



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

ALESSANDRA PANTOJA LISBOA

**AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE ANTOCIANINAS E
PARTICIONAMENTO UTILIZANDO SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS
COMPOSTO DE Etanol+(NH₄)₂SO₄+ÁGUA PRESENTES NA CASCA DA
ACEROLA (*Malpighia emarginata* D.C.)**

BELÉM-PARÁ

2018

ALESSANDRA PANTOJA LISBOA

**AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE ANTOCIANINAS E
PARTICIONAMENTO UTILIZANDO SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS
COMPOSTO DE Etanol+(NH₄)₂SO₄+ÁGUA PRESENTES NA CASCA DA
ACEROLA (*Malpighia emarginata* D.C.)**

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

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Geormenny Rocha dos Santos

BELÉM - PA

2018

ALESSANDRA PANTOJA LISBOA

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

P198a PANTOJA LISBOA, ALESSANDRA
AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE
ANTOCIANINAS E PARTICIONAMENTO UTILIZANDO
SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS COMPOSTO DE
Etanol+(NH₄)₂SO₄+ÁGUA PRESENTES NA CASCA DA
ACEROLA (Malpighia emarginata D.C.) / ALESSANDRA
PANTOJA LISBOA. — 2018.
90 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Geormenny Rocha dos Santos
Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Tecnologia,
Universidade Federal do Pará, Belém, 2018.

1. sistemas aquosos bifásicos-SAB. 2. partição. 3.
antocianinas. 4. antioxidantes. 5. acerola (Malpighia
emarginata D.C.). I. Título.

CDD 664.022

ALESSANDRA PANTOJA LISBOA

AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE ANTOCIANINAS E
PARTICIONAMENTO UTILIZANDO SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS
COMPOSTO DE Etanol+(NH₄)₂SO₄+ÁGUA PRESENTES NA CASCA DA
ACEROLA (*Malpighia emarginata* D.C.)

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Geormenny Rocha Dos Santos
(PPGCTA/ITEC/UFPA - Orientadora)

Prof. Dr. Raul Nunes de Carvalho Junior
(PPGCTA/ITEC/UFPA) – Membro interno

Prof. Dra. Alessandra Lopes Santos
(PPGCTA/ITEC/UFPA) – Membro interno (Suplente)

Prof^a. Dra. Marta Helena Tavares Pinheiro
(PPGQ/ICEN/UFPA) - Membro externo

Prof. Dr. Jesus Nazareno Silva de Souza
(PPGCTA/ITEC/UFPA) – Membro externo

“Não te mandei eu? Esforça-te e tem bom ânimo. Não temas, nem te espantes, porque o Senhor teu Deus é contigo por onde quer que andares.” Josué 1,9.

À minha mãe que é o meu suporte para tudo na vida
e meu grande tesouro.

Dedico.

AGRADECIMENTO

Primeiramente a Deus, pois sem Ele nada seria, sempre me sustentando, acalentando meus choros e me fortalecendo. A Nossa Senhora que é minha mãe do Céu e sempre me protege por onde eu caminhar. E aos meus santos de devoção, São José e São João Paulo II, muito obrigada pela intercessão.

A minha mãe, provedora dos meus estudos, minha eterna gratidão pois sem ela eu não chegaria a qualquer lugar.

Aos meus amigos, por serem como irmãos para mim, sempre me aconselhando e incentivando os meus sonhos e à minha família que sempre torcem por mim.

Agradeço aos meus amigos mestrandos e doutorandos, por todo apoio, carinho, preocupação e amizade. A toda equipe do Laboratório Labex, Laos, Bioquímica, Lamefi, Labiotec, Laquanan, Laboratório de espectrometria, LabCOR, que apoiaram e incentivaram este trabalho.

À Elaine, Paulinho, Rômulo, Talita, Augusto, Bielly, Margareth, Silvio, Larissia, Jardi, Tássio, Renatinha, Ricardo, Alexandre, Lúcia e Abraão que ajudaram tanto com a amizade mas também com incentivos e mão de obra. A Hadryane pela sempre tão solícita ajuda na secretária da pós. Ao Sr Mário pela ajuda nas análises físico-químicas e a todos que não pouparam esforços para ajudar, muito obrigado mesmo!

A Prof. Dra. Geormenny, pela orientação durante todo o desenvolvimento deste trabalho. Seus ensinamentos e orientação foram de grande importância e relevância para a conclusão do mesmo.

À Prof. Dra Nádia e aos Prof (es). Dr (es). Raul, Renan e Éder obrigada pela disposição em sempre tirar as minhas dúvidas, Deus lhes pague! Aos Prof (es). Dr (es) Jesus e Marta por aceitarem participar da minha banca, contribuindo para o crescimento do meu trabalho.

Ao corpo docente do PPGCTA da UFPA que contribuiu para conhecimento que adquiri, apoio e ajudou para a minha formação. Agradeço imensamente a todos que me ajudaram de forma direta ou indireta, Deus lhes pague.

RESUMO

Antocianinas têm se destacado como corante natural na indústria alimentícia por serem poderosos antioxidantes *in vivo*, responsáveis pela coloração de azul à vermelho de flores, frutas e folhas. Além disso, o consumo regular deste corante está associado a possíveis benefícios à saúde humana despertando interesse na indústria de alimentos. As técnicas utilizadas para obtenção deste corante implicam na co-extração de substâncias indesejadas que podem comprometer a sua qualidade, por isso, é essencial uma etapa de purificação destes compostos antes da sua aplicação. A acerola (*Malpighia emarginata* D.C) é uma fruta com potencial de obtenção de compostos fenólicos dentre eles as antocianinas. Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do tempo, temperatura e diluição da solução extratora etanol/água do processo de extração por agitação magnética. Foi estudado a partição das antocianinas em sistemas aquosos bifásicos (SABs) Etanol+(NH₄)₂SO₄+água a 25°C e 35°C, verificado a capacidade antioxidante do extrato particionado, identificado a presença de antocianinas (Cianidina-3-ramnosídeo, Pelargonidina-3-ramnosídeo e Pelargonidina) na casca da acerola por meio da cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas. Ambas as fases superiores de ambos os sistemas apresentaram um maior índice de saturação de cor em relação às fases inferiores. No entanto o SAB etanol+(NH₄)₂SO₄+água a 25°C, mostrou melhor eficiência de extração de 56% e obteve maiores concentrações de antocianinas totais de 73,08 ±0,55 (mg/100g) e o sistema a 35°C apresentou maior AAT de 6122,45±0,07 (µM Trolox/g de amostra).

Palavras-chaves: antioxidantes, antocianinas, sistemas aquosos bifásicos-SAB, acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) , partição

ABSTRACT

Anthocyanins have emerged as a natural food in the food industry by powerful antioxidants in vivo, responsible for the coloration of blue to flowers, fruits and leaves. In addition, regular consumption of this dye is associated with food orders waiting for interest in the food industry. The techniques used for the removal of this type of processing are a co-extraction of undesirable substances which may compromise the quality, therefore a purification step of the compounds prior to their application is essential. An acerola (*Malpighia emarginata D.C*) is a fruit with potential to obtain phenolic compounds such as anthocyanins. The objective of this work was to evaluate the effects of temperature, dilution and extraction solution of ethanol / water extraction process by magnetic stirring. The studied is one of the aqueous biphasic systems (SABs) Ethanol + (NH₄)₂SO₄ + H₂O at 25°C and 35°C, presents an antioxidant capacity of the particulate extract, identifies the presence of anthocyanins (Cyanidin-3-ramnoside, Pelargonidin-3 ramnoside and Pelargonidin) in the acerola bark by means of the high voltage liquid chromatography to the mass spectrometer. Both upper controllers of all systems with higher class saturation index in relation to the later classes were SAB ethanol + (NH₄)₂SO₄ + H₂O at 25°C, better extraction efficiency of 56% and higher anthocyanin results of 73.08 ± 0.55 (mg / 100g) and the system at 35 ° C showed higher total antioxidant activity (AAT) of 6122.45 ± 0.07 (μM Trolox / g sample).

LISTA FIGURA

Figura 1- Estrutura química básica das antocianinas.....	21
Figura 2- Mudanças estruturais em meio aquoso em função do pH.....	23
Figura 3- Representação esquemática de um diagrama de fase retangular, em coordenadas cartesianas.....	27
Figura 4- Diagrama de fase para sistemas aquosos bifásicos, expresso em coordenadas triangulares.....	28
Figura 5- Caracterização da matéria prima.....	41
Figura 6- Produção do extrato.....	42
Figura 7- Particionamento.....	43
Figura 8- Extrato das antocianinas particionadas no SAB.....	52
Figura 9- Cromatograma de íons totais para as antocianinas presentes na amostra da casca da acerola liofilizada	57
Figura 10- Espectros de íons totais de antocianinas presentes na amostra da casca da acerola liofilizada.....	58
11 Sistema etanol+Li ₂ SO ₄ +H ₂ O.....	62

TABELAS

Tabela 1- Nomes e grupos substituintes de antocianidinas mais frequentes na natureza	21
Tabela 2- SAB contendo etanol e sais inorgânicos.....	31
Tabela 3- SAB contendo PEG e sais inorgânicos.....	32
Tabela 4-Planejamento experimental.....	48
Tabela 5- Frações mássicas das linhas de amarrações do Sistema Etanol+Sulfato de Amônio+Água a 25°C.....	49
Tabela 6- Frações mássicas das linhas de amarrações do Sistema Etanol + Sulfato de Amônio + Água a 35°C.....	50
Tabela 7- Caracterizações físico- químicas da casca da acerola.....	56
Tabela 8- Antocianinas totais expressas em equivalente da antocianina principal cianidina3-glucosídeo para as extrações por agitação magnética.....	60
Tabela 9- Antocianinas totais expressas em equivalente da antocianina principal cianidina-3-glucosídeo para as extrações por agitação magnética sem evaporação.....	61
Tabela 10- Frações mássicas e densidade das linhas de amarrações do Sistema Etanol + Sulfato de Amônio + Água a 25° e 35°C.....	63
Tabela 11- Resultados de ácido ascórbico, ABTS e antocianinas totais.....	64
Tabela 12- Análises realizadas nas LA dos sistemas de 25°C e 35°C.....	67
Tabela 13- Resultados da análise de cor.....	69

LISTA DE ABREVIACÕES

FQ – Físico química

UR – Umidade Relativa

SAB – Sistemas aquosos bifásicos

LB – Linha binodal

PEG – Polietilenoglicol

ELL – Equilíbrio líquido-líquido

LA – Linha de amarração

CLA – Comprimento da linha de amarração

ILA – Inclinação da linha de amarração

w – Fração mássica

AAT – Atividade Antioxidante total

AT – Antocianinas totais

AA – Ácido áscórico

at – Açúcares totais

FS – Fase superior

FI – Fase inferior

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo geral:	17
2.2 Objetivos específicos:	17
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
3.1 Acerola.....	18
3.2 Antocianinas	18
3.2.1 Estabilidades das antocianinas	20
3.2.2 Estrutura química	20
3.2.3 Influenciadores da cor das antocianinas (pH e Temperatura)	21
3.2.4.Degradação das antocianinas	24
3.2.5 Extração de biomoléculas.....	24
3.3 Sistema aquoso bifásico (SAB)	25
3.3.1 Diagrama de fase.....	26
3.3.2 Sistema álcool/ sal.....	29
3.3.3 Sistema polietilenoglicóis (PEGs)/ sal	31
3.4 Atividade Antioxidante.....	32
3.5 Ácido ascórbico – Vitamina C.....	34
3.6 Cor	35
3.7 A cromatografia líquida (LC)	36
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
4.1 Matéria prima.....	40
4.2 Métodos	40
4.2.1 Caracterização físico – química	44
4.2.2 Extração.....	46

4.2.3 Dados de equilíbrio dos sistemas etanol+Li ₂ SO ₄ +H ₂ O e etanol+(NH ₄) ₂ SO ₄ +H ₂ O (Sistema em branco).....	49
4.2.4 Partição das antocianinas do extrato no SAB - etanol+(NH ₄) ₂ SO ₄ +H ₂ O	52
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1 Caracterização físico-química e Antocianinas totais	56
5.1.1 Cromatografia líquida (LC-MS)	57
5.2. Extração de antocianinas	59
5.3 Sistema etanol+Li ₂ SO ₄ +H ₂ O	62
5.3.1 Sistema etanol+(NH ₄) ₂ SO ₄ +H ₂ O	63
5.3.2 Partição das LA do sistema Etanol/(NH ₄) ₂ SO ₄ /água	63
6 CONCLUSÃO.....	71
7 REFERÊNCIAS	72

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, aumentou o interesse em explorar os benefícios para a saúde humana ocasionados pelas capacidades de eliminação de radicais livres e antioxidantes das antocianinas naturalmente disponíveis em frutas e vegetais.

A fruticultura é um dos setores de maior destaque do agronegócio brasileiro, por meio de uma grande variedade de culturas produzidas em todo o país e em diversos climas, que conquista resultados expressivos e gera oportunidades para os pequenos negócios brasileiros. O Brasil é o terceiro maior produtor de frutas no mundo, ficando atrás apenas de China e Índia, o que mostra a relevância do setor para a economia brasileira (SEBRAE, 2015).

A aparência de um produto é um fator importante na hora de se tomar a decisão para sua compra, mas estudos revelam que não basta apenas uma boa imagem, os consumidores estão cada vez mais conscientes sobre saúde e bem estar. Além disso, há uma busca crescente, por parte dos consumidores, por uma alimentação mais saudável, o que impulsiona a inovação para uso de ingredientes naturais que atendam às exigências do mercado. Corantes naturais são pigmentos extraídos de fontes naturais e têm a finalidade de conferir, intensificar ou padronizar a coloração de produtos alimentícios. Os principais corantes naturais utilizados no Brasil são: urucum, cúrcuma, luteína, clorofila, páprica, caroteno natural, antocianinas, beterraba, carvão vegetal, entre outros (FOOD INGREDIENTS BRASIL Nº 18, 2011).

A Acerola (*Malpighia emarginata* DC.), originária das Antilhas, foi introduzida no Brasil há 50 anos, hoje é o principal produtor, consumidor e exportador mundial, a acerola é uma fruta tropical bastante utilizada no desenvolvimento de novos produtos. Possibilitando, dessa forma, absorver grande parte da colheita, favorecendo o consumo de frutas durante o ano todo e a redução do desperdício de alimentos (CAETANO et al., 2012). Devido ao elevado teor de ácido ascórbico, a acerola possui boa aceitação no mercado; assim como suas características nutricionais, agregadas ao sabor e a textura, que agrada ao paladar do consumidor. Possui destaque por conter carotenóides e fotoquímicos, como as antocianinas.

Os benefícios das antocianinas na saúde humana estão relacionados ao seu efeito antioxidante, tornando-se importante na prevenção de doenças crônicas não

transmissíveis e prevenção de diversos tipos de neoplasias. A literatura evidencia que o consumo de alimentos fontes de antocianinas tem relação protetoras contra o estresse oxidativo, fato este importante na redução de danos ao DNA e outras estruturas células que poderiam desencadear processos inflamatórios e doenças como o câncer, porém tal mecanismo no câncer ainda não está totalmente esclarecido (SANTOS et al., 2014).

As substâncias antioxidantes são formadas por vitaminas, minerais, pigmentos naturais e outros compostos vegetais (antioxidantes não enzimáticos) e, ainda, por enzimas (antioxidantes enzimáticos) que combatem o efeito nocivo dos radicais livres. Tal como o nome indica, os antioxidantes impedem a oxidação de outras substâncias químicas (YAHIA, 2010).

As antocianinas são responsáveis pela cor vermelha da acerola. A determinação da composição antociânica nos alimentos é uma questão importante para fins de identificar suas estruturas químicas. Os perfis das antocianinas presentes em frutas e vegetais podem ser usados como impressões digitais através dos quais a autenticidade de matérias-primas, produtos e extratos podem ser avaliadas. Uma série de metodologias estão disponíveis para a análise de antocianinas, dentre elas está a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada ao espectrômetro de massas (MS). Neste tipo de cromatografia os componentes são separados pelo enchimento da coluna que envolve várias interações físicas ou químicas entre as moléculas e as partículas de enchimento. Estes componentes são detectados à saída da coluna por um detector.

A extração convencional normalmente é realizada empregando solventes orgânicos e geralmente é combinada com agitação/e ou aquecimento. O solvente utilizado na extração pode influenciar significativamente no nível de componentes recuperados, água, metanol, etanol, acetona, soluções aquosas destes solventes e acetato de etila são comumente usados como solventes de extração. (GONZÁLEZ- MONTELONGO et al., 2010).

As operações de extração líquido-líquido que usam sistemas de duas fases aquosas como meio extrator surgem como um método alternativo para a extração e purificação de biomoléculas, nesse sentido os sistemas aquosos bifásicos (SAB) são formados por espécies químicas que, quando misturadas em determinadas faixas de composição e temperatura, dividem-se em duas fases com composições diferentes, em equilíbrio termodinâmico, cujas fases são constituídas majoritariamente por água. Os solutos se

distribuem entre as duas fases, dependendo da sua afinidade relativa por cada uma das fases individuais (ALBERTSSON, 1986).

Os sistemas usando polímeros/sal são os mais utilizados, no entanto o seu uso é mais caro, com isso alternativas vem sendo estudadas como os SAB compostos por álcool de cadeia curta/ sal. O uso do álcool permite um custo menor e uma fácil recuperação do solvente por evaporação (YAU et al., 2015).

Espera-se que durante a formação do SAB a fase superior tenha maior concentração da molécula alvo, enquanto que a fase inferior seja enriquecida com componentes indesejáveis (contaminantes). Particularmente, no SAB formado por polímeros termossensível ou álcool, a fase topo pode ainda sofrer transformações de modo a recuperar unicamente o produto desejado via elevação de temperatura ou evaporação do solvente (WU, Y et al., 2014; YAU et al., 2015).

A escolha do método de extração de antocianinas depende da proposta de aplicação, é importante que seja um método simples, rápido, de baixo custo e que utilize solventes extratores de baixa toxicidade. Em geral, SAB é usado como um passo de separação para obter as moléculas a partir de uma solução aquosa previamente preparada.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

- Avaliar a capacidade de extração de antocianinas da casca de acerola utilizando a extração por agitação magnética estudando a partição das antocianinas no sistema aquoso bifásico (SAB) PEG+(NH₄)₂SO₄+H₂O; Etanol+(NH₄)₂SO₄+ H₂O e Etanol+Li₂SO₄+ H₂O a 25°C e 35°C.

2.2 Objetivos específicos:

- Avaliar os efeitos do tempo, temperatura e diluição da solução extratora etanol/água sobre a extração de antocianinas da casca de acerola utilizando processo de extração, por agitação magnética.
- Determinar o coeficiente de partição das antocianinas da casca de acerola nos sistemas aquosos bifásicos (SAB) PEG+(NH₄)₂SO₄+ H₂O; Etanol+(NH₄)₂SO₄+ H₂O e Etanol+ Li₂SO₄+ H₂O a 25°C e 35°C.
- Verificar a atividade antioxidante do material particionado no sistema Etanol+(NH₄)₂SO₄+ H₂O a 25°C e 35°C.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Acerola

A acerola (*Malpighia emarginata* D.C.), é um fruto de grande valor nutricional por apresentar altas concentrações de ácido ascórbico (AA), agregando um alto potencial nutricional para o consumo do fruto fresco ou industrializado (MENDONÇA; MEDEIROS, 2011; SEGTOWICK et al., 2013). O fruto nasce na aceroleira que é um arbusto de até 3 metros de altura, seu tronco se ramifica desde a base, e sua copa é bastante densa com pequenas folhas verde-escura e brilhantes. Suas flores de cor rósea esbranquiçada, são disposta em cachos, têm floração durante o ano todo, e após três a quatro semanas se dá a frutificação. A formação do fruto se processa rapidamente entre 22 e 25 dias (NEVES, 2007).

