

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

**DISSERTAÇÃO**

**Estudo de substâncias fenólicas da pele dos frutos liofilizados do  
Jamelão (*Syzygium Cumini* (L.) Skeels)**

**Nathália Leal Mendes**

**2018**



UFRRJ

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

**ESTUDO DE SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS DA PELE DOS  
FRUTOS LIOFILIZADOS DO JAMELÃO (*SYZYGIUM CUMINI* (L.)  
SKEELS)**

**NATHÁLIA LEAL MENDES**

*Sob a Orientação do Professor Doutor  
Ronoel Luiz de Oliveira Godoy  
e coorientadora*

**Ana Cristina Miranda Senna Gouvêa**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências e Tecnologia de Alimentos**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos.

Seropédica, RJ  
Setembro de 2018

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

**NATHÁLIA LEAL MENDES**

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 20/06/2018

-----  
Maria Ivone Martins Jacintho Barbosa, Profa. Dra.- UFRRJ  
Presidente da banca

-----  
Cristiane Hess de Azevedo Meleiro, Profa. Dra.- UFRRJ  
Membro

-----  
Flavia dos Santos Gomes, Pesquisadora Dra.- EMBRAPA  
Membro

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Mendes, Nathália Leal, 1988-  
M538e Estudo de substâncias fenólicas da pele dos  
frutos liofilizados do Jamelão (Syzygium Cumini (L.) Skeels)  
/ Nathália Leal Mendes. -  
2018. 78 f.: il.

Orientador: Ronoel Luis de Oliveira Godoy.  
Coorientadora: Ana Cristina Miranda Senna Gouvêa.  
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação  
em Ciências e Tecnologia de Alimentos, 2018.  
Bolsista CAPES.

1. Jamelão. 2. Antocianinas. 3. Flavonoides. 4. CLAE-  
DAD. 5. CLUE-EM. I. Godoy, Ronoel Luis de Oliveira, 1951-  
orient. II. Gouvêa, Ana Cristina Miranda Senna, 1960-  
coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de  
Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia  
de Alimentos. IV. Título.

À todos que já tiveram um momento de fraqueza.  
Não vai doer para sempre, então não deixe isso afetar o que há de melhor em você.

(Gabryella Cabral)

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, ao meu bom Deus que me permitiu chegar onde estou.

Aos meus queridos pais, Maria da Penha e Roberto, que mesmo na distância, nem sequer por um segundo, nunca deixaram de me encorajar a correr atrás dos meus sonhos. Obrigada por todo amor incondicional e por não deixarem que desistisse dos meus objetivos.

Aos meus irmãos Bruno e Leandro, que mesmo longe nunca deixaram de acreditar e de se preocupar comigo.

Ao meu companheiro Pedro, por todo apoio e amor que me dedicou durante essa caminhada e por inúmeras vezes que pensei que não conseguiria, me encorajou e me fortaleceu até que esse dia chegasse. Não tenho palavras para agradecer por tudo que têm feito por mim!

Ao meu orientador, Dr. Ronoel Godoy, e à minha coorientadora, Dra. Ana Cristina Gouvêa, pelos ensinamentos e pela paciência por todo esse tempo que passamos juntos. Muito obrigada!

À UFRRJ por ser a minha casa desde a minha graduação. Sou grata por tudo que passei aqui durante esses anos. Cheguei uma menina, que saiu do interior para estudar, e a Rural me tornou uma mulher. Me sinto feliz por ter me tornado uma eterna ruralina.

À EMBRAPA - Agroindústria de Alimentos por toda estrutura durante essa jornada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA) e à CAPES pelo apoio financeiro.

À Professora Cristiane Hess por aceitar participar da banca e por ter me passado um pouco da experiência de lecionar.

À Pesquisadora Flávia Gomes por também aceitar participar da banca e se deslocar de tão distante para me prestigiar com seus conhecimentos.

À minha companheira de laboratório Elaine Braga. Sem você com certeza não chegaria aqui! Obrigada por tudo que fez por mim na EMBRAPA, pelos conselhos, por passar inúmeros dias comigo e por ser essa pessoa iluminada que entrou em minha vida. Levarei nossa amizade para sempre, até que a “crosta terrestre” nos engula!

À Monalisa, que além de conselhos sábios, sei que ganhei uma amiga para poder contar. Muito obrigada por tudo, serei eternamente grata por tudo que fez por mim.

Ao pessoal da Planta 2 da EMBRAPA - Agroindústria de Alimentos, em especial à Carolina Beres e Érica, por ajudar neste trabalho.

Aos meus amigos de jornada, Jéssica, Giovana, Víctor, Lorena, Tatiane, Thiago, Karen, Tássia, Fernanda e Camila por todos os momentos que passamos juntos.

Ao pessoal da CLAE, Sidney Pacheco, Manuela Santiago, Renata Borguini, Lurdes e Luzimar, por todos os ensinamentos e conselhos que levarei para a minha vida.

À minha amiga e agora cunhada Celeste Rossi, minha eterna “mama”! Muito obrigada por ter me acolhido e aconselhado enquanto morávamos juntas. Sei que boa parte de tudo isso devo a você. Jamais me esquecerei do que fez (e ainda faz) por mim.

Aos meus amigos que fiz durante esse tempo, Ricardo, Priscila, Gilsonley, Iris, Weverton (nossa querido Fiona) e Alysson (Neginho), muito obrigada pelos momentos de prazer que vocês me proporcionaram com as nossas reuniões.

Às amigas e companheiras das disciplinas, em especial Livia, Vanessa (Vavá), Vanessa, Bárbara e Amanda, por todo suor derramado em objetivos comuns.

À todas as pessoas que mesmo não mencionada, não são de maneira nenhuma menos importante, que tenha me ajudado de alguma forma, com conselhos ou apenas por ter me escutado quando precisei. Meu muito obrigada por tudo!! Sei que sairei uma pessoa muito melhor depois desses anos, aprendi coisas que levarei para o resto da minha caminhada.

## RESUMO

MENDES, Nathália Leal. **Estudo de substâncias fenólicas da pele liofilizada dos frutos do Jamelão (*Syzygium Cumini* (L.) Skeels)**. 2018. 77p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

O jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) desperta interesse devido as suas propriedades benéficas, as quais geralmente estão ligadas à atividade antioxidante de compostos fenólicos presentes em sua composição, as antocianinas e os flavonoides. O objetivo deste estudo foi determinar o perfil das antocianinas presentes no pó da pele liofilizada do fruto do jamelão por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjos de Diodos (CLAE-DAD) e identificar outros flavonoides por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas-Quadrupolo- Tempo de Voo (CLUE-QTOF-EM/EM). A partir da pele liofilizada do fruto, foram elaborados três extratos diferentes: a fração de flavonoides não-antôcianos, para separação por CLAE-DAD e indicação dos flavonoides não-antôcianos por CLUE-EM/EM; o extrato antociânico, para o isolamento das antocianinas com uso do cartucho de troca-catiônica e identificação das antocianinas presentes por CLAE-DAD e o extrato metanólico, elaborado como comparativo ao extrato antociânico, para determinar a contribuição das antocianinas em relação as capacidades antioxidantes pelos métodos TEAC e ORAC. A indicação dos flavonoides ocorreu a partir do extrato de flavonoides não-antôcianos. O potencial antioxidante pelas técnicas de TEAC e ORAC, e a quantificação dos compostos fenólicos totais foi determinada nos extratos antociânico e metanólico dos anos de 2017 e 2018. A avaliação da estabilidade das antocianinas foram feitas nos mesmo extratos (antociânico e metanólico), porém somente do ano 2017. Os flavonóides indicados por comparação dos fragmentos de massa obtidos com espectros de massas da literatura foram: miricetina-3-*O*-galactosídeo, miricetina-3-*O*-glicosídeo, mirecetina-3-*O*-pentose, miricetina-3-*O*-ramnose, siringetina-3-*O*-galactosídeo, siringetina-3-*O*-glicosídeo, laricitrina-3-*O*-glucoronídeo e querceitina-3-*O*-hexose,. Os dois últimos foram indicados pela primeira vez na pele desse fruto. Identificadas as antocianinas: delphinidina-3,5-*O*-diglicósídeo, cianidina-3,5-*O*- diglicosídeo, petunidina-3,5-*O*-diglicosídeo, malvidina-3,5-*O*-diglicosídeo. A antocianina majoritária foi a petunidina-3,5-*O*-diglicosídeo. A capacidade antioxidante por TEAC, para o ano de 2017 a contribuição de antocianinas ambos em relação ao extrato metanólico foi de 18% e 5,0% para o ano de 2018. Na capacidade antioxidante por TEAC nos extratos metanólicos, as contribuições das antocianinas foram de 18% e 5% nos anos de 2017 e 2018, respectivamente. Para a análise de ORAC no extrato metanólico foram encontrados 29,5% para o ano de 2017, e 22,3% para o ano de 2018. Na análise comparativa de fenólicos totais nos extratos metanólico e antociânico no ano de 2017 a contribuição das antocianinas foi de 9,89%. E para o ano de 2018 a contribuição das antocianinas foi de 5,6%. A estabilidade das antocianinas totais e monoméricas do extrato metanólico no período de 0 a 60 dias não variou significamente (dia (0) 4,24 mg.100g<sup>-1</sup> e dia (60) 4,50 mg.100g<sup>-1</sup>) e (dia (0) 3,96 mg.100g<sup>-1</sup> e dia (60) 4,34 mg.100g<sup>-1</sup>), respectivamente. No extrato antociânico ocorreu uma pequena variação apenas no período de 0 a 15 dias. Para antocianinas totais (dia (0) 2,27 mg.100g<sup>-1</sup> e dia (15) 1,73 mg.100g<sup>-1</sup>) , 15 e 60 dias não teve diferença, 1,73 mg.100g<sup>-1</sup> e 1,69 mg.100g<sup>-1</sup>, respectivamente. Para antocianinas monoméricas, dia (0) 2,20 mg.100g<sup>-1</sup> e dia (15) 1,66 mg.100g<sup>-1</sup>) e de 15 a 60 dias não teve diferença (1,66 mg.100g<sup>-1</sup>) e (1,62 mg.100g<sup>-1</sup>), respectivamente. O jamelão apesar de considerado um fruto não comercial, demonstrou ser uma fonte importante de compostos fenólicos (antocianinas e flavonoides).

**Palavras-chave:** Jamelão, antocianinas, flavonoides, CLAE-DAD, CLUE-EM

## ABSTRACT

MENDES, Nathália Leal. **Study of phenolic substances of the freeze-dried skin of Jamelão fruits (*Syzygium Cumini* (L.) Skeels)**. 2018. 77p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

The jamelão (*Syzygium cumini* (L) Skeels) arouses interest due to its beneficial properties, which are generally linked to the antioxidant activity of phenolic compounds present in its composition, anthocyanins and flavonoids. The objective of this study was to determine the anthocyanins profile in the lyophilized skin powder of the jamelão fruit by High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector (HPLC-DAD) and to identify other flavonoids by Ultra Performance Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry-Quadrupole-Time of Flight (UPLC-QTOF-MS/MS). From the freeze-dried skin of the fruit, three different extracts were prepared: the fraction of non-anthocyanic flavonoids for separation by HPLC-DAD and indication of non- anthocyanic flavonoids by UPLC-EM/MS, the anthocyanin extract for the isolation of anthocyanins with the use of the cationic exchange cartridge and identification of the anthocyanins present by HPLC-DAD and the methanolic extract, elaborated as comparative to the anthocyanic extract, to determine the contribution of the anthocyanins in relation to the antioxidant capacities by the TEAC methods and ORAC. The indication of flavonoids occurred from the extract of non-antomonic flavonoids. The antioxidant potential through the TEAC and ORAC techniques and the quantification of the total phenolic compounds was determined in the anthocyanic and methanolic extracts of the years 2017 and 2018. The evaluation of the stability of the anthocyanins was done in the same extracts (anthocyanic and methanolic), but only of the year 2017. The flavonoids indicated by comparison of the mass fragments obtained with mass spectra of the literature were: myricetin-3-*O*-galactoside, myricetin-3-*O*-glicoside, myricetin-3-*O*-pentose, myricetin-3-*O*-rhamnose, syringetin-3-*O*-galactoside, syringetin-3-*O*-glicoside, laricitrin-3-*O*-glucoronide e quercetin-3-*O*-hexose. The last two were indicated for the first time on the skin of this fruit. The identified anthocyanins were: delphinidin-3,5-*O*-diglycoside, cyanidin-3,5-*O*-diglycoside, petunidine-3,5-*O*-diglycoside, malvidine-3,5-*O*-diglycoside. The major anthocyanin was petunidine-3,5-*O*-diglycoside. In the antioxidant capacity by TEAC in the methanolic extract, anthocyanins contributions were 18% and 5% in the years of 2017 and 2018, respectively. In the comparative analysis of total phenolics in the methanolic and anthocyanic extracts in 2017 the anthocyanins contribution was 9.89%. And for the year 2018 the contribution of the anthocyanins was 5.6%. The stability of the total and monomeric anthocyanins of the methanolic extract in the period from 0 to 60 days did not change significantly (day (0) 4.24 mg.100g<sup>-1</sup> and day (60) 4.50 mg.100g<sup>-1</sup>) and (day (0) 3.96 mg.100g<sup>-1</sup> and day (60) 4.34 mg.100g<sup>-1</sup>), respectively. In the anthocyanic extract, a small variation occurred only in the period of 0 to 15 days. For total anthocyanins (day (0) 2.27 mg.100g<sup>-1</sup> and day (15) 1.73 mg.100g<sup>-1</sup>), 15 and 60 days had no difference, 1.73 mg.100g<sup>-1</sup> and 1, 69 mg.100g<sup>-1</sup>, respectively. For monomeric anthocyanins, day (0) 2.20 mg.100g<sup>-1</sup> and day (15) 1.66 mg.100g<sup>-1</sup> and from 15 to 60 days there was no difference (1.66 mg.100g<sup>-1</sup>) and (1.62 mg.100g<sup>-1</sup>), respectively. Jamelão, although considered a non-commercial fruit, has been shown to be an important source of phenolic compounds (anthocyanins and flavonoids).

**Key words:** Jamelão, anthocyanins, flavonoids, HPLC-DAD, UPLC-E

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição centesimal de nutrientes do jamelão ( <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels), por 100 g de polpa (TACO, 2011).....	06
Tabela 2. Os flavonoides quercitina, miricetina, laricitrina e sirigenina e suas principais fontes.....	11
Tabela 3. Antocianinas identificadas e suas respectivas fontes.....	13
Tabela 4. Gradiente utilizado para obtenção do extrato do pó da pele do fruto de jamelão ( <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels).....	29
Tabela 5. Gradiente utilizado para a identificação dos flavonoides presentes no extrato de flavonóides não-antociânicos do jamelão ( <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels).....	30
Tabela 6. Gradiente de concentração de acetonitrila e tempo de corrida no CLAE-DAD para identificação de antocianinas da pele do fruto de jamelão ( <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels).....	30
Tabela 7. Valores dos pH dos extratos metanólico e antociânico da pele do fruto de jamelão liofilizada ( <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels).....	34
Tabela 8. Valores da umidade dos extratos metanólico e antociânico da pele do fruto de jamelão liofilizada ( <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels).....	34
Tabela 9. Flavonoides encontrados na pele do fruto de jamelão ( <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels).....	37
Tabela 10. Médias dos valores de capacidade antioxidantes encontradas no pó da pele do jamelão ( <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels) pelos métodos ABTS (2,2'-azinobis-3-etil-benzotiazolína-6-ácido sulfônico) e ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity).....	44
Tabela 11. Médias dos valores de fenólicos totais encontradas no pó da pele do jamelão liofilizada ( <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels).....	46
Tabela 12. Resultados estabilidade das antocianinas pelo método do pH diferencial.....	48

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1A. Árvore do Jamelão <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeel.....	03
Figura 1B. Folhas, frutos e flores do Jamelão <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeel .....	04
Figura 2. Precipitação total e temperatura média nos meses de floração do <i>Syzygium Cumini</i> (L.) Skeels dos anos de 2016 e 2017. Valores sobre as barras correspondem à radiação solar média mensal, medida em W.m <sup>-2</sup> (INMET, 2018;CPTEC/INPE, 2018) .....	04
Figura 3. Precipitação total e temperatura média nos meses de floração do <i>Syzygium Cumini</i> (L.) Skeels dos anos de 2016 e 2017. Valores sobre as barras correspondem à radiação solar média mensal, medida em W.m <sup>-2</sup> . Fonte: INMET, 2018; CPTEC/INPE, 2018.....	05
Figura 4. Ciclo biossintético dos metabólitos secundários (SIMÕES, 2007).....	07
Figura 5. Ácidos fenólicos derivados dos ácidos benzoico e cinâmico (BRAGA, 2016).....	08
Figura 6. Estrutura básica de um flavonoide (BEHLING et al., 2004).....	09
Figura 7. Flavonoides mais comumente encontrados nos alimentos .....	10
Figura 8. Estrutura química da laricitrina (FLAMINI, 2012).....	10
Figura 9. Estrutura química da miricetina (BARBOSA et al., 2006).....	11
Figura 10. Estrutura química da quercitina (SIMÕES et al., 2013).....	11
Figura 11. Estrutura química básica das antocianinas.....	12
Figura 12. Estruturas das antocianinas em equilíbrio em solução aquosa (XAVIER, 2004)...	14
Figura 13. Diagrama de um Cromatógrafo Líquido (SANTIAGO, 2014).....	17
Figura 14. Esquema do funcionamento de um detector de arranjos de diodos (DAD). 1) Arranjo de diodos; 2) Grade; 3) Fenda óptica; 4) Célula de fluxo do detector; 5) filtro de hólmio; 6) Lente acromática; 7) Lâmpada UV; 8) Lâmpada Visível (CHROMACADEMY, 2017).....	19
Figura 15. Esquema dos principais componentes de um espectrômetro de massas (LANÇAS, 2009).....	19
Figura 16. Esquema do processo de electrospray (LANÇAS, 2009).....	21
Figura 17. Estabilização do radical ABTS•+, por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio (RUFINO et al,2007).....	22
Figura 18. Estrutura química da fluoresceína (ALVES et al ,2010).....	23
Figura 19. a) Liofilizador L101 LIOTOP (Sidney Pacheco - acervo EMBRAPA - Alimentos); b) pó da pele dos frutos do jamelão ( <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels) liofilizado (Ana Gouvêa - acervo EMBRAPA Alimentos).....	25
Figura 20: Fluxograma de elaboração do extrato de flavonóides não-antociânico.....	26
Figura 21: Fluxograma de isolamento das antocianinas com uso do cartucho Oasis® MCX Cartridge Waters.....	27
Figura 22: Fluxograma do processo de elaboração de extrato metanólico.....	28
Figura 23: Fluxograma do processo de elaboração do extrato de flavonoides não- antociânico para a indicação em CLUE-EM/EM.....	30
Figura 24. Cromatogramas dos pós da pele de jamelão extraídos em Max-Plot. A) Ano de 2017 e; B) ano de 2018. A marcação em vermelho corresponde ao tempo de corrida que foram coletadas.....	35
Figura 25. Fatores que influenciam na produção dos metabólitos secundários das plantas Fonte: Gobbo-Neto e Lopes (2006).....	36
Figura 26. Cromatograma da fração isolada de flavonoides não-antociânicos por CLUE-EM.....	37

Figura 27. Cromatograma dos íon totais da fração com seleção dos íons m/z 319. Números sobre os picos correspondem aos picos da Tabela 9.....	37
Figura 28A. Espectros de massas dos flavonoides presentes do pó da pele liofilizada de <i>S. cumini</i> . .....	39
Figura 28B. Espectros de massas dos flavonoides presentes do pó da pele liofilizada de <i>S. cumini</i> . .....	40
Figura 29. Cromatograma das antocianinas do extrato de pó da pele do fruto de jamelão liofilizado a 520nm. Picos identificados. Pico 1: Delfinidina-3,5- <i>O</i> - diglicosilada; Pico 2- Cianidina-3,5- <i>O</i> - diglicosilada; Pico 3- Petunidina-3,5- <i>O</i> - diglicosilada; Pico 4- Malvidina-3,5- <i>O</i> - diglicosilada. AU: Unidade de absorvância.....	42
Figura 30. Esquema da estrutura química do sorbente MCX e a molécula de antocianina em diferentes pH. Fonte: He e Giusti, (2011).....	43
Figura 31. Gráfico correspondentes aos potenciais antioxidantes pelos métodos de ABTS e ORAC dos extratos metanólico e antociânico do pó liofilizado da pele de jamelão ( <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels) do ano de 2017.....	46
Figura 32. Gráficos correspondentes a contribuição das antocianinas em porcentagem do total de fenólicos dos anos de 2017 e 2018 da pele do jamelão liofilizada ( <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels), em relação ao extrato metanólico.....	47
Figura 33. Gráfico correspondentes a estabilidade das antocianinas dos extratos metanólico e antociânico do pó liofilizado da pele de jamelão ( <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels) do ano de 2017.....	49

## LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Concentração de fenólicos totais.....	31
Equação 2. Leitura de absorvância no respectivo comprimento de onda (totais).....	32
Equação 3. Concentração de antocianinas totais ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ).....	32
Equação 4. Leitura de absorvância no respectivo comprimento de onda (monoméricas).....	33
Equação 5. Concentração de antocianinas monoméricas ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ).....	33

## LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

°C - graus Celsius  
μ - micro  
AAPH Dicloridrato de 2,2, azobis (2-metilpropionamida)  
Abs - Absorbância  
ABTS - 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)  
ACN – Acetonitrila  
AGE - ácido gálico equivalente  
AM - antocianinas monoméricas  
C18 - Fase estacionária reversa octadecilsílica  
CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência  
DAD - arranjo de fotodiodo  
EM - espectrometria de massas  
ESI – Eletronspray  
FT - fenólicos totais  
M – Molar  
m/m - massa por massa  
*m/z* - Relação massa carga  
nm - nanômetro  
OH – hidroxila  
ORAC - Oxygen Radical Antioxidant Capacity  
pH – potencial hidrogeniônico  
QTOF – Detectores: Quadrupolo + Tempo de Voo  
rpm - rotações por minuto  
sp – Espécie ( uma espécie no gênero)  
TOF – Detector de massas de tempo de voo  
*t<sub>R</sub>* - tempo de retenção  
UV – Espectro de absorção na região ultra violeta  
UV-Vis - ultravioleta e visível  
v/v - volume por volume  
W - watts  
ε – Absortividade Molar  
μL - Unidade de volume: microlitros (10<sup>-6</sup> L)  
μm -Unidade de medida: micrometros, 1 milionésimo de metro (10<sup>-6</sup> m)  
psi -Unidade de pressão libra força por polegada quadrada

## SUMÁRIO

ABSTRACT .....	viii
LISTA DE TABELAS .....	ix
LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS .....	xiii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS .....	2
2.1. Objetivo geral .....	2
2.1. Objetivos específicos .....	2
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
3.1. Jamelão .....	3
3.2. Compostos fenólicos .....	6
3.2.1. Quantificação de compostos fenólicos totais .....	8
3.2.2. Fenólicos Totais (Folin- Ciocalteau) .....	8
3.2.3. Flavonoides .....	9
3.2.4. Flavonoides não-antôcianos .....	10
3.2.5. Antocianinas .....	12
3.3. Liofilização .....	15
3.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .....	16
3.4.1. Fase móvel .....	17
3.4.2. Fase estacionária .....	18
3.4.3. Detector de Arranjos de Diodos (DAD) .....	18
3.5. Espectrometria de Massas .....	19
3.5.1. Cromatografia Líquida acoplada à espectrometria de massas .....	20
3.6. Potencial antioxidante .....	22
3.6.1. TEAC (capacidade antioxidante total equivalente ao Trolox) .....	22
3.6.2. ORAC – “Oxygen Radical Absorbance Capacity” .....	22
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	24
4.1. Material .....	24
4.1.1. Matéria-prima e caracterização da coleta .....	24
4.1.2. Solventes e Reagentes .....	24
4.1.3. Equipamentos .....	24
4.2. Métodos .....	25
4.2.1. Obtenção da pele do jamelão .....	25
4.2.2. Obtenção do pó da pele de jamelão liofilizada .....	25
4.3. Obtenção dos extratos .....	25
4.3.1. Obtenção do extrato de flavonoides não-antocianino .....	26

4.3.2. Obtenção do extrato antociânico .....	27
4.3.3. Obtenção do Extrato Metanólico.....	27
4.4. Análises.....	28
4.4.1. Umidade do pó da pele do fruto do jamelão liofilizado.....	28
4.4.2. Separação da fração de interesse do extrato de flavonoides não-antociânico por CLAE-DAD .....	28
4.4.3. Indicação dos flavonoides não-antociânico do extrato de flavonoides não-antociânico por CLUE-MS/MS.....	29
4.4.4. Determinação das antocianinas do extrato antociânico por CLAE-DAD.....	30
4.5. Quantificação dos compostos fenólicos totais (método Folin-Ciocalteu).....	30
4.6. Capacidade antioxidante .....	31
4.6.1. Método TEAC- Capacidade antioxidante Trolox equivalente.....	31
4.6.2. Método ORAC- “Oxygen Radical Absorbance Capacity” .....	32
4.7. Estabilidade de antocianinas (método pH diferencial) .....	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	34
5.1. Pó da pele do jamelão liofilizada: Caracterização química do pó e dos extratos .....	34
5.2. Cromatograma da fração de flavonoides não-antociânicos por CLAE-DAD .....	34
5.3. Indicação dos flavonoides não-antociânico por CLUE-EM/EM.....	36
5.4. Identificação das antocianinas por CLAE-DAD.....	41
5.5. Potencial antioxidante pelos métodos TEAC (Capacidade antioxidante Trolox equivalente) e ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) .....	43
5.6. Quantificação dos Fenólicos totais pelo método Folin-Ciocalteu.....	46
5.7. Antocianinas Totais e Monoméricas pelo método do pH diferencial - Estabilidade.....	47
6. CONCLUSÃO.....	50
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	51
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	52
8 APÊNDICE .....	63
8.1. Apêndice A1 .....	63
8.2. Apêndice A2 .....	63
8.3. Apêndice A3 .....	64

## 1. INTRODUÇÃO

Segundo os últimos dados do Instituto Brasileiro de Estatísticas- IBGE do ano de 2015, a expectativa de vida dos brasileiros aumentou aproximadamente 40 anos nas últimas onze décadas. Em consequência deste aumento expressivo, ocorreu também mudança nos tipos de enfermidades que atingem a população, como obesidade, câncer e problemas cardiovasculares, males que estão relacionados com os hábitos alimentares adquiridos, que estão mais frequentes nesse século. Assim, as pessoas buscaram consumir alimentos que proporcionam melhores qualidade de vida. E estudos sugerem que consumir alimentos que são ricos em antioxidantes, podem prevenir os riscos dessas doenças.

E as frutas são conhecidas por serem fontes naturais de antioxidantes, como o romã, uva, jaboticaba, morango, amora e jambo. E no laboratório de Cromatografia líquida de Alta Eficiência da EMBRAPA já se trabalhou com o fruto do jamelão, onde os trabalhos foram executados usando as peles do fruto do jamelão, porém, a sua secagem foi por outros métodos, como a secagem convectiva, onde surgiu a ideia de se trabalhar com as peles desse fruto, porém a secagem seria pelo método de liofilização.

Um dado importante sobre esse fruto é que ela está inserida na Relação Internacional de plantas medicinais de interesse ao SUS- Sistema Único de Saúde, chamada de RENISUS, onde o Ministério da Saúde mantém atualmente uma listagem de 71 espécies de interesse que possuem potencial medicinal, o jamelão ocupa a 64ª posição, para elaboração de produtos de interesse no Ministério da Saúde mostrando que o interesse pelo fruto têm aumentado nos últimos anos.

E a atividade antioxidante já foram estudadas anteriormente, é citada como decorrência da presença de compostos fenólicos, como as antocianinas e os flavonóides. Com o uso da cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE-DAD- e da Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a espectrometria de massas por tempo de voo - CLUE-QTOF-EM-EM- possibilita o isolamento e identificação desses compostos tornando seus estudos mais eficientes, em um período menor de tempo, com maior tecnologia e maior sensibilidade.

O jamelão é uma fruta que dispõe de alta produtividade e potencialidade para o cultivo no Brasil, assim com o crescente interesse por fontes potenciais de antioxidantes, que geram benefícios à saúde, faz-se necessário o estudo mais aprofundado de seus compostos que podem gerar esses privilégios a partir de seu consumo.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Determinar o perfil das antocianinas presentes no pó da pele liofilizado do jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) por CLAE-DAD e identificar outros flavonoides por CLUE-QTOF-EM-EM.

