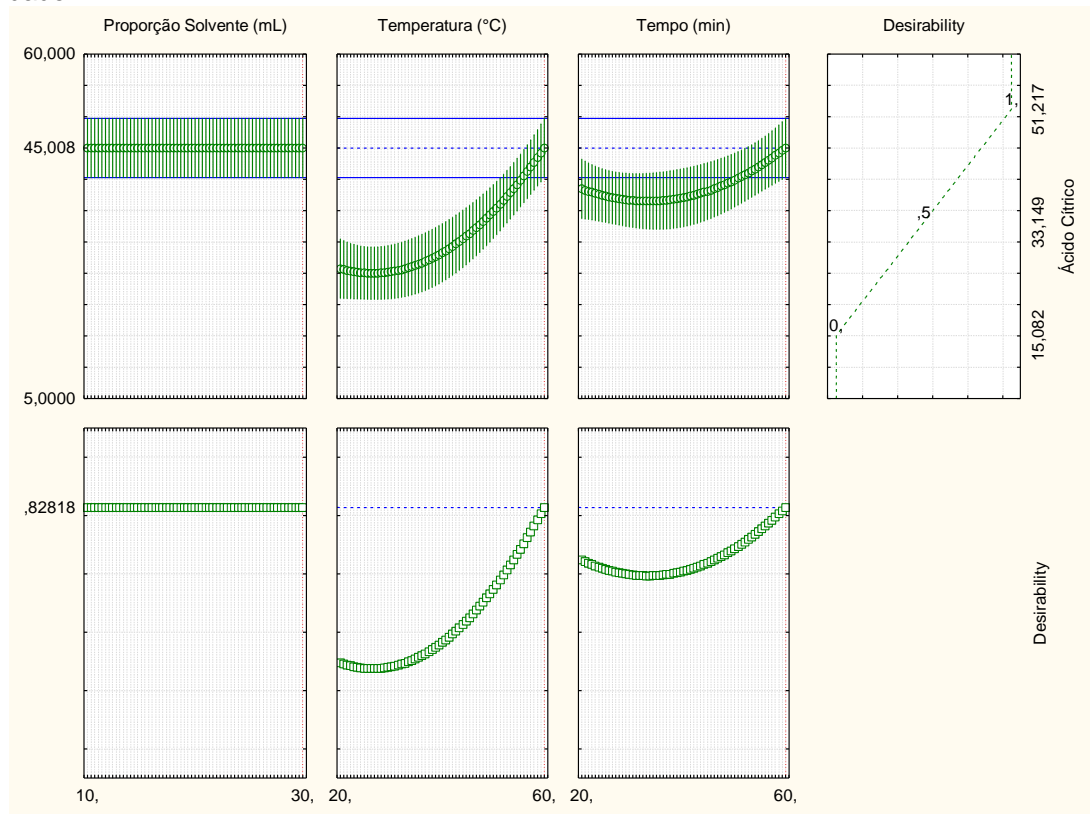
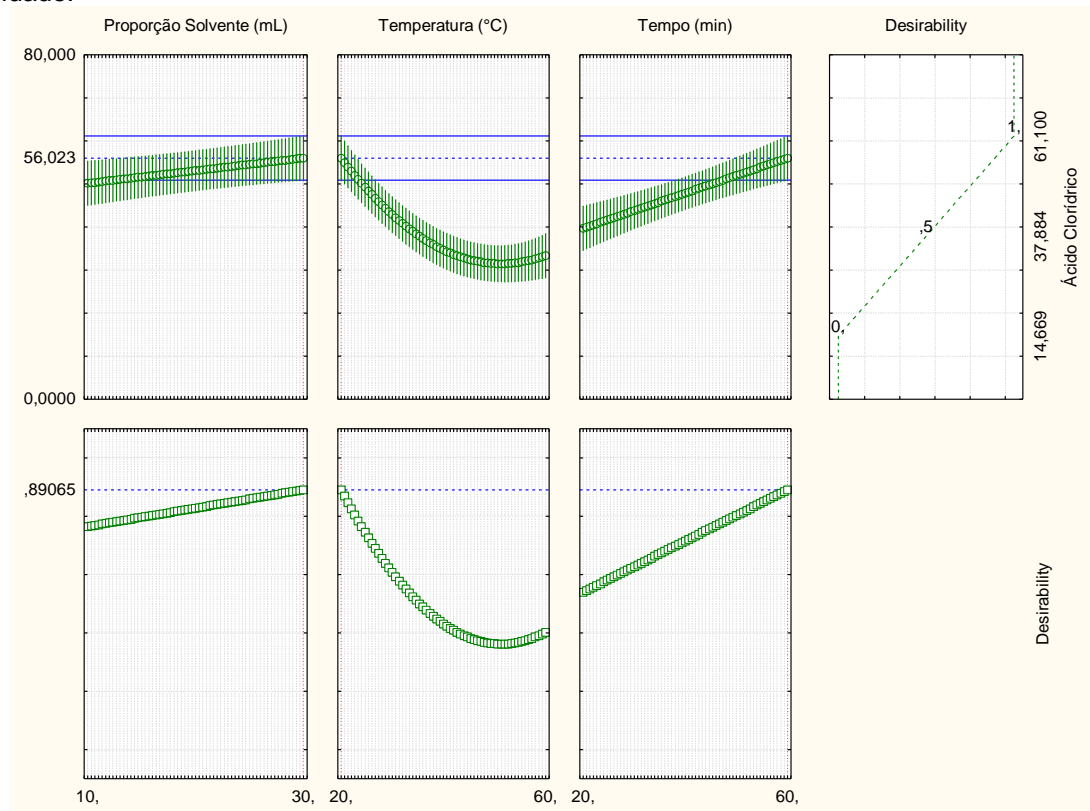


Figura 14: Otimização das antocianinas de amora com ácido clorídrico usando a função de desejabilidade.



Depois de modelar a extração das antocianinas, uma otimização simultânea foi realizada usando a função de desejabilidade (D) objetivando maximizar os resultados. Então, os ótimos valores sugeridos para a extração com ácido cítrico com função de desejabilidade foram às seguintes condições: tempo de 60 min., razão de 2g / 30 mL e uma temperatura de 60°C (Figura 13). As condições de extração sugeridas teoricamente foram utilizadas e o teor de antocianinas totais determinado foi de $39,76 \pm 0,87 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ e o modelo forneceu um valor de $45 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ (erro absoluto igual a $5,24 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$).

Os ótimos valores sugeridos para a extração com ácido clorídrico com função de desejabilidade foram às seguintes condições: tempo de 60 min., razão de 2g / 30 mL e uma temperatura de 20°C (Figura 14). As condições de extração sugeridas teoricamente foram utilizadas e o teor de antocianinas totais determinado foi de $49,25 \pm 0,75 \text{ mg}/100\text{g}^{-1}$ e o modelo forneceu um valor de $56,02 \text{ mg}/100\text{g}^{-1}$ (erro absoluto igual a $6,77 \text{ mg}/100\text{g}^{-1}$).

O resultado da validação externa do experimento permaneceu dentro dos $\pm 95\%$ dos intervalos de predição proposto pelo modelo. Os baixos valores dos erros absolutos dos resultados experimentais em relação aos preditos confirmam que os modelos propostos por superfície de resposta são adequados para predição das antocianinas de amora destinadas para a extração.

Pompeu, Silva e Rogez (2009) ao estudar frutos de *Euterpe oleracea* com um delineamento de composto central com três variáveis (proporção de etanol, concentração de ácido hidrocloreídrico e temperatura) propôs um modelo com um bom ajuste ($R^2 > 0,89$) e mostrou uma correlação significativa entre compostos fenólicos totais, antocianinas totais e atividade antioxidante ($p < 0,05$) e suas condições ótimas foram concentração de etanol entre 70 e 80%, ácido hidrocloreídrico entre 0,065 e 0,074 mol/L e temperatura de 58°C.

Borges *et al.* (2011) ao realizar um planejamento de extração com ultrassom evidenciou que as respectivas condições ótimas para extrato de antocianinas de Jussara foram com solvente metanol/HCl 1,5 M, razão sólido: líquido entre 1:30 e 1:50 e tempo de extração de 24 horas ($R^2 = 0,99$).

Rajha *et al.* (2014) encontraram como ótima extração para o resíduo de uva o tempo de 119 minutos, com efeitos quadráticos e lineares positivos para

temperatura e um efeito quadrático negativo para mistura de solvente no processo de extração.