Os frutos são drupas tricarpeladas, com epicarpo fino, mesocarpo carnoso e suculento, podem ser constituídos de três caroços triangulares, alongados, a superfície do fruto pode ser lisa ou apresentar, entre os carpelos, sulcos rasos ou profundos, dependendo de sua forma de cultura podem apresentar formatos diferenciados, através do clima, solo, irrigação e tempos de colheita (RITZINGER e RINTZINGER, 2011).

O estágio de desenvolvimento (abertura da flor até o amadurecimento) da acerola compreendeu um período de 25 dias. A acerola no estágio maduro destaca-se por apresentar teores significativos destes compostos bioativos, dentre eles a antocianina e o ácido ascórbico que fazem desta fruta uma fonte promissora de compostos antioxidantes. (MARANHÃO, 2010).

A acerola apresenta grande potencial econômico, podendo ser utilizadas em diversos segmentos como nas indústrias farmacêutica, de cosmético, mas principalmente na alimentícia (LIMA et al., 2013).

3.2 Antocianinas

As antocianinas pertencem ao grupo dos flavonoides que compõem a maior classe de compostos fenólicos e compreendem um grande número de substâncias coloridas e

estão amplamente distribuídas na natureza. Este subgrupo dos flavonóides se caracteriza por ser o principal componente dos pigmentos vermelho, azul e roxo (RAMOS ESCUDERO; GONZALEZ-MIRET; GARCIA-ASUERO, 2012) nas pétalas de flores, nas frutas, nos grãos e vegetais em geral.

Suas características e benefícios na saúde humana por meio dos alimentos já foram descritas por pesquisadores (LEYDENS, 2011; PEREIRA, 2012; FERREIRA, 2013; BRITO, 2016).

As antocianinas são os membros mais reconhecidos e visíveis dentre os fitoquímicos bioflavonóides devido sua propriedade de coibir a atuação de radicais livres e por atuarem como antioxidante, os pigmentos de antocianinas são os mais divulgados como alternativa para o tratamento de certas doenças. A antocianina isolada e misturas de bioflavonóides ricos em antocianinas pode promover proteção contra a clivagem do DNA, atividade estrogênica, inibição de enzimas, entre outras (LILA, 2004, GONG; LI; YANG, 2014).

É bem sabido que as antocianinas são solúveis em solventes polares e comumente extraídas por misturas aquosas de solventes orgânicos tais como etanol, metanol ou acetona (KANO et al., 2005).

Geralmente, a medição de antocianinas é feita por análise espectrofotométrica. Esta técnica não reflete a cor quando mede a absorbância de um extrato num particular comprimento de onda. Por outro lado, a cor visível, que é um indicativo da concentração do pigmento, pode ser medida instantaneamente usando colorímetros Hunter para controle de qualidade (KARA e ERÇELEBI, 2013).

Vendramini e Trugo (2004) determinaram a composição qualitativa dos compostos fenólicos em acerola proveniente do Rio de Janeiro-Brasil, através de CLAE UV/Vis, sendo que os compostos separados foram divididos em dois grupos: 1) compostos fenólicos antociânicos identificados como malvidina-3,5-diglicosilada, cianidina-3-monoglicosilada e pelargonidina; 2) compostos fenólicos não antociânicos identificados como ácidos fenólicos (ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido cumárico e ácido ferúlico) e como flavonóides (quercetina e kaempferol).

3.2.1 Estabilidades das antocianinas

Todos os produtos apresentam um tempo de vida útil que é caracterizado pela sua estabilidade nutricional, sensorial, química, física e microbiológica. Entende-se por estabilidade de um produto o período no qual ele pode ser consumido de forma que as suas características nutricionais e microbiológicas estejam conservadas (YUYAMA et al., 2008). Geralmente as vitaminas, ácidos, carboidratos, proteínas, pigmentos entre outros constituintes, são sensíveis a fatores externos e internos como a luz, temperatura, umidade, tempo de processamento, pH, degradando facilmente devido a reações enzimáticas de óxido-redução (FREITAS et al., 2006; YUYAMA et al., 2008).

A estabilidade das antocianinas é maior sob condições ácidas, mas pode ocorrer degradação por vários mecanismos, iniciando com perda da cor, seguida do surgimento de coloração amarelada e formação de produtos insolúveis. A estabilidade da cor de antocianinas é dependente da estrutura e da concentração dos pigmentos, além de fatores como o pH, temperatura e a presença de oxigênio (LOPES et al., 2007).

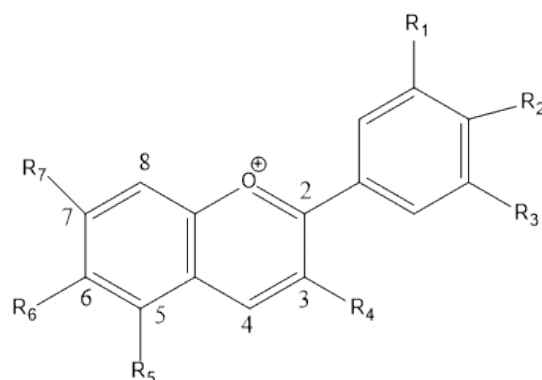
3.2.2 Estrutura química

O principal emprego biológico atribuído às antocianinas é a atividade antioxidante (SUN et al., 2002; MEYERS et al., 2003), essa atividade se deve a sua estrutura química. As antocianinas são as principais responsáveis por inúmeras tonalidades de cores encontradas em flores, frutas e folhas, e responsáveis pela maioria das colorações azuis, violeta e vermelho.

Em produtos naturais, a maioria das substâncias responsáveis pela coloração pertence à classe dos flavonoides. Os flavonoides possuem estrutura marcada pela presença de um esqueleto com 15 átomos de carbono na forma $C_6C_3C_6$, e são divididos em classes dependendo do estado de oxidação do anel central de pirano (MARÇO et al., 2008).

Suas moléculas possuem estruturas elaboradas, e são baseadas em um esqueleto policíclico de quinze carbonos, onde os diferentes grupos ligados, “R”, caracterizam cada composto de antocianinas (BRILHANTE et al., 2012) como mostra a figura 1.

Figura 1- Estrutura química básica das antocianinas



Fonte: Arquivo pessoal

Das 23 antocianidinas, apenas 6 são as mais comuns nas plantas: Cianidina Delfinidina, Pelargonidina, Peonidina, Petunidina, Malvidina., dentre outras mostradas na tabela 1.

Tabela 1- Nomes e grupos substituintes de antocianidinas mais frequentes na natureza.

Aglicona	R1	R2	R3	R4	Massa Molecular (daltons)
Cianidina	OH	H	OH	H	287
Tricetidina	OH	OH	H	H	287
Aurantidina	H	H	OH	OH	287
Delfinidina	OH	OH	OH	H	303
6-Hidroxicianidina	OH	H	OH	OH	303
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃	OH	H	331
Pelargonidina	H	H	OH	H	271
Luteolidina	OH	H	H	H	271
Peonidina	OCH ₃	H	OH	H	301
Petunidina	OCH ₃	OH	OH	H	317

3.2.3 Influenciadores da cor das antocianinas (pH e Temperatura)

A importância das cores na percepção pelos sentidos é marcante, sendo um dos critérios utilizados na identificação, aceitação ou rejeição de produtos alimentícios (SILVA et al., 2006). A coloração das antocianinas depende do seu pH, variando de vermelho em meio

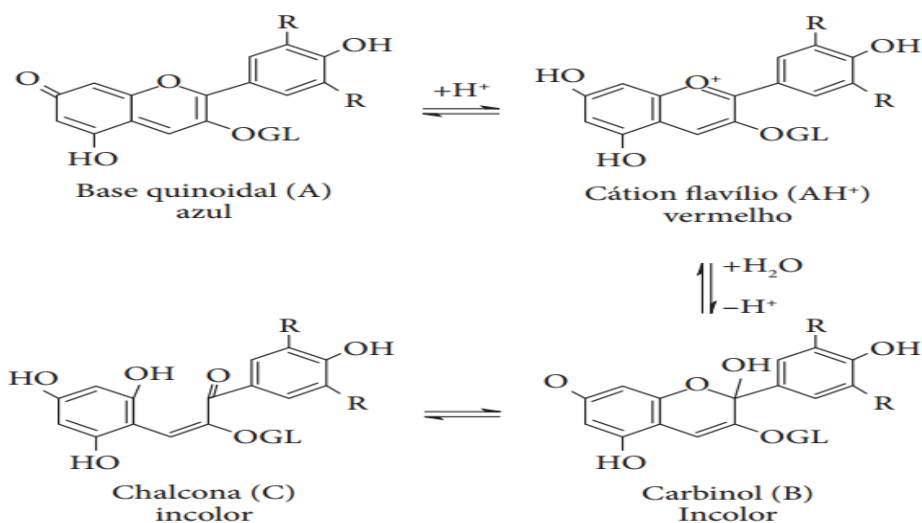
ácido a azul em meio básico, sendo elas mais estáveis em meio ácido (ANDERSEN; JORDHEIM, 2006; TSAO, 2010). A variação se deve também à instabilidade das antocianinas frente a fatores que podem ocorrer durante o processo de despolpamento e congelamento da polpa, tais como incorporação de oxigênio, incidência de luz e temperatura, conforme citado por Ribeiro e Seravalli (2004).

i. Potencial hidrogeniônico (pH)

O pH é o fator que mais influência na coloração das antocianinas, visto que, em função de sua acidez ou alcalinidade, estas podem apresentar diferentes estruturas. (LEE et al., 2005; ANDERSEN; JORDHEIM, 2006). Em valores de pH baixo (pH ~2,0), as antocianinas se apresentam na forma de cátion flavílium, exibindo cor vermelha. Quando acontece o equilíbrio ácido-base ocorre uma reação de hidratação do cátion ou a protonação desse íon. A primeira reação gera um produto de coloração incolor, uma pseudobase, chamada carbinol (B) que em meio neutro (pH ~ 6,0) se transforma em chalcona (C), que também é um produto incolor. Já a segunda reação produz uma base quinoidal (A), de coloração azul, que se apresenta em co-equilíbrio com o cátion flavílium (AH^+). (COUTO; RAMOS; CAVALHEIRO, 1998; CANUTO, 2011).

Estruturas moleculares encontradas em solução aquosa com diferentes valores de pH. Cátion flavilium (AH^+), A) base quinoidal; B) carbinol ou pseudobase e C) chalcona (adaptado de LEVI et al., 2004) podem ser observadas na figura 2.

Figura 2- Mudanças estruturais em meio aquoso em função do pH



Fonte: LEVI et al., (2004)

Bordignon et al., (2009) relatam que, conforme a variação do pH, ocorre mudança dos máximos de absorção no espectro, fato que interfere diretamente no doseamento destes metabólitos na matéria-prima analisada.

ii. Temperatura

O uso de extratos de antocianinas como corantes naturais é limitado em decorrência da grande instabilidade desses compostos a fatores abióticos, dentre os quais se destacam a luz e a temperatura (LIMA et al., 2003; LIMA et al., 2005). Kirca e Cemeroglu (2003), demonstraram que a degradação térmica de antocianinas segue uma relação linear entre concentração de antocianinas e tempo de estoque em determinada temperatura, seguindo assim, uma reação de primeira ordem. O mecanismo exato da degradação desses pigmentos em solução aquosa não é bem elucidado, mas acredita-se que elevadas temperaturas promovam a formação de chalconas (incolor), como o primeiro passo de degradação (PATRAS et al., 2010).

3.2.4.Degradação das antocianinas

A acerola muda de tonalidade com a maturação, passando do verde ao amarelo, laranja, vermelho ou roxo (PORCU e RODRIGUEZ-AMAYA, 2003) devido, sobretudo, à degradação da clorofila e à síntese de antocianinas e carotenoides. A cor vermelha da acerola, no estágio maduro, decorre da presença de antocianinas (LIMA et al., 2002b). Em acerola, evidencia-se uma grande variação no teor de antocianinas influenciando consequentemente na cor dos frutos (LIMA et al., 2002a). Quanto maior o teor de antocianinas, melhor a aceitação do produto por parte do consumidor (MOURA et al., 2002).

Contudo, a combinação entre antocianinas e ácido ascórbico pode ser mutuamente destrutiva em presença de oxigênio, o que limita a fortificação de alimentos contendo antocianinas (TALCOTT et al., 2003).

West M. et al., (2013) estudaram a cor e as estabilidades químicas de seis antocianinas, incluindo o cianidina-3-glicosídeo, altamente purificado e presente em extratos semi purificados (também contendo outras antocianinas) de bagaço de uva, milho roxo e arroz preto, foram determinados em combinação com ácido ascórbico em soluções em diferentes concentrações. Valores de pH (3,0 e 4,0) e temperaturas (6 a 40 ° C) e pós liofilizados em diferentes umidades relativas (43 98% UR). As alterações químicas e de cor foram analisadas usando medições CIELAB e HPLC, respectivamente. Em líquidos, a estabilidade foi inversamente relacionada ao aumento do pH e temperatura; para pós, a estabilidade foi inversamente relacionada à umidade relativa. A degradação mútua de antocianinas e ácido ascórbico em solução foi confirmada, baseado na estrutura da antocianina, incluindo diferentes núcleos de flavilium (três tipos) e tipo de acilação (dois alifáticos, um ácido cinâmico) ou pureza final do extrato.

3.2.5 Extração de biomoléculas

A extração é uma fase muito importante no isolamento, identificação e utilização de compostos funcionais a partir de materiais vegetais (LAPORNIK et al., 2005). Várias técnicas de extração convencional foram relatadas para a extração de fenóis a partir de

cascas de citros como a extração de solvente (ANAGNOSTOPOULOU et al., 2006; JEONG et al., 2004; LI et al., 2006a; MANTHEY e GROHMANN, 1996; XU, YE, CHEN E LIU, 2007; ZIA-UR-REHMAN, 2006).

Barros et al., (2011) apresentaram os resultados da extração convencional de *Asparagus acutifolius*, à temperatura ambiente, com metanol: água (80:20%, v/v), e descreveram um perfil fenólico constituído por três flavonoides e um ácido fenólico, sendo a rutina (3-Orutinósido de quercetina) o composto fenólico mais abundante.

A extração de compostos bioativos de fontes vegetais utilizando solventes eutéticos foi obtida por Almeida F, (2016), a partir de extrações realizadas por agitação magnética e por maceração, que obteve extratos fenólicos preparados a partir de amostras de espargos liofilizados.

3.3 Sistema aquoso bifásico (SAB)

Os sistemas aquosos bifásicos (SAB) são sistemas usados em processos de extração líquido-líquido que tem sido utilizada para desenvolver bioprocessos para a recuperação primária e purificação parcial de uma variedade de produtos biológicos, como proteínas, material genético, bionanopartículas e fitoquímicos, bem como células e organelas celulares. (ALBERTSSON et al., 1990; ANDREWS et al., 2010; MAZZOLA et al., 2008).

Existem muitas áreas de oportunidade de pesquisa dentro da operação SAB contínua, como o particionamento de bioafinidade (RUIZ-RUIZ et al., 2012), o fracionamento de proteínas, o uso de SAB alternativos (Sistemas baseados Álcool/sal, PEG/sal, PEG/Dextrana, e líquidos iónicos/sal) para recuperar diferentes biomoléculas, os modelos operacionais para otimização de processos, recirculação de fase, operação em grande escala, etc. (MAYOLO-DELOISA et al., 2010).

Os primeiros estudos envolvendo SAB datam do final da década de 1950 e início da década de 1960, quando Albertsson PA, (1961) demonstrou a aplicação desta técnica para o processamento a jusante de partículas e macromoléculas. Desde então, foram realizadas pesquisas extensas sobre o uso de estratégias baseadas em SAB para recuperação e purificação de biomoléculas. Esses estudos podem ser divididos em três

áreas principais: (1) caracterização do comportamento particional dos produtos biológicos, (2) desenvolvimento de sistemas líquido-líquido novos ou modificados para aumentar a seletividade de separação e (3) desenvolvimento de estratégias e abordagens para a aplicação da tecnologia SAB em larga escala. Além disso, os SAB demonstraram ter aplicações analíticas para a caracterização físico-química (particularmente propriedades relacionadas à superfície, como hidrofobicidade e carga eletroquímica) de compostos, bionanopartículas e células.

Em um sistema aquoso bifásico, quando as espécies químicas (polieletrólitos, polímeros, líquidos iônicos, entre outras) são misturadas em determinadas composições e temperatura dividem-se em duas fases de composições diferentes, que se encontram em equilíbrio termodinâmico. Ou seja quando as duas fases do SAB estão em equilíbrio, nenhuma propriedade termodinâmica varia em uma dimensão temporal, ou, ainda, não existe troca resultante de matéria e energia entre as fases.

3.3.1 Diagrama de fase

3.3.1.1 Curva binodal

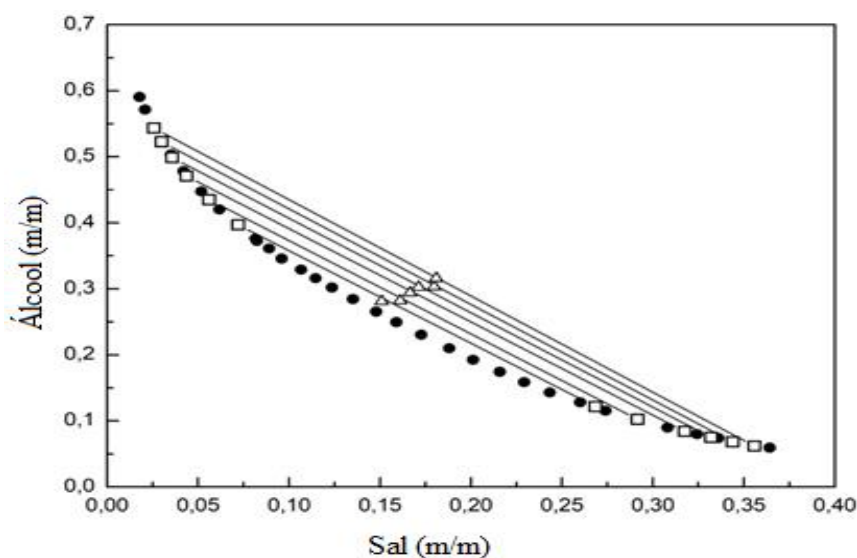
Os SAB podem ser obtidos pela combinação de dois polímeros hidrossolúveis, que apresentam estruturas quimicamente diferentes, ou pela mistura de um polímero e um sal (orgânico ou inorgânico) e, mais recentemente, pela mistura de líquidos iônicos e sais inorgânicos. Entretanto, para aplicar os sistemas aquosos bifásicos ao estudo de partição de biomoléculas é importante que se conheça previamente seus diagramas de fases. Esses diagramas representam graficamente a composição na qual se formam duas fases líquidas em equilíbrio termodinâmico. Pode ser dividido basicamente em duas regiões que em coordenadas cartesianas (figura 3) na região situada acima da linha binodal, ocorre a formação de duas fases; e abaixo dessa linha, o sistema se mantém homogêneo.

