

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO**

VERA LÚCIA ARROXELAS GALVÃO DE LIMA

Caracterização de antocianinas em frutos de genótipos de aceroleiras (*Malpighia emarginata* D.C.) cultivadas no Banco Ativo de Germoplasma da Universidade Federal Rural de Pernambuco

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição do Departamento de Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Doutor.

ORIENTADORA: Dr^a. Nonete Barbosa Guerra
Professora Titular do Departamento de Nutrição/UFPE

CO-ORIENTADOR: Dr. Paulo César Stringheta
Professor Titular do Departamento de Tecnologia de Alimentos/UFV

Recife
2005

Lima, Vera Lúcia Arroxelas Galvão de
Caracterização de antocianinas em frutos de
genótipos de aceroleiras (*Malpighia emarginata* D.C.)
cultivadas no Banco Ativo de Germoplasma da
Universidade Federal Rural de Pernambuco / Vera
Lúcia Arroxelas Galvão de Lima. – Recife : O Autor,
2005.

133 folhas ; il., fig., tab.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de
Pernambuco. CCS. Nutrição, 2005.

Inclui bibliografia.

1. Nutrição – Ciência de alimentos. 2. Genótipos
de aceroleiras (*Malpighia emarginata* D.C.) –
Caracterização e avaliação do teor de antocianinas.
3. Avaliação da cor da polpa da acerola – Sistema
CIELab. 4. Antocianidinas – Identificação. 5.
Antocianinas – Atividade antioxidante – Método de
oxidação acoplada β -caroteno/ácido linoléico –
Método DPPH (1,1 – difenil – 2 - picrilhidrazina). I.
Título.

612.392
613.2

CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)

UFPE
BC2006-04

Caracterização de antocianinas em frutos de genótipos de aceroleiras (*Malpighia emarginata* D.C.) cultivadas no Banco Ativo de Germoplasma da Universidade Federal Rural de Pernambuco

VERA LÚCIA ARROXELAS GALVÃO DE LIMA

Tese defendida e aprovada em 27.12.2005

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA:


Zelyta Pinheiro de Faro – Presidente


Enayde de Almeida Mélo


Irapuan Oliveira Pinheiro


Luiz Bezerra de Carvalho Júnior


Haroldo Satiro Xavier

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, a quem devo tantas conquistas, pelos ensinamentos e princípios morais que sempre nortearam minha vida;

Aos meus filhos, Aline, Henrique e Mariana, e a meu esposo Alexandre, que contribuíram, cada um a seu modo especial, na realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Prof^ª Nonete Barbosa Guerra, pela valiosa orientação, exemplo de profissionalismo, competência e experiência científica;

À Dra. Prof^ª Enayde de Almeida Mélo, pelo apoio, sugestões, amizade e presença contínua nos momentos difíceis e, ainda, pela colaboração nas análises estatísticas;

À Dra. Prof^ª Márcia Nascimento, por ter incentivado e disponibilizado a realização das análises no Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE), pertencente ao Departamento de Antibióticos/UFPE;

Ao Dr. Irapuan Pinheiro, por ter acreditado no êxito das análises no CLAE e pela competência e imprescindível colaboração em superar as dificuldades experimentais;

Ao Departamento de Ciências Domésticas da UFRPE pela oportunidade de realizar o Doutorado e de utilizar o Laboratório de Análises Físico-Químicas de Alimentos durante a análise objetiva da cor, em especial a Dra. Prof^ª. Maria Inês Sucupira Maciel;

À Prof^ª Samara Andrade, pelo estímulo e realização das análises de correlação;

À Prof^ª Dra. Rosimar dos Santos Musser pelo apoio na manutenção do Banco Ativo de Germoplasma de Aceroleira (BAG);

Ao Sr. Gilberto Honório de Menezes, funcionário da Estação Experimental de Cana-de-açúcar e “guardião” do BAG, pela colaboração durante as colheitas dos frutos;

À Daisyvângela Lima, Márcia Regina, Janáina dos Anjos, Patrícia Gomes, Fátima Padilha, pelo companheirismo nos laboratórios durante as mais diversas etapas desta tese;

Ao Laboratório de Experimentação e Análises de Alimentos (LEAAL) “Nonete Barbosa Guerra”, em nome de seu chefe, a Profª Nonete Barbosa Guerra, pelo fornecimento de reagentes, sem os quais este estudo não teria sido desenvolvido;

Ao Sr. Alexandre Valença L. de Lima, pela liberação de recursos financeiros destinados à aquisição dos padrões de cloreto de cianidina, pelargonidina e malvidina (Extrasynthese, Genay, França), imprescindíveis para a finalização deste estudo;

Aos funcionários do LEAAL, pela cordialidade e ajuda nas atividades laboratoriais;

À Ana Katarina de Araújo, pelos incontáveis artigos científicos adquiridos através do COMUT e do Portal Brasileiro de Informação Científica;

À empresa “Waters Technologies do Brasil”, em nome do Sr Nelson Iatallese, Gerente de Vendas da filial sediada em São Paulo (SP), pela doação de cartuchos Sep-Pak C₁₈, indispensáveis na etapa de identificação das antocianidinas;

À Sandra Maria da Silva pelo suporte e pela ajuda sempre constantes;

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	pág
RESUMO	09
ABSTRACT	11
1- INTRODUÇÃO	13
2- REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1- Considerações gerais sobre acerola	17
2.2- Antocianinas	19
2.2.1- Estrutura química e estabilidade	19
2.2.2- Atividade antioxidante	25
2.3- Referências bibliográficas	32
3- OBJETIVOS	60
3.1- Objetivo geral	61
3.2- Objetivos específicos	61
4- PLANO DE TRABALHO	62

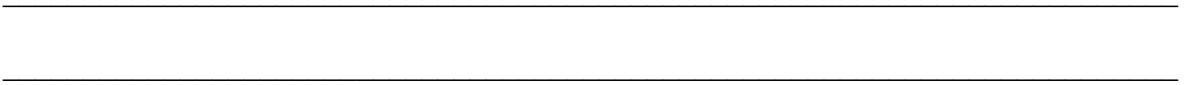
5- RESULTADOS	64
• 5.1- Teor de antocianinas e caracterização cromática de polpas de 12 genótipos de acerola (<i>Malpighia emarginata</i> DC.)	65
5.1.1- Resumo	66
5.1.2- Introdução	67
5.1.3- Material e métodos	68
5.1.4- Resultados e discussão	71
5.1.5- Conclusões	76
5.1.6- Referências bibliográficas	76
• 5.2- Identificação das antocianidinas em polpas de 12 genótipos de acerola (<i>Malpighia emarginata</i> DC.)	81
5.2.1- Resumo	82
5.2.2- Introdução	83
5.2.3- Material e métodos	84
5.2.4- Resultados e discussão	87
5.2.5- Conclusões	99
5.2.6- Referências bibliográficas	100
• 5.3- Potencial antioxidante de antocianinas presentes em 12 genótipos de acerola (<i>Malpighia emarginata</i> DC.)	105
5.3.1- Resumo	106

