

UFRRJ

INSTITUTO DE TECNOLOGIA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

DISSERTAÇÃO

**QUANTIFICAÇÃO DAS ANTOCIANINAS MAJORITÁRIAS DO AÇAÍ
POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**

ANA CRISTINA MIRANDA SENNA GOUVÊA

2010



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS**

**QUANTIFICAÇÃO DAS ANTOCIANINAS MAJORITÁRIAS DO AÇAÍ
POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**

ANA CRISTINA MIRANDA SENNA GOUVÊA

Sob a orientação da Professora
Lourdes Maria Corrêa Cabral

e Co-orientação do Professor
Ronoel Luiz de Oliveira Godoy

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, na área de concentração Ciência de Alimentos.

Seropédica, RJ

Fevereiro de 2010

664.8046

G719q

T

Gouvêa, Ana Cristina Miranda
Senna,
1960-

Quantificação das antocianinas
majoritárias do açaí por
cromatografia líquida de alta
eficiência / Ana Cristina Miranda
Senna Gouvêa. - 2010.

75f. : il.

Orientador: Lourdes Maria
Corrêa Cabral.

Dissertação (mestrado) -
Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro, Curso de Pós-
Graduação em Ciência e Tecnologia
de Alimentos.

Bibliografia: f. 55-63.

1. Açaí - Análise - teses. 2.
Antocianinas - Teses.
Cromatografia líquida de alta
eficiência - Teses. 4. polpa de
frutas - Teses. I. Cabral,
Lourdes Maria Corrêa, 1957-. II.
Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro. Curso de Pós-
Graduação em Ciência e Tecnologia
de Alimentos. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS**

ANA CRISTINA MIRANDA SENNA GOUVÊA

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciências** no programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de concentração Ciência de Alimentos.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 23 de fevereiro de 2010

Lourdes Maria Corrêa Cabral (D.Sc.) Embrapa-CTAA
(Orientador)

Mônica Caramez Triches Damaso (D.Sc.) Embrapa-CTAA

Mirian Ribeiro Leite Moura (D.Sc.) UFRJ

Renata Galhardo Borguini (D.Sc.) Embrapa-CTAA
(Suplente)

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais
volta ao seu tamanho original.”
(Albert Einstein)

DEDICATÓRIA

Às minhas filhas Priscila e Gabriela, minhas grandes meninas, amores da minha vida.

À D. Dayl, minha querida sogra pelo grande apoio durante este ano.

Ao meu marido Ary, pelo amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus por ter possibilitado esta oportunidade na minha vida. Aos meus orientadores professores (D.Sc.) Lourdes Maria C. Cabral e (D.Sc.) Ronoel L. Godoy pela paciência, suporte, palavras de incentivo e por acreditarem no meu trabalho.

À minha família principalmente minha mãe, minhas irmãs e irmãos por compreenderem minha ausência nestes últimos dois anos. Ao meu pai querido que partiu sem ver este sonho concluído.

Ao (D.Sc.) João Oiano Neto pelas palavras de consolo devido ao especial momento que passei.

Aos colegas em especial Manuela, Fernanda, Sidney, Jeane e Renata pelas palavras de incentivo e troca de experiências.

A todos os colegas do laboratório de cromatografia líquida e da planta II da Embrapa, CTAA, Daniel Schulz, Vanessa, Sâmara, Suellen, Pedro, Josi, Priscila, Juliana, Pingo, Isabelle, Ana Paula Cruz, Mônica e Tatiana pela ajuda e apoio. Nunca esquecerei a convivência que foi muito prazerosa.

Ao Daniel pelo grande suporte durante os processos na planta e Aline por compreender seu apoio.

Com carinho aos amigos da faculdade UFRRJ Sabrina, Vanessa, Elisabete, Eliana, Gabriela, Thais, Admilson, Lucilla, Marliza, Silvana, Patrícia, Monique, Diego e Juarez por dividirmos nossas dúvidas e conhecimentos durante o ano acadêmico.

À minha família pelo incentivo na realização desta dissertação de mestrado, principalmente minhas filhas e em especial meu marido pelo amor e paciência durante o tempo que me dediquei a este trabalho e por me darem força para ir adiante, cada vez que desanimei.

Às minhas amigas Iolanda e Tininha pela amizade de anos e sempre estarem por perto quando necessito.

RESUMO

GOUVÊA; Ana Cristina Miranda Senna. **Quantificação das antocianinas majoritárias do açai por cromatografia líquida de alta eficiência**. Seropédica: UFRRJ, 2010. 63p. (Dissertação, Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Ciência de Alimentos).

O açai (*Euterpe oleraceae* Mart) é um fruto com alto valor energético e nutricional que possui um elevado teor de compostos fenólicos, principalmente de pigmentos antocianicos diretamente relacionados à sua coloração. Nos últimos anos, o interesse por esses pigmentos se intensificou uma vez que vários estudos científicos têm demonstrado que as antocianinas e suas respectivas agliconas são compostos bioativos e que podem estar relacionados à prevenção de doenças, principalmente aquelas causadas por oxidação celular. A indústria de alimentos apresenta forte interesse em inovações tecnológicas que permitam atender às necessidades e anseios do mercado consumidor. A aplicação dos processos com membranas, especificamente a microfiltração, representa uma alternativa que justifica o grande interesse em investimentos e pesquisas. Em geral, são processos que ocorrem à temperatura ambiente sem que haja mudança de fase ou utilização de calor. Desta forma, permitem a manutenção das propriedades sensoriais e nutricionais dos produtos, além de representar uma economia nos custos energéticos envolvidos no processo. O objetivo deste trabalho foi avaliar o teor das antocianinas majoritárias, cianidina-O-3-glicosídeo e cianidina-O-3-rutenosídeo, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando padrões previamente isolados de amostras de açai liofilizadas, durante clarificação de suco de açai por microfiltração. Para diminuir a viscosidade e o teor de polpa do suco e, conseqüentemente, aumentar a eficiência do processo, foram introduzidas uma etapa de hidrólise enzimática e outra de centrifugação do suco antes da microfiltração possibilitando a quantificação de cada antocianina e o seu rendimento em cada etapa do processo. As antocianinas majoritárias isoladas foram conclusivamente identificadas por CLAE e espectrometria de massas, confirmando as informações obtidas na literatura quanto à presença das antocianinas cianidina-3-O-glicosídeo e cianidina-3-O-rutenosídeo como majoritárias do açai. Esta técnica também pode contribuir para caracterização de outras matrizes, sendo possível a confirmação de dados previamente publicados. Com os resultados obtidos, conclui-se também ser possível a utilização de outras matrizes para isolar padrões e assim caracterizar outras amostras com confiança e economia. Em relação à microfiltração, foi possível quantificar os teores de cianidina-3-O-glicosídeo e cianidina-3-O-rutenosídeo nas correntes de alimentação e permeado que apresentaram respectivamente, 37 e 97 µg / 100g na alimentação e 15 e 54 µg / 100g no permeado.

Palavras chaves: padrões de antocianinas, CLAE; açai, microfiltração.

ABSTRACT

GOUVÊA; Ana Cristina Miranda Senna. **Quantification of the major anthocyanins of açai by high performance liquid chromatography.** Seropédica: UFRRJ, 2010. 64p. (Dissertation, Master in Food Science and Technology, Food Science).

Açaí (*Euterpe oleraceae* Mart) is a fruit with a high energetic and nutritional value that presents high content of phenolic compounds, mainly anthocyanin pigments directly related to its color. Over the past few years the interest on these pigments has been intensified as many scientific studies demonstrate that the anthocyanins and their aglycones are bioactive compounds and they can be related to disease prevention, mainly those caused by cellular oxidation. The food industry has a great interest in technological innovations that attend for of the requirements of the consumer market. The use of membrane processes, particularly microfiltration, represents an option that justifies the investments and researches on this subject. In general, these processes are conducted at room temperature without heat or phase change, preserving the sensory and nutritional quality of the products in addition to the reduction in the energetic costs involved in the process. The objective of this work was to evaluate the content of the main anthocyanins, cyanidin-3-O-glicoside and cyanidin-3-O-rutenoside, using high performance liquid chromatography (HPLC) by using standards previously isolated from freeze-dried açai samples, in the clarification of açai juice by microfiltration. In order to decrease the juice viscosity and the pulp content, consequently increasing the efficiency of the process it was introduced two steps before the microfiltration, an enzymatic hydrolysis followed by the juice centrifugation. The use of HPLC allowed the isolation of analytic standards from natural sources with a high purity level more than 97% allowing the quantification of each anthocyanin and its yield in each step of the process. The main anthocyanins isolated were conclusively identified by HPLC and mass spectrometry confirming data reported by other researches about the presence of anthocyanins cyanidin-3-O-glucoside and cyanidin-3-O-rutenoside as major anthocyanins of açai. This technique can also contribute to the characterization of new matrix, allowing the confirmation of previously published data. The obtained results showed that it is possible to use new matrix to isolate standards and to characterize other samples with confidence and economy. Regarding the microfiltration evaluation, it was possible to quantify the levels of cyanidin-3-O-glicoside and cyanidin-3-O-rutenoside in the feed and permeate fractions, respectively, 37 and 97 µg / 100g for the feed and 15 and 54 µg / 100g for the permeate.

Keywords: standards of anthocyanins, HPLC, açai; microfiltration.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	01
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	03
2.1 Açaí	03
2.1.1 Hábitos alimentares	04
2.1.2 Classificação da polpa	04
2.1.3 Conservação da polpa	05
2.1.4 Composição química	05
2.2 Compostos Fenólicos	07
2.2.1 Flavonóides	08
2.2.2 Antocianinas	09
2.2.2.1 Equilíbrio químico em solução aquosa	10
2.2.2.2 Estabilidade	11
2.2.2.3 Antocianinas em alimentos	12
2.3 Processos de Separação por Membranas –PSM	14
2.3.1 Vantagens e limitações	16
2.3.2 Microfiltração	17
2.4 Procedimentos Analíticos	17
2.4.1 Extração	18
2.4.2 Purificação do extrato	18
2.4.3 Isolamento	18
2.4.4 Identificação e quantificação	19
2.4.4.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE	19

2.4.4.2 Métodos espectroscópicos -----	21
3 MATERIAL E MÉTODOS -----	23
3.1 Matéria-Prima -----	23
3.1.1 Açaí -----	23
3.1.2 Material -----	23
3.2. Processo de Clarificação da Polpa de Açaí -----	23
3.2.1 Pré-tratamento -----	24
3.2.2 Processo de microfiltração -----	25
3.2.3 Limpeza dos sistemas de membranas -----	26
3.3 Adaptações do Método Cromatográfico para Amostras Líquidas-----	27
3.3.1 Análise cromatográfica -----	27
3.3.2 Etapa de extração -----	28
3.4 Isolamento das Antocianinas Monoméricas para Obtenção dos Padrões -----	28
3.4.1 Liofilização da polpa de açaí -----	28
3.4.2 Extração das antocianinas majoritárias -----	29
3.4.3 Concentração do extrato antociânico -----	29
3.4.4 Coleta dos pigmentos antociânicos -----	29
3.4.5 Purificação e concentração dos extratos aquosos das antocianinas majoritárias isoladas -----	30
3.4.6 Obtenção das concentrações dos padrões das antocianinas majoritárias isoladas -----	31
3.4.7 Identificação dos padrões por espectrometria de massas -----	32
3.5 Metodologia analítica -----	33

3.5.1 pH -----	33
3.5.2 Sólidos solúveis em °Brix -----	33
3.5.3 Acidez total titulável -----	33
3.5.4 Fenólicos totais -----	33
3.5.5 Sólidos totais -----	33
3.5.6 Avaliação da técnica de quantificação de antocianinas por CLAE no processo de microfiltração -----	33
3.5.6.1 Extração das antocianinas monoméricas -----	33
3.5.6.2 Análise cromatográfica -----	34
3.5.7 Determinação do coeficiente de rendimento para cada antocianina majoritária em cada etapa do processo -----	35
3.5.8 Determinação do índice de retenção da membrana de microfiltração -----	36
3.5.9 Quantificação por pH-diferencial e por CLAE das Antocianinas Monoméricas-	36
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	38
4.1 Adaptações do Método Analítico para Extração e Identificação da Antocianinas nos Extratos Antociânicos -----	38
4.1.1 Extração -----	38
4.1.2 Análises cromatográficas do açaí grosso -----	39
4.1.3 Identificação das antocianinas no açaí grosso por comparação com a literatura -----	40
4.2 Obtenção dos Padrões Cromatográficos das Antocianinas Majoritárias -----	40
4.2.1 Concentração da amostra -----	41
4.2.2 Identificação dos padrões por espectrometria de massas -----	43

4.3.3 Construção da curva de calibração -----	46
4.4 Aplicação dos Padrões para Quantificação por CLAE das Antocianinas Majoritárias no Suco de Açaí Clarificado por Microfiltração-----	48
4.4.1 Tratamento enzimático -----	48
4.4.2 Centrifugação -----	49
4.4.3 Processo de microfiltração -----	59
4.5 Quantificação por pH-diferencial e por CLAE das Antocianinas Monoméricas --	51
5 CONCLUSÃO -----	54
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS -----	55
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	56

1 INTRODUÇÃO

O açazeiro (*Euterpe oleracea Mart.*) é uma palmeira tropical nativa da Amazônia encontrado em grandes concentrações em todo o Estuário do Rio Amazonas e seus frutos, o açaí, são utilizados na produção da polpa, um importante componente na alimentação da população local, devido ao seu alto valor energético e nutricional, consumida, sobretudo misturada à farinha, com ou sem açúcar. Nos estados do Amapá e Pará é consumido durante todo ano, por famílias de diferentes níveis de renda. Nos outros estados brasileiros, principalmente nas regiões sul e sudeste, tem-se verificado um novo hábito alimentar, representado pelo consumo de açaí também na forma de suco, e esse crescimento tem sido estimulado pela divulgação na mídia sobre seu potencial energético e saudável.

A “geração saúde” aprovou o produto e o incluiu em sua dieta alimentar e, como consequência direta desta divulgação nacional e internacional, este passou a ser considerado extremamente importante para o crescimento das regiões produtoras.

A principal finalidade da utilização do açazeiro ainda é para extração do açaí, e isso irá confirmar a sua importância para a população ribeirinha como uma das mais rentáveis possibilidades de produção e comercialização do fruto *in natura*, demonstrando sua importância socioeconômica para a região.

O crescimento da demanda no mercado nacional e internacional, que foi observado nos últimos anos, despertou grande interesse em investimentos e pesquisas sobre esse assunto. Este aumento pode ser atribuído às propriedades nutricionais e valor calórico, pois este é um alimento rico em lipídios, fibras, vitamina E, vitamina B₁ e alguns micronutrientes minerais como manganês, cobre, boro e cromo. Além disso, este fruto possui um elevado teor de compostos fenólicos, principalmente de pigmentos antocianínicos, que estão diretamente relacionados à sua coloração. Nos últimos anos, o interesse por esses pigmentos se intensificou uma vez que vários estudos científicos têm demonstrado que as antocianinas e suas respectivas agliconas são compostos bioativos e que estão relacionados à redução do risco de diversas doenças, principalmente aquelas causadas por oxidação celular.

A literatura já apresenta indicações da presença das antocianinas cianidina-3-O-glicosídeo e cianidina-3-O-rutenosídeo como majoritárias no açaí. Além da identificação das antocianinas, sua quantificação também é muito importante, pois seus frutos podem ser oriundos de várias regiões apresentando, portanto, teores de antocianinas diferentes. Além disso, a medida exata das antocianinas associada aos seus índices de degradação também se torna muito útil para indústrias de processamento de frutas, pois é um instrumento que pode avaliar o impacto do processamento, armazenamento e transporte na qualidade da polpa, sucos clarificados, sorvetes dentre outros.

Assim, a quantificação das antocianinas ganha grande importância uma vez que estes compostos mostraram possuir atividades benéficas à saúde, podendo então servir como parâmetro para qualidade do suco do açaí ou de seus produtos processados.

Atualmente, a técnica mais utilizada, e uma das principais, para separação de antocianinas é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com fase reversa. Esta técnica permite realizar separações de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade. Além de permitir uma excelente separação, possibilita simultaneamente a identificação e quantificação dos pigmentos antocianínicos.

No entanto, para identificar e quantificar as antocianinas, individualmente, por CLAE, o maior desafio é a disponibilidade dos padrões de referência, os quais são vendidos em

pequenas quantidades e, em geral, têm alto custo. Existem relatos na literatura da dificuldade de adquirir padrões de antocianinas devido à grande diversidade da molécula, consequência das inúmeras possibilidades de combinações de seus substituintes, assim como da natureza e do número de açúcares e de ácidos alifáticos e/ ou aromáticos bem como da localização destes compostos na molécula.

A Embrapa Agroindústria de Alimentos vem desenvolvendo métodos de quantificação de moléculas bioativas por CLAE através de isolamento de padrões.

Esses desenvolvimentos têm como objetivo evitar o uso de padrões analíticos comerciais, que podem apresentar baixa pureza devido ao longo tempo para aquisição e as condições de armazenamento, visto que, são geralmente importados, além de apresentarem alto custo.

A indústria de alimentos apresenta forte interesse em inovações tecnológicas que permitam atender às necessidades e anseios do mercado consumidor que se apresenta cada vez mais exigente. A aplicação de processos de separação por membranas, mais especificamente da microfiltração, no processamento de sucos de frutas pode ser uma alternativa aos processos clássicos de conservação e clarificação. Na microfiltração ocorre a remoção das substâncias responsáveis pela turbidez de sucos e bebidas, além de ser considerada uma técnica de pasteurização a frio. Esta técnica pode ser utilizada à temperatura ambiente, sem que haja utilização de calor. Desta forma, permite a manutenção das propriedades sensoriais e nutricionais dos produtos, além de representar uma economia nos custos energéticos envolvidos no processo.

A microfiltração do suco de açaí já foi estudada, embora não tenha sido possível avaliar quantitativamente as antocianinas individualmente.

Neste contexto, o objetivo geral deste estudo foi avaliar por cromatografia líquida de alta eficiência o efeito do processamento de clarificação de suco de açaí, através da tecnologia de membranas, mais especificamente por microfiltração, sobre o teor das antocianinas majoritárias utilizando a técnica de quantificação por padronização externa.

Objetivos específicos:

- Adaptar o método analítico utilizado para identificação de antocianinas em amostras sólidas para quantificação de amostras líquidas através da otimização da etapa de extração e condições de análise cromatográfica.
- Obter padrões das antocianinas presentes no açaí a partir de amostras liofilizadas de seu suco, visando a sua quantificação por padronização externa.
- Identificar os padrões por CLAE e confirmar por espectrômetro de massas MS-MS.
- Avaliar, por CLAE, a concentração de antocianinas ao longo do processo de obtenção de açaí clarificado por microfiltração.
- Determinar o coeficiente de rejeição das antocianinas em todas as etapas do processamento do suco de açaí quantificadas por CLAE.

Este trabalho foi dividido em uma pequena revisão da literatura, na exposição dos materiais e métodos utilizados para o desenvolvimento do trabalho e finalmente na apresentação e discussão dos resultados obtidos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Açaí

O açaizeiro (*Euterpe oleraceae* Mart.) é uma palmeira abundante no estuário do Rio Amazonas, em terrenos de várzeas, igapós e terra firme de toda a região Amazônica, encontrando-se no Pará suas maiores reservas naturais. Fornece variada matéria-prima, sendo utilizado pelas populações nativas para suprir múltiplas necessidades. De seus frutos pode-se extrair, com auxílio de água, uma polpa de coloração violácea comestível e amplamente utilizada na alimentação da população regional, que se caracteriza pelo alto valor energético e nutricional (FRANKE *et al.*, 2001).

O açaizeiro é muito semelhante à palmeira juçara (*Euterpe edulis* Mart.) da Mata Atlântica, diferenciando-se por crescer em touceiras de 3 a 25 estipes (truncos de palmeira) e podendo chegar a até 25 metros de altura (Figura 1). A exploração clandestina do palmito da palmeira juçara pôs em risco de extinção esta espécie e hoje sua extração é considerada crime ambiental. O incentivo do consumo do seu fruto como alimentação humana é uma alternativa ecologicamente correta e biologicamente saudável. Seu fruto está sendo considerado o açaí da Mata Atlântica. Segundo pesquisadores do Centro de Pesquisa do Cacau (Ceplec/Ceplac), a polpa dos frutos da juçara apresenta composição química com qualidades nutricionais compatíveis com o da polpa do açaizeiro (SILVA, BARRETO & SÊRODIO, 2004).



Figura 1: Açaizeiros (Fonte: SILVA *et al.*, 2004).

O açaizeiro apresenta duas variedades de açaí: o açaí branco, que possui frutos e polpa verde-escura brilhante e o açaí roxo cujo fruto apresenta coloração roxa tendendo ao preto e que representa o maior volume de comercialização. Os frutos são pequenos e arredondados medindo de 1,1 a 1,5 cm de diâmetro (Figura 2). Possuem uma única semente envolvida por um tecido fibroso e coberta por uma camada de polpa fina e seca (ROGEZ, 2000). No entanto, seu consumo não ocorre na forma *in natura*, tendo a necessidade de ser submetido a um processo de extração para que seja transformado em polpa ou suco.



Figura 2: Fruto do açazeiro roxo (Fonte: Açai, Portal São Francisco).

2.1.1 Hábitos alimentares

Na região norte, o açai constitui-se há muito tempo como integrante da alimentação, tanto dos povos indígenas quanto da população ribeirinha e para alguns centros urbanos regionais. Sendo então consumido pela população como “vinho”, suco feito da polpa de seus frutos, ou principalmente misturado à farinha de mandioca ou de tapioca (ROGEZ, 2000). A divulgação das suas propriedades nutritivas e energéticas despertou interesse no seu consumo em outros estados brasileiros. Principalmente nas regiões sul e sudeste, tem-se verificado esse novo hábito alimentar representado pelo consumo de açai também na forma de suco, sorvete, geléias, dentre outros.

A polpa congelada de açai começou a ser comercializada a partir da década de 90. Geralmente os jovens da região sul e sudeste consomem esse produto misturado a outros ingredientes, como xarope de guaraná ou guaraná em pó, algumas frutas tropicais e granola. A “geração saúde” aprovou o produto e o incluiu em sua dieta alimentar. Como consequência direta desta divulgação nacional, sua fama de bebida energética ultrapassou fronteiras, o que permitiu que o produto em 2000 começasse a ser exportado para outros países como Estados Unidos e Itália. Estima-se que em 2003 foram comercializados cerca de US\$2,12 milhões, e em 2005 pelo menos US\$5,49 milhões correspondendo a aproximadamente 2 a 3 mil toneladas da bebida (SANTANA, 2006).