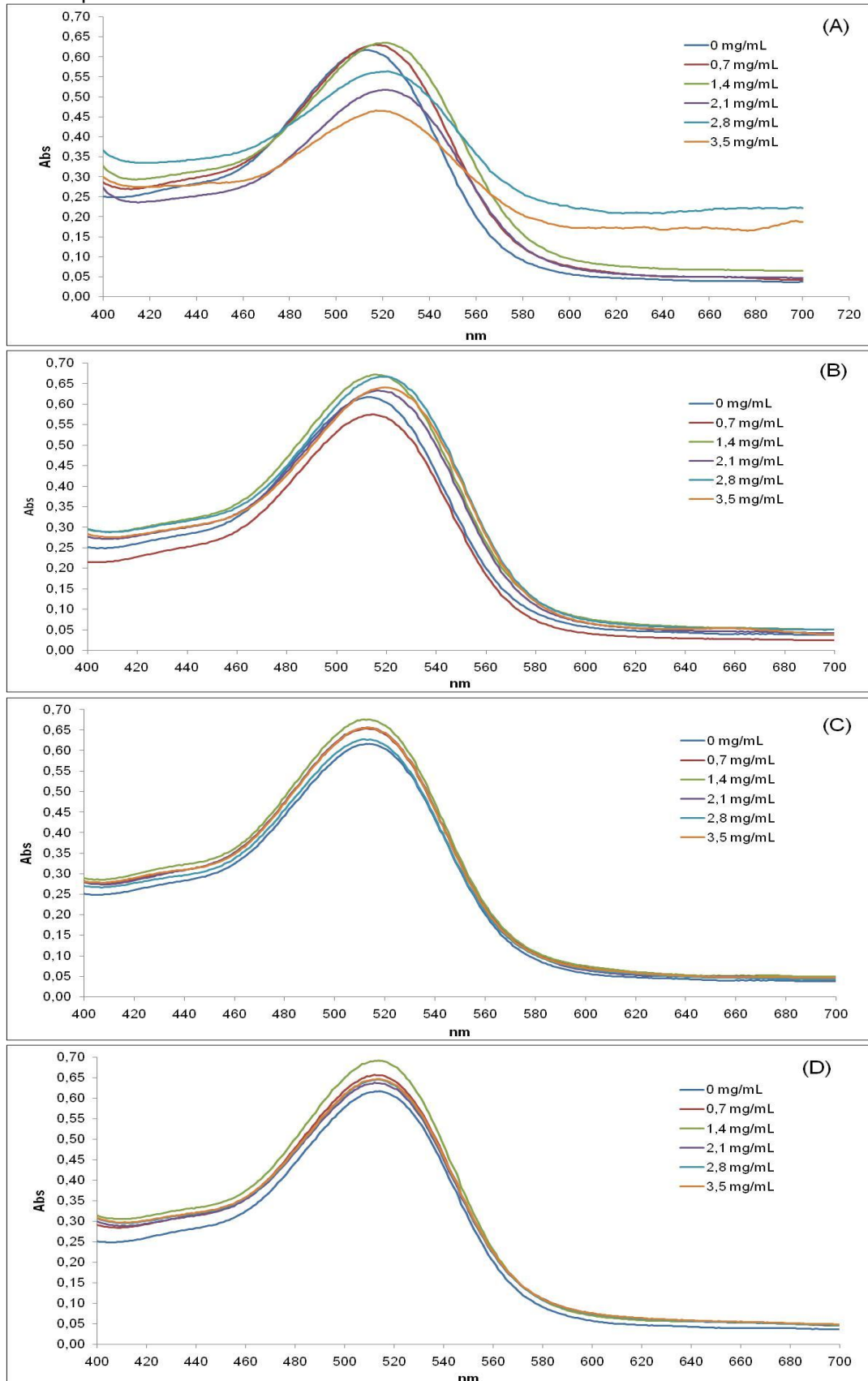
Como o maior rendimento de extração foi detectado utilizando etanol acidificado com ácido clorídrico com um modelo, este foi utilizado para o decorrer do trabalho.

5.3 Copigmentação Intermolecular

A copigmentação envolvida no presente estudo mostra a absorbância máxima no visível de 400 a 700 nm. Foram avaliadas, diferentes proporções de ácido caféico, ácido gálico, ácido málico e extrato polifenólico de *Camellia sinensis* em relação ao extrato de antocianinas para verificar a possível reação de copigmentação (Figura 15). O aumento na relação copigmento/antocianina, aumentou o desvio no comprimento de onda de máxima absorção (efeito batocrômico) e os aumento nos valores de absorbâncias das antocianinas (efeito hiper-crômico), sugerindo a interação das antocianinas do extrato bruto de amora e os copigmentos testados em pH 3,0 (Tabela 9). Isto indica claramente interações intermoleculares de pigmento-copigmento que é a copigmentação entre extrato de amora e os ácidos e/ou extrato polifenólico. Este fenômeno tem um papel importante para colorir soluções e matrizes quando eles são encontrados juntos (MALAJ *et al.*, 2013).

Geralmente, os compostos fenólicos não absorvem a região visível do espectro (BYAMUKAMA *et al.* 2005; KELEBEK *et al.*, 2009). Sendo assim, tem sido relatada em várias pesquisas, a ocorrência dos desvios batocrômico e hiper-crômico, que confirmam a reação de copigmentação de antocianinas com compostos fenólicos e antioxidantes (DIMITRIC *et al.*, 2005; GRIS *et al.*, 2007b; RUSTIONI *et al.*, 2012; MALAJ *et al.*, 2013; ZHANG, LIU *et al.*, 2015).

Figura 15: Espectros de absorção de antocianinas de amora Brazo em diferentes concentrações de copigmentos. (A) Ácido cafeico; (B) Ácido gálico; (C) Ácido málicos; (D) Extrato polifenólico de Chá Verde.



Como proposto por Brouillard *et al.*, (1989) foi utilizado valores de efeito hiperacrômico, reportados como $(A-A_0)/A_0$ (λ_{520nm}) como principal parâmetro experimental para medir a magnitude das interações entre as antocianinas e os copigmentos (Tabela 9).

Tabela 9: Valores de desvios hiperacrômico e batocrômico no comprimento de onda de máxima absorção de antocianinas de amora Brazos adicionadas de co-fatores em solução tampão pH 3,0.

Concentração de co-fator em solução modelo (mg/mL e mL/mL)	0,7	1,4	2,1	2,8	3,5
$\Delta\lambda$ = deslocamento batocrômico (nm) em relação ao controle					
Ácido Caféico	3,04	8,02	8,02	8,02	3,02
Ácido Gálico	1,07	8,02	1,97	3,04	6,06
Ácido Málico	-1,96	3,04	-3,02	-3,02	-1,96
Ext. polifenólico de <i>Camellia sinensis</i>	-1,96	5,00	-1,96	-1,05	-1,05
ΔA = Efeito hiperacrômico das amostras (%) em relação ao controle*					
Ácido Caféico	3,81	4,96	-14,47	-6,82	-23,13
Ácido Gálico	-6,22	10,45	4,23	8,56	6,01
Ácido Málico	4,51	9,40	3,08	1,43	6,40
Ext. polifenólico de <i>Camellia sinensis</i>	6,18	12,09	3,14	1,12	4,72

*Valores de efeito hiperacrômico, reportados como $(A-A_0)/A_0$ (λ_{520nm}).

Na Tabela 9 está evidente que o deslocamento hiperacrômico é maior para mais alta concentração de copigmento, indicando a dependência da reação de copigmentação com a concentração. Observa-se que o ácido caféico destacou-se em relação aos outros no deslocamento batocrômico e em relação a melhor concentração, 1,4 mg mL⁻¹. E o extrato polifenólico apresentou maior efeito hiperacrômico.

Algumas concentrações de co-fatores apresentaram resultados de deslocamento batocrômicos negativos, demonstrando um deslocamento em relação ao controle para a esquerda. E em outros casos, em algumas concentrações não se verificou o efeito hiperacrômico nas amostras em relação ao controle, valores negativos, o que pode ser atribuído a uma não copigmentação nestas concentrações devido à saturação ou reduzida concentração de co-fator.

Zhang *et al.*, (2015) avaliou a copigmentação intermolecular entre a antocianina malvidina-3-glucosídeo e 5 diferentes co-fatores por seus

respectivos espectros e parâmetros termodinâmicos. Afirmaram que a copigmentação intermolecular está associada com a estrutura dos cofatores, porque o cofator contendo mais grupos metoxilas ou hidroxilas iria interagir com a malvidina-3-glucosídeo formando um complexo mais estável que conduz a maiores efeitos hipercrômicos e batocrômicos (ácido siríngico > ácido vanílico > ácido gálico > ácido protocatéquico > ácido p- hidroxibenzoico).

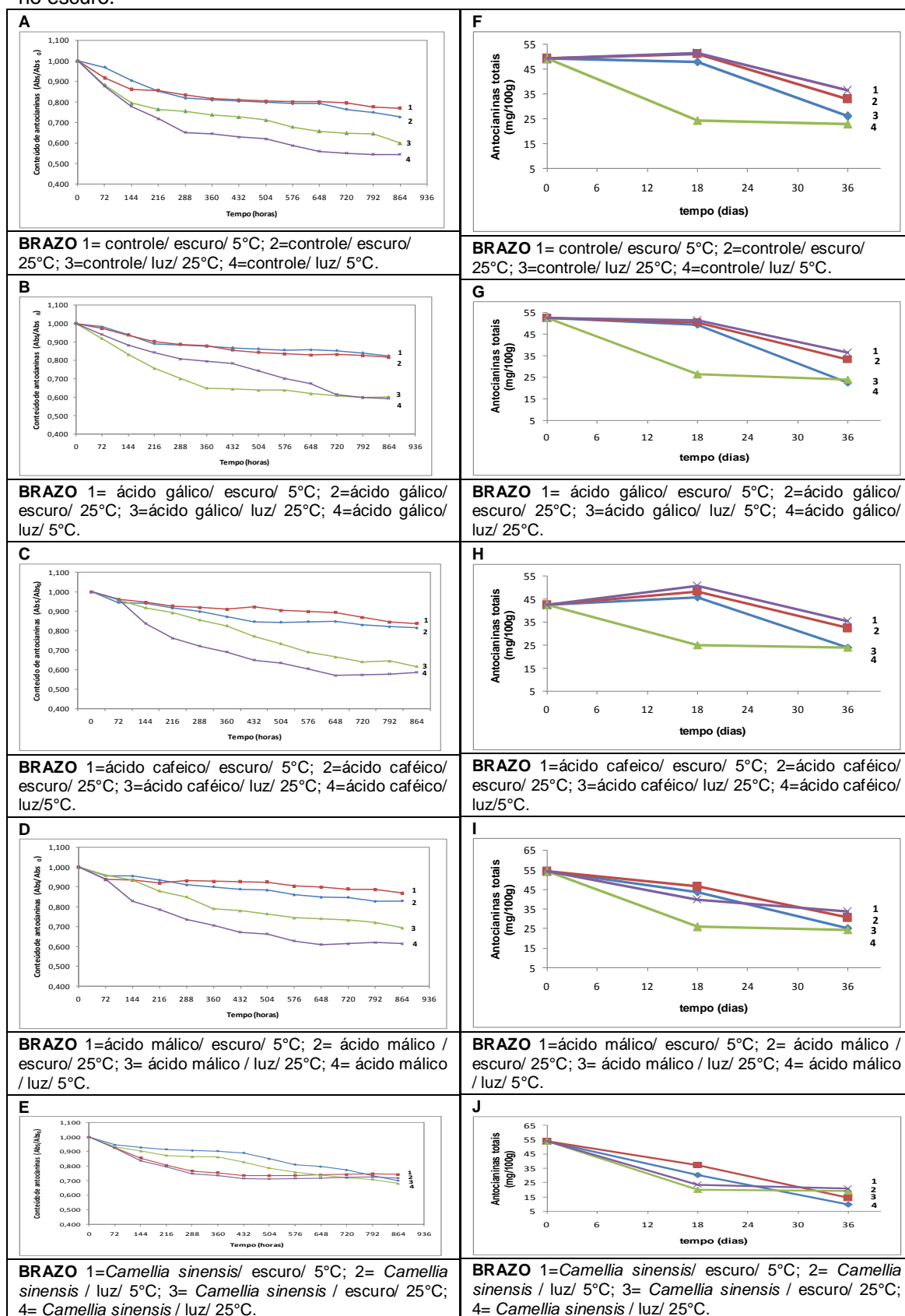
Os resultados reportados por Dimitric-Markovic, Petranovic e Baranac (2000) ao avaliarem a reação de copigmentação intermolecular in vitro de malvidina 3,5-diglicosidase e ácido caféico, confirmaram que o ácido caféico tem a capacidade de copigmentação e o complexo antocianina:ácido caféico apresenta atividade antioxidante maior que a antocianina sozinha.