5.3.2- Introdução	107
5.3.3- Material e métodos	108
5.3.4- Resultados e discussão	112
5.3.5- Conclusões	122
5.3.6- Referências bibliográficas	122
6- CONCLUSÕES GERAIS	132

RESUMO

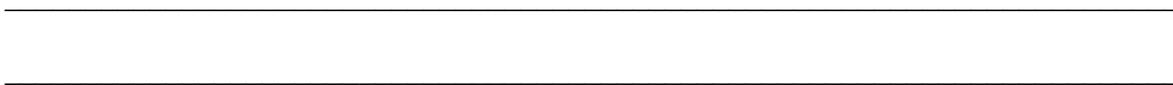
Considerando que a cor vermelha da acerola decorre da presença de antocianinas, objetivou-se caracterizá-las em frutos maduros provenientes de 12 genótipos. O teor de antocianinas e características cromáticas foram determinados pelo método pH diferencial e sistema CIELAB ($L^*a^*b^*$), respectivamente, e os resultados submetidos à correlação de Pearson. Pigmentos hidrolisados, separados por cromatografia líquida de alta eficiência, foram identificados tendo como base os padrões de referência. As antocianinas isoladas foram testadas quanto ao potencial antioxidante através do método β -caroteno/ácido linoléico e do radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH). O teor de antocianinas variou de 64,65 mg/100g (008-CPA) a 6,45 mg/100g (002-SPE). A polpa do genótipo 015-CPA foi caracterizada amarelada, enquanto a do 005-APE, a mais vermelha. Foram encontradas correlações positivas entre a concentração de antocianinas e o parâmetro a^* e negativas com L^* , b^* , C^* e h_{ab} . A cianidina e pelargonidina foram as antocianidinas identificadas em todos os genótipos. A atividade antioxidante situou-se entre 28,58 a 47,07% e a capacidade de seqüestrar o radical livre DPPH, variou em função dos genótipos, da concentração e do tempo de reação. Os resultados demonstraram que a influência da concentração das antocianinas na expressão da cor é parcial; as antocianinas possuem diferentes graus de glicosilação e ausência de acilação; os genótipos apresentam diferentes proporções de cianidina e pelargonidina; as antocianinas isoladas exibem capacidade antioxidante e o genótipo 008-CPA, pelo elevado teor de antocianinas, apresenta maior potencial antioxidante.

ABSTRACT



Since acerola's red color is due to anthocyanins presence, the aim of this research was to characterize these pigments in mature fruits from 12 genotypes. Total anthocyanins and chromatic characteristics were evaluated by pH differential method and CIELAB (L*a*b*) color system, respectively, and the results were submitted to the Pearson correlation. Hydrolyzed pigments, separated by high-performance liquid chromatography, were identified based on standard compounds. The antioxidant potential of isolated anthocyanins was measured according to the β -carotene bleaching method and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) assay. Anthocyanin contents varied from 64,65 mg/100g (008-CPA) to 6,45 mg/100g (002-SPE). The pulp of genotype 015-CPA was characterized as yellow whereas the pulp of 005-APE was the reddest. Positive correlations were found between anthocyanin contents and a* parameter and negatives with L*, b*, C* e h_{ab}. Cyanidin and pelargonidin were anthocyanidins identified in all genotypes. Antioxidant activity ranged from 25.58 to 47.04% a and the free radical scavenging capacity varied according to the genotypes, the concentration and the reaction time. The results showed that the influence of anthocyanin concentrations on color expression is partial; anthocyanins have different glycosylation patterns and absence of acylation; genotypes show different proportions of cyanidin and pelargonidin; isolated anthocyanins exhibit antioxidant capacity and the genotype 008-CPA, due to the high anthocyanin content, shows strong antioxidant potential.

INTRODUÇÃO



A aceroleira (*Malpighia emarginata* D.C.), cujos frutos são conhecidos pelo elevado conteúdo de vitamina C, foi introduzida no Brasil na década de 50. No entanto, apenas a partir do início da década de 80, seus plantios ganharam expressão econômica face à crescente demanda do mercado interno e externo (PAIVA; ALVES; BARROS, 1999).

Em decorrência da forma de propagação, inicialmente utilizada por sementes, os pomares comerciais de acerola no país apresentam acentuada variabilidade genética facilmente identificada em termos de produtividade, características das plantas e qualidade dos frutos (OLIVEIRA; SOARES FILHO, 1999).

A tônica dominante das pesquisas, iniciadas em 1950, sobre o seu fruto e produtos foi a avaliação do teor e estabilidade da vitamina C em relação aos diferentes estádios de maturação, condições de processamento e armazenamento (ASENJO; MOSCOSO, 1950; FITTING; MILLER, 1960; LEME Jr., FONSECA; NOGUEIRA, 1973; ROCHA, 1988; CARVALHO; MANICA, 1994; MATSUURA et al., 1997; MACIEL et al., 1999; MÉLO; LIMA; NASCIMENTO, 1999). Não obstante a importância da cor, parâmetro freqüentemente utilizado para avaliar o ponto ótimo de colheita dos frutos e como argumento de escolha pelo consumidor na hora da compra, a importância das antocianinas, pigmentos responsáveis pela cor vermelha da acerola madura, ganhou destaque a partir da década de 90 face ao conhecimento dos efeitos benéficos à saúde (KONG et al., 2003; LILA, 2004).

Os artigos científicos publicados sobre este tema, com vistas a identificar e caracterizar as antocianinas, em sua maioria, se reportam a frutos de clima temperado tais como: morango, framboesa, cereja doce, “blueberry, cranberry, chokeberry, lingonberry”, “bue honeysuckle” (*Lonicera caerulea* L.), amora negra, groselha negra, uvas, “sea

buckthorn (*Hippohaë rhamnoides*), “Chinese bayberry” (*Myrica rubra*), *Rhamnus alaternus* L., *Ruscus aculeatus* L.

Os resultados gerados evidenciam diferenças qualitativas e quantitativas entre os frutos da mesma espécie e de diferentes espécies, com reflexo sobre suas propriedades funcionais e aceitabilidade. No que diz respeito à identificação, caracterização e atividade antioxidante das antocianinas presentes em genótipos de acerola verifica-se que as informações são, além de escassas, incipientes. Desta forma, considerando o potencial do fruto quanto a esta propriedade, bem como a comprovada diversidade entre as espécies cultivadas foi implementada esta pesquisa com o objetivo de gerar novos conhecimentos, inclusive avaliar a influência genética sobre a atividade antioxidante deste fruto, de expressivo cultivo e consumo em nosso País.

REVISÃO DA LITERATURA

Parte desta Revisão da Literatura foi publicada no Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 37 (Supl.), p, 121-128, 2003.

CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE ACEROLA

A euforia inicial que caracterizou a explosão do cultivo da aceroleira no Brasil, cujo crescimento rápido e desordenado dos pomares pela utilização de mudas obtidas por via sexuada, originou alta segregação no porte e produção da planta, e no tamanho, forma, cor e teor de vitamina C dos frutos (GONZAGA NETO, 1995; GONZAGA NETO; MATTUZ; SANTOS, 1999; SEMENSATO; PEREIRA, 2000; LOPES; PAIVA, 2002; BRUNINI, et al., 2004).

Programas de melhoramento da aceroleira vêm sendo conduzidos por diversas instituições de pesquisa, visando selecionar genótipos de interesse agrônomo, baseado, principalmente, na qualidade do fruto e na alta produtividade (LOPES; PAIVA, 2002). Como resultado, foi lançada em 1998, a cultivar Sertaneja, indicada para cultivo nas áreas irrigadas do Submédio São Francisco, cujos frutos apresentam, dentre outras características agrônomicas, teor de vitamina C superior a 1.500 mg/100g de polpa (GONZAGA NETO; BEZERRA, 2000), e a cultivar Olivier, que produz frutos maduros de coloração vermelho-intensa, com teor de vitamina C de 2.022,5 mg/100g e período de pós-colheita mais prolongado selecionada em pomar comercial instalado no Município de Junqueirópolis-SP, (KANNO; RIZZI; KAVATI, 2000).

A elevada produção e perecibilidade destes frutos motivaram os tecnologistas a realizarem pesquisas tendo em vista a sua conservação e geração de novos produtos industrializados. O congelamento tem sido um dos principais métodos utilizados na conservação de polpas, cujos efeitos sobre a estabilidade de constituintes bioativos têm sido avaliados por diversos autores: teor de antocianinas (LIMA et al., 2003), de carotenóides (AGOSTINI-COSTA; ABREU; ROSSETTI, 2003) e de vitamina C (YAMASHITA et al., 2003). Recentemente, Matta, Moretti e Cabral (2004)

desenvolveram um processo para obter suco de acerola clarificado por microfiltração e concentrado por osmose reversa; Alves et al. (2005) aplicaram a desidratação osmótica aos frutos com o objetivo de diversificar as alternativas de consumo e ainda polpa de acerola em pó, obtida por secagem em leito de jorro, que teve sua estabilidade avaliada por Gomes, Figueirêdo e Queiroz (2004). O suco de acerola também tem sido utilizado na elaboração de “blends” como forma de enriquecer o suco integral de abacaxi com vitamina C (MATSUURA; ROLIM, 2002). Estes e outros produtos demonstraram a potencialidade industrial deste fruto.

Esta tendência também tem acompanhado as pesquisas voltadas para as funções biológicas exercidas pelos seus constituintes. Hoje se sabe que além da prevenção do escorbuto e da ação redutora da vitamina C, esta também atua como agente antioxidante (VANNUCCHI; JORDÃO Jr., 1998) sendo secundada por outros constituintes presentes no fruto. Hwang, Hodis e Sevanian (2001) relataram que a adição de extrato de acerola aos extratos de soja e de alfafa potencializou a inibição da oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL). Este efeito protetor foi atribuído a um possível sinergismo entre os flavonóides presentes nos extratos de soja e de alfafa e ao ácido ascórbico no extrato da acerola. Estudos recentes demonstram que extratos de acerola também contêm substâncias biofuncionais, como as antocianinas, cuja atividade biológica, sugere uma possível aplicação na redução de doenças degenerativas, inclusive câncer (MOTOHASHI et al., 2004).

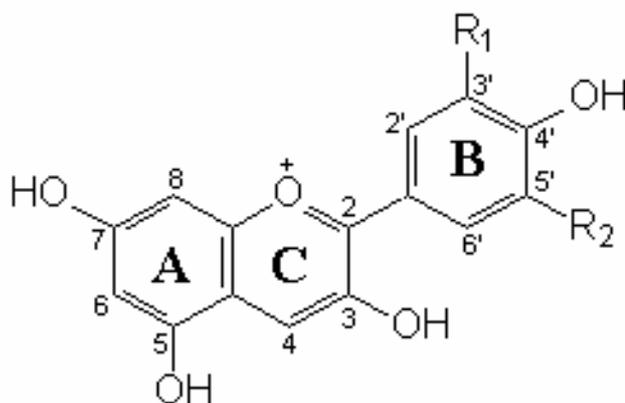
ANTOCIANINAS

Estrutura química e estabilidade

As antocianinas, pigmentos solúveis em água, são compostos fenólicos pertencentes à classe dos flavonóides que apresentam uma estrutura formada por dois anéis aromáticos ligados através de três carbonos, que normalmente formam um heterociclo oxigenado (BRAVO, 1998; ROBARDS et al., 1999). Esses pigmentos conferem as várias nuances entre laranja, vermelho e azul, exibidas pelas frutas, hortaliças, flores, folhas e raízes (FRANCIS, 1989). Esta diversidade justifica a ênfase dada às pesquisas relacionadas com a identificação das estruturas químicas e a estabilidade destas substâncias nas décadas de 60, 70 e 80 do século passado (SAKAMURA; FRANCIS, 1961; FRANCIS; SERVADIO, 1963; DARAVINGAS; CAIN, 1965; FRANCIS; HARBORNE; BARKER, 1966; DARAVINGAS; CAIN, 1966; FRANCIS, 1967; STARR; FRANCIS, 1968; FULEKI; FRANCIS, 1968; WROLSTAD; PUTNAM; VARSEVELD, 1970; DEKAZOS, 1970; SIEGEL; MARKAKIS; BEDFORD, 1971; WROLSTAD; ERLANDSON, 1973; SKALSKI; SISTRUNK, 1973; SAKELLARIADES; LUH; 1974; PALAMIDIS; MARKAKIS, 1975; BARRIT; TORRE, 1975; FLORA, 1976; CHAN Jr.; KAO-JAO; NAKAYAMA, 1977; WILLIAMS; HRAZDINA, 1979; POEI-LANGSTON; WROLSTAD, 1981; MACCARONE; MACCARRONE; RAPISARDA, 1985).

O termo “antocianinas”, derivado do grego (*anthos*, flores e *kyanos*, azul), foi criado por Marquart, em 1835 para designar os pigmentos azuis das flores (MARKAKIS, 1974; MAZZA; MINIATI, 1993). Quimicamente, apresentam como estrutura básica o cátion 2-fenilbenzopirilium, também denominado cátion flavilium (BOBBIO; BOBBIO, 1995). As antocianinas são glicosídeos que por hidrólise ácida, liberam agliconas também denominadas de antocianidinas e, dentre as encontradas na natureza, apenas seis estão

presentes nos alimentos: pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina e malvidina, que diferem entre si quanto ao número de hidroxilas e grau de metilação, presentes no anel B (Figura 1) (FRANCIS, 1989).