### 2.1. Objetivos específicos

- ✓ Extrair flavonoides não-antôcianos;
- ✓ Separar os flavonoides da fração de flavonoides não-antôcianos por CLAE-DAD;
- ✓ Indicar os flavonoides da fração de flavonoides não-antôcianos por CLUE-EM-EM;
- ✓ Isolar as antocianinas (extrato antociânico) presentes na pele do fruto de jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) com uso do cartucho de troca catiônica - Oasis® MCX Cartridge Waters;
- ✓ Determinar as antocianinas por CLAE-DAD presentes extrato antociânico;
- ✓ Avaliar a contribuição das antocianinas na capacidade antioxidante pelos métodos ABTS e ORAC dos extratos antociânico e metanólico, das coletas dos anos de 2017 e 2018.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Jamelão

A família Myrtaceae engloba cerca de 100 gêneros e 3.500 espécies de árvores e arbustos que se distribuem por todos os continentes, com exceção da Antártica, mas sua predominância é nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (BARROSO, 1991; MARCHIORI; SOBRAL, 1997).

A predominância da maioria das espécies de Myrtaceae ocorre no Brasil produzem frutos no geral carnosos, rico em água e carboidratos, e pobre em proteínas e lipídeos (LANDRUM; KAWASAKI, 1997; PIZO, 2002). A cor dos frutos quando maduros varia de preto, vermelho, amarelo, laranja, cinza e verde, com predomínio da primeira (PIZO, 2002).

A espécie *Syzygium cumini* (L.) Skeels, é uma Myrtacea de nomes populares como jamelão, jalão, kambol, azeitona-do-nordeste, ameixa roxa, murta, baga de freira, guapê, jambuí, azeitona-da-terra, entre muitos outros nomes, podendo ser encontrada em quase todo o país (VIZZOTO et al, 2009). A árvore é perenifólia de copa frondosa e densa, chegam a ter de 15 a 20 metros de altura (RUFINO, 2008) (Figura 1A). De folhas simples, coriáceas, glabras, aromáticas, lustrosas, medindo entre 8 a 14 cm de comprimento, com a nervura principal destacada e o pecíolo de 1 a 3 cm, suas flores que são dominadas pelos estames de coloração branca a creme que estão dispostas em grandes quantidades em ramos axilares ramificados (AYYANAR e SUBASH-BABU, 2012) (Figura 1B).



**Figura 1A.** Árvore do Jamelão *Syzygium cumini* (L.) Skeel. **Fonte:** <http://www.centraldojardim.com/mudas-de-jamelao-gigante-da-india-jambolao-frutifera-muda-91747817-x-jm>



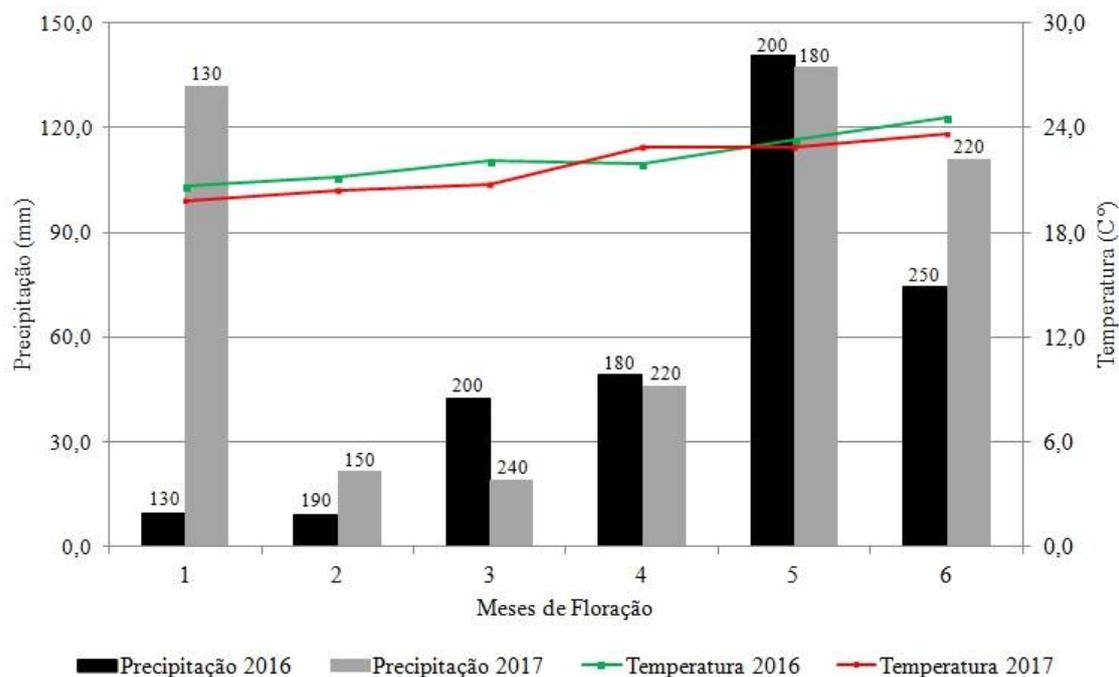
**Figura 1B.** Folhas, frutos e flores do Jamelão *Syzygium cumini* (L.) Skeel. **Fonte:** Sidney Pacheco

Seus frutos são carnosos do tipo baga, elípticos, apresentando de 3,0 a 4,0 cm de comprimento, e 2,0 cm de diâmetro, de pericarpo com coloração roxa escura intensa, e apresenta apenas uma semente (Figura 2). O mesocarpo é carnosos, sabor adstringente e adocicado (MORTON, 1987; ROSS, 1999; OLIVEIRA; AKISUE, 2000; ALBERTON et al., 2001).



**Figura 2.** Fruto do jamelão *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Fonte:** Sidney Pacheco

A frutificação ocorre no período de janeiro a março (LORENZI et al., 2015). Na Figura 3, estão representados os dados climáticos (precipitação, temperatura e radiação solar) de junho a dezembro dos anos de 2016 e 2017, abrangendo o período de floração e formação dos frutos da espécie (LORENZI et al., 2015).



**Figura 3.** Precipitação total e temperatura média nos meses de floração do *Syzygium Cumini* (L.) Skeels dos anos de 2016 e 2017. Valores sobre as barras correspondem à radiação solar média mensal, medida em  $W \cdot m^{-2}$ . **Fonte:** INMET, 2018; CPTEC/INPE, 2018.

A coloração inicial é verde, e torna-se vermelha ao longo da sua maturação chegando a preta, quando o ponto de maturação é máximo (VIZZOTO et al., 2009). Crescem preferencialmente em climas quentes e úmidos, é uma árvore rústica (SOUSA, 2012). Os frutos podem ser encontrados nas formas de vinhos, licores e doces além do seu consumo *in natura* (VIZZOTTO; FETTER, 2009).

As propriedades medicinais do jamelão, já estudadas, em sua maior parte, são relacionadas à atividade antioxidante, que é citada como decorrência da presença de compostos fenólicos já previamente identificados, como os flavonoides e antocianinas (SEVERO et al., 2010).

O fruto do jamelão apresenta em sua polpa, em torno de 88% de água, 0,34% de cinzas, 0,30% de lipídeos, 0,67% proteínas, 10,7% de carboidratos totais, 1% de açúcares redutores, 0,28% de fibra alimentar, 9,0° Brix e pH de 3,9 e 5,91% de acidez (ácido cítrico), segundo estudo feito por Vizzoto et al. (2009). E menciona também que o principal mineral encontrado nesta fruta é o fósforo e a vitamina em maior abundância é a C (VIZZOTO et al., 2009). Na Tabela 1 segue a composição centesimal de nutrientes do jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels), segundo a TACO, (2011).

**Tabela 1.** Composição centesimal de nutrientes do jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels), por 100 g de polpa

<b>Constituinte</b>	<b>Teor</b>
Umidade (%)	87,7
Energia (kcal)	41,0
Proteína (g)	0,5
Lipídeos (g)	0,1
Carboidrato (g)	10,6
Fibra Alimentar (g)	1,8
Cinzas (g)	1,0
Cálcio (mg)	3,0

Fonte: TACO, 2011

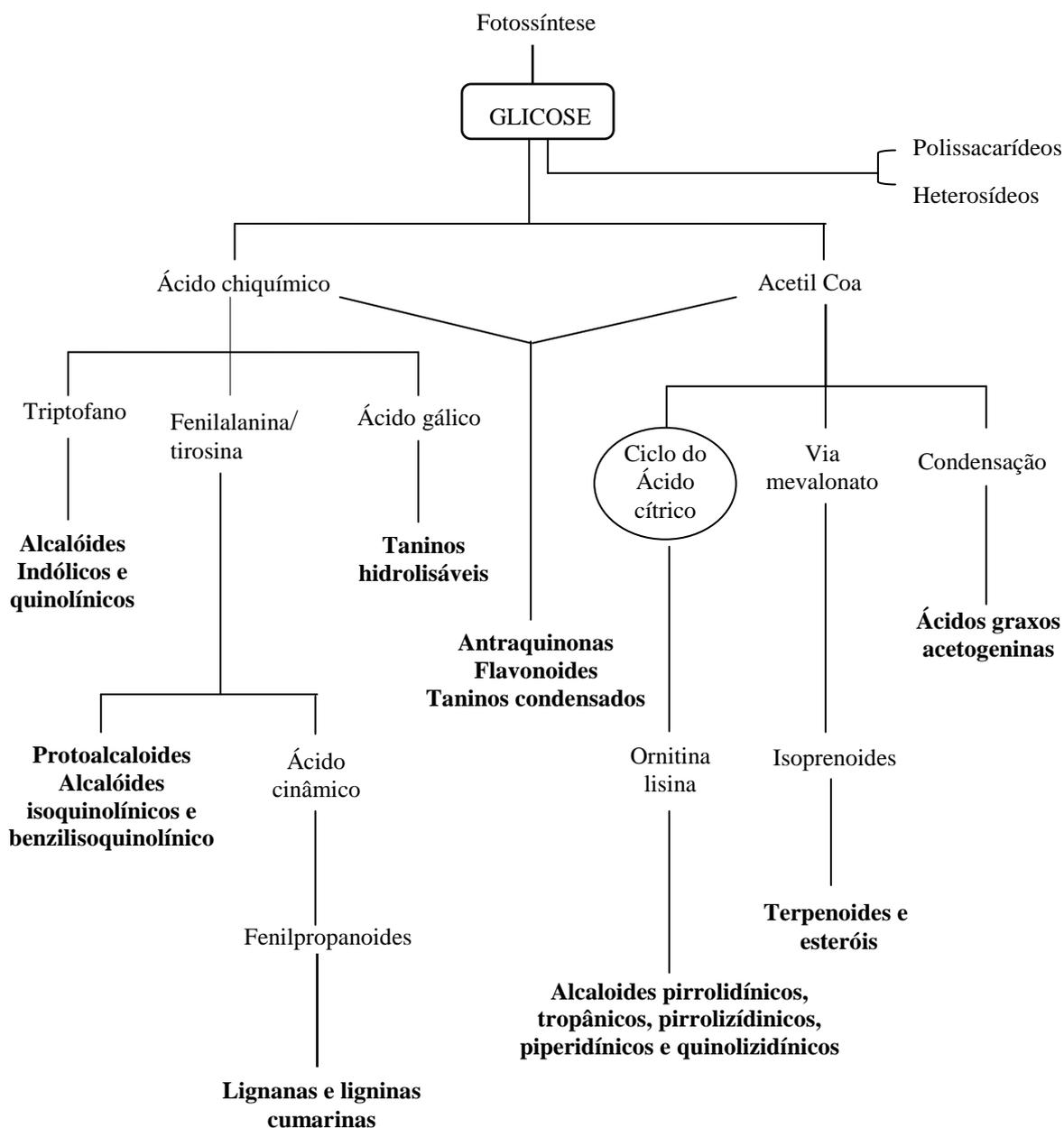
### 3.2. Compostos fenólicos

Os alimentos de origem vegetal são largamente estudados por serem fontes de energia, proteínas, fibras, compostos fenólicos e vitamina C, das quais o metabolismo humano necessita (OLIVEIRA, 2015).

Estudos feitos com o fruto do jamelão mostram elevados níveis de compostos fenólicos, como o estudo de Araújo (2014), onde estudou o jamelão e encontrou teores de 468,6 a 534,0 mgGAE.100<sup>-1</sup> g bs na sua polpa liofilizada em leito de jorro, e teores de antocianinas de 491,9 a 673 mg cianidina-3-glicosídeo.100<sup>-1</sup>g bs. E Rufino et al (2010), em estudos de extratos de frutas, encontrou para o extrato de jamelão 185,0 mg GAE. 100<sup>-1</sup>g e para antocianinas encontrou 93,3 mg.100<sup>-1</sup>g de matéria fresca.

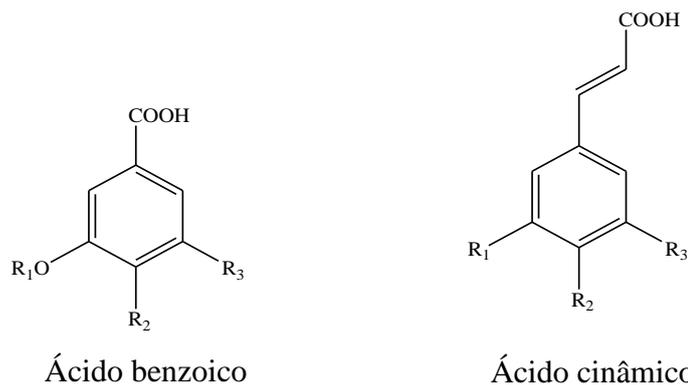
As substâncias fenólicas são encontradas também em vegetais, frutas, legumes e grãos, e são consumidos no nosso dia a dia (VIZZOTO et al. 2010). Esses compostos são oriundos do metabolismo secundários das plantas, são geralmente de estrutura complexa e de baixo peso molecular, que possuem atividades biológicas, diferentes dos metabólitos primários, estão presentes nas plantas em baixas concentrações. Os metabólitos secundários são essenciais para o crescimento e reprodução das plantas (ANGELO E JORGE, 2007; NACZK E SHAHIDI, 2004; OLIVEIRA, 2015) e apresentam função: estrutural nos tecidos, proteção, defesa, sinalização, interações entre plantas e sensorial (TAIZ & ZEIGER, 2004; ARAÚJO, 2014).

A origem biosintética dos compostos bioativos é proveniente de duas rotas,: a via do ácido chiquímico e a via de acetato-malato (malanoil CoA e acetil CoA), (Figura 4) (SANTOS, 1999; LEE et al., 2005).



**Figura 4.** Ciclo biossintético dos metabólitos secundários. **Fonte:** Simões, 2007

Os metabólitos secundários são formados geralmente em condições de estresse como, ferimentos, infecções e excesso de radiação. Nos alimentos os compostos fenólicos contribuem com o aroma, cor e adstringência (ÂNGELO e JORGE, 2007). Na Figura 5 estão representados alguns ácidos fenólicos, oriundo dos metabólitos secundários, que são derivados dos ácidos benzoico e cinâmico.



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>		R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Ácido Gálico	H	OH	OH	Ácido p-cumárico	H	OH	H
Ácido Vanílico	CH <sub>3</sub>	OH	H	Ácido Caféico	OH	OH	H
Ácido Siríngico	CH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	Ácido Ferúlico	OCH <sub>3</sub>	OH	H
				Ácido Sinápico	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>

**Figura 5.** Ácidos fenólicos derivados dos ácidos benzoico e cinâmico. **Fonte:** Braga, 2016.

De acordo com Severo et al. (2009), dentre os metabólitos secundários presentes na natureza, os compostos fenólicos se destacam pelo seu potencial antioxidante. São fontes de compostos fenólicos as frutas cítricas, como laranja e limão, uva, cereja, ameixa, tangerinas e maçã entre outras fontes. Esses compostos são comumente encontrados em maiores quantidades na polpa das frutas, do que no suco delas (PIMENTEL et al, 2005). E as concentrações desses compostos em frutas podem variar de acordo com a espécie e variedade (BEZERRA, 2015).

### 3.2.1. Quantificação de compostos fenólicos totais

Compostos fenólicos possuem alto potencial antioxidante, tem facilidade em formar complexos com íons metálicos e/ou causar a inativação de espécies reativas como os radicais livres (GARCIA, 2016). O jamelão se destaca como antioxidante, com benefícios medicinais, que são oriundos da presença de compostos fenólicos, como a miricetina e quercitina. E as antocianinas como a delphinidina-3-*O*-glicosídeo, malvinidina-3-*O*-glicosídeo e a petunidina-3-*O*-glicosídeo (AMERICO, 2014; FARIA et al., 2011; LIMA et al., 2007).

### 3.2.2. Fenólicos Totais (Folin- Ciocalteu)

O método de Folin-Ciocalteu é o método mais antigo empregado na medição dos compostos fenólicos totais em uma amostra. Inicialmente foi desenvolvido por Singleton e parceria no ano de 1965, porém somente em 1999 que esse método foi padronizado para uso de fenólicos totais (TOMEI E SALVADOR, 2009). Entre os métodos colorimétricos, o método de Folin-Ciocalteu é o mais reconhecido e largamente usado, porém esse método não faz distinção entre compostos fenólicos e outros compostos redutores ou antioxidantes formando precipitados que interferem na leitura espectrofotométrica (SCHOFIELD et al., 2001). O método Folin-Denis foi aperfeiçoado e modificado para método de Folin-Ciocalteu (FOLIN; CIOCALTEAU, 1927). O ensaio se baseia na redução do reagente Folin-Ciocalteu, onde há formação de um complexo de coloração azul, que é quantificado fotometricamente, a um comprimento de onda de 750 nm (GARCIA, 2016). A intensidade da coloração vai

dependem da quantidade e disponibilidade do composto redutores, incluindo os compostos fenólicos presente na amostra.

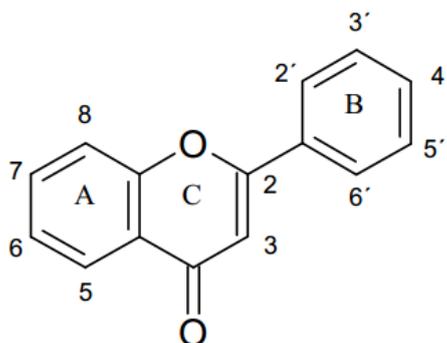
Estudos realizados para a avaliação de métodos quantitativos nas folhas de coníferas, usando Azul da Prússia e Folin-Ciocalteu, revelaram que esse último apresenta maior sensibilidade, em termos de fenóis, usando como solvente acetona 50% (DAHLGREN; YU, 2000).

### 3.2.3. Flavonoides

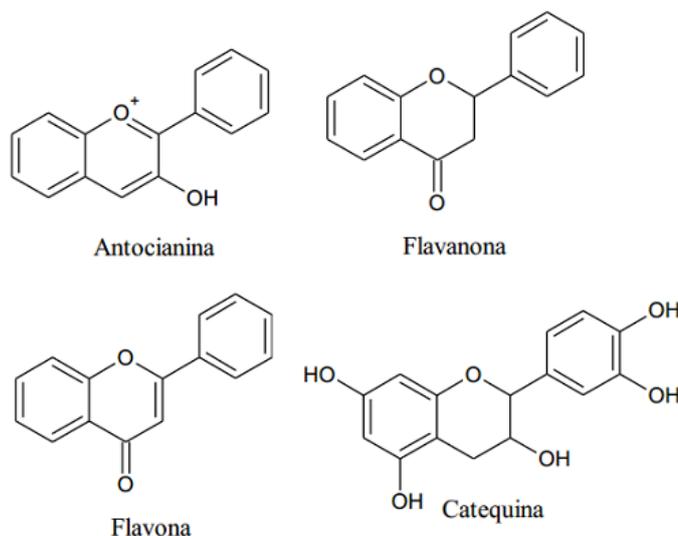
O termo flavonoide vem do latim que significa “*flavus*”, que significa amarelo, porém sabe-se que os flavonoides variam de verde a azul (LOPES et al.,2000). No ano de 1930 foi isolada uma substância da fruta laranja que foi chamada de vitamina P, e anos mais tarde foi identificado um flavonoide, não como uma vitamina. Eles representam um grupo importante e de bastante variedade de origem vegetal e estão largamente distribuídos no reino vegetal (MACHADO et al, 2008). Simões et al 2000, menciona que os flavonoides encontrados nos frutos são diferentes dos encontrados nas folhas, raízes e galhos da mesma espécie.

Os compostos fenólicos de origem vegetal são classificados em dois grupos: os flavonoides e não - flavonoides. Os flavonoides tem estrutura química de C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>. Burns et al, (2002), classificou como C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> –ácido hidroxibenzoico, ácido gálico e ácido elágico. Estruturas C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> – ácido caféico e *p*-cumárico, e estrutura C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> – tras-resveratrol, cis-resveratrol e cis- resveratrol-glicosídeo.

Os flavonoides são compostos de baixo peso molecular e possuem um esqueleto com 15 átomos de carbono arranjados em três anéis, chamados de A, B, C, na forma C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> (Figura 6), (MARÇO et al, 2008; GONÇALVES, 2008). Os flavonoides são as flavonas, flavanonas, flavonols, flavanonols, isoflavonas, catequinas e antocianidinas e os flavonóides como a miricetina e quercitina. Porém são encontrados mais comumente 4 grupos em alimentos que são as antocianinas, as flavononas, flavonas e catequinas que apresentam em sua estrutura o esqueleto da Figura 7 (VOLP et al., 2008; OLIVEIRA, 2015; VIZZOTO et al., 2010).



**Figura 6.** Estrutura básica de um flavonoide. **Fonte:** Behling et al., 2004



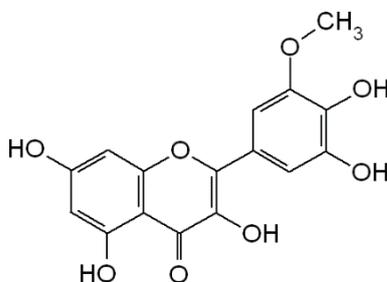
**Figura 7.** Flavonoides mais comumente encontrados nos alimentos.

De todos os metabólitos existentes, os flavonoides possuem a estrutura que é ideal ao sequestro dos radicais, tornando ele o oxidante mais eficiente que as vitaminas C e E (ALVES et al, 2007).

A produção e concentração dos flavonoides sofrem influências ambientais como luz, radiação solar, raios UV, déficit hídrico, e outros como fatores não naturais e têm função de proteção das plantas contra raios e patógenos e ação antioxidante (SIMÕES et al ,2000; MACHADO et al, 2008). E são considerados compostos relativamente estáveis a oxidação, altas temperaturas e algumas faixas de pH. E seu grande interesse por estudos e por seus efeitos antivirais, microbiano, antioxidante, hipolipidêmico, anti-inflamatório dentre outros (PELZER et al., 1998).

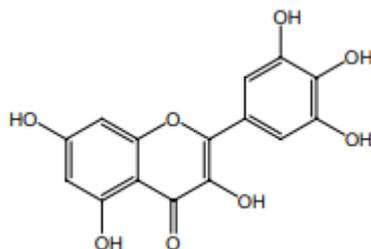
### 3.2.4. Flavonoides não-antôcianos

Os flavonoides chamados de não-antôcianos têm estruturas de  $C_6-C_1$ ,  $C_6-C_3$  e  $C_6-C_2-C_6$ . São divididos em duas classes as flavonas e os flavonóis, e os flavonóis mais comuns são o kaempferol, quercitina e miricetina (BOBBIO e BOBBIO, 2003). A miricetina e quercetina são majoritárias, seguida do kaempferol, sorhamnetina, laricitrina (Figura 8) e siringetina (Fernández, 2017).



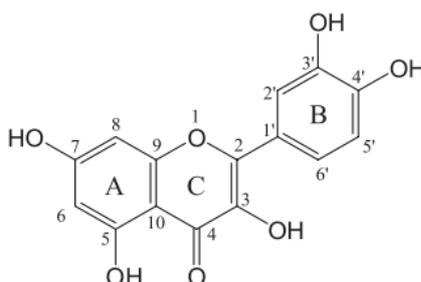
**Figura 8.** Estrutura química da laricitrina. **Fonte:** Flamini (2012)

A miricetina é um flavonoide que caracterizado pela presença da hidroxila na posição 3' (Figura 9), e estudos demonstram que existe efeito hipoglicêmico e hipotrigliceridêmico, tendo valor terapêutico em pacientes com diabetes (BARBOSA et al., 2006).



**Figura 9.** Estrutura química da miricetina **Fonte:** Barbosa et al., 2006.

A quercitina se caracteriza pela presença do -OH nas posições 3, 5, 7, 3', 4' (Figura 10), é considerado o flavonoide mais abundante utilizado na dieta humana, e está relacionada na prevenção de doenças como o câncer, doenças cardiovasculares, proteção do fígado (função hepática) e função renal (BEHLING et al., 2004).



**Figura 10.** Estrutura química da quercitina **Fonte:** Simões et al., 2013

As principais fonte de flavonoides são do cacau, café, chá preto, vinho e cerveja (PIERPOINT, 1986). A miricetina e quercitina estão presentes em diversas fontes, mas com predominância em vegetais e frutas (LOPES et al.,2000). E as principais fontes de miricetina, quercitina, laricitrina e sirigenina encontrada na literatura estão na Tabela 2.

**Tabela 2.** Os flavonoides quercitina, miricetina, laricitrina e sirigenina e suas principais fontes

Flavonoide	Fonte
Quercitina	Jamelão, cebola, couve, vagem, tomate, repolho, maçã, brócolis, pitanga, caju, acerola, rúcula, morango, mirtilo e chá (branco, preto e mate)
Miricetina	Jamelão, pitanga, caju, morango, mirtilo e chá (branco preto e mate)
Laricitrina	Jamelão, vinho, uva, morango e mirtilo
Sirigentina	Jamelão, vinho, uva, morango e mirtilo

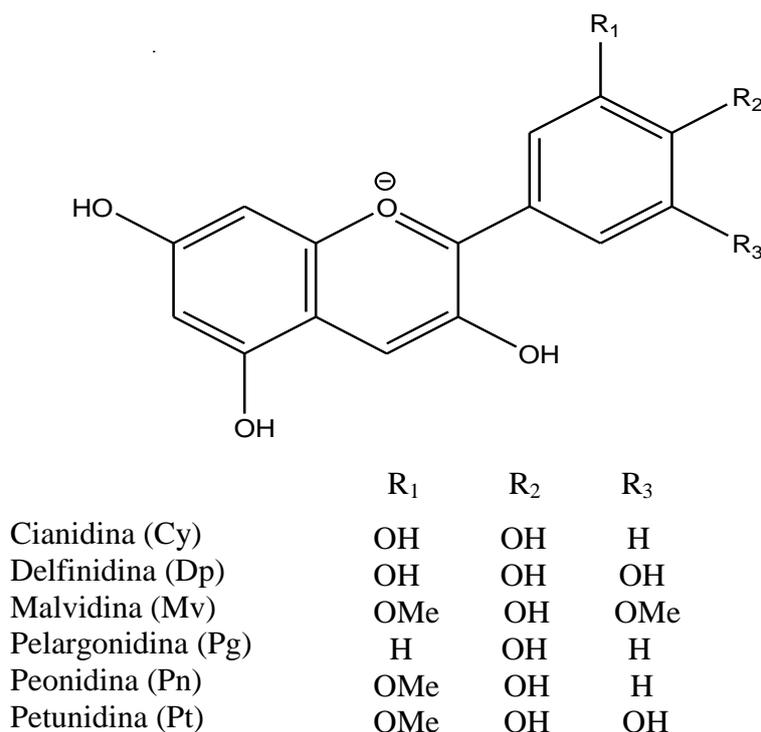
**Fonte:** Hertog et al., 1993; Behling et al.,2004; Lantzouraki at al., 2015; Tavares et al., 2016; Aranaz et al., 2017.

### 3.2.5. Antocianinas

A palavra antocianina é de origem grega (*anthos*, uma flor, e *kyanos*, azul escuro), nomeado por Marquart em 1853 para se referir aos pigmentos azuis das flores (MARÇO et al., 2008). As antocianinas ficam normalmente acumuladas nos vacúolos das células epidérmicas e sub-epidérmicas (AMERICO, 2014), mas podem ser encontradas nas raízes, nas hastes e nas folhas (OLIVEIRA, 2011). Da família dos flavonóides, seus pigmentos são hidrossolúveis, e são responsáveis pela maioria das cores como laranja, vermelha e azul das frutas, flores e vegetais (MALACRIDA e MOTTA, 2006; FALÇÃO et al., 2003). Suas funções são de proteção à ação da luz, mecanismo de defesa das plantas contra insetos e além da sua característica como antioxidante natural (LOPES et al., 2007).