Quaisquer pontos que pertençam à região bifásica e estejam na mesma linha de amarração (LA) terão as mesmas propriedades termodinâmicas intensivas, porém sendo distintas as variáveis termodinâmicas extensivas (massa, volume etc.). O mesmo

raciocínio aplica-se para as fases inferiores formadas por composições globais localizadas sobre a mesma linha de amarração (ZASLAVSKY, 1995; DA SILVA E LOH, 2006).

Nestes diagramas encontramos inúmeras informações, todas relacionadas à minimização da energia livre do sistema. Por exemplo, podemos obter, em quais composições globais o sistema é monofásico ou bifásico (figura 3 e 4), sendo estas duas regiões demarcadas por uma linha denominada curva binodal.

Figura 3- Representação esquemática do diagrama de fase retangular, em coordenadas cartesianas



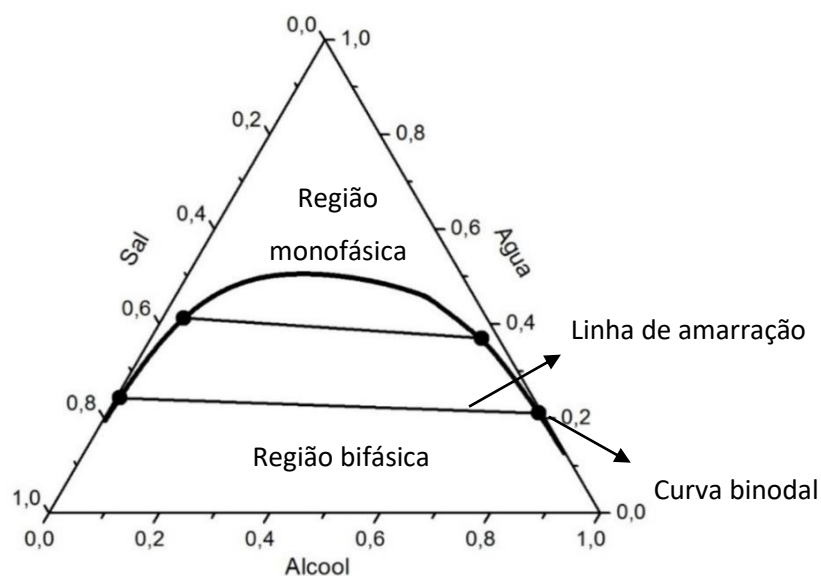
Fonte: Lago, (2017); Gama, (2018)

3.3.1.2 Dados de equilíbrio/ Tie lines

Também são representadas as linhas de amarração (“tie lines”), que são retas que ligam pontos no diagrama que representam a composição das duas fases em equilíbrio. Qualquer conjunto de pontos que pertençam à região bifásica e que estejam sobre a mesma linha de amarração fornecerá fases superiores que possuirão propriedades termodinâmicas intensivas iguais (densidade, volume molar, entalpia molar, etc.), entretanto, sendo distintas as suas variáveis termodinâmicas extensivas (massa, volume, etc). Aplica-se o mesmo raciocínio para as fases inferiores formadas a partir de composições globais localizadas sobre uma mesma linha de amarração. (DA SILVA E LOH, 2006).

No diagrama de fases (figura 4) a abscissa nos informa a concentração do eletrólito (sal) e a ordenada a concentração do polímero presente no sistema. Esta representação também nos mostra em quais composições globais o sistema se encontra homogêneo ou heterogêneo, sendo essas duas regiões separadas pela linha binodal (LB). A posição da binodal varia de acordo com o tipo de espécies químicas, natureza química do eletrólito, temperatura e pH do meio (SVENSSON et al., 1997).

Figura 4- Diagrama de fase para sistemas aquosos bifásicos, expresso em coordenadas triangulares



Fonte: Lago, (2017); Gama, (2018)

Existem distintos métodos para a obtenção da curva binodal, entretanto o mais utilizado envolve titulação turbidimétrica e quantificação das composições das fases.

3.3.1.3 Qualidade dos dados de equilíbrio

As correlações de OTHMER-TOBIAS e HAND (CARTINI E RAIGANI, 1978), equação 01 e 02, respectivamente, serão utilizadas para testar a validade dos dados experimentais dos sistemas estudados, de modo a medir a confiabilidade dos dados obtidos experimentalmente. A linearidade destas correlações indica o grau de confiabilidade dos dados,

$$\ln\left(\frac{1 - W_1^S}{W_1^S}\right) = A + B \ln\left(\frac{1 - W_2^I}{W_2^I}\right) \quad (1)$$

$$\ln\left(\frac{W_3^S}{W_1^S}\right) = A + B \ln\left(\frac{W_3^I}{W_1^I}\right) \quad (2)$$

Sendo que w_1 corresponderá à fração mássica de PEG/etanol, w_2 a fração mássica de sal, e w_3 a fração mássica de água; e os sobrescritos S e I representarão os pontos na fase superior e a fase inferior, respectivamente. Com a construção das linhas de amarrações os componentes se distribuem entre as duas fases de formas diferentes até atingir o equilíbrio termodinâmico, O coeficiente de partição (k) serve para avaliar como os componentes se distribuem entre as fases e são calculados como a razão descrita pela equação 03:

$$K = \frac{C_i(\text{fase superior})}{C_i(\text{fase inferior})} \quad (3)$$

onde: C_i (fase superior) e C_i (fase inferior) são as concentrações no equilíbrio do componente i nas fases superior e inferior, respectivamente (i = água, PEG/etanol, sal ou antocianinas). Os valores dos coeficientes de partição elevados nos sistemas estudados indicarão o elevado potencial de extração do material i em sistemas de duas fases aquosas.

O comprimento das linhas de amarração (CLA) e inclinação das linhas de amarração (ILA) foram calculados de acordo com as Equações 4 e 5, respectivamente.

$$CLA = \sqrt{[(C_{Ps} - C_{Pi})^2 + (C_{Ss} - C_{Si})^2]} \quad (4)$$

$$ILA = \frac{(C_{Ps} - C_{Pi})}{(C_{Ss} - C_{Si})} \quad (5)$$

3.3.2 Sistema álcool/ sal

Nos últimos anos, os sistemas aquosos bifásicos com base num sistema de álcool e sal têm sido utilizados para a recuperação de produtos sensíveis ao calor a partir de extratos puros (CHEN et al., 2007). Este tipo de SAB tem vantagens se usado para separar compostos bioativos.

Sistemas de Álcool /sais inorgânicos são usados como um novo sistema para purificar compostos naturais, este sistema tem muitas vantagens como baixo custo, baixa tensão interfacial, quando analisado por HPLC tem boa resolução, bem como alto rendimento devido à sua estrutura, já que estes são adequados para compostos hidrofílicos (RITO-PALOMARES, 2004).

Álcoois de cadeia curta como o etanol pode formar um sistema estável e ajustável com sais inorgânicos (por exemplo, fosfato e sulfato) (JIANG et al., 2009; GÜNDÜZ, 2000).

Wu et al., (2011) mostraram que a extração, identificação e atividade antioxidante do extrato de antocianinas da amora foram relatados em seu estudo por sistemas aquosos bifásicos: relação solvente-sólido 45:1 (mL/g), etanol a 25% (w/w), concentração de sulfato de amônio a 22% (w/w) e pH 3,3; O rendimento de antocianina e o coeficiente de partição nas condições ótimas foram de 90,02% e 19,62, respectivamente. E o resultado da análise HPLC-ESI-MS revelou oito tipos de compostos, e as principais antocianinas foram cianidina-3-O-glicosídeo e cianidina-3-O-rutinosídeo, delfindina-3-rutinosídeo, delfindina-3-(6-malonil)-glicosídeo e peonodina-3-xilosil-ramnosídeo. O SAB não afetou a composição da mistura de antocianina, e o extrato mostrou uma atividade antioxidante relativamente elevada em comparação com a extração convencional, concluindo que o SAB era o método desejado que purificou as antocianinas em uma única etapa, o método também reduziu o tempo de processamento e reduziu o custo. O SAB é muito promissor na purificação de outros pigmentos antocianinas naturais.

Outros trabalhos utilizando álcool e sais inorgânicos podem ser observados na tabela 2.

Tabela 2- SAB contendo etanol e sais inorgânicos.

Sal	Álcool	Amostra	T(°C)	Referência
(NH ₄) ₂ SO ₄	Etanol	Caldo de fermentação	20	Li, Z. et al (2010)
NaH ₂ PO ₄ /(NH ₄) ₂ SO ₄	Etanol	Suco de uva	25	Wu, Y. et al (2014)
(NH ₄) ₂ SO ₄	Etanol	Batata roxa	20-60	Liu, X. et al (2013)
(NH ₄) ₂ SO ₄	Etanol	Amora	25-50	Wu X. et al (2011)
(NH ₄) ₂ SO ₄	Etanol	Mirtilo	30	Almeida, H (2016)

3.3.3 Sistema polietilenoglicóis (PEGs)/ sal

Os PEGs são moléculas relativamente estáveis, biodegradáveis, não tóxicas e são muito utilizados na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica. São também conhecidos pelos nomes comerciais de poliglicol E[®], carbowax E[®] e pluracol E[®], dependendo da empresa que os fabricam. Os polietilenoglicóis são fornecidos na forma de soluções incolores estáveis ou pastas, se possuírem massas moleculares menores que 1000. Os PEGs de massas moleculares acima de 1000 são encontrados na forma de pó ou de flocos brancos e podem ser estocados a temperatura ambiente, sendo que a 4°C a oxidação dessas soluções é retardada. A oxidação do PEG é detectada pela diminuição do pH, devido à liberação de grupos ácidos que altera a coloração da solução para marrom (RABELO, 1999).

Os sistemas formados dois polímeros (PEG, dextrano e polipropileno glicol) ou um polímero e um sal (fosfato, sulfato e citrato) são combinados em concentrações 28 críticas que formam duas fases cujo componente principal é a água. Os primeiros estudos envolvendo SAB datam do final da década de 50 e início dos anos 60, quando Albertsson, (1986) demonstrou o grande potencial dos sistemas polímero-polímero para a recuperação primária de macromoléculas biológicas. Dado que a força iônica nos sistemas de polímero-polímero é extremamente baixa, eles são usados preferencialmente para a separação, recuperação e purificação de solutos extremamente sensíveis a ambientes iônicos, bem como células viáveis e organelas susceptíveis ao choque osmótico. Além dos sistemas de polímero-polímero tradicionais, existem SABs que

exploram o uso de copolímeros de óxido de etileno e óxido de propileno que se revelaram eficientes para o desenvolvimento de processos de fracionamento. Os SABs de polímerosal são usados para uma grande variedade de biomoléculas, principalmente proteínas e partículas, sendo a sua única inconveniência a força iônica relativamente alta na fase rica em sal.

A aplicação de particionamento em duas fases para cultura de células de morango produtoras de antocianina relatadas por Eda Hiro et al., (2005) demonstrou o efeito das mudanças nas propriedades da superfície celular na partição em SABs.

Meychik et al., (2001) mostraram que alterações superficiais foram causadas por alterações no metabolismo secundário intracelular em células acumuladas de antocianina. Foram utilizados 7% p/p de dextrano T500 e 4,4% p/p de sistema PEG 6000 para experiências de particionamento celular. Além disso, a adição de sulfato de lítio ou tampão de fosfato de potássio (pH 6.4) deslocou o comportamento de partição das células do fundo para a fase superior. As células cultivadas com carga negativa mudaram a partição de acordo com sua superfície celular, adicionando sulfato de lítio ao sistema. Este sal é conhecido por partição diferencialmente para as fases superior e inferior, causando uma diminuição no potencial elétrico do sistema, equilibrando as interações eletroquímicas e hidrofílicas entre a superfície celular e a solução de fase.

Outros trabalhos utilizando PEG e sais inorgânicos podem ser visto na tabela 3.

Tabela 3: SAB contendo PEG e sais inorgânicos.

Sal	M _{PEG} [g / mol]	Temperatura (°C)	Referência
(NH ₄) ₂ SO ₄	1000-6000	10-45	Salabat. A. (2001)
NaH ₂ PO ₄	995-5886	25-45	Zafarani-Moattar et al (2001)
(NH ₄)H ₂ PO ₄	5886	25-45	Zafarani-Moattar et al (2002)
K ₃ PO ₄	1000-3400	05-45	Huddleston et al (2003)

3.4 Atividade Antioxidante

O conceito de capacidade antioxidante originou-se pela química e foi posteriormente adaptado à biologia, medicina, epidemiologia e nutrição (CAO E PRIOR, 1998; FLOEGEL et al. 2010; PELLEGRINI et al., 2003). Ele descreve a capacidade das moléculas redox em alimentos e sistemas biológicos para eliminar os radicais livres. Este conceito fornece uma imagem mais ampla dos antioxidantes presentes em uma amostra biológica, pois considera os efeitos aditivos e sinérgicos de todos os antioxidantes em vez do efeito de compostos isolados e, portanto, pode ser útil para estudar os potenciais benefícios para a saúde dos antioxidantes em substâncias oxidativas doenças mediadas pelo estresse (BRIGHENTI et al., 2005; PUCHAU et al., 2009).

Os métodos antioxidantes também podem auxiliar na escolha das espécies de planta para estudos químicos e farmacológicos, comprovando ou não a presença de substâncias com capacidade antioxidantes em alimentos e bebidas, podendo agregar valor comercial aos alimentos (ALVES et al., 2010).

A capacidade antioxidante pode ser expressa por meio de vários parâmetros, incluindo a remoção de um radical peroxil (ORAC - oxygen radical absorbance capacity, TRAP - total reactive antioxidant potential), a capacidade de redução de metal (FRAP - ferric reducing antioxidant power, CUPRAC - cupric ion reducing antioxidant capacity), a capacidade de remoção de radical orgânico (ABTS - 2,20-azino-bis (ácido 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfônico), DPPH - peroxidação do 2,2-difenil-1-picrylhydrazil) e a quantificação de produtos formados durante a peroxidação de lipídeos (TBARS, a 30 oxidação do LDL, co-oxidação do β -caroteno). Os métodos FRAP, ABTS, DPPH e ORAC são mais utilizados para determinar a capacidade antioxidante in vitro.

O método FRAP baseia-se na habilidade antioxidante de um composto, em transformar o ferro na forma complexada com a 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) Fe^{3+} - TPTZ em Fe^{2+} TPTZ (ferroso-tripiridil-triazina), na presença de um antioxidante e em condições ácidas. O complexo Fe^{2+} -TPTZ possui coloração azul podendo ser verificada na absorbância 593 nm, esta coloração é proporcional a concentração de Fe na amostra. As limitações do método estão relacionadas ao fato de que o redutor que é hábil para reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} às vezes pode não ser um antioxidante e muitos antioxidantes podem não ter a habilidade específica para reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} , a exemplo a glutatona (VASCONCELOS et al. 2008).

No método ABTS, quando o perfulfato de potássio é adicionado ao ácido 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolina)-6-sulfônico (ABTS), faz com que este seja convertido ao seu cátion (ABTS^{*+}). Este radical de cor azul esverdeado absorve a luz a 734 nm e é reativo para a maioria dos antioxidantes tanto de natureza hidrofílica quanto hidrofóbica, sendo esta uma de suas vantagens quando comparada a outros métodos. Neste ensaio antioxidante, o cátion radical ABTS azul esverdeado é convertido em sua forma neutra, tornando-se incolor, devido a sua captura pela substância antioxidante avaliada. A reação pode ser monitorada espectrofotometricamente (MARTYSIAK-ZUROWSKA e WERONIKA-WENTA, 2012). Uma vantagem deste método é seu uso ser permitido tanto em soluções orgânicas quanto aquosas (PRADO, 2009).

O método DPPH se baseia na capacidade antioxidante de uma determinada substância em sequestrar o radical DPPH, transformando a sua forma reduzida chamada hidrazina. Quando uma determinada substância age como redutora, doando átomos de hidrogênio ao radical DPPH, a hidrazina é obtida e como consequência ocorre uma mudança na coloração de violeta a amarelo pálido. Este decaimento da coloração pode ser observado pelas leituras nas absorvâncias 515 a 528 nm (ALVES et al., 2010).

O método ORAC possui uma vantagem muito importante com relação aos outros métodos de determinação da capacidade antioxidante que usam a absorvância, que é o uso da fluorescência como medida do dano oxidativo, pois assim ocorre menor interferência dos compostos coloridos presentes nas amostras. Isso é fator importante a se considerar quando se analisam alimentos que possuem cor (especialmente frutos e 31 hortaliças), suplementos de produtos naturais e vinho tinto. Outra vantagem é o uso de radicais peroxila ou hidroxila como pró-oxidantes, conferindo maior significado biológico em relação aos métodos que usam oxidantes não necessariamente, próoxidantes fisiológicos (LIMA, 2008).

Os métodos para avaliação da atividade antioxidante propostos na literatura são diversos, porém alguns são mais apropriados que outros, dependendo da natureza dos compostos presentes na constituição de cada fruta.

3.5 Ácido ascórbico – Vitamina C

A acerola (*Malpighia emarginata*) é uma fruta que tem se destacado por ser uma grande fonte de vitamina C. Também é conhecida como cereja-das-antilhas, por originar-se nesta região (Norte da América do Sul e América Central). Além da vitamina C, a acerola contém polifenóis, outro nutriente funcional benéfico para a saúde humana. Como promissora fonte de vitamina C e compostos fenólicos, a acerola tem um grande potencial na indústria alimentícia, podendo ser utilizada como suplementos nutricionais ou aditivos para aumentar o valor nutricional de outros produtos (MACIEL et al. (2010); OLIVEIRA et al. 2012).

A vitamina C confere um papel essencial como antioxidante e participa de inúmeras reações no organismo humano, sendo responsável, por exemplo, pela produção do colágeno, aumento e resistência às infecções, auxílio na absorção de ferro e zinco e na eliminação de metais, além de prevenir o escorbuto. (MAIA, 2007).

A vitamina C tem múltiplas funções no organismo. É necessária para a produção e manutenção do colágeno; é responsável pela cicatrização de feridas, fraturas, contusões e sangramentos gengivais; e reduz a suscetibilidade à infecção, desempenha papel na formação de dentes e ossos, aumenta a absorção de ferro e previne o escorbuto. Desse modo, a vitamina C é importante no desenvolvimento e manutenção do organismo humano. Alguns frutos tropicais tais como acerola e camu-camu fornecem alto teor de vitamina C a baixo custo (ALBERTINO et al., 2009).

3.6 Cor

A avaliação sensorial da cor é critério subjetivo de baixa precisão, quando se objetiva quantificar alterações progressivas e de pequena monta em materiais sujeitos a mudanças de cor. Sistemas de controle baseados em medidas objetivas e valores numéricos são, geralmente, utilizados, quando se deseja prevenir erros devido a diferenças na percepção visual desse parâmetro. Nesses sistemas, as alterações dos pigmentos podem ser detectadas pela medida da cor, que pode ser usada como um meio indireto de análise para estimar compostos coloridos de alimentos e, muitas vezes, é mais simples e rápida do que a análise química (FRANCIS, 1982).

Com o objetivo de normalizar a medição da cor, em 1931 a CIE (Commission Internationale de l'Eclairage) adotou os seguintes métodos para medição e especificação de cor: uso de fontes de luz-padrão definidas pela CIE, condições exatas para observação ou medição da cor, uso de unidades matemáticas apropriadas para expressar a cor e definição do observador-padrão (JIMÉNEZ; GUTIÉRREZ, 2001).