Antocianidinas	R ¹	R ²
Pelargonidina	H	H
Cianidina	OH	H
Delfinidina	OH	OH
Peonidina	OCH ₃	H
Petunidina	OCH ₃	OH
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃

Figura 1: Estrutura das seis antocianidinas mais comuns

Estes pigmentos podem estar glicosilados por diferentes açúcares, sempre ligados na posição 3. No caso de diglicosilação, o segundo açúcar geralmente encontra-se na

posição 5 e, de outras glicosilações, nas posições 7, 3', 4' e 5' (SHRIKHANDE, 1976; TIMBERLAKE, 1980; BROUILLARD, 1982). Os açúcares mais comumente ligados às estruturas das antocianidinas são, por ordem de ocorrência: glicose, ramnose, xilose, galactose, arabinose e frutose (FRANCIS, 1989). Dissacarídeos e trissacarídeos, formados pela combinação destes monossacarídeos, podem, também, estar glicosilados a algumas antocianidinas. Por sua vez, os resíduos de açúcares podem estar acilados com o ácido p-cumárico e, ocasionalmente, com os ácidos caféico, ferúlico ou sinápico e, algumas vezes, com os ácidos p-hidroxibenzóico, malônico, acético, succínico, oxálico e málico, que geralmente se encontram ligados ao C-4 da molécula do açúcar (MARKAKIS, 1974; BROUILLARD, 1982; FRANCIS, 1989; FRANCIS, 1982). À luz destas diferenciações, Jackman, Yada e Tung (1987) relataram a ocorrência de, pelo menos, 247 diferentes antocianinas na natureza, número que, segundo Strack e Wray, em 1994, foi alterado para aproximadamente 300.

Quanto à localização das antocianinas, Dekazos (1970) encontrou-as em maior proporção na película (0,4%) do que no fruto (aproximadamente 0,05%) de cerejas maduras. No que foi secundado por Gross (1987), que relatou a presença das mesmas no mesocarpo, a exemplo dos relatados para cerejas, morangos, groselhas e framboesa. Esta constatação também foi recentemente observada na pitanga roxa madura, que apresentou 0,42% e 0,03% de antocianinas na película e na parte comestível, respectivamente (LIMA; MÉLO; LIMA, 2002).

Segundo Brouillard (1982), as antocianinas são pigmentos muito instáveis, podendo ser destruídas por diversos fatores, tais como: presença de oxigênio, temperatura, pH do meio, teor de vitamina C, entre outros. Destes, o pH é o fator que mais afeta a cor da maioria das antocianinas em solução: vermelha, em pH ácido, azulada, em pH

intermediário, e incolor, em alcalino (MAZZA; BROUILLARD, 1987). A cor desses compostos também é influenciada pela presença de açúcares isolados e/ou açúcares acilados, dos grupos metoxil e hidroxil. A estabilidade das antocianinas é diretamente proporcional ao grau de metilação e, indiretamente, ao número de hidroxilas, encontrando-se também associada ao nível de glicosilação, uma vez que as moléculas diglicosiladas são mais estáveis do que as monoglicosiladas. Tendo em vista a baixa estabilidade das antocianinas, fator que tem limitado seu emprego como corante natural, pesquisas vêm sendo conduzidas com o intuito de minimizar a perda de cor (GARZÓN; WROLSTAD, 2002; REIN; HEINONEN, 2004), bem como de avaliar a estabilidade desses pigmentos de diferentes fontes (KAMMERER; CARLE; SCHIEBER, 2004; TORSKANGERPOLL; ANDERSEN, 2005; RUBINSKIENE et al., 2005; BAO et al., 2005; LIMA; MÉLO; LIMA, 2005). Estudos têm demonstrado que as antocianinas aciladas retêm melhor a cor e aumentam a estabilidade do pigmento em pH alcalino ou sob ação de outros fatores, como aquecimento, luz e SO₂ (JACKMAN et al., 1987; FRANCIS, 1989; DELGADO-VARGAS; JIMÉNEZ; PAREDES-LÓPES, 2000), sendo, portanto, uma alternativa promissora de corante natural para aplicação em alimentos (GIUSTI; WROLSTAD, 2003).

De um modo geral, a diferença da cor é dependente do tipo e concentração das antocianinas, cuja percentagem de participação, de acordo com Gross (1987), é de aproximadamente: 55% de cianidina, 12% de peonidina, 12% de delphinidina, 8% de pelargonidina, 8% de malvidina, e 6% de petunidina. Entretanto, nem todos esses tipos encontram-se presentes nos vegetais: em uvas, por exemplo, foram identificadas cianidina, delphinidina, petunidina, peonidina e malvidina (LAMIKANRA, 1988); em cerejas ácidas, Dekazos (1970) relatou a presença de cianidina e peonidina e, em suco de framboesa

vermelha, Boyles e Wrolstad (1993) demonstraram a presença de cianidina e pelargonidina.

Esta diversidade gerou inúmeras pesquisas que confirmaram a presença de antocianinas em diversos produtos alimentícios, tais como: casca de maracujá roxo (PRUTHI; SUSHEELA; LAL, 1961), casca de manga (PROCTOR; CREAZY, 1969), folhas de ruibarbo e rabanete (FULEKI, 1969), cebola roxa (FULEKI, 1971), berinjela (IGARASHI; YOSHIDA; SUZUKI, 1993), jambo do Pará (CARDOSO, 1994), morango (BAKKER; BRIDLE; BELLWORTHY, 1994), cereja doce (GAO; MAZZA, 1995), casca de maçã (CURRY, 1997), batata vermelha (RODRIGUEZ-SAONA; GIUSTI; WROLSTAD, 1998), batata doce roxa (OKI et al., 2002), repolho roxo (CHIGURUPATI et al., 2002), entre outros. No que diz respeito à identificação de antocianinas, apesar de escassas, algumas pesquisas foram implementadas no Brasil, conforme Tabela 1. Não obstante os esforços dependidos no desenvolvimento de pesquisas realizadas com o objetivo de quantificar e identificar as antocianinas constata-se a existência de uma considerável lacuna, face à diversidade de hortaliças e frutos, inclusive, os silvestres, consumidos no País e, particularmente, no Nordeste.

Recentemente, o interesse por esses pigmentos tem sido intensificado uma vez que pesquisas têm demonstrado que as antocianinas e suas respectivas agliconas, são compostos bioativos e que, entre os vários outros efeitos fisiológicos, possuem capacidade antioxidante (KÄHKÖNEN; HEINONEN, 2003), propriedade anti-inflamatória (SEERAM et al., 2001), promovem vaso-dilatação (BURNS et al., 2000), atuam na prevenção da hiperglicemia (MATSUI et al., 2002), inibem crescimento de células cancerígenas (MEIRES et al., 2001), estimulam a secreção de insulina (JAYAPRAKASAM et al., 2005) e melhoram a adaptação da visão noturna e previnem a fadiga visual (NAKAISHI et al.,

2000). Trabalhos recentes como, por exemplo, o desenvolvido por Hou et al. (2004) revisou o mecanismo molecular da ação anti-carcinogênica e anti-inflamatória e da indução do apoptose de células malignas pelas antocianidinas e o de Zhang, Vareed e Nair (2005) que constatou o efeito inibitório da cianidina, delphinidina, pelargonidina, petunidina e malvidina na proliferação de células humanas cancerígenas, originadas do estômago, colón, mama, pulmão e sistema nervoso central.