A principal finalidade da utilização do açazeiro ainda é para extração do açai. Nogueira *et al.*(2005) apontaram a preservação dos açazais como ganho ambiental importante como consequências destes novos mercados, confirmando a sua importância para a população ribeirinha como uma das mais rentáveis possibilidades de produção e comercialização de seu fruto. Eles ainda relatam que 20% da produção em 2004, foram provenientes de áreas cultivadas e de açazais nativos manejados, o que em anos anteriores, era quase que exclusivamente extrativista. O controle da produção com aumento das áreas cultivadas e diminuição do extrativismo é uma tendência a ser ampliada para que possa suprir a demanda do mercado nacional e internacional.

2.1.2 Classificação da polpa

A Instrução Normativa nº 1, de 7 de janeiro de 2000 do Ministério da Agricultura e de Abastecimento (BRASIL, 2000), define polpa de açai como produto extraído da parte comestível do fruto do açazeiro, com ou sem adição de água. Na prática, há a necessidade de imersão do fruto em água (morna ou à temperatura ambiente, dependendo do grau de maturação) a fim de possibilitar o amolecimento do epicarpo e do mesocarpo. Após algumas sequências de lavagens, o despulpamento ocorre com o auxílio de injeção de água filtrada,

onde o processo pode ser manual ou utilizando máquinas (mecânicas ou elétricas). Os produtos obtidos segundo a Normativa citada (2000) são classificados da seguinte forma:

- Açaí grosso ou especial (tipo A) é a polpa extraída com adição de água e filtração, apresentando acima de 14% de sólidos totais e uma aparência densa.
- Açaí médio ou regular (tipo B) é a polpa extraída com adição de água e filtração, apresentando de 11 a 14% de sólidos totais e uma aparência densa.
- Açaí fino ou popular (tipo C) é a polpa extraída com adição de água e filtração, apresentando de 8 a 11% de sólidos totais e uma aparência pouco densa.

2.1.3 Conservação da polpa

Um ponto crítico do comércio do açaí é sua alta perecibilidade, quando não-submetido a processos de conservação. Mesmo sob refrigeração, a polpa não se conserva por mais de 12 horas (ALBARICI, VALETA, PESSOA, 2007). Esse fato pode estar associado à degradação enzimática em conjunto à elevada carga microbiana presente no fruto, causadas por condições inadequadas de colheita, acondicionamento, transporte e manuseio durante o processamento.

Em 2006 a Secretaria Executiva de Saúde Pública do Pará (SESPA), notificou a contaminação em algumas frutas, entre as quais o açaí, pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, causador da Doença de Chagas transmitida por barbeiros, inseto hematófago. Uma das formas de transmissão dessa doença se dá por via oral através do consumo de alimentos contaminados pelo barbeiro infectado. A contaminação pode ocorrer quando os insetos ou suas excreções são triturados em conjunto com o fruto do açaí no despulpamento. A única forma de eliminar o risco de contaminação e assegurar a qualidade do produto é através da pasteurização, além da introdução das boas práticas de fabricação e higiene no processamento, visto que este é um processo cientificamente comprovado para eliminação de patógenos, uma vez que, apenas o congelamento da polpa não tem eficácia sobre a inativação do protozoário. Na pasteurização, ocorre o aquecimento da polpa de açaí sob temperatura de 80°C a 90°C durante 10 segundos e resfriamento imediato no próprio trocador de calor (COHEN & ALVES, 2006).

Em 2007, foi firmado um acordo, Termo de Ajustamento de Conduta (TAC), onde as grandes empresas se comprometeram a adequarem suas instalações com equipamentos para a pasteurização da polpa, além de adotar nos serviços de manipulação, preparação, armazenamento, distribuição, transporte, exposição à venda ou entrega da polpa ou suco de frutas, condições higiênico-sanitárias exigidas pelo órgão de vigilância sanitária, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), (CNPQ, 2007).

Para os produtores artesanais, o Ministério da Saúde recomendou técnicas de branqueamento e higienização (imersão em solução de hipoclorito) do fruto do açazeiro, aliada às boas práticas de coleta, transporte, armazenamento e manipulação visando minimizar o risco de contaminação do suco (CNPQ, 2007; PORTALMS, 2009).

2.1.4 Composição química

O açaí é considerado uma das mais nutritivas frutas da Amazônia. A polpa concentrada de açaí é um alimento que possui alto valor calórico, por seu elevado percentual lipídico, e nutricional, por ser rico em proteínas e minerais (COHEN & ALVES, 2006). Sua composição foi avaliada por Rogez (2000) conforme mostra a Tabela 1.

Tabela 1: Composição química e valor nutricional do açáí

Composição química	Unidade	Quantidades na matéria seca
pH		5,8
Energia	Kcal/100g	66,3
Matéria seca	%	15,0
Proteínas	g/100g(1)	13,0
Lipídeos totais	g/100g(1)	48,0
Açúcares totais	g/100g(1)	1,5
Açúcares redutores	g/100g(1)	1,5
Frutose	g/100g(1)	0,0
Glicose	g/100g(1)	1,5
Sacarose	g/100g(1)	0,0
Fibras Bruta	g/100g(1)	34,0
Cinzas	g/100g (1)	3,5
Sódio	mg/100g(2)	56,40
Potássio	mg/100g(2)	932,00
Cálcio	mg/100g(2)	286,00
Magnésio	mg/100g(2)	174,00
Ferro	mg/100g(2)	1,50
Cobre	mg/100g(2)	1,70
Zinco	mg/100g(2)	7,00
Fósforo	mg/100g(2)	45,00
VitaminaB1	mg/100g(2)	0,25
α- Tocoferol (vitamina E)	mg/100g(2)	45,00

(1)Matéria seca (2) Cálculo por diferença (Fonte: ROGEZ, 2000)

Não há um consenso literário referente à composição tanto dos frutos, porção comestível, quanto da polpa de açaí industrializada. Pereira, Queiroz e Figueiredo (2002) avaliaram a sua composição química e obtiveram valores próximos aos de Rogez (2000), comprovando o elevado teor nutricional da polpa como fonte de lipídeos e proteínas. Cohen e Alves (2006) relatam a influência de fatores ambientais e genéticos além de outros fatores como: tipo de solo, qualidade da água de inundação dos solos e época de safra. Em síntese, acredita-se que vários fatores extrínsecos e/ou intrínsecos podem influenciar a composição e sua respectiva concentração nos componentes dos frutos, portanto, sobre a qualidade do produto final comercializado. Cohen e Alves (2006) citam Farias Neto *et al* (2005) referindo-se a esses fatores como possíveis responsáveis pela diferenciação entre as populações de diferentes procedências, mas sem saber a real contribuição de cada um.

No entanto, não é somente o alto valor nutricional do açaí que vem despertando o interesse dos consumidores e pesquisadores. O fruto é rico em fenólicos, destacando-se os pigmentos antocianinas pertencentes à classe dos flavonóides, atualmente em evidência no mundo científico por seus benefícios bioativos (CHANG *et al.*, 2006; AGRAWAL; HALAWEISH; DWIVEDI, 2007). Portanto, além do controle de qualidade da cor, visto que a intensidade da cor violácea do açaí está diretamente relacionada à alta concentração das antocianinas (ROGEZ, 2000), a medida das antocianinas totais se torna interessante uma vez que a estes compostos se atribuem atividades benéficas à saúde humana.

2.2 Compostos Fenólicos

São definidos como substâncias que possuem pelo menos um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais (SHAHIDI & NACZK, 1995). Sua estrutura química pode ter forma simples ou de polímeros e em alimentos de origem vegetal podem apresentar-se na forma livre ou complexados a açúcares e proteínas (BRAVO, 1998).

Os compostos fenólicos de origem vegetal são metabólitos secundários que frequentemente são sintetizados pelas plantas. Encontram-se amplamente distribuídos nos vegetais exercendo variadas funções como: atrativo para polinização, como agentes antioxidantes, na proteção das plantas contra raios UV e de agentes patógenos dentre outros (NACZK & SHAHIDI, 2004).

O interesse por esses compostos naturais, os quais foram por muitos anos somente estudados por seus efeitos anti-nutrientes em alimentos, vem aumentando principalmente nas últimas décadas devido a vários estudos associarem compostos fenólicos com ações benéficas à saúde humana (AGRAWAL; HALAWEISH; DWIVEDI, 2007; TOURIÑO, *et al.*, 2009). Possuem um dos maiores grupos de componentes dietéticos, não essenciais, pois englobam uma gama enorme de substâncias das quais algumas são responsáveis pela atividade antioxidante e seus efeitos farmacológicos.

Nos alimentos, os compostos fenólicos são os principais responsáveis pela qualidade nutricional e características sensoriais tais como adstringência, amargor e aroma, além da estabilidade oxidativa dos produtos derivados de vegetais (BRAVO, 1998).

Dentre os compostos fenólicos existentes no reino vegetal destacam-se os flavonóides que são compostos que se encontram amplamente distribuídos neste reino. Englobam um numeroso grupo de pigmentos naturais e são responsáveis pelas cores e tons de azul, vermelho e amarelo de numerosas flores, frutos e folhas (BOBBIO & BOBBIO, 1995).

2.2.1 Flavonóides

Os flavonóides representam um grande grupo fitoquímico de compostos fenólicos. Possuem 15 átomos de carbono representados por uma estrutura comum, $C_6C_3C_6$, composta por dois anéis aromáticos ligados por três carbonos e um átomo de oxigênio formando um anel heterocíclico oxigenado, denominado anel C (Figura 3). O grau de oxidação e o padrão de substituição do anel C classificam os flavonóides e, dentro destas classes o padrão de substituição nos anéis A e B definem especificamente cada composto (RHODES, 1996; BRAVO, 1998). Estas substituições podem incluir oxigenação, alquilação, glicosilação, acilação e sulfatação (HOLLMAN & KATAN, 1999).

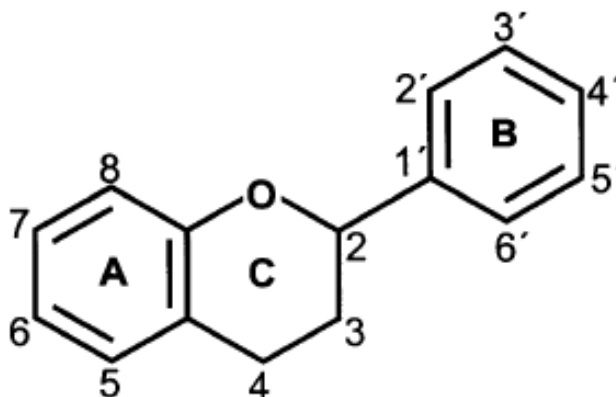


Figura 3: Representação da estrutura básica dos flavonóides e o sistema usado para numeração dos carbonos (BRAVO, 1998).

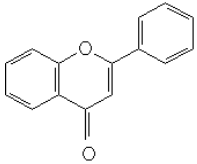
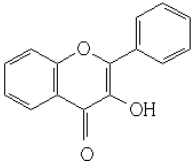
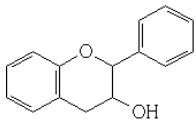
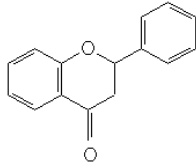
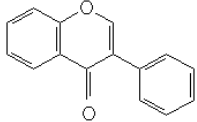
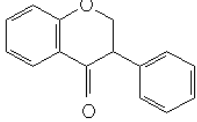
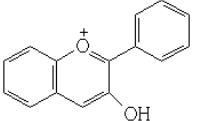
Dependendo da substituição e do nível de oxidação no anel C, os flavonóides podem ser divididos em várias classes, sendo que os que se incluem na dieta humana encontram-se essencialmente em seis classes. Considerando-se suas estruturas químicas elas serão denominadas por flavonóis, flavanóis, flavonas, isoflavonóides, flavanonas e antocianinas conforme apresentado no Quadro 1 (BOBBIO & BOBBIO, 1995; MARTINEZ *et al.*, 2002; YILMAZ & TOLEDO, 2004).

Os flavonóides destacam-se dentre os compostos fenólicos de maior interesse para a saúde humana, por apresentarem efeitos biológicos protetores, atuando na diminuição de riscos de várias doenças como as cardiovasculares e o câncer (BROWNING; WALLE; WALLE, 2005).

Existe mais de 8000 compostos individuais conhecidos. Segundo Veitch e Grayer (2008), o número de flavonóides novos notificados entre 2004 e 2006 foi superior a 600. Essa diversidade está relacionada a diferentes combinações de grupamentos substituintes presentes nestes compostos.

Podem ser encontrados em diferentes tipos de vegetais: as flavanonas são encontradas predominantemente em frutas cítricas; flavonas em ervas aromáticas e grãos de cereais; isoflavonóides em leguminosas e sementes oleaginosas como a soja; as antocianidinas e suas formas glicosiladas, as antocianinas, em flores, folhas, caules e frutos; as flavan-3-ol catequinas, epicatequinas e seus galato-ésteres estão amplamente distribuídos em plantas, embora as folhas de chá apresentem altas concentrações deste composto (PIETTA, 2000).

Quadro 1: Estruturas químicas dos flavonóides

Flavonóides	Estrutura química básica
Flavonas	
Flavonóis	
Flavanóis	
Flavanonas	
Isoflavonóides	 
Antocianinas	

(Fonte: BRAVO, 1998)

2.2.2 Antocianinas

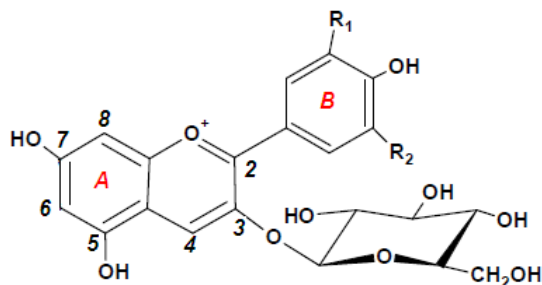
Pertencentes à classe dos flavonóides, as antocianinas representam o mais importante grupo de pigmentos vegetais hidrossolúveis do reino vegetal (BRAVO, 1998).

O termo antocianina, derivado do grego de flor e azul (anthos = flores; kianos = azul), foi denominado por Marquat em 1853 caracterizando os pigmentos azuis das flores. Mais tarde, foi observado que pigmentos naturais largamente distribuídos no reino vegetal responsáveis pela maioria das cores violeta e vários tons de vermelho em flores, frutos, folhas, caules e raízes eram quimicamente similares aos que deram origem ao “flor azul” (BROUILLARD, 1982).

Como ocorre com os outros flavonóides, a grande diversidade das antocianinas está relacionada com a possibilidade de várias combinações de grupos substituintes em sua

molécula, da natureza e do número de açúcares e de ácidos alifáticos e/ ou aromáticos (Figura 4), bem como da localização desses compostos presentes na sua aglicona o que irá conferir a sua molécula uma maior estabilidade (STRACK & WRAY, 1989). Portanto, é raro no reino vegetal a molécula na forma livre, aglicona. Podem estar glicosiladas em várias posições, mas ocorre naturalmente com maior frequência na posição C₃. O segundo açúcar quando presente na molécula encontra-se na posição C₅, porém podem ocorrer glicosilações nas posições C₇, C_{3'}, C_{4'} e C_{5'} (Figura 3), (BROUILLARD,1982).

Glicose, arabinose, galactose, xilose, frutose e ramnose são os açúcares mais comuns ligados às agliconas. Dissacarídeos e trissacarídeos, oligossacarídeos formados pela combinação destes seis monossacarídeos podem também glicosilar algumas antocianinas (HARBONE; SAITO; DETONI, 1994). Em muitos casos os açúcares podem ser acilados por ácidos fenólicos como p-cumárico, caféico, ferúlico e sinápico (MAZZA & BROUILLARD, 1987).



Aglicona (Anel B)	Glicosilação (Posição 3 e 5)	Acilação (Esterificação da OH dos açúcares)
R ₁ =R ₂ =H Pelagornidina	Glicose	Ácido p-cumárico
R ₁ =OH, R ₂ =H Cianidina	Arabinose	Ácido ferúlico
R ₁ = R ₂ = OH Delfinidina	Xilose	Ácido caféico
R ₁ =OCH ₃ ,R ₂ =H Peonidina	Galactose	
R ₁ =OCH ₃ ,R ₂ =OH Petunidina	Ramnose	
R ₁ =R ₂ = OCH ₃ Malvidina	Rutinose	
	Sambubiose	

Figura 4: Representa a estrutura das antocianinas e as posições de glicosilação e acilação com exemplos de açúcares e ácidos mais comumente encontrados na natureza (Fonte: MALACRIDA & MOTTA, 2006).

2.2.2.1 Equilíbrio químico em solução aquosa

Estes pigmentos antociânicos sofrem transformações estruturais reversíveis com mudança de pH em solução aquosa (Figura 5), manifestada por espectros de absorvância muito diferentes (GUIST & WROLSTAD, 2001). A mudança da coloração de uma mesma antocianina também está relacionada à mudança do pH, associação com cátions ou com outros flavonóides presentes na planta (BOBBIO & BOBBIO, 1995).

Em soluções aquosas, as antocianinas apresentam diferentes estruturas químicas em equilíbrio. Quando o pH se encontra abaixo de 2,0, as antocianinas apresentam coloração intensamente avermelhada devido ao predomínio da forma cátion flavílica (AH^+). Com o pH em torno de 4,5 é observado um equilíbrio entre a pseudo base carbinol ou forma hemicetal, incolor e chalconas. Com o aumento do pH ocorre uma rápida desprotonação resultando na formação predominante da base quinoidal (A) que tem coloração azul (BOBBIO & BOBBIO, 1995; GIUST & WROLSTAD, 2001).

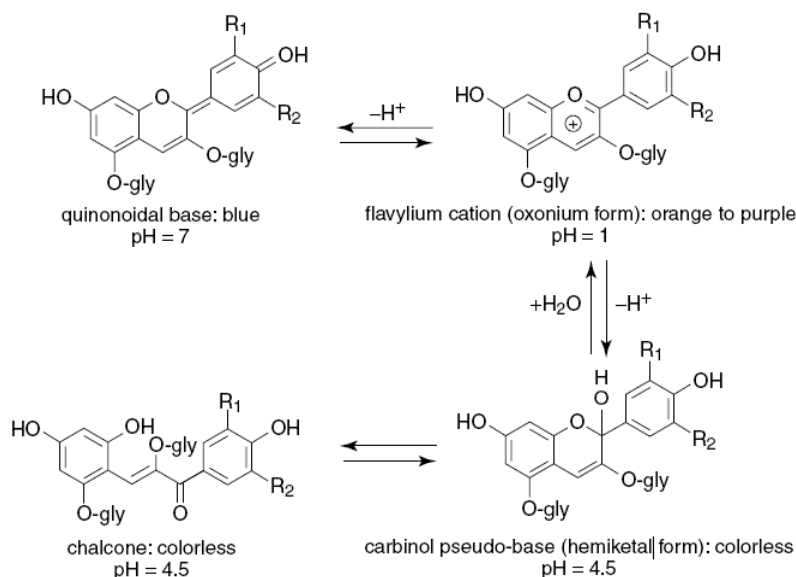


Figura 5: Equilíbrio das antocianinas em solução aquosa (GIUST & WROSLTAD, 2001).

2.2.2.2 Estabilidade

Várias pesquisas foram realizadas com o intuito de se eliminar ou pelo menos reduzir o uso de corantes alimentícios sintéticos, dando lugar ao uso nos alimentos de corantes de fontes naturais. As antocianinas são corantes permitidos em alimentos, mas elas ainda não têm muitas aplicações. Seu uso como aditivo ainda é bastante restrito em função de limitações como a disponibilidade de matéria-prima produtora de pigmentos na quantidade e qualidade requerida (STRINGHETA & BOBBIO, 2009). Além disso, tem-se visto que elas são corantes fortes apenas em valores baixos de pH, o que limita ainda mais seu uso (COULTATE, 2004). Durante o armazenamento, as antocianinas podem sofrer modificações devido à sensibilidade ao efeito da temperatura, oxigênio, luz e ação enzimática (FRANCIS, 1982, SHENOY, 1993; SKREDE; WROLSTAD; DURST, 2000).

Em presença de cátions de alumínio (Al), ferro (Fe), estanho (Sn) e outros metais, as antocianinas formam produtos insolúveis que, no caso do alumínio, encontram aplicações como corantes que apresentam estabilidade ao calor, pH e oxigênio superior à das antocianinas livres (MARÇO & POPPI, 2008).

A luz é outro fator de grande importância na alteração da cor das antocianinas e a transformação é mais intensa quando esse fator está associado com o efeito do oxigênio (MARÇO & POPPI, 2008).

Na natureza, as moléculas de antocianinas estão frequentemente associadas com outras moléculas chamadas de copigmentos, que exercem uma influência determinante sobre a cor dos vegetais. Atuam aumentando a intensidade da cor deslocando a absorvância no sentido de maior comprimento de onda, efeito batocrômico (WILSKA & KORZUCHOWSKA, 1996). Devido à solubilidade em água, as antocianinas ocorrem nos tecidos das plantas dissolvidas no fluido da célula vegetal, que geralmente apresenta pH levemente ácido (MARÇO & POPPI, 2008) e, segundo Gonnet (1998), nessa faixa de pH as antocianinas apresentam-se incolores. Entretanto, as antocianinas estão sempre relacionadas às partes coloridas das plantas indicando que fatores físico-químicos devem estabilizá-las naturalmente (WILSKA & KORZUCHOWSKA, 1996). Segundo Bobbio e Bobbio (1995), a estabilidade das antocianinas ao descolorimento aumenta consideravelmente quando contêm copigmentos associados a suas moléculas como ácidos fenólicos, flavonóides não-antociânicos, alcalóides, aminoácidos, taninos, entre outros.

A copigmentação pode ocorrer intermolecular e intramolecularmente. Na complexação intermolecular (Figura 6- A) predominam, provavelmente, forças Van der Waals e efeitos hidrofóbicos em meio aquoso como resultado do empilhamento entre a molécula de antocianina e o copigmento (BROUILLARD, 1992; FALCÃO, 2003). A copigmentação intramolecular (Figura 6- B) ocorre somente quando o pigmento e o copigmento fazem parte da mesma molécula, ou seja, quando o cromóforo da antocianina e o copigmento estão covalentemente ligados ao mesmo resíduo de açúcar (BROUILLARD, 1982; FALCÃO, 2003).

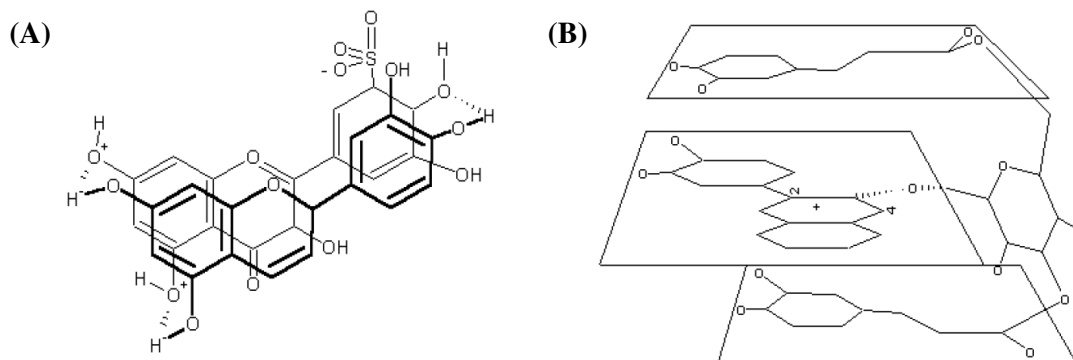


Figura 6: (A) Exemplo de copigmentação intermolecular entre uma antocianina e um copigmento (não-antociânico) Fonte: IACOBUCCI E SWEENEY, (1983), FALCÃO, (2003); (B) Exemplo de copigmentação intramolecular (FALCÃO, 2003). Fonte: BROUILLARD, (1982); FALCÃO, (2003).