5.4 Estudo da estabilidade

Para o estudo da estabilidade das antocianinas de amoras Brazo foi selecionada a concentração de 1,4 mg/mL dos ácidos caféico, gálico, málico e 1,4 mL/mL de extrato polifenólico de *Camellia sinensis*, que apresentaram o maior efeito hipercrômico no comprimento de onda de máxima absorção das antocianinas. A Figura 16 indica a absorvância das amostras em função do tempo (864 horas de monitoramento) a cada 72 horas e indica a correspondente regressão por análise de CLAE.

O conteúdo de antocianinas durante o armazenamento diminuiu no decorrer do tempo e os fatores temperatura e luz agiram de maneiras dependentes observado em ambas as medidas de absorvâncias em espectrofotômetro e pela cromatografia líquida de alta eficiência (Figura 16). A regressão linear confirma que a degradação das antocianinas das amoras segue uma reação cinética de primeira ordem (Figura 16). O modelo de primeira ordem foi aplicado para calcular as constantes de degradação de antocianinas. Wang e Xu (2007) fizeram um estudo reportando sobre a determinação dos parâmetros da cinética de degradação para antocianinas de amora em suco e concentrado durante o aquecimento e estocagem em várias temperaturas, e as amostras degradaram mais rapidamente com o aumento da temperatura apresentando uma cinética de primeira ordem.

Figura 16: Redução dos valores de absorvância obtidos por espectrofotômetro e redução dos valores de antocianinas totais obtidos por CLAE das antocianinas dos extratos brutos de amora Braço em solução tampão citrato pH 3,0, temperatura de $5 \pm 3^\circ\text{C}$ e $25 \pm 3^\circ\text{C}$, presença de luz e no escuro.



O pigmento antociânico de amora Brazo adicionado na solução modelo (amostras controle) apresentou ao final do período de 864 horas, em média, 67% da cor inicial (% R) e tempo de meia-vida de 66 dias.

Menores constantes de velocidade de cor resultaram em maiores tempo de meia vida. O efeito da temperatura e da presença de luz na estocagem foi determinante para a estabilidade das antocianinas. As amostras mantidas em pH 3,0 foram avaliadas durante 36 dias. Comparando-se as diferentes temperaturas de armazenamento observou-se que as amostras mantidas a $5\pm 3^{\circ}$ C apresentaram valores de tempo de meia vida superiores. Quanto ao fator ambiente, observou-se que em presença de luz as amostras foram mais rapidamente degradadas do que quando mantidas no escuro.

Notou-se que as amostras em temperatura de $5\pm 3^{\circ}$ C no escuro mantiveram os maiores valores de absorbância o que confere maiores valores de tempo de meia vida e maiores valores de porcentagem de retenção de cor, porém a amostra com adição do ácido gálico apresentou maior valor para as amostras armazenadas no escuro a 25° C. Levando em consideração os maiores valores das amoras Brazo (armazenamento no escuro a 5° C) se destacaram as soluções com adição de ácido caféico com um aumento significativo do tempo de meia vida e porcentagem de retenção de cor ($T_{1/2} = 242,40 \pm 25,40$ dias e $\%RC = 90,15 \pm 0,99$), seguido pelo ácido málico ($T_{1/2} = 200,48 \pm 12,15$ dias e $\%RC = 88,27 \pm 0,69$). Os menores valores observados foram para as amostras controle mantidos na luz a 5° C ($T_{1/2} = 48,60 \pm 1,59$ dias e $\% RC = 54,82 \pm 1,01$).

Isto indica que para aplicação de antocianinas da amora Brazo em bebida de pH 3,0 com maior vida de prateleira e com cor mais estável a temperatura de armazenamento do produto necessita ser controlada e o produto deve estar protegido da luz. A adição de copigmento nestas condições aumentou a porcentagem de retenção de cor das amostras (Tabelas 10 e 11).

Em estudos feitos por Sun, Cao, Bai, Liao e Hu (2010) baixas temperaturas favoreceram a reação de copigmentação ao investigar o efeito da adição de ácido sinápico, ferrúlico, caféico, cumárico e gálico. Sun, Cao, Bai, Liao e Hu (2010) relataram que o mais alto efeito de copigmentação dos extratos de framboesa vermelha foi na ordem de ácido sinápico, ferrúlico,

caféico, cumárico e gálico, o que confere com os resultados obtidos no trabalho.

Eiro e Heinonen (2002) estudaram a reação de copigmentação com ácido cafeico, ferrúlico, clorogênico e gálico e observaram que a adição dos ácidos ferrúlico e cafeico melhorou a estabilidade da cor das antocianinas e o ácido gálico apresentou uma baixa capacidade de prevenir a perda da cor.

GRIS *et al.*, (2007b) ao estudar as antocianinas presentes nas uvas Carbenet Sauvignon verificou que a adição de ácido caféico (1:1; m\v) aumentou significativamente a estabilidade das antocianinas em sistema modelo e em iogurte, sendo os maiores valores de tempo de meia-vida obtidos em pH 3,0 estocado no escuro em temperatura de $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$ (6930 h).

SILVA *et al.*, (2010) a fim de melhor aproveitar os efeitos benéficos dos compostos bioativos presentes nas cascas de jabuticaba, caracterizaram e avaliaram a estabilidade dos corantes e os pigmentos que tiveram maior degradação foram os armazenado sob incidência da luz a 25°C , evidenciando o efeito deletérico da luz sob estes compostos.

Sari *et al.* (2012) estudaram a estabilidade das antocianinas da casca de jambolão na forma natural e copigmentando com ácido sinápico, ácido caféico, ácido ferrúlico e extrato polifenólico de alecim aumentando a baixa intensidade de cor da estrutura de diglucosidases, a estabilidade e a atividade antioxidante (DPPH), sendo que o extrato polifenólico de alecim preservou melhor a cor.

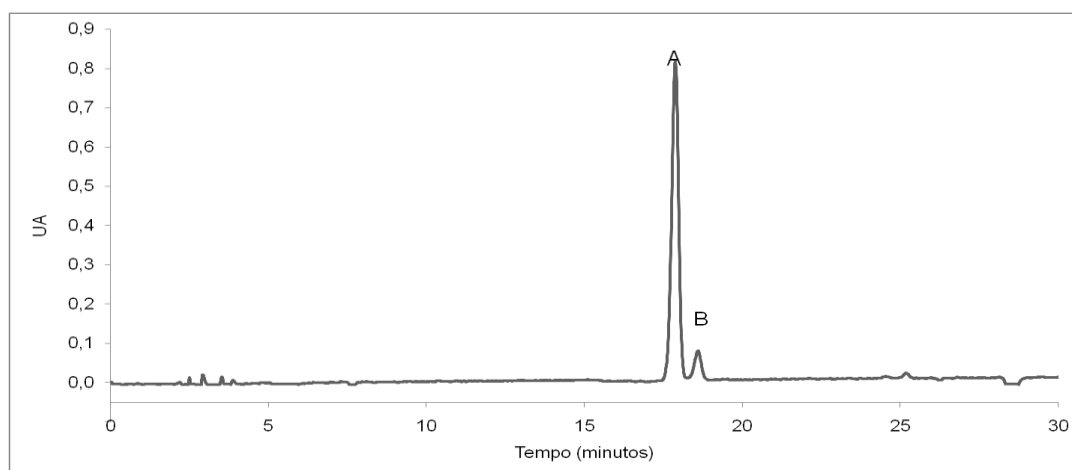
Tabela 10: Tempo de meia vida (dias) e percentagem de retenção de cor dos extratos de amora Brazo com e sem adição de copigmento nas diferentes condições de estocagem.