Sua estrutura química é baseada em uma estrutura de quinze carbonos, ligados a um anel aromático na posição de C<sub>2</sub> são heteroglicídeos onde sua estrutura possui uma ou mais moléculas de açúcar ligadas em diferentes posições (LÓPEZ et al., 2000; OLIVEIRA, 2011). Quando uma antocianina sofre hidrólise ocorre à liberação da aglicona que também são chamadas de antocianidinas (LIMA et al., 2006)

Segundo Francis (2000), na natureza são encontradas muitas antocianidinas, porém apenas seis são importantes e estudadas em alimentos, que são as: pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina e malvidina. E sua distribuição nos vegetais e frutas ocorrem em porcentagem: 50% de cianidina, 12% para cada uma: pelargonidinas, delphinidina e peonidina e 7% para malvinidinas e petunidinas (CASTÑEDA- OVANDO et al., 2009). Na Figura 11, estão representadas as principais antocianidinas e seus substituintes químicos.



**Figura 11.** Estrutura química básica das antocianinas.

Jackman e Smith (1996), mencionam que as antocianinas estão distribuídas em muitas famílias de plantas como a *Ericaceae* (mirtilo), *Cruciferae* (rabanete e o repolho roxo.), *Leguminoseae* (vagem) *Rosaceae* (ameixa, morango, amora entre outras), *Gramineae* (as sementes de cereais), *Vitaceae* (uva), *Solanaceae* (tamarindo e batata), *Saxifragaceae* (groselha preta e vermelha) e as *Myrtaceae* (jambo, jabuticaba e jamelão) na tabela 3, estão

algumas frutas e suas principais antocianinas. A cor característica do fruto jamelão é atribuída a antocianinas presentes que atraem bastante atenção, por seus benefícios a saúde (AMERICO, 2014).

**Tabela 3.** Antocianinas identificadas encontradas e suas respectivas fontes

<b>Antocianinas</b>	<b>Fonte</b>
Cianidina-3-glicosídeo	Uva, vinho, jamelão, cereja, azeitona, morango, amora, maçã
Cianidina-3,5-glicosídeo	Uva, vinho, cereja, marmelo, figo
Peonidina -3-glicosídeo	Uva, vinho, cereja, jaboticaba
Malvinidina -3-glicosídeo	Uva, vinho,
Malvinidina -3,5-glicosídeo	Uva, vinho, inhame, feijão
Cianidina-3-galactosídeo	Maçã, cacau
Cianidina-3 <i>p</i> -cumarilsoforosídeo-5-glicosídeo	Repolho roxo
Perlagonodina-3-soforosídeo-5-glicosídeo	Rabanete
Perlagonodina-3-glicosídeo	Morango, tamarindo
Delfinidina-3,5-diglicosídeo	Berinjela, feijão, uva, romã
Delfinidina-3-cafeoilglicídeo-5-glicosídeo	Berinjela
Petunidina-3-glicídeo	Feijão, vinho, mirtilo, laranja, uva

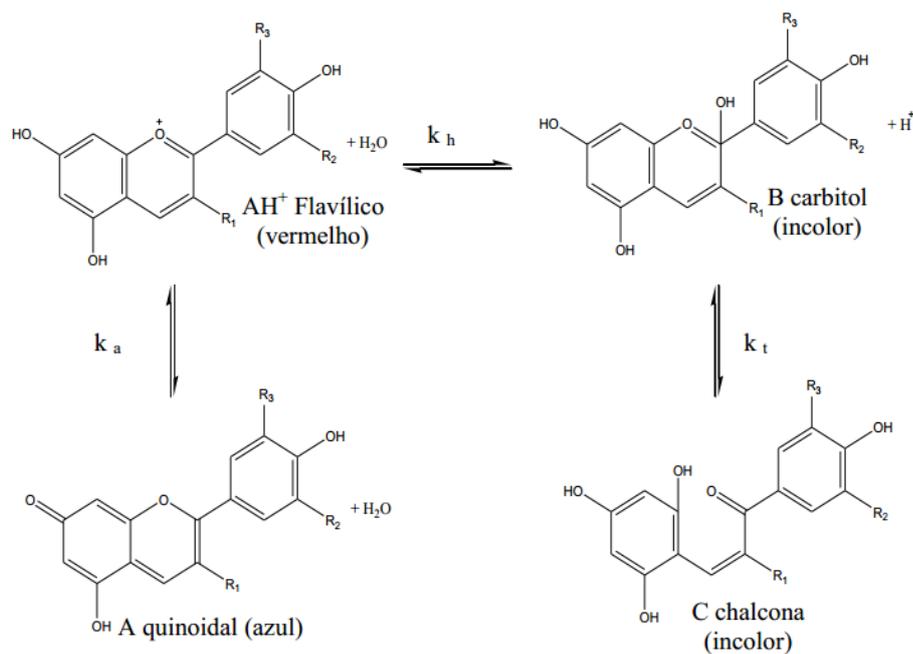
**Fonte:** Malacrida e Motta (2006)

A glicose, ramnose, xilose, galactose, arabinose e frutose são açúcares mais encontrados ligados diretamente nas antocianinas, que ocorrem como monoglicosídeos, diglicosídeos e triglicosídeos (MALACRIDA e MOTTA, 2006; FRANCIS, 1989).

Segundo Brouillard (1982), a metoxilação, que é a substituição dos radicais R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub>, é mais ocorrente nas posições 3' e 5', e ocorrem menos nas posições 5' e 7'. No caso das antocianinas naturais, não se encontrará as hidroxilas nas posições 5', 7' e 4' substituídas ao mesmo tempo, onde um dos grupos de hidroxila se mantém livre numa dessas posições para que se possa ocorrer a formação da estrutura quinoidal que é responsável pela formação cor das antocianinas.

As diferentes cores entre as antocianinas são determinadas pela substituição do anel B, chamado de padrão de glicosilação, bem como o grau e a natureza da esterificação desses açúcares com o ácidos aromáticos e alifáticos, bem como a temperatura, pH, solvente utilizado e também pela presença de copigmentos (MAZZA, 2007; OLIVEIRA, 2011).

A alteração da coloração de uma antocianina, está relacionada à mudança do pH do meio, sendo este o fator que mais afeta a cor (GOUVÊA et al, 2015; BOBBIO e BOBBIO, 1995). Em diferentes valores de pH, os pigmentos apresentam formas variadas, apresentando cores diferentes (AGUIAR, 2001). As antocianinas em pH 2, predominam na forma do cátion flavilium (vermelho intenso), com o aumento do pH, se apresenta como base anidra quinoidal (cor azul), e com pH entre 4,5 como pseudo-base carbinol (incolores), e as chalconas apresentam-se incolores ou levemente amarelas, Figura 12 (LOPES et al, 2007; GOUVÊA et al, 2015).



**Figura 12.** Estruturas das antocianinas em equilíbrio em solução aquosa. **Fonte:** Xavier (2004).

As antocianinas são compostos considerados instáveis e sua maior estabilidade ocorre sempre em meio ácido (BEZERRA, 2015). São sensíveis a fatores como luz, pH, temperatura e oxigênio (ARAÚJO, 2014), e também são consideradas potentes antioxidantes, até mais eficientes que os BHA (butilhidroxianol), BHT (butilhidroxitolueno) e  $\alpha$ -tocoferol (Mazza, 2007).

O crescente interesse dos estudos das antocianinas vem de seus possíveis usos, como nas indústrias cosmética, alimentícia e farmacêutica. Outro potencial uso para essas substâncias é como corante alimentício, contudo ainda sem muitas aplicações, de uso restrito, especialmente os de cores vermelhas, devido à baixa estabilidade e dificuldade de obtenção (FAVARO, 2008; GOUVÊA, 2010; SANTIAGO, 2015).

### 3.2.5.1. Extração de antocianinas

A extração e quantificação das antocianinas envolvem diferentes técnicas de avaliação de conteúdo total ou isolado.

Para Oliveira (2011), o etanol é o solvente mais utilizado para extração de antocianinas, apesar de ser menos eficiente que o metanol, porém preferido para extração em matrizes alimentícias, pois o etanol evita a toxicidade que as soluções metanólicas apresentam.

Já foram testadas muitas metodologias de extração, cujas aplicações dependem da finalidade, que podem consistir de uma simples extração feita com solventes com graus de polaridades diferentes, misturados na água ou não, e também a utilização de soluções com diferentes pH. Na literatura são observadas outras técnicas de extração e purificação de antocianinas, tais como o Fluido Supercrítico (SFE – Supercritical Fluid Extraction); Extração com Líquido Pressurizado (PLE®- Pressurized Liquid Extraction); Campo Elétrico Pulsado (PEF- Pulsed Electric Field), Cartucho de troca catiônica (Cation-exchange SPE - Oasis® MCX) e Cromatografia líquida de alta eficiência - com detector de arranjos de diodos (CLAE-DAD) (HE e GIUSTI, 2011; GOUVÊA, 2015).

O uso do Cartucho de troca catiônica - Cation-exchange SPE - Oasis® MCX- foi anteriormente utilizado por He e Guisti (2011), onde utilizou esse método para isolar antocianinas de frutas e vegetais como o mirtilo, rabanete, framboesa preta, morango, repolho roxo, uva e cenoura roxa. Onde neste estudo foi criado uma metodologia inovadora de baixo custo e gasto de reagentes para o isolamento das antocianinas.

As antocianinas apresentam absorção na região visível de 500 a 535 nm (MARKAKIS, 1982). Os pesquisadores Fulek e Francis (1968), desenvolveram uma metodologia que determina o teor de antocianinas totais em extratos brutos, contendo outros compostos fenólicos, que estão naturalmente presentes nas matrizes, através da medida da absorvância da solução no comprimento de onda específico para as antocianinas. Assim, essa metodologia desenvolvia por eles, com particularidades de cada extração, ainda é a mais utilizada para a determinação das antocianinas totais.

### 3.3. Liofilização

O processo de liofilização ou também chamado de *freeze-drying* é o processo de desidratação, no qual a amostra a ser desidratada tem que ser previamente congelada, que a determinadas condições como pressão e temperatura, causam a sublimação da água (ARAÚJO, 2014). Por ser realizado a baixas temperaturas e com a ausência do ar atmosférico (vácuo), permite que as propriedades sensoriais e químicas praticamente não se alterem (MENEZES et al., 2009). Para o sucesso desse processo, na etapa de congelamento, deve ser rápido, pois gera cristais de menor diâmetro, o que diminui o dano da membrana celular do alimento (NETO, 2008)

O processo de liofilização é utilizada mais em alimentos que possuem maior valor no mercado, como café, ervas, sucos de frutas, fermento biológico entre outros. Esses produtos que são transformados em pó, são cada vez mais utilizados na indústria de alimentos, por serem mais baratos, ocupam menores espaços e apresentarem maior período de validade (SANTOS et al, 2012). É um processo que ainda é considerado caro em comparação com a secagem convectiva, chega a ser até oito vezes mais custosa, porém ainda é o processo mais adequado para manter as características originais dos produtos (ARAÚJO, 2014; GAVA, 2008; RITTI, 2001).

E os frutos apresentam curto período de safra, e apresentam alta porcentagem de água (umidade) quando *in natura*, que está ligada diretamente com a sua estabilidade, composição dos e qualidade. E essas características podem afetar na hora do armazenamento, embalagem e a sua forma de processamento. Com isso o processo de secagem é muito importante, onde diminui a sua atividade de água, ou pelo processo de evaporação ou sublimação, conseguindo atingir melhores situações de conservação (FREITAS et al., 2013).

Bezerra (2015), encontrou para o pó liofilizado do fruto do jamelão 2,99% de umidade, e uma atividade de água de 0,45. E Oliveira et al (2014), encontrou para o fruto do cajá 2,05% de umidade após liofilização. E Santos et al, (2012), encontrou no pó liofilizado da fruta mangabeira 20,69% de umidade. E Menezes et al, (2008) para polpa liofilizada de açaí 4,29% de umidade.

A perda de água dos alimentos é muito desejável, por causarem poucas alterações, como uso da técnica de criodessecação, que consistiu na concentração dos nutrientes por unidade de peso (OLIVEIRA et al., 2011).

### 3.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Segundo a IUPAC (2006), “Cromatografia é um método de separação físico-químico no qual os componentes que serão separados são distribuídos entre duas fases, uma das quais é estacionária (fase estacionária), enquanto a outra (fase móvel) se move em uma direção definida”.

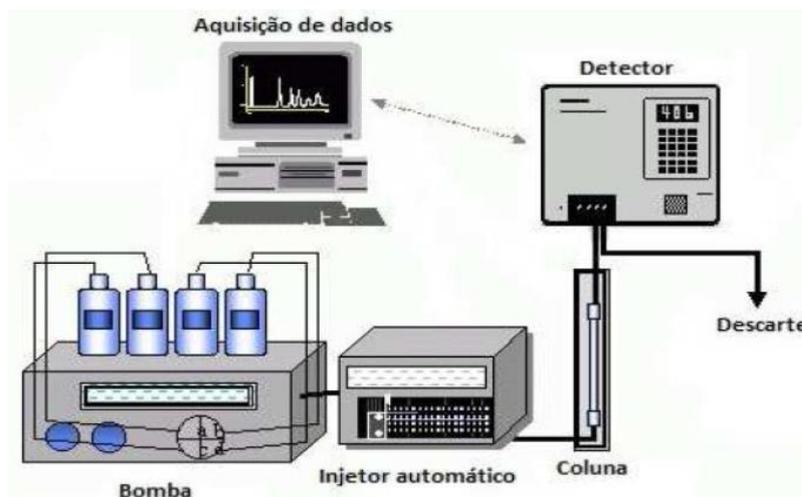
Relatos mostram que a primeira utilização de fenômenos cromatográficos tenha ocorrido em 1877 por um historiador romano chamado de Caio Plínio Segundo, mas foi somente no ano de 1903 por um botânico chamado Mikhail Semenovitch Tswett de origem Italiana, que se deu o mérito do nascimento da cromatografia (PACHECO et al., 2015).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) se baseia na injeção da amostra contendo a mistura dos analitos dissolvida em um solvente líquido, através de um injetor, na coluna cromatográfica preenchida de materiais especialmente preparados (SOUZA, 2008). A coluna cromatográfica pode ser aquecida de forma controlada com temperaturas desejadas, e a movimentação da amostra dentro da coluna e através da eluição de misturas de solventes de polaridades diferentes, chamado de fase móvel (ARDREY, 2003). As colunas podem ser classificadas quanto ao seu diâmetro, onde as preparativas tem diâmetro de 6-50 mm, as analíticas 2-6mm as microdiâmetro possuem diâmetro menores que 2mm (CUNHA, 2013).

O fluxo é controlado através da bomba, que permite também a realização de sistemas de gradientes de solventes, onde é possível utilizar vários solventes na mesma corrida, permitindo alterar suas concentrações durante ela. E a fase móvel é eluída sob altas pressões. A CLAE tem capacidade de realizar separações e análises quantitativas 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 (VALENTE et al., 1983). De modo geral a fase móvel é composta por misturas de solventes orgânicos, ou solventes orgânicos em água (RIGAUD et al., 1993).

A partir dos anos de 1970, foi possível o avanço considerável da cromatografia líquida de alta eficiência moderna, que até então, não era muito desenvolvida. Peres (2002), menciona que o avanço ao longo do tempo foi gradual e atingiu o nível de sofisticação que a CLAE apresenta nos dias atuais, devido ao revolucionário desenvolvimento tecnológico da prática deste tipo de cromatografia (MALDANER; JARDIM, 2009).

É a técnica de separação mais utilizada para análise de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarbonetos, hidratos de carbono, drogas, terpenóides, pesticidas, antibióticos, esteroides, entre muitas outras (SKOOG et al., 2002). Na Figura 13, está representando de forma esquemática o diagrama de um cromatógrafo líquido (SANTIAGO, 2014).



**Figura 13.** Diagrama de um Cromatógrafo líquido. **Fonte:** Santiago, 2014

Essa técnica já foi utilizada em estudos sobre o jamelão, onde estudo realizado por Santiago et al (2016) em artigo intitulado “Characterization of jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) fruit peel powder for use as natural colorant” onde identificou seis antocianinas por CLAE-DAD que foram a delfinidina-3,5-diglicosilada, cianidina-3,5-diglicosilada, delfinidina-3-glicosídeo, petunidina-3,5- diglicosilada, peonidina-3,5- diglicosilada e malvidina-3,5- diglicosilada.

Março et al (2008), cita que o uso de ferramentas mais avançadas como da espectrometria UV-Vis acoplada a CLAE é uma ferramenta essencial para a identificação das antocianinas, onde elas podem apresentar perfis espectrais diferentes dependendo do pH na qual elas se encontram.

### 3.4.1. Fase móvel

Na CLAE a fase móvel deve ser um líquido, e dentro do universo das substâncias líquidas puras e de suas misturas encontram-se várias possibilidades de solventes (AQUINO-NETO, 2003). COLLINS et al, (1997) diz que o solvente escolhido deve ser de alta pureza já que as impurezas causam a diminuição da sensibilidade do detector, fluído e não sofrer decomposição. Quando possível o solvente da amostra é a própria fase móvel ou um dos seus componentes, para que ela não sofra precipitação no injetor ou na coluna, o que provocará queda de resolução na separação. CIOLA (1998), completa dizendo que a viscosidade na fase móvel também influencia, pois essa viscosidade interfere no efeito de transferência de massa entre as fases móvel e estacionária.

As fases móvel e estacionária podem ser classificadas em: cromatografia de fase normal e cromatografia de fase reversa. A cromatografia em fase normal, a fase estacionária utilizada é polar e a fase móvel é apolar, em relação à eluição, os solutos mais apolares são eluídos primeiramente, enquanto que os polares são retidos pela fase estacionária e são eluídos depois (SILVA, 2012). Na Cromatografia com fase reversa, a fase estacionária é apolar e a fase móvel polar, portanto os compostos polares são eluídos primeiro e os mais apolares eluídos posteriormente (VOGEL, 1981).

Se durante a separação for utilizado um único eluente de composição constante a eluição é chamada de isocrática (SKOOG et al., 2002; CECCHI, 2003). Uma fase móvel adequada é indispensável para a CLAE, por isso é necessário examinar fatores que determinam a sua escolha, como a sua polaridade, que determinará o seu poder de eluição juntamente com a polaridade da fase estacionária e com a natureza dos componentes da

amostra. Se a separação for com fase normal, o poder de eluição aumenta com o aumento da polaridade da fase móvel, se a separação ocorrer em fase reversa, o poder de eluição diminui com o aumento da polaridade. Contudo outros fatores também devem ser considerados como: o ponto de ebulição, a viscosidade, a compatibilidade com o detector e a toxicidade (VOGEL, 1981; CIOLA, 1998).

O melhor material para se trabalhar na fase móvel, a serem utilizadas na CLAE são aqueles que, em menor tempo possível, têm a máxima capacidade de separação, apresentam a melhor resolução na separação da mistura, são de fácil introdução na coluna, produzem pequeno aumento de pressão e que sejam de baixo custo e toxidez (COLLINS et al.; GUIMARÃES, 1997; CECCHI, 2003).

### **3.4.2. Fase estacionária**

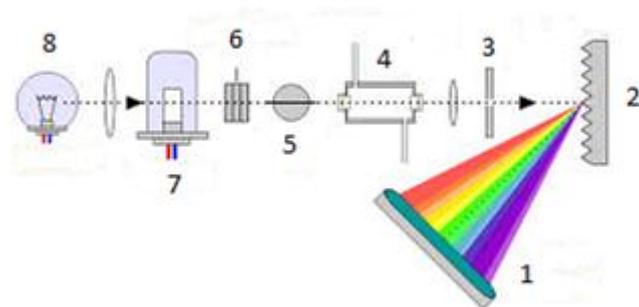
Na fase estacionária as partículas são classificadas quanto ao seu tamanho. São elas: as macropartículas, de diâmetro menor que 10 $\mu$ m; intermediárias, maior que 3 $\mu$ m; e micropartículas, menor que 3 $\mu$ m. Quanto menor for a partícula, maior será a eficiência da separação, o que melhora consideravelmente o processo de difusão das moléculas da amostra dentro e fora das partículas, porque as partículas menores reduzem a distância de contato do soluto com as fases estacionária e móvel, facilitando o equilíbrio. Podem ser de formato esférico, e de formato irregular, sendo que as regulares são mais eficientes por oferecerem um enchimento mais uniforme e mais reprodutível da coluna, e, por consequência, de sua maior eficiência e são as de maiores custos (CECCHI, 2003; ARAÚJO, 2004).

Suas propriedades físicas, os enchimentos para a CLAE são classificados como sólidos, rígidos, semi-rígidos, partículas porosas ou peliculares, partículas esféricas ou irregulares e partículas com diferentes diâmetros (COLLINS et al.; GUIMARÃES, 1997; CECCHI, 2003). Segundo Harris (2005), a fase estacionária de octadecil (C<sub>18</sub>) é a mais utilizada na cromatografia líquida de alta eficiência, sendo representada por ODS (octadecilsilano).

### **3.4.3. Detector de Arranjos de Diodos (DAD)**

Esse detector é o mais utilizado para substâncias bioativas, porque sua ampla faixa de comprimentos de onda monitorados simultaneamente facilitam a detecção e identificação dessas substâncias (BRAGA, 2016; COLLINS et al., 2007). É amplamente utilizada, desde que o analito tenha grupos cromóforos, ou seja, é a parte ou conjunto de átomos de uma molécula, responsável por sua cor, e são grupos funcionais com absorção característica na região do ultravioleta, absorção da luz na região de 190 a 370 nm e/ou do visível de 370 a 700 nm. O CLAE-DAD fornece informações do espectro UV-Visível de cada substância, onde diferentes moléculas possuem os mesmos grupos cromóforos (LIMA, 2008).

O detector DAD possui alta resolução espectral e além das informações quantitativas, apresenta informações qualitativas, permitindo assim checar a identidade do composto e a pureza do pico no qual se tem interesse (CALDAS et al., 2011). Lanças (2003) menciona que, os dados espectrais de cada pico cromatográfico, são coletados na medida em que os compostos eluem da coluna, podendo assim, adicionar informações para a identificação do pico. Na figura 14, mostra o funcionamento do detector de arranjo de diodos- DAD (CHROMACADEMY, 2017).



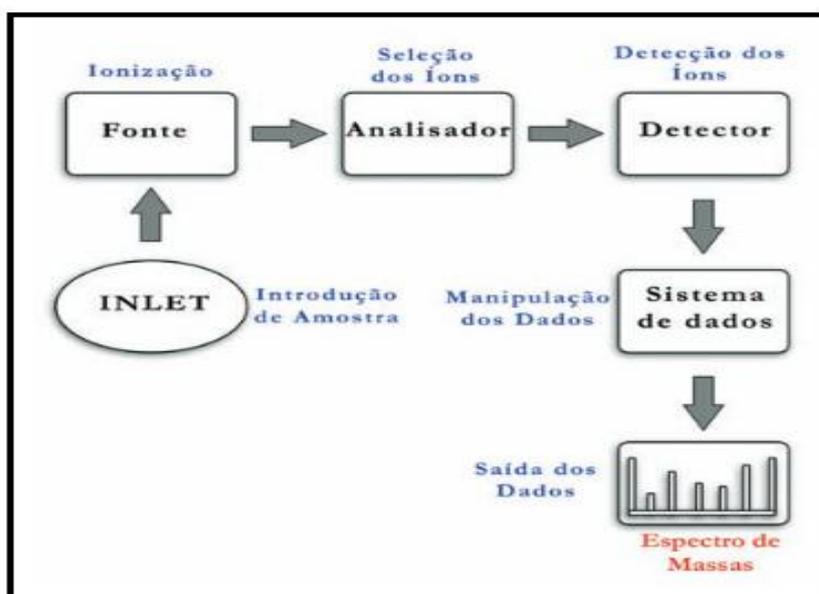
**Figura 14.** Esquema do funcionamento de um detector de arranjos de diodos (DAD). 1) Arranjo de diodos; 2) Grade; 3) Fenda óptica; 4) Célula de fluxo do detector; 5) Filtro de hólmio; 6) Lente acromática; 7) Lâmpada UV; 8) Lâmpada Visível. **Fonte:** Chromacademy, 2017.

### 3.5. Espectrometria de Massas

Os primeiros relatos existentes sobre a massa atômica elementar datam de 1815, quando o físico inglês W. Prout formulou sua teoria dos múltiplos do hidrogênio, onde ele constatou que a massa atômica e molecular de diversos elementos e compostos eram múltiplos do hidrogênio, que ele havia determinado como contendo 1,00 unidade de massa (BUDZIKIEWICZ; GRIGSBY, 2005).

Espectrometria de massas pode ser entendida como uma técnica analítica que permite a identificação da composição química de um determinado composto isolado, ou de diferentes compostos em misturas complexas, através da determinação de suas massas moleculares na forma iônica, (carga elétrica líquida unitária, positiva ou negativa), baseada na sua movimentação através de um campo elétrico ou magnético. Esta movimentação é determinada pela razão entre a massa de um determinado composto (analito) e sua carga líquida, designada por  $m/z$  (mass to charge ratio). Conhecendo o valor de  $m/z$  de uma molécula é possível inferir sua íon molécula, e com isso determinar sua estrutura (VAN-BRAMER, 1998).

Portanto, uma técnica fornece informações precisas sobre a massa dos compostos analisados. O espectrômetro de massas fornece a massa obtida dos íons, e também é utilizado na determinação de razões isotópicas. Na Figura 15, está representado esquema dos principais componentes de um espectrômetro de massas, descrito por Lanças (2009).



**Figura 15.** Esquema dos principais componentes de um espectrômetro de massas. **Fonte:** Lanças, 2009.

As principais funções de um espectrômetro de massas são:

- ✓ Fontes: parte do espectrômetro responsável pelo processo de ionização das moléculas, ou seja, transformação de moléculas neutras em íons;
- ✓ Analisadores de massas: parte do espectrômetro responsável pela separação dos íons de acordo com seu  $m/z$ , realizado através de aplicações de campos elétricos e magnéticos;
- ✓ Detectores: parte final de um espectrômetro de massas, responsável pela detecção e amplificação dos íons.

As principais aplicações são:

Identificar estruturas de biomoléculas (carboidratos, ácidos nucleicos, esteroides):

- ✓ Sequenciar biopolímeros como proteínas e oligossacarídeos;
- ✓ Realizar análises como a confirmação e quantificação de abuso de drogas;
- ✓ Análise de poluentes ambientais;
- ✓ Determinar a idade e origens de espécies em geoquímica e arqueologia;
- ✓ Identificar e quantificar componentes de misturas orgânicas complexas.

A utilização da espectrometria de massas têm se tornado ao longo dos anos indispensável para a caracterização e identificação das biomoléculas, por ser um método rápido e de alta sensibilidade. De larga aplicação, sendo utilizados tanto em proteínas, peptídeos, carboidratos, lipídeos, produtos de metabolismo secundários, como as antocianinas e os flavonoides, entre muitos outros compostos.

### **3.5.1. Cromatografia Líquida acoplada à espectrometria de massas**

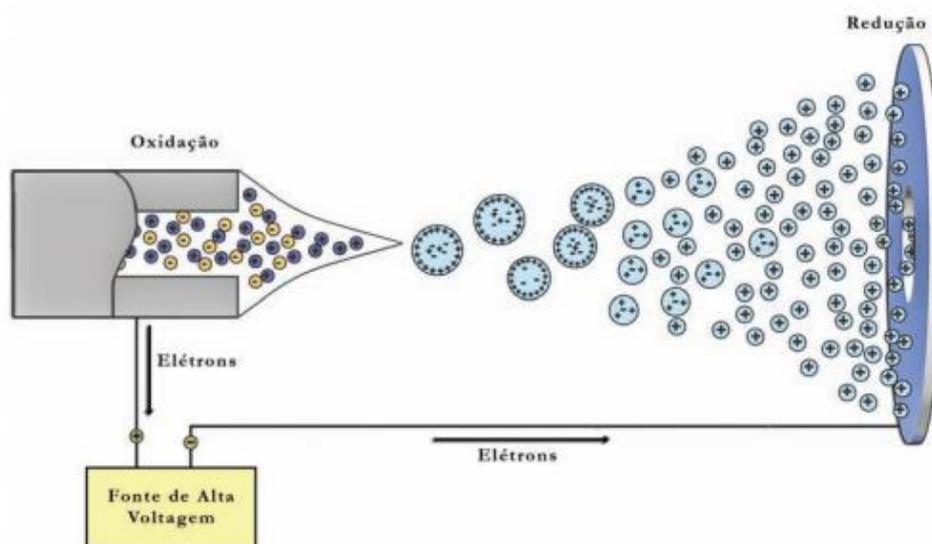
A cromatografia líquida de alta eficiência trabalha com pressões entre 4000 e 6000psi, onde em pressões maiores a estas ocorreria um desgaste dos selos dos pistões e bombas, sendo assim foi necessária a criação de uma nova técnica onde poderia trabalhar com pressões maiores sem danos ao aparelho. Então na primeira década do ano de 2000 a Waters® disponibilizou o primeiro Cromatógrafo a líquido onde pode-se trabalhar em altas pressões acima de 15000psi, chamada de CLUE- Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência, denominada de ACQUITY®, e o uso de partículas das colunas inferiores a 2 $\mu$ m (PACHECO, 2014). Além de se trabalhar com partículas menores que a CLAE, a CLUE proporciona ganho na resolução, maior sensibilidade, tempo de retenção, velocidade linear, e maior largura, podendo assim, obter análises mais rápidas e com menor gasto de solvente, onde gera economias de solventes caros e muito utilizados na cromatografia como a acetonitrila, ainda com o uso de amostras menores comparado com a CLAE. O uso da miniaturização também é muito importante para a preservação do meio ambiente, onde a quantidade de resíduos gerados nos laboratórios é bem menor se comparando a CLAE (NOGUEIRA et al., 2011).