2.2.2.3 Antocianinas em alimentos

Quando submetidas à hidrólise ácida, as antocianinas liberam suas agliconas denominadas de antocianidinas e, dentre as encontradas na natureza, apenas seis são as mais comuns em alimentos: cianidina, pelargonidina, peonidina, delfinidina, petunidina e malvidina que diferem entre si pelo número de hidroxilas presentes no anel B e o grau de metilação desses grupos (BOBBIO & BOBBIO, 1995; GALVANO *et al.*, 2004; LIMA *et al.*,

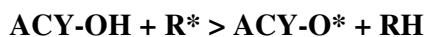
2006). A presença de grupos -OCH₃ (metoxila) confere, em geral, cor mais avermelhada e maior estabilidade à oxidação e ao calor do que o aumento das hidroxilações, que, por sua vez proporcionam predomínio das cores rosa e azul (BELITZ; GROSCH; SCHIEBERLE, 2004). Alguns alimentos já possuem suas antocianinas identificadas na literatura (Tabela 3).

Tabela 3: Exemplos de antocianinas identificadas em alimentos

Antocianinas	Alimentos
Cianidina-3-glicosídeo	Cerejas*, jambolão*, uvas*, morangos*, amoras vermelhas*, açai (<i>E. oleracea</i>) ***, juçara (<i>E.edulis</i>)**
Cianidina-3-rhamnosídeo	Acerola **, juçara (<i>E.edulis</i>)**
Cianidina-3-rutenosídeo	Açai (<i>E. oleracea</i>) ***, juçara (<i>E.edulis</i>) **, amoras preta (<i>R.ssp.</i>) e ameixa (<i>P. domestica</i>) ****.
Cianidina-3,5- diglicosídeo	Jambolão **
Peonidina-3-glicosídeo	Cerejas*, jabuticaba*, uvas*
Peonidina-3,5- diglicosídeo	Jambolão**
Malvidina-3- glicosídeo	Uvas*
Malvidina-3,5- diglicosídeo	Jambolão**
Pelargonidina-3-glicosídeo	Morangos*, juçara (<i>E.edulis</i>)**
Pelargonidina-3-rhamnosídeo	Acerola **
Pelargonidina-3-rutenosídeo	Juçara (<i>E.edulis</i>) **
Delfinidina-3,5-diglicosídeo	Berinjelas*, jambolão**
Delfinidina-3-galactosídeo ou glicosídeo	Guajiru **
Petunidina-3-glicosídeo	Uvas*
Petunidina-3-glicosídeo ou galactosídeo	Guajiru**
Petunidina-3,5- diglicosídeo	Jambolão**

Fonte: * (BOBBIO & BOBBIO, 1995), ** (BRITO *et al.*, 2007), *** (GALLORI *et al.*, 2004), ****(HONG & WROLSTAD, 1990).

A elevada capacidade antioxidante das antocianinas está diretamente relacionada à deficiência de elétrons do núcleo flavílium e à presença dos grupos hidroxilas livres, como por exemplo, das delfinidinas e cianidinas (KUSKOSKI *et al.*, 2004). O alto poder de reação do grupo hidroxil com o radical faz com que o mesmo fique inativo (NIJVELDT *et al.*, 2001). A reação ocorre da seguinte forma:



Onde: ACY= antocianina, R*= radical livre e O*= radical livre de oxigênio

Na última década, muitos estudos sobre as antocianinas têm se concentrado no potencial biológico e seus efeitos na saúde humana. Embora exista grande quantidade de evidências indicando sua bioatividade, pouco progresso foi feito para estabelecer a farmacocinética destes compostos em relação a sua absorção e metabolismo (KAY; MAZZA; HOLUB 2005).

2.3 Processos de Separação por Membranas – PSM

O desenvolvimento dos processos de separação por membranas e suas aplicações industriais são considerados relativamente recentes, principalmente levando-se em conta que os fenômenos envolvendo membranas vêm sendo estudados há mais de um século (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006). Uma membrana pode ser definida como uma barreira que separa duas fases e que restringe, total ou parcialmente, o transporte de uma ou várias espécies (Figura 7).

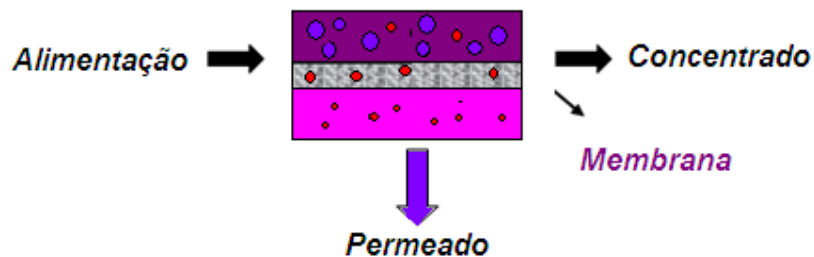


Figura 7: Esquema de permeação por membranas.

A classificação das mesmas pode ser feita a partir das suas características morfológicas como, por exemplo, a presença ou ausência de poros, o tamanho dos mesmos e o grau de simetria, a partir de características químicas, como em relação ao material que a constitui e ainda de acordo com a forma e tipo de módulo em que estão inseridas (MULDER, 1991).

A tecnologia de separação por membrana baseia-se na permeabilidade seletiva de alguns compostos do material através do meio filtrante, por meio de uma força motriz. A composição da membrana e o tipo de força motriz utilizado definem os diferentes processos: microfiltração, ultrafiltração, nanofiltração, diálise, osmose inversa, evaporação osmótica, pervaporação, permeação de gases (PORTER, 1990).

Os processos de microfiltração (MF), ultrafiltração (UF) e nanofiltração (NF) utilizam membranas porosas cuja seletividade é caracterizada pela diferença de tamanho entre as moléculas da solução a ser fracionada e os poros da membrana, promovendo assim, um fluxo convectivo com escoamento do permeado nos poros. No processo de osmose inversa (OI) são utilizadas membranas densas, sendo a força motriz a diferença de pressão para transferência de massa. Estes processos diferem entre si pelo tamanho dos poros, que diminuem da microfiltração para a nanofiltração (0,6 μm a 100 Da) e quase inexiste nas membranas densas (MUDLER, 1991). Em contra partida, à medida que se diminui o tamanho dos poros a pressão necessária para que haja um fluxo comercialmente permeável é proporcionalmente maior. A Figura 8 demonstra esquematicamente o processo de separação por membranas em função do tamanho dos poros.

Segundo Habert, Borges e Nobrega (2006), os processos de separação por membrana podem ser operados em escoamento tangencial ou perpendicular à membrana (Figura 9). Quando ocorre o processamento de uma solução ou de uma suspensão no modo perpendicular, o permeado passa através da membrana e, o soluto ou os materiais em

suspensão, são retidos, ficando acumulados na superfície da membrana. Trata-se de um modo de operação transiente, uma vez que a concentração do soluto próximo à membrana aumenta com o tempo. No escoamento tangencial, a solução ou suspensão escoam paralelamente à superfície da membrana enquanto o permeado é transportado transversalmente à mesma. Neste caso, o escoamento paralelo à membrana limita o acúmulo do material retido sobre a mesma.

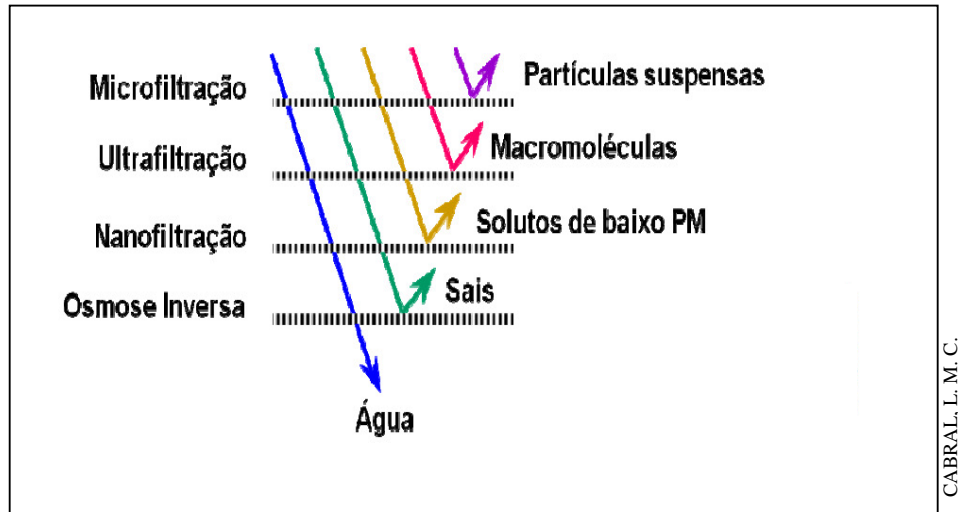


Figura 8: Representação de processos de separação por membranas de acordo com o tamanho dos poros.

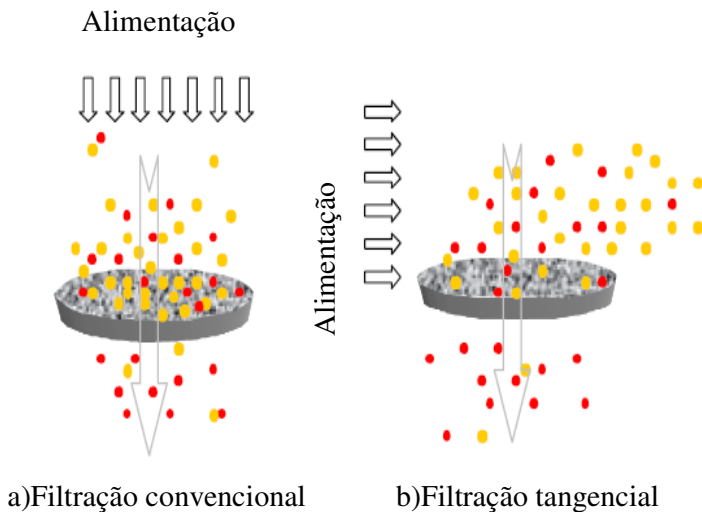


Figura 9: Modelo esquemático das diferentes formas de operação dos PSM – a) filtração convencional e b) tangencial.

O Quadro 2 dispõe algumas características dos PSM que utilizam gradiente de pressão como força motriz.

Quadro 2: Características dos PSM que utilizam a pressão como força motriz

Processo	Força motriz	Material retido	Material que permeia	Aplicações
Microfiltração (MF)	ΔP (0,5-2 atm)	Material em suspensão, bactérias.	Água e sólidos dissolvidos	Esterilização bacteriana Clarificação, sucos, vinhos, etc. Concentração de células Oxigenação do sangue
Ultrafiltração (UF)	ΔP (1-7 atm)	Colóides macromoléculas	Água, sais solúveis e compostos de massa molar média	Fracionamento/ concentração de proteínas Recuperação de pigmentos/ óleos
Nanofiltração (NF)	ΔP (5-25 atm)	500<M.M<2000 Da.	Água, sais monovalentes e moléculas de baixa massa molar	Purificação de enzimas Dessulfatação de água do mar Biorreatores a membrana
Osmose Inversa (OI)	ΔP (20-80 atm)	Todo o material solúvel ou em suspensão	Água (solvente)	Dessalinização de águas Concentração de suco de frutas Desmineralização de águas

(Fonte: HARBERT; BORGES; NOBREGA, 2006)

2.3.1 Vantagens e limitações

A grande vantagem dos processos de separação por membranas é que geralmente ocorrem à temperatura ambiente e sem mudança de fase, o que resulta em baixo custo energético. O emprego de condições amenas de temperatura gera a preservação de compostos termo sensíveis. Outra vantagem da tecnologia de membrana está relacionada à seletividade do meio filtrante e o fácil escalonamento, por se tratar de sistemas modulares (MUDLER, 1991). Contudo, o custo de reposição da membrana, a diminuição do fluxo ao longo do processo e a limpeza dos sistemas são algumas das desvantagens. Mesmo utilizando o fluxo tangencial, verifica-se a diminuição do fluxo de permeado ao longo do processo, consequência do fenômeno conhecido como *fouling*, que se caracteriza pelo aumento da resistência à passagem do solvente pela membrana, que pode ser resultante tanto da diminuição da porosidade (entupimento, adsorção) quanto da polarização de concentração e formação de camada gel na superfície da membrana (MERIN & DAUFIN, 1990).

Segundo Cruz (2008), estes fenômenos podem ser minimizados através de pré-tratamentos que promovam uma diminuição dos sólidos em suspensão presentes na polpa como a centrifugação, tratamento enzimático ou refino, ou ainda através de alterações das condições de processamento.

A limpeza e sanitização da membrana, além de serem necessárias para a garantia de higiene possuem também a finalidade de garantir o restabelecimento do fluxo. Recomenda-se que a limpeza seja feita no início e final de cada processo. O método de limpeza irá depender da resistência química da membrana e do soluto utilizado (MUDLER, 1991).

2.3.2 Microfiltração

A microfiltração (MF) é o processo de separação com membranas mais próximo da filtração clássica. Utiliza membranas porosas com poros na faixa entre 0,1 e 10 μ m (100 e 10.000 nm) sendo, portanto, processos indicados para a retenção de materiais em suspensão e emulsão.

A microfiltração é um dos processos com membranas de maior interesse nas indústrias de alimentos. Merin e Daufin (1990) relataram sua utilização na separação da gordura do leite, bactérias do leite integral ou de micelas de caseínas das proteínas solúveis no leite. Dentre outras utilizações para microfiltração destaca-se seu emprego na recuperação de biomassa e obtenção de sucos clarificados.

Matta *et al.* (2004) relataram ser possível a obtenção de suco clarificado de acerola através da microfiltração e sua preservação durante três meses sob refrigeração, sem que ocorressem alterações significantes das suas características químicas.

Magalhães *et al.* (2005) avaliaram a conservação da água do coco verde utilizando a tecnologia de separação por membranas, particularmente a microfiltração e a ultrafiltração e observaram uma redução significativa na turbidez da água de coco após o processo de filtração. Além disso, relataram que não observaram mudanças físico-químicas quando compararam a água de coco permeada com a água de coco da alimentação.

Fontes e Caminoto (2007) avaliaram a microfiltração de suco de açaí diluído e refinado, com o objetivo de reter fibras e, posteriormente, caracterizar as antocianinas nas frações do permeado. Os autores atribuíram a baixa produtividade obtida ao tamanho do poro utilizado (0,2 e 0,6 μ m) e sugeriram novos experimentos com poros maiores, na faixa de 1 a 2 μ m.

As condições operacionais da microfiltração do açaí fino, não pasteurizado, foram avaliadas por Cruz (2008), que operou um sistema de membranas tubulares cerâmicas de α -alumina, com tamanho de poro de 0,1 μ m e área filtrante de 0,022m². O fluxo médio obtido para temperatura de 35°C com pressão aplicada à membrana de 3,0 bar foi de 117,4L/hm², com fator de concentração volumétrico fixado em 2,0.

Ao avaliar o comportamento das antocianinas monoméricas, por pH diferencial, durante o processo de clarificação do suco de açaí por microfiltração, Cruz (2008) observou uma retenção de 36% no sistema que utilizou membranas cerâmicas e de 25% no sistema de membranas poliméricas. Contudo, a avaliação estatística indicou influência não só do tipo de membranas, mas também da interação com a temperatura sobre as antocianinas monoméricas. Apesar das membranas poliméricas terem apresentado melhor desempenho em relação ao rendimento dos pigmentos antocianínicos, para o autor o fator determinante para a escolha do tipo de sistema foi o rendimento do processo, no qual foi observado que a melhor condição foi a microfiltração do açaí em membranas cerâmicas a 35°C.

2.4 Procedimentos Analíticos

As técnicas de separação, identificação e quantificação recentes estão baseadas em equipamentos sofisticados e, grande parte das pesquisas voltadas para extração e purificação necessitam de etapas longas de preparo da amostra.

Os métodos citados na literatura para a análise de antocianinas incluem cromatografia em papel, cromatografia em camada fina, cromatografia em coluna, extração em fase sólida, cromatografia contra-corrente, espectroscopia de absorção UV-Visível, cromatografia líquida

de alta eficiência (CLAE), espectrometria de massa (MS) e espectrometria de ressonância magnética e nuclear (RMN) (SKREDE & WROLSTAD, 2002).

2.4.1 Extração

As antocianinas, por apresentarem glicosídeos e grupamentos hidroxílicos ligados a sua estrutura básica, são muito hidrossolúveis, sendo facilmente extraídas de plantas utilizando solventes polares. Quando sua extração não possui caráter quantitativo, a água e etanol são solventes que podem ser utilizados, mas quando o aspecto quantitativo é prioridade, o metanol é o solvente mais eficaz e utilizado, apesar da sua toxicidade. A limitação do uso do etanol e água está relacionada com menor eficiência de extração de antocianinas. Metanol é 20% mais eficiente do que etanol e 73% mais efetivo que a água (TERCI, 2004).

Muitos pesquisadores acidificam os solventes de extração com intenção de prevenir a oxidação das antocianinas extraídas e, dentre os ácidos utilizados encontram-se o ácido clorídrico, ácido acético e ácido fórmico. Porém, segundo Jackman *et al.* (1987), a concentração do ácido clorídrico não deve ser superior a 0,05%, pois na tentativa de estabilizar a antocianina, o ácido modifica a forma nativa do pigmento, devido ao rompimento das associações com metais e co-pigmentos, podendo resultar em decomposição das antocianinas aciladas e, conseqüentemente, na estimativa incorreta do teor de antocianinas.

O controle da temperatura também é muito importante, pois quando os extratos alcoólicos acidificados com 1% de HCl são submetidos à temperatura de 60°C durante 1 hora ou à evaporação sob aquecimento para eliminação do solvente, poderá ocorrer a hidrólise dos açúcares ligados a antocianinas liberando suas agliconas (CAMPOS, 2006).

Segundo Xavier (2004), com metanol o ácido cítrico é o ácido orgânico mais efetivo, seguido pelos ácidos tartárico, fórmico, acético, propiônico, nesta ordem; com água, os melhores ácidos são ácidos acético, cítrico, tartárico e hidrocloreídrico.

2.4.2 Purificação do extrato

Quando necessário, deve-se fazer a purificação do extrato. Pois após a extração, o extrato antociânico contém além de antocianinas, outros compostos fenólicos, açúcares, polissacarídeos solúveis, proteínas, cátions e ácidos orgânicos (CAMPOS, 2006).

Giusti *et al.* (1998) relataram o método de extração em fase sólida (SPE – *Solid Phase Extraction*) para purificação prévia de extrato antociânico. Os cartuchos C₁₈ ou Sephadex são habitualmente os mais usados. Consiste na aplicação de extrato das antocianinas bruto no cartucho contendo material sorvente. As antocianinas são sorvidas fortemente neste material (fase estacionária) por suas hidroxilas livres. Desta forma, as substâncias mais polares que as antocianinas, como açúcares e ácidos orgânicos são, primeiramente, eluídas quando o cartucho é submetido à lavagem com água. Em seguida, as antocianinas são eluídas com solvente alcoólico acidificado (TERCI, 2004; KONG *et al.*, 2003; KONG *et al.*, 2008).

2.4.3 Isolamento

Segundo Pacheco (2009), o uso da cromatografia em coluna aberta pode ser uma técnica alternativa para isolamento de substâncias em quantidade relativamente significativa e alta pureza, as quais podem ser usadas posteriormente como padrões analíticos.

Por oferecer ótimas separações, alta sensibilidade, tempo de análise relativamente curto e não necessitar de extratos com elevada pureza, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem sido a técnica cromatográfica de escolha para a separação e isolamento de antocianinas. As antocianinas possuem intensa absorção característica na faixa de 490-550nm (UV-Visível), esta banda de absorção está longe das bandas de absorção de outros compostos fenólicos (FULEKI & FRANCIS, 1968b). A área do pico cromatográfico da antocianina isolada observada em 280nm pode servir como indicador de pureza do pigmento isolado, pois na faixa de 250-280nm (UV) todos os flavonóides mostram alta absorvância (GIUSTI; SAONA; WROLSTAD, 1999).

Campos (2006) relatou o isolamento de antocianinas presentes em extrato previamente purificado por CLAE. As coletas das frações foram realizadas individualmente, diretamente do cromatógrafo para tubos de ensaio, sendo em seguida realizadas leituras de absorvância em espectrofotômetro em 517 nm. Para eliminar o solvente o autor submeteu as frações por aproximadamente quatro horas em evaporador a vácuo.

2.4.4 Identificação e quantificação

2.4.4.1 Cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE

Com origem no grego “chroma +graphein”, a cromatografia ou escrita da cor, é um método contemporâneo que ganhou relevo por volta de 1903, com o botânico Mikhail Semenovich Tswett, nascido em Asti (Itália) a 14 de Maio de 1872, sendo a família originária da Rússia. Após ter estudado na Universidade de Genebra (Suíça), mudou-se para S. Petersburgo (Rússia) em 1896 onde começou a trabalhar como assistente no laboratório de botânica da Academia de Ciências dos Imperadores Russos. Foi mais tarde considerado o pai da cromatografia moderna, através dos vários trabalhos experimentais que efetuou, particularmente na separação de extratos de plantas por adsorção diferencial em colunas de vidro (Figura 10), tendo verificado a nítida separação de diversos pigmentos corados. Desde então, enormes avanços têm sido concretizados com elevado mérito por diversos cientistas pioneiros no desenvolvimento e aperfeiçoamento desta importante técnica de separação (ETTRE, 2000).

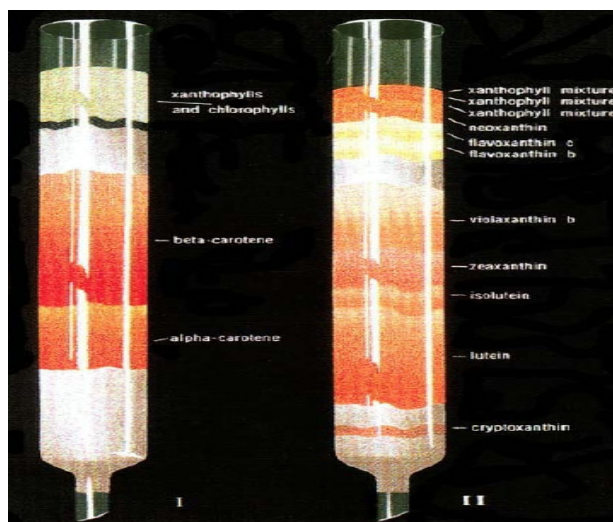


Figura 10– Exemplo de separação cromatográfica de carotenóides em coluna de vidro feitas por Strain em 1938 (Fonte: PACHECO, 2009).