Tabela 1: Principais compostos antociânicos presentes em alimentos consumidos no Brasil

Fontes	Principais Antocianinas/Antocianidinas	Referências
Acerola (<i>Malpighia glabra</i>)	Malvidina, pelargonidina e cianidina	Silva, Guedes e Menezes (1998)
Caju (<i>Anacardium occidentale</i> L.)	Delfinidina, cianidina e pelargonidina	Agostini-Costa et al. (2000)
Ameixa (<i>Prunus salicina</i> L.)	Cianinidina 3-glicosídeo e cianidina 3-sambubiosídeo	Draetta et al. (1985)
Açaí (<i>Euterpe oleracea</i>)	Cianidina 3-arabinosídeo e cianidina 3-arabinosil-arabinosídeo	Bobbio et al. (2000)
Jambolão (<i>Eugenia jambolana</i> Lamarck)	Cianinidina 3-glicosídeo	Bobbio e Scamparini (1982)
Jaboticaba (<i>Myrciaria jaboticaba</i> L.)	Peonidina e peonidina 3-glicosídeo	Trevisan, Bobbio e Bobbio (1972)
Amora (<i>Rubus</i> sp.)	Cianidina glicosilada na posição 3 por um trissacarídeo composto por glicose, xilose e arabinose	Fadelli e Bobbio (2000)
Feijão preto (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Malvidina 3-glicosídeo, cianidina 3-glicosídeo e delphinidina 3-glicosídeo	Chiaradia, Gomes e Stringheta (2000)
Frutos de baguaçu (<i>Eugenia umbelliflora</i> Berg)	Delfinidina, cianidina, petunidina, pelargonidina, peonidina e malvidina glicosiladas com glicose, xilose e arabinose	Kuskoski et al. (2002)

Atividade antioxidante

A atividade metabólica humana produz, normalmente, radicais livres, moléculas ou fragmentos de moléculas que possuem, em sua órbita externa, elétrons livres, bastante reativos (JACOB; BURRI, 1996; PIETTA, 2000). Embora o organismo humano possua mecanismos para se proteger da ação desses radicais, incluindo a defesa enzimática (glutation-peroxidase, catalase, superóxido dismutase) e não enzimática (glutation, melatonina, albumina sérica, ácido úrico, caroteno, α -tocoferol, coenzima Q₁₀, retinol e ácido ascórbico, entre outros) (CHEESEMAN; SLATER, 1996; ROBARDS et al., 1999; PIETTA, 2000), estes, face à excessiva produção e à elevada reatividade dos referidos radicais livres, nem sempre são eficazes. Em consequência, os radicais livres gerados “in vivo” reagem com os lipídeos, proteínas, DNA, RNA, e outras substâncias, oxidando-as e promovendo danos que podem contribuir na patogênese de muitas doenças, como câncer, aterosclerose, artrite reumatóide, mal de Parkinson, mal de Alzheimer, entre outras (NAMIKI, 1990; JACOB; BURRI, 1996; HALLIWELL, 1996; POLLONIO, 1999; LANGSETH, 2000).

Estas constatações, aliadas às evidências epidemiológicas que apontam para uma estreita correlação entre o consumo de frutas e hortaliças e a redução de risco de doenças (AMES; SHIGENAGA; HAGEN, 1993), incentivaram a realização de pesquisas voltadas para a identificação de antioxidantes, substâncias que, de acordo com Bianchi e Antunes (1999), têm a capacidade de inibir e reduzir as lesões causadas pelos radicais livres nas células.

Em revisão sobre o tema, Mélo e Guerra (2002) relatam várias pesquisas que comprovam a ação antioxidante de especiarias (alecrim, canela, coentro, orégano, erva-doce) e de outros vegetais (alho, gengibre, soja e cevada). No mesmo ano, Ou et al., ao

avaliarem a capacidade antioxidante de 927 amostras de 13 vegetais, verificaram que esta propriedade é dependente da espécie, origem geográfica e época de colheita e que, dos vegetais estudados, o pimentão verde, o espinafre, a cebola roxa, o brócolis, a beterraba e a couve-flor apresentaram maior potencial antioxidante.

Esta ação está relacionada à presença de compostos bioativos, como β -caroteno, vitamina C, vitamina E e flavonóides. A eficácia destes últimos como antioxidantes tem sido comprovada por diversas pesquisas (TOREL; CILLARD; CILLARD, 1986; YUTING et al., 1990; SICHEL et al., 1991; KANDASWAMI; MIDDLETON Jr., 1994; RICE-EVANS et al., 1995; BROWN et al., 1998). A propriedade antioxidante das antocianinas vem sendo estudada por diversos pesquisadores, face à sua presença em um significativo número de alimentos de origem vegetal e pela diversidade de sua estrutura química (MORAZZONI; MALANDRINO, 1988; SAUTÉ-GRACIA; HEINONEM; FRANKEL, 1997; PRIOR et al., 1998; KALT et al., 1999; WANG et al., 1999; ESPÍN et al., 2000; KALT; McDONALD; DONNER, 2000; SEERAM et al., 2001; TSAI et al., 2002; OKI et al., 2002; SEERAM; NAIR, 2002; STINTZING et al., 2002; MATSUMOTO et al., 2002; ZHENG; WANG, 2003).

De acordo com Bors et al. (1990) e Pietta (2000), um flavonóide, para ser eficaz, deve apresentar um ou mais das seguintes características:

- a) a presença de 3',4'-dihidroxil na estrutura do anel B;
- b) uma dupla ligação no C-2,3 conjugado com um grupo carbonila presente no carbono 4 (anel C);
- c) a presença adicional de grupos hidroxilas no C-3 e C-5.

As diferentes metodologias empregadas para avaliar a capacidade antioxidante de uma substância apresentam, em comum, o fato de utilizarem, como padrão, antioxidantes sintéticos ou compostos de comprovada ação antioxidante, como, por exemplo, o Trolox (RAJALAKSHMI; NARASIMHAN, 1995; SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999). Na execução dos ensaios é necessário considerar, dentre outros aspectos, a composição do sistema, o tipo de substrato oxidável, o modo de acelerar a oxidação e a forma de quantificar a atividade antioxidante, cuja eficiência deve ser comparada utilizando a mesma concentração da substância “teste” e do padrão (FRANKEL, 1993; FRANKEL; MEYER, 2000).