A cromatografia líquida de alta eficiência tem sido uma das ferramentas de principal utilização em compostos não voláteis, apesar de seu uso ser de extrema excelência para estudos na identificação e separação das substâncias, ao longo dos anos existiu a necessidade de outra técnica para a confirmação da identidade das substâncias, dentre todas as técnicas existentes, a espectrometria de massas é a mais utilizada e fazendo o uso de acoplamentos entre elas gerou uma ferramenta com maior versatilidade e potencial quantitativo e qualitativo.

Com esse acoplamento da cromatografia líquida ao espectrômetro de massas com uso de fontes de ionização apropriadas para cada amostra, surgiram técnicas que operam em pressões atmosféricas são a electrospray (ESI, “Electrospray Ionization”), ionização química à pressão atmosférica (APCI, “Atmospheric Pressure Chemical Ionization”) e ionização por fótons à pressão atmosférica (“Atmospheric Pressure Photon Ionization”) sendo o Electrospray a técnica mais largamente utilizada nesse tipo de acoplamento (LANÇAS, 2009).

O pioneiro desse tipo de ionização foi o ganhador do prêmio Nobel de química do ano de 2002, um novo-iorquino nascido no ano de 1917, com doutorado em química pela Universidade de Yale no ano de 1940, o Professor John Bennett Fenn, pelo trabalho iniciador no uso do electrospray como fonte de ionização branda para uso na espectrometria de massas (LANÇAS, 2009).

O princípio da ionização por “electrospray” permite a formação dos íons na pressão atmosférica. A amostra é dissolvida, geralmente em solvente não polares, e passa por um tubo capilar onde é aplicada uma voltagem entre 3.000 e 5.000 V, onde as gotículas passam pelo processo de dessolvatação, onde as gotículas perdem o solvente. Assim os íons vão para o espectrômetro de massa, que são induzidos pela atração eletrostática. As gotículas de água são evaporadas e ocorrem inúmeras “explosões coulômbicas” até que apenas um íon do analito permaneça. O “electrospray” pode ser operado em dois modos: positivo e negativo (Figura 16). O primeiro modo a gotícula que sai do spray ganha uma carga, ocorrendo o processo de oxidação, e o segundo modo a gotícula perde uma carga, ocorrendo o processo de redução (LANÇAS, 2009).



**Figura 16.** Esquema do processo de “electrospray”. **Fonte:** Lanças, 2009

Para a separação desses íons na fonte de ionização é necessário analisadores de massas, que podem ser: Quadrupolo (Q)- mais simples, desempenho para quantificações e custo relativamente baixo; *Ion-trap* (IT)- é uma variação do quadrupolo, tem maior sensibilidade e custos baixos, porém tem uma baixa resolução de massas; e Tempo de Voo (TOF)- alto poder de resolução, exatidão de massas e faixa de detecção (MARTINS, 2017).

Estratégias são empregadas para aumentar a seletividade durante a análise, e o uso de analisadores em série têm sido empregadas.

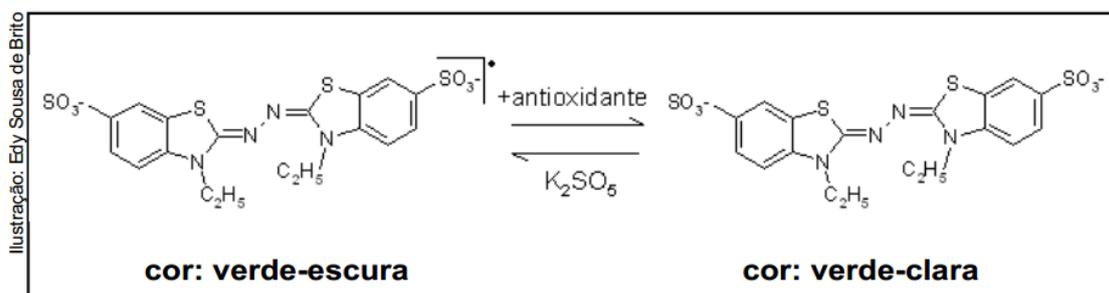
### 3.6. Potencial antioxidante

O crescente interesse por estudos em alimentos que tenham como propriedade o potencial antioxidante, contendo substâncias capazes de combater os radicais livres, têm aumentado significativamente nos últimos anos.

Os radicais livres ocorrem naturalmente durante ações catalíticas de enzimas, no metabolismo celular ou pela exposição à fatores exógenos (NASCIMENTO et al, 2011). São conhecidos por causarem danos oxidativos aos ácidos nucleicos, lipídeos e proteínas, que podem levar a doenças como câncer doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune, disfunções cerebrais e diabetes mellitus tipo I. A ingestão de antioxidantes são capazes de barrar a formação dos radicais livres, tendo um papel importantíssimo na prevenção de doenças (GONÇALVES, 2008; SOUSA et al., 2007; NASCIMENTO et al, 2011).

#### 3.6.1. TEAC (capacidade antioxidante total equivalente ao Trolox)

O TEAC, método que mede o potencial antioxidante, baseado na habilidade dos antioxidantes na inativação do cátion- radical  $ABTS^{++}$ , que é formado após reação eletroquímica, química ou enzimática (Figura 17) com o persulfato de potássio, mais utilizado, ou dióxido de manganês (OLIVEIRA, 2011; KUSKOSKI et al, 2005). O  $ABTS^{++}$  é instável, reagindo energeticamente com um doador de átomo de hidrogênio, como os fenólicos, e é convertido em um composto incolor (MATOS, 2014).



**Figura 17.** Estabilização do radical  $ABTS^{++}$ , por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio. **Fonte:** Rufino et al., 2007.

Com o  $ABTS^{++}$ , mede-se compostos tanto de natureza lipofílica como hidrofílica (OLIVEIRA, 2011). A vantagem desse método é a relativa simplicidade.

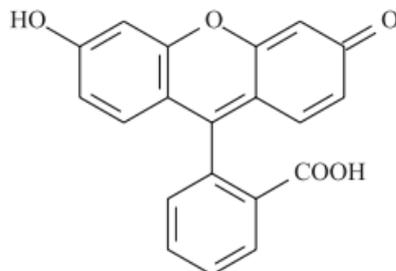
Os resultados são expressos como valor TEAC (capacidade antioxidante total equivalente ao Trolox), tornando assim mais fácil a comparação dos resultados (SOUZA, 2012). O TEAC é definido como a concentração de Trolox que apresenta o mesmo percentual de inibição que uma concentração de 1 mmol do composto de referência, então, quanto maior o valor TEAC, mais forte é o potencial antioxidante (SOUSA; VIEIRA e LIMA, 2011).

#### 3.6.2. ORAC – “Oxygen Radical Absorbance Capacity”

Método que se baseia na propriedade fluorescente das proteínas B-ficoeritrina (B-PE) e R-ficoeritrina (RPE) e essas proteínas são usadas como indicador fluorescente. São oriundas e isoladas de *Porphyridium cruentum* e algas vermelhas (ALVES et al, 2010).

O radical peroxil, gerado pela reação do AAPH [dicloreto de 2,2' -azobis(2-amidinopropano)] com oxigênio atmosférico, reage com o indicador fluorescente para formar um produto não fluorescente. A fluorescência pode ser medida por espectrofotometria com

máxima emissão de fluorescência em 575 nm (B-PE) e 578 nm (R-PE) (GLAZER, 1988). Devido a limitações da B-PE e RPE, um dos indicadores preferidos atualmente é a fluoresceína (Figura 18).



**Figura 18.** Estrutura química da fluoresceína. **Fonte:** Alves et al ,2010.

O ensaio determina a atividade antioxidante através da quantificação de uma solução da molécula fluorescente, quando misturada com a amostra adicionada de radicais livres. Quanto maior a fluorescência maior será o poder antioxidante da amostra. (PRIOR et al, 2015).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Material

#### 4.1.1. Matéria-prima e caracterização da coleta

Os frutos de jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) foram coletados de três matrizes no interior do pátio da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) - Agroindústria de Alimentos, localizada em Guaratiba, Rio de Janeiro - RJ. As coletas ocorreram em dois períodos, sendo nos meses de janeiro a março dos anos de 2017 e 2018. Para todas as coletas buscou-se a homogeneidade de maturação dos frutos, onde o parâmetro utilizado foi a cor da pele dos frutos.

#### 4.1.2. Solventes e Reagentes

- ✓ Acetonitrila grau HPLC, da marca Tedia® (EUA);
- ✓ Etanol, GP=99,5% Tedia® (EUA);
- ✓ Metanol grau HPLC, da marca Sigma-Aldrich® (EUA);
- ✓ Acetato de etila da marca Tedia® (EUA);
- ✓ Acetona da marca Tedia® (EUA);
- ✓ Ácido fórmico grau HPLC da marca Tedia® (EUA);
- ✓ Ácido Trifluoroacético;
- ✓ Hidróxido de amônio;
- ✓ ABTS<sup>+</sup> 7mM; Trolox (ácido 6-hidroxil-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico)
- ✓ Hipoclorito de Sódio;
- ✓ Fosfato de Sódio (75 mMol.L-1, pH 7,5);
- ✓ Fluoresceína sal de Sódio (78 mMol.L-1);
- ✓ AAPH (221 mMol.L-1);
- ✓ Ácido Gálico;
- ✓ Sulfato de Sódio;
- ✓ Folin-Ciocalteu;
- ✓ Carbonato de Sódio;
- ✓ Água ultrapura obtida do sistema Milli-Q® Gradient 10A.

#### 4.1.3. Equipamentos

- ✓ Foram utilizados, Cromatógrafo a Líquido (ALLINCE 2995 Water®);
- ✓ Cromatógrafo a líquido de ultra eficiência Acquity UPLC® acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução Synapt® modelo G1, ionização por electrospray (ESI) e analisador do tipo quadrupolo e tempo de voo (QTDV);
- ✓ Detector DAD (detector de arranjo de diodos);
- ✓ Vortex (GENE 2 Scientific Industries);
- ✓ Pipetas automáticas (Traspette® 100 µL, 100 µL, 5,0 mL);
- ✓ Balança analítica (Marte® AY220);
- ✓ Agitador magnético (IKA® RH-KT/C);
- ✓ Barra magnética;
- ✓ Espectrofotômetro (SHIMADZU UV-1800);

- ✓ Ultrassom (Branson® 251 OR-MT);
- ✓ Cartuchos (Oasis® MCX Cartridge Waters®; Sep Pack 5g Waters®);
- ✓ Analisador de umidade infravermelho (Mettler LP 16 acoplado com Mettler PM 4600 Delta Range);
- ✓ Centrifuga (Hettich Zentrifugen EBA 12);
- ✓ Evaporador a vácuo (Buchi 461 Water Bath, RE 21);
- ✓ Moinho (IKA® A11 basic);
- ✓ Liofilizador (L101 LIOTOP);
- ✓ Freezer (Brastemp- Freezer flex).

## 4.2. Métodos

### 4.2.1. Obtenção da pele do jamelão

Para a obtenção da pele do *Syzygium cumini*, os frutos coletados foram selecionados manualmente, lavados em água corrente para retirar as sujidades e frutos danificados. Depois, o fruto foi sanitizado em solução de hipoclorito de sódio 10% por um período de aproximadamente 10 minutos. Os frutos foram armazenados em bandejas de plástico e mantidos sob o congelamento a  $-18^{\circ}\text{C}$  até a utilização.

### 4.2.2. Obtenção do pó da pele de jamelão liofilizada

Após o descascamento manual, as peles obtidas foram colocadas em quatro placas de alumínio (14,0 x 14,0 cm largura por 1,0 cm de profundidade), para melhor homogeneidade na liofilização, em seguida levadas para o freezer para congelamento a  $-18^{\circ}\text{C}$ .

Após congelamento as peles dos frutos foram submetidas ao processo de liofilização (Figura 1a) por um período de aproximadamente 48 horas, à temperatura de  $-50^{\circ}\text{C}$  sob vácuo. As peles do fruto liofilizadas foram moídas em moinho analítico (IKA® A11 basic), para a obtenção do pó (Figura 19).



(a)



(b)

**Figura 19.** a) Liofilizador L101 LIOTOP (**Fonte:** Sidney Pacheco - acervo EMBRAPA - Alimentos); b) pó da pele do jamelão liofilizado (**Fonte:** Nathália Mendes)

## 4.3. Obtenção dos extratos

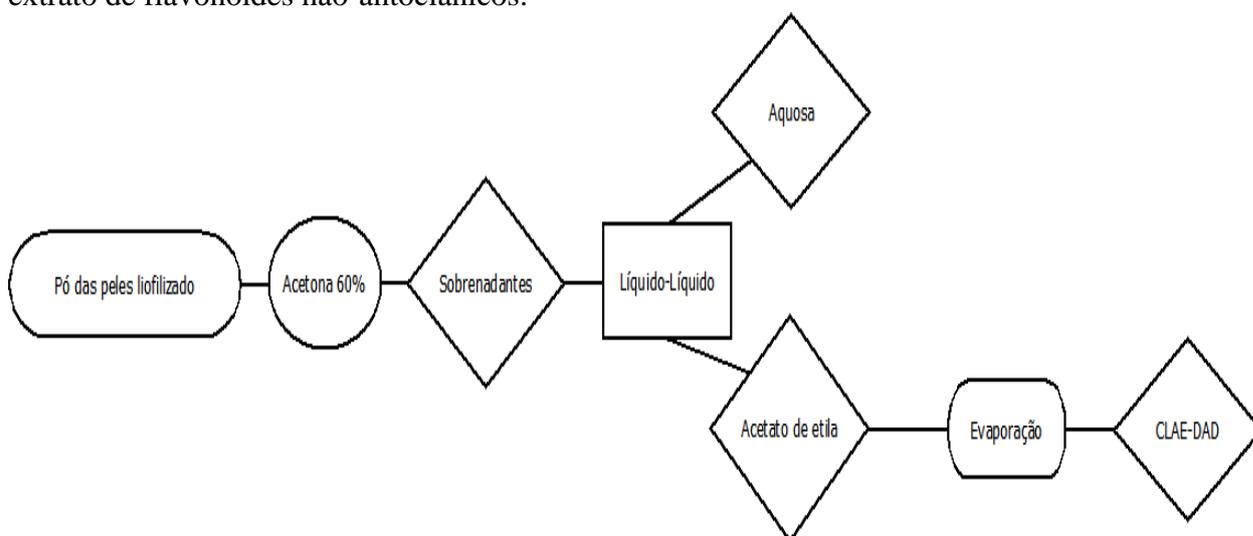
Para a elaboração desse trabalho, foi necessário a preparação de três extratos diferentes, onde o primeiro extrato de caráter de seletividade foi elaborado para a seleção e

indicação de flavonoides não-antocianicos (extrato de flavonoides não-antocianicos). O segundo extrato, também de caráter seletivo, foi confeccionado a fim de isolar as antocianinas e identifica-las (extrato antociânico), e por último foi elaborado um extrato sem caráter de seleção, onde foi utilizado dois solventes diferentes (metanol e acetona), onde esse extrato é composto de todas as substâncias apolares que esse solventes conseguiram extrair como as antocianinas, flavonoides, alguns carotenoides entre outros (extrato metanólico). Uma vez que o extrato antociânico apresente somente as antocianinas isoladas, o extrato metanólico será o comparativo em relação ao extrato antociânico, serão avaliadas suas capacidades antioxidantes por dois métodos diferentes (ABTS e ORAC), por comparação saber qual foi a contribuição das antocianinas em relação ao extrato metanólico.

#### 4.3.1. Obtenção do extrato de flavonoides não-antociânico

Para esta análise, a extração dos flavonoides do pó da pele dos frutos do jamelão foi realizada conforme a metodologia descrita por Kennedy (2002) e modificada por Martins (2016). Neste procedimento, foi pesada 5,0g do pó das peles liofilizadas (dos anos de 2017 e 2018) em tubo Falcon. Em seguida foram adicionados 40,0 mL de solução de acetona a 60% em água. Posteriormente foram homegeinizadas em Vortex, submetidas ao banho de ultrassom por 30 minutos e centrifugados por 10 minutos a 6.000 rpm. Esse processo de extração foi repetido três vezes, sendo todo o sobrenadante (extrato) recolhido e concentrado no rotaevaporador a vácuo.

Após a evaporação da acetona no rotaevaporador, o extrato aquoso (40,0 mL) foi diluído em mais 60 mL de água (totalizando 100 mL) e adicionado de 100 mL de acetato de etila, no sistema de solventes acetato de etila: água 1:1, para a partição líquido-líquido. O processo de partição líquido-líquido foi realizado com a utilização de funil de separação, onde se retira a parte aquosa e, a fase de acetato de etila, filtra-se com lã de vidro e sulfato de sódio, sendo esta fase colocada novamente no rotaevaporador a vácuo, equipado com banho de aquecimento a 60° C, para a evaporação do acetato de etila, ficando somente o resíduo. O processo de partição foi repetido três vezes. Na Figura 20 está o fluxograma de elaboração do extrato de flavonóides não-antocianicos.



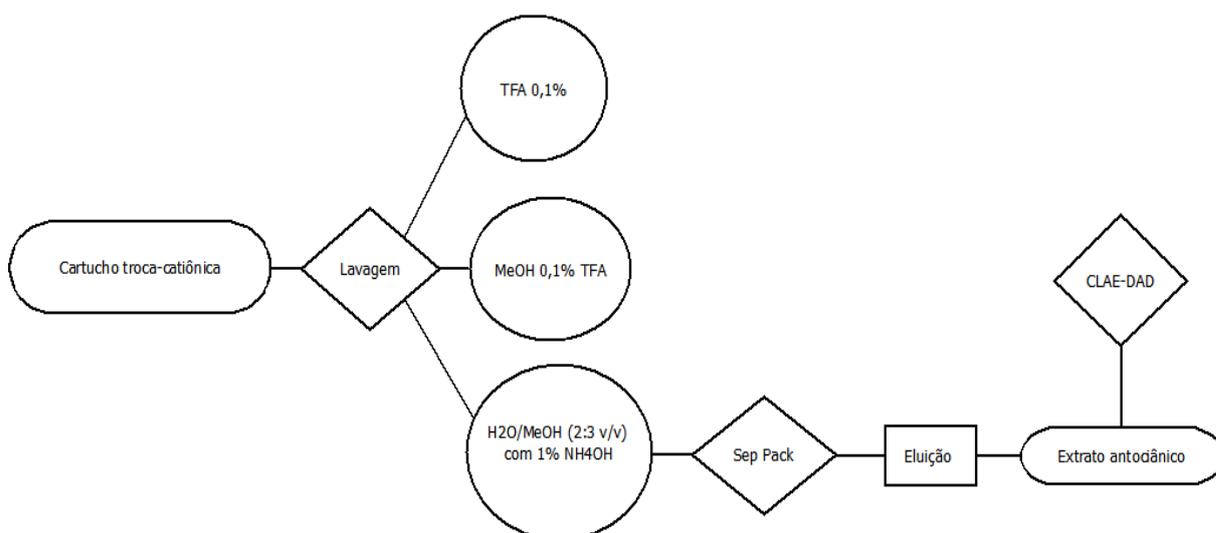
**Figura 20:** Fluxograma de elaboração do extrato de flavonóides não-antociânico.

### 4.3.2. Obtenção do extrato antociânico

Para a obtenção do extrato antociânico, utilizando a metodologia de Santiago et al., (2016), foram pesados em tubo de Falcon, aproximadamente 0,5 g do pó das peles de jamelão liofilizadas, adicionada 30,0 mL de acetona 70% em água Milli-Q. Após esta adição, a solução foi homogeneizada em vortex, seguido de banho de ultrassom por 15 minutos a 45 °C e centrifugação por 10 minutos a 6.000 rpm, o sobrenadante foi recolhido e transferido para balão de fundo chato, seguido de evaporação em rotaevaporador.

Após a evaporação, foi realizado partição líquido-líquido com acetato de etila, conforme metodologia de Kennedy (2002) modificada por Martins (2016). O processo de partição foi repetido três vezes. Com a partição gerou-se dois extratos distintos (extrato de acetato de etila e extrato aquoso). O extrato de acetato de etila foi desprezado, e o extrato aquoso foi reservado para a obtenção das antocianinas.

O extrato aquoso da partição líquido-líquido foi diluído aproximadamente 10 vezes com água Milli-Q e aplicado no cartucho Oasis® MCX Cartridge Waters®, seguindo a metodologia de He e Giusti (2011), com adaptações. A fração de interesse (antocianinas), foi eluída com água/metanol (40:60, v/v) contendo 1% NH<sub>4</sub>OH. Fluxograma do isolamento das antocianinas pelo cartucho de troca- catiônica (Figura 21).



**Figura 21:** Fluxograma de isolamento das antocianinas com uso do cartucho Oasis® MCX Cartridge Waters.

A fração obtida na coluna Oasis® MCX Cartridge Waters foi diluída aproximadamente 10 vezes com água Milli-Q. A fração diluída foi eluída em cartucho Sep Pack 5,0 g Waters®, inicialmente condicionado com metanol acidificado com 5% de ácido fórmico. Após a eluição, o cartucho foi lavado uma vez com 2,0 mL de água Milli-Q.

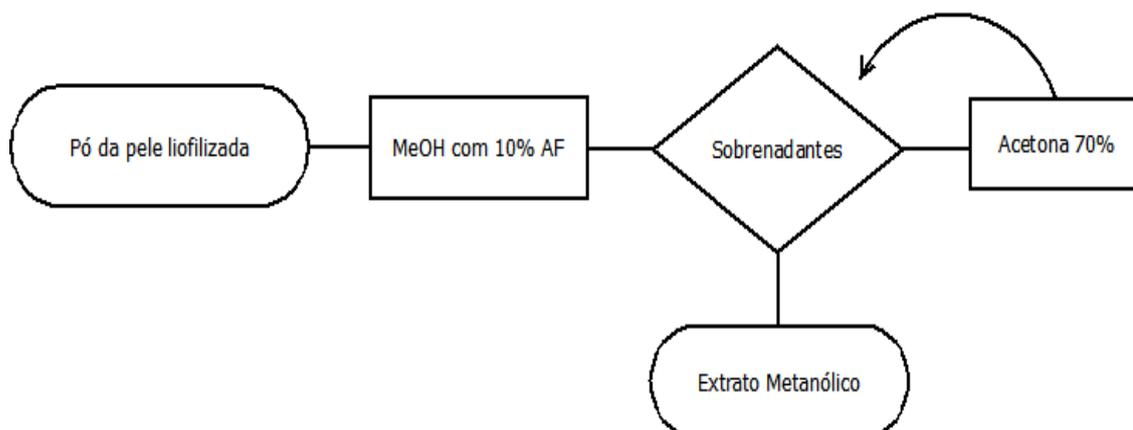
A fração retida no cartucho Sep Pack 5,0 g Waters®, foi coletada com a solução de extração de antocianinas (metanol acidificado com 10% de Ácido Fórmico), em quantidades suficientes para a eluição total do cartucho. Todo volume eluído foi coletado e avolumado para balão de vidro âmbar de 50,0 mL com a mesma solução de extração de antocianinas, adicionados de 250 µL de ácido fórmico.

### 4.3.3. Obtenção do Extrato Metanólico

Para a obtenção do extrato metanólico, foram pesados, em tubos Falcon, aproximadamente 0,5 g do pó das peles liofilizadas, adicionado de 10,0 mL da solução de

extração de antocianinas (metanol acidificado com 10% de Ácido Fórmico) (SANTIAGO et al., 2016). Após a adição da solução de extração, ocorreu a homegeinização em vortex, seguido de banho de ultrassom por 10 minutos e centrifugação por 10 minutos a 6.000 rpm, foi recolhido o sobrenadante, e no resíduo foi adicionado, novamente, 10,0 mL da solução de extração. O processo foi repetido até o total esgotamento de cor no sobrenadante, totalizando sete vezes.

Já com o resíduo sem a presença de cor (oitava extração) foi adicionada acetona 70% em água Milli-Q no lugar da solução de extração. O sobrenadante desta última extração foi armazenado em balão de cor âmbar, com capacidade de 100 mL, junto com os outros sobrenadantes retirados anteriormente. O volume do balão foi avolumado para balão de 100mL ao final do processo com a adição da solução de extração. Fluxograma do processo de elaboração do extrato metanólico (Figura 22).



**Figura 22:** Fluxograma do processo de elaboração de extrato metanólico.

#### 4.4. Análises

##### 4.4.1. Umidade do pó da pele do fruto do jamelão liofilizado

A determinação da umidade do pó da pele dos frutos do jamelão, após liofilização, foi realizada pesando aproximadamente 1g de amostra em balança infravermelho. Foram medidas as umidades dos pós dos anos de 2017 e 2018.

##### 4.4.2. Separação da fração de interesse do extrato de flavonoides não-antociânico por CLAE-DAD

O resíduo proveniente da partição líquido-líquido foi solubilizado em acetonitrila e água, na proporção de 2:1 (v/v), e injetado em Cromatógrafo a líquido de Alta Eficiência com detector de Arranjos de Diodos (CLAE-DAD). A coluna utilizada foi a Purospher® STAR RP-18 endcapped (5,0 µm), Hibart® RT (25 cm x 4.6 mm), o gradiente utilizado para a coleta está apresentado na Tabela 4, composta por duas fases: A: água com 1,0% de ácido fórmico e B: Acetonitrila. Foram realizadas sucessivas coletas da fração de interesse, automaticamente, com o auxílio de válvula Rheodyne®, modelo RV500-104, com seis canais, conectada a saída do detector (DAD), através do software Empower® a válvula foi programada para direcionar a saída do detector para o canal 4, coletada a fração do intervalo de 13 a 16 minutos, feitas

100 injeções de 20 µL, tempo total de corrida de 35 horas de coleta. Após as injeções obteve-se aproximadamente 100,0 mL de coleta.

**Tabela 4.** Gradiente utilizado para a coleta do extrato do pó da pele do fruto de jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels)

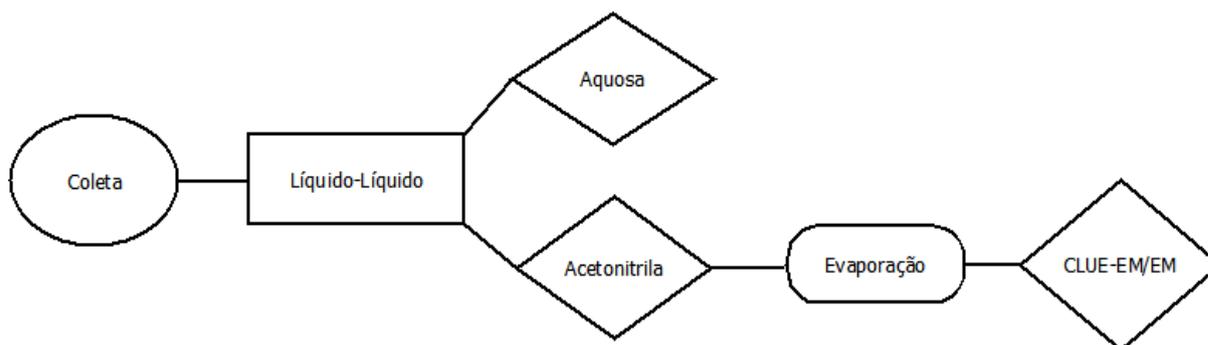
Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	Fase A	Fase B
		Água + 1,0% AF (%)	Acetonitrila (%)
06	1.2	95	5
08	1.2	88	12
10	1.2	88	12
12	1.2	60	40
14	1.2	60	40
16	1.2	40	60
18	1.2	40	60
18	1.2	95	5
21	1.2	95	5

Após a coleta da fração com o auxílio de válvula Rheodyne®, foi feita uma nova partição líquido-líquido. Para esse procedimento, primeiramente congelou-se a fração coletada, e, depois de congelada, foi retirada a acetonitrila (ponto de fusão da ACN: -45°C). O restante da fração (sem a acetonitrila) foi deixado para descongelar em temperatura ambiente, e, após o total descongelamento, a acetonitrila foi novamente adicionada, sendo essa mistura agitada e retornando-se para o congelamento. Este procedimento foi realizado duas vezes.