Em 1976, a CIE recomendou o uso da escala de cor CIE $L^*a^*b^*$, ou CIELAB. O máximo valor de L^* (luminosidade) é 100, e representa uma perfeita reflexão difusa, enquanto que o valor mínimo é zero e constitui o preto. Os eixos a^* e b^* não apresentam limites numéricos específicos. A coordenada a^* varia do vermelho ($+a^*$) ao verde ($-a^*$), e a coordenada b^* do amarelo ($+b^*$) ao azul ($-b^*$). Os valores delta (ΔL^* , Δa^* e Δb^*) indicam o quanto a amostra diferiu do padrão para L^* , a^* e b^* , e são frequentemente utilizados no controle de qualidade e ajustes de formulação, além de serem utilizados para o cálculo da diferença total de cor (ΔE^*) (HUNTERLAB, 1996).

L^* varia de 0 a 100, em que o valor 0 indica o preto (ou cor escura) e o 100, o branco (cor clara), a^* varia de 0 a 100, em que o valor 0 indica o verde e o 100, o vermelho. Existe uma relação para as cores verde e vermelha. Quando o valor é 0 ou próximo a 0 para o verde, há maior índice de saturação na amostra e os valores próximos a 100 há menor índice de saturação. Para a cor vermelha já é ao contrário o resultado. b^* varia de 0 a 100, em que o valor 0 indica o azul e o 100, o amarelo. Quando o valor é 0 ou próximo de 0 para o azul, há maior índice de saturação e os valores próximos a 100 indicam um menor índice de saturação. Já para o amarelo, é ao contrário o resultado do índice de saturação (CANUTO et al., 2010).

3.7 A cromatografia líquida (LC)

A cromatografia líquida (LC) que é uma das formas de cromatografia, é uma técnica analítica de separação, que envolve a injeção de um pequeno volume de amostra líquida num tubo cheio de partículas porosas, fase estacionária, onde os componentes individuais da amostra são transportados ao longo do tubo de enchimento, a coluna, por um líquido movido pela força da gravidade, fase móvel. A separação ocorre porque, no âmbito de um conjunto ótimo de condições, cada componente de uma mistura irá interagir física e quimicamente com as duas fases de modo diferente em relação aos outros

componentes da mistura. A cromatografia líquida é o nome genérico utilizado para descrever qualquer procedimento de cromatografia em que a fase móvel é um líquido. Com o avanço da cromatografia em coluna, desenvolveu-se a utilização de suportes com partículas menores responsáveis por uma melhor eficiência e como tal tornou-se necessário o uso de bombas de alta pressão para a eluição da fase móvel, daí o desenvolvimento da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). A cromatográfica líquida acoplada ao espectrômetro de massas (LC-MS) representa uma metodologia rápida e de fácil acesso com alta sensibilidade e baixa demanda de amostra.

A espectrometria de massas (do inglês “mass spectrometry” - MS) é uma técnica que se baseia na ionização de moléculas e átomos, realizando de forma eficiente a separação dos íons com base nas diferentes razões massa/carga (m/z), sendo m a massa em u [massa atômica unificada, chamada também de Dalton (Da)] e z a carga formal. Segundo Silverstein et al., (2007) Essa técnica não analisa átomos ou moléculas no estado fundamental, apenas espécies ionizadas. Dessa forma, para a análise dos íons necessitase a formação dos mesmos a partir de fontes de ionização, que devido aos avanços tecnológicos tem evoluído constantemente buscando ampliar o campo de aplicação. (HAM, 2008). A espectrometria de massas é uma técnica analítica com ampla aplicação vista a sua alta sensibilidade e velocidade de análise. (SILVERSTEIN et al., 2007; DINIZ, 2011).

O LC acoplado à detecção MS permite análises mais precisas e pode revelar dados que podem ser úteis na identificação de produtos de oxidação ou formas de equilíbrio dos pigmentos que não apresentam absorbância a 520 nm. Além disso, a aplicação da espectrometria de massa em tandem on-line (MS/MS) simplifica muito o procedimento, tipicamente permitindo o estabelecimento da estrutura do pigmento através da determinação da massa molecular e subsequente isolamento seletivo e fragmentação direcionada dos íons de interesse.

Dentre os componentes que compõem o espectrômetro de massas, a fonte de ionização e o analisador são partes com grande importância. Pois cada fonte de ionização possui características de ionização e com isso, tipos específicos de compostos são analisados. As diferentes formas de ionização juntamente com analisadores de massas são o que determinam a aplicabilidade da MS. (GHISLAIN et al., 2012).

Vera de Rosso et al., (2008) estudaram as antocianinas de acerola e açaí, duas frutas tropicais conhecidas por seus compostos bioativos. Duas variedades de acerola in natura e uma marca de polpa congelada de açaí foram analisadas por cromatografia líquida de alto desempenho conectada a detectores de matriz de fotodiodo e espectrometria de massa (HPLC-PDA-MS / MS). A polpa de açaí apresentou 282- 303 mg/100g de antocianina total, com predominância de cianidina-3-glucósido e cianidina-3-rutinósido, em proporções médias de 13% e 87%, respectivamente. A composição das duas variedades de acerola (Waldy Cati 30 e Olivier) foi semelhante, sendo a cianidina-3-ramnosídeo (76-78%) a principal antocianina, seguida de pelargonidina-3-ramnosídeo (12-15%). A variedade acerola (Waldy) mostrou um teor total de antocianinas de 6,5-7,6 mg/100 g, enquanto que 7,9-8,4. Foram encontradas mg/100g na variedade (Olivier).

Li et al., (2012) analisaram doze vegetais altamente pigmentados (vermelhos ou roxos) de (cenouras, repolho, couve-flor, batatas, cebolas, espargos e berinjelas). Foram investigados pelo conteúdo total de antocianinas e composições das antocianinas e antocianidinas individuais pela UPLC e LC-DAD-ESI-MS, e suas atividades antioxidantes por DPPH, FRAP (poder de antioxidante de redução férrica) e ORAC (capacidade de absorção de radiação de oxigênio). Enquanto um total de 26 antocianinas foram identificadas, as principais agliconas só se encontravam limitadas a 4 antocianidinas (cianidina, petunidina, pelargonidina e delphinidina). Os resultados deste estudo são comparáveis e fornecem um método rápido e eficaz para a identificação e quantificação de todas as principais antocianidinas e seus glicosídeos (antocianinas) e como elas podem contribuir para a atividade antioxidante, portanto, informações importantes no desenvolvimento de nutracêuticos ricos em antocianina e alimentos funcionais.

Acevedo et al., (2012) estudaram a composição e concentração de antocianinas de peles de uva. Foram analisadas para avaliar a variação fenotípica entre quatro variedades de uvas pertencentes a 4 espécies diferentes: *Vitis vinifera*, *Vitis amurensis*, *Vitis cinerea* e *Vitis Xi champinii*. A cromatografia líquida de alto desempenho acoplada à espectrometria de massa (LC-MS) e a espectroscopia de RMN (LC-RMN) foram utilizadas para separar e identificar a estrutura das antocianinas presentes nestas espécies. A combinação de LC-MS e LC-NMR resultou na identificação de 33 antocianinas. Em particular, identificaram-se novos isômeros cis de derivados de p-cumarico (petunidina, peonidina e malvidina-3-(6-p-cumaril)-5-diglucosídeo). Em *V. cinerea* e *V. vinifera*, as

antocianinas foram derivados de monoglucosídeos, enquanto que em *V. amurensis* e *V. X champinii*, identificaram-se ambos os derivados de mono e diglucósido. Os derivados de Malvidina, delphinidina e petunidina foram, respectivamente, os componentes mais abundantes em *V. cinerea* e *V. vinifera*, *V. amurensis* e *V. X champinii*.

O pigmento do extrato de frutas é um tipo de corante natural para o processamento de alimentos e possui potenciais valores médicos e comerciais. Este estudo centra-se na análise e caracterização de antocianinas do pigmento de amoreira. As frutas de amoreira frescas foram extraídas com o solvente de 95% de álcool / 0,1% de HCl (1: 1, relação) à temperatura ambiente durante 4 h no escuro. Após o isolamento usando a coluna C-18, o pigmento foi identificado com Espectroscopia UV-Visível, HPLC-PAD, LC-MS e ¹H-RMN. Os resultados mostraram que as abundantes antocianinas no pigmento de amoreira são cianidina 3-O-rutinosido (60%) e cianidina 3-O-glucósido (38%). As antocianinas menores (totalmente 2%) são pelargonidina 3-O-glucósido e pelargonidina 3-O-rutinosido (QIN et al., 2007).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Matéria prima

Os frutos de acerola (cerca de 10 Kg) foram adquiridos em feira da região metropolitana de Belém. Em cada lote, os frutos foram selecionados livres de injúrias mecânicas, no estágio maduro subjetivamente pela cor da casca (vermelho escuro), de forma aleatória, e separadas para as caracterizações. Os frutos foram descascados, separando-se manualmente a casca da polpa e sementes de acordo com a quantidade a ser utilizada no dia da análise, os demais frutos foram conservados em embalagens de plástico polietileno sob refrigeração para posterior análise. Em todas as análises foram usadas apenas as cascas do fruto da acerola para a caracterização do material e extração.

4.2 Métodos

Este trabalho foi dividido em 3 etapas. A 1º etapa consistiu na caracterização da casca do fruto da acerola, a 2º etapa consistiu em determinar as condições ótimas de extração utilizando extração por agitação magnética acoplada ao banho termostático e a 3º etapa consistiu nos ensaios de particionamento conforme as figuras 5, 6 e 7 respectivamente.

Figura 5- Caracterização da matéria prima

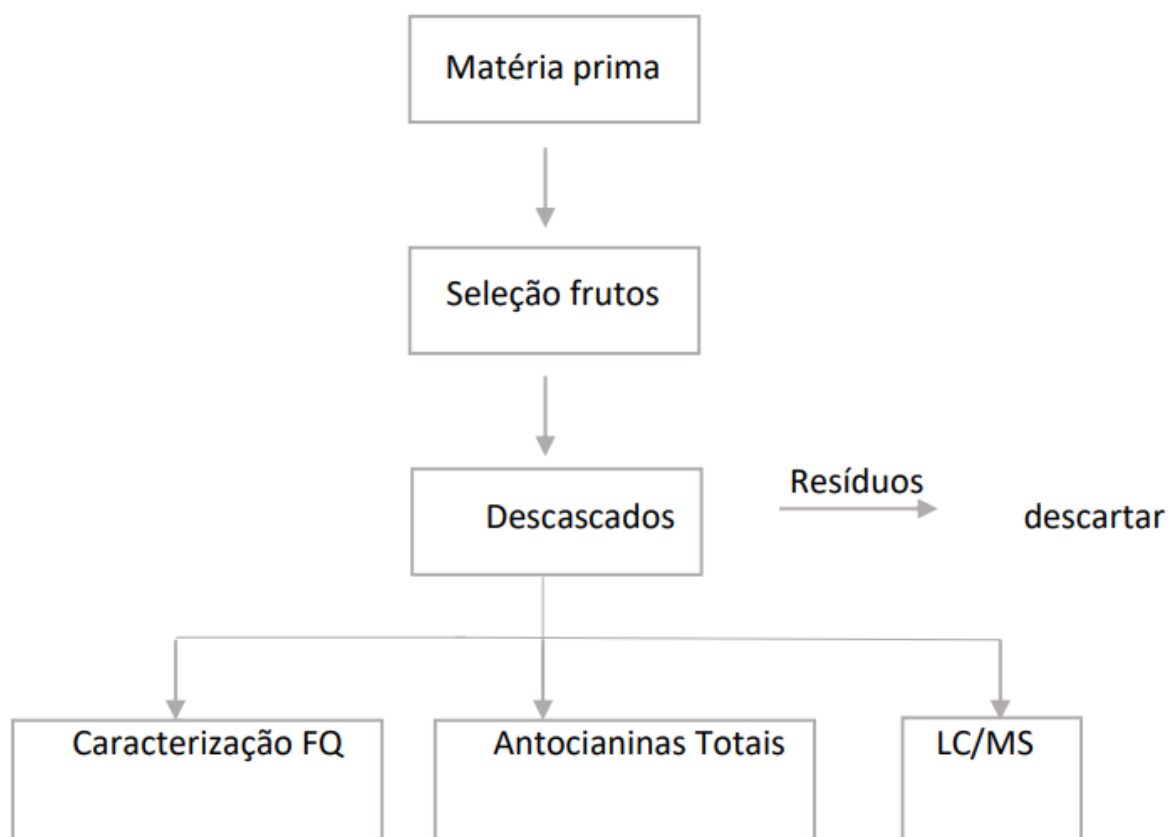


Figura 6- Produção do extrato

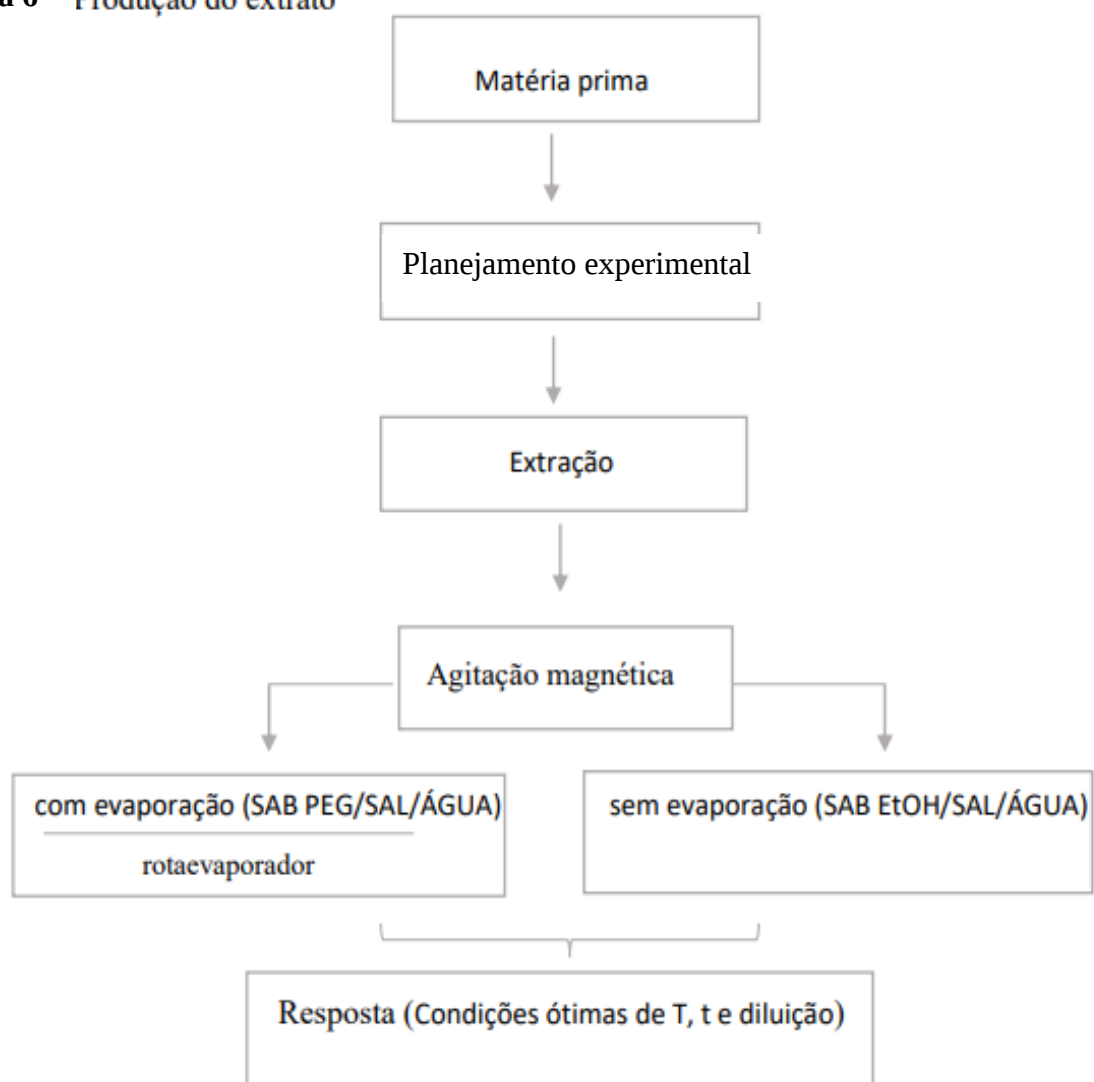
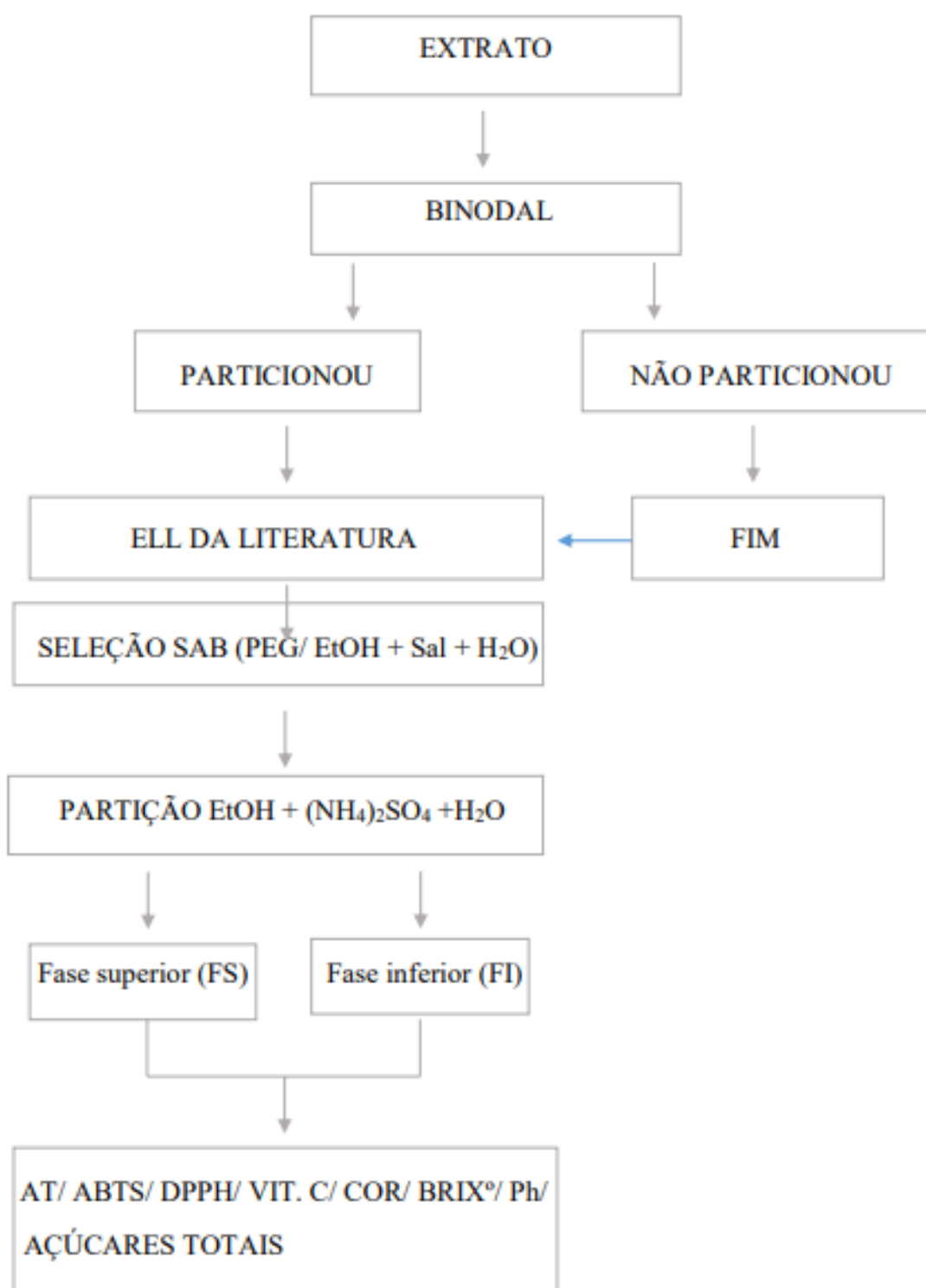


Figura 7- Particionamento



4.2.1 Caracterização físico – química

4.2.1.1 Umidade

A umidade foi determinada segundo a metodologia da AOAC (2011), método nº 920.107.