Amora Brazo					
Constante de velocidade de degradação da cor (k)					
T(°C)/Ambiente	Controle	Gálico	Caféico	Málico	<i>Camellia sinensis</i>
25 ± 3°C/ Luz	6,0 ± 0,2. 10 ⁻⁴ aB	6,0 ± 0,7. 10 ⁻⁴ aA	6,0 ± 0,3. 10 ⁻⁴ aA	4,0 ± 0,6. 10 ⁻⁴ bB	4,0 ± 0,8. 10 ⁻⁴ bA
25 ± 3°C/ Escuro	4,0 ± 0,1. 10 ⁻⁴ aC	2,0 ± 0,1. 10 ⁻⁴ bB	2,0 ± 0,3. 10 ⁻⁴ bB	2,0 ± 0,1. 10 ⁻⁴ bC	4,0 ± 0,6. 10 ⁻⁴ aA
5 ± 3°C /Luz	7,0 ± 0,2. 10 ⁻⁴ aA	6,0 ± 0,5. 10 ⁻⁴ abA	6,0 ± 0,6. 10 ⁻⁴ abA	6,0 ± 0,8. 10 ⁻⁴ bA	4,0 ± 0,1. 10 ⁻⁴ cAB
5 ± 3°C/ Escuro	3,0 ± 0, 2. 10 ⁻⁴ aD	2,0 ± 0,2. 10 ⁻⁴ bB	1,0 ± 0,1. 10 ⁻⁴ cC	1,0 ± 0,1. 10 ⁻⁴ cC	4,0 ± 0,3. 10 ⁻⁴ aB
Tempo de meia-vida em dias (T _{1/2})					
25 ± 3°C/ Luz	48,60 ± 1,59 ^{bC}	49,79 ± 5,70 ^{bB}	52,14 ± 3,07 ^{aC}	69,68 ± 8,64 ^{aC}	66,66 ± 10,69 ^{aB}
25 ± 3°C/ Escuro	78,72 ± 2,51 ^{cB}	172,64 ± 11,53 ^{aA}	124,14 ± 12,96 ^{bB}	132,39 ± 7,16 ^{bB}	70,59 ± 11,11 ^{cB}
5 ± 3°C /Luz	41,04 ± 1,20 ^{cC}	48,01 ± 4,07 ^{bcC}	47,30 ± 4,50 ^{bcC}	52,01 ± 7,45 ^{bD}	74,90 ± 2,76 ^{aB}
5 ± 3°C/ Escuro	95,19 ± 5,98 ^{cA}	124,37 ± 10,88 ^{cA}	242,40 ± 25,40 ^{aA}	200,48 ± 12,15 ^{bA}	94,67 ± 8,19 ^{cA}
% Retenção de Cor (%R)					
25 ± 3°C/ Luz	54,82 ± 1,01 ^{cC}	60,38 ± 3,56 ^{bC}	61,91 ± 1,74 ^{bC}	69,67 ± 3,30 ^{aC}	68,39 ± 4,42 ^{aB}
25 ± 3°C/ Escuro	72,81 ± 0,73 ^{cB}	86,51 ± 0,86 ^{aA}	81,67 ± 1,81 ^{bB}	82,79 ± 0,86 ^{abB}	69,90 ± 3,79 ^{cB}
5 ± 3°C /Luz	55,42 ± 0,97 ^{cC}	59,35 ± 2,72 ^{bcC}	58,87 ± 2,90 ^{bcC}	61,58 ± 4,18 ^{bD}	71,64 ± 0,87 ^{aB}
5 ± 3°C/ Escuro	76,89 ± 1,31 ^{cA}	81,74 ± 1,50 ^{bB}	90,15 ± 0,99 ^{aA}	88,27 ± 0,69 ^{aA}	76,74 ± 1,70 ^{cA}

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna e minúsculas na mesma linha representam resultados com diferença estatística, de acordo com o teste de Duncan ($p \leq 0,05$).

A quantificação e caracterização dos extratos de antocianinas de amora no decorrer do tempo foram realizadas também por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A quantificação analítica foi segundo curva dos padrões de cianidina-3-glucosídeo ($0,01 \text{ mg mL}^{-1}$ a $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$) e cianidina-3-rutinosídeo ($0,01 \text{ mg mL}^{-1}$ a $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$). Foi possível constatar através dos padrões que a principal antocianina presente no extrato de amora Brazo é a cianidina-3-glucosídeo. Os perfis das duas antocianinas presentes nos extratos (Tabela 11) mostram o decréscimo no decorrer do tempo das antocianinas, não sendo detectado a cianidina-3-rutinosídeo a partir de 36 dias quando os extratos foram armazenados com luz em temperatura de 25°C e a partir de 18 dias em temperatura de 5°C , demonstrando ser mais estável a temperatura de 25°C . A Figura 17 mostra o cromatograma do extrato de antocianina. O tempo de retenção médio para identificação de cianidina-3-glucosídeo e cianidina-3-rutinosídeo foi próximo dos tempos de retenção dos padrões, 17,72 e 18,44 minutos.

Figura 17: Cromatograma do extrato nas condições otimizadas de antocianina de amora Brazo rota-evaporado. (A) cianidina-3-glucosídeo, (B) cianidina-3-rutinosídeo.



Fonte: o autor.

Tabela 11: Redução dos valores de absorvância de amora Brazo pela metodologia de CLAE.

Amora Brazo- Estabilidade CLAE									
Tratamento	T(°C)	25 ± 3°C		25 ± 3°C		5 ± 3°C		5 ± 3°C	
	AMBIENTE/ TEMPO (dias)	Luz		Escuro		Luz		Escuro	
		cianidina-3 (mg/100g)							
		Glucosídeo	rutinosídeo	glucosídeo	Rutinosídeo	Glucosídeo	Rutinosídeo	glucosídeo	rutinosídeo
Controle	0	49,25 ± 0,31	2,63 ± 0,16	49,25 ± 0,31	2,63 ± 0,16	49,25 ± 0,31	2,63 ± 0,16	49,25 ± 0,31	2,63 ± 0,16
	21	47,94 ± 0,49	1,89 ± 0,07	51,15 ± 1,23	2,46 ± 0,14	24,35 ± 2,58	ND	51,7 ± 1,23	3,27 ± 0,09
	42	25,96 ± 1,25	ND	32,99 ± 0,66	2,39 ± 0,23	23,04 ± 1,62	ND	36,39 ± 1,34	3,02 ± 0,38
Ácido Gálico	0	52,54 ± 0,03	3,14 ± 0,16	52,54 ± 0,03	3,14 ± 0,16	52,54 ± 0,03	3,14 ± 0,16	52,54 ± 0,03	3,14 ± 0,16
	21	49,35 ± 1,16	1,50 ± 0,17	50,55 ± 1,48	2,37 ± 0,20	26,36 ± 1,93	ND	51,63 ± 1,16	2,62 ± 0,17
	42	22,62 ± 0,77	ND	33,22 ± 0,62	2,35 ± 0,25	24,05 ± 1,46	ND	36,38 ± 0,19	2,62 ± 0,14
Ácido Cafeico	0	47,41 ± 0,80	2,57 ± 0,15	47,41 ± 0,80	2,57 ± 0,15	47,41 ± 0,80	2,57 ± 0,15	47,41 ± 0,80	2,57 ± 0,15
	21	45,92 ± 0,50	1,55 ± 0,29	48,27 ± 1,48	2,31 ± 0,30	25,08 ± 1,70	ND	50,98 ± 0,50	3,14 ± 0,10
	42	23,96 ± 1,89	ND	32,47 ± 0,26	2,20 ± 0,15	23,91 ± 1,15	ND	35,54 ± 0,43	2,68 ± 0,23
Ácido Málico	0	54,28 ± 0,43	3,32 ± 0,07	54,28 ± 0,43	3,32 ± 0,07	54,28 ± 0,43	3,32 ± 0,07	54,28 ± 0,43	3,32 ± 0,07
	21	43,78 ± 1,04	1,16 ± 0,19	46,48 ± 1,56	1,95 ± 0,38	25,9 ± 1,65	ND	39,77 ± 7,00	2,39 ± 1,49
	42	25,14 ± 0,79	ND	30,63 ± 1,24	1,89 ± 0,33	24,48 ± 1,51	ND	33,54 ± 1,35	2,30 ± 0,40
Extrato <i>Camellia sinensis</i>	0	53,87 ± 0,43	3,46 ± 0,29	53,87 ± 0,43	3,46 ± 0,29	53,87 ± 0,43	3,46 ± 0,29	53,87 ± 0,43	3,46 ± 0,29
	21	30,38 ± 1,99	ND	37,38 ± 2,90	0,30 ± 0,01	19,94 ± 1,55	ND	23,61 ± 4,56	0,31 ± 0,01
	42	9,80 ± 0,21	ND	14,22 ± 0,18	ND	18,99 ± 1,10	ND	20,76 ± 1,04	ND

A técnica de HPLC revelou-se um dos mais eficientes métodos cromatográficos, em virtude do desenvolvimento de instrumentação automatizada. Permitiu a injeção de volumes de amostra cada vez menores e reproduzíveis e a detecção de quantidades de analito cada vez menores em sistemas de detecção em fluxo que indicam quando os componentes sofrem eluição da coluna. Os grupos substituintes das antocianinas geralmente influenciam a sua reatividade e a cor por variações da distribuição eletrônica. Os resíduos dos açúcares das antocianinas podem ser acilados com um ou mais grupos de ácidos alifáticos. De qualquer modo, pequenas quantidades de ácido podem sofrer parcial ou total hidrólise dos grupos acilo das antocianinas aciladas presentes em algumas plantas (LACOURSE, 1997).

Chen e Hrazdina (1981) reportaram que quando os flavonoides agem como copigmentos o efeito da copigmentação é aumentado por mais grupos hidroxilas. Os resultados estão de acordo com Cabrita *et al.* (2000), os quais mostraram que cianidina-3-glucosídeo é mais estável que pelargonidina-3 glicosídeo, a qual é a principal antocianina de morangos.

De acordo com Harbone (1973) dependendo dos procedimentos de extração e de purificação utilizados para obtenção de pigmentos de espécies vegetais pode-se obter isoladamente agliconas, antocianinas ou uma mistura das duas com predominância de antocianinas. Se na etapa de extração for usado como solvente extrator uma solução etanólica de HCl a 1% (v/v), a hidrólise completa dos açúcares desses compostos ocorrerá em 1 h, a uma temperatura de 60 °C. Guimarães *et al.* (2012) afirmaram que os dois fatores preponderantes e que devem ser controlados de forma simultânea para que aconteça a hidrólise completa dos açúcares são temperatura e pH ácido. Se ocorrer hidrólise total serão detectadas apenas as agliconas. Todavia, se estes dois fatores, pH ácido (menor que 1,0) e temperatura, forem usados em momentos distintos, haverá hidrólise parcial das antocianinas e, desse modo, serão detectadas antocianinas e suas respectivas agliconas.

Pacheco-Palencia e Taalcott (2010) conduziram um estudo para avaliar a influência de diferentes grupos de cofatores polifenólicos de ocorrência natural (extrato de alecrim comercial e chá rooibos) na estabilidade de antocianinas de açaí estocado sob diferentes condições de pHs (3,5 e 4,0) e

temperatura (5, 20 e 30°C). Durante a estocagem eles observaram que o pH e temperatura tiveram perdas de maneiras dependentes, e o tempo de meia vida para cianidina-3-rutinosídeo (2,67-210 dias) foi maior que para cianidina-3-glicosídeo (1,13-144 dias). A presença do chá proporcionou uma estabilidade 40% maior estabilidade das antocianinas quando comparado com a antocianina sem o copigmento.

6 CONCLUSÕES

A metodologia de superfície de resposta foi eficaz quando identificou os parâmetros de extração com ácido cítrico que foram tempo de 60 min., razão de 2 g / 30 mL e uma temperatura de 60°C, já para a extração com ácido clorídrico foram sugeridas as mesmas condições de tempo e razão, porém a uma temperatura de 20°C.