A importância das estruturas das antocianinas tem sido evidenciada por diversos pesquisadores: Igarashi et al. (1989) demonstraram que a malvidina, isolada de uva silvestre, apresentou maior capacidade antioxidante do que a malvidina 3,5-diglicosídeo, através do método de tiocianato férrico; Shahidi e Wanasundara (1992), em revisão sobre o tema, referem que a glicosilação dos flavonóides no C-3, com mono ou dissacarídeos, também reduz a atividade antioxidante, em relação à sua correspondente aglicona; Wang, Cao e Prior (1997), ao avaliarem a capacidade antioxidante de 14 antocianinas, incluindo delphinidina, cianidina, pelargonidina, malvidina, peonidina e suas estruturas ligadas a diferentes açúcares, pelo teste ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) e o radical peroxil (ROO^\bullet), constataram que a cianidina 3-glicosídeo apresentou um valor de ORAC 3,5 superior ao do Trolox. No que diz respeito às demais cianidinas, a ordem foi a seguinte: cianidina-3-glicosídeo > cianidina-3-ramnoglicosídeo > cianidina > cianidina-3-galactosídeo > cianidina-3,5-diglicosídeo.

Igarashi, Yoshida e Suzuki (1993) verificaram, com relação às antocianinas da beringela, que a atividade antioxidante da nasunina (delphinidina-3-(p-cumaroil-

rutinosídeo)-5-glicosídeo), presente na pele do fruto deste vegetal, foi maior que a da sua aglicona, através da inibição da oxidação do β -caroteno induzida pelo sistema ácido linoléico-lipoxigenase, provavelmente devido à presença do ácido p-cumárico na sua estrutura, ação que posteriormente foi corroborada por Noda et al., em 2000. Tamura e Yamagami (1994) testaram a capacidade antioxidante de malvidina 3-glicosídeo, malvidina 3,5-diglicosídeo e estas, aciladas com ácido p-cumárico, extraídas de cascas de uva, e registraram, para a malvidina 3-p-cumaroilglicosídeo-5-glicosídeo, um maior percentual de inibição da peroxidação do ácido linoléico, demonstrando que a presença de um grupo acil na molécula aumenta a atividade antioxidante e pode agir como sinergista intramolecular. Muñoz-Espada et al. (2004) relataram que em cascas de uvas das variedades “Concord”, “Marechal Foch” e “Norton”, embora a malvidina 3,5-diglicosídeo estivesse presente em todas as amostras, constataram que esta última, apresentou o maior teor de antocianinas, a mais elevada concentração de malvidina 3,5-diglicosídeo e a maior capacidade de seqüestrar o radical livre 1, 1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH).

No que diz respeito à capacidade de capturar espécies reativas de oxigênio, Tsuda et al. (1996), ao avaliarem a ação das antocianinas pelargonidina, cianidina e delphinidina, todas glicosiladas no C-3, isoladas e purificadas, de feijão vermelho e preto, bem como suas respectivas agliconas, de fontes comerciais, constataram uma superioridade da delphinidina 3-glicosídeo em capturar o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), que foi atribuída ao número de grupos hidroxilas no anel B. Quando se tratou da captura do radical hidroxila (OH^{\bullet}), o melhor efeito foi apresentado pela pelargonidina. A influência das estruturas químicas sobre a resposta do teste também foi demonstrada por Sichel et al. (1991), que estabeleceram, no que diz respeito à eficácia em capturar o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), a

seguinte ordem: pelargonidina > malvidina 3-glicosídeo > malvidina 3-5-diglicosídeo > cianidina > pelargonidina 3-5-diglicosídeo > pelargonidina 3-glicosídeo > peonidina.

A posição e o grau de hidroxilação é de importância primária na capacidade antioxidante dos flavonóides, sendo a estrutura o-dihidroxila presente no anel B, a característica determinante da capacidade antioxidante desses compostos (SHAHIDI; WANASUNDARA, 1992; PIETTA, 2000). Em 2002, Noda et al., ao relatarem a capacidade de seqüestrar radicais livres (hidroxila, OH^\bullet e superóxido, $\text{O}_2^{\bullet-}$) e de inibir a peroxidação lipídica, em homogenato de cérebro de ratos, induzida por H_2O_2 , com antocianidinas da romã, registraram uma superioridade da delfinidina em relação à cianidina e pelargonidina, provavelmente pela presença dos grupos hidroxilas no C-3', 4' e 5' do anel B.

Em 2000, Youdim, Martin e Joseph demonstraram que antocianinas, obtidas de extrato de “elderberry” (*Sambucus nigra* L.), são incorporadas na membrana e no citosol de células endoteliais vasculares, conferindo um significativo efeito protetor contra o estresse oxidativo. A modificação oxidativa da lipoproteína de baixa densidade (LDL), molécula constituída por um complexo de lipídeos, uma proteína de grande peso molecular (apolipoproteína B), e antioxidantes lipofílicos, principalmente α -tocoferol e β -caroteno, tem sido apontada como o principal mecanismo relacionado com a patogênese da aterosclerose (BATLOUNI, 1997). Neste contexto, as antocianinas podem exercer efeito benéfico sobre a aterogênese, por serem capazes de inibir a oxidação *in vitro* de LDL humana (SAUTÉ-GRACIA; HEINONEN; FRANKEL, 1997). Embora não tenham quantificado o teor de antocianinas no extrato aquoso de *Vaccinium myrtillus*, Laplaud, Lelubre e Chapman (1997) registraram um efeito desse extrato contra a oxidação *in vitro* de LDL humana.

A evidência de que, não obstante o elevado consumo de gordura saturada, certas regiões da França apresentam uma baixa incidência de doenças cardiovasculares em relação aos Estados Unidos e Reino Unido, encontra-se correlacionada ao consumo de vinho tinto ("paradoxo francês") (RENAUD; de LORGERIL, 1992). Saint-Cricq de Gaulejac, Glories e Vivas (1999) levantam a hipótese de que este benefício advém das antocianinas presentes nesta bebida.

No entanto, apesar do crescente avanço científico sobre a atividade biológica das antocianinas, ainda é pouco o conhecimento sobre a biodisponibilidade e destino metabólico desses compostos em humanos. Pesquisas realizadas por Miyazawa et al. (1999) e Matsumoto et al. (2001), demonstraram que as antocianinas mantêm sua estrutura de glicosídeo, e que, no plasma e na urina de voluntários, não foram encontradas agliconas nem conjugados ou metilados de antocianinas. Esta tendência foi confirmada por Pérez-Vicente; Gil-Izquierdo; Garcia-Vigueira (2002) que, ao avaliarem, *in vitro*, a digestão gastrointestinal de antocianinas da romã, não constataram a presença de agliconas, comprovando a inexistência de hidrólise da ligação glicosídica durante o referido processo.