4.2.1.2 Resíduo mineral fixo (cinzas)

As cinzas foram determinadas segundo o método nº 940.26 da AOAC (1997).

4.2.1.3 Proteínas totais

O teor de proteínas foi determinadas de acordo com o método nº 920.152 da AOAC (1997).

4.2.1.4 Lipídios Totais

O teor de lipídios totais foi obtido por extração em Soxhlet de acordo com o método nº 968.20 da AOAC (1997).

4.2.1.5 Sólidos solúveis (°Brix)

O teor de sólidos solúveis, expresso em °brix foi obtido pela leitura direta dos graus Brix da amostra em refratômetro de bancada (QUIMIS, modelo Q7678) de acordo com o método nº 932.12 da AOAC (1997).

4.2.1.6 Acidez total titulável por volumetria potenciométrica

Este método é realizado em soluções escuras ou fortemente coloridas. Segundo método nº 942.15B da AOAC (1997).

4.2.1.7 pH

O pH foi determinado através de leitura direta em potenciômetro, devidamente calibrado com as soluções tampões pH 7,0 e 4,0 a 20°C segundo método nº 981.12 da AOAC (1997).

4.2.1.8 Antocianinas totais (AT)

A quantificação de antocianinas totais foi realizada de acordo com o método espectrofotométrico do pH diferencial, que utiliza solução de pH 1,0 e 4,5, conforme descrito por (FULEKI e FRANCIS, 1968). A concentração final de antocianina foi expressa em mg/100g de cianidina-3-glicosídeo. Com posterior leitura em Espectrofotômetro UV-VIS (Pharmatec biotech-ultraspec 2000) em comprimentos de onda de 510 e 700 nm, (branco: solução de pH).

$$C \text{ (mg/L)} = \frac{[(Abs_{510nm} - Abs_{700nm})_{pH1,0} - (Abs_{510nm} - Abs_{700nm})_{pH4,5}] \cdot MM \cdot FD \cdot 1000}{(\epsilon \times l)} \quad (6)$$

Onde C é igual a concentração de antocianinas presentes na amostra e a diferença dos valores de absorbância em pH 1,0 e 4,5 é diretamente proporcional à concentração de antocianinas.

MM = 449,2 g mol⁻¹

FD= fator diluição

ε = coeficiente de extinção molar: 26900 M⁻¹ cm⁻¹ ,

A concentração de antocianina expressa na fórmula 6 em (mg/L) é convertida para concentração final de antocianina e foi expressa em mg/100g de cianidina-3-glucósido.

4.2.1.9 Cromatografia líquida (LC-MS)

As amostras da casca da acerola passaram pelo processo de liofilização. O equipamento utilizado foi um liofilizador de bancada (Liotop, L-101), Após o congelamento das cascas da acerola, foram pesadas 100g e dispostas em cada uma das 3 bandejas de inox no interior da câmara de secagem do liofilizador, em operação por um período de 24 h, para a leitura no espectrômetro de massas.

A análise foi conduzida no Laboratório de espectrometria locado no PPGQ/UFPA.

As análises via LC-MS foram realizadas em um espectrômetro de massas XEVO G2-SToF (Waters®) com fonte de eletrospray (ESI).

Uma alíquota de 1 mg da amostra foi solubilizada em 1 mL de H₂O:ACN 2:8 (v:v), em seguida a solução obtida foi filtrada em filtro de seringa qualitativo. Para a separação cromatográfica, utilizou-se uma composição binária de água (A)/acetonitrila (B) como fase móvel acidificada (0,1% de ácido fórmico) e uma coluna de fase reversa octadecil (50 mm x 2,1 mm x 1,7 μ m) Acquity BECH-Waters. A análise consistiu na eluição de 5 μ L da amostra em modo gradiente linear na faixa de composição de fase móvel 5-95% de durante 10 minutos sob uma temperatura de 40° C, em fluxo de 0,3 mL/min.

A ionização da amostra foi realizada em modo positivo (ES⁺) em ampla faixa de m/z (50-1200 Da) com registro de 0,1 segundo. A temperatura da fonte foi estabelecida em 150° C, o fluxo de gás no cone de 20 L/h e o gás de dessolvatação foi estabelecido em 550 L/h à temperatura de 250 °C. As voltagens do capilar e do cone foram fixadas, respectivamente, em 2 kV e 40 V.

A aquisição dos dados por LC-MS da casca da acerola liofilizada de *Malpighia emarginata* foram realizadas utilizando-se a interface do software Masslynx versão 4.1.

4.2.2 Extração

‘Os extratos de antocianinas da casca da acerola foram obtido pelo processo de extração por agitação magnética. As condições de operação foram estudadas conforme planejamento experimental. Foi utilizada a quantidade de 4g da casca da acerola para 16g da solução alcoólica, pesados em balança analítica (QUIMIS, Q-500L210C).

Após a obtenção dos extratos as amostras foram transferidas para um balão de fundo redondo coberto com papel alumínio acoplado ao rotaevaporador, (Heidolph, Laborota 4000) ligado ao banho termostático com controle de temperatura de 35°C até a total evaporação do etanol do extrato, que foi conferido por balanço de massa.

4.2.2.1 Planejamento experimental

Os parâmetros do processo foram estudados através de um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^3 , incluindo 6 pontos axiais (PA) e 5 repetições do ponto central (PC), totalizando 19 ensaios, onde a constituição deste planejamento foram realizados após análise prática das variáveis independentes diluição etanol/água 79% (v/v), 50% (v/v), 21% (v/v), puro (v/v), tempo (4,8’, 15’, 30’, 45’, 55,2’) e temperatura (15°C - 42 °C). As variáveis dependentes foram as concentrações de antocianinas. O valor de α foi calculado em função do número de variáveis independentes (n=3) através da equação 07.

$$\alpha = (2^n)^{\frac{1}{4}} \quad (7)$$

Os resultados foram analisados através da Metodologia de Superfície de Resposta com auxílio do software *Statistica*, versão 13.1. Na tabela 4 está descrito o planejamento experimental e a variável de resposta são as análises de antocianinas totais.

Tabela 4- planejamento experimental

Ensaio	Tempo (min)	Temperatura(°C)	DILUIÇÃO (Etanol/H ₂ O)
1	2	15	21
2	5	15	21
3	2	35	21
4	5	35	21
5	2	15	79
6	5	15	79
7	2	35	79
8	5	35	79
9	0,98	25	50
10	6,02	25	50
11	3,5	8,2	50
12	3,5	41,8	50
13	3,5	25	98,72
14	3,5	25	H ₂ O
15	3,5	25	50
16	3,5	25	50
17	3,5	25	50
18	3,5	25	50
19	3,5	25	50

4.2.2.2 Extração por agitação magnética

As amostras com 4g da casca da acerola foi macerada em gral e pistilo, e pesado na célula encamisada com 16g da solução alcoólica de acordo com o planejamento previamente estudado, foi mantido sob agitação magnética a 199 rpm, ligadas ao banho termostático nos tempos de 4,8', 15', 30', 45' e 55,2' minutos com diluições de 99,72% (v/v), 79% (v/v), 50% (v/v), 21% (v/v) (Etanol/ H₂O). Após essas condições a amostra foi filtrada a vácuo utilizando papel filtro, funil de porcelana e kitassato. O extrato foi armazenado em frasco âmbar para posterior procedimento de particionamento no SAB, análises de AT, AA (Vitamina C), pH , AAT, °Brix, Açúcares totais e Cor.

4.2.3 Dados de equilíbrio dos sistemas etanol+Li₂SO₄+H₂O e etanol+(NH₄)₂SO₄+ H₂O (Sistema em branco)

Como a proposta desse trabalho consiste em estudar a partição das antocianinas em sistemas etanol+Li₂SO₄+ H₂O e etanol+(NH₄)₂SO₄+ H₂O, foram realizados um estudo prévio de tais sistemas, que consistiam nos sistemas em branco foram coletados dados de equilíbrio para o sistema etanol+Li₂SO₄+ H₂O nas temperaturas 25°C e 35°C haja visto que não existiam na literatura. E para o sistema etanol+(NH₄)₂SO₄+água, foram reproduzidos as 3 linhas de amarrações dos sistemas a 25°C e 35°C com os maiores coeficiente de distribuição da literatura (Lago, 2017; Gama, 2018) para validar a metodologia utilizados neste trabalho.

A composição dos componentes de cada LA do Sistema Etanol + Sulfato de Amônio + Água a 25°C e 35°C estão representadas nas Tabelas 5 e 6, respectivamente, nas quais os dados estão expressos em frações mássicas.

Tabela 5- Frações mássicas das linhas de amarrações do Sistema Etanol + Sulfato de Amônio + Água a 25°C

LA	Fase Superior			Fase Inferior		
	WSAL	WETOH	WH ₂ O	WSAL	WETOH	WH ₂ O
1	0,0404	0,4780	0,4816	0,3498	0,0711	0,5792
2	0,0300	0,5164	0,4536	0,3719	0,0629	0,5652
3	0,0448	0,4639	0,4913	0,3357	0,0768	0,5876

A Tabela 6 apresenta a composição dos componentes de cada LA do Sistema Etanol + Sulfato de Amônio + Água a 35°C, na qual os dados estão expressos em frações mássicas.

Tabela 6- Frações mássicas das linhas de amarrações do Sistema Etanol + Sulfato de Amônio + Água a 35°C

LA	Fase Superior			Fase Inferior		
	WSAL	WETOH	WH ₂ O	WSAL	WETOH	WH ₂ O
1	0,0404	0,4780	0,4816	0,3498	0,0711	0,5792
2	0,0300	0,5164	0,4536	0,3719	0,0629	0,5652
3	0,0448	0,4639	0,4913	0,3357	0,0768	0,5876

4.2.3.1 Curva Binodal (Curva de Solubilidade)

Primeiramente foram preparadas as soluções aquosas estoque de sal, no ponto de saturação. A curva binodal do sistema sulfato de amônio (NH₄)₂SO₄, etanol e água foram preparados por um método de gotejamento até a turvação tal como descrito por (LI et al., 2009) realizado em banho termostático em temperatura constante e pré-determinada pelo planejamento experimental, adicionou-se uma solução aquosa de sulfato de amônio (NH₄)₂SO₄ gota a gota com auxílio de seringas ao etanol na célula encamisada. O gotejamento ocorreu até o turvamento da mistura, então foi anotada a massa da solução salina que causou a turbidez.

O ponto seguinte de coleta foi obtido ao ser adicionado água destilada gota a gota até o desaparecimento da turvação, anotou-se a massa utilizada da mesma. E o posterior gotejamento com solução salina foi repetido até que se adquiram pontos necessários para a construção da fase superior da curva de solubilidade (curva binodal). O mesmo procedimento foi repetido para construção da parte inferior da curva de solubilidade, que apresenta uma maior concentração de sal, onde foi gotejada etanol na solução salina.

As frações mássicas de etanol, Li₂SO₄ e água (w₁, w₂ e w₃ respectivamente) foram obtidas e a curva de solubilidade foi plotada para várias concentrações de álcool e sulfato de Lítio (Li₂SO₄). A seguir os dados da curva de solubilidade foram correlacionados matematicamente, obtendo-se 2 equações, referentes à fase superior (equação 08) e inferior (equação 09).

$$w_1^S = f(w_2^S) \quad (8)$$

$$w_1^I = f(w_2^I) \quad (9)$$

4.2.3.2 Dados de equilíbrio

A determinação dos dados de equilíbrio constituiu em, após delimitar a região de miscibilidade parcial, os componentes (w_1 , w_2 e w_3) foram pesados e preparados a solução (composição global) com concentrações dentro da região de duas fases. As soluções foram preparadas em tubos de ensaios, homogeneizadas com o uso de agitador vórtex (Vortex, QL-901) e em seguida transferidas para células encamisadas acopladas ao banho termostático de modo que toda solução estivesse submersa para garantir que a temperatura do sistema se mantivesse constante. E em seguida mantidos em repouso durante horas nas temperaturas estabelecidas, para que ocorra a separação das fases. Após alcançar o equilíbrio termodinâmico, amostras de ambas as fases foram coletadas e os componentes do sistema foram quantificados utilizando a metodologia do método indireto que consiste na quantificação dos componentes em cada fase mediante o uso da curva de solubilidade (equações 08-09) equação de calibração (equação 11) e a equação da soma das frações mássicas (equação 10).

$$w_{PEG} + w_{SAL} + w_{ÁGUA} = 1 \quad (10)$$

A qualidade dos dados de equilíbrio foram avaliados com o uso das equações de Othmer–Tobias e Hand (equações 01 e 02 respectivamente). E o coeficiente de partição do PEG foram calculado conforme equação 03.

4.3.2.3 Curva de Calibração

Para quantificar as composições das fases em equilíbrio foram construídas curvas de calibração a partir de soluções preparadas em concentrações (ponto de mistura) sobre a curva binodal e realizada as respectivas medidas de condutividade. Os dados obtidos

foram correlacionados matematicamente de modo que se obtenha um coeficiente de correlação (R^2) próximo a unidade conforme equação 05.

$$W_i = f(\text{CONDUT}) \quad (11)$$

Sendo i = concentração de etanol ou sal.

4.2.4 Partição das antocianinas do extrato no SAB - etanol+ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + H_2O

O experimento de partição de antocianinas constitui em adicionar o extrato, com a melhor resposta quanto a quantidade de antocianinas obtida no item 4.2.2, a solução na célula cuja concentração corresponde a linha de amarração com maior coeficiente de distribuição do item 4.2.3.

A mistura foi agitada num agitador tipo vórtex até as duas fases estarem completamente homogeneizadas, em seguida ficou em repouso por um tempo de 3 minutos. Após esse tempo analisou-se as concentrações de extrato de antocianinas da casca da acerola nas fases superior e inferior (figura 8), bem como foi determinado a atividade antioxidante, pH, °BRIX, análise de cor e vitamina C de cada fase. Os resíduos acumulados na interface das duas fases foram descartados em recipiente apropriados.

Figura 8- Extrato da partição das antocianinas no SAB



Fonte: Arquivo pessoal

4.2.4.1 Determinação de antocianinas totais (AT)

A quantificação de antocianinas totais foi realizada de acordo com o método espectrofotométrico do pH diferencial, descrito no item 4.2.1.8.

4.2.4.2 Atividade antioxidante in vitro

-Método ABTS A capacidade antioxidante do extrato particionado foi determinada pelo ensaio do cátion radical $ABTS^{•+}$, segundo metodologia da Rufino et al. (2007b). Com adaptações/modificações feitas para o preparo do radical $ABTS^{•+}$, onde utilizou-se a metodologia descrita por Re et al., (1999). Inicialmente, foi formado o radical $ABTS^{•+}$, a partir da reação de 14 mM de ABTS com 4,9 mM de persulfato de potássio (1:1 v/v), os quais foram incubados a temperatura ambiente e na ausência de luz, por 16 horas. Transcorrido esse tempo, a solução foi diluída em etanol até a obtenção de uma solução com absorvância de $0,700 \pm 0,02$. Em seguida, diluiu-se 1ml desta mistura em etanol até obter uma absorvância de $0,70 \text{ nm} \pm 0,05 \text{ nm}$ a 734 nm. Um volume de 2ml da solução radical $ABTS^{•+}$ foi adicionado a 20 μ l de amostra. A leitura absorvância da mistura foi realizada após 6 minutos. O branco utilizado para zerar o espectrofotômetro foi o etanol. Para padronização dos resultados, o trolox foi utilizado como padrão e os resultados de atividade antioxidante foram expressos em equivalente de Trolox (μ M Trolox equivalente por g de polpa). Para realizar as análises, foram adicionados em tubos de ensaio a solução contendo o radical $ABTS^{•+}$ e o extrato diluído em etanol. A absorvância foi monitorada em espectrofotômetro UV-visível (Pharmatec biotech-ultraspec 2000) a 750 nm, após 15 minutos de reação.

-Método DPPH A capacidade antioxidante pelo método DPPH (2,2-Difenil-1-picril-hidrazil) foi determinada de acordo com a determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical DPPH (baseadas em adaptações/modificações feitas nos laboratórios da Embrapa Agroindústria Tropical. (RUFINO et al., 2007).

4.2.4.3 Ácido ascórbico- vitamina C

Para a determinação do teor de vitamina C utilizou-se o método padrão Titulométrico AOAC (1984), método de Tillmans modificado por Benassie Antunes

(1988), que utilizaram solução de ácido oxálico como solvente, em substituição ao ácido metafosfórico. As amostras foram retiradas do congelador e deixadas em temperatura ambiente para posterior análises do extrato e do material particionado, de acordo com os procedimentos descritos nos subitens 4.2.2 e 4.2.4. O resultado foi expresso em mg de ácido ascórbico por 100 g da amostra do extrato particionado da casca da acerola.

4.2.4.4 Cor

A análise foi conduzida no Laboratório de Corantes (LabCor), locado na FEQ/UFPA em câmara escura com controle de luminosidade. A avaliação colorimétrica foi realizada utilizando colorímetro Color Reader CR– 10 (Konica Minolta), operando no sistema CIELAB. Os valores de L* (luminosidade), a* (componente verde-vermelho) e b* (componente amarelo-azul) foram obtidos diretamente do colorímetro e utilizados para cálculo da tonalidade e saturação (croma).

$$(C^*=(a^2+b^2)^{0,5}) \quad (21)$$

Para determinar a diferença total de cor entre as três coordenadas é utilizada a equação 22:

$$\Delta E^* = [\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}]^{0,5} \quad (22)$$

Onde:

ΔL^* = diferença em mais claro e escuro (+ = mais claro, - = mais escuro)

Δa^* = diferença em vermelho e verde (+ = mais vermelho, - = mais verde)

Δb^* = diferença em amarelo e azul (+ = mais amarelo, - = mais azul)

ΔE^* = diferença total de cor

4.2.4.5 Açúcares totais – fenol / sulfúrico (at)

O teor total de açúcar das amostras do extrato foi determinado pelo método de Dubois usando fenol e ácido sulfúrico (Dubois, M et al., 1956). Diluiu-se uma amostra

do extrato particionado de ambas as fases superior e inferior a 1/100 com água destilada e adicionou-se 0,2 mL de solução de fenol a 5% a 0,2 mL da amostra diluída, seguindo-se a adição de 1 mL de ácido sulfúrico. Em seguida a solução foi homogeneizada e deixada à temperatura ambiente pôr 30 minutos. A absorbância da solução foi registada a 490 nm. A calibração foi realizada com glicose como padrão.

4.2.4.6 Tratamento estatístico

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições. Os resultados foram submetidos a análise de variância e teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o software Statistica, versão 13.1, para Windows.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização físico-química e Antocianinas totais

As características físico-químicas e concentração de antocianinas totais da casca da acerola utilizada neste trabalho estão apresentadas na tabela 07.