O aumento na relação copigmento/antocianina, aumentou o desvio no comprimento de onda de máxima absorção (efeito batocrômico) e os aumentos nos valores de absorbâncias das antocianinas (efeito hiperacrômico), sugerindo a complexação das antocianinas do extrato bruto de amoras e os copigmentos testados em pH 3,0 e a concentração de 1,4 mg/mL dos ácidos caféico, gálico, málico e 1,4 mL/mL de extrato polifenólico de *Camellia sinensis* apresentaram o maior efeito hiperacrômico no comprimento de onda de máxima absorção das antocianinas.

A estabilidade das antocianinas do extrato de amoras Brazo está intimamente associada a um conjunto de condições que são comuns ao processamento de alimentos, entre eles a temperatura e ambiente externo. Para um melhor resultado na estabilidade da cor das antocianinas é necessário que diferentes fatores sejam associados, o que confere coloração mais estável, por mais tempo.

As amostras mantidas no escuro a 5°C apresentaram maiores valores de tempo de meia vida e maior percentagem de retenção de cor. As antocianinas adicionadas de ácido caféico e ácido málico apresentaram resultados de tempo de meia vida que trazem perspectivas para aplicação deste corante natural.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA-MONTOYA, O.; VAILLANT, F.; COZZANO, S.; MERTZ, C.; PÉREZ, A. M.; CASTRO M. V. Phenolic content and antioxidant capacity of tropical blackberry (*Rubus adenotrichus* Schltdl.) during three edible maturity stages. . **Food Chemistry**, v. 119, n. 4, p. 1497-1501, 2010.

AMY KING, R. D. Y., G. . Characteristics and Occurrence of Phenolic Phytochemicals. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 99, p. 213-218, 1999.

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

ANTUNES, L. E. C.; DUARTE FILHO, J.; SOUZA, C. M. Conservação pós-colheita de frutos de amoreira-preta. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 3, p. 412-419, 2003.

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis of AOAC international. **gaitersburg: AOAC international**, v. 17 a, 2000.

ARAYA L, H.; CLAVIJO R, C.; HERRERA, C. Capacidad antioxidante de frutas y verduras cultivados en Chile. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 56, n. 4, p. 361-365, 2006.

ARUOMA, O. I. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 523-524, n. 0, p. 9-20, 2003.

ARUOMA, O. I.; MURCIA, A.; BUTLER, J.; HALLIWELL, B. Evaluation of the antioxidant and prooxidant actions of gallic acid and its derivatives. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, n. 1880-1885, 1993.

ASEN, S.; STEWART, R. N.; NORRIS, K. H. Co-pigmentation of anthocyanins in plant tissues and its effect on color. **Phytochemistry**, v. 11, n. 3, p. 1139-1144, 1972a.

ATTILIO, L. B. Custo de produção de amora-preta em região tropical. **Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal**, v. 31, n. 4, p. 1042-1047, 2009.

BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Free radicals and the main dietary antioxidants. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BJOROY, O.; FOSSEN, T.; ANDERSEN, O. M. Anthocyanin 3-galactosides from *Cornus alba* 'Sibirica' with glucosidation of the B-ring. **Phytochemistry**, v. 68, n. 5, p. 640-645, 2007.

BOMSER, J.; MADHAVI, D.L.; SINGLETARY, K.; SMITH, M. A. In vitro anticancer activity of fruit extracts from vaccinium species. . **Planta Medica**, v. 62, p. 212-216, 1996.

BORGES, G. D. S. C.; VIEIRA, F. G. K.; COPETTI, C.; GONZAGA, L. V.; FETT, R. Optimization of the extraction of flavanols and anthocyanins from the fruit pulp of *Euterpe edulis* using the response surface methodology. **Food Research International** v. 44, p. 708-715, 2011.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. . **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 9, p. 25-30, 1995a.

BRIDLE, P.; TIMBERLAKE, C. F. Anthocyanins as natural food colours—selected aspects. **Food Chemistry**, v. 58, n. 1–2, p. 103-109, 1997.

BROUILLARD, R. Origin of the exceptional colour stability of the Zebrina anthocyanin. **Phytochemistry**, v. 20, n. 1, p. 143-145, 1981.

BROUILLARD, R. The in vivo expression of anthocyanin colour in plants. **Phytochemistry**, v. 22, n. 6, p. 1311-1323, 1983.

BROUILLARD, R.; MAZZA, G.; SAAD, Z.; ALBRECHT-GARY, A. M. e CHEMINAT, A. The copigmentation reaction of anthocyanins: A micropobe for the structural study of aqueous solutions. **Journal of American Chemical Society**, v. 111, p. 2604-2611, 1989.

BRUGGINK, C. Backgrounds and possibilities for electrochemical detection in conjunction with anion exchange chromatography. **AVH Association - 7th Symposium; Reims: , 2000.**

BYAMUKAMA, R.; KIREMIRE, B. T.; ANDERSEN, O. M. Anthocyanins from fruits of *Rubus pinnatus* and *Rubus rigidus*. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 18, n. 6, p. 599-605, 2005.

CABRITA, L.; FOSSEN, T.; ANDERSEN, M. Colour and stability of the six common anthocyanidin 3-glucosides in aqueous solutions. **Food Chemistry**, v. 68, n. 1, p. 101-107, 2000.

CALVO, C.; SALVADOR, A. Use of natural colorants in food gels. Influence of composition of gels on their colour and study of their stability during storage. **Food Hydrocolloids**, v. 14, n. 5, p. 439-443, 2000.

CARLSEN, C.; STAPELFELDT, H. Light sensitivity of elderberry extract. quantum yields for photodegradation in aqueous solution. **Food Chemistry**, v. 60, n. 3, p. 383-387, 1997.

CASTREJON, A. D. R.; EICHHOLZ, I.; ROHN, S.; KROH, L. W.; HUYSKENS-KEIL, S. Phenolic profile and antioxidant activity of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) during fruit maturation and ripening. **Food Chemistry**, v. 109, p. 564-572, 2008.

CAVALCANTI, R. N.; SANTOS, D. T.; MEIRELES, M. A. A. Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems-An overview. **Food Research International**, v. 44, p. 499-509, 2011.

CHEN, I. J.; HRAZDINA, G. Structural aspects of anthocyanin-flavonoid complex formation and its role in plant colour. **Phytochemistry**, v. 20, p. 297-303, 1981.

CHEN, P.N.; CHU, S. C.; CHIOU, H. L.; KUO, W. H.; CHIANG, C. L. e HSIEH, Y. S. Mulberry anthocyanins, cyanidin 3-rutinoside and cyanidin 3-glucoside, exhibited an inhibitory effect on the migration and invasion of a human lung cancer cell line. **Cancer Letters**, v. 235, n. 2, p. 248-259, 2006.

CHOE, M.; KANG, J.; YOO, H.; CHOE, S.; YANG, C. H.; KIM, R. Y. Cyanidin and cyanidin-3-O- β -d-glucoside suppress the inflammatory responses of obese adipose tissue by inhibiting the release of chemokines MCP-1 and MRP-2. **Journal of Food Science and Nutrition**, v. 12, p. 148-153, 2007.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence and dietary burden. **Journal of Science and Food Agriculture**, v. 79, p. 362-372, 1999.

COSTA, C. T. D.; HORTON, D.; MARGOLIS, S. A. Analysis of anthocyanins in foods by liquid chromatography, liquid chromatography-mass spectrometry and capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 881, n. 1-2, p. 403-410, 2000.

DANGLES, O.; WIGAND, M. C.; BROUILLARD, R. Anthocyanin anti-copigment effect. **Phytochemistry**, v. 31, n. 11, p. 3811-3812, 1992.

DAUBENY, H. A.; MOORE, J. N.; JANICK, J. Fruit breeding. **London: John Willey**, v. 2, p. 109-190, 1996.

DAVIES, A. J.; MAZZA, G. Copigmentation of simple and acylated anthocyanins with colourless phenolic compounds. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, p. 716-720, 1993.

DIACONEASA, Z.; FLORICA, R.; RUGINA, D.; LUCIAN, C.; SOCACIU, C. HPLC/PDA-ESI/MS Identification of Phenolic Acids, Flavonol Glycosides and

Antioxidant Potential in Blueberry, Blackberry, Raspberries and Cranberries. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 2, n. 11, p. 781-785, 2014.

DÍAZ-REINOSO, B.; MOURE, A.; DOMINGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Supercritical CO₂ extraction and purification of compounds with antioxidant activity. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 2441-2469, 2006.

DIMITRIC-MARKOVIC, J. M. D.; PETRANOVIC, N. A.; BARANAC, J. M. Spectrophotometric study of the copigmentation of malvin with caffeic and ferulic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 5530-5536, 2000.

DIMITRIC´ MARKOVIC´, J. M.; PETRANOVIC´, N. A.; BARANAC, J. M. The copigmentation effect of sinapic acid on malvin: a spectroscopic investigation on colour enhancement. **Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology**, v. 78, p. 223-228, 2005.

DYRBY, M.; WESTERGARD, N.; STAPELFELDT, H. Light and Heat Sensitivity of Red Cabbage Extract in Soft Drink Models Systems. **Food Chemistry**, v. 72, p. 431-437, 2001.

EIRO, M. J.; HEINONEN, M. Anthocyanin color behaviour and stability during storage: Effect of intermolecular copigmentation. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 1461-7466, 2002.

ELISIA, I.; HU, C.; POPOVICH, D. G.; KITTS, D. D. Antioxidant assessment of an anthocyanin-enriched blackberry extract. **Food Chemistry**, v. 101, n. 3, p. 1052-1058, 2007.

ESTUPIÑAN, D. C.; SCHAWARTZ, S. J.; GARZÓN, G. A. Antioxidant activity, total phenolics content, anthocyanin, and color stability of isotonic model beverages colored with andes berry (*Rubus glaucus* Benth) Anthocyanin Powder. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 1, p. S26-S33, 2011.

FALCÃO, A. P.; CHAVES, E. D.; KUSKOSKI, E. M.; FETT, R.; FALCÃO, L. D.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Índice de polifenóis, antocianinas totais e atividade antioxidante de um sistema modelo de geléia de uvas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 3, p. 637-642, 2007.