Com esta partição foram geradas duas frações distintas, uma de acetonitrila e outra da água proveniente da partição. A parte da água foi liofilizada, e a parte de acetonitrila foi evaporada em rotaevaporador. Após esses processos, ambas as frações foram solubilizadas com solução de extração de antocianinas, armazenadas em vidro âmbar e devidamente etiquetadas para a análise no CLUE-MS/MS.

#### 4.4.3. Indicação dos flavonoides não-antociânico do extrato de flavonoides não-antociânico por CLUE-MS/MS

Após a coleta no CLAE-DAD e posterior partição líquido-líquido, foi analisada e identificada os flavonoides não-antociânicos. Padrão utilizado foi de Cianidina da pitanga roxa disponível no laboratório de cromatografia líquida. O sistema utilizado foi *Synapt* da marca Waters® (Milford, USA), com inserção direta da amostra. Este sistema é composto pelos analisadores quadrupolo ortogonal e tempo de voo (Q-TOF- *Quadropole Time of Flight*) de alta resolução. A fonte de ionização: electrospray em modo positivo (ESI) com as seguintes condições: temperatura da fonte de 120°C, gás de dissolvatação (N<sub>2</sub>) com fluxo de 5 L.min<sup>-1</sup> e temperatura de 500°C, energia de capilar de 3,0 kV, energia do cone de amostragem de 25 V e energia de colisão de 8,0 V, o gradiente apresentado na Tabela 5. Composta por duas fases: A: água com 0,1% de ácido fórmico e B: Acetonitrila. Na figura 23 está representado o fluxograma de elaboração do extrato de flavonoides não- antociânicos após coleta no CLAE-DAD, para indicação em CLUE-EM/EM.



**Figura 23:** Fluxograma do processo de elaboração do extrato de flavonoides não- antociânico para a indicação em CLUE-EM/EM

**Tabela 5.** Gradiente utilizado para a identificação dos flavonoides presentes no extrato de flavonóides não-antociânicos do jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels)

Tempo (min)	Fluxo(mL\min)	Fase A	Fase B
		Água + 0,1% de FA	Acetonitrila (%)
0	0.350	90	10
05	0.350	85	15
10,5	0.350	81	19
11	0.350	80	20
19	0.350	70	30
19	0.350	90	10
22	0.350	90	10

#### 4.4.4. Determinação das antocianinas do extrato antociânico por CLAE-DAD

O extrato antociânico foi injetado na metodologia para a identificação de antocianinas por CLAE-DAD, sendo as condições analíticas: Cromatógrafo modelo Alliance 2995 Waters®, coluna C<sub>18</sub> 3,5µm (4,6 x 150mm), a uma temperatura de 40° C, volume de injeção de 20 µL, fluxo de 1,0 mL/minuto, temperatura do injetor de 15° C, tempo da corrida de 20 minutos, fase móvel (gradiente): A: ácido fórmico 5% em água; B: acetonitrila. Na Tabela 6 está o gradiente de concentração e tempo utilizado para a corrida. A visualização dos dados foi obtida através do software Empower®.

**Tabela 6.** Gradiente de concentração de acetonitrila e tempo de corrida no CLAE-DAD para a identificação de antocianinas do pó da pele do fruto de jamelão liofilizado (*Syzygium cumini* (L.) Skeels)

Acetonitrila (%)	Tempo de Corrida (minutos)
0,0 - 5,0	0 - 2
5,0 - 7,0	2 - 10
7,0 - 10,0	10 - 15

#### 4.5. Quantificação dos compostos fenólicos totais (método Folin-Ciocalteu)

Na determinação dos compostos fenólicos totais nos extratos do pó das peles dos frutos do jamelão liofilizados nas duas épocas de colheita, seguindo a metodologia de Georgé et al., (2005), onde foram adicionadas de 250 µL de cada extrato (dos extrato antociânico e do

extrato metanólico em tubos diferentes) em tubos de ensaio, seguido da adição de 1,25 mL de solução de Folin-Ciocalteu 10% e deixado em repouso por 2,0 minutos na temperatura ambiente. Após o repouso, adicionou-se 1,0 mL de solução de carbonato de sódio 7,5% e realizou a homegeinização em vortex, em seguida sendo levados para banho-maria por 15 minutos a 50° C. Após os tubos com a solução foram resfriados em banho de gelo por 30 segundos, em seguida sendo levados para o espectrofotômetro para as leituras das absorvâncias,

Todos os procedimentos dessa análise ocorreram em triplicatas, em que para cada triplicata uma solução testemunha (branco) foi confeccionada. Para a solução do branco, foram pipetados 250 µL de solução de acetona 7% e realizado os mesmos procedimentos dos extratos. A curva padrão (Apêndice- Figura A1) foi obtida da pesagem de 0,01 g de ácido gálico, sendo avolumado em balão com capacidade de 100,0 mL com adição de solução de acetona 7%. A concentração de fenólicos totais foi calculada conforme a Equação 1.

$$FT = \left( C_{EB} \cdot \frac{D_{EB}}{m} \right) \cdot 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Onde,

FT: concentração de fenólicos totais expresso em mg de ácido gálico por 100 g do extrato ( $\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ );

$C_{EB}$ : concentração de ácido gálico na solução do extrato ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), referente ao extrato bruto;

$D_{EB}$ : diluição do extrato (L), referente ao extrato bruto;

m: massa do pó da pele dos frutos utilizado na extração (g);

Os valores obtidos para a concentração dos fenólicos totais dos extratos nas diferentes safras de colheita (2017 e 2018) foram submetidos ao teste t ( $P \geq 0,95$ ).

## 4.6. Capacidade antioxidante

A capacidade antioxidante foi medida nos dois extratos (metanólico e antociânico) das diferentes safras de colheita (2017 e 2018) e pelo método TEAC (Capacidade antioxidante Trolox equivalente) e pelo ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity). A fim de saber a contribuição da capacidade antioxidante das antocianinas presentes na pele do jmelão.

### 4.6.1. Método TEAC- Capacidade antioxidante Trolox equivalente

A análise da capacidade antioxidante pelo método TEAC foi realizada segundo Rufino et al. (2007). O radical ABTS $\cdot^+$  foi obtido pela reação da solução estoque de ABTS  $7 \text{ mMol} \cdot \text{L}^{-1}$  com a solução persulfato de potássio  $140 \text{ mMol} \cdot \text{L}^{-1}$  por 18 horas protegido do escuro. O radical ABTS $\cdot^+$  foi diluído com etanol até se obter uma absorvância de  $0,7 \text{ nm} \pm 0,05 \text{ nm}$  a  $734 \text{ nm}$ . A curva padrão (Apêndice- Figura A2) foi obtida a partir da reação de soluções de diferentes concentrações de padrão de Trolox (100, 500, 1000, 1500 e 2000  $\mu\text{Mol/L}$ ) com o radical ABTS $\cdot^+$ . Os resultados foram expressos em  $\mu\text{M}$  de Trolox $_{\text{eq}}$ /g do pó.

Para a análise da capacidade antioxidante dos extratos (Extrato antociânico e metanólico), alíquotas de  $30,0 \mu\text{L}$  dos mesmos foram adicionadas a  $3,0 \text{ ml}$  do radical ABTS $\cdot^+$  por 6 minutos de reação e, então, foi realizada a leitura em espectrofotômetro a  $734 \text{ nm}$  e determinação dos valores da capacidade antioxidante. Esta análise foi realizada em triplicata.

Os valores obtidos da capacidade antioxidante dos extratos das diferentes safras de coleta (2017 e 2018) foram submetidos ao teste t ( $P \geq 0,95$ ).

#### 4.6.2. Método ORAC- “Oxygen Radical Absorbance Capacity”

A capacidade antioxidante pelo método ORAC foi realizada segundo Zulueta et al. (2009) em fluorímetro (RCHISTO Infinit M200 TECAN®). Os extratos (Extrato antociânico e metanólico), foram diluídos 1:50 (v/v) com tampão fosfato de sódio (75 mMol.L-1, pH 7,4) e foram homegeinizadas em vortex por 10 segundos. Em placa de 96 poços de cor preta foram adicionadas 80,0 µL das amostras nos compartimentos (triplicatas), com exceção das três últimas células, em que foram adicionados fluoresceína pura. Após esses procedimentos as placas com as amostras e a fluoresceína foram levadas para o fluorímetro para as leituras e determinação dos valores da capacidade antioxidante. A curva de calibração do fluorímetro está representada no Apêndice (Figura A3).

Os valores encontrados para a capacidade antioxidante dos extratos do pó das peles do fruto de jamelão das duas épocas de colheita (2017 e 2018) foram submetidos ao teste t ( $P \geq 0,95$ ).

#### 4.7. Estabilidade de antocianinas (método pH diferencial)

O processo de determinação dos valores de concentração de antocianinas nos extratos do pó das peles do fruto de jamelão nas diferentes épocas ocorreu pelo método pH diferencial, seguindo a metodologia de Giusti and Wrolstad, (2001) com adaptações para o presente estudo. Em seis balões volumétricos de cor âmbar e capacidade de 10, mL, foi pesado 1,0 g dos extratos antociânico e metanólico, do ano de coleta de 2017, para as soluções do pH 1,0 e do pH 4,5, sendo esta operação realizada em triplicata. Em seguida, foi realizado o ajuste do volume do balão volumétrico com a solução tampão para os respectivos pH's e a homegeinização em vortex por 10 segundos.

Após a homogenização, as soluções com os extratos (metanólico e antociânico), foram deixadas em repouso por 20 minutos. Posteriormente, com o auxílio de papel filtro, as soluções com os extratos foram filtradas e transferidas para becker de 100 mL. Passados 30 minutos da adição da solução tampão, no espectrofotômetro, foram realizadas as leituras, em dois comprimentos de onda (510 nm e 700 nm), tanto para a solução com os extratos no pH 1,0, quanto no pH 4,5.

Os valores de antocianina totais foram calculados pela Equação 2 e pela Equação 3, utilizando as leituras obtidas com as amostras diluídas com pH 1,0, as antocianinas monoméricas, foram calculadas utilizando as Equações 4 e 5, em que se utilizou a diferença entre as leituras para a solução com o pH 1,0 e o pH 4,5.

$$Abs_{(Totais)} = (Abs_{(510)} - Abs_{(700)}) \quad (\text{Equação 2})$$

$$C_{(mg \cdot L^{-1})} = \frac{(Abs_{(Totais)} \cdot PM \cdot FD \cdot 1000)}{\epsilon} \quad (\text{Equação 3})$$

$$Abs_{(Monomérico)} = (Abs_{(510)} - Abs_{(700)})_{pH\ 1,0} - (Abs_{(510)} - Abs_{(700)})_{pH\ 4,5} \quad (\text{Equação 4})$$

$$C'_{(mg\cdot L^{-1})} = \frac{(Abs_{(Monomérico)} \cdot PM \cdot FD \cdot 1000)}{\varepsilon} \quad (\text{Equação 5})$$

Onde,

Abs: leitura de absorbância no respectivo comprimento de onda;

C: concentração de antocianinas totais ( $mg\cdot L^{-1}$ );

PM: peso molecular da antocianina ( $449,2\ g\cdot mol^{-1}$ )

FD: fator de diluição (10)

$\varepsilon$ : absorvidade da cianidina-3-glicosídeo (26.900)

C': concentração de antocianinas monoméricas ( $mg\cdot L^{-1}$ )

Para a determinação da estabilidade das antocianinas nos extratos do pó das peles dos frutos do jamelão foi utilizado somente frutos colhidos na safra de 2017, onde determinou-se diferentes épocas de avaliação, em que a primeira ocorreu assim que as extrações foram realizadas (tempo 0,0), tanto para o extrato metanólico, como para o antociânico. As análises seguintes ocorreram a cada 15 dias, até completar 60 dias da extração. No intervalo entre cada época de avaliação, os extratos foram mantidos em geladeira na temperatura aproximada entre  $6^{\circ}\ C$  e  $10^{\circ}\ C$ .

Os dados das diferentes concentrações nas diferentes épocas da avaliação da estabilidade (0, 15, 30, 45 e 60 dias) foram submetidos à análise de variância, e, quando constatado diferenças significativas, ao teste de Tukey ( $P \geq 0,95$ ).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Pó da pele do jamelão liofilizada: Caracterização química do pó e dos extratos

Os valores médios de umidade e pH dos extratos metanólico e antociânico foram medidos em triplicatas e conforme mostrados na Tabela 7 e 8.

**Tabela 7.** Valores da umidade dos pós da pele do fruto de jamelão liofilizada (*Syzygium cumini* (L.) Skeels)

Ano	Umidade%
2017	2,21
2018	1,0

**Tabela 8.** Valores dos pH dos extratos metanólico e antociânico da pele do fruto de jamelão liofilizada (*Syzygium cumini* (L.) Skeels)

Extrato	----- pH (25°C) -----	
	2017	2018
Metanólico	3,90	3,59
Antociânico	2,81	2,30

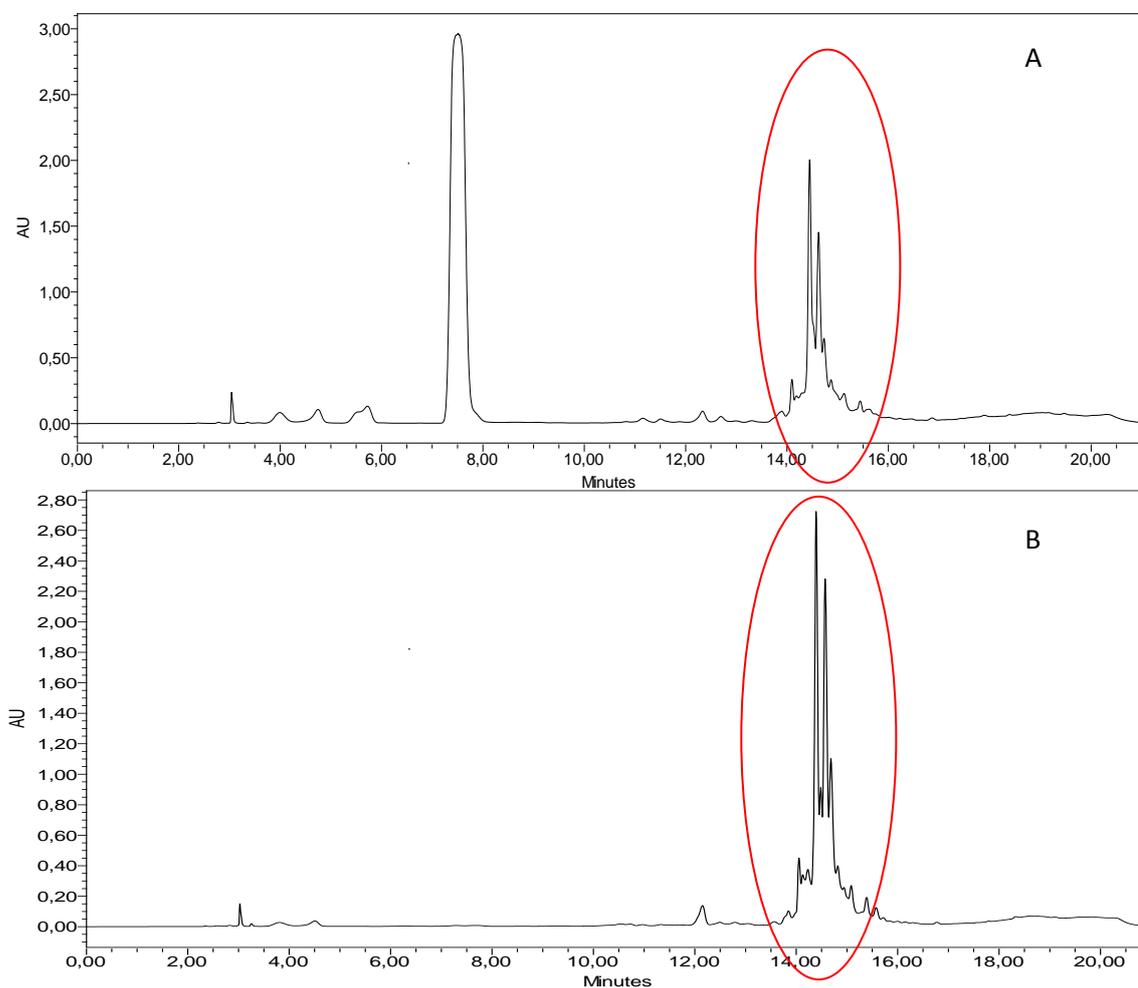
Após o processo de secagem (liofilização), que consiste da remoção da umidade por meio do congelamento da parte aquosa contida na fruta pela sublimação, com vantagens de: redução do tempo das reações de degradação, preservação das propriedades química e física do material, não desnaturação das proteínas, vitaminas e compostos voláteis, se presente, além do encolhimento reduzido. (MARQUES, 2008). O processo de secagem diminuiu as perdas pós-colheita e desperdício, podendo ser armazenadas em temperatura ambiente e por longos períodos, e quanto menor a teor de umidade (Tabela 9) maior o tempo de estocagem, desde que armazenadas em ambiente e locais apropriados. Sabemos que a umidade presente nos alimentos é um fator muito importante para ser avaliado, sendo que nas frutas *in natura* seu percentual de umidade pode chegar percentuais maiores que 90%. O fruto do jamelão quando *in natura* tem 87,7% de umidade segundo a Tabela de composição química dos alimentos (TACO, 2011). Bezerra (2015) encontrou um percentual de umidade em seu pó de jamelão liofilizado de 2,99%, e uma atividade de água ( $a_w$ ) 0,45, em uma escala que varia de 0 a 1. E foram classificados como de baixa atividade de água, que pode ser classificada quando essa atividade é  $>0,60$ , o que possibilita o mínimo de crescimento microbiano e somente a possibilidade de ocorrer reações químicas e enzimáticas. Esse valor encontrado é ainda superior ao encontrado, evidenciando que a atividade de água no pó de jamelão pode ser ainda mais baixa, proporcionando maior estabilidade do mesmo.

Em relação ao pH os resultados mostram que as antocianinas sofrem uma influência direta no meio à qual se encontra, podendo assumir diferentes colorações. O pH dos extratos avaliados encontram-se em meio ácido, onde é favorável para as antocianinas, que se encontram como íons cátion-flavílico.

### 5.2. Cromatograma da fração de flavonoides não-antociânicos por CLAE-DAD

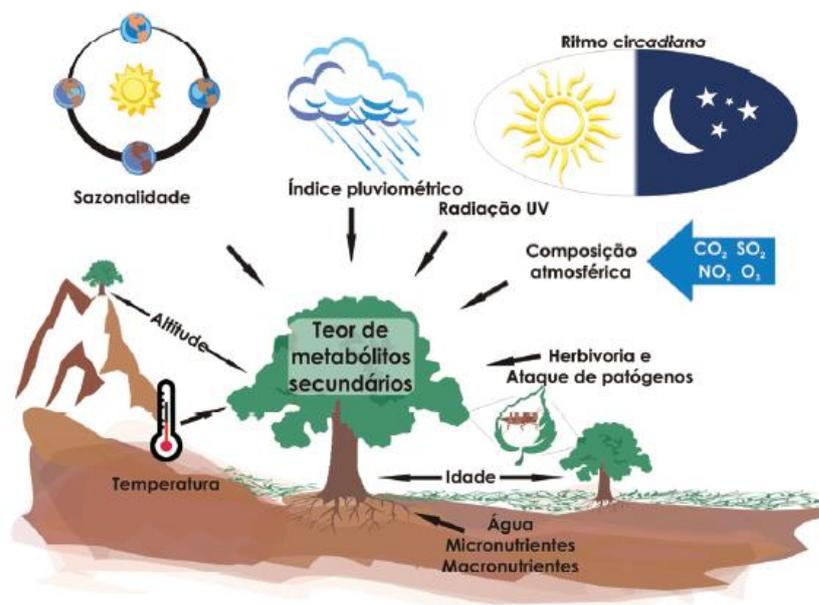
Após a injeção da coleta da fração de flavonoides não-antociânicos dos anos de 2017 e 2018, foi observado dois cromatogramas distintos, a partir deles foi possível à identificação dos flavonoides.

Observou-se que o cromatograma do pó da pele do ano de 2017 apresentou um pico entre os tempos de retenção de aproximadamente 7 a 8 minutos, o que não ocorreu para o ano de 2018 (Figura 24).



**Figura 24.** Cromatogramas dos pós da pele de jamelão extraídos em Max-Plot. A) Ano de 2017 e; B) ano de 2018. A marcação em vermelho corresponde ao tempo de corrida que foram coletadas.

Sabe-se que os metabólitos secundários sofrem influência de fatores como a disponibilidade hídrica, temperatura e irradiação solar. Gobbo-Neto e Lopes (2006) relatam que existe uma relação bem estabelecida entre os níveis de radiação solar e a produção de compostos fenólicos como as antocianinas, flavonoides e taninos. Outros fatores que podem influenciar diretamente na produção dos metabólitos secundários nas plantas como os nutrientes (micronutrientes e macronutrientes), altitude, poluição atmosférica, indução por estímulos mecânicos e/ou ataque de patógenos (Figura 25).



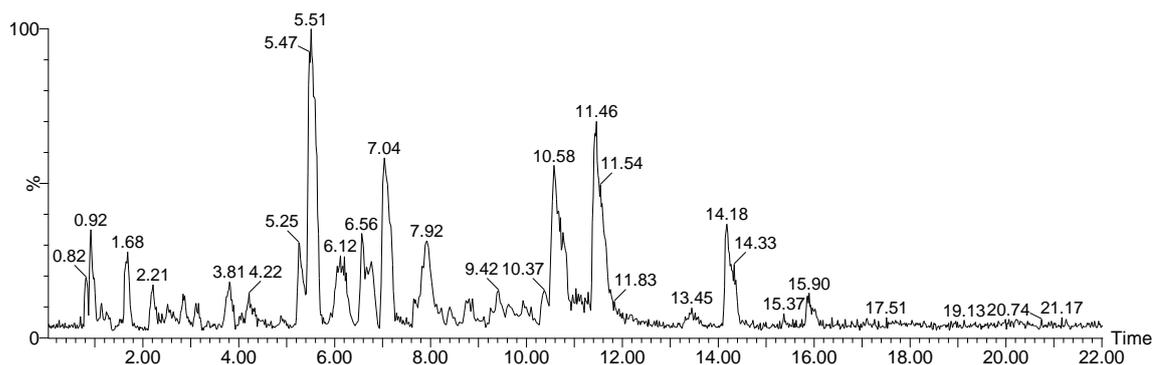
**Figura 25.** Fatores que influenciam na produção dos metabólitos secundários das plantas  
**Fonte:** Gobbo-Neto e Lopes (2006)

Morais (2009), avaliando a influência de fatores abióticos na composição química de óleos essenciais, menciona que fatores fisiológicos como a fotossíntese, abertura e fechamento dos estômatos, crescimento e expansão foliar, são fatores que influenciam diretamente quando a planta sofre estresse hídrico, podendo gerar mudanças na produção dos metabólitos. Segundo dados coletados do INMET e CPTEC/INPE, para os anos de 2016 (referente à coleta de 2017) e 2017 (referente à coleta de 2018), a variação da temperatura entre os meses de floração e enchimento dos frutos, não houve variação entre os anos, ficando em torno de 25°C, ocorrendo o mesmo para o índice de radiação solar entre os dois anos (média de 190 W·m<sup>-2</sup>) mas a precipitação do ano de 2016 foi menor (356,2 mm), que do ano de 2017 (461,5 mm), ou seja, choveu no ano de 2016 (105,3mm) a menos que o ano de 2017 nos meses de janeiro a dezembro de cada ano, podendo ter influenciado na produção desses metabólitos (Figura 3).

Como o estudo dos flavonoides, após se fazer uma varredura no cromatograma, foi notado a possível presença de flavonoides, por isso, se concentrou e coletou-se entre os tempos de 13 a 16 minutos. Para o presente estudo os cromatogramas não sofreram variação entre os dois anos avaliados, por esse motivo, somente foi injetado para a sua indicação o ano de 2018, por estar mais concentrado que ano de 2017, facilitando na detecção dos compostos.

### 5.3. Indicação dos flavonoides não-antocianíco por CLUE-EM/EM

A separação e a indicação dos flavonoides não-antocianícos presentes na fração não-antocianíca isolada por CLAE-DAD, foi realizada por CLUE-EM, como o mostra a Figura 26, na figura está apresentada somente o cromatograma do ano de 2018. Os cromatograma abaixo mostra as injeções de 2017 e 2018, onde ambas apresentaram o mesmo perfil cromatográfico.

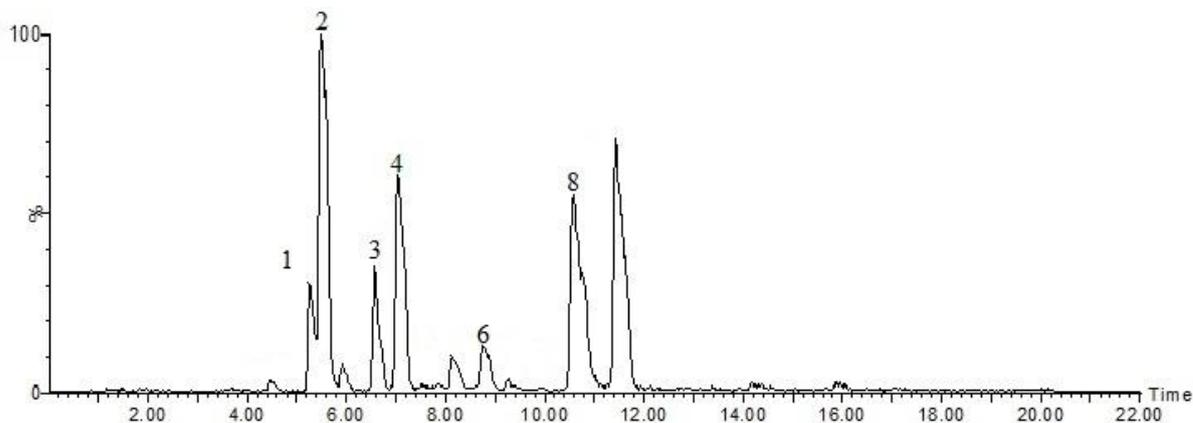


**Figura 26.** Cromatograma da fração isolada de flavonoides não-antociânicos por CLUE-EM

A indicação dos flavonoides não-antociânicos isolados por CLAE-DAD, foi realizada por espectrometria de massas, que registrou os íons moleculares correspondentes a cada flavonoide. Foram indicados 8 flavonoides não-antociânicos, com o auxílio dos fragmentos gerados da análise da espectrometria de massas e da literatura (artigos), onde foram indicados por esses métodos pela falta de padrões no laboratório para a identificação e confirmação delas, como mostra a Tabela 9.