Tabela 7- Caracterização físico- químicas da acerola.

Análise	Este trabalho*- Casca acerola
Cinzas	0,0806±0,03
Lipídios %	0,0043±0,002
Proteínas %	0,74±0,65
pH	3,45±0,04
Acidez titulável (meqNaOH/100g)	16,97±0,24
Umidade (%)	92,56%±0,1
Antocianinas (mg.100 g)	41,25±0,1

*valores expressos em base úmida

*valores médios (média ± desvio-padrão) de triplicatas

A característica da cor vermelha da casca da acerola é um dos mais importantes indicadores de maturação da acerola e qualidade comestível, isso se deve as concentrações de antocianinas presente no fruto (Tabela 7). Pode ser observado que os valores de antocianinas totais obtidos nesse trabalho foram 41,25 mg.100g⁻¹. Quanto maior o teor de antocianinas, melhor a aceitação do produto por parte do consumidor. Aquino et al (2011) encontraram valores próximos ao encontrados nesse trabalho, para pH, umidade e antocianinas totais para acerola in natura. Soares et al., (2017) também obtiveram resultados semelhantes dos parâmetros avaliados de pH e proteínas para a polpa de acerola.

5.1.1 Cromatografia líquida (LC-MS)

O cromatograma e o espectro de íons totais da casca da acerola liofilizada, obtidos nas análises de espectrometria de massas são apresentados nas figuras 9 e 10 .

Figura 9- Cromatograma de íons totais para as antocianinas presentes na amostra da casca da acerola liofilizada.

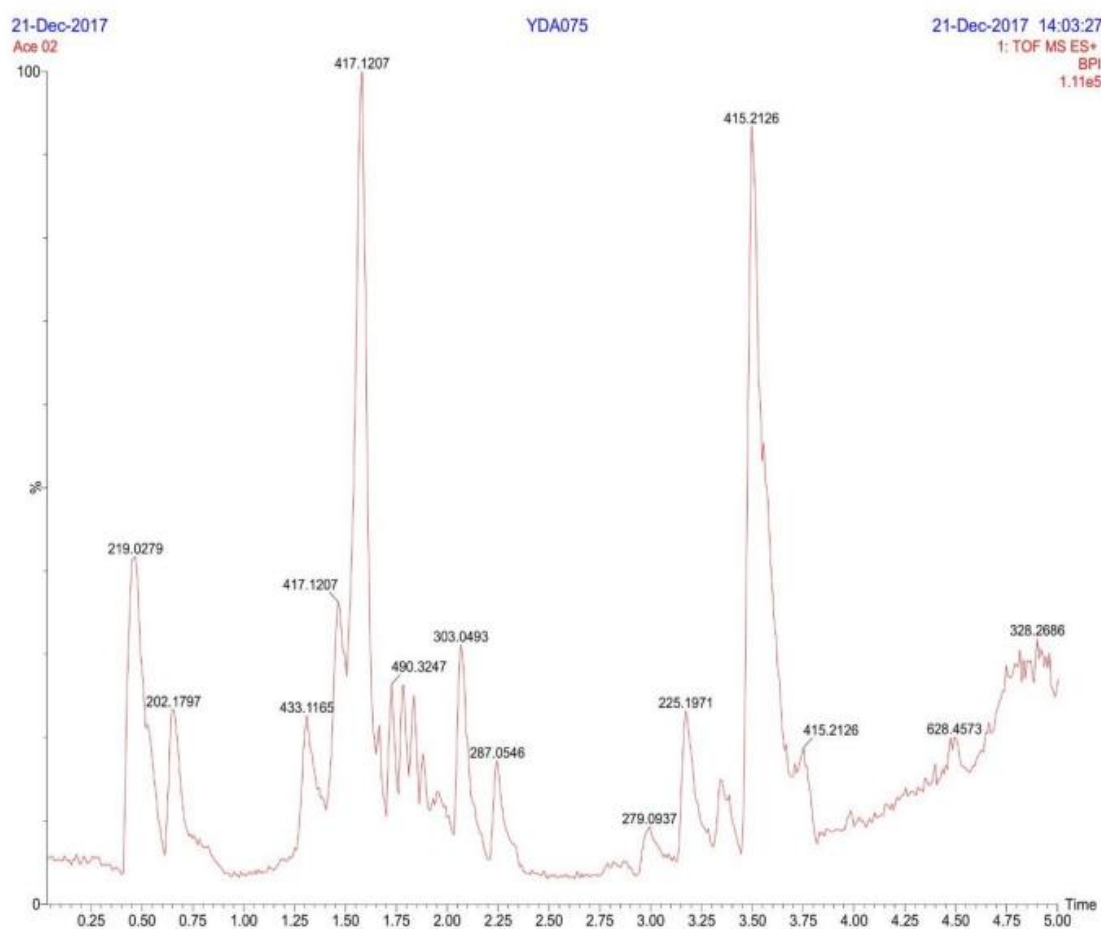
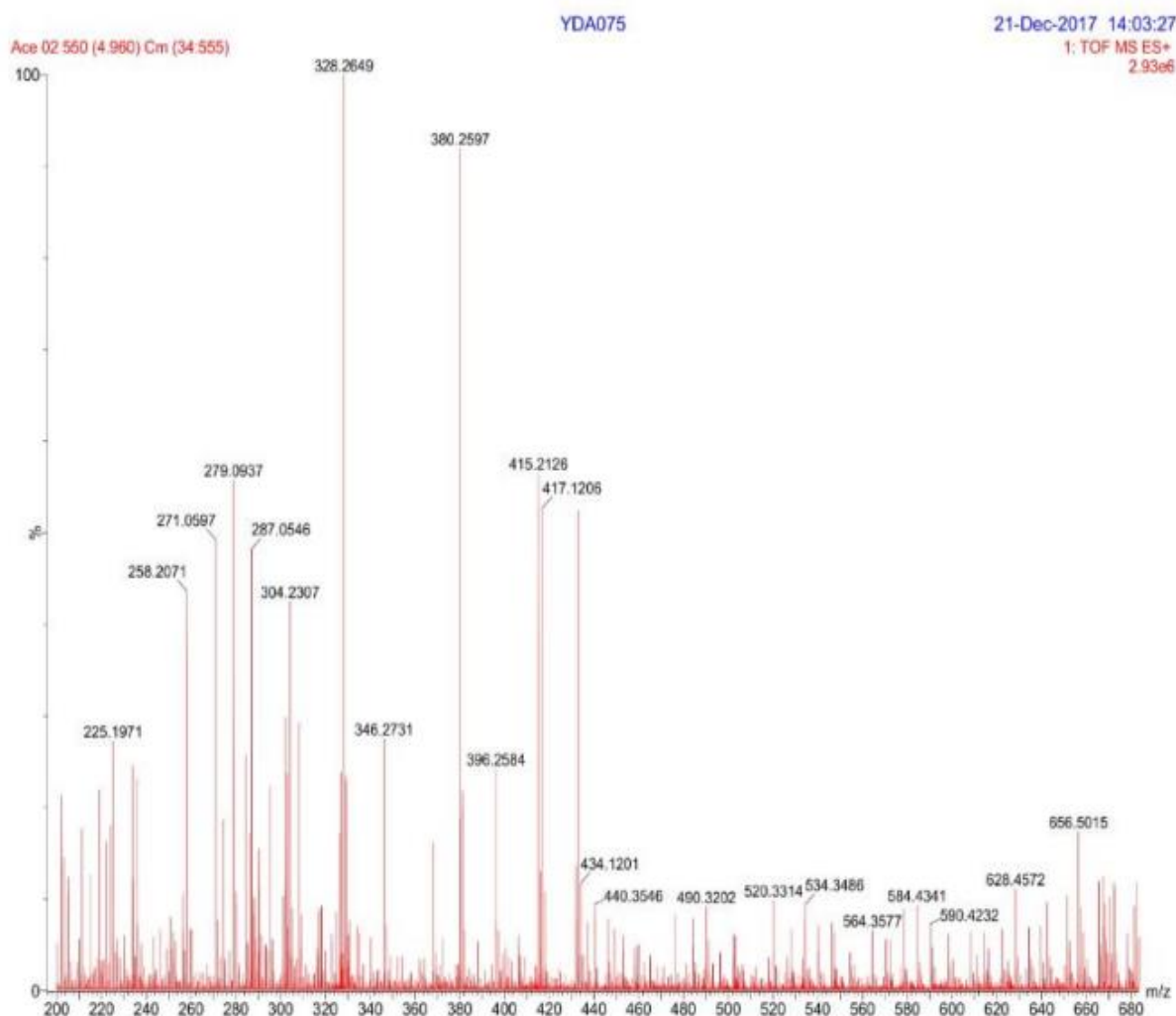


Figura 10- Espectros de íons totais das antocianinas presentes na amostra da casca da acerola liofilizada.



Nas figuras 9 e 10 pode ser observado que a identificação das substâncias presentes na amostra foi realizada pela ordem de eluição e pelos tempos de retenção levada em consideração a massa de alta resolução de 10^4 . Os cromatogramas obtidos demonstraram que o perfil antociânico da amostra da casca de acerola liofilizada apresentaram de três a cinco picos comuns entre as massas encontradas na literatura. Após a ionização da amostra foram observadas cinco agliconas identificadas como cianidina, peonidina, petunidina, delphinidina e pelargonidina. As amostras não passaram pelo processo de fragmentação para uma possível afirmação das antocianinas presentes nas

amostras analisadas, no entanto ao comparar os cromatogramas das antocianinas e das antocianidinas e, avaliando os tempos de retenção, é possível supor que há presença de antocianinas com diferentes graus de glicosilação, e que as agliconas identificadas, cianidina, delphinidina e pelargonidina, encontravam-se com diferentes proporções nos espectros de ionização e com massas de melhor resolução, de 10^4 .

Alguns autores como Brito et al., (2007) encontraram 2 tipos de antocianinas: cianidina-3-ramnosídeo e pelargonidina-3-ramnosídeo e Vera de Rosso et al., (2008) encontraram as mesmas antocianinas na acerola mais 2 antocianinas: Cianidina, Cianidina- 3-ramnosídeo, Pelargonidina-3-ramnosídeo e Pelargonidina.

5.2. Extração de antocianinas

Na tabela 8 são apresentados os resultados do planejamento experimental das extrações por agitação magnética seguida de evaporação.

Tabela 8- Antocianinas totais expressas em equivalente da antocianina principal cianidina-3-glucosídeo para as extrações por agitação magnética seguida de rotaevaporador.

Ensaio	Diluição EtOH/H ₂ O	Concentração de antocianina em mg / 100g
1	21%	21,85 ± 3,40
2	21%	16,36 ± 1,29
3	21%	16,55 ± 3,93
4	21%	16,96 ± 1,34
5	79%	16,19 ± 0,36
6	79%	11,9 ± 2,12
7	79%	11,38 ± 1,80
8	79%	13,32 ± 4,04
9	50%	12,30 ± 6,39
10	50%	8,01 ± 0,34
11	50%	14,23 ± 0,48
12	50%	16,68 ± 1,68
13	98,72%	-
14	50%	14,12 ± 0,40
15	50%	11,01 ± 6,70
16	50%	-
17	50%	-
18	50%	-
19	50%	-

*valores expressos em base úmida *valores médios (média ± desvio-padrão) de triplicatas

Na tabela 8, observamos que embora os experimentos apresentassem a mesma condição de diluição, tempo e temperatura de extração, o tempo gasto para concentrar cada amostra no rotaevaporador diferiram entre si causando possivelmente degradação das antocianinas. O uso do rotaevaporador foi aplicado para retirar as frações de etanol do extrato, com o intuito de aplicar no SAB PEG/(NH₄)₂SO₄, esses resultados mostraram que a utilização do calor (35°C) no processo de evaporação do etanol ocasionaram perdas significativas das concentrações de antocianinas do extrato, com isso houve uma mudança

de sistema para o SAB etanol/(NH₄)₂SO₄ pois com essa nova proposta não houve a necessidade de retirar o etanol do extrato obtido.

Na tabela 9, são apresentadas as respostas do planejamento experimental para a extração por agitação magnética sem o uso do rotaevaporador.

Tabela 9- Antocianinas totais expressas em equivalente da antocianina principal cianidina-3-glucosídeo para as extrações por agitação magnética sem evaporação.

Ensaio	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Diluição (EtOH/H ₂ O)	Concentração de antocianina em mg/100g
1	15	15	21	22,43±0,19
2	45	15	21	28,25±0,26
3	15	35	21	26,32±0,51
4	45	35	21	45,26±0,22
5	15	15	79	34,83±0,15
6	45	15	79	27,39±0,24
7	15	35	79	33,54±0,39
8	45	35	79	48,04±0,47
9	4,8	25	50	52,32±0,38
10	55,2	25	50	49,61±0,27
11	30	8,2	50	48,32±0,45
12	30	41,2	50	53,26±0,57
13	30	25	98,72	57,17±0,50
14	30	25	0	31,37±0,04
15	30	25	50	33,10±0,55
16	30	25	50	48,57±0,31
17	30	25	50	46,19±0,15
18	30	25	50	48,73±0,15
19	30	25	50	46,33±0,04

*valores expressos em base úmida **valores médios (média ± desvio-padrão) de triplicatas

Na tabela 9 pode ser constatado um aumento significativo no teor de antocianinas do planejamento experimental das amostras dos extratos obtidos a partir do processo de

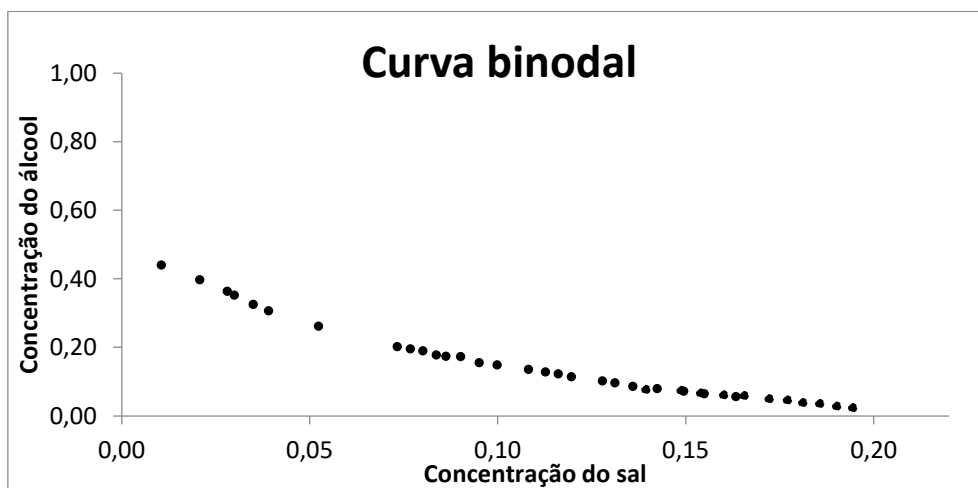
extração por agitação magnética acoplada ao banho termostático com controle de temperatura, quando comparado com os resultados apresentados na tabela 8, a qual se fez uso de evaporação para retirada das frações de etanol do extrato.

Em relação as diluições utilizadas no planejamento, as concentrações de antocianinas ficaram entre 22,43 e 57,17 mg/100g⁻¹, e os extratos com maiores frações de etanol, as diluições de 50 e 98,72% apresentaram os maiores teores de antocianinas. Também na tabela 9 pode ser verificado que o ensaio 13, resultou na obtenção de maior teor de antocianinas extraídos 57,17 mg/100g. Desta forma, esse foi o extrato utilizado nas etapas posteriores desse trabalho.

5.3 Sistema etanol+Li₂SO₄+H₂O

Na figura 11, são apresentados dados de solubilidade do sistema etanol+Li₂SO₄ + H₂O 25°C.

Figura 11- Sistema sistema etanol+Li₂SO₄ + H₂O



Fonte: Arquivo pessoal

Também na figura 11 pode ser observado que para este sistema não foi caracterizado uma região de duas fases. Foi observado que a transição de fases (ponto de turvação) era instável, ou seja, o turvamento desaparecia após alguns minutos de repouso,

ou a mistura voltava ficar homogênea ou ocorria precipitação do sal. Tal comportamento pode ter sido ocasionado pela natureza do sal utilizado em relação ao álcool.

Sendo assim, não havendo a região de miscibilidade parcial, não foi possível obter os dados de equilíbrio e calcular o comprimento da linha de amarração (CLA) nem a sua inclinação (ILA), que são parâmetros termodinâmicos utilizados para medir as propriedades intensivas entre as fases.

5.3.1 Sistema etanol+(NH₄)₂SO₄+H₂O

Os dados de equilíbrio líquido-líquido do sistema etanol/sulfato de amônia a 25°C e 35°C reproduzidos da literatura são apresentados na tabela 10, respectivamente, com os dados reproduzidos neste trabalhos.

Tabela 10- Frações mássicas e densidade das linhas de amarrações do Sistema etanol + Sulfato de amônio + água a 25°C e 35°C

Massa específica (g/cm³)***		Este trabalho		
25°C				
LA 1	FS	FI	FS	FI
	0,919±0,002	1,183±0,000	0,9203±0,001	1,1956±0,008
35°C				
LA 2	FS	FI	FS	FI
	0,918±0,000	1,164±0,000	0,9281±0,007	1,1692±0,003

*valores médios (média ± desvio-padrão) de triplicatas **FS: fase superior; FI: fase inferior*** Literatura

5.3.2 Partição das LA do sistema Etanol/(NH₄)₂SO₄/água

Os dados de ácido ascórbico (AA), ABTS, antocianinas totais (AT), °Brix, pH, açúcares totais, obtidos após particionamento do extrato no SAB são apresentados na tabela 11, 12 e 13.

Tabela 11- Resultados de ácido ascórbico, ABTS e antocianinas totais

Análises		AA mg/100g	ABTS μM Trolox/g	AT mg/100g
Extrato particionado (FS/FI)	25°C			
	LA 1	FS 2381,00±0,0 ^a	2136,76±0,04 ^b	73,08 ±0,55 ^a
		FI 1445,61±0,0 ^b	1263,43±0,04 ^c	9,53±0,00 ^c
	35°C			
	LA 2	FS 2551,08±0,0 ^a	6122,45±0,07 ^a	63,95±0,59 ^b
		FI 1275,54±0,0 ^b	219,62±0,13 ^d	6,36±0,03 ^d

*valores expressos em base úmida

**valores com letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa ($p \leq 0,05$).

***valores médios (média ± desvio-padrão) de triplicatas;

FS: fase superior; FI: fase inferior.; AA: ácido ascórbico; AT: antocianinas totais;

Conforme os resultados de ácido ascórbico (AA) mostrados na tabela 11 para a fase superior, que contém majoritariamente antocianinas, álcool e água a quantidade de AA encontrada foi de 2551,08 mg/100g no sistema à 35°C, e para a fase inferior, que contém majoritariamente, água e o sal sulfato de amônio foi obtido 1275,54 mg/100g, a metade da quantidade da fase superior. Podemos considerar que este sistema SAB (etanol+(NH₄)₂SO₄+H₂O) preservou o AA sem interferir na concentração de antocianinas.

A quantidade de AA obtidos neste trabalho para as fases inferiores estão próximas dos encontrados por Freire et al. (2013), que obtiveram 1457,69 mg/100g para acerola in natura, esses autores também averiguaram a atividade antioxidante de outras frutas (caju, goiaba e morango) e observaram que a acerola apresentou os melhores resultados, sendo, assim, a de maior atividade antioxidante dentre as demais amostras analisadas.