Entretanto, alguns pesquisadores relataram a existência de possíveis metabólitos e Miyazawa et al. (1999) alertaram sobre a possibilidade de algumas antocianinas serem absorvidas e metabolizadas a formas não coloridas, não detectáveis nas condições por eles empregadas. Cao et al. (2001) e Milbury et al. (2002), constataram que após a ingestão de extrato de "elderberry", contendo cianidina 3- sambubiosídeo e cianidina 3-glicosídeo, além das antocianinas glicosiladas, apresentaram outros picos, identificados como cianidina e malvidina hexosídeo em baixas concentrações no plasma e, na urina, quatro picos, que por não apresentarem espectro típico de antocianinas, foram considerados possíveis metabólitos. Após 4h do consumo de extrato de "elderberry", Wu, Cao e Prior

(2002), encontraram na urina, a presença de quatro metabólitos e a ocorrência de metilação da cianidina a peonidina, através da detecção de peonidina 3-glicosídeo e peonidina 3-sambubiosídeo; e de glicuronidação, pela presença de peonidina monoglicuronídeo e cianidina 3-glicosídeo monoglicuronídeo. Segundo Felgines et al. (2003), na urina de voluntários que consumiram morango, além de ser detectada a pelargonidina 3-glicosídeo, cinco metabólitos foram identificados: três como pelargonidina monoglicuronídeo, um sulfoconjugado de pelargonidina e um, como pelargonidina. Esses autores verificaram, ainda, que a taxa de excreção dos metabólitos das antocianinas do morango foi 1,8% da pelargonidina 3-glicosídeo ingerida e mais de 80% dessa excreção foi representada por monoglicuronídeos. Entretanto, Bitsch et al. (2004) relataram, após cinco horas da ingestão oral de suco de “elderberry”, que a taxa de metabólitos de antocianinas detectadas na urina, em relação à dose administrada, foi de 0,053% como cianidinas glicosiladas e apenas 0,003% como cianidina glicuronídeos e, que a glicuronidação da cianidina representa uma etapa negligenciável de conversão no metabolismo da cianidina presente nesse fruto.

Ainda que os experimentos com humanos tenham sido realizados com um número restrito de voluntários, variando entre 1 (CAO; PRIOR, 1999; MURKOVIC; ADAM; PFANNHAUSER, 2000) a 16 (MÜLLEDER; MURKOVIC; PFANNHAUSER, 2002), essas pesquisas vêm contribuindo para demonstrar a biodisponibilidade desses compostos. No entanto, as pesquisas implementadas, em sua maioria, a partir da década de 90, levantam, face à complexidade do tema, algumas controvérsias que necessitam ser dirimidas.

A literatura, nas últimas décadas, tem apresentado um considerável avanço científico no que diz respeito à caracterização das antocianinas, bem como quanto à sua

estabilidade frente aos processos tecnológicos, o que contribui positivamente para a qualidade dos alimentos e, conseqüentemente, sua aceitabilidade. Mais recentemente, diante das evidências de que as antocianinas atuam como antioxidante, tema dos mais atuais na ciência dos alimentos e da saúde, ocorreu um redirecionamento nas pesquisas sobre estas substâncias, com vistas a avaliar esta propriedade funcional. Não obstante a diversidade desses compostos e das metodologias empregadas, esta propriedade tem sido confirmada e demonstrada sua correlação com a estrutura química. Outros efeitos fisiológicos propalados pela literatura culminaram com o reconhecimento das antocianinas como substâncias biologicamente ativas, impulsionando pesquisas sobre outros aspectos, inclusive, a biodisponibilidade. Com relação a esta, o conhecimento disponível sobre a absorção, metabolismo e excreção desses compostos é, ainda, bastante incipiente, necessitando de futuros estudos para elucidá-los. A maioria destes estudos foi realizada com frutos de clima temperado, especialmente as “berries”, o que abre a perspectiva de estendê-los aos frutos nativos brasileiros que apresentam coloração típica destes pigmentos. As antocianinas, portanto, continuam sendo um tema promissor para novas investigações científicas, com vistas a uma melhor exploração do seu potencial, inclusive na redução de riscos à saúde.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINI-COSTA, T.S.; ABREU, L.N.; ROSSETTI, A.G. Efeito do congelamento e do tempo de estocagem da polpa de acerola sobre o teor de carotenóides. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.25, p.56-58, 2003.

AGOSTINI-COSTA, T.S.; SANTOS, J.R.; GARRUTI, D.S.; FEITOSA, T. Caracterização, por cromatografia em camada delgada, dos compostos fenólicos presentes em pedúnculos de caju (*Anacardium occidentale* L.). **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v.18, p.129-137, 2000.

ALVES, D.G.; BARBOSA Jr., J.L.; ANTÔNIO, G.C.; MURR, F.E.X. Osmotic dehydration of acerola fruit (*Malpighia puniceifolia* L.). **Journal of Food Engineering**, v.68, p.99-103, 2005.

AMES, B.N.; SHIGENAGA, M.K.; HAGEN, T.M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.90, p.7915-7922, 1993.

ASENJO, C.F.; MOSCOSO, C.G. Ascorbic acid content and other characteristics of the West Indian cherry. **Food Research**, v.15, p.103-106, 1950.

BAKKER, J.; BRIDLE, P.; BELLWORTHY, S.J. Strawberry juice colour: a study of the quantitative and qualitative pigment composition of juice from 39 genotypes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.64, p.31-37, 1994.

BAO, J.; CAI, Y.; SUN, M.; WANG, G.; CORKE, H. Anthocyanins, flavonols, and radical scavenging activity of Chinese bayberry (*Myrica rubra*) extracts and their color properties and stability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.2327-2332, 2005.

BARRIT, B.H.; TORRE, L.C. Fruit anthocyanin of red raspberry cultivars. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.100, n.2, p.98-100, 1975.

BATLOUNI, M. Hipótese oxidativa da aterosclerose e emprego dos antioxidantes na doença arterial coronária. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.68, n.1, 1997. [on line] Disponível em: <http://www.epub.org.br/abc/6801/tjan12.htm> [acesso em 01/03/2003].

BIANCHI, M. de L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n.2, p. 123-130, 1999.

BITSCH, R.; NETZEL, M.; SONNTAG, S.; STRASS, G.; FRANK, T.; BITSCH, I. Urinary excretion of cyanidin glucosides and glucuronides in healthy humans after elderberry juice ingestion. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v.5, p.343-345, 2004.

BOBBIO, F.O.; DRUZIAN, J.I.; ABRÃO, P.A.; BOBBIO, P.A.; FADELLI, S. Identificação e quantificação das antocianinas do fruto de açaizeiro (*Euterpe oleracea*) Mart. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.20, n.3, p.388-390, 2000.

BOBBIO, F.O.; SCAMPARINI, A.R.P. Carbohydrates, organic acid and anthocyanin of *Eugenia jambolana* Lamarck. **Industrie Alimentari**, v.21, n.4, p.296-298, 1982.

BOBBIO, P.A.; BOBBIO, F.O. Pigmentos naturais. In: BOBBIO, P.A.; BOBBIO, F.O. (Ed.) **Introdução à química de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Varela, 1995. p.191-223.

BORS, W.; HELLER, W.; MICHEL, C.; SARAN, M. Flavonoids as antioxidant: determination of radical-scavenging efficiencies. **Methods in Enzymology**, v.186, p.343-355, 1990.

BOYLES, M.J.; WROLSTAD, R.E. Anthocyanin composition of red raspberry juice: influence of cultivar, processing, and environmental factors. **Journal of Food Science**, v.58, p.1135-1141, 1993.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v.56, n.11, p.317-333, 1998.