FALCÃO, L. D. Estabilidade de antocianinas de uvas Carbenet Sauvignon e betalainas de beterraba Agrow Wonder adicionadas de ácido tânico em iogurte. **Revista Instituto Laticionios de Cândido Tostes**, v. 58, n. 332, p. 19-23, 2003.

FERRARI, C. C.; RIBEIRO, C. P.; AGUIRRE, J. M. Secagem por atomização de polpa de amora-preta usando maltodextrina como agente carreador. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 2, p. 157-165, 2012.

FERREIRA, D. S.; ROSSO, V. V. D.; MERCADANTE, A. Z. Compostos bioativos presentes em amora-preta (*Rubus* spp.). Bioactive compounds of blackberry fruits (*Rubus* spp.) grown in Brazil. p. 664-674, 2010.

FISCHER, U. A.; CARLE, R.; KAMMERER., D. R. Thermal stability of anthocyanins and colourless phenolics in pomegranate (*Punica granatum* L.) juices and model solutions. **Food Chemistry**, v. 138, p. 1800-1809, 2013.

FOSSSEN, T.; ANDERSEN, O. M. Anthocyanins from red onion, *Allium cepa*, with novel aglycone. **Phytochemistry**, v. 62, n. 8, p. 1217-1220, 2003.

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

FRANCIS, F. A new group of food colorants. . **Trends in Food Science and Technology: Cambridge**, v. 3, p. 27-30, 1992.

FRANCIS, F. J. Food colorants: anthocyanins. **CRC Critical Reviews. Food Science and Nutrition**, v. 8, p. 273–314, 1989.

FRANCIS, F. J. Anthocyanins and betalains: composition and applications. **Cereal Foods World**, v. 45, p. 208-213, 2000.

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

FULEKI, T.; FRANCIS, F. J. Quantitative methods for anthocyanins. 2. Determination of total anthocyanin and degradation index for cranberries juices. **Journal of Food Science and Nutrition**, v. 33, p. 78-83, 1968b.

GIUSTI, M.; SAONA-RODRIGUEZ, L. E.; WROLSTAD, R. E. Molar absorptivity and color characteristics of acylated and non-acylated pelargonidin-based anthocyanins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, , v. 47, p. 4631-4637, 1999.

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Characterization and measurement of anthocyanins by uv-visible spectroscopy. . **Current Protocols in Food Analytical. Chemistry. New York, John Willey & Sons.**, 2001.

GOMEZ, A. M.; OSSA, E. M. D. L. Quality of borage seed oil extracted by liquid and supercritical carbon dioxide. **Chemical Engineering Journal**, v. 88, p. 103-109, 2002.

GONNET, J.-F. Colour effects of co-pigmentation of anthocyanins revisited—2.A colorimetric look at the solutions of cyanin co-pigmented byrutin using the CIELAB scale. **Food Chemistry**, v. 66, n. 3, p. 387-394, 1999.

GONZÁLEZ-MONTELONGO, R.; LOBO, M. G.; GONZÁLEZ, M. Antioxidant activity in banana peel extracts: Testing extraction conditions and related bioactive compounds. **Food Chemistry**, v. 119, n. 3, p. 1030-1039, 2010a.

GONZÁLEZ-MONTELONGO, R.; LOBO, M. G.; GONZÁLEZ, M. The effect of extraction temperature, time and number of steps on the antioxidant capacity of methanolic banana peel extracts. **Separation and Purification Technology**, v. 71, n. 3, p. 347-355, 2010b.

GRIS, E. F.; FERREIRA, E.A.; FALCÃO, L. D.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Caffeic acid copigmentation of anthocyanins from Cabernet Sauvignon grape extracts in model systems. **Food Chemistry**, v. 100, n. 3, p. 1289-1296, 2007a.

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

HAGER, T. J.; HOWARD, L. R.; LIYANAGE, R.; LAY, J. O.; PRIOR, R. L. Ellagitannin composition of blackberry as determined by HPLC-ESI-MS and MALDI-TOF-MS. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 661-669, 2008.

HARBONE, J. B. Phytochemical methods - a guide to modern techniques of plant analysis. **Chapman and Hall: London**, 1973.

HARBORNE, J. B. Comparative Biochemistry of the Flavonoids. **Academic Press**, 1967.

HARBORNE, J. B. The Flavonoids: Advances in Research Since 1986 (Harborne, J. B.). **Journal of Chemical Education**, v. 72, n. 3, p. A73, 1995.

HASLER, C. M. Functional foods: benefits, concerns and challenges. A position paper from the American council on Science and health. **Journal Nutrition**, v. 132, n. 12, p. 3772-3781, 2002.

HASSIMOTTO, N. M. A.; MOTA, R. V.; CORDENUNSI, B. R.; LAJOLO, F. M. Physico-chemical characterization and bioactive compounds of blackberry fruits (*Rubus sp.*) grown in Brazil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 702-708, 2008.

HEINONEN, M.; LEHTONEN, P. J.; HOPIA, A. I. Antioxidant activity of berry and fruit wines and liquors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 25-31, 1998.

HIRSCH, G. E.; FACCO, E. M. P.; RODRIGUES, D. B.; VIZZOTTO, M.; EMANUELLI, T. Caracterização físico-química de variedades de amora-preta da região sul do Brasil Physicochemical characterization of blackberry from the Southern Region of Brazil. p. 942-947, 2012.

HOSSEINIAN, F. S.; LI, W.; BETA, T. Measurement of anthocyanins and other phytochemicals in purple wheat. **Food Chemistry**, v. 109, p. 916-924, 2008.

HU, C.; ZAWISTOWSKI, J.; LING, W.; KITTS, D. D. Black rice (*Oryza sativa* L. indica) pigmented fraction suppresses both reactive oxygen species and nitric oxide in chemical and biological model systems. . **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 5271-5277, 2003.

HUANG, A. S.; VON ELBE, J. H. Effect of pH on the degradation and regeneration of betanine. **Journal Food Science**, v. 52, n. 6, p. 1689-1693, 1987.

IAL, Métodos físicos e químicos para análise de alimentos. **Normas Analíticas. São Paulo.**, 2005.

JAAFARI, A.; MOUSE, H. A.; RAKIB, E. M.; BAREK, L. A. M.; TILAOU, M.; BENBAKHTA, C.; BOULLI, A.; ABBAD, A.; ZYAD, A. Chemical composition and antitumor activity of different wild varieties of Moroccan thyme. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 4, p. 477-491, 2007.

JACQUES, A. C.; PERTUZATTI, P. B.; BARCIA, M. T. Compostos bioativos em pequenas frutas cultivadas na região sul do Estado do Rio Grande do Sul. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, n. 2, p. 123-127, 2009.

JARDINI, F. A.; MANCINI FILHO, J. Antioxidant activity evaluation of different polarities extracts by pulp and seeds of pomegranate (*Punica granatum*, L.). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 1, p. 137-147, 2007.

JING, P.; ZHAO, S.; RUAN, S.; XIE, Z.; DONG, Y. Anthocyanin and glucosinolate occurrences in the roots of Chinese red radish (*Raphanus sativus* L.) and their stability to heat and pH. **Food Chemistry**, v. 133, p. 1569-1576, 2012.

KAFKAS, E.; KOSAR, M.; TÜREMIS, N. Analysis of sugars, organic acids and vitamin C contents of blackberry genotypes from Turkey. **Food Chemistry**, v. 97, p. 732-736, 2006.

KATSABOXAKIS, K.; PAPANICOLAOU, D.; MELANITOU, M. Stability of pigmented orange anthocyanins in model and real food system. **Italian Journal Food Science**, v. 10, p. 17-25, 1998.

KAUME, L.; GILBERT, W. C.; BROWNMILLER, C.; HOWARD, L. R.; DEVAREDDY, L. Cyanidin 3-O- β -d-glucoside-rich blackberries modulate hepatic gene expression, and anti-obesity effects in ovariectomized rats. **Journal of Functional Foods**, v. 4, n. 2, p. 480-488, 2012.

KAUME, L.; HOWARD, L. R.; DEVAREDDY, L. The blackberry fruit: a review on its composition and chemistry, metabolism and bioavailability, and health

benefits. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 5716-5727, 2012.

KELEBEK, H.; SELI, S.; CANBAS, A.; CABAROGLU, T. HPLC determination of organic acids, sugars, phenolic compositions and antioxidant capacity of orange juice and orange wine made from a Turkish cv. Kozan. . **Microchemical Journal**, v. 91, n. 2, p. 187-192, 2009.

KIRCA, A.; CEMEROGLU, B. Degradation kinetics of anthocyanins in blood orange juice and concentrate. **Food Chemistry**, v. 81, p. 583-587, 2003.

KIRCA, A.; ÖZKAN, M.; CEMEROG˘LU, B. Stability of black carrot anthocyanins in various fruit juices and nectars. **Food Chemistry**, v. 97, n. 4, p. 598-605, 2006.

KONG, J.; CHIA, L.; GOH, N.; CHIA, T.; BROUILLARD, R. Analysis and biological activities of anthocyanins. **Phytochemistry**, v. 64, n. 4, p. 923-933, 2003.

KUBO, I.; NORIYOSHI, M.; XIAO, P.; HARAGUCHI, H. Antioxidant activity of dodecyl gallate. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3533-3539, 2002.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; MORALES, M. T.; FETT, R. Wild fruits and pulps of frozen fruits: antioxidant activity, polyphenols and anthocyanins. **Ciência Rural**, v. 36, n. 4, p. 1283-1287, 2006.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; TRANCOSO, A. M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Food Science and Technology (Campinas)**. v. 25, n. 4, p. 726-732, 2005.

LACOURSE. **WR: Pulsed Electrochemical Detection in high performance liquid chromatography**. , 1997.

LEE, H. S.; HONG, V. Chromatographic analysis of anthocyanins. **Journal of Chromatography A**, v. 624, n. 1-2, p. 221-234, 10/30/ 1992.

LEJA, M.; MARECZEK, A.; WYZGOLIK, G.; KLEPACZ-BANIAK, J.; CZEKNSKA, K. Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. **Food Chemistry**, v. 100, n. 1, p. 237-240, 2007.

MACZ-POP, G. A.; RIVAS-GONZALO, J. C.; PÉREZ-ALONSO, J. J.; GONZALEZ-PARAMAS, A. M. Natural occurrence of free anthocyanin aglycones in beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Chemistry**, v. 94, n. 3, p. 448-456, 2006.