Também na tabela 11 pode ser observado que com o aumento da temperatura de 25°C para 35°C, a quantidade de antocianinas totais variou de 73,08±0,55 (mg/100g) para 63,95 ±0,59 e de 9,53±0,0 (mg/100g) para 6,36±0,03 (mg/100g) nas fases superior e inferior respectivamente, indicando que a variação de temperatura apresentou discreto decréscimo no conteúdo de antocianinas totais em ambas as fases. Indicando assim que o SAB proposto conseguiu particionar com eficiência as antocianinas totais do extrato, se comparado com o conteúdo de AT encontrado por Batista et al (2012), para alguns cultivares de acerola, para AT.

Uma das principais características da acerola é seu elevado teor de ácido ascórbico e antocianinas totais que atuam como poderosos antioxidantes. Para preservar essa propriedade após os processos de extração, foram avaliadas as amostras dos extratos particionados da casca da acerola. A atividade antioxidante das amostras foi expressa em função da concentração de Trolox (µM Trolox/g de amostra). Neste trabalho, foi possível observar que o extrato da casca da acerola não só preservou sua capacidade antioxidante, mas também apresentou uma taxa de desempenho de aproximadamente 6122,45±0,07 (µM Trolox/g de amostra) para a FS do sistema à 35°C correspondendo a aproximadamente 3 vezes a capacidade de antioxidante presente no extrato particionado às FS do sistema com temperatura de 25°C 2136,76±0,04(µM Trolox/g de amostra).

Ao elevar a temperatura do sistema de 25° para 35° C é possível perceber um decréscimo na sua atividade antioxidante de 1263,42±0,04 (µM Trolox/g de amostra)

para $219,62 \pm 0,13$ (μM Trolox/g de amostra) na fase inferior do sistema, entretanto podemos observar que o comportamento inverso aconteceu com a fase superior que triplicou, conforme mostrado na tabela 11.

A análise de DPPH foi realizadas para nos ensaios LA1 e LA2 e foi observado que a análise de ABTS refletiu melhor o conteúdo de atividade antioxidante para a casca da acerola, pois na realização da análise de DPPH, ao levar as amostras para serem feitas as leituras no espectrofotômetro as mesmas apresentaram-se instáveis, variando bruscamente a sua absorbância, impossibilitando a obtenção de dados para esta análise.

Lima, (2008) observou que o método DPPH apresenta vantagens quando a substância em estudo é mais solúvel em solventes orgânicos. Possivelmente a instabilidade das respostas na leitura de absorbância deveu-se ao fato de que tanto as antocianinas como a forma radical não-reagida de DPPH absorvem na mesma faixa visível, e o método espectroscópico é baseado nas medidas de intensidade de cor em 517 nm. Com isso não foi possível obter os resultados da atividade antioxidante total pelo método DPPH, verificando assim que esta metodologia não se aplica para a amostra em questão.

Tabela 12- Análises realizadas nas LA2 dos sistemas de 25°C e 35°C

LA		°BRIX	pH	Açúcares totais	$K_{\text{etanol}} = \text{FS}/\text{FI}^*$	K_{AT}	K_{AA}	K_{at}	E% _{AA}	E% _{AT}	E _{at}
25°C											
LA1	FS	20,00±0,0 ^d	4,52±0,03 ^a	58,22±0,32 ^a	8,20	7,67	1,78	1,63	58,11	85,67	56,00
	FI	37,27±0,06 ^a	4,01±0,01 ^b	35,66±0,28 ^d							
35°C											
LA2	FS	24,83±0,47 ^c	4,48±0,26 ^a	57,52±0,09 ^b	8,93	10,05	2,0	1,43	59,48	88,06	51,22
	FI	36,37±0,47 ^b	4,09±0,08 ^b	40,21±0,16 ^c							

*valores expressos em base úmida; *valores com letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa ($p \leq 0,05$).; *valores médios (média ± desvio-padrão) de triplicatas.; dados da literatura.; FS: fase superior FI: fase inferior.; AA: ácido ascórbico; AT: antocianinas totais; at: Açúcares totais *K: coeficiente de partição; E%: eficiência de extração

O pH manteve-se entre 4,01 a 4,52. É desejável para antocianinas $\text{pH} < 7$ para manter-se em meio ácido haja visto que o pH alto > 7 o meio estará básico causando a degradação das antocianinas. Com isso a escolha do pH é muito importante uma vez que a estrutura química das antocianinas varia com o valor do pH da solução (HUA et al., 2013). De acordo com os ensaios de (ALMEIDA H, 2016), onde se variou o pH de 3,0 a 5,5, quanto maior o pH maior foi o rendimento da recuperação da antocianina na fase superior em relação a fase inferior.

Na tabela 12 mostra que com o aumento da temperatura aumentou o coeficiente de partição (k) do etanol no sistema em branco reportados na literatura, isso refletiu no coeficiente de partição das AT e AA que apresentou o mesmo comportamento, ou seja o coeficiente de partição das AT e do AA aumentou com o aumento da temperatura do sistema. Esse comportamento é comprovado com os valores da eficiência de extração, que também mostraram que o sistema etanol+ sulfato de amônio+ água tem uma eficiência de extração de AT maior que 88,06 % na temperatura de 35°C e uma eficiência de extração de AA de 59,48% à 35°C. Tal comportamento foi também observado por Wu et al., (2011) para o mesmo sistema e na temperatura de 35°C obtiveram melhor coeficiente de partição (K) nestas condições. Um comportamento inverso foi observado para açúcares totais (at) que mostraram maior coeficiente de partição (1,63) para o sistema com menor temperatura (25°C), esse mesmo comportamento foi observado para eficiência de extração (Eat) 56%.

Os resultados de sólidos solúveis totais (°Brix) aumentaram nas fases superiores (de $20,00 \pm 0,0$ para $24,83 \pm 0,47$) e decresceram nas fases inferiores (de $37,27 \pm 0,06$ para $36,37 \pm 0,47$) de ambas as temperaturas, conforme mostrado na tabela 12.

Na tabela 13 estão os resultados das análises de cor que foram realizadas para os sistemas das LA1 e LA2, tendo o extrato como branco.

Tabela 13-Resultados da análise de cor

LA		L*	a*	b*	a*/b*	ΔE^*	C*
25°C							
	FS	28,13 ^d	4,23 ^a	12,43 ^a	0,34 ^a	9,23 ^c	13,14 ^a
LA1	FI	34,57 ^b	-0,67 ^c	4,77 ^c	-0,14 ^c	9,40 ^c	4,81 ^c
35°C							
	FS	33,20 ^c	0,90 ^b	7,93 ^b	0,11 ^b	7,45 ^b	7,99 ^b
LA2	FI	37,73 ^a	-0,80 ^c	4,77 ^c	-0,14 ^c	10,43 ^a	4,84 ^c

*valores expressos em base úmida

*letras iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa

Para estudar sistematicamente a qualidade da cor do extrato particionado da casca da acerola que tem considerável potencial em antocianinas, foi utilizado o sistema CIE $L^* a^* b^*$ (Comissão Internacional de Iluminação, Viena) expostos na tabela 14. Podemos observar que os valores de a^* para o sistema de 25°C aumentaram de maneira significativa na FS (4,23) onde tem uma maior concentração de antocianinas (conforme mostrado na tabela 12), em relação à fase inferior de ambos os sistemas (-0,67 e -0,80) em decorrência da menor concentração das antocianinas, tendendo para a cor verde, de acordo com o significado geométrico das coordenadas $L^* a^* b^*$. Nos resultados onde os valores de a^* se apresentaram negativos (-0,67 e -0,80), teve como consequência, os valores de L^* aumentados nas FI de ambos os sistemas (34,57 e 37,73). A fase superior do sistema a 25°C apresentou cor mais escura ($L^*=28,13$), e a fase inferior do sistema de 35°C, a mais clara ($L^*=37,73$).

Comparando-se os resultados da avaliação cromática com a quantificação das antocianinas, confirma-se a importância das coordenadas de cromaticidade a^* e b^* no estudo da avaliação do comportamento de pigmentos naturais, visto que estes parâmetros estão diretamente relacionados aos teores antocianinas totais presentes na casca da acerola. Maiores decréscimos foram observados nos valores de a^* dos extratos das fases inferior de ambos os sistemas, que reafirmam as maiores reduções nos teores de antocianinas totais desses frutos discutidos anteriormente.

Em relação ao ΔE^* , diferença total de cor, o sistema de 35°C, apresentou uma maior diferença de cor com valores de 7,45 e 10,43 das fases superior e inferior respectivamente, o que pode ser atribuído a uma maior reação oxidação de compostos fenólicos responsáveis pela coloração, como as antocianinas.

Com relação ao croma (C^*), observaram-se para o sistema de 25°C, valores variando de 4,81 até 13,14 (fase inferior e superior, respectivamente), indicando que a fase inferior apresenta uma coloração mais opaca, enquanto a fase superior mostra uma cor mais viva.

6 CONCLUSÃO

O ensaio de extração com diluição de 98,72% etanol/H₂O da extração por agitação magnética acoplado ao banho termostático (ensaio 13) obteve maiores concentrações de antocianinas totais de $57,04 \pm 0,36$ (mg/100g). Este extrato foi particionado no SAB etanol+ sulfato de amônio+ água à temperatura de 25 e 35°C, e foi observado que com o aumento da temperatura, aumentou o coeficiente de partição (K) das antocianinas. Este resultado foi comprovado com os valores da eficiência de extração, que também mostraram que o sistema etanol+ sulfato de amônio+ água tem uma eficiência de extração de AT maior que 88,06 % e uma eficiência de extração de AA de 59,48% ambos na temperatura de 35°C.

Após o particionamento foi observado que a atividade antioxidante, em ambas as fases se mostraram elevadas, concluindo que o SAB além de particionar o AA e AT preserva a sua capacidade antioxidante e também apresentou uma taxa de desempenho de aproximadamente $6122,45 \pm 0,07$ (μ M Trolox/g de amostra) para a FS do sistema à 35°C correspondendo a aproximadamente 3 vezes a capacidade de antioxidante presente no extrato particionado às FS do sistema com temperatura de 25°C $2136,76 \pm 0,04$ (μ M Trolox/g de amostra).

Em relação a cor foi verificado que os valores de a^* para o sistema de 25°C aumentaram de maneira significativa na FS (4,23) onde tem uma maior concentração de antocianinas em relação à fase inferior de ambos os sistemas (-0,67 e -0,80) em decorrência da menor concentração das antocianinas.

As amostras da casca de acerolas avaliadas podem ser consideradas fonte de compostos bioativos, como ácido ascórbico, antocianinas extraíveis e atividade antioxidante, sendo recomendado seu consumo, visando à manutenção de uma boa saúde.

7 REFERÊNCIAS

ACEVEDO, A, C. HILBERT, G. RIVIÉRE, C. MENGIN, V. OLTAT, N. BORDENAVE, L. DECROOCQ, S. DELAUNAY, J-C. DELROT, S. MÉRILLON, J-M. Monti, J-P. GOMÈS, E. RICHARD, T. Anthocyanin identification and composition of wild Vitis spp. accessions by using LC–MS and LC–NMR. **Analytica Chimica Acta** 732 (2012) 145–152.

ALBERTINO, A.; BARGE, A.; CRAVOTTO, G.; GENZINI, L. Natural origin f ascorbic acid: validation by C NMR and IRM. Food Chamistry, London, v.112, p.715-720, 2009. ALBERTSSON PA (1961) Fractionation of particles and macromolecules in aqueous twophase systems. **Biochemical Pharmacology** 5: 351–358.

ALBERTSSON, P-A. Partition of Cell Particles and Macromolecules, 2nd edition, Wiley, New York, 1986. ALBERTSSON et al., (1990) Aqueous two-phase separations. In: Asenjo JA (ed.) Separation Processes in Biotechnology, pp. 287–327. New York, NY: Dekker.

ALMEIDA, F. D. F. **Extração de compostos bioativos de fontes vegetais utilizando solventes eutéticos.** Dissertação. Tecnologia biomédica, Instituto Politécnico de Bragança, Portugal, 2016.

ALMEIDA, H. N. **Extração e purificação parcial de antocianinas do mirtilo com remoção simultânea dos açúcares redutores usando o sistema de duas fases aquosas etanol/ sulfato de amônio.** Dissertação. UFRN Departamento de Engenharia Química – DEQ 69

ALVES, C.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

ANAGNOSTOPOULOU, M. A. KEFALAS, P. PAPAGEORGIU, V. P. ASSIMOPOULOU, A. N. BOSKOU, D. Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*). **Food Chemistry**, 94 (2006), pp. 19-25.

ANDERSEN, O. M.; JORDHEIM, M. The anthocyanins. In *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*; Anderson, O.M., Markham, K.R., Eds.; CRC Press/Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL, USA, p. 472–551 (2006).

ANDREWS et al., (2010) Theoretical and experimental evaluation of hydrophobicity of proteins to predict their partitioning behaviour in aqueous two phase systems: A review. **Separation Science and Technology** 45: 2165–2170.

AOAC. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists: edited Ig W. Horwitz 16^a ed. Washington, 850p. v.2. 1997.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of AOAC international. 8. ed., Washington, 2011.

AQUINO, A. C.M. S.; CARNELOSSI, M.A.G.; CASTRO, A.L. Estabilidade do ácido ascórbico e dos pigmentos da polpa da acerola congelada por métodos convencional e criogênico. **B.CEPPA**, Curitiba, v. 29, n. 1, p. 147-156, jan./jun. 2011 70

BARROS, L., M. DUEÑAS, A. M. CARVALHO, I. C. FERREIRA e C. SANTOBUELGA (2011). "Use of HPLC–DAD–ESI/MS to profile phenolic compounds in edible wild greens from Portugal." **Food Chemical Toxicol** 127: 169-173.

BATISTA, P.F.; LIMA, A.C.; TRINDADE, D.C.G.; FAÇANHA, R.V.; SOUZA, K.O.; ALVES, R.E. Compostos bioativos e atividade antioxidante em acerolas (*Malpighia emarginata*, D.C.) cultivados no submédio do vale do São Francisco. XXII Congresso Brasileiro de Fruticultura, Outubro de 2012.

BENASSI, M. T.; ANTUNES, A. J. A comparison of metaphosphoric and oxalic acids as extractant solutions for the determination of vitamin C in selected vegetables. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, v.31, n.4, p.507-513, 1988.

BORDIGNON, C.L.J., FRANCESCETTO, V., NIENOW, A.A., CALVETE, E., REGINATTO, F.H. Influência do pH da solução extrativa no teor de antocianinas em frutos de morango. **Ciência Tecnologia Alimentos**, Campinas, 29(1): 183-188, jan.- mar. 2009.

BRILHANTE et al., Determinação do teor de antocianinas e sua influência na variação da coloração dos extratos de flores do Oeste Potiguar. 2012.

BRIGHENTI, F.S.; VALTUENA, N.; PELLEGRINI, D.; ARDIGO, D. DERLRIO, S.; SALVATORE, P.; PIATTI, M.; SERAFINI, I. ZAVARONI. Total antioxidant capacity of the diet is inversely and independently related to plasma concentration of highsensitivity C-reactive protein in adult Italian subjects. **The British Journal of Nutrition**, 93 (2005), pp. 619-625.

BRITO, G.M., **Termodinâmica de partição do ânion $[\text{CO}(\text{NO}_2)_6]^{3-}$ em sistemas aquosos bifásicos**. 2007. 91f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, MG, 2007.

BRITO, L. L. R.; OLIVEIRA, B. S.; SOARES, C. M. F.; SOZA, R. L.; LIMA, A.S. Extração de compostos fenólicos e de antocianinas da casca de Jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) utilizando acetonitrila em processo assistido por ultrassom. 18ª Semana de Pesquisa da Universidade Tiradentes. “A prática interdisciplinar alimentando a Ciência”. 24 a 28 de outubro de 2016. ISSN: 1807-2518

CAETANO, P. K.; DAIUTO, E. R.; VIEITES, R. L. Característica físico-química e sensorial de geleia elaborada com polpa e suco de acerola. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 3, p. 191-197, 2012.

CANUTO, G.A.B.; XAVIER, A.A.O.; NEVES, L.C.; BENASSI, M.T. Caracterização físico-química de polpas de frutos da Amazônia e sua correlação com a atividade antiradical livre. **Rev. Bras. Frutic.** vol.32 no.4 Jaboticabal Dec. 2010. Epub Nov 26, 2010

CANUTO, G. A, B. **Caracterização, quantificação e estudo da relação retenção propriedade antioxidante (QRPR) de antocianinas em extratos de morango (*Fragaria vesca*) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**. 2011. 235 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

CAO, G.; PRIOR, R.L. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. **Clinical Chemistry**, 44 (1998), pp. 1309-1315.

CARTINI E RAIGANI, 1978. A Critical Analysis of the Hand and Othmer- Tobias Correlations. **Fluid Phase Equilibria**, 2: 39-47.

CHEN, F. SUN, Y. ZHAO, G. LIAO, X. HU, X. WU, J. WANG, Z. Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins in red raspberries and identification of anthocyanins in extract using high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. **Ultrasonics Sonochemistry** 14 (2007) 767-778.

COUTO, A.B.; RAMOS, L.A.; CAVALHEIRO, E.T.G. Aplicação de pigmentos de flores no ensino da química. **Química Nova**, v. 21, n. 2, p. 221-227, 1998.

DA SILVA E LOH. Sistemas aquosos bifásicos. **Quim. Nova**, Vol. 29, No. 6, 1345-1351, 2006.

DINIZ, M, E, R. **Uso da técnica de espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS) para o estudo do mecanismo de reações orgânicas e avaliação do perfil de fragmentação de bis-hidroxiiminas aromáticas**. 2011. 93 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Programa de Pós Graduação, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

DUBOIS, M. K. A. GILLES, J. K. HAMILTON, P. A. REBERS, and FRED SMITH. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**. Vol. 28, Nº. 3, March 1956.

EDAHIRO J-I.; YAMADA M.; SEIKE S.; KAKIGI Y.; MIYANAGA K.; NAKAMURA M. Separation of cultured strawberry cells producing anthocyanins in aqueous two-phase system. **J. Biosci. Bioeng.** 100: 449–454 (2005).

FERREIRA, T. I. L. **Quantificação de antocianinas no fruto, polpa e produto processado de Juçara (*Euterpe edulis Martius*)**. Trabalho apresentado ao Departamento de Engenharia Mecânica, Universidade de Taubaté para conclusão do curso de Engenharia de Alimentos. Taubaté, SP, 2013.

FLOEGEL, A.; D.O. KIM, S.J. CHUNG, W.O. SONG, M.L. FERNANDEZ, R.S. BRUNO, S.I. KOO, O.K. CHU. Development and validation of an algorithm to establish a total antioxidant capacity database of the US diet. **International Journal of Food Sciences and Nutrition** (2010).

FOODS INGREDIENTS BRAZIL Nº 18, 2011.

FRANCIS, F. J. Analysis of anthocyanins. In: MARKAKIS, P. (Ed.) Anthocyanins as food colors, London: Academic Press, 1982. p. 181-205.

FREIRE, J. M.; ABREU, C.M.P.; ROCHA, D.A.; CORRÊA, A.D.; MARQUES, N.R. Quantificação de compostos fenólicos e ácido ascórbico em frutos e polpas congeladas de acerola, caju, goiaba e morango. **Ciência Rural**, Santa Maria, 2013. online. ISSN 0103-8478

FREITAS, C.; MAIA, G. A.; COSTA, J. M. C. D.; FIGUEIREDO, R. W. D.; RODRIGUES, M. D. C. P.; SOUSA, P. H. M. D. Estabilidade do suco tropical de acerola (*Malpighia emarginata* DC) adoçado envasado pelos processos hot-fill e asséptico, **Ciência e Tecnologia Alimentos**. Campinas, v. 26, n. 3, p. 544-549, 2006.