Um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (Figura 11) é composto por um sistema de reservatório de solvente, uma bomba, um injetor de amostra, uma coluna, um detector e um computador com software de aquisição e processamento de dados (ROSA, 2005).

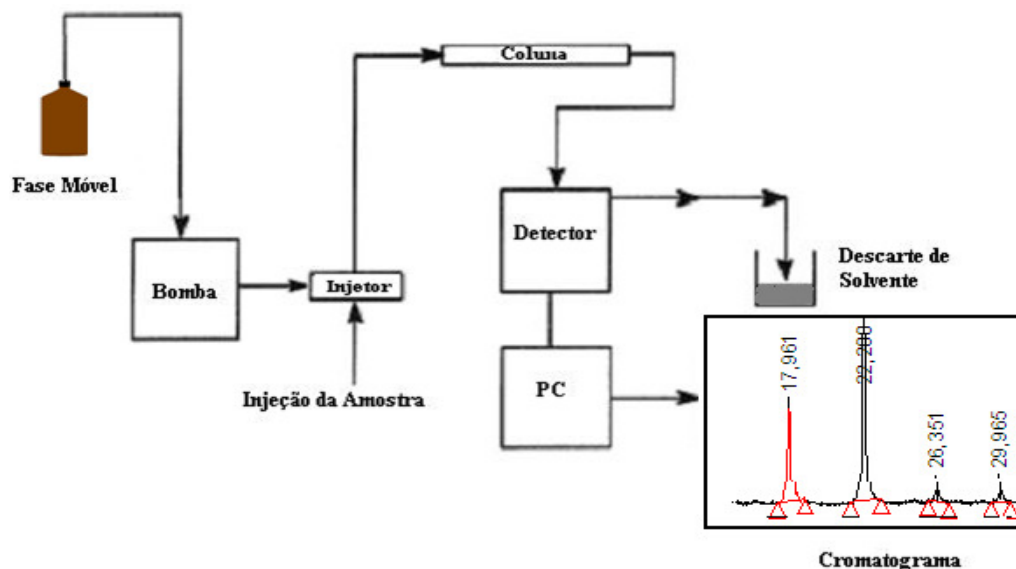


Figura 11: Sistema básico de um cromatógrafo líquido (ROSA, 2005), cromatograma adaptado.

O perfil de antocianinas é distinto para diferentes frutos, podendo ainda variar de acordo com o cultivar analisados. Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa acoplada a um detector de arranjo de fotodiodos (PDA) tem sido a ferramenta mais usada ultimamente para a identificação e quantificação das antocianinas. As antocianinas podem ser separadas por sua polaridade, o que as confere tempos de retenção diferentes. A quantificação das antocianinas pode ser realizada pela comparação com um padrão externo. Contudo, quando se usa somente um padrão analítico para quantificar diferentes antocianinas presentes na amostra, normalmente a cianidina-3-glicosídeo, as concentrações reportadas podem ser inferiores às reais (HONG & WROLSTAD, 1990; FRANCIS, 1982).

Na cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa, as colunas utilizadas são aquelas que possuem grupos funcionais apolares (C_8 , C_{18} e C_{30}) quimicamente ligados ao suporte de sílica, como ilustrado na Figura 12 (ROSA, 2005).

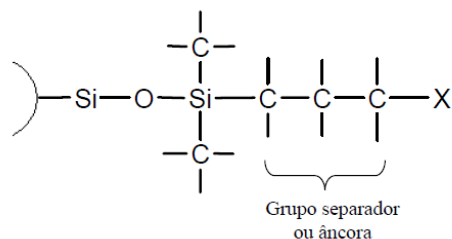


Figura 12: Estrutura de uma fase ligada à sílica. X = \emptyset , OH, CN, NH₂, C₈, C₁₈ ou C₃₀ (ROSA, 2005).

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

Nos detectores de arranjo de fotodiodos a radiação policromática após passar através da amostra, é dispersa por uma grade fixa (monocromadores) atingindo o arranjo de fotodiodos (de 512 a 1024 diodos). Cada diodo mede uma banda estreita de comprimento de onda no espectro, dessa forma o PDA tem uma aquisição de dados paralela, todos os pontos do espectro sendo medidos simultaneamente. A habilidade de fazer medidas de múltiplos comprimentos de onda e a alta velocidade de aquisição significa que várias técnicas de amostragem de sinal podem ser usadas para reduzir o ruído e aumentar a sensibilidade (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 1997).

Outra metodologia que vem sendo utilizada recentemente para a análise de antocianinas é a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectrômetro de massa. A espectrometria de massas consiste na geração de íons pela fragmentação das moléculas da amostra e a detecção dos fragmentos é realizada de acordo com a massa. Esta combinação gera resultados excelentes para a determinação de estruturas de misturas de antocianinas (HARBONE, 1986; RIJKE *et al.*, 2006).

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

2.4.4.2 Métodos espectroscópicos

Os métodos espectroscópicos englobam a espectrofotometria de absorção UV-Visível, espectrometria de massa (MS) e a espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN) (SKREDE & WROLSTAD, 2002).

O avanço rápido e contínuo nas técnicas instrumentais, em particular as que envolvem espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massa (MS), tem contribuído muito nos últimos anos para a elucidação estrutural em todos os campos da química de produtos naturais. Para as antocianinas isto significa que mesmo as maiores e mais complexas estruturas podem ser determinadas com estas técnicas. Em geral, tais determinações não requerem longas reações de derivatização ou degradação (HARBONE, 1994).

O método do pH diferencial para quantificação das antocianinas totais, o qual contempla o uso da espectroscopia de absorção UV-Visível, é validado e consiste em uma metodologia simples, rápida e confiável. Esta metodologia tem sido muito utilizada pelas comunidades científica e industrial para a quantificação das antocianinas.

O método do pH diferencial torna-se uma opção vantajosa quando nos extratos há a presença de produtos de degradação (açúcares e antocianidinas). Este método se baseia na obtenção de espectros das soluções em dois valores de pH, visto que com a alteração deste parâmetro, são observadas transformações nas estruturas das antocianinas e conseqüentemente na coloração das soluções (JACKMAN *et al.*, 1987). São utilizadas soluções de pH 1,0 e 4,5 para diluição do extrato, sendo as leituras feitas em dois comprimentos de onda (λ máx-vis = absorção máxima; 700nm = ausência de absorção). A

absorvância das soluções a $\lambda_{\text{máx-vis}}$ em pH 1,0 é proporcional à concentração das antocianinas presentes, enquanto a absorvância das soluções neste mesmo comprimento de onda, porém em pH 4,5, equivale aos produtos de degradação das antocianinas. O cátion flavílico, de coloração vermelha, é a forma predominante em pH 1,0 enquanto que o carbinol, incolor, predomina em pH 4,5. As leituras a 700nm servem para corrigir eventuais espalhamentos de luz causados por partículas em suspensão (GIUSTI & WROSLTAD, 2001; COHEN& ALVES, 2006).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Matéria-Prima

3.1.1 Açaí

Como matéria-prima foi utilizada polpa de açaí pasteurizada proveniente de uma indústria processadora de açaí, localizada em Tomé-Açu/ Pará. A polpa foi transportada congelada e mantida a -18°C em câmara frigorífica até o momento de sua utilização.

3.1.2 Material

Para a realização dos experimentos foram utilizadas as seguintes vidrarias e reagentes:

- Ponteiras para pipetador automático com capacidade para 10 a 1000µL- Brand®
- Ponteiras para pipetador automático com capacidade para 100 a 1000µL- Brand®
- Ponteiras para pipetador automático com capacidade para 0,5 a 5mL- Brand®
- Balões volumétricos âmbar com capacidade para 5,10, 50 e 100mL
- Balões volumétricos com capacidade para 200, 500 e 2000mL
- Pipetas pasteur
- Béqueres com capacidade para 50, 100, 250 e 500mL
- Dessecador de vidro com adaptador para vácuo
- Vials âmbar para injetor automático com capacidade para 1,8mL - Waters®
- Redutor de volume para vial com volume de 200 µL

Todos os reagentes utilizados nos experimentos possuíam grau HPLC, marca Tedia®. A água ultra-pura (18,2MΩ) utilizada também em todas as etapas, foi obtida do sistema Milli-Q® A 10 – Millipore.

3.2 Processo de Clarificação da Polpa de Açaí

Os experimentos de clarificação do suco de açaí foram realizados na Planta Piloto e nos laboratórios da Embrapa Agroindústria de Alimentos, CTAA, Rio de Janeiro. As amostras de todo o processo foram coletadas e guardadas em frascos devidamente identificados e congelados até o dia das análises.

A Figura 13 representa o diagrama de blocos do processo de clarificação da polpa de açaí, incluindo os pontos de coleta das alíquotas das amostras.

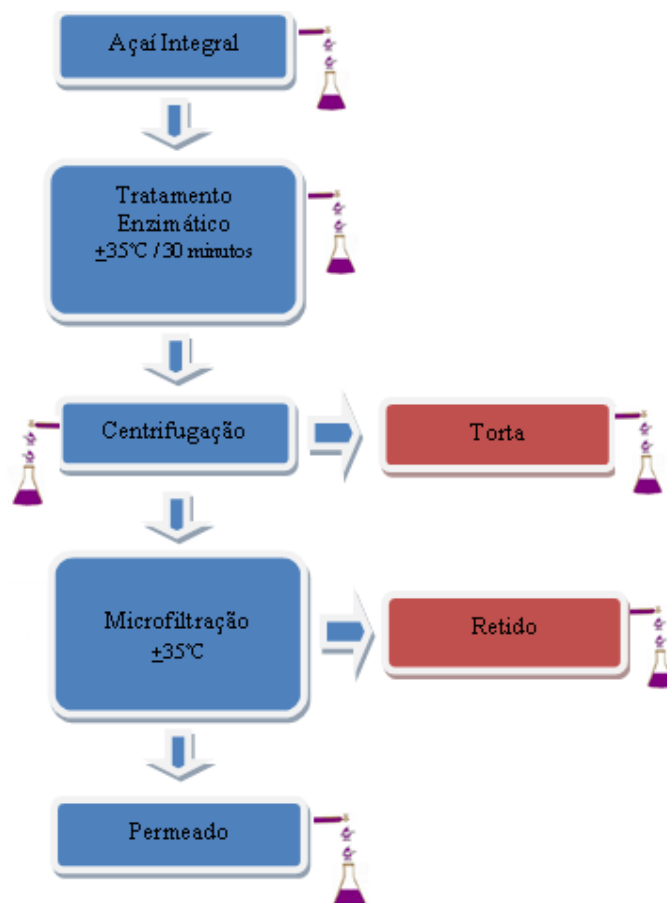


Figura 13: Diagrama de blocos do processo de clarificação da polpa de açaí com pontos de coleta da amostra.

3.2.1 Pré-tratamento

Os sacos, contendo 1kg de polpa de açaí congelado, foram retirados da câmara frigorífica e acondicionados em recipientes de inox com tampa até seu total descongelamento. Para o processo foi descongelado aproximadamente 10 kg de polpa. O recipiente com a polpa de açaí foi pesado para cálculos de rendimento. Uma vez descongelada, a polpa foi submetida ao tratamento enzimático e a centrifugação.

Foi adicionada à polpa de açaí a enzima Rapidase® TF da DSM Food Specialities na concentração de 0,1g/Kg de polpa. A Rapidase TF é uma preparação enzimática líquida oriunda de *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei*, apresentando atividade de pectinase e hemicelulase, com temperatura ótima na faixa de 10 a 50°C e pH entre 3,0 e 5,5. Após a homogeneização, a polpa de açaí ficou em repouso e o tratamento foi realizado a 35°C por 30 minutos.

Após o tratamento enzimático, a polpa de açaí foi homogeneizada e centrifugada utilizando uma centrífuga de cestos (Figura 14), marca Internacional Equipment Company, modelo SIZE 2, a 406g, tendo como meio filtrante uma tela de nylon de 150µm.



Foto: Gouvêa, A.C.M.S.

Figura 14: Centrífuga de cestos.

O suco centrifugado foi acondicionado em recipientes plásticos de 4 L, previamente sanitizados e pesados para determinação do rendimento dos mesmos (Equação I).

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{massa do produto centrifugado}}{\text{massa da polpa de açaí}} \times 100 \quad \text{Equação I}$$

3.2.2 Processo de microfiltração

A microfiltração do suco centrifugado foi realizada utilizando um sistema de membranas cerâmicas à temperatura de 35°C, composto por três membranas tubulares de óxido de alumínio com poros de 0,1µm de diâmetro e área filtrante total de 0,0165m². As membranas estavam dispostas em série, sendo o permeado coletado de cada membrana por tubos flexíveis independentes. O tanque de alimentação em aço inox tem a capacidade nominal de 4,5L, é fechado e encamisado, permitindo o controle da temperatura do processo através do acoplamento com um sistema de refrigeração (Figura 15).

Para cada processo foram utilizados 4L do produto centrifugado com recirculação do retido. A diferença de pressão aplicada à membrana foi de 2,0 bar e o fator de concentração volumétrica atingido foi de 3,5.

Durante o processo de microfiltração, o permeado era coletado continuamente e pesado ao término do processo.

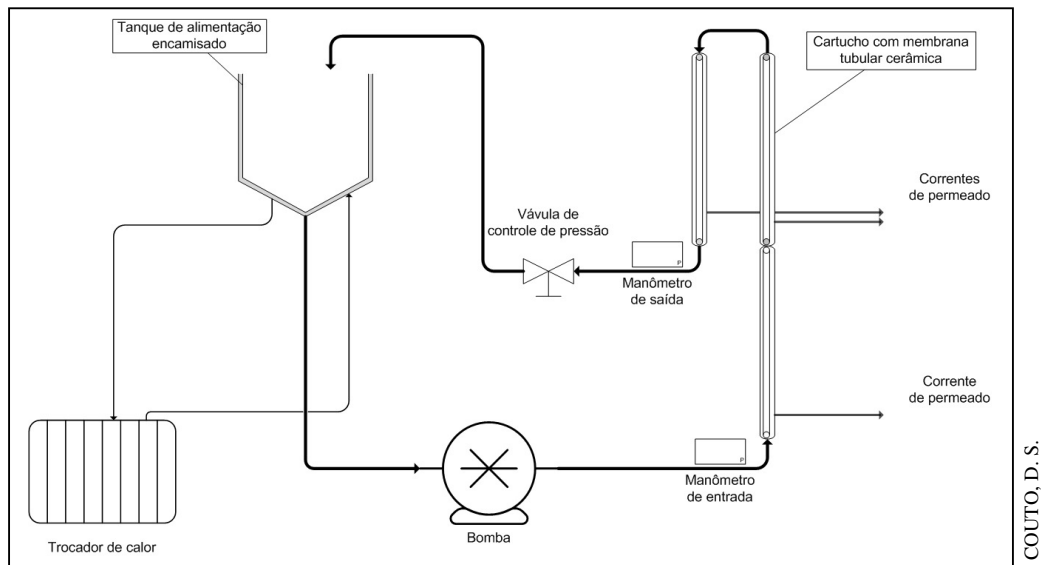


Figura 15: Diagrama esquemático do sistema de microfiltração.

3.2.3 Limpeza dos sistemas de membranas

Após o processo, o sistema de membranas era lavado, seguindo o procedimento a seguir conforme recomendações do fabricante.

1. – Lavagem com água à temperatura ambiente, com descarte das correntes de retido e de permeado até a remoção dos resíduos de suco (detectada por inspeção visual).
2. – Lavagem com solução de hidróxido de sódio 1% à temperatura de 40°C por 20 minutos, com recirculação das duas correntes.
3. – Adição de 200 ppm de cloro, deixando recircular por 20 minutos.
4. – Adição de 1 mL de detergente comercial para limpeza de membranas, deixando recircular por mais 20 minutos.
5. – Enxague com água filtrada até que o pH do permeado fosse neutro ou igual ao da água, descartando-se as correntes de saída.

Após o procedimento de limpeza, a permeabilidade hidráulica da membrana era medida e comparada com o valor inicial. A membrana é considerada limpa quando a permeabilidade é maior ou igual a 90 % do seu valor original. Caso contrário, era realizado um novo procedimento de limpeza, sem adição de detergente, e o fluxo do permeado era novamente avaliado. O fluxo de permeado era calculado utilizando a equação II.

$$J = \frac{V_p}{A \times t}$$

Equação II

Onde,

J = fluxo de permeado

V_p = volume de permeado obtido com intervalo de tempo t.

A = área filtrante da membrana

A permeabilidade hidráulica das membranas foi determinada a partir da medida do fluxo permeado de água sob diferentes pressões aplicadas à membrana, sendo seu valor determinado a partir do coeficiente angular da reta resultante da relação fluxo e pressão aplicada a membrana.

3.3 Adaptações do Método Cromatográfico para Amostras Líquidas

3.3.1 Análise cromatográfica

A análise cromatográfica foi realizada em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Waters® Alliance modelo 2690/5, com detector de arranjo de fotodiodos Waters® modelo 2996, software Empower®, coluna C₁₈ 3,5µm (4,6 x 150mm), fluxo de 1,0mL/min e 50 µL de injeção.

A etapa cromatográfica foi adaptada da metodologia descrita para amostras liofilizadas proposta por Brito *et al.* (2007). O gradiente utilizado foi alterado para adaptar-se à mudança do tempo de corrida de injeções, que foi otimizado para o tempo de 45 minutos possibilitando a realização de um maior número de análises por dia (Tabela 4).

Tabela 4– Primeira adaptação do gradiente de concentração da fase móvel .

Solvente A ácido fórmico/ água (10:90, v/v)	Solvente B (metanol)	Tempo de corrida (minutos)
95-85%	5-15%	0-20
85-75%	15-25%	20-35
75-95%	25-5%	35-45

Ao longo dos testes, observou-se que os tempos de retenção dos picos estavam variando um pouco entre uma injeção e outra, sendo uma das explicações encontradas para tal fenômeno o fato de apenas 5 minutos não terem sido suficientes para estabilização da coluna. Com isto, fez-se uma nova adaptação do gradiente de concentração da fase móvel, onde a coluna continuou com o tempo de 5 minutos para retornar às condições iniciais e acrescentaram-se mais 5 minutos nas mesmas condições de fase móvel obtida ao final dos 40 minutos de corrida (Tabela 5).

A temperatura da coluna também foi outro fator alterado em relação ao método usado por Brito *et al.* (2007). A temperatura na qual a coluna é acondicionada passou de 20°C para 30°C, que é uma temperatura com margem de segurança para evitar a degradação das antocianinas, além de influenciar na redução do tempo de retenção dos picos por contribuir como aumento da cinética de eluição. É válido ressaltar que manter a coluna a uma determinada temperatura fixa, isto é, sem oscilações, é extremamente importante para a estabilização da mesma.

Tabela 5 – Segunda adaptação do gradiente de concentração da fase móvel

Solvente A	Solvente B (metanol)	Tempo de corrida (minutos)
ácido fórmico/ água (10:90, v/v)		
95-85%	5-15%	0-20
85-75%	15-25%	20-35
75-95%	25-5%	35-40
95%	5%	40-45

3.3.2 Etapa de extração

Alíquotas de variados volumes foram testadas na etapa de extração, onde por fim passou-se a usar para amostras líquidas alíquotas de 1,0mL. Em seguida, 2,0mL de solução ácido fórmico/metanol (10:90, v/v) foram adicionados ao tubo, o qual passou por agitação durante 1 minuto em Vortex, ocorrendo após este processo uma etapa de sonificação por 10 minutos no ultrasson Cleanears e posterior centrifugação a 3000g a 20°C em centrífuga refrigerada THERMO[®] (Electron Corporation Sorvall Biofuge Stratos) por igual período de 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um balão volumétrico de 10mL, repetiu-se o processo de lavagem descrito acima com o precipitado obtido na centrifugação, até que o sobrenadante obtido não apresentasse mais coloração. Após as sucessivas extrações, completou-se para 10mL o volume do balão volumétrico com a mesma solução de extração.

Na metodologia original, filtrava-se o extrato em membrana hidrofílica do tipo Millex[®] (0,45µm). Essa etapa foi substituída por centrifugação em microcentrífuga modelo Branson[®] na velocidade de 14.000rpm por 5 minutos para evitar possíveis partículas em suspensão que pudessem danificar a coluna cromatográfica.

3.4 Isolamento das Antocianinas Monoméricas para Obtenção dos Padrões

Para obtenção dos padrões foi utilizado como matéria-prima açaí liofilizado.

3.4.1 Liofilização da polpa de açaí.

Na etapa de liofilização foi utilizado 0,5 Kg do suco de açaí congelado. O processo foi realizado em liofilizador Liotop modelo L101 (Figura 16) à temperatura de -40°C durante 24 horas, até obtenção de umidade de 4%.



Figura 16: Liofilizador modelo L101 (marca - Liotop).

3.4.2 Extração das antocianinas majoritárias

O suco de açaí liofilizado (2g) foi colocado em quatro tubos marca Sorvall com tampa, específicos para a centrífuga THERMO® (Electron Corporation Sorvall Biofuge Stratos). As antocianinas foram extraídas utilizando-se 4mL do solvente extrator ácido fórmico em metanol (10:90, v/v). As outras etapas da extração seguiram conforme descrito no item 3.3.2. As alíquotas do extrato metanólico foram coletadas em um balão de 100mL.

3.4.3 Concentração do extrato antociânico

Todo o material obtido com a extração foi concentrado utilizando rotavapor Büchi à temperatura de $\pm 38^{\circ}\text{C}$ durante 4 horas. Em seguida foi submetido à secagem sob fluxo de nitrogênio.

3.4.4 Coleta dos pigmentos antociânicos isolados

O extrato seco foi ressuspenso em 4 mL da solução utilizada para injeção no cromatógrafo composta por ácido fórmico/metanol/ água (10:10:80, v/v/v). Foi filtrado em filtros de membrana hidrofílica tipo Millex (0,45 μm) e acondicionado em vials e levado ao injetor do cromatógrafo. A coleta foi realizada utilizando uma válvula seletora de colunas com seis canais (Figura 17), válvula Rheodyne® conectada a saída do detector. Somente as duas antocianinas majoritárias de interesse foram coletadas (Figura 18).

A válvula seletora foi programada para direcionar a saída do detector para o canal 1 logo após o início da eluição da cianidina-3-O-glicosídeo no tempo de retenção (t_R) de 16,4 minutos, voltando à programação para o canal de descarte para o lixo após a eluição parcial desta antocianina no tempo de retenção (t_R) de 18,4 minutos. Repetiu-se o mesmo procedimento para a cianidina-3-O-rutenosídeo utilizando-se outro canal e programação de acordo com o seu tempo de retenção (t_R) 21,0 e 22,4, respectivamente, para o início e o fim de sua eluição.