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

MALAJ, N. et al. Spectrophotometric study of the copigmentation of malvidin 3-O-glucoside with p-coumaric, vanillic and syringic acids. . **Food Chemistry**, v. 141, n. 4, p. 3614-3620, 2013.

MARÇO, P. H.; POPPI, R. J.; SCARMINIO, I. S. Analytical procedures for identifying anthocyanins in natural extracts. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1218-1223, 2008.

MARINOVA, E. M.; TONEVA, A. G.; YANISHLIEVA, N. V. Comparison of the antioxidative properties of caffeic and chlorogenic acids. . **Food Chemistry**, v. 114, n. 4, p. 1498-1502, 2009.

MARKAKIS, P. Stability of anthocyanins in foods. **Anthocyanins as food colors**. New York: Academic Press, p. 163-180, 1982.

MATEUS, N.; OLIVEIRA, J.; PISSARA, J.; GONZÁLES-PARAMÁS, A. M.; RIVAS-GONZALO, J. C.; SANTOS-BUELGA, C.; SILVA, A. M. S.; FREITAS, V. A new vinylpyranoanthocyanin pigment occurring in aged red wine. **Food Chemistry**, v. 97, n. 4, p. 689-695, 2006.

MATSUMOTO, H.; NAKAMURA, Y.; TACHIBANAKI, S.; KAWAMURA, S.; HIRAYAMA, M. Stimulatory effect of cyanidin 3-glycosides on the regeneration of rhodopsin. . **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 3560-3563, 2003.

MAZZA, G.; BROUILLARD, R. Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products. **Food Chemistry**, v. 25, n. 3, p. 207-225, 1987a.

MAZZA, G.; BROUILLARD, R. The mechanism of co-pigmentation of anthocyanins in aqueous solutions. . **Phytochemistry**, v. 29, p. 1097-1102, 1990b.

MEDINA, I.; UNDELAN, I.; LARSSON, K.; STORRO, I; RUSTAD, T.; JACOBSEN, C.; KRISTINOVÁ, V.; GALLARDO, J. M. Activity of caffeic acid in different fish lipid matrices: A review. **Food Chemistry**, v. 131, p. 730-740, 2012.

MELO, E. A.; MACIEL, M. I. S; LIMA, V.L. A.G.; LEAL, F.L.L.; CAETANO, A.C.S.; NASCIMENTO, R. J. Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 639-644, 2006.

MILLER, N. J.; RICE-EVANS, C. A. Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS^o radical cation assay. **Free Radical Research**, v. 26, n. 3, p. 195-199, 1997.

MOREIRA, A. V. B.; MANCINI-FILHO, J. Influence of spices phenolic compounds on lipoperoxidation and lipid profile of rats tissues. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 4, p. 411-424, 2004.

MOTA, R. V. Caracterização do suco de amora-preta elaborado em extrator caseiro. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 303-308, 2006.

MOTA, R. V. Caracterização física e química de geléia de amora-preta. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 539-543, 2006.

MOTA, R. V. D. Physico and chemical characterisation of blackberry jam. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 539-543, 2006.

MOYER, R. A.; HUMMER, K. E.; FINN, C. E. Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: Vaccinium, Rubus and Ribes. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 519-525, 2002.

MUKHTAR, H.; AHMAD, N. Tea polyphenols: prevention of cancer and optimizing health. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 71, p. 1698-1702, 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.

NARDINI, M.; D'AQUINO, M.; TOMASSI, G.; GENTILI, V.; DI FELICE, M.; SCACCINI, C. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by caffeic acid and other hydroxycinnamic acid derivatives. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 19, p. 541-552, 1995.

NETZEL, M.; NETZEL, G.; TIAN, Q.; SCHWARTZ, S.; KONCZAK, I. Native Australian fruits — a novel source of antioxidants for food. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 8, n. 3, p. 339-346, 2007.

NETZEL, M.; STRASS, G.; KAUL, C.; BITSCH, I.; DIETRICH, H.; BITSCH, R. In vivo antioxidative capacity of a composite berry juice. **Food Research International**, v. 35, n. 2–3, p. 213-216, 2002.

NICOUÉ, E. E.; SVARD, S.; BELKACEMI, K. Anthocyanins in wild blueberries of Quebec: extraction and identification. **Journal of agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 5626-5635, 2007.

PACHECO-PALENCIA, L. A.; TAALCOTT, S. T. Chemical stability of açai fruit (*Euphorbia oleracea* Mart.) anthocyanins as influenced by naturally occurring and externally added polyphenolic cofactors in model systems. **Food Chemistry**, v. 118, p. 17-25, 2010.

PANTELIDIS, G. E.; VASILAKAKIS, M.; MANGANARIS, G. A. Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and cornelian cherries. **Food Chemistry**, v. 102, p. 777-783, 2007.

PAREDES-LOPEZ, O.; CERVANTES-CEJA, M. L.; VIGNA-PÉREZ, M.; HERNÁNDEZ-PÉREZ, T. Berries: improving human health and healthy aging, and promoting quality life - a review. **Plant Foods Human Nutricional**, v. 65, p. 299-308, 2010.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International**, v. 39, n. 7, p. 791-800, 2006.

POLING, E. B. Blackberries. **Journal of Small Fruit and Viticulture**, v. 14, n. 1-2, p. 38-69, 1996.

POMPEU, D. R.; SILVA, E. M.; ROGEZ, H. Optimisation of the solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *Euterpe oleracea* using Response Surface Methodology. **Bioresource Technology** v. 100, p. 6076-6082, 2009.

PRADO, M. A.; GODOY, H. T. Corantes artificiais em alimentos. . **Alimentos e Nutrição**, v. 14, n. 2, p. 237-250, 2003.

PRODANOV, M. P.; DOMINGUEZ, J. A.; BLAZQUEZ, I.; SALINAS, M. R.; ALONSO, G. L. Some aspects of the quantitative/qualitative assessment of commercial anthocyanin-rich extracts. **Food Chemistry**, v. 90, n. 4, p. 585-596, 2005.

RAJHA, H. N.; DARRA, N. E.; HOBAIKA, Z.; BOUSSETTA, N.; VOROBIEV, E.; MOROUN, R. G.; LOUKA, N. Extraction of Total Phenolic Compounds, Flavonoids, Anthocyanins and Tannins from Grape Byproducts by Response Surface Methodology. Influence of Solid-Liquid Ratio, Particle Size, Time, Temperature and Solvent Mixtures on the Optimization Process **Food and Nutrition Sciences**, v. 5, p. 397-409, 2014.

RAMIREZ- TORTOSA, C. Anthocyanin-rich extracts decreases indices of lipid peroxidation and DNA damage in vitamin E- depleted rats. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, n. 9, p. 1033-1037, 2001.

RATNAM, D. V.; ANKOLA, D. D.; BHARDWAI, V.; SAHANA, D. K.; KUMAR, M. N. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. **Journal of Controlled Release**, v. 113, n. 3, p. 189-207, 2006.

RENAUD, S.; LORGERIL, M. D. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. **Lancet**, v. 339, p. 1523-1526, 1992.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

RICKMAN, J. C.; BARRETT, D. M.; BRUHN, C. M. Review: nutritional comparison of fresh, frozen and canned fruits and vegetables. Part 1. Vitamins

C and B and phenolic compounds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, p. 930-944, 2007.

RODRIGUES, H. G.; DINIZ, Y. S.; FAINE, L. A.; ALMEIDA, J. A.; FERNANDES, A. A. H.; NOVELLI, E. L. B. Nutritional supplementation with natural antioxidants: effect of rutin on HDL- cholesterol concentration. **Revista de Nutrição.**, v. 16, n. 3, p. 315-320, 2003.

ROSA, E. A. D.; SILVA, B. C.; SILVA, F. M.; TANAKA, C. M. A.; PERALTA, R. M.; OLIVEIRA, C. M. A.; KATO, L.; FERREIRA, H. D.; SILVA, C. C. Flavonoids and antioxidant activity in *Palicourea rigida* Kunth, Rubiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 484-488, 2010.

ROSSO, V. V.; MARCADANTE, A. Z. Evaluation of clour and stability of anthocyanins from tropical fruits in na isotonic soft drink system. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 8, p. 347-352, 2007.

ROWE, K. S.; K.J., R. Systhetic food coloring and behaviour: A dose response effect in a Double-blind, placebo-controlled, repeated-measures study. . **The Journal of Pediatrics**, v. 125, p. 691-698, 1994.

RUSTIONI, L.; BEDGOOD JR, D. R.; FAILLA, O.; PRENZLER, P. D.; ROBARDS, K. et al. Copigmentation and anti-copigmentation in grape extracts studied by spectrophotometry and post-column-reaction HPLC. **Food Chemistry**, v. 132, p. 2194-2201, 2012.

SANCHEZ-MORENO, C. Compuestos polifenólicos: efectos fisiológicos. Actividad antioxidante. **Alimentaria: Revista de tecnología e higiene de los alimentos**, n. 329, p. 29-40, 2002.

SARI, P.; WIJAYA, C. H.; SAJUTHI, D.; SUPRATMAN, U. Colous properties, stability, and free radical scavenging activity of jambolan fruit anthocyanins in a beverage model system: Natural and copigmented anthocyanins. **Food Chemistry**, v. 132, p. 1908-1914, 2012.

SARIBURUN, E.; SAHIN, S.; DEMIR, C.; TURKBEN, C.; UYLASER, V. Phenolic content and antioxidant activity of raspberry and blackberry cultivars. . **Journal Food Science**, v. 75, p. 326-335, 2010.

SCALZO, J.; POLITI, A.; PELLERGRINI, N.; MEZZETTI, B.; BATTINO, M. Plant genotype affects total antioxidant capacity and phenolic contents in fruit. **Nutrition Research, Los Angeles.**, v. 21, p. 207-213, 2005.

SCHIMITZ, W. E. A. O chá verde e suas ações como quimioprotetor. . **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina**, v. 26, n. 2, p. 119-130, 2005.

SEERAM, N. P. Berry fruits: compositional elements, biochemical activities, and the impact of their intake on human health, performance, and disease. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 627-629, 2008.

SEERAM, N. P.; ADAMS, L. S.; ZHANG, L.; LEE, R.; SAND, D.; SCHEULLER, H. S.; HEBER, D. Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cell in vitro. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 9329-9339, 2006.