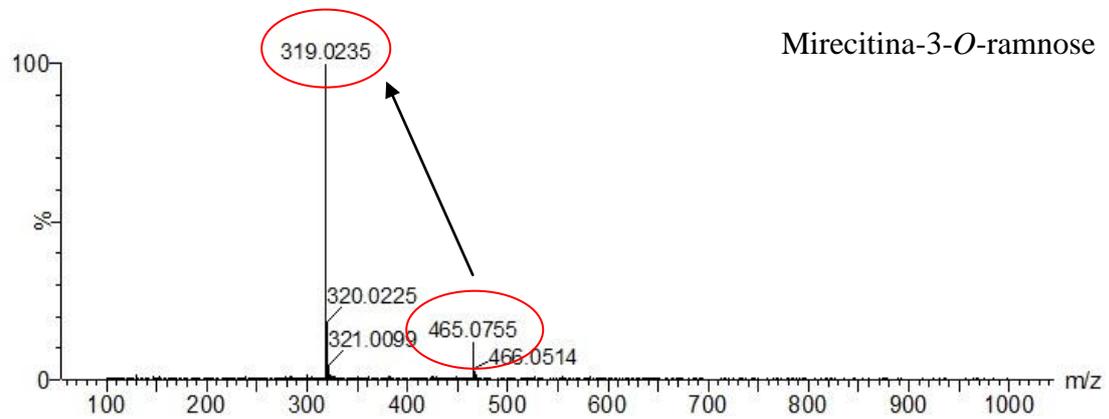
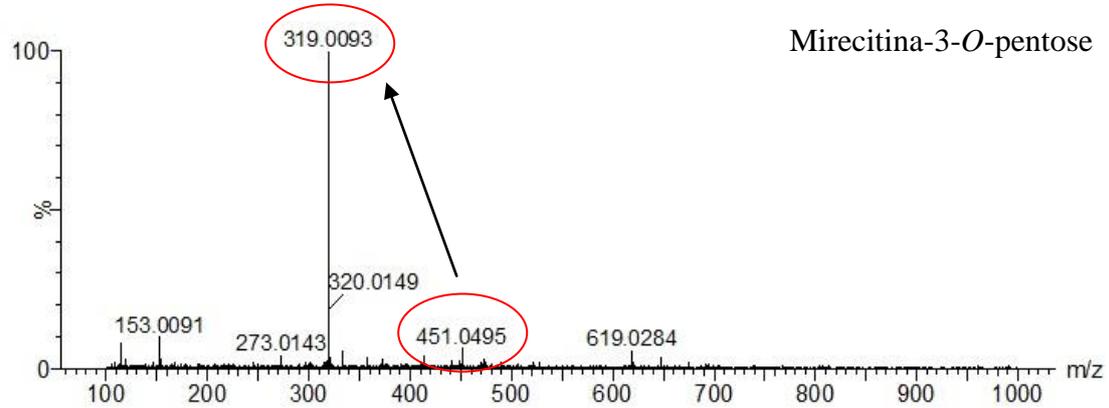
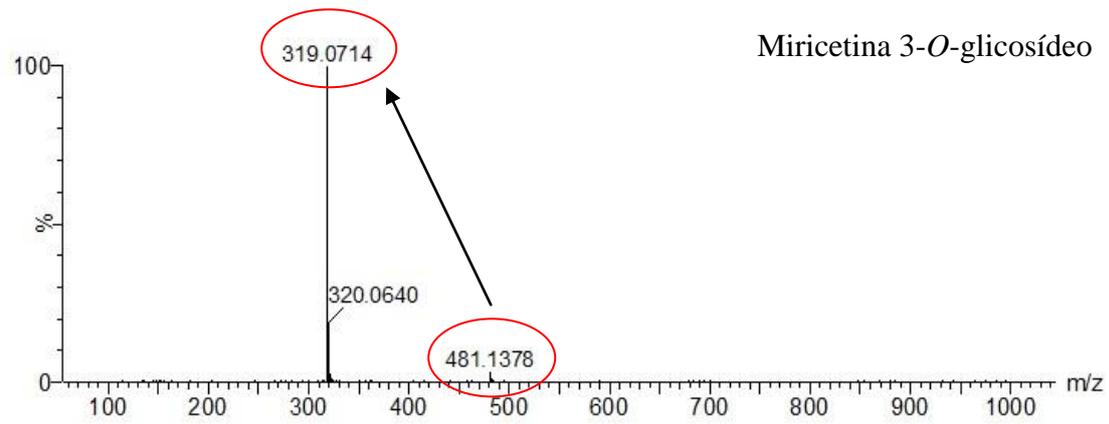
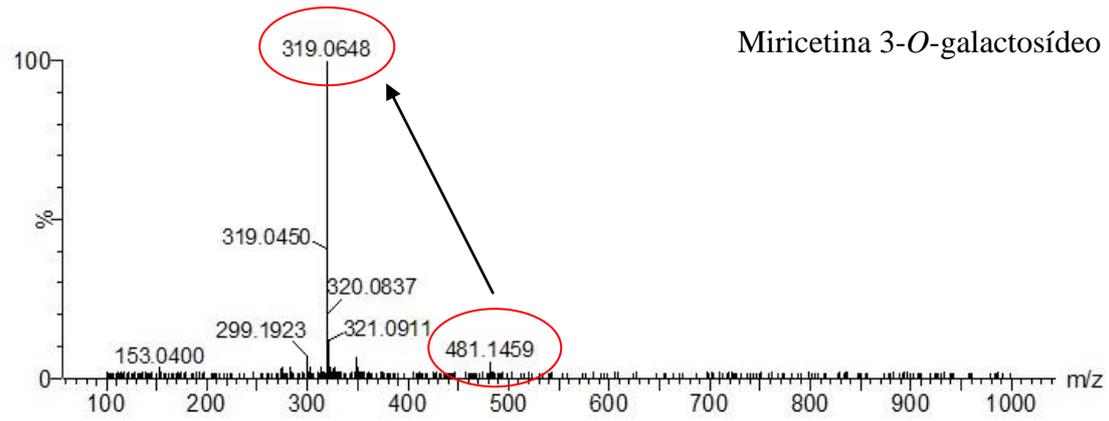
**Tabela 9.** Flavonoides encontrados no extrato da pele do fruto de jamelão liofilizado (*Syzygium cumini* (L.) Skeels)

Picos	T <sub>R</sub> (min)	Flavonoides	M/Z	Íon base
1	5.27	Miricetina 3- <i>O</i> -galactosídeo	481.1459	319.0648
2	5.49	Miricetina 3- <i>O</i> -glicosídeo	481.1378	319.0714
3	6.56	Mirecitina-3- <i>O</i> -pentose	451.0495	319.0093
4	7.04	Mirecitina-3- <i>O</i> -ramnose	465.0755	319.0235
5	7.84	Laricitrina-3- <i>O</i> -glucoronídeo	509.1031	333.0616
6	8.72	Quercitina- 3- <i>O</i> -hexose	465.1248	303.0657
7	10.33	Sirigetina-3- <i>O</i> -galactosídeo	509.0764	347.0378
8	10.56	Sirigetina-3- <i>O</i> -glicosídeo	509.0930	347.0447

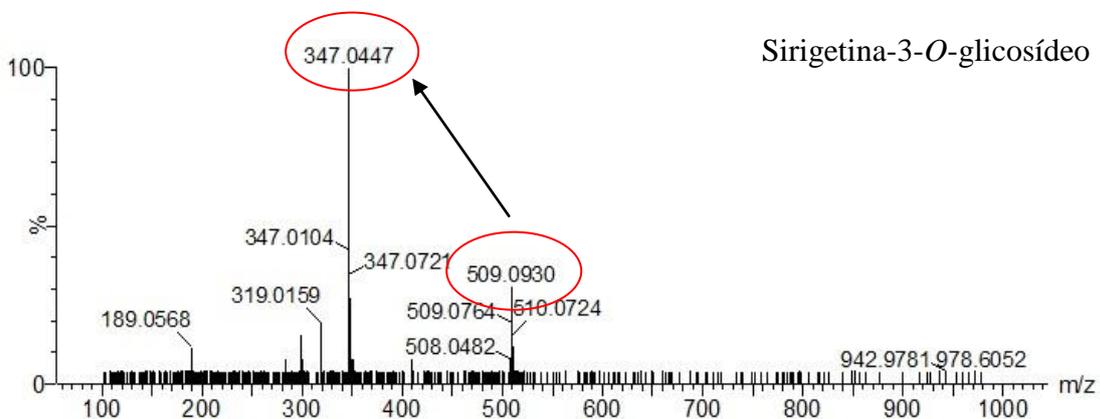
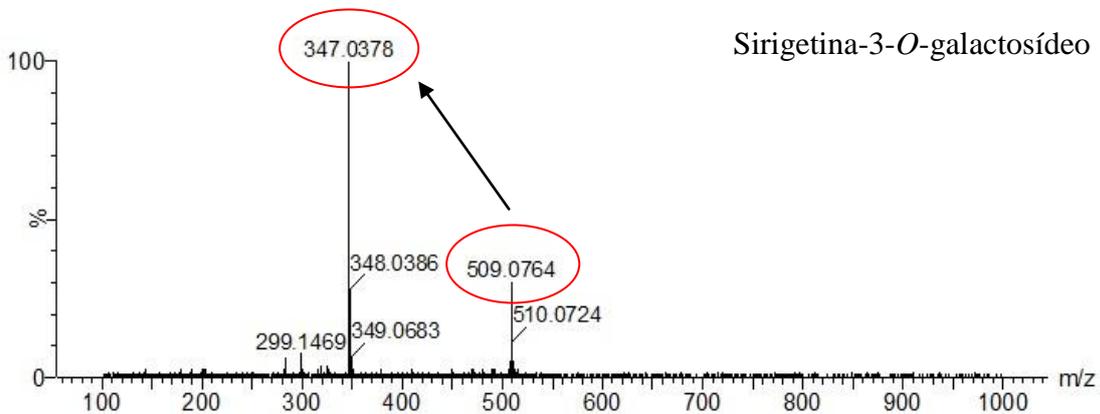
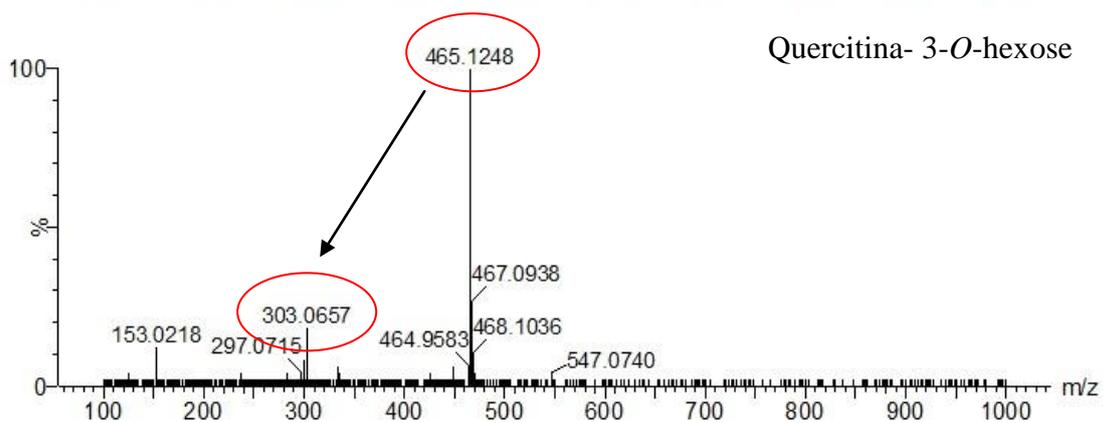
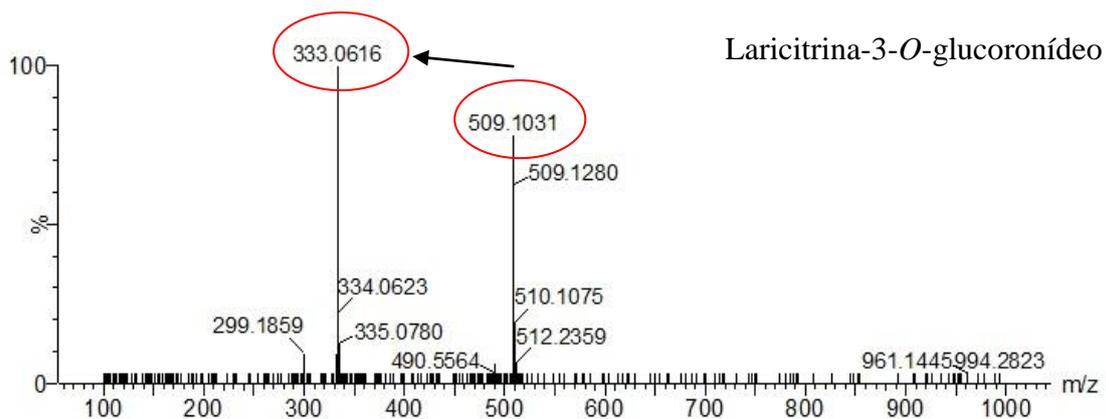


**Figura 27.** Cromatograma dos íon totais da fração com seleção dos íons m/z 319. Números sobre os picos correspondem aos picos da Tabela 9.

O espectro de massas obtido EM do flavonoide pico 1 apresenta íon molecular de  $m/z$  481.1459 referente miricetina 3-*O*-galactosídeo e  $m/z$  de 481.1378 (pico 2) referente a miricetina 3-*O*-glicosídeo tiveram fragmentação similar, gerando um íon  $m/z$  base de 319, correspondente à massa molar da antocianidina miricetina, divergindo apenas nos tempos de retenção na corrida ( $T_{R=}$  5,27 e 5,49, respectivamente) (Figuras 18 e 19). O mesmo se aplica para as outras duas miricetinas: miricetina-3-*O*-pentose de  $m/z$  451.0495 ( $T_{R=}$  6,56, Pico 3) e mirecitina-3-*O*-ramnose de  $m/z$  465.0755 ( $T_{R=}$  7,04, Pico 4). O flavonoide laricitrina-3-*O*-glucoronídeo de  $m/z$  de 509.1031 ( $T_{R=}$  7,84, Pico 5), teve uma fragmentação gerando íon  $m/z$  base 333 referente a sua antocianidina. A quercitina- 3-*O*-hexose de  $m/z$  de 465.1248 ( $T_{R=}$  8,72, Pico 6) teve uma fragmentação gerando íon  $m/z$  base de 303 referente à sua antocianidina quercitina. Por última, a sirigetina-3-*O*-galactosídeo de  $m/z$  de 509.0764 ( $T_{R=}$  10,33, Pico 7) e a sirigetina-3-*O*-glicosídeo de  $m/z$  de 509.0930 ( $T_{R=}$  10,56, Pico 8), tiveram uma fragmentação similar gerando um íon  $m/z$  base de 347, correspondente à massa molar da antocianidina sirigetina, diferenciando apenas nos tempos de retenção na corrida (Figuras 27, 28A e 28B).



**Figura 28A.** Espectros de massas dos flavonoides presentes do pó da pele liofilizada de *S. cumini*.



**Figura 28B.** Espectros de massas dos flavonoides presentes do pó da pele liofilizada de *S. cumini*.

Tavares et al. (2016), em estudo sobre os compostos fenólicos presentes no *S. cumini* encontrou os flavonoides: miricetina 3-*O*-galactosídeo, miricetina 3-*O*-glicosídeo, mirecitina-3-*O*-pentose, mirecitina-3-*O*-ramnose, sirigetina-3-*O*-galactosídeo, sirigetina-3-*O*-glicosídeo. E outros três flavonoides: miricetina 3-*O*- glucoronídeo, laricitrina-3-*O*- galactosídeo e laricitrina-3-*O*- glicosídeo. E Faria et al. (2011), em estudo sobre o mesmo fruto encontrou compostos não-antociânicos, a dihidromiricetina-diglicosídeo, metil-dihidromiricetina-diglicosídeo, dimetil- dihidromiricetina-diglicosídeo, miricetin-3-*O*-glucosídeo, miricetina-3-*O*- pentosídeo, miricetina-3-*O*- ranmosídeo e miricetina-acetil- ranmosídeo.

E em outras frutas como o de Lantzouraki et al. (2015), avaliando o conteúdo de fenólicos totais em vinho de uva e romã, encontrou a laricitrina-3-*O*-glucosídeo, miricetin-3-*O*-galactosídeo, miricetin-3-*O*-glucosídeo, mirecitina-3-*O*-ramnose, sirigetina-3-*O*-glicosídeo e laricitrina-3-*O*-glicosídeo. E Aranaz et al. (2017), encontrou em morangos e mirtilo a miricetina 3-*O*-glicosídeo, laricitrina-3-*O*-glucosídica, sirigetina-3-*O*-glicosídeo. E Castillo-Muñoz et al. (2007), estudou o perfil dos flavonoides em uvas vermelhas e encontrou a miricetina 3-*O*-glucoronídeo, miricetina 3-*O*-glicosídeo, quercitina- 3-*O*- glucoronídeo, quercitina- 3-*O*- glicosídeo, laricitrina-3-*O*- glicosídeo, sirigetina-3-*O*-glicosídeo e laricitrina-3-*O*-galactosídeo.

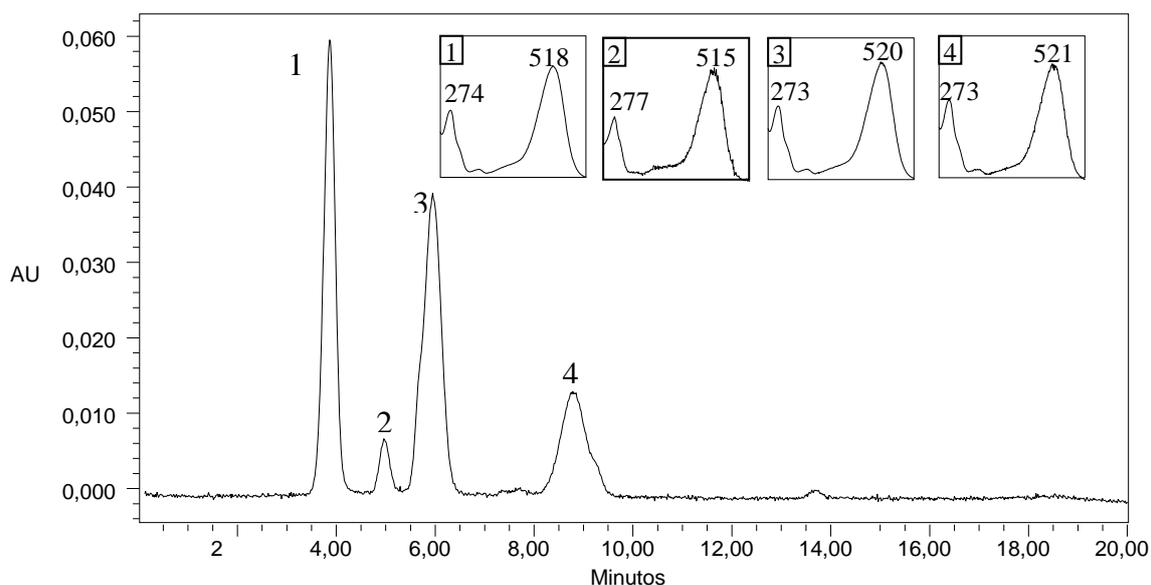
Foi observado que na literatura dos oito flavonoides indicados não foi relatado dois flavonoide não-antociânicos, a laricitrina-3-*O*-glucoronídeo e quercitina- 3-*O*-hexose (Figura 24B).

#### **5.4. Identificação das antocianinas por CLAE-DAD**

As antocianinas são substâncias bioativas com característica marcante como a capacidade antioxidante, e foi possível a identificação de quatro das seis antocianinas mais comumente encontradas em fruto, sendo utilizada a técnica de CLAE-DAD que permitiu sua confirmação e identificação das antocianinas isoladas.

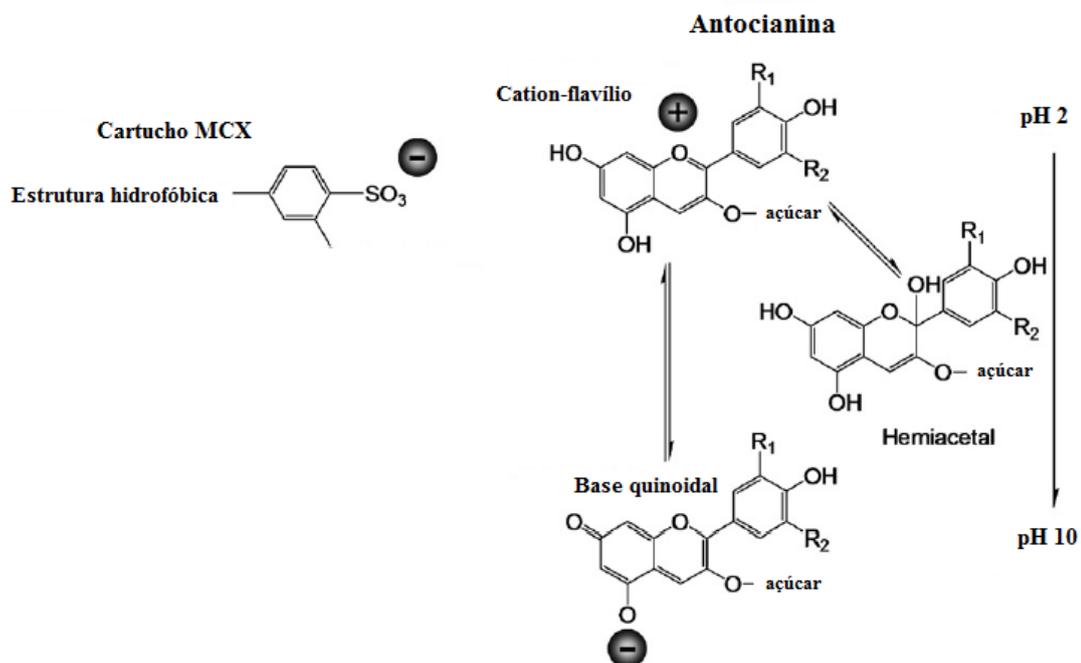
O cromatograma da análise realizada por CLAE-DAD do pó liofilizado da pele dos frutos do jamelão, apresentou quatro picos majoritários. As substâncias foram identificadas por comparação de seus tempos de retenção e pelos espectros UV-Vis (520 nm), a partir da injeção de padrões isolados no laboratório de cromatografia líquida, onde já tinha ocorrido sua prévia identificação de trabalhos anteriores executados no laboratório de cromatografia.

Das seis antocianinas comumente encontradas no fruto do jamelão, segundo a literatura (SANTIAGO et al, 2016), neste trabalho, foram identificadas quatro antocianinas na pele dos frutos de jamelão liofilizada: delphinidina-3,5-*O*- diglicosilada ( $T_R = 2,8$ , Pico 1); cianidina-3,5-*O*- diglicosilada ( $T_R = 3,9$ , Pico 2); petunidina-3,5-*O*- diglicosilada ( $T_R = 4,6$ , Pico 3); malvidina-3,5-*O*- diglicosilada ( $T_R = 6,9$ , Pico 4), sendo a petunidina-3,5-*O*-diglicosilada a antocianina de majoritária. O cromatograma da análise e os espectros estão representados na Figura 29.



**Figura 29.** Cromatograma das antocianinas do extrato de pó da pele do fruto de jamelão liofilizado extraídos a 520nm. Picos identificados. Pico 1: Delfinidina-3,5-*O* - diglicosilada; Pico 2- Cianidina-3,5-*O*- diglicosilada; Pico 3- Petunidina-3,5-*O*- diglicosilada; Pico 4- Malvidina-3,5-*O*- diglicosilada. AU: Unidade de absorvância.

Os resultados obtidos comprovam a eficiência da metodologia utilizada para isolamento das antocianinas da pele dos frutos do jamelão, pelo método de separação em cartucho Oasis® MCX Cartridge Waters (troca-catiônica). Esse cartucho combina dois diferentes mecanismos, a troca catiônica e adsorção da fase reversa (onde a fase estacionária é mais apolar e a fase móvel mais polar). Seu material consiste de um copolímero de divinilbenzênico-vinilpirrolidona, onde um átomo de hidrogênio do anel benzênico é substituído por um grupo sulfônico. A interação hidrofóbica ocorre pelo grupo dinilbenzênico e as antocianinas ficam retidas devido à forte interação entre o anel benzênico e o anel das antocianinas (cátion-flavinium), as antocianinas por serem cátions podem ficar retidas na fase estacionária. Para a eluição é necessário a adição do hidróxido de amônio (NH<sub>4</sub>OH), (Figura 30) que neutraliza o cátion- flavílico formando uma base quinoidal possibilitando a sua eluição. Esse método de separação em cartucho, foi otimizado para a obtenção de maior seletividade e sensibilidade para extração de compostos com grupos de troca-catiônica como as antocianinas, no trabalho citado foi isolada antocianinas de frutas e verduras como groselha preta com eficiência de isolamento de 99,7% , mirtilo (99,9%), rabanetes (85,6%), framboesas pretas (97,4%), morangos (94,2%), repolho roxo (99,4%), uva (93,8%) e cenoura roxa (99,2%) onde comprovou a eficiência desse cartucho comparados com outra metodologia (C<sub>18</sub> otimizada) (HE e GIUSTI, 2011).



**Figura 30.** Esquema da estrutura química do sorbente MCX e a molécula de antocianina em diferentes pH. **Fonte:** He e Giusti, (2011).

O perfil das antocianinas do jamelão já foi descrito em trabalhos anteriores como o de Santiago et al (2016), em um trabalho onde objetivou-se a caracterização do fruto do jamelão, identificou seis antocianinas presentes na pele do fruto liofilizado: delphinidina-3,5-*O*-diglicosídeo, cianidina-3,5-*O*-diglicosídeo, delphinidina-3-*O*-glucosídeo, petunidina-3,5-*O*-diglicosídeo, peonidina-3,5-*O*-diglicosídeo e a malvidina-3,5-*O*-diglicosídeo. Brito et al (2017), em trabalho onde avalia as alterações de cor das antocianinas em diferentes pH, menciona que as principais antocianinas encontradas no fruto do jamelão são: delphinidina - 3,5-*O*-diglicosídeo, petunidina-3,5-*O*-diglicosídeo, malvidina-3,5-*O*-diglicosídeo, cianidina-3,5-*O*-diglicosídeo e peonidina-3,5- diglicosídeo. E Faria et al (2011), onde seu principal estudo foi a identificação dos compostos bioativos do jamelão, encontrou delphinidina -3,5- diglicosídeo, cianidina-3,5- diglicosídeo, petunidina-3,5-*O*-diglicosídeo, peonidina-3,5-*O* - diglicosídeo, delphinidina -3- *O*-glicosídeo, malvidina-3,5-*O*-diglicosídeo, delphinidina-acetil- diglicosídeo, cianidina-3-*O*- glicosídeo, petunidina-3-*O*-glicosídeo e malvidina-3-*O*-glicosídeo.

### 5.5. Potencial antioxidante pelos métodos TEAC (Capacidade antioxidante Trolox equivalente) e ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

Entre os ensaios espectrofotométricos mais utilizados, destacam-se os que usam o sequestro do radical livres, como o TEAC, método considerado de media facilidade de execução, e com uma boa correlação com outras metodologias que avaliam a atividade antioxidante (SOUZA; VIEIRA; LIMA, 2011; AMERICO, 2014).

Foi avaliado o potencial antioxidante do extrato antociânico e no extrato metanólico da pele da fruta jamelão, a fim de saber a contribuição que as antocianinas exercem na atividade antioxidante total em relação ao extrato metanólico.

Os valores são dados nas duas metodologias pelo Trolox, que apresenta o percentual de inibição de concentração 1 mmol de composto de referência, sou seja, quanto maior os valores, mais forte e a seu potencial antioxidante (SOUZA; VIEIRA e LIMA, 2011)

Existem diversas metodologias de determinação do potencial antioxidante, onde essas metodologias podendo ter interferentes e são usadas para diferentes fundamentos, por isso, atualmente recomenda-se o uso de pelo menos duas técnicas diferentes para mostrar melhor o potencial antioxidante total de uma amostra (GONÇALVES, 2008). Por isso optou-se por medir o potencial antioxidante por captura do radical ABTS (TEAC), e pelo método das propriedades fluorescentes da proteína ORAC. Os resultados encontrados das análises de TEAC e ORAC nos extratos metanólico e antociânico encontram-se na Tabela 10.

**Tabela 10.** Médias dos valores de capacidade antioxidantes encontradas no pó da pele do jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) pelos métodos TEAC (Capacidade antioxidante Trolox equivalente) e ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

Extrato	TEAC ( $\mu\text{Mol Trolox}\cdot\text{g}^{-1}$ )				ORAC ( $\mu\text{Mol Trolox}\cdot\text{g}^{-1}$ )			
	2017	DP	2018	DP	2017	DP	2018	DP
Metanólico	178,78 b	8,37	739,30 a	47,19	499,91 b	13,60	759,33 a	18,41
Antociânico	32,17 a	0,47	36,89 a	16,12	147,51 a	8,73	169,56 a	10,68

Médias seguidas pela mesma letra na linha e nos diferentes métodos não diferem entre si pelo teste t de Student ( $P \geq 0,95$ ). DP: desvio padrão.