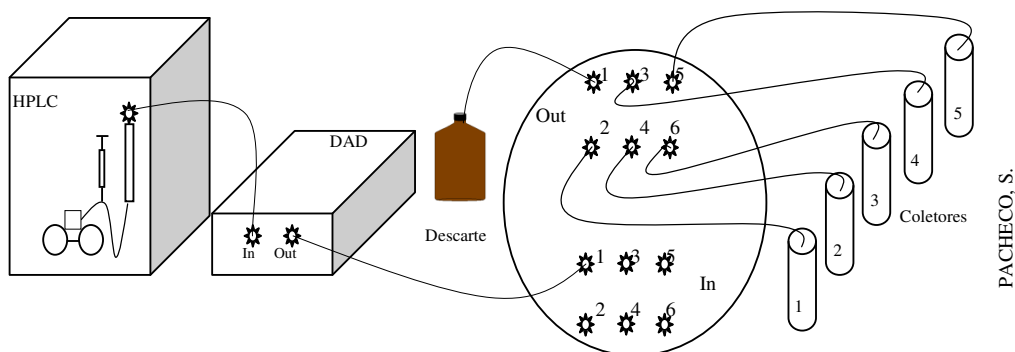


Figura 17: Esquema de funcionamento da válvula seletora de colunas com seis canais.

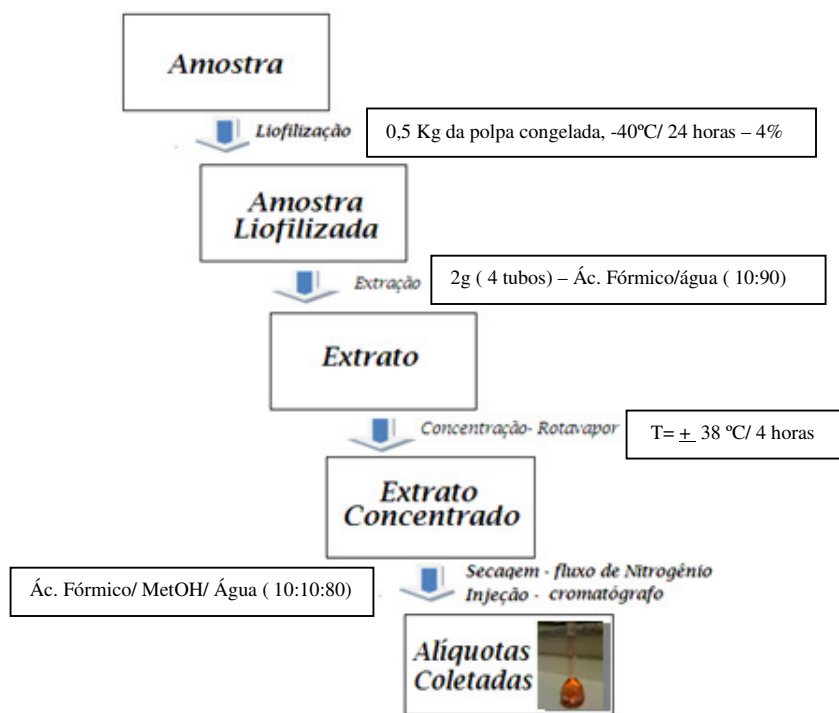


Figura 18: Diagrama esquemático de obtenção das alíquotas dos padrões.

3.4.5 Purificação e concentração dos extratos aquosos das antocianinas majoritárias isoladas

Para esta etapa foi utilizado cartucho Sep-Pak C₁₈ Waters[®] (Figura 19) previamente acondicionado com metanol. Após saturação do cartucho com o extrato aquoso antociânico, o mesmo foi lavado com 10 mL da solução aquosa de HCl 0,01%. Os pigmentos antociânicos isolados foram extraídos com solução de metanol, foram secos sob fluxo de nitrogênio e ressuspensos em balão volumétrico âmbar de 5mL com solução de ácido fórmico/ metanol/ água (10:10:80,v/v/v).

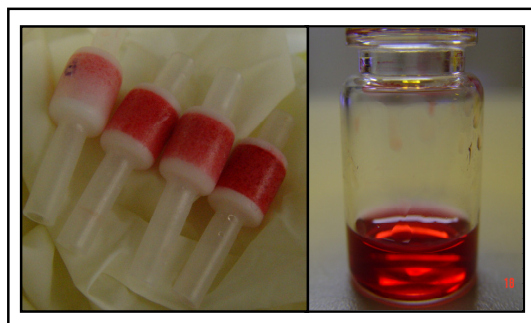


Figura 19: Cartuchos Sep-Pak C₁₈ com antocianinas adsorvidas e concentrado obtido após a eluição.

3.4.6 Obtenção das concentrações dos padrões das antocianinas majoritárias isoladas

A concentração dos extratos das antocianinas monoméricas isoladas foi calculada através dos respectivos valores das concentrações obtidas por leitura em espectrofotômetro Shimadzu[®] UV 1800. Para cada antocianina, foi utilizada uma determinada absorvidade molar conhecida e específica de cada solvente de leitura. Duas alíquotas de 100µL de cada concentrado foram secas sob fluxo de nitrogênio gasoso e ressuspensas em 2ml nos seus respectivos solventes de leitura descritos na Tabela 6.

Tabela 6: Solventes utilizados na determinação da concentração das antocianinas isoladas.

Antocianina	Cianidina- 3-O-glicosídica	Cianidina- 3-O-rutenosídica
Solvente de leitura	HCl/metanol, v/v (1:99)*	HCl/água, v/v (1:99)**
Comprimento de onda	520nm*	523nm**
Absortividade molar- ε	34300 L/mol.cm*	28840 L/mol.cm**
Massa Molar	449,2g/mol	595g/mol

Fonte:* (BRITO *et al.*, 2007); *(GUISTI; SAONA; WROSLTAD,1999).

Para a obtenção da pureza, uma alíquota de 100µL foi retirada de cada concentrado e injetada no cromatógrafo sob as condições descritas no item 3.3.1, com o gradiente da fase móvel descrito na Tabela 5. A pureza obtida foi calculada segundo a equação III. Em seguida, foi calculada a concentração das antocianinas monoméricas isoladas utilizando a equação IV.

$$Pureza\% (P) = \frac{\text{Área do pico de interesse}}{\text{Área de todos os picos}} \times 100 \quad \text{Equação III}$$

$$C = \frac{P \times A \times 10^3 \times MM \times FD}{\epsilon \times b} \quad \text{Equação IV}$$

Onde:

C= concentração da antocianina em mg/5mL

P= percentual de pureza equivalente ao percentual de área da antocianina

A= a absorvância obtida no comprimento de onda específico do solvente utilizado

10^3 = fator para passar a concentração de grama para miligrama.

MM= massa molar da antocianina – g/mol

FD= fator de diluição

ϵ =coeficiente de absorvidade molar da antocianina no solvente usado - L/mol.cm.

b = caminho óptico da cubeta usada no espectrofotômetro.

Com o valor da concentração obtido, foi possível preparar por diluição outros pontos para a curva de calibração, cada um com volume final de 200 μ L. Os pontos foram injetados no cromatógrafo sob as mesmas condições descritas no item 3.3.6, sendo a curva de calibração feita a partir dos valores de concentração X valores de área, Tabela 7.

Tabela 7: Concentrações utilizadas para construção da curva de calibração do padrão

Ponto da curva	Solução padrão μ L	Solvente de injeção* μ L	Volume final de injeção μ L
1	5	195	200
2	10	190	200
3	20	180	200
4	30	170	200
5	50	150	200
6	100	100	200
7	150	50	200
8	200	0	200

*ácido fórmico/metanol/água (10:10:80, v/v/v)

3.4.7 Identificação dos padrões por espectrometria de massas

Para identificação dos padrões isolados, utilizou-se o sistema de espectrometria de massas Synapt da Waters[®], com inserção direta dos mesmos. Este sistema é composto pelos analisadores quadrupolo ortogonal (t-wave[®]) e W TOF de alta resolução. A fonte de ionização utilizada foi electrospray (ESI) positiva com as seguintes condições: temperatura da fonte de 80°C, fluxo do gás de arraste (N₂) de 5L/min com temperatura de 150°C, energia de capilar de 2,5 KV, energia do cone de amostragem de 35 V e energia do cone de extração de 4,0 V.

3.5 Metodologia Analítica

3.5.1 pH

As determinações de pH foram realizadas em titulador automático Metrohm[®], modelo 785 DMP – Titrino, após calibração do aparelho com tampões de pH 4 e 7.

3.5.2 Sólidos solúveis em °Brix

Para a amostra de suco de açaí (açaí grosso), que possui fração insolúvel, foi necessária uma filtração em papel de filtro (filtração rápida) para posterior leitura em refratômetro Bellingham+ Stanley Limited, com escala em grau Brix, a leitura na amostra de suco clarificado foi realizada de forma direta, todas as medições foram realizadas à temperatura de 25°C com correção do valor obtido referente ao valor da temperatura.

3.5.3 Acidez total titulável

A acidez total foi determinada em titulador automático Metrohm[®], modelo 785 DMP – Titrino, com reagente hidróxido de sódio fatorado com biftalato de sódio. Os valores foram expressos em g de ácido málico por 100g de amostra.

3.5.4 Fenólicos totais

A quantificação de fenólicos totais foi realizada seguindo a metodologia espectrofotométrica de Folin-Ciocalteu (SINGLENTON & ROSSI, 1965) com leitura de absorvância a 760nm. O resultado obtido foi expresso em equivalente de ácido gálico (EAG, mg/100g), de acordo com a curva padrão.

3.5.5 Sólidos totais

Foi realizada a secagem da amostra em estufa a vácuo a 60°C, com pesagem até peso constante na terceira casa decimal (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

3.5.6 Avaliação da técnica de quantificação de antocianinas por CLAE no processo de microfiltração

As alíquotas coletadas para análises das etapas do processo de clarificação do suco de açaí foram procedentes do açaí grosso, polpa de açaí após o tratamento enzimático, polpa de açaí centrifugada, torta, alimentação, permeado e retido.

Todas as amostras foram pesadas em balança analítica, BEL-Engineering[®], de quatro casas decimais.

3.5.6.1 Extração das antocianinas monoméricas

Todas as amostras foram pesadas em triplicatas conforme descrito na Tabela 8, em um tubo com tampa de rosca apropriado para utilização em centrífuga. Em seguida 2mL de

solução ácido fórmico/metanol (10:90, v/v), foram adicionados ao tubo, o qual passou por agitação durante 1 minuto em Vortex, ocorrendo após este processo uma etapa de sonificação por 10 minutos no ultrasson Cleanears e posterior centrifugação a 3000g a 20°C na centrífuga refrigerada THERMO[®] (Electron Corporation Sorvall Biofuge Stratos) por igual período de 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um balão volumétrico de 10mL, repetiu-se o processo de lavagem descrito acima com o precipitado obtido na centrifugação, até que o sobrenadante obtido não apresentasse mais coloração. Após as sucessivas extrações, completou-se para 10mL o volume do balão volumétrico com a mesma solução de extração.

Alíquotas de 2mL foram transferidas utilizando pipetador automático para ependorfes e levados para centrifugação em microcentrífuga modelo Bransonic[®] na velocidade de 14.000rpm por 5 minutos. Em seguida, uma alíquota de 1mL do extrato centrifugado foi evaporada sob fluxo de ar comprimido filtrado e ressuspensa em 200µL de solução metanol /ácido fórmico /água (10:10:80, v/v/v). O extrato foi transferido para um vial com redutor de volume e levado ao injetor do cromatógrafo para análise cromatográfica.

Tabela 8: Alíquotas pesadas de acordo com a etapa do processo

Alíquota pesada (g)	Amostras procedentes do processo de clarificação
0,1 - 0,2	Torta, Retido
0,4 - 0,5	Açaí polpa; Açaí tratamento enzimático
1,0 - 1,5	Centrifugado, Permeado

3.5.6.2 Análise cromatográfica

As análises cromatográficas foram realizadas em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência com equipamentos já descritos (item 3.3.1). As condições cromatográficas foram:

- Coluna C₁₈, temperatura do forno da coluna cromatográfica em 30°C
- Fluxo fase móvel 1mL/ minuto
- Volume de injeção de 50µL
- Tempo de análise 45 minutos
- Detector de arranjo de fotodiodos e detecção a 520nm
- Gradiente de eluição de forma linear com as fases móveis A- Ácido Fórmico/ Água (10:90, v/v) e B- Metanol (Tabela 5)

3.5.7 Determinação do coeficiente de rendimento para cada antocianina majoritária em cada etapa do processo

Como o suco sofreu tratamento enzimático foram também realizadas análises na polpa de açaí sem tratamento e na polpa de açaí com tratamento enzimático.

Para cada etapa do processo foi calculado o percentual de rendimento de cada antocianina majoritária (cianidina-3-O-glicosídeo e cianidina-3-O-rutenosídeo) através do balanço de massas, o cálculo utilizado está representado nas equações V e VI.

Etapa de Centrifugação

$$\text{Equação para balanço de massas: } M_I \times C_I = M_C \times C_C + M_T \times C_T \quad \text{Equação V}$$

Onde:

M_I = massa em kg da polpa de açaí (inicial)

C_I = concentração inicial obtida da antocianina em mg /100g, na polpa de açaí com tratamento enzimático.

M_C = massa do açaí centrifugado em kg

C_C = concentração da antocianina obtida no açaí centrifugado em mg/100g

M_T = massa da torta do açaí em kg

C_T = concentração da antocianina obtida na torta do açaí em mg/100g

Etapa da Microfiltração

$$\text{Equação para balanço de massas: } M_A \times C_A = M_P \times C_P + M_R \times C_R \quad \text{Equação VI}$$

Onde:

M_A = massa em kg da alimentação (açaí centrifugado)

C_A = concentração inicial obtida da antocianina em mg /100g, na alimentação

M_P = massa do suco permeado em kg

C_P = concentração da antocianina obtida no permeado em mg/100g

M_R = massa do retido em kg

C_R = concentração da antocianina obtida no retido em mg/100g

3.5.8 Determinação do índice de retenção da membrana de microfiltração

Com os valores obtidos por CLAE das concentrações das antocianinas foi calculado o índice de retenção da membrana para cada antocianina majoritária. Os cálculos foram realizados segundo a equação IX.

$$IR = 1 - \frac{\text{Concentração Permeado}}{\text{Concentração alimentação}} \times 100 \quad \text{Equação VII}$$

3.5.9 Quantificação por pH-diferencial e por CLAE da Antocianinas Monomérica

Foi feito um teste utilizando a matéria-prima, polpa de açaí, e outra polpa de fruta como matriz para efeito de comparação da metodologia de pH diferencial e a metodologia de quantificação por CLAE descrita anteriormente. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

As antocianinas totais e monoméricas das amostras de polpa de açaí e de amora (*Rubus* spp.), foram analisadas pelo método do pH diferencial (GIUSTI & WROSLTAD, 2001). Todas as amostras foram obtidas dos extratos antociânicos resultantes da extração realizada conforme o item 3.5.6.1. Para as amostras de açaí, duas alíquotas de 0,5mL de cada extrato foram retiradas e cada qual foi acondicionada em dois balões volumétricos (10mL), para a amora as alíquotas foram de 1mL cada, seguindo o mesmo procedimento. Em seguida foram dissolvidas nos dois sistemas tampão: cloreto de potássio/ ácido clorídrico para o pH 1,0 (0,025M) e cloreto de potássio/acetato de sódio para o pH4,5 (0,4M) até completar o volume 10 mL. Após 30 minutos em repouso ao abrigo da luz, foram filtradas em papel de filtro (faixa preta) e logo em seguida foram efetivadas as medidas em máximos de absorção na região visível e a 700nm utilizando o espectrofotômetro Shimadzu® UV 1800. A absorvância foi calculada a partir da equação VIII.

$$A = (A_{\lambda_{\max}} - A_{700nm})_{pH1,0} - (A_{\lambda_{\max}} - A_{700nm})_{pH4,5} \quad \text{Equação VIII}$$

A concentração dos pigmentos antociânicos monoméricos foi calculada e representada em cianidina-3-glicosídeo através da utilização da equação IX

$$AM = \frac{A \times MM \times FD}{\epsilon \times b} \quad \text{Equação IX}$$

Onde: AM é a concentração de antocianinas monoméricas em g/L

A é a absorvância calculada pela equação II

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

ϵ é o coeficiente de absorvidade molar da cianidina-3-glicosídeo

FD é o fator de diluição

b é o caminho óptico da cubeta usada no espectrofotômetro

Para quantificação por CLAE foram retiradas três alíquotas de 1 mL, tanto do açai quanto da amora, de cada extrato antociânico, o mesmo utilizado para o método do pH diferencial. Após a secagem por fluxo de ar comprimido filtrado foram ressuspensas na solução de injeção e, injetadas sob as mesmas condições cromatográficas descritas no item 3.5.6.2. Os resultados foram calculados através do software Empower[®].

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Adaptações do Método Analítico para Extração e Identificação das Antocianinas nos Extratos Antociânicos

4.1.1 Extração

As alterações e adaptações tanto na etapa de extração quanto na análise cromatográfica do método original descrito por Brito *et al.* (2007) para amostras liofilizadas, foram realizadas a fim de adaptar o mesmo para a matriz de interesse, no caso polpa e sucos de frutas, além de possibilitar a quantificação por meio de CLAE dos analitos em questão, visto que a metodologia original visava apenas a sua identificação.

Os resultados obtidos após alguns testes de extração e análise cromatográfica proporcionaram uma ótima separação das antocianinas com picos de magnitude que viabilizaram seu isolamento para separações preparativas e futura quantificação do analito (Figura 20).

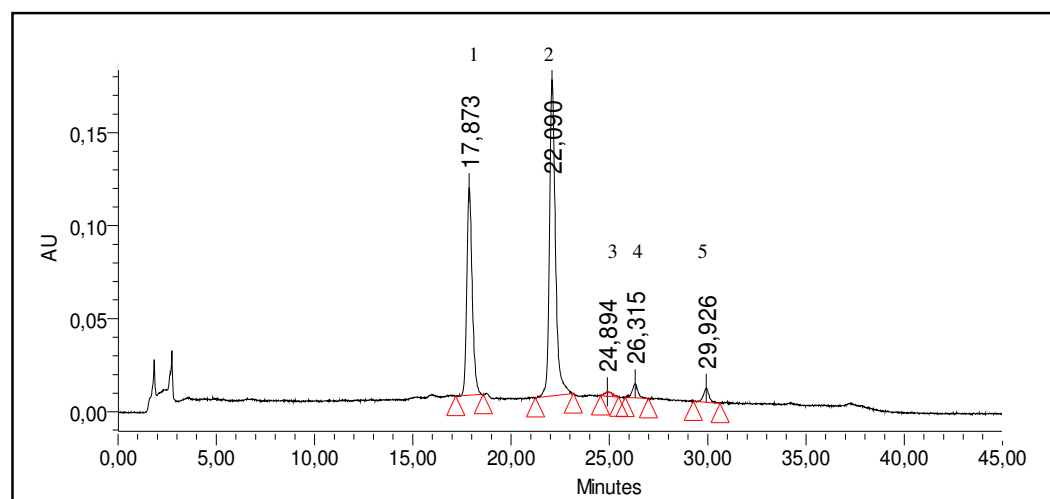


Figura 20: Perfil cromatográfico obtido do extrato antociânico do açaí grosso, pico 1 (t_R 17,87) 35,14%, pico 2 (t_R 22,0) 58,74%, pico 3 (t_R 24,8) 1,14% , pico 4 (t_R 26,31) 2,48 % e pico 5 (t_R 29,9) 2,48%.

Os testes realizados visaram ainda adequar alíquotas retiradas das amostras para a etapa de extração, de modo que não dificultassem a etapa de lavagem da amostra para obter o extrato antociânico. Foram satisfatórias apenas três ou quatro lavagens da amostra sendo, portanto, não observada mais alteração na cor do último extrato obtido (Figura 21). Para confirmação de que já não havia mais antocianinas para serem extraídas, foi realizada uma análise cromatográfica sob as condições já descritas, do sobrenadante da quarta lavagem da amostra, o qual já se apresentava descorado e não foi observada a presença de nenhum sinal no cromatograma obtido no comprimento de onda de análise específico para antocianinas (520nm). Foi possível ainda, observar que havendo a necessidade de trabalhar com outros sucos de frutas, esta alíquota variará de acordo com a concentração ou diluição da amostra.

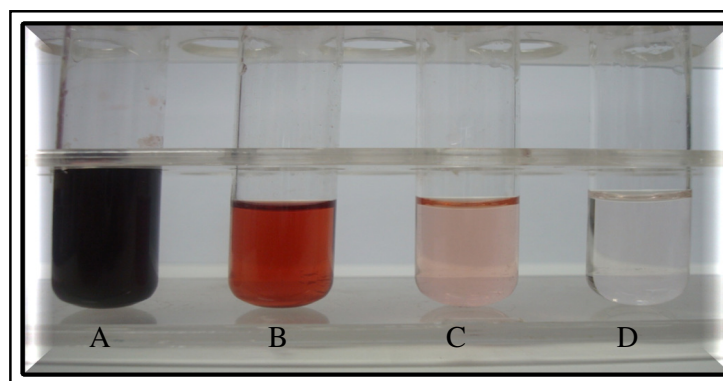


Figura 21: Resultado das sucessivas lavagens da amostra ocorrida na etapa de extração. (A) extrato obtido da primeira lavagem (B) extrato obtido da segunda lavagem (C) extrato obtido da terceira lavagem e (D) extrato obtido da quarta lavagem.

4.1.2 Análises cromatográficas da polpa de açaí

Depois de alguns experimentos, o melhor resultado foi obtido mantendo o perfil cromatográfico, com o ajuste no gradiente de eluição e a fixação da temperatura da coluna cromatográfica C_{18} fase reversa a $30^{\circ}C$ (Tabela 5). Com essas mudanças, foi possível otimizar o tempo da corrida cromatográfica de cada análise com a redução de 10 minutos (Figura 22) em relação a corrida cromatográfica seguindo o método Brito *et al.* (2007).

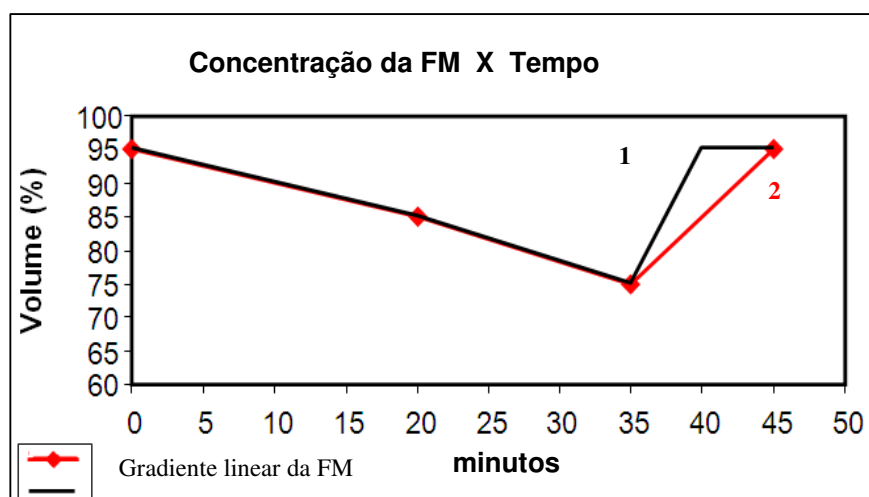


Figura 22: Gráfico do gradiente da fase móvel - (1) primeira adaptação do gradiente da fase móvel e (2) segunda adaptação do gradiente da fase móvel.