SEERAM, N. P.; MOMIN, R. A.; NAIR, M. G.; BOURQUIN, L. D. Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant cyanidin glycosides in cherries and berries. **Phytomedicine**, v. 8, p. 362-369, 2001.

SEERAM, N. P.; NAIR, M. G. Inhibition of lipid peroxidation and structure activity related studies of dietary constituents anthocyanins, anthocyanidins and catechins. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 19, p. 5308-5312, 2002.

SELLAPPAN, S.; AKOH, C. C.; KREWER, G. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 2.432-2.438, 2002.

SERRAINO, I.; DUGO, L.; DUGO, P.; MONDELLO, L.; MAZZON, E.; DUGO, G.; CAPUTI, A. P.; CUZZOCREA, S. Protective effects of cyanidin-3-O-glucoside from blackberry extract against peroxynitrite-induced endothelial dysfunction and vascular failure. **Life Sciences**, v. 73, n. 9, p. 1097-1114, 2003.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications. **Lancaster: Technomic Publishing Co**, n. 1, p. 331, 1995.

SHOEMAKER, J. A. Small fruit culture. **Westport Conn : AVI-Bramble fruits**, p. 188-250, 1978.

SILVA, G. J. F. D.; CONSTANT, P. B. L.; FIGUEIREDO, R. W.; MOURA, S. M. Formulação e estabilidade de corantes de antocianinas extraídas das cascas de jabuticaba (*myrciaria* ssp.). **Alimentos e Nutrição**, v. 21, n. 3, p. 429-436, 2010.

SINGLETON, V.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

SIRIWOHARN, T.; WROLSTAD, R. E.; FINN, C. E. Influence of cultivar, Maturity, and Sampling on Blackberry (*Rubus* L. Hybrids) Anthocyanins, Polyphenolics, and Antioxidant Properties. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 8021-8030, 2004.

SOUSA, C. M. D. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Total phenolics and

antioxidant activity of five medicinal plants. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

STRACK, D.; WRAY, V. Anthocyanins. **Methods in Plant Biochemistry** v. 1, n. 325-56, 1989.

SUHAIJ, M. Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 6–7, p. 531-537, 9// 2006.

SUN, J.; CAO, X.; BAI, W.; LIAO, X.; HU, X. Comparative analyses of copigmentation of cyanidin 3-glucoside and cyanidin 3-sophoroside from red raspberry fruits. **Food Chemistry**, v. 120, n. 4, p. 1131-1137, 6/15/ 2010.

TATE, P.; KUZMAN, A.; SMITH, S. W.; WEDGE, D. E.; LARCOM, L. L. Comparative effects of eight varieties of blackberry on mutagenesis. **Nutrition Research**, v. 23, p. 971-979, 2003.

TATE, P.; STANNER, A.; SHIELDS, K.; SMITH, S.; LARCOM, L. Blackberry extracts inhibit UV-induced mutagenesis in *Salmonella typhimurium* TA100. **Nutrition Research**, v. 26, n. 2, p. 100-104, 2006.

TERCI, D. B. L.; ROSSI, A. V. Indicadores naturais de pH: usar papel ou solução? **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 684-688, 2002.

TIAN, Q.; GIUSTI, M. M.; STONEI, G. D.; SCHWARTZ, S. J. Characterization of a new anthocyanin in black raspberries (*Rubus occidentalis*) by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 94, n. 3, p. 465-468, 2006.

TONG, H.; LIANG, Z.; WANG, G. Structural characterization and hypoglycemic activity of a polysaccharide isolated from the fruit of *Physalis alkekengi* L. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, n. 2, p. 316-323, 2008.

TOUAIBIA, M.; JEAN-FRANÇOIS, J.; DOIRON, J. Caffeic acid, a versatile pharmacophore: An overview. . **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 1-18, 2011.

TSUDA, T.; HORIO, F.; OSAWA, T. Cyanidin 3-O- β -d-glucoside suppresses nitric oxide production during a zymosan treatment in rats. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 48, p. 305-310, 2002.

TSUDA, T.; HORIO, F.; UCHIDA, K.; AOKI, H.; OSAWA, T. Dietary cyanidin 3-O- β -d-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 133, p. 2125-2130, 2003.

TÜRKER, N.; ERDOĞ˘DU, F. Effects of pH and temperature of extraction medium on effective diffusion coefficient of anthocyanin pigments of black

carrot (*Daucus carota* var. L.). **Journal of Food Engineering**, v. 76, n. 4, p. 579-583, 2006.

VAN DER HEIJDEN, C. A.; JANSSEN, P. J.; STRIK, J. J. Toxicology of gallates: a review and evaluation. . **Food Chemistry Toxicology**, v. 24, p. 1067-1070, 1986.

VATTEM, D. A.; GHAEDIAN, R.; SHETTY, K. Enhancing health benefits of berries through phenolic antioxidant enrichment: focus on cranberry. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 14, p. 120-130, 2005.

VEAZIE, P. P.; COLLINS, J. K. Quality of erect-type blackberry frit after short intervals of controlled atmosphere storage. **Postharvest Biology and Technology**, v. 25, p. 235-239, 2002.

WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R. L. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. . **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 304-309, 1997.

WANG, J.; MAZZA, G. Inhibitory effects of anthocyanins and other phenolic compounds on nitric oxide production in LPS/IFN-gamma-activated RAW 264.7 macrophages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 850-857, 2002.

WANG, S. Y.; LIN, H. S. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 140-146, 2000.

WANG, W.-D.; XU, S.-Y. Degradation kinetics of anthocyanin in blackberry juice and concentrate. **Journal of Food Engineering**, v. 82, p. 271-275, 2007.

WORSLTAD, R. E. G., M. M. . Characterization and measurement of anthocyanins by uv-visible spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. New York, John Wiley & Sons, 2001.

WU, W.-M., LU, L.; LONG, Y.; WANG, T.; LIU, L.; CHEN, Q.; WANG, R. Free radical scavenging and antioxidative activities of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and its related compounds in solution and membranes: A structure-activity insight. **Food Chemistry**, v. 105, n. 1, p. 107-115, 2007.

WU, X.; CAO, G.; PRIOR, R. L. Absorption and metabolism of anthocyanins in elderly women after consumption of elderberry or blueberry. . **Journal of Nutrition**, v. 132, p. 1865-1871, 2002.

YAWADIO, R.; MORITA, N. Color enhancing effect of carboxylic acids on anthocyanins. **Food Chemistry**, v. 105, p. 421-427, 2007.

carrot (*Daucus carota* var. L.). **Journal of Food Engineering**, v. 76, n. 4, p. 579-583, 2006.

VAN DER HEIJDEN, C. A.; JANSSEN, P. J.; STRIK, J. J. Toxicology of gallates: a review and evaluation. . **Food Chemistry Toxicology**, v. 24, p. 1067-1070, 1986.

VATTEM, D. A.; GHAEDIAN, R.; SHETTY, K. Enhancing health benefits of berries through phenolic antioxidant enrichment: focus on cranberry. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 14, p. 120-130, 2005.

VEAZIE, P. P.; COLLINS, J. K. Quality of erect-type blackberry fruit after short intervals of controlled atmosphere storage. **Postharvest Biology and Technology**, v. 25, p. 235-239, 2002.

WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R. L. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. . **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 304-309, 1997.

WANG, J.; MAZZA, G. Inhibitory effects of anthocyanins and other phenolic compounds on nitric oxide production in LPS/IFN-gamma-activated RAW 264.7 macrophages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 850-857, 2002.

WANG, S. Y.; LIN, H. S. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 140-146, 2000.

WANG, W.-D.; XU, S.-Y. Degradation kinetics of anthocyanin in blackberry juice and concentrate. **Journal of Food Engineering**, v. 82, p. 271-275, 2007.

WORSLTAD, R. E. G., M. M. . Characterization and measurement of anthocyanins by uv-visible spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. New York, John Wiley & Sons, 2001.

WU, W.-M., LU, L.; LONG, Y.; WANG, T.; LIU, L.; CHEN, Q.; WANG, R. Free radical scavenging and antioxidative activities of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and its related compounds in solution and membranes: A structure-activity insight. **Food Chemistry**, v. 105, n. 1, p. 107-115, 2007.

WU, X.; CAO, G.; PRIOR, R. L. Absorption and metabolism of anthocyanins in elderly women after consumption of elderberry or blueberry. . **Journal of Nutrition**, v. 132, p. 1865-1871, 2002.

YAWADIO, R.; MORITA, N. Color enhancing effect of carboxylic acids on anthocyanins. **Food Chemistry**, v. 105, p. 421-427, 2007.

YING, G.; ZHAO, C. M.; JUN, W. On Rubus resources in Human and Fujian provinces. . **International Horticultural Congress**, v. 23, n. Florence., p. 4014, 1990.

ZANWAR, A. A. Chapter 80 - Role of Gallic Acid in Cardiovascular Disorders. In: WATSON, R. R.; PREEDY, V. R., *et al* (Ed.). **Polyphenols in Human Health and Disease**. San Diego: Academic Press, 2014. p.1045-1047. ISBN 978-0-12-398456-2.

ZARDO, D. M.; DANTAS, A. P.; VANZ, R.; WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A. Intensity of red pigmentation in apples and its influence on phenolic compounds content and antioxidant activity. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 1, p. 148-154, 2009.

ZHANG, B.; LIU, R.; HE, F.; ZHOU, P. P.; DUAN, C. Q. Copigmentation of malvidin-3-O-glucoside with five hydroxybenzoic acids in red wine model solutions: Experimental and theoretical investigations. **Food Chemistry**, v. 170, n. 0, p. 226-233, 2015.

ZHANG, Z.; KOU, X.; FUGAL, K.; MCLAUGHLIN, J. Comparison of HPLC methods for determination of anthocyanins and anthocyanidins in bilberry extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 688-691, 2004.

ZHENG, J.; DING, C.; WANG, L.; LI, G.; SHI, J.; LI, H.; WANG, H. Anthocyanins composition and antioxidant activity of wild *Lycium ruthenicum* Murr. from Qinghai-Tibet Plateau. **Food Chemistry**, v. 126, p. 859-865, 2011.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v. 64, n. 4, p. 555-559, 1999.