Para a capacidade antioxidante medida por TEAC, para o extrato metanólico do ano de 2018 foi encontrado  $739,30 \mu\text{Mol Trolox}\cdot\text{g}^{-1}$  que foi mais que quatro vezes maior que para o extrato do ano de 2017 ( $178,78 \mu\text{Mol Trolox}\cdot\text{g}^{-1}$ ), e Souza (2012), explica que a atividade de sequestro de radicais livres é diferenciada entre frutos diferentes, e também entre extratos do mesmo fruto, devido à grande quantidade de compostos presentes no fruto. E como foram safras diferentes, sendo a primeira safra do pó sendo confeccionada um ano antes do que o pó de 2018, também pode-se explicar essas diferenças, para o pó de 2017 pode ter a degradação de algumas substâncias que influenciaram na capacidade antioxidante. Para a confirmação dessa teoria, é necessário que se faça uma análise química do extrato metanólico, para saber quais possíveis substâncias influenciaram e/ou degradaram.

Para o extrato antociânico, não ocorreu o mesmo padrão que para o extrato metanólico. Para ambos os anos, para o ano de 2017 foi encontrado  $32,17 \mu\text{Mol Trolox}\cdot\text{g}^{-1}$  e para 2018 foi de  $36,89 \mu\text{Mol Trolox}\cdot\text{g}^{-1}$ , as capacidades antioxidantes não tiveram diferenças significativas, a influência do tempo de um safra para outra não mostrou degradação das antocianinas, uma vez que no extrato somente contêm antocianinas que foram isoladas.

Foram encontrados resultados inferiores na literatura para esse fruto, onde estudos foram feitos com a pele ou polpa, como estudo feito por Américo (2014), em polpa de jamelão onde encontrou  $18,48 \mu\text{M}\cdot\text{Trolox}\cdot\text{g}^{-1}$ . E Kuskoski et al (2006), avaliando frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas e encontrou para o extrato de jamelão em etanol  $13,3 \pm 1,9 \mu\text{M}\cdot\text{Trolox}\cdot\text{g}^{-1}$  em 30 minutos e  $20,1 \pm 1,1 \mu\text{M}\cdot\text{Trolox}\cdot\text{g}^{-1}$  em 60 minutos. E em extrato metanólico encontrou valores de  $15,0 \pm 3,1$  e  $21,0 \pm 2,4 \mu\text{M}\cdot\text{Trolox}\cdot\text{g}^{-1}$  em 30 e 60 minutos respectivamente. E valores parecidos ao extrato antociânico como Rufino et al (2010), que após análise encontrou  $29,7 \pm 0,3 \mu\text{M}\cdot\text{Trolox}\cdot\text{g}^{-1}$  e valores semelhantes ao extrato metanólico porém somente da safra 2017, foi estudo de Sá (2008), onde encontrou em pele e polpa de jamelão  $262,13 \pm 8,02 \mu\text{M}\cdot\text{Trolox}\cdot\text{g}^{-1}$ . E estudos feitos com outros frutos foi encontrado valores semelhantes para o ano de 2017 tanto para o extrato metanólico quanto para o antociânico. Onde Soares et al (2008), avaliando dois tipos de uvas encontrou valores médios de TEAC entre 89,22 e  $157,31 \mu\text{M}\cdot\text{Trolox}\cdot\text{g}^{-1}$ . Para o ano de 2018 do extrato metanólico não foi encontrado valores parecidos, somente inferiores como os citados.

Para o ensaio do potencial antioxidante por ORAC os resultados foram parecidos aos encontrados para o estudo em TEAC, para o extrato metanólico ano de 2018 foi encontrado

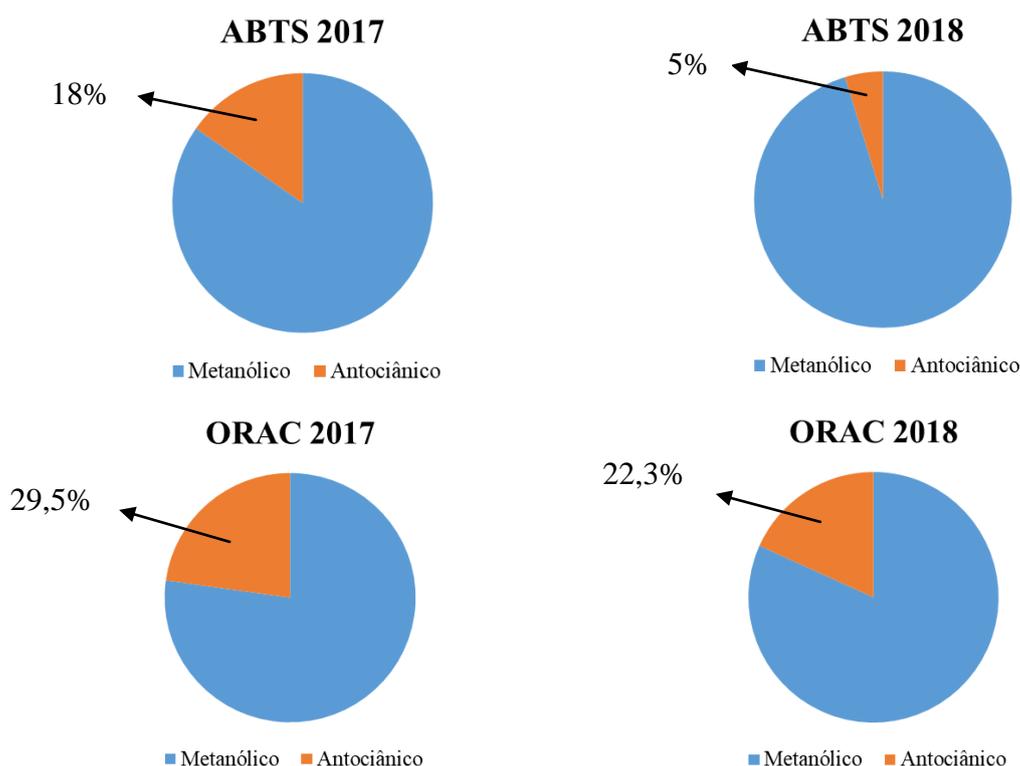
759,33  $\mu\text{Mol Trolox}\cdot\text{g}^{-1}$ , sendo quase duas vezes maior ao encontrado para o ano de 2017 do mesmo extrato (499,91  $\mu\text{Mol Trolox}\cdot\text{g}^{-1}$ ), sendo a mesma explicação feita para TEAC sobre essa possíveis diferenças entre lotes. Para o extrato antociânico também obtivemos o mesmo padrão, onde não tivemos diferenças significativas entre os anos, encontrado 147,51  $\mu\text{Mol Trolox}\cdot\text{g}^{-1}$  e 169,56  $\mu\text{Mol Trolox}\cdot\text{g}^{-1}$  para o ano de 2017 e 2018 respectivamente

Resultado superior encontrado por Sá (2008), em ambos anos e extratos, por essa metodologia de análise, encontrando  $1384,5\pm 57,27 \mu\text{M.Trolox}\cdot\text{g}^{-1}$  em ensaio com feito com o jamelão. E resultados inferiores com outro fruto como Thaipong et al (2006), onde encontrou valores de  $85,54 \mu\text{M.Trolox}\cdot\text{g}^{-1}$  para o potencial antioxidante em extratos de goiaba.

No geral o potencial antioxidante do extrato metanólico de 2017 foi inferior ao ano de 2018 da mesma metodologia de extração. E para o extrato antociânico todos os resultados foram semelhantes entre métodos, para os dois anos avaliados. Assim pode-se concluir que nos ensaios a maior variação foi observada nos extratos metanólico, onde a quantidade de substâncias presentes no extrato é maior, e no extrato antociânico onde somente existem as antocianinas que foram isoladas, eles se mantiveram proporcionalmente nos métodos de TEAC e ORAC, não tendo diferenças significativas entre lotes.

Avaliando as metodologias empregadas, podemos contatar que tanto para o extrato metanólico como o antociânico a metodologia de ORAC obteve melhores resultados que a análise de TEAC, lembrando que ambos são métodos de inibição onde a amostra é colocada em sistema que gera radicais livres, e sua inibição da ação desses radicais é quantificada (SÁ, 2008). Isso se explica, porque a análise feita por ORAC é considerada mais específica para as antocianinas, é a única metodologia que combina tempo de inibição e seu grau de inibição na amostra (HUANG et al., 2002).

Na figura 31, mostra graficamente a contribuição das antocianinas em relação ao extrato metanólico medidas pelos métodos de ABTS e ORAC, onde, para o ano de 2017 pelo método de ABTS a contribuição das antocianinas foi respectivamente 18% em comparação os extrato metanólico, e para o ano de 2018 de 5%. E para o potencial antioxidante medido por ORAC, a contribuição das antocianinas para o potencial antioxidante para o ano de 2017 foi de 29,5% e para 2018 de 22,3% em comparação ao extrato metanólico. Portanto as antocianinas obtiveram uma variação entre 5% a 29,5% de contribuição, mostrando que as antocianinas obtiveram nesse estudo uma participação relevante no potencial antioxidante total no fruto do jamelão.



**Figura 31.** Gráfico correspondentes aos potenciais antioxidantes pelos métodos de ABTS e ORAC dos extratos metanólico e antociânico do pó liofilizado da pele de jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) do ano de 2017.

### 5.6. Quantificação dos Fenólicos totais pelo método Folin-Ciocalteu

A quantificação dos fenólicos totais engloba todo o conteúdo dos compostos existentes pertencentes a subclasses de compostos redutores presente na amostra. A quantificação destes compostos foi determinada pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, o ácido gálico foi usado como padrão. O reagente consiste em uma mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungstístico, o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação, em presença de agentes redutores, como os fenólicos, forma-se o molibdênio azul e tungstênio azul. A leitura foi realizada a 740 nm em espectrofotômetro (SOUSA et al.; 2007; NEVES et al.; 2009). Os resultados encontrados para fenólicos totais para os extratos antociânico e metanólico dos anos de 2017 e 2018 encontram-se na Tabela 11.

**Tabela 11.** Médias dos valores de fenólicos totais encontradas no pó da pele do jamelão liofilizado (*Syzygium cumini* (L.) Skeels)

Extrato	Fenólicos Totais (mgEAG·100g <sup>-1</sup> )			
	2017	DP	2018	DP
Metanólico	4740,32 b	268,89	8351,87 a	136,64
Antociânico	469,18 a	27,64	482,47 a	9,82

Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste t de Student ( $P \geq 0,95$ ). DP: desvio padrão.

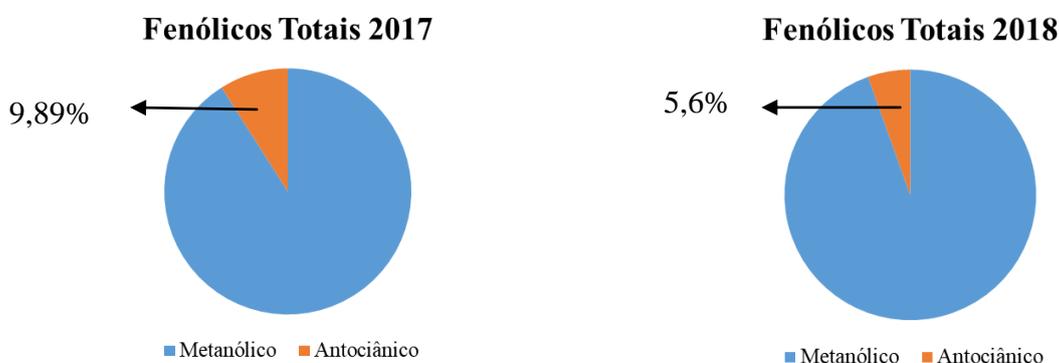
Considerando os resultados encontrados, podemos avaliar que os fenólicos totais também obtiveram o mesmo padrão aos resultados encontrados em TEAC e ORAC, onde o

ano de 2018 foi superior ao ano de 2017 no extrato metanólico, e para o extrato antociânico os extratos não obtiveram diferenças entre anos.

Foi encontrado para o extrato metanólico do ano de 2018 (8351,87 mgEAG·100g<sup>-1</sup>), e para o ano de 2017 do mesmo extrato quase duas vezes menor (4740,32 mgEAG·100g<sup>-1</sup>). E para o extrato antociânico foi encontrado para o ano de 2017 (469,18 mgEAG·100g<sup>-1</sup>), e 482,47 mgEAG·100g<sup>-1</sup> para 2018, não tendo diferenças entre anos. Foi encontrado na literatura resultados abaixo ao encontrado. Malta et al. (2017), avaliando extratos de frutas, e seu poder redutor, encontrou 268,5 mg.EAG.100g<sup>-1</sup> g para o extrato de jamelão e Luzia e Jorge (2009) encontraram valores de 130,56 mg.EAG.100g<sup>-1</sup> em extratos de sementes da mesma fruta. E Faria et al. (2011), encontrou 148.3 ± 32.4 mg.EAG.100g<sup>-1</sup> no extrato de jamelão utilizando a mesma metodologia de análise.

Os altos valores encontrados nas respectivas análises para os dois extratos dos dois lotes diferentes, pode ser justificado pelo meio no qual ocorreram suas extrações (metanol). Para todos os resultados encontrados na literatura, todos foram extraídos em uma solução de etanol em diferentes proporções, já na metodologia desse trabalho os extratos avaliados foram extraídos com metanol com 10% de ácido fórmico (solução de extração). Faria et al. (2010), cita que o etanol é menos eficiente na extração dos compostos fenólicos do que o metanol, justificando os altos valores encontrados com os da literatura aqui citados.

Podemos então com esses resultados, avaliar a contribuição das antocianinas isoladas (extrato antociânico), em relação ao extrato metanólico, que para o lote de 2017 as antocianinas obtiveram uma contribuição de 9,89% em comparação ao extrato metanólico, e para o ano de 2018 uma contribuição de 5,6%, como mostrado na Figura 32. Essas diferenças nas contribuições entre os anos de 2017 e 2018, é pela quantidade de substâncias que foram extraídas no extrato metanólico, como já citado acima.



**Figura 32.** Gráficos correspondentes a contribuição das antocianinas em porcentagem do total de fenólicos dos anos de 2017 e 2018 da pele do jamelão liofilizada (*Syzygium cumini* (L.) Skeels), em relação ao extrato metanólico.

### 5.7. Antocianinas Totais e Monoméricas pelo método do pH diferencial - Estabilidade

Os valores médios encontrados em ambos os extratos das pele de jamelão liofilizado pelo método do pH diferencial encontra-se na Tabela 12. Foram avaliados nos tempos de 0, 15, 30, 45 e 60 em dias.

**Tabela 12.** Resultados estabilidade das antocianinas pelo método do pH diferencial

Tempo	--- Antocianinas Totais (mg·100g <sup>-1</sup> ) ---				- Antocianinas Monoméricas (mg·100g <sup>-1</sup> ) -			
	Extrato metanólico	DP	Extrato antociânico	DP	Extrato metanólico	DP	Extrato antociânico	DP
0	4,24 a	0,11	2,27 a	0,12	3,96 a	0,16	2,20 a	0,12
15	4,34 a	0,17	1,73 b	0,06	4,32 a	0,48	1,66 b	0,08
30	4,46 a	0,70	1,60 b	0,04	4,11 a	0,70	1,53 b	0,03
45	4,71 a	0,17	1,61 b	0,03	4,52 a	0,17	1,54 b	0,04
60	4,50 a	0,16	1,69 b	0,24	4,34 a	0,18	1,62 b	0,26

DP: Desvio Padrão. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente ao teste de Tukey ( $P > 0,95$ ).

As médias dos resultados encontrados no extrato metanólico para antocianinas totais como para as monoméricas não teve diferença significativa no período de análise de 0 a 60 dias. Para o extrato metanólico as antocianinas presentes foram “protegidas”, onde o extrato metanólico é composto de todas as substâncias presentes nas peles do fruto que foram extraídas.

Lopes et al. (2007), diz que a presença de flavonoides não- antociânicos podem proteger as antocianinas contra a degradação, podendo assim, ter contribuído para que as antocianinas não tenha sofrido um processo de polimerização/degradação nesse período de análise de até 60 dias. Onde os dois extratos tanto o metanólico quanto o antociânico foram mantidos em geladeira por todo período de análise nas mesmas condições. Março et al (2008) fala que caso haja necessidade de armazenamento, o extrato deve ser mantido em local escuro e, preferencialmente, a baixas temperaturas. O que pode ter contribuído para a estabilidade, já que a geladeira fornece essas condições.

O que está de acordo com estudo feito por Sousa (2012), onde avaliou antocianinas monoméricas em licores de jamelão, em vários períodos de maturação da fruta, notou-se que as antocianinas diminuíram de forma significativa somente após 90 dias para todas as formulações, caindo de  $66,80 \pm 2,87$  dia zero (0), para  $37,70 \pm 3,05$  em 90 dias. E Santiago et al (2016), também avaliando a estabilidade das antocianinas nos peles do fruto do jamelão, onde observou que somente após esse período de análise que ocorreu uma degradação das antocianinas de  $878.56 \pm 31.43$  dia zero (0) para  $690.50 \pm 31.74$  mg.100g<sup>-1</sup> no dia noventa (90).

Markakis (1982), em seu livro intitulado “Anthocyanins as Food Colors” diz que as antocianinas são mais estáveis em soluções ácidas do que em neutras e alcalinas, visto que o extrato encontra-se em meio ácido (Tabela 9), podendo ter colaborado para sua estabilidade.

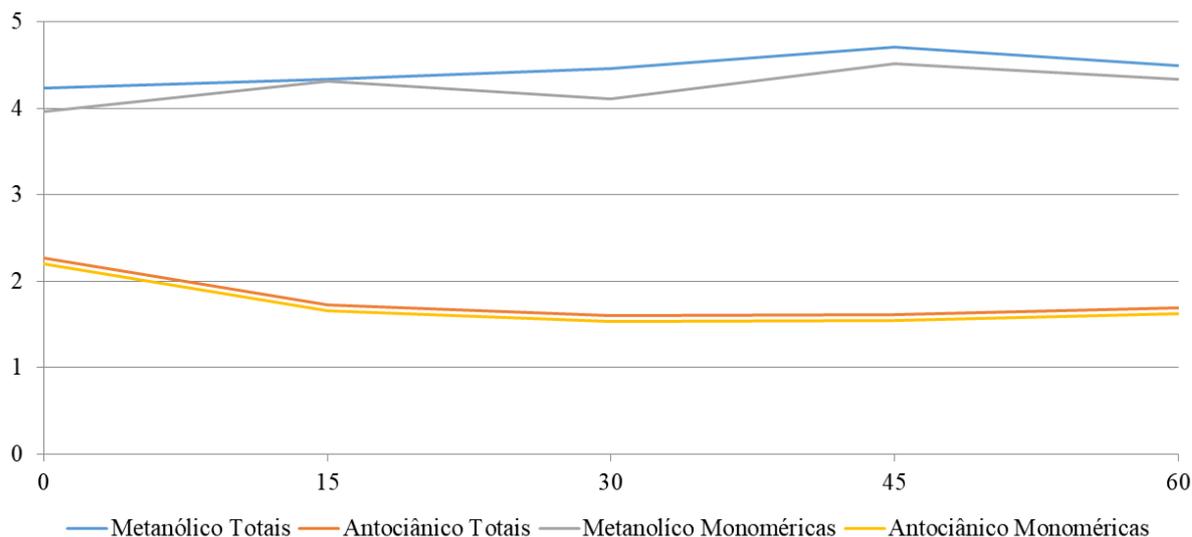
Para resultados de antocianinas totais do extrato antociânico, observa-se uma degradação de  $2,27 \pm 0,12$  mg.100g<sup>-1</sup> para  $1,73 \pm 0,06$  mg.100g<sup>-1</sup> no período de 0 a 15 dias, ocorrendo o mesmo para as antocianinas monoméricas ( $2,20 \pm 0,12$  mg.100g<sup>-1</sup> para  $1,66 \pm 0,08$  mg.100g<sup>-1</sup>), e após esse período ele se manteve estável até os 60 dias para ambos os extratos. Maeda et al (2007), fala das antocianinas, que são compostos termossensíveis e são rapidamente degradadas, como fatores de aquecimento, processamento e armazenamento, justificando assim o comportamento observado no trabalho. Como já mencionado os extratos foram mantidos em geladeira por todo o período de análise, o que pode ter favorecido a estabilidade no período 15 a 60 dias.

Foi observado ainda que os resultados de antocianinas totais e monoméricas encontradas nos dois extratos foram abaixo das encontradas na literatura com a mesmo fruto. Essas diferenças podem ser atribuídas pela metodologia de extração utilizada para obtenção das antocianinas (solução de extração). Alguns estudos mostram que o solvente mais utilizado

é o etanol, como no trabalho realizado por Brito et al. (2017), no fruto jamelão, onde avaliou a eficiência de seis soluções a base de etanol para extrair antocianinas e encontrou índices de antocianinas totais  $296 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ . E Borges (2011), encontrou valores de antocianinas em extratos etanólicos (80% v/v), de resíduo de jamelão  $487,7 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$  no extrato, e Américo (2014), encontrou  $93,56 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$  de antocianinas totais em polpa de jamelão com o mesmo solvente.

Na Figura 33, nota-se a estabilidade de ambas as extrações, que não sofreram grandes variações para as antocianinas totais e monoméricas. Esse teste de estabilidade foi realizado a fim de confirmar se ao longo das análises, se elas sofreriam alguma degradação/polimerização.

**Figura 33.** Gráfico correspondentes a estabilidade das antocianinas dos extratos metanólico e antociânico do pó liofilizado da pele de jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) do ano de 2017.



## 6. CONCLUSÃO

A indicação de oito flavonoides não-antôcianos foi possível com o auxílio da Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas Sequencial (CLUE-EM-EM) sendo dois deles ainda desconhecidos para o fruto do jamelão (laricitrina-3-*O*-glucoronídeo e quercitina- 3-*O*-hexose).

A identificação de quatro antocianinas das seis mais comuns encontradas nos alimentos.

O isolamento das antocianinas da pele do fruto liofilizado feito pelo cartucho de troca catiônica - Oasis® MCX Cartridge Waters foi realizado com eficiência esperada, pela primeira vez relatada para esse fruto.

As antocianinas têm uma participação considerável na capacidade antioxidante do fruto, tendo variações de 5% a 29,5%.

Portanto, o *S. cumini* mostrou ser uma fonte rica de compostos fenólicos, que têm grande potencial de cultivo no país.

## **7. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Para futuros trabalhos deixo algumas sugestões.

- ✓ Fazer a injeção de padrões dos flavonoides não-antocianicos indicados nesse trabalho para a sua confirmação.
- ✓ Fazer o análise química do extrato metanólico, para saber quais substâncias que influenciaram na capacidade total dos compostos e de fenólicos totais em comparação ao extrato antociânico.
- ✓ Fazer a avaliação do pH diferencial não somente do ano de 2017, mas também do ano de coleta de 2018.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, L.P.  **$\beta$ - Caroteno, vitamina C e outras características de qualidade da acerola, caju, e melão em utilização no melhoramento genético.** 87f. Dissertação de mestrado (ciência e tecnologia de Alimentos) – Universidade federal do Ceará. Fortaleza, 2001.
- ALBERTON, J.R; RIBEIRO, A; SACRAMENTO, L.V.S; FRANCO, S.L; LIMA, M.A.P. Caracterização farmacognóstica do jambolão (*Syzygium Cumini* (L.) Skeels). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 37p., 2001.
- ALVES, C. Q.; BRANDÃO, H. N.; DAVID, J.M.; DAVID, J. P.; LIMA, L. S. Avaliação da atividade antioxidante de flavonoides. **Revista da rede de ensino FTC**. Ano V, n 12. Dez. 2007.
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R.M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro*. **Quim. Nova**, Vol. 33, N<sup>o</sup>. 10, 2202-2210, 2010.
- AMERICO, G. V. **Otimização da pasteurização da polpa de jambolão (*Syzygium Cumini* Lamark).** 2014. 71f. Dissertação (Mestrado em ciências e tecnologia de alimentos) Universidade Federal do Pará, Belém, 2014.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Rev Inst Adolfo Lutz**, 2007.
- AQUINO-NETO, F.R e NUNES, D.S.S. Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins. Rio de Janeiro: **Interciência**, 187p., 2003.
- ARAÚJO, A. L. M. **Polpa de jamelão (*Syzygium cumini*) desidratada por liofilização e secagem em leito de jorro: Caracterização físico-químico e funcional e impacto de secagem.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). p.111. Universidade Federal do Rio Grande do Norte-UFRN. 2014.
- AYYANAR, M.; SUBASH-BABU, P. *Syzygium cumini* (L.) Skeels: A review of its phytochemical constituents and traditional uses. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, 240-246p., 2012.
- BARBOSA, W. L. R.; PERES, A.; GALLORI, S.; VINCIERI, F. F. Determination of myricetin derivatives in *Chrysobalanus icaco* L. (Chrysobalanaceae). **Rev. Bras. Farmacogn.** Braz J. Pharmacogn. jul/set. 2006.
- BARROSO, G.M. **Sistemática de Angiospermas do Brasil.** Universidade Federal de Viçosa, viçosa, v. 2, 1991.
- BEHLING, E.B.; SENDÃO, M.C.; FRANCESCATO, H.D.C.; ANTUNES, L.M.G.; BIANCHI, M.L.P. Flavonoid quercetin: general aspects and biological actions. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.
- BEZERRA, M. F. **Polpa de jambolão (*Eugenia jambolana* Lam.) fresca e desidratada: características físico-químicas, Bioativas e funcionais, efeitos biológicos em *Caenorhabditis elegans* e uso para produção de frozen yogurt caprino probiótico.** Tese de Doutorado (Doutorado em Engenharia Química). p.225. Universidade Federal do Rio Grande do Norte-UFRN. 2015.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Introdução à Química de Alimentos**. 2a. edição. São Paulo: Varela, p.223, 1989.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Química do Processamento de Alimentos**. 2a. edição. São Paulo: Livraria Varela, 223 p. 1992.

BOBBIO, P.A.; BOBBIO, F.O. **Introdução à química de Alimentos**. 3. ed., São Paulo: Varela. p. 202-215. 2003.

BORDIGNON Jr, C. L.; FRANCESCOTTO, V.; NIENOW, A. A.; CALVETE, E.; REGINATTO, F.H. Influência do pH da solução extrativa no teor de antocianinas em frutos de morango. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 183-188, jan.-mar. 2009.

BRAGA, E. C. O. **Caracterização química de substâncias bioativas dos frutos de duas espécies do gênero eugenia**. 115p. Dissertação de mestrado (Mestre em Alimentos e Nutrição) - Universidade Federal do Estado Rio de Janeiro- Rio de Janeiro, 2016.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm. Wiss. Technology**, 25-30 p., 1995.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999b. **Define: alimento funcional**. Disponível em < [www.anvisa.gov.br/alimentos/consecoes/tecno\\_lista\\_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/consecoes/tecno_lista_alega.htm)> acesso em 03 de dezembro de 2017.

BRASIL, Ministério da Saúde. **RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS- Espécies vegetais**. Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos – PPNPMF. Fev. 2009a. Disponível em < <http://portalms.saude.gov.br/acoes-e-programas/programa-nacional-de-plantas-medicinais-e-fitoterapicos-ppnpmf/politica-e-programa-nacional-de-plantas-medicinais-e-fitoterapicos/plantas-medicinais-de-interesse-ao-sus-renisus>> acesso em 17 de março de 2018.

BRITO, B. N. C.; PENA, R.S.; LOPES, A. S.; CHISTÉ, R.C. Anthocyanins of Jambolao (*Syzygium cumini*): Extraction and pH-Dependent Color Changes. **Journal of Food Science**. Vol. 0, Nr. 0, 2017.

BRITO, E. S.; ARAÚJO, M. C. P.; ALVES, R. E.; CARKEET, C.; CLEVIDENCE, B. A.; NOVOTNY, J. A. Anthocyanins Present in Selected Tropical Fruits: Acerola, Jambolão, Jussara, and Guajiru. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 55, p. 9389-9394, 2007.

BRITO, E. S.; ARAUJO, M.C.P.; ALVES, R.E.; CARKEET, C. Anthocyanins present in selected tropical fruits: acerola, jambolao, jussara, and guajiru. **J Agric Food Chem**. Clevidence BA, Novotny JA. 2007.

BROILLARD, R. **Chemical structure of anthocianins**. In P. Markasis (Ed.), Anthocyanins as food colors, 1-40. London, UK, 1982.

BURNS, J.; YOKOTA, T.; ASHIHARA, H.; LEAN; M. E. J.; CROZIER, A. Plant foods and herbal sources of resveratrol. **Journal of agricultural and food chemistry**, Washington, v. 50, n. 11, p. 3337-3340, 2002.

CALDAS, S.S.; GONÇALVES, F.F.; PRIMEL, E.G. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos. **Quim. Nova**, Vol. 34, No. 9, 1604-1617, 2011.