FULEKI, T.; FRANCIS, F.J.; (1968). Determination of total anthocyanin and degradation index for cranberry juice. **FOOD SCIENCE**, 33(1), 78–83.

GAMA, T, L. **Determinação experimental e modelagem termodinâmica dos dados de equilíbrio líquido-líquido do sistema aquoso bifásico de etanol/sulfato de amônio/água a 308,15K.** Trabalho de conclusão de curso. Universidade Federal do Pará. Belém, 2018.

GHISLAIN, T.; FAURE, P.; MICHELS, R. Detection and Monitoring of PAH and Oxy PAHs by High Resolution Mass Spectrometry: Comparison of ESI, APCI and APPI Source Detection. **American Society for Mass Spectrometry.**, 23, 530-536. 2012.

GONG, H., LI, Q. e YANG, Z.. Optimization of enzyme-assisted extraction of anthocyanins from blackberry (*Rubus fruticosus* L.) juice using response surface methodology. **African Journal of pharmacy and Pharmacology.** v. 8, n. 34, p. 841-848 (2014).

GÜNDÜZ, U.(2000). Partitioning of bovine serum albumin in an aqueous two-phase system: optimization of partition coefficient. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications.* 743, 259–262.

HAM, B.M. Even electron mass spectrometry with bimolecular applications, **Hoboken, John Wiley & Sons:** 2008. 75

HUA, Z., Yuesheng, D., Ge, X., Menglu, L., Liya, D., LiJia, A. e Zhilong, X. (2013). Extraction and Purification of Anthocyanins from the Fruit Residues of *Vaccinium uliginosum* Linn. **Journal of Chromatography & Separation Technique.**, v. 4, p. 2.

HUDDLESTON, J. G.; Willauer, H. D.; Rogers, R. D. Phase Diagram Data for Several PEG þ Salt Aqueous Biphasic Systems at 25°C. **J. Chem. Eng. Data** 2003, 48, 1230–1236.

HUNTERLAB. Applications note: CIE L* a* b* color scale. Virginia, 1996. v. 8, n. 7.

JIANG et al., (2009). Aqueous two-phase extraction of 2,3-butanediol from fermentation broths using an ethanol/phosphate system. **Process Biochemistry**. Volume 44, Issue 1, January 2009, Pages 112–117.

JEONG, S. M. KIM, S.Y. KIM, D.R. JO, S.C. NAM, K.C. AHN, D.U. Effect of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52 (2004), pp. 3389-339

KANO, M., TAKAYANAGI, T., HARADA, K., MAKINO, K., & ISHIKAWA, F. Antioxidative activity of anthocyanins from purple sweet potato. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 69(5), 979–988 (2005)

KARA, S.; ERÇELEBI, E. A. Thermal degradation kinetics of anthocyanins and visual colour of Urmu mulberry (*Morus nigra* L.). **Journal of Food Engineering**, v.116, p.541547, 2013.

KIRCA, A. & CEMEROG LU, B. Degradation kinetics of anthocyanins in blood orange juice and concentrate. **Food Chemistry**, 81, 583–587(2003).

LAGO, A, R. **Extração de antocianinas do Açaí (*Euterpe oleracea*) em sistemas aquosos bifásicos formados por etanol e sulfato de amônio**. Dissertação – Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Pará. Belém, 2017.

LAPORNIK, B., PROSEK, M. and WONDRA, A.G. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. **J. Food Eng.** 71(2), 214– 222 (2005).

LEE, J., DURST, R. W., & WROLSTAD, R. E. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. **Journal Association of Official Analytical Chemists International**, 88(5), 1269–1278 (2005).

LEVI, M. A. B. et al. Three-way chemometric method study and UV-VIS absorbance for the study of simultaneous degradation and anthocyanins in flowers of the *Hibiscus rosasinensis* species. **Talanta**, v. 62, n. 2, p. 299-305, 2004.

LEYDENS, N. **Extração, purificação e fracionamento das antocianinas do bagaço da uva**. Trabalho de conclusão de curso em Engenharia Química (UFRGS). Porto Alegre, 2011.

LI, B. B.; SMITH, B.; HOSSAIN, M.M. Extraction of phenolics from citrus peels: II. Enzyme-assisted extraction method. **Separation and Purification Technology**, 48 (2006a), pp. 189-196 77

LI, Z.; LI, B.; JIANG, D.; ZHANG, Z.; XIU. Aqueous two-phase extraction of 1,3-propanediol from glycerol- based fermentation broths. **separation and purification. technology**, 66 (3) (2009), PP. 472–478.

LI, Z. TENG, HU. XIU, Z. Aqueous two-phase extraction of 2,3-butanediol from fermentation broths using an ethanol/ammonium sulfate system. **Process Biochemistry**. 45 (2010) 731–737

LI, H. DENG, Z. ZHU, H. HU, C. LIU, R. YOUNG, J. TSAO, R. Highly pigmented vegetables: Anthocyanin compositions and their role in antioxidant activities. **Food Research International**. 46 (2012) 250–259

LILA, M.A. Anthocyanins and Human Health: An In Vitro Investigative Approach. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 5, p.306-313 (2004).

LIMA A. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo, e identificação dos compostos fenólicos presentes no pequi (caryocar brasiliense, camb.).** Tese. [Doutorado em Bromatologia] - Universidade de São Paulo; 2008.

LIMA, V.L.A.G.; MUSSER, R.S.; LEMOS, M.A. et al. Análise conjunta das características físico-químicas de acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) do banco ativo de germoplasma em Pernambuco. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17, 2002a, Belém, Anais... Belém: SBF, 2002. CD-ROM.

LIMA, V. L. A. G. et al. Avaliação do teor de antocianinas em polpa congelada proveniente de frutos de 12 diferentes aceroleiras (*Malpighia emarginata* D.C.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 101-103, 2002b.

LIMA, V. L. A. G. et al. Avaliação de teor de antocianinas em polpa de acerola congelada proveniente de 12 frutos de diferentes elétrons (*Malpighia emarginata* DC.) **Ciencia y Tecnología Alimentaria**, 23 (2003), pp. 101-103

LIMA, V. L. A. G. et al. Total phenolic and carotenoid contents in acerola genotypes harvested at three ripening stages. **Food Chemistry**, v. 90, n. 4, p. 495-496, 2005.

LIMA, E. C.; BATISTA FILHO, M.; FALCÃO FILHO, R. S.; KOLODIUK, M. F. Avaliação física e físico-química da acerola (*malpighia glabra* l.) após aplicação do extrato aquoso de nim (*azadirachta indica* a. juss.). In: IX Congresso de Iniciação Científica do IFRN (CONGIC). Rio Grande do Norte, Anais. 2013.

LIU, X. MU, T. SUN, H. ZHANG, M. CHEN, J. Optimisation of aqueous two-phase extraction of anthocyanins from purple sweet potatoes by response surface methodology. **Food Chemistry**. 141 (2013) 3034–304

LOPES, T.J.; XAVIER, M.F.; QUADRI, M.G.N.; QUADR, M.B. Antocianinas: uma breve revisão das características estruturais e da estabilidade. *R. Bras. Agrociência, Pelotas*, v.13, n.3, p. 291-297, jul-set, 2007.

MACIEL, M. I. S.; MÉLO, E.; LIMA, V; SOUZA, K. A.; SILVA, W. Caracterização físico-química de frutos de genótipos de aceroleira (*Malpighia emarginata* D.C.), **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 30, n.4, p. 865-869, 2010.

MAIA et al. Processamento de suco de acerola. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, 27(1): 130-134, jan.-mar. 2007.

MANTHEY, J.A. GROHMANN, K. Concentrations of hesperidin and other orange peel flavonoids in citrus processing byproducts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 44 (1996), pp. 811-814

MAYOLO-DELOISA, J. K. GONZÁLEZ-VALDEZ, D. GUAJARDO-FLORES, O. AGUILAR, J. BENAVIDES, M. RITO-PALOMARES. Current advances in the nonchromatographic fractionation and characterization of PEGylated proteins. **J. Chem. Technol. Biot.**, 86 (2010), pp. 18-25

MARANHÃO, C.M.C. **Caracterização física, físico-química, e química do fruto da aceroleira (*Malpighia emarginata* D.C.), variedade okinawa, durante o seu desenvolvimento.** Dissertação (UFPB/CT). João Pessoa, Paraíba. 2010.

MARÇO, P.H., POPPI, R.J., SCARMINIO, I.S. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Quim. Nova**, Vol. 31, No. 5, 1218-1223 (2008).

MARTYSIAK-ŻUROWSKA, D.; WENTA, W. A comparison of abts and dpph methods for assessing the total antioxidant capacity of human milk. *Acta scientiarum polonorum. Technologia alimentaria*, v. 1, n.11, p. 83-89, 2012.

MAZZOLA PG, LOPES AM, HASMANN FA, et al. (2008). Liquid–liquid extraction of biomolecules: An overview and update of the main techniques. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology** 83: 143–157.

MENDONÇA, V.; MEDEIROS, F. L. Culturas da aceroleira e do maracujazeiro. Mossoró: Universidade Federal Rural do Seminário, 2011. (Boletim Técnico; IV).

MEYCHIK, N.R.; YERMAKOV, I.P. Ion-exchange properties of cell walls isolated from lupine roots. **Biochemistry** (Moscow) 66: 556–563 (2001).

MEYERS, K.J.; WATKINS, C.B.; PRITTS, M.P.; LIU, R.H. Antioxidant and antiproliferative activities of strawberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 23, p. 6887-6892, 2003

MOURA, C.F.H.; ALVES, R.E.; PAIVA, J.R. et al. Avaliação de clones de aceroleira (*Malpighia emarginata* D.C.) na região da Chapada do Apodi-CE. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17., 2002, Belém, Anais... Belém: SBF, 2002. CD-ROM.

NEVES, I. P. Cultivo da Acerola. Dossiê técnico. Rede de tecnologia da Bahia RETEC/BA, 2007.

OLIVEIRA, L. D.; MOURA, C. F. H.; BRITO, E. S.; MAMEDE, R. V. S.; MIRANDA, M. R. A. Antioxidant Metabolism during Fruit Development of Different Acerola (*Malpighia emarginata* D.C) Clones. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, v.60, n. 32, p.79577964, 2012.

PATRAS, A., BRUNTON, N.P., O'Donnell, C., Tiwari, B.K. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. **Trends in Food Science & Technol.**, v.21, p.3- 11, 2010.

PELLEGRINI, N. M. SERAFINI, B. COLOMBI, D. DEL RIO, S. SALVATORE, M. BIANCHI, F. BRIGHETTI. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. **The Journal of Nutrition**, 133 (2003), pp. 2812-2819.

PEREIRA, R.J.; CARDOSO, M.D.G. Plant secondary metabolites and antioxidant benefits. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**. Vol. 3, No 4. 2012

PUCHAU, B. M.A. ZULET, A. GONZALEZ E, H. H. HERMSDORFF, J. A. MARTINEZ. Dietary total antioxidant capacity is negatively associated with some metabolic syndrome features in healthy young adults. **Nutrition** (2009).

PORCU, O.M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. Carotenóides de acerola: efeito de estágio de maturação e remoção de película. In: Simpósio Latino Americano de ciências de alimentos-Desenvolvimento científico e tecnológico e a inovação na indústria de alimentos, 5, 2003, Campinas, Anais... São Paulo: UNICAMP, 2003. 1 CD-ROM.

PRADO, A. **Composição fenólica e atividade antioxidante de frutas tropicais**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) 2009. 107 p. – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

QIN C.; LI Y.; NIU W.; DING Y.; ZHANG, R.; SHANG, X. Analysis and characterisation of anthocyanins in mulberry fruit. **Czech J. Food Sci.**, Vol. 28, 2010, Nº. 2: 117–126

RABELO, Ana Paula Brescancini. **Estudo e Desenvolvimento de uma micro-coluna de câmpulas pulsantes para a purificação de proteínas**. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 1999. (Dissertação, Doutorado em Engenharia Química).

RAMOS-ESCUDERO, F., GONZALEZ-MIRET, M. L. e GARCIA-ASUERO, A. (2012). Effect Of Various Extraction Systems On The Antioxidant Activity Kinetic And Color Of Extracts From Purple Corn. *Vitae* [online]., v.19, n.1, p. 41-48. Disponível em: . ISSN 0121-4004.

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

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. Química de Alimentos. 1º Ed. São Paulo: Editora Edgard Blücher LTDA, 2004.184 p.

RITO- PALOMARES, M. Practical application of aqueous two-phase partition to process development for the recovery of biological products. **Journal of Chromatography B**. (2004) Volume 807, Pages 3–11

RITZINGER, R.; RITZINGER, C. H. S. P. Acerola. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 32, n. 264, p. 17-25, set./out. 2011.

RUIZ-RUIZ, F.J. BENAVIDES, O. AGUILAR, M. RITO-PALOMARES. Aqueous two affinity partitioning systems: current applications and trends. **J. Chromatogr. A**, 1244 (2012), pp. 1-13

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; PÉREZ-JJIMÉNEZ.; SAURA-CALIXTO, F.D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. Comunicado técnico 127 online. ISSN 1679-6535 Julho, 2007 Fortaleza, CE

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; PÉREZ-JJIMÉNEZ.; SAURA-CALIXTO, F.D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS ^{•+}. Comunicado técnico 128 online. ISSN 1679-6535 Julho, 2007b Fortaleza, CE

SALABAT, A. The influence of salts on the phase composition in aqueous two-phase systems: experiments and predictions. **Fluid Phase Equilibria**, v. 187-188, p. 489, 2001

SANTOS, A.C.A.; MARQUES, M.M.P.; SOARES, A.K.O.; FARIAS, L.M. FERREIRA, A.K.L CARVALHO, M.L. Potencial antioxidante de antocianinas em fontes alimentares: revisão sistemática. **R. Interd.** v. 7, n. 3, p. 149-156, jul. ago. set. 2014

SEBRAE - Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. Mercado de fruticultura: panorama do setor no Brasil. Boletim de inteligência, outubro 2015.

SEGTOWICK, E. C. S.; BRUNELLI, L. T.; VENTURINI FILHO, W. G. Avaliação físico-química e sensorial de fermentado de acerola., **Brazilian Journal of Food Technology**. Campinas, v. 16, n. 2, p. 147-154, 2013.

SILVA, A.G.; CONSTANT, P.B.L.; GABRIEL, E.N.; GONÇALVES, R.A.S; AREAL, E.R.S.; STRINGHETA, P.C.; MAIA, M.C.A.; Quantificação de antocianinas do mangostão (*Garcinia mangostana*). In: Anais do XX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Curitiba-PR, 2006.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. 7. ed. Rio de Janeiro: Ltc, p. 508, 2007.

SOARES, A.P.; OLIVEIRA, E. N. A.; FEITOSA, R. M.; SILVA, R. C.; ARAUJO, K. T. A. Perfil sensorial e aceitação de licores mistos de acerola e goiaba xaropado com mel. **Revista Brasileira de Agrotecnologia**. (BRASIL). v. 7, n. 2 (2017) páginas 126 - 131 ISSN: 2317-3114

SVENSSON, M.; JOABSSON, F.; LINSE, P.; TJERNELD, F.; Partioning of hydrophobic amino acids and oligopeptides in aqueous two-phase system containing selfaggregating block copolymer. **Journal of Chromatography**. A, 761(1997)91

SUN, J. et al. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 25, p. 7449-7454, 2002.

TALCOTT, S. T.; BRENES, C. H.; Pires, D. M.; Del Pozo-Insfran, D. D. Phytochemical stability and color retention of copigmented and processed muscadine grape juice. **J. Agric. Food Chem.**, 51, 957-963, 2003

TSAO, R. (2010). Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. **Nutrients**, v. 2, p.1231-1246; doi:10.3390/nu2121231.

VASCONCELOS, S.; MARY. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2008.

VENDRAMINI, A. L.; TRUGO, L. C. Phenolic compounds in acerola fruit (*Malpighia puniceifolia* L.). **J. Braz. Chem. Soc.** 15, 664-668, 2004

VERA DE ROSSO, V. HILLEBRAND, S. MONTILLA, E. C. O. BOBBIO, F. WINTERHALTER, P. MERCADANTE, A.Z. Determination of anthocyanins from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) and açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) by HPLC–PDA–MS/MS. **Journal of Food Composition and Analysis**. Volume 21, Issue 4, June 2008, Pages 291-299

WEST, M. E. and MAUER, L. J. Color and Chemical Stability of a Variety of Anthocyanins and Ascorbic Acid in Solution and Powder Forms. **J. Agric. Food Chem.** 2013, 61, 4169–417. dx.doi.org/10.1021/jf400608b

WU, X.; LIANG, L.; ZOU, Y.; ZHAO, T.; ZHAO, J.; LI, F.; YANG L. Aqueous twophase extraction, identification and antioxidant activity of anthocyanins from mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.) **Food Chemistry**. 129 (2011) 443–453.

WU, Y.; WANG, Y.; ZHANG, W.; HAN, J.; LIU, Y. HU, Y.; NI, L. Extraction and preliminary purification of anthocyanins from grape juice in aqueous two-phase system. **Separation and Purification Technology**. p 124 (2014) 170–178

XU, G. YE, X. CHEN, J. LIU, D. Effect of heat treatment on the phenolic compounds and antioxidant capacity of citrus peel extract. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 55 (2007), pp. 330-335

YAHIA, E. M. The Contribution of Fruit and Vegetable Consumption to Human Health. In: ROSA, L.A.; ALVAREZ-PARRILLA, E.; GONZALEZ AGUILARA; G.A. Fruit and vegetable phytochemicals: chemistry, nutritional value and stability. Hoboken: **Wiley-Blackwell**, 2010. p. 3-51.

YAU, Y.K., OOI, C. W., NG, E.-P., LAN, J. C.-W., LING, T. C. AND SHOW, P. L. (2015). Current applications of different type of aqueous two-phase systems. **Bioresource and Bioprocess**, v. 2, p. 49. doi 10.1186/s40643-015-0078-0

YUYAMA, L. K. O.; MAEDA, R. N.; PANTOJA, L.; AGUIAR, J. P. L.; MARINHO, H. A. Processamento e avaliação da vida-de-prateleira do tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) desidratado e pulverizado., **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 28, n. 2, 408-412, 2008.

ZAFARANI-MOATTAR, M. T.; SADEGHI, R. Liquid-liquid equilibria of aqueous twophase systems containing polyethyleneglycol and sodium dihydrogen phosphate or disodium hydrogen phosphate. Experiment and correlation. **Fluid Phase Equilib.** v. 181, p. 95-112, 2001

ZAFARINI-MOATTAR, M. T.; GASEMI, J. Phase Diagrams of Some Aliphatic Alcohols þ Ammonium Dihydrogen Phosphate or Diammonium Hydrogen Phosphate þ Water. **J. Chem. Eng. Data** 2002, 47, 525–528.

ZASLAVSKY, B.Y. Aqueous Two-Phase Partitioning, Physical chemistry and bioanalytical applications. New York: Marcel Decker, 696 p., 1995.

ZIA-UR-REHMAN. Citrus peel extract – A natural source of antioxidante. **Food Chemistry**, 99 (2006), pp. 450-454