Houve também a necessidade de aumentar o tempo de lavagem do sistema cromatográfico com água ultra purificada (no mínimo por 3 horas) e por fim metanol (10 minutos) após sua utilização, a fim de evitar o processo de corrosão pelo ácido fórmico presente na fase móvel proporcionando assim a preservação do mesmo.

4.1.3 Identificação das antocianinas na polpa de açaí por comparação com a literatura

As antocianinas majoritárias observadas na análise cromatográfica da polpa de açaí sugeriram em primeira ordem tratar-se de cianidina-3-O-glicosídeo e cianidina-3-O-rutenosídeo (Figura 23). Esta observação foi fundamentada após comparação com resultados já observados na literatura (HARBONE, SAITO, DETONI, 1994; GALLORI *et al.*, 2004; BRITTO *et al.*, 2007).

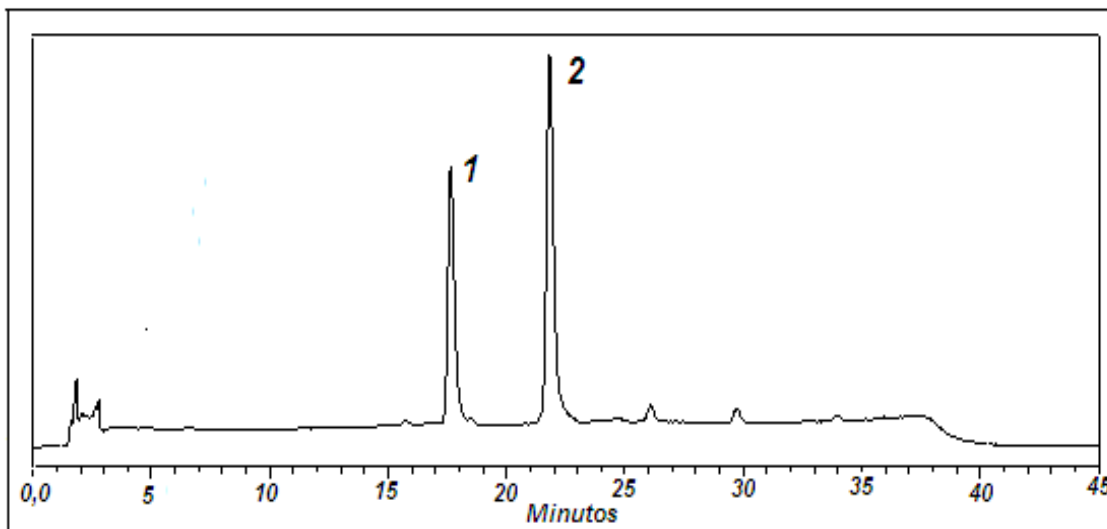


Figura 23: Cromatograma adquirido a 520 nm reproduz o perfil das antocianinas do extrato antociânico do açaí, pico (1) cianidina-3-O-glicosídeo e pico (2) cianidina-3-O-rutenosídeo.

Das antocianinas presentes no perfil cromatográfico do açaí, somente a cianidina-3-O-glicosídeo é comumente relatada pelos pesquisadores em seus trabalhos, independente do fruto. Para a antocianina cianidina-3-O-rutenosídeo como não existia um consenso da sua presença na matriz de açaí, necessitou de um método mais eficiente para sua identificação, CLAE acoplado a espectrometria de massas.

A análise do extrato antociânico por CLAE também possibilitou observar que em todas as amostras analisadas provenientes da matéria-prima adquirida (polpa de açaí grosso), a antocianina-3-O-rutenosídeo (59 %) é a que possui maior concentração em relação às outras antocianinas presentes, inclusive a outra majoritária, cianidina-3-O-glicosídeo (35%).

4.2 Obtenção dos Padrões das Antocianinas Majoritárias

A cianidina-3-O-glicosídeo é a mais comum das antocianinas encontrada nas frutas e seu padrão pode ser adquirido comercialmente a preços elevados e baixa concentração. A etapa mais crítica na obtenção desses padrões no Brasil envolve, principalmente, tempo de aquisição, transporte e armazenamento, visto que, em geral, são adquiridos por importação, o que pode comprometer seu grau de pureza.

O isolamento das antocianinas envolveu etapas que demandam tempo, mas, no entanto, a metodologia não é difícil apesar da necessidade de equipamentos sofisticados.

4.2.1 Concentração da amostra

Para obtenção dos padrões de antocianinas, cianidina-3-O-glicosídeo e cianidina-3-O-rutenosídeo foi utilizada a mesma matéria-prima de trabalho. Foi necessário partir de um extrato com alta concentração destas substâncias para que fosse possível diminuir o tempo de coleta e minimizar gastos com os solventes constituintes da fase móvel. Para tal optou-se pela liofilização da amostra e concentração do extrato por rotavapor seguido do processo de secagem com fluxo de nitrogênio. A concentração do extrato do liofilizado obtida foi satisfatória para realizar as coletas das antocianinas. Houve necessidade de 30 corridas, portanto, 30 coletas para obtenção dos dois extratos aquosos antociânicos referente às duas antocianinas isoladas com concentração que permitisse a confecção de uma curva de calibração com oito pontos.

A estabilidade adquirida no tempo de retenção da corrida cromatográfica devido às condições adotadas, citadas no item 4.1.2, possibilitou a utilização de uma válvula seletora Rheodyne® automatizando e otimizando o tempo de coleta dos padrões. Vale ressaltar que este tipo de procedimento foi uma adaptação realizada para que a mesma exercesse a função de coletor de amostras. Este procedimento viabilizou, portanto, a coleta de padrões isoladamente e sem a necessidade da presença constante de um operador para realização da operação de coleta manual. Somente o extrato aquoso correspondente ao pico da antocianina de interesse foi coletado, mas pode-se observar que também é viável a coleta das outras antocianinas pertencentes à amostra de açaí seguindo o mesmo procedimento.

Como a coleta foi realizada com a eluição dos analitos de interesse, estes se encontravam muito diluídos na fase móvel. Para concentrá-los optou-se por capturar as antocianinas em cartucho Sep Pack C₁₈, previamente condicionado com metanol. A lavagem do cartucho com 10 mL da solução aquosa de HCl 0,01% teve como objetivo retirada de substâncias mais polares, açúcares e ácidos orgânicos livres na solução, que são eluídas primeiro (CAMPOS, 2006). Em seguida, o pigmento antociânico adsorvido no cartucho foi extraído com metanol, solvente mais volátil. Este procedimento além de purificar o extrato, possibilitou a secagem utilizando fluxo de nitrogênio. Sem a troca de solventes ficaria inviável a evaporação da fase móvel utilizando fluxo de nitrogênio (Figura 24).

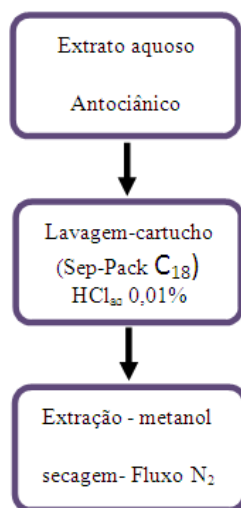


Figura 24: Diagrama esquemático da purificação e concentração das antocianinas isoladas.

O cálculo da pureza foi obtido utilizando a relação entre a área do pico do padrão isolado e as áreas de outros picos presentes no cromatograma a 520nm. A pureza da antocianina cianidina-3-O-glicosídeo foi de 98,9% (Figura 25) e da cianidina-3-O-rutenosídeo foi de 97,2% (Figura 26). Como foi descrito por Guisti, Saona e Wroslstad (1999) o percentual de área do pigmento antociânico isolado a 280nm foi também utilizado como indicador de pureza, pois neste comprimento também ocorre a absorção de outros compostos fenólicos.

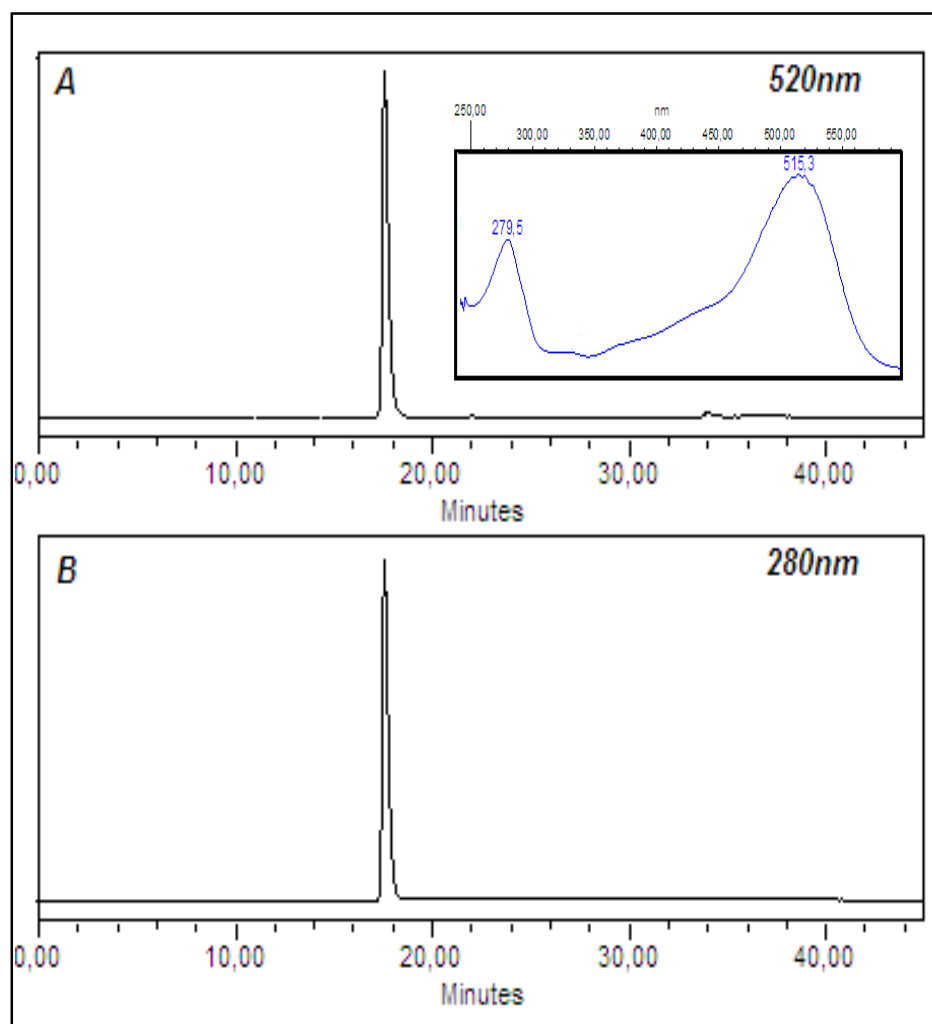


Figura 25(A): Apresenta um cromatograma a 520nm, com um sinal significativo que corresponde à antocianina cianidina-3-O-glicosídeo. **Figura 25 (B):** Apresenta um cromatograma com apenas um sinal a 280nm, que corresponde à antocianina cianidina-3-O-glicosídeo.

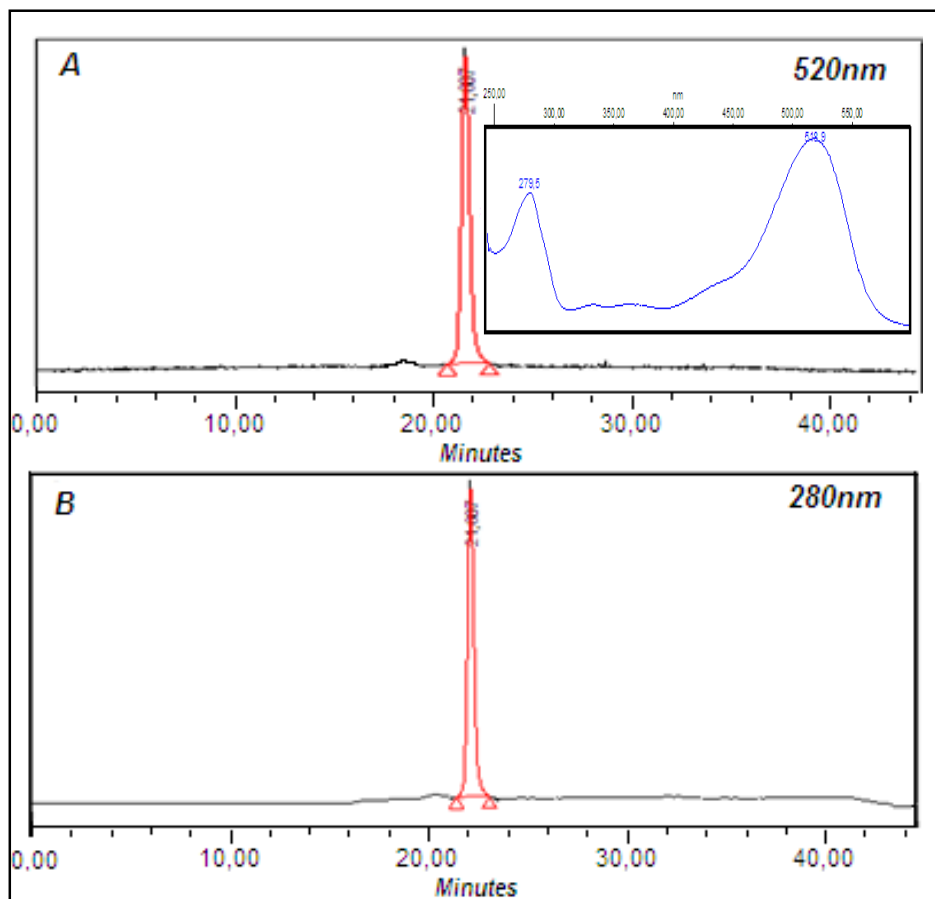


Figura 26(A): Apresenta um cromatograma a 520nm, com um sinal significativo que corresponde à antocianina cianidina-3-O-rutenosídeo **Figura 26 (B):** Apresenta um cromatograma com apenas um sinal a 280nm, que corresponde à antocianina cianidina-3-O-rutenosídeo.

4.2.2 Identificação dos padrões por espectrometria de massas

A análise por espectrometria de massas selecionou o íon pai a m/z 449 correspondente a massa molar da antocianina cianidina-3-O-glicosídeo (t_R 17,80). A fragmentação do íon pai, 449, gerou um íon a m/z de 287 que corresponde à massa molar da aglicona cianidina. Esses dados comprovam que o padrão isolado é a cianidina-3-O-glicosídica (Figura 27).

Em relação ao segundo padrão (t_R 21,00) foi selecionado o íon pai a m/z 595, que corresponde a massa molar da antocianina cianidina-3-O-rutenosídeo.

A fragmentação do íon pai gerou dois fragmentos a m/z de 449 e 287, o fragmento a m/z de 449, corresponde à perda de um fragmento de açúcar de 146uma, sugere ser ramnose, e o fragmento a m/z de 287 corresponde a massa molar da estrutura da aglicona cianidina (Figura 28). Esses dados confirmam que o padrão isolado é a cianidina-3-O-rutenosídeo.

Os dados encontram-se na Tabela 9. Todos os valores foram confrontados com dados existentes na literatura (WU & PRIOR, 2005; BRITO *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2007).

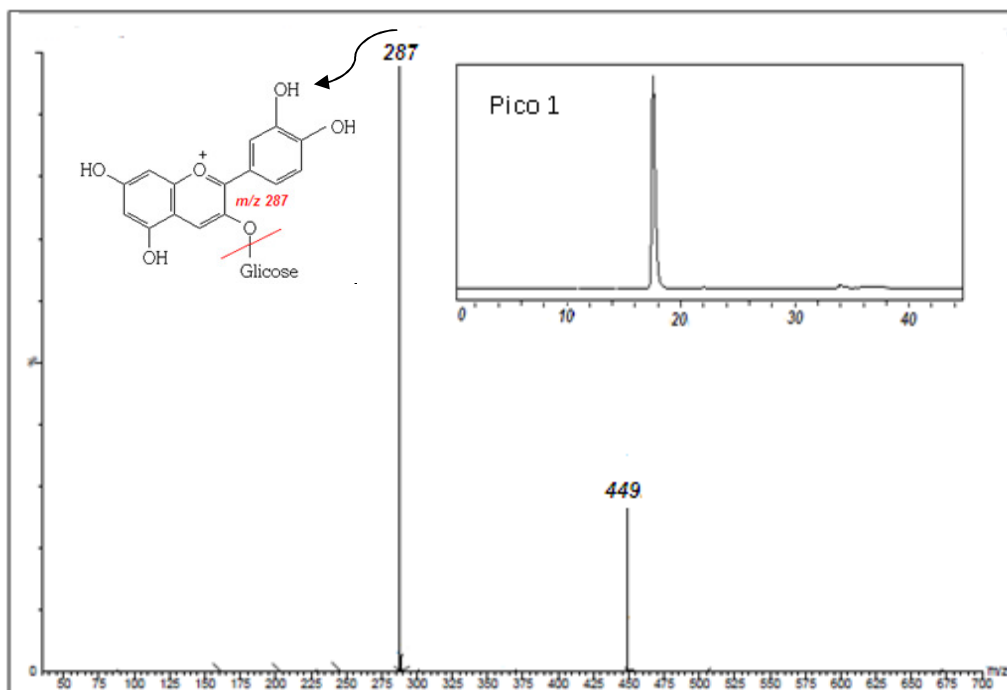


Figura 27: Espectro de massa do pigmento antocianina isolado, pico 1 cianidina-3-O-glicosídeo.

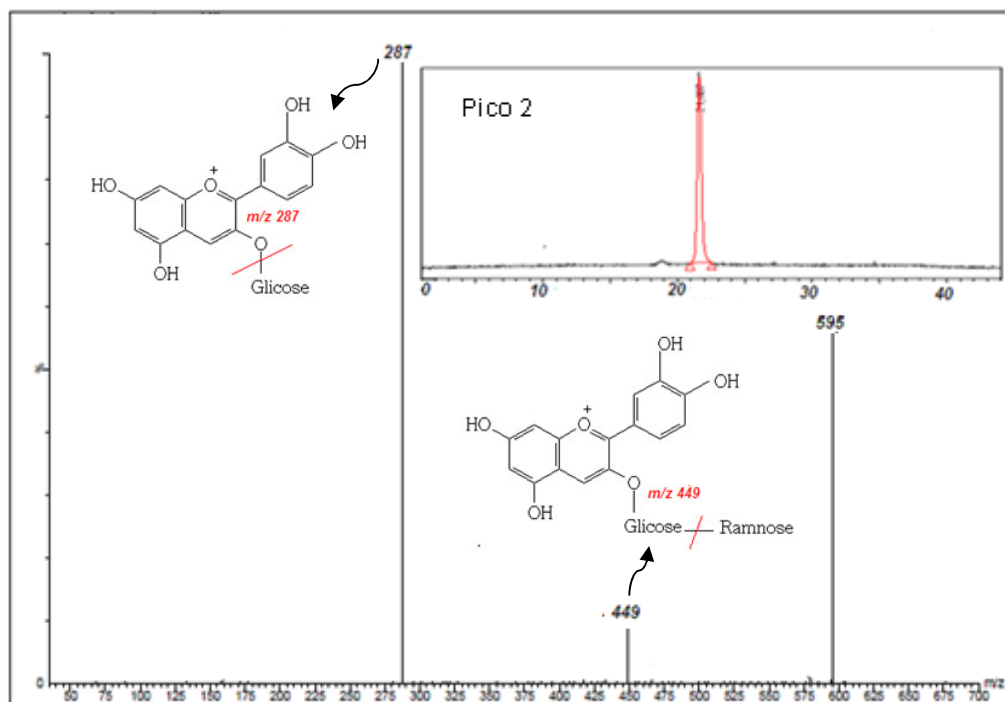


Figura 28: Espectro de massa do pigmento antocianina isolado, pico 2 cianidina-3-O-rutenosídeo.

Tabela 9. Identificação dos padrões das antocianinas majoritárias isoladas do açaí CLAE-MS/MS

Pico	t _R -CLAE (minutos)	[M] ⁺ (m/z)	MS/MS (m/z)	Antocianina
1	17,80	449	287	Cianidina-3-glucosídeo
2	21,00	595	449/287	Cianidina-3-rutenosídeo

Durante os experimentos foi observado que os padrões, que ficaram acondicionados durante 90 dias dentro do injetor do cromatógrafo em solução de injeção (Figura 29-A e Figura 30-D), mantiveram o mesmo perfil cromatográfico ao serem novamente analisados. Foram realizadas avaliações comparando os valores das áreas obtidas para o pico do padrão cianidina-3-O-glicosídeo e cianidina-3-O-rutenosídeo do primeiro dia de análise e 90 dias após (Tabela 10). Na análise após 90 dias foi observado um pequeno aumento na área e consequentemente na concentração dos padrões (Figura 29-B e Figura 30-E), fato que poderá ser explicado pelo efeito de evaporação do solvente, uma vez que os frascos não estavam hermeticamente fechados.

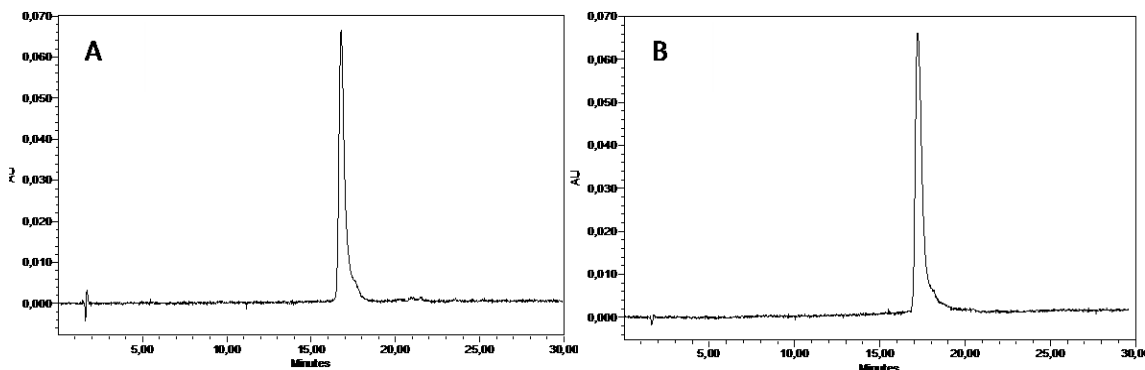


Figura 28: Cromatogramas, obtidos por CLAE, do extrato metanólico do padrão cianidina-3-O-glicosídeo, (A) cromatograma obtido em 18/02/2009 e (B) cromatograma obtido em 06/05/2009.