CASTILLO-MUÑOZ, N.; MEZ-ALONSO, S. G.; GARCÍA-ROMERO, E.; HERMOSIÁN-GUTIERREZ, I. Flavonol profiles of *Vitis vinifera* red grapes and their single-cultivar wines. **J. Agric. Food Chem.**, 55, 992-1002. 2007.

CASTÑEDA-OVANDO, A.; PACHECO-HERNÁNDEZ, M. L.; PÁEZ-HERNANDEZ, M. E.; RODRÍGUEZ, J. A.; GÁLAN-VIDAL, C. A. **Food chemistry**, 113, 859-871, 2009.

CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2ª ed. rev. Campinas: Editora da Unicamp, p.207, 2003.

CIOLA, R. **Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho**. 1ªed. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda, p.179, 1998.

COLLINS, C. H. **Princípios básicos de cromatografia. In: Introdução a métodos cromatográficos**. 7 ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 1997. p.11-27, 1997.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de Cromatografia**. 1ª edição. Campinas: UNICAMP, 2007.

CUNHA, C. P. **Contribuição na investigação fitoquímica de *Glycine max* (soja) e *Dipteryx odorata* (cumaru) – otimização de análise cromatográfica e caracterização estrutural de flavonoides**. 147f. Dissertação de mestrado (Mestrado em química-Química de Produtos naturais) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropedica-RJ, 2013.

FALÇÃO, L. D.; BARROS, D. M.; GAUCHE, C.; LUIZ, M. T. B. Copigmentação intra e intermolecular de antocianinas: uma revisão. **B.CEPPA**, Curitiba, v. 21, n. 2, p. 351-366, jul./dez. 2003.

FARIA, A. F., MARQUES, M. C., MERCADANTE, A. Z. Identification of bioactive compounds from jambolão (*Syzygium Cumini*) and antioxidant Capacity evaluation in different pH conditions . **Food Chemistry**, v. 126, p. 1571-1578, 2011.

FAVARO, M. M. A. **Extração, estabilidade e quantificação de antocianinas de frutas típicas brasileiras para aplicação industrial como corantes**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

FERNÁNDEZ, M. N. **Influencia de la especie botánica, del grado de tostado y del uso de las barricas de roble sobre los elagitaninos; consecuencias enológicas y sensoriales**. 211p. Tese. Universitat Rovira i Virgili. Tarragona. 2017.

FIGUEIREDO, R. W. **Qualidade e bioquímica as parece celular durante o desenvolvimento, maturação e armazenamento de pedúnculos de cajueiro anão precoce CCP 76 submetidos à aplicação pós-colheita de cálcio**. 2000. 157f. Tese (Doutorado em ciências de alimentos) Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

FOLIN, O.; CIOCALTEAU, V. Ontyrosine and tryptophane determination in proteins. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 73, p. 424-427. 1927.

FREITAS, V.; ROSSETO, V.; ROSA, G. S. Caracterização da casca e polpa de butiás *in natura* e liofilizadas: umidade e antocianinas. X Congresso Brasileiro de Engenharia Química Iniciação Científica- COBEQ IC. Volume 1, Número 1. Dez. 2013.

FULEIK, T.; FRANCIS, F.J. Quantitative methods for anthocyanins: Extraction and determination of total anthocyanins in cranberries. **Jornal of scienc**, 33, 72-77, 1968.

FLAMINI, R. Recent Applications of Mass Spectrometry in the Study of Grape and Wine Polyphenols. **Hindawi Publishing Corporation ISRN Spectroscopy** Vol. 2013, Article ID 813563, 2012.

GARCIA, K, C. **Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana da polpa do fruto de *Eugenia brasiliensis* Lam.** Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia.). p.168. Universidade Estadual Paulista –UNESP, 2016.

GAVA, A. J. **Tecnologia de Alimentos: Princípios e Aplicações**. 511p. São Paulo, Nobel, 2008.

GEORGÉ, S.; BRAT, P.; ALTER, P.; AMIOT, M.J. Radip determination of poliphenols and vitamin C in plant-derived pproducts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p.1370-1373, 2005.

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Anthocyanins. Characterization and Measurement with UV-Visible Spectroscopy. In: Wrolstad, R. E. (Ed.). **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. New York: John Wiley & Sons, 2001. Unit. F1.2.1-13. GLAZER, A. N.; **FASEB J.**, 2, 2487. 1988.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quim. Nova**. Vol. 30, No. 2, 2006.

GONÇALVES, A. E. S. S. **Avaliação da capacidade antioxidante de frutas e polpas de frutas nativas e determinação dos teores de flavonoides e vitamina C.**88f. Dissertação de mestrado (Ciência dos Alimentos) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

GOUVÊA, A. C. M. S. **Extração, isolamento e caracterização de antocianinas de fontes naturais e a sua aplicação na análise de alimentos por cromatografia líquida.** Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). p.226. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Campus Seropédica. 2015.

OLIVEIRA, G. S., COSTA, J. M. C., AFONSO, M. R. A. Caracterização e comportamento higroscópico do pó da polpa de cajá liofilizada. **R. Bras. Eng. Agríc. Ambiental**, v.18, n.10, p.1059–1064, 2014.

GOUVÊA; A. C. M. S. **Quantificação das antocianinas majoritárias do açaí por cromatografia líquida de alta eficiência.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal

GURJÃO, K. C. O. et al. Desenvolvimento de frutos e sementes de tamarindo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 3, p. 351-354, 2006.

HARRIS, Daniel C. **Análise Química Quantitativa** . 6ª ed. Rio de Janeiro: LTC-Livros Técnicos e Científicos Editora S.A. 876p, 2005.

HE, J.; GIUSTI, M.M. High-purity isolation of anthocyanins mixtures from fruits and vegetables – A novel solid-phase extraction method using mixed mode cation-exchange chromatography. **J. Chromatogr. A**. 1218. 2011.

HERTOG, M.G.L et al. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. **Nutr. Cancer**, v.20, n.1, p.21- 29, 1993.

INMET, Instituto Nacional de Meteorologia. **Balanço Hídrico Sequencial**. Disponível em <<http://sisdagro.inmet.gov.br/sisdagro/app/monitoramento/bhs>> acesso em 28 de fevereiro de 2018.

IUPAC. **Compendium of Chemical Terminology**, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by McNaught, A. D.; Wilkinson, A. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1997.

JACKMAN, R. L.; SMITH, J. L. Anthocyanins and betalains. In: HENDRY, G. A. F.; HOUGHTON, J. D. (Eds.) p. 245-309. **Natural Food Colorants**. 2nd ed. Londres: Chapman e Hall, 1996.

KENNEDY, J. A. Proanthocyanidins: extraction, purification and determination of subunit composition by HPLC. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, I1.4.1-I1.4.11, 2002.

KLOPOTEK, Y.; OTTO, K.; BOHM, V. Processing strawberries to different products alters contents of vitamins C, total phenolics, total Anthocyanins and antioxidant Capacity. **Journal of Agricultural and food chemistry**, v. 53, p. 5640-5646, 2005.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; TRANCOSO, A. M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicação de diversos métodos químicos para determinar a atividade antioxidante em polpa de frutos. **Ciência de tecnologia de Alimentos**, p.25, 726-732, 2005.

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**, Santa Maria, v.36,n.4,p.1283-1287,jul-ago, 2006.

LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**. v.1.n.2. 2009.

LANDRUM, L.R. & KAWASAKI, M.L. The genera of Myrtaceae in Brazil - an illustrated synoptic treatment and identification keys. **Brittonia** 49:508-536, 1997.

LANTZOURAKI, D. Z.; SINANOGLU, V. J.; TSIKA, T.; PROESTOS, C. P.; ZOUMPOULAKIS, P. Total phenolic content, antioxidant capacity and phytochemical profiling of grape and pomegranate wines. **RSC Adv.**, 2015.

LEE, S.J.; UMANO, K.; SHIBAMOTO, T.; LEE, K. G. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chem** 2005.

LIMA, A.J.B.; CORRÊA, A.D.; ALVES, A.P.C.; ABREU, C.M.P.; DANTAS-BARROS, A.M. Caracterização do fruto jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) e de suas frações. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 58, p. 426-421, 2008.

- LIMA, L. A. et al. Correlation of anti-inflammatory activity with phenolic content in the leaves of *Syzygium Cumini* (L.) Skeels (Myrtaceae). **Química Nova**, v.30, n.4, p. 860-864, 2007.
- LOPES, R. M.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; PINTO, A.S. Flavonóides: farmacologia de flavonóides no controle hiperlipidêmico em animais experimentais. **Biotecnologia Cien. Desenvolv.** ; 3(17):18-22.2000.
- LOPES, T.J.; XAVIER, M.F.; QUADRI, M.G.N.; QUADRI, M.B. Antocianinas: uma breve revisão das características estruturais e da estabilidade. **R. Bras. Agrociência**, Pelotas, v.13, n.3, p. 291-297, jul-set, 2007.
- LÓPEZ O.P.; JIMÉNEZ A.R.; VARGAS F.D. et al. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains – characteristics, biosynthesis, processing, and stability, *Critical Reviews Food Science Nutrition*, v.40, n.3, p.173-289, 2000.
- LORENZI, H.; LACERDA, M. T. C.; BACHER, L. B. **Frutas no Brasil** (de consumo *in natura*). p.493.São Paulo. Instituto de Plantarum de estudos da flora. Ed.2015.
- LUZIA, M.W.; JORGE, N. Composição centesimal, potencial antioxidante e perfil dos ácidos graxos de sementes de jabolão (*Syzygium cumini* L.). **Revista Ciência Agronômica**, v. 40, n. 2, p. 219-223, abr-jun, 2009.
- MACHADO, H.; NAGEM, T. J.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. S.; OLIVEIRA, T. T. Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, Juiz de Fora, v. 27, n. 1/2, p. 33-39, 2008.
- MAEDA, R. N.; PANTOJA, L.; YUYAMA, L. K. O.; CHAAR, J. M. Estabilidade de ácido ascórbico e antocianinas em néctar de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H. B. K.) McVaugh). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 313-316, 2007.
- MALACRIDA, C. R.; MOTTA, S. Antocianinas em suco de uva: composição e estabilidade. **B.CEPPA**, Curitiba, v. 24, n. 1, p. 59-82 jan./jun. 2006.
- MALDANER, L. e JARDIM, I.C.S.F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, São Paulo, v.32, n.1, p.214-222, 2009.
- MALTA, D. S.; NÚÑEZ, F.F.; GRACIA, H. D. Q.; BIANCHIN, L. L.; SOUZA, M.M.; MARTINS, V. G. **Avaliação de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante pelo método do poder redutor de diferentes fontes de vegetais**. Simpósio, saúde e alimentação. Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Campos Chapecó. 2017.
- MARCHIORI, J.N.C. SOBRAL, M. Dendrologia das angiospermas ã Myrtales. **Editora da UFSM**, Santa Maria, 1997.
- MARÇO, P.H.; POPPI, R. J.; SCARMINIO, I. S. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Quim. Nova**, Vol. 31, No. 5, 1218-1223, 2008.
- MARKAKIS, P. **Stability of anthocyanins in foods**. In: MARKAKIS, P. (Ed.) *Anthocyanins as food colors*. p. 163-180. New York: Academic Press, 1982.

- MARQUES, L. G. **Liofilização de frutas tropicais**. 293p. Tese (Doutor em Engenharia Química). Universidade Federal de São Carlos- São Carlos- SP. 2008.
- MARTINS, V. C. **Investigação sobre um Método de Detecção de Adulterantes em Café por CLUE-EM-EM**. 121f. Dissertação (Mestre em ciências dos alimentos) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro- Seropédica, 2017.
- MARTINS, G. R. **A química de taninos condensados: estudo baseado em espécies da família arecaceae (palmae)**. Tese (Doutor em Química de Produtos Naturais). 214p. Universidade Federal do Rio de Janeiro- Rio de Janeiro, 2016.
- MATOS, L. P. C. **Compostos fotoquímicos e atividade antioxidante de casca de café**. Trabalho de conclusão de curso (Curso superior em Tecnologia de Alimentos). 31f. Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, 2014.
- MAZZA, J. **Anthocyanins and health**. Ann Ist Super Sanità; 4, 369-374, 2007.
- MENEZES, A. R. V.; SILVA JUNIOR, A.; CRUZ, H. L. L.; ARAÚJO, D. R.; SAMPAIO, D. D. Estudo comparativo do pó da acerola verde obtido em estufa por circulação de ar e por liofilização. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**. Campina Grande. v.11, n.1, p.1- 8, 2009.
- MORAIS L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira** 27: S4050-S4063. 2009.
- MIGLIATO, K. F.; MOREIRA, R. R. D.; MELLO, J. C. P.; SACRAMENTO, L. V. S.; CORREA, M. A.; SALGADO, H. R. N. Controle da qualidade do fruto de *Syzygium Cumuni* (L.) Skeels. **Revista brasileira de farmacognosia**, v.17, n.1, p. 94-101, 2007.
- MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Functional foods and nutraceuticals: definition, legislation and health benefits. **Revista Eletrônica de Farmácia** Vol 3, 2006.
- MORTON, J.F. **Fruits of warm climates**. Miami: Ag.Science, 1987. 559p.
- NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **J Chromatogr A**. pag. 95-111. 2004.
- NASCIMENTO, J. C.; LAGE, L. F. O.; CAMARGOS C. R. D.; AMARAL, J. C.; COSTA, L. M. A. N. S.; OLIVEIRA, F. Q. Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH e doseamento de flavonóides totais em extratos de folhas da *Bauhinia variegata* L. **Rev. Bras. Farm**, 2011.
- NETO, H. J. de J. **Obtenção do tomate seco através do uso de um sistema solar alternativo de baixo custo**. 78p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica). Programa de Pós- Graduação em Engenharia Mecânica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal –RJ, 2008.
- NEVES, L.C.; ALENCAR, S.M.; CARPES, S.T. Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonoides totais em amostras de pólen apícola de *Apis melífera*. **Braz. J. Food Technol.**, VII BMCFB, junho 2009.
- OLIVEIRA, A. C. et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v.32, n.3, p. 689-702, 2009.

OLIVEIRA, E. R. **Desenvolvimento de bebida alcoólica fermentada à base de jambolão e caldo de cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). P149. Universidade Federal de Goiás. Goiânia. 2015.

OLIVEIRA, I. R. N. **Antocianinas extraídas de capim-gordura (*Melinis minutiflora*): Atividade antioxidante, microencapsulamento por atomização e estabilidade**. 152f. Dissertação (Mestre em ciências dos alimentos) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2011.

ORAC Values. (2018). **Antioxidant values of foods sorted by ORAC value**. <<http://www.oracvalues.com/sort/orac-value>>. Acesso em 11 de março de 2018.

PACHECO, S. **Melhoria e implantação de metodologias de análise de alimentos por cromatografia líquida de alta eficiência**. 161f. Tese (Doutor em Ciências dos Alimentos). Universidade federal Rural do Rio de Janeiro, 2014.

PACHECO, S.; BORGUINI, R. G.; SANTIAGO, M. C. P. A.; NASCIMENTO, L. S. M.; GODOY, R. L. O. História da Cromatografia Líquida. **Rev. Virtual Quim.** 7 (4), 1225-1271, 2015.

RATTI, C. Hot air and freeze-drying of high-value foods: a review. **Journal of Food Engineering**, v.49. N.4. p.311-319, 2009.

PELZER, E. L. et al. Acute and chronic antiinflammatory effects of plant flavonoids. **II Farmaco**. v. 53, p. 421-424, 1998.

PERES, T.B. Noções básicas de cromatografia. **Biológico**. São Paulo, , v.63, n.2, p.227-229, 2002.

PIERPOINT, W.S. Flavonoids in the human diet. **Prog. Clin. Biol. Res.**, v. 213, p. 125-140, 1986.

PIMENTEL, C. V. M. B.; FRANCKI, V. M.; GOLLÜCKE, A. P. B. Alimentos funcionais: introdução às principais substâncias Bioativas em alimentos. São Paulo: **Varela**; 2005.

PIZO, M.A. **The seed dispersers and fruit syndromes of Myrtaceae in Brazilian Atlantic forest**. In Frugivores and seed dispersers ã biodiversity and conservation perspectives. (D.J. Levey, W.R. Silva & M. Galetti, eds.), CABI Publishing, Wallingford, p.129-143, 2002.

PRIOR.R. L; et al. Standardized methods for the determination of antioxidante capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of agricultural and food chemistry**, 2015.

PROENÇA DA CUNHA, A.; SILVA, A.; ROQUE, O. Marmeleiro. In: Plantas e produtos vegetais em fitoterapia. **Fundação Calouste Gulbenkian**, Lisboa, Portugal, 2003.

RIBEIRO, A. A. M. **Avaliação da atividade antioxidante de diferentes marcas de chá de *Hibiscus sabdariffa* (L.)**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Farmácia). Universidade de Brasília- UnB. Brasília – DF, 2017.

RIGAUD, J., ESCRIBANO-BAILON, M. T., PRIEUR, C., SOUQUET, J. M., E CHEYNIER, V. Normal-phase high-performance liquid chromatographic separation of procyanidins from cacao beans and grape seeds. **J. Chromatogr.**, 1993.

RUFINO, M. S. M. **Propriedades funcionais de frutas tropicais brasileiras não tradicionais.** Mossoró, 263p. Tese – Universidade Federal Rural do Semi-Árido. 2008.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS. **Comunicado técnico on line-EMBRAPA**, ISSN 1679-6535, Fortaleza- CE, Julho, 2007.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; PEREZ JIMENEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, p.996-1002, 2010.

SÁ, A. P. C. S. **Potencial Antioxidante e aspectos químicos e físicos das frações comestíveis (polpa e casca) e sementes do jmelão (*Syzygium Cumini* (L.) Skeels).** 88p. Dissertação de mestrado (Mestre em Ciências dos Alimentos). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ, 2008.

SANCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F.A. Procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal Science of Agricultural**, 76, 270, 1998.

SANCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J.A.; SAURA-CALIXTO, F.E. Procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal science food agricultural**.76, 210, 1998.

SANTIAGO, M.C.P.A. **Avaliação de processos para obtenção de produtos ricos em antocianinas utilizando suco de romã (*Punica granatum* L.).** Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2014.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. in: Simões, C.M.O et al. **Farmacognosia: da planta ao Medicamento.** Universidade/UFRJ/EDDA/UFSC Porto Alegre, 1999.

SCHOFIELD, P.; PELL, A. N.; MBUGUA, D. M. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 91, p. 21-40. 2001.

SEVERO, J. et al.. Avaliação de compostos fenólicos, antocianinas, vitamina C e capacidade antioxidante em mirtilo armazenado em atmosfera controlada. **Brazilian Journal of Food Technology**. II SSA, 2009.

SEVERO, J.; SANTOS, R.S.; CASARIL, J.; TIECHERI, A.; SILVA, J. A.; ROMBALDI, C. V. Destanização e conservação de frutos de jmelão. **Revista Ciência Rural**, v.40, n.4, p.976-982, 2010.

SILVA, C. P. **Complexos de inclusão de antocianinas e análogos sintéticos de antocianinas.** Dissertação (Mestre em ciências (química)). p.89, Universidade de São Paulo-São Paulo, 2015.

SILVA; P.D. **Determinação de compostos fenólicos por HPLC.** Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Química Industrial. Out. 2012.

SIMÕES, C. et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 2ª ed. rev. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed Universidade /UFRGS/ Ed. Universidade/ UFSC, 2000.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis (SC): Editora da UFSC, 1102 p. 2007.

SIMÕES, V. V.; FAVARIN, L. R. V.; CABEZA, N. A.; OLIVEIRA, T. D.; FIORUCCI, A. R.; STROPA, J. M.; RODRIGUES, D. C. M.; CAVALHEIRO, A. A.; ANJOS, A. Síntese, caracterização e estudo das propriedades de um novo complexo mononuclear contendo quercetina e íon GA(III). **Quim. Nova**, Vol. 36, No. 4, 495-501, 2013.

SINGLETON, V. L., ORTHOFER, R., LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin– Ciocalteu reagent. **Methods of Enzymology**, 299,1999.

SKOOG, D. A., HOLLER, F., E NIEMAN, T. A. Princípios de Análise Instrumental Trad. de Inez Caracelli, Paulo Celso Isolani, Regina Helena de Almeida Santos e Regina Helena Porto Francisco. Porto Alegre. RS.: **Ed. Guanabara Dois S.A**, 2002.

SOARES, M.; WELTER, L.; KUSKOSKI, E. M.; GONZAGA, L.; FETT, R. Compostos Fenólicos e atividade antioxidante da casca de uvas Niágara e Isabel. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, 30, n. 1, p. 59-64, 2008.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO. M.S.; CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quim. Nova**, Vol. 30, No. 2, 351-355, 2007.

SOUSA, M. S. B.; VIEIRA, L. M.; LIMA, A. Fenólicos totais e capacidade antioxidante in vitro de resíduos de polpas de frutas tropicais. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 14, n. 3, p. 1-9, 2011.

SOUSA, M.M. **Compostos bioativos e atividade antioxidante do fruto e do licor de jamelão (*Syzygium cumini*)**. Dissertação (Mestre em Alimentos e Nutrição.). p.115. Universidade federal do Piauí – UFPI, 2012.

SOUSA. C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA, G. M.; AYRES, M. C.C.; COSTA, C.S.; ARAÚJO, D. S. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**,2007.

SOUZA, M. M. **Compostos bioativos e atividade antioxidante do fruto e do licor de jamelão (*Syzygium cumini*)**. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição). p99. Universidade Federal do Piauí. 2012.

SOUZA, M. S. B.; VIEIRA, L. M.; LIMA, A. Fenólicos totais e capacidade antioxidante in vitro de resíduos de polpas de frutas tropicais. **Brazilian Journal of Technology**, v 14, n.3, p.1-9, 2011.

STAMP, NANCY **.Out of the quagmire of plant defense hypotheses**. The Quarterly Review of Biology. 2003.

TAVARES, I. M .C.; LAGO-VANZELA, E. S.; REBELLO, L. P. G.; RAMOS, A. M.; GÓMEZ-ALONSO, S.; GARCÍA-ROMERO, E.; SILVA, R.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I.

Comprehensive study of the phenolic composition of the edible parts of jambolan fruit (*Syzygium cumini* (L.) Skeels). **Food Research International**. 2016.

THAIPONG, K.; BOONPRAKOPA, U.; CROSBY, K.; CISNEROS-ZEVALLOSC, L.; BYRNE, D. H. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**. p.669–675, 2006.

TOMEI, R. R.; SALVADOR, M. J. **Metodologias analíticas atuais para avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais**. XI Encontro Latino Americano de iniciação científica e VII Encontro Latino Americano de pós-graduação – Universidade do Vale do Paraíba, 2009.

VALENTE, A.L.P.; COLLINS, C.H.; MANFREDI, J.E. Conceitos básicos de cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, São Paulo, p.103-109, 1983.

VAN BRAMER, S. E. An introduction to mass spectrometry. **Widener University**, Chester PA, 1998.

VEIGAS, J. M.; NARAYAN, M. S.; LAXMAN, P. M.; NEELWARNE, B. Chemical nature, stability and bioefficacies of Anthocyanins from fruit peel of *Syzygium Cumini* Skeels. **Food Chemistry**, v.105, p. 619-627, 2007.

VIZZOTO, M. FETTER, M.R. Artigo de divulgação de mídia- Jambolão o poderoso antioxidante. Embrapa clima temperado. **Site cultivar**, on-line, Pelotas-RS, maio, 2009.

VOGEL, A. Análise Química Quantitativa. 5ª ed. São Paulo: **Mestre Jou**, p.462, 1981.

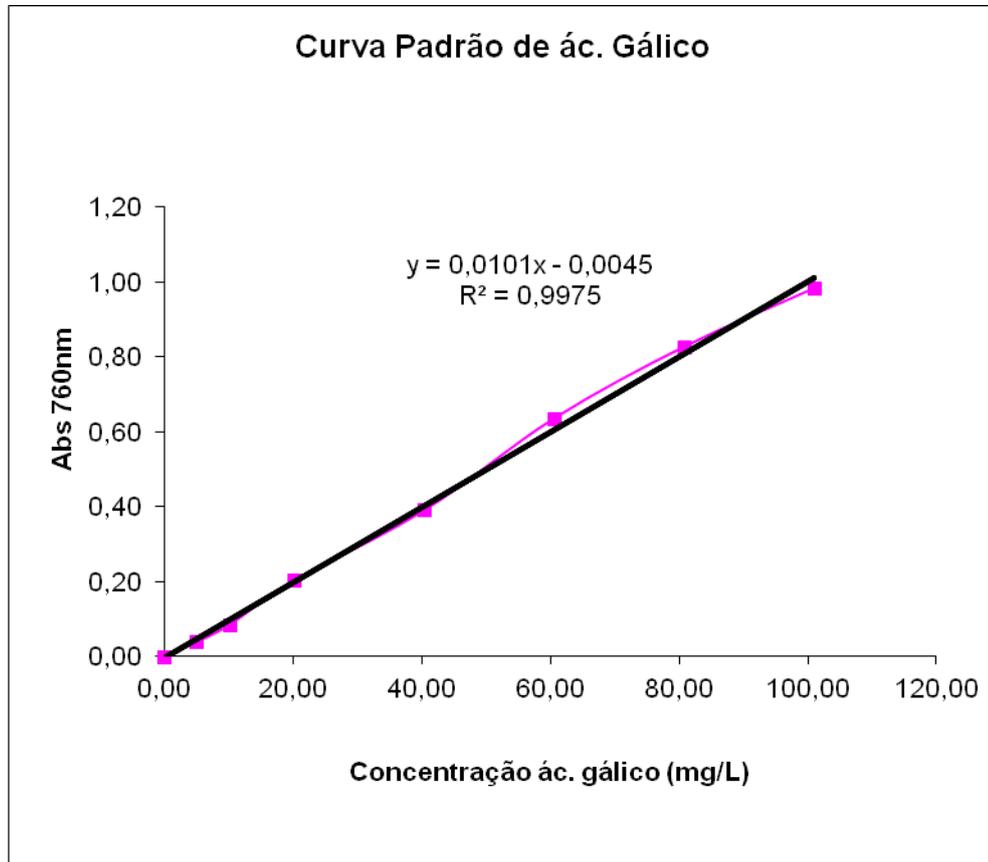
VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R. T.; BARRA, K.; STRINGUETA, P. C. Flavonoides antocianinas: características e propriedades na nutrição e saúde. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v.23, n.2, p.141-149, 2008.

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

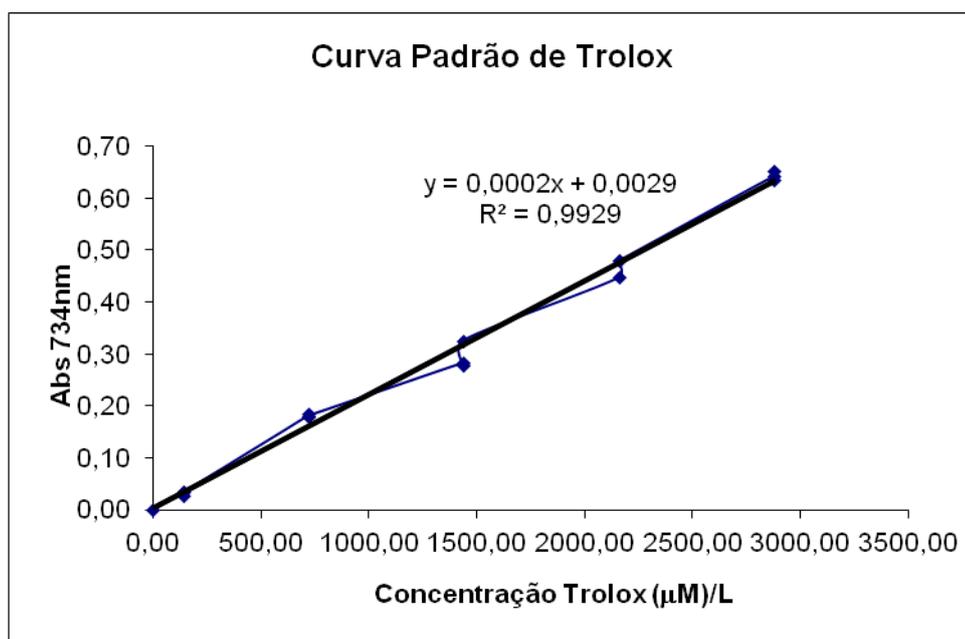
ZULETA, A.; ESTEVE, M.L.; FRÍGOLA, A. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant Capacity of food products. **Food Chemistry**, v. 114, p. 310-316, 2009.

## 8 APÊNDICE

### 8.1. Apêndice A1



### 8.2. Apêndice A2



### 8.3. Apêndice A3