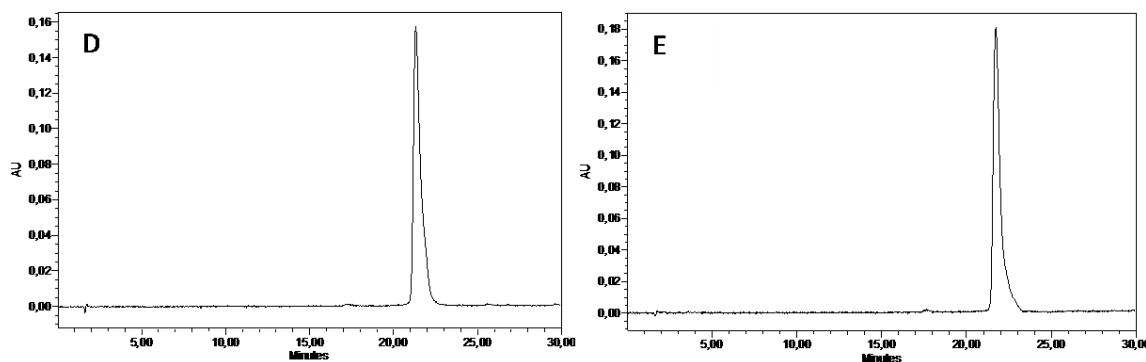


Figura 30: Cromatogramas, obtidos por CLAE, do extrato metanólico do padrão cianidina-3-O-rutenosídeo, (D) cromatograma obtido em 11/02/2009 e (E) cromatograma obtido em 14/05/2009

Tabela 10: Apresenta os resultados referentes aos padrões das antocianinas isolados do açáí liofilizado.

Antocianinas (padrão)	Dia da análise	Área
Cianidina-3-O-glicosídeo	18/02/2009 (início)	1738285
Cianidina-3-O-glicosídeo	06/05/2009 (fim)	1789809
Cianidina-3-O- rutenosídeo	11/02/2009 (início)	4886836
Cianidina-3-O- rutenosídeo	14/05/2009 (fim)	5398895

O fato da concentração dos padrões não ter sofrido redução e o perfil cromatográfico ter sido mantido, indica que os padrões apresentam-se estáveis quando conservados em solução de injeção , ácido fórmico/metanol/ água (10:10:80, v/v/v), a qual possui pH menor que 2,0.

4.3.3 Construção da curva de calibração

Após obtenção da pureza de cada pigmento antociânico isolado e através dos cálculos realizados a partir da leitura da absorvância de cada um, obteve-se a concentração em mg/5mL seguindo a Lei de Lambert-Beer (Tabela 11 e 12). Com a concentração calculada foram realizadas as diluições para a confecção dos pontos da curva de calibração, cada ponto com volume final de 200µL (Figura 31), sendo o ponto oito da curva referente à concentração do padrão em 5mL. A injeção dos pontos foi realizada em triplicata e as condições cromatográficas foram as mesmas do item 3.5.6.2.

Tabela 11– Concentração dos pontos da curva de calibração da cianidina-3-O-glicosídeo

Pontos	Solução padrão (µL)	Solvente de injeção* (µL)	Concentração do ponto (mg/5mL)
Ponto 1	5	195	0,015
Ponto 2	10	190	0,031
Ponto 3	20	180	0,062
Ponto 4	30	170	0,093
Ponto 5	50	150	0,155
Ponto 6	100	100	0,309
Ponto 7	150	50	0,464
Ponto 8	200	0	0,618

*ácido fórmico/metanol/água (10:10:80, v/v/v)

Tabela 12– Concentração dos pontos da curva de calibração da cianidina-3-O-rutenosídeo

Pontos	Solução padrão (µL)	Solvente de injeção* (µL)	Concentração do ponto (mg/5mL)
Ponto 1	5	195	0,004
Ponto 2	10	190	0,007
Ponto 3	20	180	0,015
Ponto 4	30	170	0,022
Ponto 5	50	150	0,036
Ponto 6	100	100	0,073
Ponto 7	150	50	0,109
Ponto 8	200	0	0,145

*ácido fórmico/metanol/água (10:10:80, v/v/v)

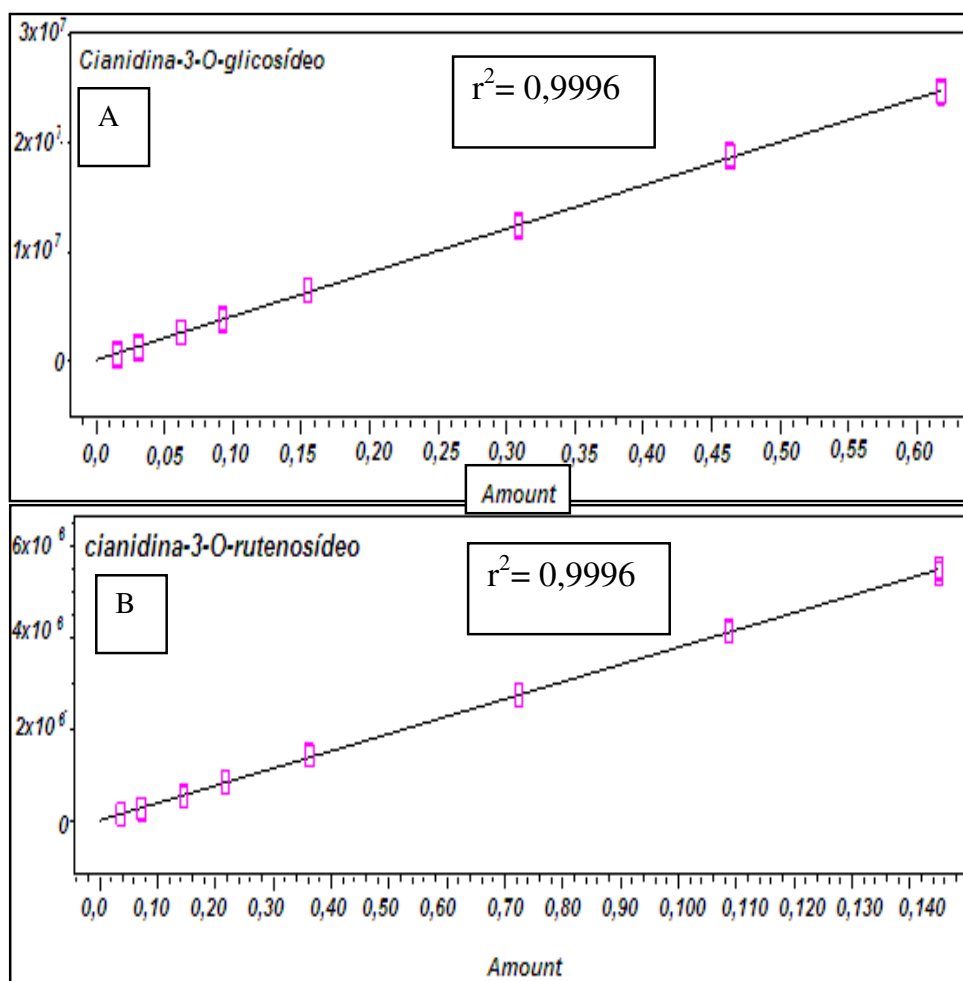


Figura 31 (A): Curva de calibração obtida para cianidina-3-O-glicosídeo (Equação da reta: $Y=4,03 \cdot 10^7X + 2,81 \cdot 10^4$; $R^2=0,999658$), (B) curva de calibração obtida para cianidina-3-O-rutenosídeo (Equação da reta: $Y=3,76 \cdot 10^7X + 1,75 \cdot 10^4$; $R^2=0,999687$).

4.4 Aplicação dos Padrões para Quantificação, por CLAE, das Antocianinas Majoritárias no Suco de Açaí Clarificado por Microfiltração

A metodologia desenvolvida foi utilizada para quantificação das antocianinas majoritárias durante todo o processo de obtenção do suco de açaí clarificado, incluindo o tratamento enzimático até a microfiltração.

4.4.1 Tratamento enzimático

O tratamento enzimático foi realizado com intenção de redução dos sólidos totais a fim de ocasionar melhoria no fluxo do permeado durante a microfiltração (CRUZ, 2008). Porém foi observado após avaliação por CLAE, que a concentração das antocianinas majoritárias do açaí tratado enzimaticamente apresentou um aumento em relação ao açaí sem tratamento. Esse comportamento também foi observado por Cruz (2008) e, provavelmente pode ser consequência do tratamento enzimático favorecer o aumento da disponibilidade das antocianinas monoméricas no meio. Foi detectado um aumento de 37,5% da concentração da cianidina-3-O-glicosídeo e 37,9% da cianidina-3-O-rutenosídeo. O perfil cromatográfico das antocianinas permaneceu inalterado, demonstrando que a enzima utilizada não indicou ter afinidade distinta entre as antocianinas majoritárias, mantendo, portanto, a cianidina-3-rutenosídeo a maior área cromatográfica (Figura 32).

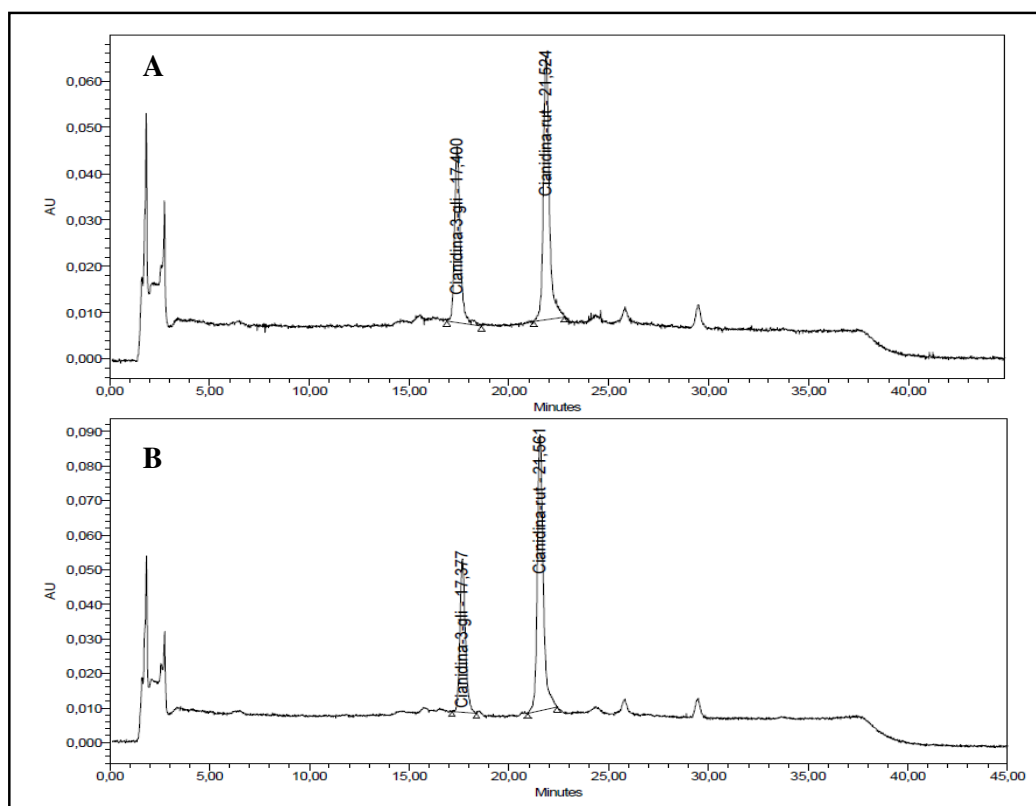


Figura 32: Cromatogramas das antocianinas majoritárias: (A) antes do tratamento enzimático e (B) após o tratamento enzimático.

4.4.2 Centrifugação

Após a centrifugação, o rendimento em suco foi de 64,20%. Os efeitos da centrifugação sobre as características físico-químicas estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13: Parâmetros físico-químicos do açaí grosso e do suco centrifugado¹

Parâmetros	Açaí grosso sem tratamento	Açaí centrifugado
Sólidos solúveis ²	3,3± 0,1	-
pH	4,9± 0,0	4,9 ± 0,0
Acidez total ³	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0
Fenólicos Totais ⁴	462,1± 25,6	349,9 ± 16,5
Antocianinas majoritárias ⁵	168 ± 2,0*	37 ± 1,0*
	316± 2,0 **	965 ± 2,0**

¹ Valores médios de 3 determinações com seus respectivos desvios padrão; ²expresso em °Brix (g/100g); ³em g de ácido málico/100g ; ⁴ expresso em EAG (mg/100g);⁵ expresso em µg/100g , * = cianidina-3-O-glicosídeo, **= cianidina-3-O-rutenosídeo.

Não houve acréscimo nos valores médios de pH e acidez total do açaí grosso e do suco centrifugado mas, em relação aos compostos bioativos houve grande influência da etapa de centrifugação. Pode-se observar redução significativa para os compostos fenólicos totais, 24,3%. A etapa de centrifugação mostrou ser uma etapa crítica para o teor de antocianinas no produto, pois ocasionou a redução de 72,8% e 75,8% de teor das antocianinas majoritárias cianidina-3-O-glicosídeo e cianidina-3-O-rutenosídeo, respectivamente. A centrifugação do suco resultou em duas correntes, centrifugado e torta. Dos 27,2% de cianidina-3-O-glicosídeo que seguiram para estas correntes, apenas 10,1% ficaram no centrifugado e, portanto, 17,6% ficaram retidos na torta.

O mesmo comportamento foi observado para a cianidina-3-O-rutenosídeo. Dos 24,2% que seguiram para as correntes de alimentação e torta, apenas 14,2% ficaram na alimentação e 10% ficaram retidos na torta.

4.4.3 Processo de microfiltração

Além da possibilidade de quantificação individual das antocianinas monoméricas do açaí, foi possível calcular o índice de retenção do processo, indicando que a membrana retém 59,95% de cianidina-3-O-glicosídeo e 42,07% de cianidina-3-O-rutenosídeo.

Os parâmetros da corrente permeado foram comparados com os da alimentação e estão representados na Tabela 14.

Tabela14: Parâmetros da alimentação e do produto final (permeado), suco clarificado¹.

Parâmetros	Alimentação	Açaí permeado
Sólidos solúveis ²	-	2,5 ± 0,1
pH	4,9 ± 0,0	4,6 ± 0,0
Acidez total ³	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0
Fenólicos Totais ⁴	349,9 ± 16,5	189,7 ± 3,9
Antocianinas majoritárias ⁵	37 ± 1,0*	15 ± 0,0*
	97 ± 2,0**	54 ± 1,0**

¹ Valores médios de 3 determinações com seus respectivos desvios padrão; ² expresso em °Brix; ³ expresso em g de ácido málico/100g; ⁴ expresso em EAG (mg/100g); ⁵ expresso em µg/100g, * = cianidina-3-O-glicosídeo, ** = cianidina-3-O-rutenosídeo.

Na etapa de clarificação houve uma redução não significativa no pH, mas a acidez total continuou inalterada. Para os compostos bioativos houve uma grande redução, 54,2% para fenólicos totais e 32,4% do total da antocianina monomérica cianidina-3-O-glicosídeo encontradas na alimentação (suco centrifugado) seguiram para o permeado e retido, indicando assim uma perda de 68,7% durante o processo. Destes 32,4%, 25,2% seguiram para a corrente do permeado e 7,2% ficaram no retido.

Para a cianidina-3-O-rutenosídeo a perda observada durante o processo de microfiltração foi de 57,9%, portanto apenas 42,1% seguiram para a corrente de permeado e retido. Dos 42,1% que restaram no processo, 36,1% seguiram para a corrente do permeado e 6,0% ficaram no retido.

Assim como ocorreu na centrifugação houve grande perda das antocianinas durante o processo de microfiltração, em torno de 70%. E com os resultados das análises cromatográficas pode-se concluir que essa fração dos compostos bioativos perdida não se encontra distribuído na fração insolúvel, torta ou retido, pelo menos não na forma de antocianinas monoméricas. A Figura 33 demonstra o perfil das antocianinas majoritárias, através dos cromatogramas obtidos, durante as etapas do processo de clarificação.

Estes resultados mostram que mais de 70% das antocianinas são degradadas durante estas etapas, podem ter sofrido ação de glicosidases, enzimas que hidrolisam as ligações glicosídicas liberando, portanto, suas agliconas que são mais instáveis que as antocianinas e, que formam espontaneamente chalconas incolores. Fatores extrínsecos dentre os quais se destacam a presença de luz, oxigênio, e efeito do aumento da temperatura, visto que a centrífuga não possui refrigeração, também podem ter contribuído para a instabilidade desses pigmentos antociânicos (WANG & XU, 2007; ALBARACI, VALETA, PESSOA, 2007).

A temperatura durante o processo de microfiltração permaneceu em torno de ± 35°C, portanto, um parâmetro favorável para manter as antocianinas monoméricas nesta etapa, mas dentro do tanque de alimentação a atmosfera não foi controlada, portanto a presença de oxigênio pode ter sido um dos fatores que contribuiu para a redução na concentração dos pigmentos antociânicos nesta etapa.

O cálculo do índice de retenção mostrou uma retenção de 59,9% para a cianidina-3-O-glicosídeo e 42,1% para a cianidina-3-O-rutenosídeo. Esses cálculos mostraram um índice de retenção maior, ± 18%, para a cianidina-3-O-glicosídeo, que possui menor massa molar, do que para cianidina-3-O-rutenosídeo.

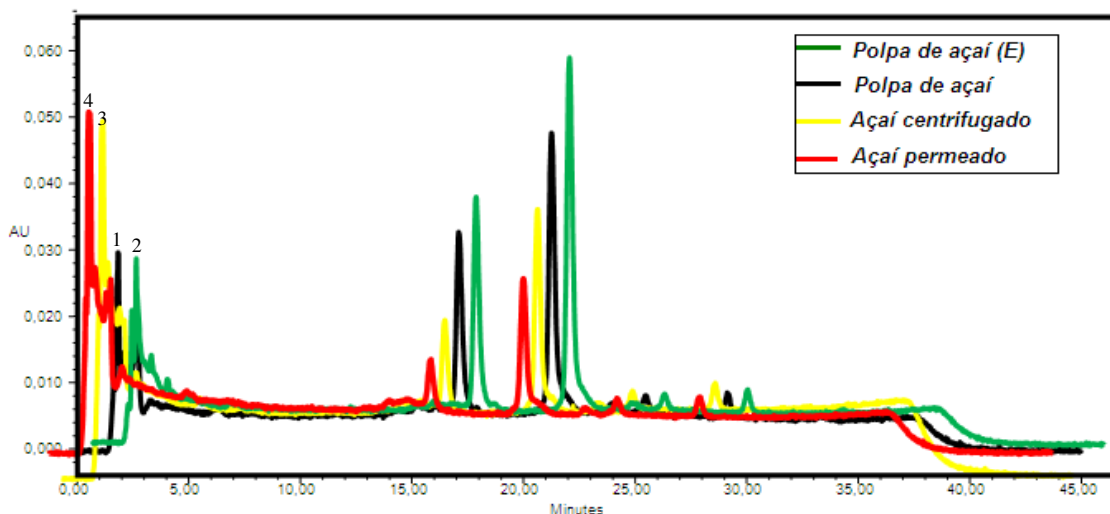


Figura 33: Perfil cromatográfico das antocianinas majoritárias do suco de açai ao longo do processo de clarificação: (1) cromatograma da polpa de açai, (2) cromatograma da polpa de açai após o tratamento enzimático, (3) cromatograma da polpa após centrifugação (4) cromatograma do suco de açai clarificado (Permeado).

4.5 Quantificação por pH diferencial e por CLAE das antocianinas monoméricas

O método por CLAE apresentou resultados com maior confiabilidade. As concentrações das antocianinas monoméricas totais e das antocianinas majoritárias do açai estão descritas na Tabela 15.

Tabela 15: Concentração das antocianinas totais por pH diferencial e por CLAE nas amostras de polpa de açai.

Açai (Amostra em triplicata)	pH diferencial ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	CLAE ($\mu\text{g}/100\text{g}$)
1°	336,4 ¹	48,5 ²
2°	407,0 ¹	48,6 ²
3°	461,2 ¹	48,1 ²
Média ³	401,5 ± 62,6	48,2 ± 0,3

¹ resultado em antocianinas monomérica totais², soma das duas antocianinas monoméricas quantificadas (cianidina-3-O-glicosídeo e cianidina-3-O-rutenosídeo), ³ média com seu respectivo desvio padrão.

Os resultados encontrados na quantificação por pH diferencial e CLAE mostraram uma diferença significativa entre as análises. Na quantificação por pH diferencial a média das triplicatas quantificadas foi de 401,6 $\mu\text{g}/100\text{g}$ para antocianinas monoméricas totais enquanto a média para a soma das duas majoritárias quantificadas por CLAE foi de 48,2 $\mu\text{g}/100\text{g}$.

A possibilidade de este fato ter ocorrido pode estar relacionada a possíveis substâncias presentes na matriz do açai analisada, que não interferiram nos resultados cromatográficos, mas ocasionaram superestimação nos resultados observados durante as análises por pH diferencial. Além disso, a matriz em questão apresenta a cianidina-3-O-rutenosídeo em maior

concentração ($\pm 60\%$ das antocianinas presentes) e não a cianidina-3-O-glicosídeo. Este fato acarreta erro na quantificação, visto que os dados, massa molar e coeficiente de absorvidade, utilizados para cálculo da quantificação das antocianinas totais não provêm da maioria da matriz como é determinado pela metodologia (WROLSTAD, DURST, LEE, 2005).

Utilizou-se também o extrato da amora, o qual possui a antocianina cianidina-O-glicosídeo em maior concentração, a maioria como preconiza o método de pH diferencial, utilizando para cálculos sua massa molar e o coeficiente de absorvidade específico já conhecido para o solvente utilizado na análise (Tabela 16). Comparando os valores obtidos pode-se observar que para essa matriz os resultados tanto para análise por pH diferencial, quanto para a análise por CLAE estão na mesma ordem de grandeza e possuem valores próximos, já que a quantificação realizada pela primeira metodologia fornece valores de antocianinas monoméricas totais, ou seja, tanto as majoritárias quanto as outras de menor concentração são quantificadas, enquanto a segunda metodologia fornece a soma dos valores de concentração das antocianinas majoritárias (cianidina-3-O-glicosídeo e cianidina-3-O-rutenosídeo).

Tabela 16: Concentração das antocianinas totais nas amostras de amora

Amora (Amostra em triplicata)	pH diferencial ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	CLAE ($\mu\text{g}/100\text{g}$)
1°	253,0 ¹	231,6 ²
2°	264,0 ¹	232,7 ²
3°	261,4 ¹	228,7 ²
Média ³	259,4 \pm 5,7	231,0 \pm 4,3

¹ resultado em antocianinas monomérica totais, ²soma das duas antocianinas monoméricas quantificadas (cianidina-3-O-glicosídeo e cianidina-3-O-rutenosídeo), ³ média com seu respectivo desvio padrão.

O perfil cromatográfico do extrato do açaí (Figura 34) mostrou que o açaí possui uma variedade de outros compostos na matriz absorvendo a 280nm e o perfil cromatográfico do extrato da amora (Figura 35) mostrou uma matriz com poucos compostos absorvendo a 280nm, portanto, uma matriz com menor quantidade de interferentes, mais purificada, quando comparada ao extrato do açaí analisado por este trabalho.

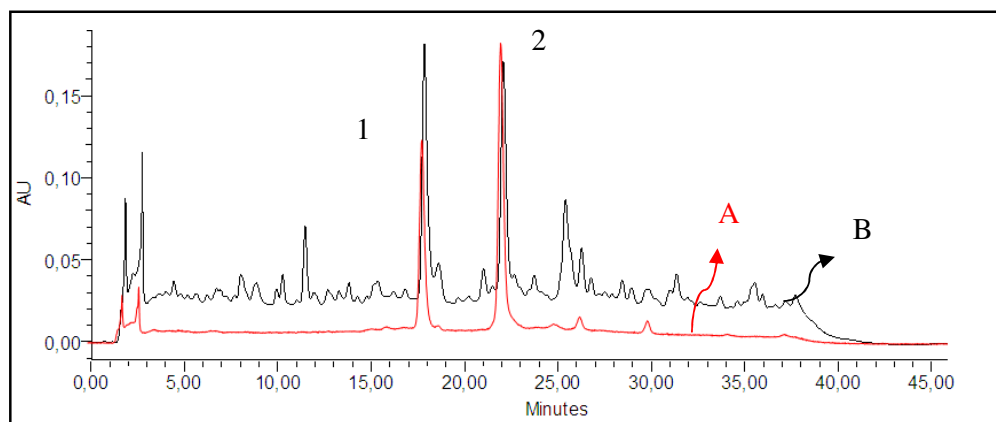


Figura 34: (A) Cromatograma do extrato do açaí a 520 nm e (B) cromatograma do extrato do açaí a 280nm. Pico 1- cianidina-3-O-glicosídeo e pico 2 – cianidina-3-O-rutenosídeo.

A análise com o extrato da amora constatou que as duas técnicas avaliadas não diferiram na eficiência da quantificação das antocianinas. Porém no caso do açaí recomenda-se o uso de quantificação por CLAE, pois esta metodologia apresenta resultados mais confiáveis, pois consegue separar de forma rápida e eficiente, identificar e quantificar as antocianinas monoméricas de forma isolada

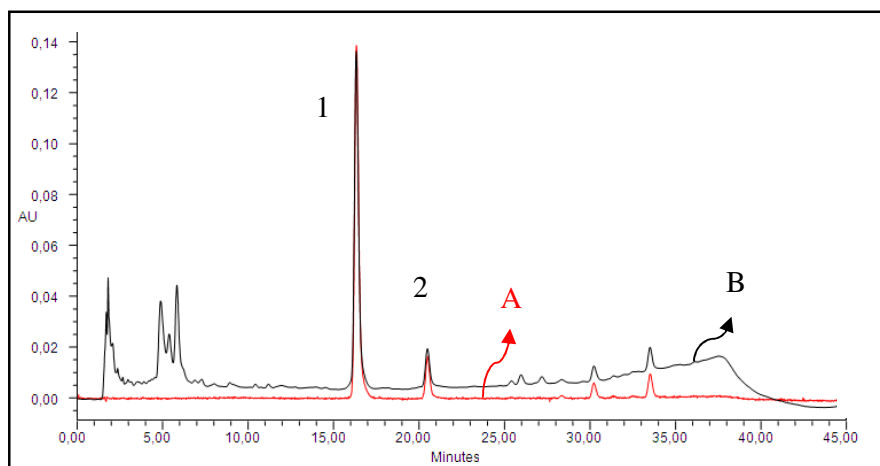


Figura 35: (A) Cromatograma do extrato da amora a 520 nm e (B) cromatograma do extrato da amora a 280nm. Pico 1- cianidina-3-O-glicosídeo e pico 2- cianidina-3-O-rutenosídeo.

5 CONCLUSÃO

A adaptação do método de extração para amostras líquidas mostrou-se adequada, uma vez que após as lavagens não se observou mais alteração da cor do extrato obtido, indicando que todas as antocianinas presentes foram extraídas. Além disso, os cromatogramas dos extratos antociânicos obtidos apresentaram ótimas resoluções e magnitude que permitiu sua quantificação.

As mudanças realizadas no gradiente de eluição e no tempo de corrida possibilitaram análises mais rápidas, além de diminuir o gasto com os solventes que constituem a fase móvel, acarretando menor custo por análise.

O isolamento de padrões de fontes naturais e a técnica de cromatografia líquida possibilitaram a obtenção de padrões analíticos com excelente grau de pureza, acima de 97%. Esse método possibilita caracterizar outras amostras, assim como a utilização de outras matrizes para isolar padrões com confiança e economia.

As antocianinas majoritárias isoladas foram conclusivamente identificadas por CLAE e espectrometria de massas, confirmando as informações obtidas na literatura quanto à presença das antocianinas cianidina-3-O-glicosídeo e cianidina-3-O-rutenosídeo como majoritárias do açaí.

Foi possível conservar por 90 dias o extrato antociânico acidificado dos padrões isolados com confiabilidade. Este procedimento possibilita a redução nos custos de análise, devido à redução de uso dos insumos e tempo de pessoal para isolá-los.

Este estudo possibilitou avaliar o processo de clarificação do suco de açaí através da quantificação das antocianinas cianidina-O-3-glicosídeo e cianidina-O-3-rutenosídeo em cada etapa do processo. Verificou-se que a temperatura de processamento da polpa é uma variável importante para a manutenção dos teores de antocianinas no suco clarificado, bem como a exposição ao oxigênio. O controle da etapa de centrifugação é essencial para minimizar as perdas observadas e permitir que o suco clarificado de açaí apresente teor de antocianinas mais próximo ao do suco integral.

A quantificação das antocianinas majoritárias de forma isolada permitiu ainda calcular o índice de rejeição durante a microfiltração, um parâmetro que deve ser considerado para melhoria do desempenho do processo.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Utilizar a metodologia por CLAE aqui estudada para explorar o potencial de outras matrizes que possam ser utilizadas como fonte de padrões antociânicos.
- Isolar outros tipos de antocianinas e utilizá-las como padrões, possibilitando a caracterização de outras amostras com confiabilidade.
- Utilizar a metodologia de quantificação de antocianinas isoladas por CLAE para avaliar as condições do processamento de sucos de frutas por tecnologia de membranas, pasteurização, vida útil do produto, servindo, portanto como parâmetro de qualidade para o produto final.
- Utilizar a metodologia de caracterização para identificação de adulteração de vinhos, pois os tipos de antocianinas podem caracterizar a procedência da uva.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANGELO, P.M; JORGE, N.Compostos fenólicos em alimentos-Uma breve Revisão.**Inst. Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 232-240, 2007.
- ALBARACI, T. R.; VALETA, A. C.; PESSOA, J. D., Efeito da temperatura nas antocianinas do açáí. **Comunicado Técnico Embrapa**, p. 1517-4786, 2007.
- AGRAWEL, P., HALAWEISH, F., DWIVEDI, G..Antioxidant Effects and Drug Interactions of Resveratrol Present in Wine. **Journal of Wine Research**,v. 18, n. 2, p. 59-71, 2007.
- BELITZ, H. D; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. **Food Chemistry**. 3ª. edição. Garching Springer, 2004.
- BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Química do Processamento de Alimentos**. 2ª. edição. São Paulo: Varela, p.111, 1995.
- BRITO, E. S.; ARAUJO, M. C. P.; ALVES, R. E.; CARKEET, C., CLEVIDENCE, B. A.; NOVOTY, J. A. Anthocyanins Present in Selected Tropical Fruits: acerola, jabolão, jussara and guajiru. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.55, p. 9389-9394, 2007.
- BROUILLARD, J. R. In: **Anthocyanins a food colors**; Markakis, P., ed.; Academic Press: New York. 1982, Cap.1, p. 263.
- BROWNING, A.M., WALLE, U.K, WALLE, T.Flavonoid glycosides inhibit oral cell proliferation-role of cellular uptake and hydrolysis to the aglycones. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 57, n.8, p. 1037-42, 2005.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Instrução Normativa nº1, de 7 de janeiro de 2000. **Diário oficial da União**, 10 jan. 2000. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=7777>>. Acesso em: 21 agost. 2009.
- BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.
- BURNS, J; GARDNER, P. T.; MATTHEWS, D.; DUTHIE, G. G.; LEAN, M.E.J.;CROZIER, A., Extraction of Phenolics and Changes in Antioxidant Activity of Red Wines during Vinification. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 49, n. 12, p. 5797-5808, 2001.
- CAMPOS, D. D. P. **Extração, purificação e isolamento de antocianinas de jabolão (*Syzygium cumini*) e avaliação dos seus efeitos biológicos**. Campinas, S.P., 2006, 113p.Dissertação (Mestre em Química Analítica), Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

CHERYAN, M. **Ultrafiltration and Microfiltration Handbook**. Lancaster: Technomic Publishing Company, p. 527, 1988.

CHANG, Y.C; HUANG, K.X; HUANG, A.C.; HO, Y.C; WANG, C.J. Hibiscus anthocyanins-rich extract inhibited LDL oxidation and oxLDL-mediated macrophages apoptosis. **Food and Chemical Toxicology** , v. 44,p. 1015–1023, 2006.

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

COLLINS, C. H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de Cromatografia**.1ª edição. Campinas: UNICAMP, p. 445, 2006.

CNGPC. **Açaí é objeto de Termo de Ajustamento de Conduta no Ministério Público do Pará**. Conselho Nacional de Procuradores Gerais. Pará, 2006. Disponível em <<http://www.cnpg.org.br>> Acesso em: 02 dez. 2009.

COULTATE, T. P. **Alimentos: a química de seus componentes**.trad.FRAZZON,J. *et al.*,3ª.edição. Porto alegre: Artmed, p.368, 2004.

CRUZ, A. P. **Avaliação do efeito da extração e da microfiltração do açaí sobre sua composição e atividade antioxidante**. Rio de Janeiro, 2008, 104p. Dissertação (Mestre em Ciências), Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

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

FALCÃO, L. D.; BARROS, D. M.; GAUCHE, C.; BORDIGNON, L. M. T.; Copigmentação intra e intermolecular de antocianinas: uma revisão. **Boletim Ceppa**, v. 21, n.2, p. 351-366, 2003.

FARIAS NETO, J. T.; MÜLLER, C.H.; MÜLLER, A. A.; CARVALHO,J. E.U.; VIÉGAS,I.J.M.Cultivar e produção de mudas. In: NOGUEIRA, O.L; FIGUEIRÊDO, F. J. C.;

FONTES, S. R.; CAMINOTO, K. B. S. Microfiltração tangencial aplicada ao suco de açaí **VI Congresso Íbero-Americano em Ciências e Tecnologia de Membranas**, 2007.

FRANCIS, F. J. Analysis of Anthocyanins. In: **Anthocyanins as food colors**. P.Markakis, P., ed.; Academic Press: New York, 1982, p. 182-205.

FRANKE, I. L.; BERGO,C. L.; AMARAL, E. F.; ARAUJO,E. A. Aptidão Natural para o Cultivo de Açaí (*Euterpe oleraceae* Mart. e *Euterpe precatórea* Mart.) no Estado do Acre. **Comunicado Técnico**, nº142, 2001, p1-5.

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

- FULEKI, T.; FRANCIS, F. J. Quantitative methods for Anthocyanins.2. Determination of total anthocyanin and degradation index for cranberries juices. **Journal of Food Science**, v. 33, p. 78-83, 1968b.
- GALLORI, S., BILIA, A. R.; BERGONZI, M. C., BARBOSA, W. L. R.; VINCIERI, F. F. Polyphenolic constituents of fruit pulp of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí palm). **Chromatographia**,v.59, n.11/12, p. 739-743, 2004.
- GALVANO, F.; FAUCI, L.; LAZZARINO, G.;FOGLIANO, V.; RIETIENI, A.; CIAPPELLANO, S.; BATTISTINI, N.C.; TAVAZZI, B.; GALVANO, G. Cyanidins: metabolism and biological properties. **Journal of National Biochemistry**, v. 15, p. 2-11, 2004.
- GIUSTI, M. M.; SAONA, R.E.L; BAGGET, J. R.; DRUST, R. W.; REED, G. L.; WROSLTAD, E. R. Anthocyanin pigment composition of red radish cultivasrs as potencia food colorants. **Journal Food Science**, v.63, p.219, 1998.
- GIUSTI, M. M.; SAONA, R.E.L; WROSLTAD, E. R. Molar Absorptivity and Color Characteristics of Acylated and Non- Acylated Pelargonidin-Based Anthocyanins. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 47, p.4631-4637, 1999.
- GIUSTI, M. M.;WROSLTAD, E. R. Anthocyanins: characterization and measurement by uv-visible spectroscopy. In: WROLSTAD, R.E. **Current protocols in food analytical chemistry**. New York: John Wiley & Sons. Unit. F1.2.1-13. 2001.
- GONNET, J. F. Colour effects of co-pigmentation of anthocyanins revisited-1. A colorimetric definition using the CIELAB scale. **Food Chemistry**, v. 63, n.3, p. 409-415, 1998.
- HABERT, A. C.; BORGES, C.; NOBREGA, R. **Processos de Separação com membranas**. E-papers, p.180, 2006.
- HARBONE, J.B.**The Flavonoids: Advances in research**. 1ªedição.London, Chapman & Hall p.1-19, 1994.
- HARBONE, J.B.; SAITO, N.; DETONI, C. H. Anthocyanins of *Cephaelis*, *Cynomorium*, *Euterpe*, *Lavadera* and Pinanga. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 8, p. 835-836, 1994.
- HARBONE, J.B. **Advances in flavonoid research since 1986**, 5ª edição, Champman & Hall:New York, , 1994.
- HARBONE, J.B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v.52, p.481-504, 2000.
- HOLLMAN, P. C. H; KATAN, M. B. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailably. **Food Chemistry Toxicological**, v. 37, n. 9/10, p. 937-9342, 1999.

HONG, V.; WROLSTAD, R.E. Characterization of anthocyanin containing colorants and fruit juices by HPLC/Photodiode array detection. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 38, p. 689-708, 1990.

IACOBUCCI, G. A.; SWEENEY, J. G. The chemistry of anthocyanins, anthocyanidins and related flavilium salts. **Tetrahedron Letters**, v.39, n. 19, p. 3005-30038, 1983.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas: Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos**. São Paulo, 1985.

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

JACKSON, R. Chemical constituents of grapes and wine. In: Wine Science. **Principles and Applications**. Food Science and Technology. 2^a.edição. London: Academic Press, 2000, p.243.

KAY, C. D.; MAZZA, G.; HOLUB, J. B. Anthocyanins Exist in the circulation as metabolites in adult men. **The Journal of Nutrition**, p.2582-2588, 2005.

KIM, S-J.; MAEDAT, T.; ZAIDUL; TAKIGAWA, S.; MATSUURA-ENDO, C.; YAMAUCHI, H.; MUKASA, Y.; SAITO, K.; HASHIMOTO, N.; TAKAHIRO, N.; SAITO, T.; SUSUKI, T. Identification of anthocyanins in the sprouts of buckwheat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, n. 15, p. 6314-6318, 2007.

KONG, J.-M., CHIA, L.-S., GOH, N.-K, CHIA, T.-F, BROUILLARD, R. Corrigendum to "Analysis and biological activities of anthocyanins". **Phytochemistry**, v. 69, p. 1039-1940, 2008.

KONG, J.-M., CHIA, L.-S., GOH, N.-K, CHIA, T.-F, BROUILLARD, R. Corrigendum to "Analysis and biological activities of anthocyanins". **Phytochemistry**, v.64, p. 923-93, 2003.

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

KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A. G.; MORALES, M. T.; FETT, R. Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Ciência Rural**, v. 36, n. 4, p. 1283-1287, 2006.

MAGALHÃES, M. P.; GOMES, F. S.; MODESTA, R. C. D.; MATTA, V. M.; CABRAL, L. M. C. Conservação da água de coco verde por filtração em membrana. **Ciência e Tecnologia Alimento**, v. 25, n. 1, p. 72-75, 2005.

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

- MARÇO, P. H.; POPPI, R. J. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas em extratos naturais. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1218-1223, 2008.
- MARTÍNEZ, F.; GONZÁLEZ, G. J.; CULEBRAS, J. M.; TUÑÓN, M. J. Los flavonóides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutrition Hosp**, v.17, n.6, p. 271-278, 2002.
- MATTA, V. M., MORETI, R. H.; CABRAL, L. M. C. Microfiltration and reverse osmosis for clarification and concentration of acerola juice **Journal of Food Engineering**, v. 61, p. 477-482, 2004.
- MAZZA, G., BROUILLARD, R. Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food-products. **Food Chemistry**, v. 25, n. 3, p. 207-225, 1987.
- MELO, M. J., ROQUE A., PINA F. "**Sistemas Fotocrômicos para Escrever-Ler-Apagar. Um futuro colorido para a Memória?**", *Química-Boletim da Sociedade Portuguesa de Química*, v.74, 1999, p. 41-50.
- MERIN, U.; DAUFIN, G. Crossflow microfiltration in the dairy industry state-of-the-art. **Lait**, v. 7, p. 281-291, 1990.
- MUDLER, M. **Basic Principles of Membrane Technology**. Springer, 1º ed., 1991.
- MÜLLER, A. A. (Ed.). **Açaí**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2005. p. 20-27. (Embrapa Amazônia Oriental. Sistema de Produção, v.4). Disponível em: Acesso em 18 março 2009.
- NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, p. 95-111, 2004.
- NIJVELDT, R. J.; VAN-NOOD, E.; VAN-HOORN, D. E.; BOELEN, P. G. VAN-NORREN, K., VAN-LEEUVEN, P. A. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **American Journal Clinical Nutrition**, v.74, n. 4, p. 418-425, 2001.
- NOGUEIRA, O. L.; FIQUEIRÊDO, F. J. C.; MÜLLER, A. A. **Sistemas de Produção**. Açaí. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, P.A, 2005, v. 4, p. 137.
- PACHECO, S. **Preparo de padrões analíticos, estudo de estabilidade e parâmetros de validação para ensaio de carotenóides por cromatografia líquida**. Rio de Janeiro, 2009, 106p. Dissertação (Mestre em Ciências), Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).
- PEREIRA, E. A.; QUEIROZ, A. J. de M.; FIQUEIREDO, R.M.de. Massa específica de polpa de açaí em função do teor de sólidos totais e da temperatura. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.6, n. 3, p. 526-530, 2002.

PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, Columbus, v.63,n.7, p.1035-1042, 2000.

PORTALMS. **Saúde: Açaí pasteurizado elimina risco de mal de Chagas**, Mato Grosso, PortalMS.com.br, 12 agost 2009. Disponível em < <http://www.portalms.com.br/noticias/Saude-Acai-pasteurizado-elimina-risco-de-mal-de-Chagas/Mato-Grosso-do-Sul/Saude/959557381.html>> Acesso em: 22 nov 2009.

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

RIJKE, E.; OUT, P.; NIESSEN, W. M. A.; ARIESE, F.; GOOIJER, C.; BRINKMAN, U.A.T. Analytical separation and detection methods for flavonoids. **Journal of chromatography A**. v.1112, p. 31-63, 2006.

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

ROGEZ, H. **Açaí: preparo, composição e melhoramento da conservação**. Belém: EDUFPA, 2000, p. 313.

ROSA, J. S. **Desenvolvimento de um método rápido para análise de vitamina C por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando coluna de troca iônica**. Rio de Janeiro, 2005, 92p. Dissertação (Mestre em Ciências), Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

SANTANA, A. C. Dinâmica espacial da produção rural do Estado do Pará: referências para o desenvolvimento sustentável. Série Acadêmica, v.2. Belém: UFRA, 2006.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Food Phenolics: sources, chemistry, effects and applications**. Lancaster: Technomic, 1995, 331 p.

SHENOY, V.R. Anthocyanins: Prospective food colours. **Current Science**, v .64, n. 8, 1993.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetric of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **Amerc. J. Enol Viti**, v.16, p.144-158, 1965

SILVA, M.G.C.P.C.; BARRETO, W. S.; SERÔDIO, M. H. Comparação nutricional da polpa dos frutos de juçara e de açaí. **Artigo Técnico**. Disponível em :<www.ceplac.gov.br/mapa.htm>. Acesso em: 17 maio 2009.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENCKEL, E. P.; MELLO J. C. P.; MENTZ L, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: **Da planta ao medicamento**. Editora UFSC: UFRGS, 1999.
SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Principles of instrumental analysis**. 6ª ed. Fort Worth: Saunders College Publishing, 1997. 849p.

SKREDE, G., WROLSTAD, R.E., DURST, R.W. Changes in Anthocyanins and Polyphenolics during juice processing of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). **Journal of Food Science**, v. 65, n. 2, p. 357-364, 2000.

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

STRACK, D. ; WRAY, V. Anthocyanins, In: "Methods in plant biochemistry". P.M Dey, J. B. Harborne (Eds.), **Academic Press**, New York, p. 325-356, 1989.

STRINGHETA, P.C.; BOBBIO, P.A. Copigmentação de Antocianinas. In: **Uso de corantes naturais em alimentos processados**. Disponível em: < www.biotecnologia.com.br/revista/bio14/copigment.pdf>. Acesso em: 12 jul.2009.

TERCI, D.B.L. **Aspéctos analíticos e didáticos de antocianinas extraídas de frutas**. Campinas, 2004, 223p. Tese (Doutora em Química Analítica), Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

TOURIÑOS, S.; FUGUET, E., VINARDELL, M. P., CASCANTE, M., TORRES, L. Phenolic Metabolites of Grape Antioxidant Dietary Fiber in Rat Urine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 30, n. 20, 2009.

VEITCH, N. C.; GRAYER, R. J. Flavonoids and their glycosides, including anthocyaninins. **Natural Product Reports**. v. 25, p. 555-611, 2008.

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

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

WILSKA, J.; KORZUCHOWSKA, A. Anthocyanins and chlorogenic acid copigmentation – influence on the colour of strawberry and chokeberry juices. **Lebensm Unters Forsch**, v. 203, p. 38-42, 1996.

WROLSTAD, R. E.; DRUST, W.; LEE, J. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. **Food Science & Technology**. v.16, p. 423-428, 2005.

WU, X.; PRIOR, R. L. Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common foods in the United States: fruits and berries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. V. 53, p. 2589-2599, 2005.

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

XAVIER, M. F. **Estudo da extração de antocianinas em colunas recheadas**, Dissertação de Mestrado, Departamento de Engenharia Química, UFSC, 2004.

ZHANG, Y; LIAO, X.; CHEN, F.; WU, J.; HU, X. Isolation, identification, and color characterization of cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-sophoroside from red raspberry. **European Food Research and Technology**, v. 223, p. 395-403, 2008.