BROUILLARD, R. Chemical structure of anthocyanins. In: MARKAKIS, P. (Ed.) **Anthocyanins as food colors**. London: Academic Press, 1982. p.1-40.

BROWN, J.E.; KHODR, H.; HIDER, R.C.; RICE-EVANS, C.A. Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties. **Biochemical Journal**, v.330, p.1173-1178, 1998.

BRUNINI, M.A.; MACEDO, N.B.; COELHO, C.V.; SIQUEIRA, G.F. Caracterização física e química de acerolas provenientes de diferentes regiões de cultivo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.26, p.486-489, 2004.

BURNS, J.; GARDNER, P.T., O'NEIL, J.; CRAWFORD, S.; MORECROFT, I.; McPHAIL, D.B.; LISTER, C.; MATTHEWS, D.; MacLEAN, M.R.; LEAN, M.E.J.; DUTHIE, G.G.; CROZIER, A. Relationship among antioxidant activity, vasodilation capacity, and phenolic content of red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.220-230, 2000.

CAO, G.; MUCCITELLI, H.U.; SÁNCHEZ-MORENO, C.; PRIOR, R.L. Anthocyanins are absorbed in glycosylated form in elderly woman: a pharmacokinetic study. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, p.920-926, 2001.

CAO, G.; PRIOR, R.L. Anthocyanins are detected in human plasma after oral administration of an elderberry extract. **Clinical Chemistry**, v.45, p.574-576, 1999.

CARDOSO, R.L. **Estabilidade da geléia de jambo-vermelho (*Eugenia malaccensis*, Lin) em copo de vidro**. 1994. 157f. Dissertação (Mestrado)-UNICAMP, Campinas.

CARVALHO, R.I.; MANICA, I. Influência de estádios de maturação e condições de armazenamento na conservação da acerola (*Malpighia glabra* L.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 29, p. 681-688, 1994.

CHAN Jr., H.T.; KAO-JAO, T.H.C.; NAKAYAMA, T.O.M. Anthocyanin composition of taro. **Journal of Food Science**, v.42, p.19-21, 1977.

CHEESEMAN, K. H.; SLATER, T. F. Uma introdução à bioquímica dos radicais livres. In: CHEESEMAN, K. H.; SLATER, T. F (Ed.) **Radicais livres na medicina**. Rio de Janeiro: Interlivros, 1996. p.1-13.

CHIARADIA, A.C.N.; GOMES, J.C.; STRINGHETA, P.C. Caracterização de antocianinas de feijão preto (*Phaseolus vulgaris* L.). **Revista Brasileira de Corantes**, v.4, n.1, p.91-96, 2000.

CHIGURUPATI, N.; SAIKI, L.; GAYSER Jr., C.; DASK, A.K. Evaluation of red cabbage dye as a potent natural color for pharmaceutical use. **International Journal of Pharmaceutics**, v.241, p.293-299, 2002.

CURRY, E.A. Temperatures for optimum anthocyanin accumulation in apple tissue. **Journal of Horticultural Science**, v.72, p.723-729, 1997.

DARAVINGAS, G.; CAIN, R.F. Changes in the anthocyanin pigments of raspberries during processing and storage. **Journal of Food Science**, v.30, p.400-405, 1965.

DARAVINGAS, G.; CAIN, R.F. The anthocyanin pigments of black raspberries. **Journal of Food Science**, v.31, p.927-936, 1966.

DEKAZOS, E. D. Quantitative determination of anthocyanin pigments during the maturation and ripening of red tart cherries. **Journal of Food Science**, v. 35, p.242-244, 1970.

DELGADO-VARGAS, F.; JIMÉNEZ, A.R.; PAREDES-LÓPEZ, O. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains - characteristics, biosynthesis, processing, and storage. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.40, n.3, p.173-289, 2000.

DRAETTA, I.S.; IADEROZA, M.; BALDINI, V.L.S.; FRANCIS, F.J. Antocianinas de ameixa (*Prunus salicina* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.5, p.31-38, 1985.

ESPÍN, J.C.; SOLER-RIVAS, C.; WICHERS, H.J.; GARCÍA-VIGUERA, C. Anthocyanin-based natural colorants: a new source of antiradical activity for foodstuff. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.1588-1592, 2000.

FADELLI, S.; BOBBIO, F.O. Identificação das antocianinas presentes em amora (*Rubus* sp.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 17, 2000, Fortaleza. p.5.88.

FELGINES, C.; TALAVERA, S. GONTHIER, M.P.; TEXIER, O.; SCALBERT, A.; LAMAISON J.L.; REMESY, C. Strawberry anthocyanins are recovered in urine as glucuro- and sulfoconjugates in humans. **Journal of Nutrition**, v.133, p.1296-1301, 2003.

FITTING, K.O.; MILLER, C.D. The stability of ascorbic acid in frozen and bottled acerola juice alone and combined with other fruit juices. **Food Research**, v.25, p. 203-210, 1960.

FLORA, L.F. Time-temperature influence on muscadine grape juice quality. **Journal of Food Science**, v.41, p.1312-1315, 1976.

FRANCIS, F.J. Anthocyanins of asparagus. **Journal of Food Science**, v.32, p.430-431, 1967.

FRANCIS, F.J. Analysis of anthocyanins. In: MARKAKIS, P. (Ed) **Anthocyanins as food colors**. London: Academic Press, 1982. p.181-207.

FRANCIS, F.J. Food colorants: anthocyanins. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.28, n.4, p.273-314, 1989.

FRANCIS, F.J.; HARBORNE, J.B.; BARKER, W.G. Anthocyanins in the lowbush blueberry, *Vaccinium angustifolium*. **Journal of Food Science**, v.31, p.583-587, 1966.

FRANCIS, F.J.; SERVADIO, G.J. Relation between color of cranberries and color and stability of juice. **Proceeding of the American Society for Horticultural Science**, v.38, p.406-415, 1963.

FRANKEL, E.N. In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in foods lipids. **Trends in Food Science & Technology**, v.4, p.220-225, 1993.

FRANKEL, E.N.; MEYER, A.S. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.80, p.1925-1941, 2000.

FULEKI, T. Anthocyanins in red onion, *Allium cepa*. **Journal of Food Science**, v.36, p.101-104, 1971.

FULEKI, T. The anthocyanins of strawberry, rhubarb, radish and onion. **Journal of Food Science**, v.34, p.365-369, 1969.

FULEKI, T.; FRANCIS, F.J. Quantitative methods for anthocyanins. 4. Determination of individual anthocyanins in cranberry and cranberry products. **Journal of Food Science**, v.33, p.471-478, 1968.

GAO, L.; MAZZA, G. Characterization, quantitation, and distribution of anthocyanins and colorless phenolics in sweet cherries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.43, p.343-346, 1995.

GARZÓN, G.A.; WROLSTAD, R.E. Comparison of the stability of pelargonidin-based anthocyanins in strawberry juice and concentrate. **Journal of Food Science**, v.67, p.1288-1299, 2002.

GIUSTI, M.M.; WROLSTAD, R.E. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. **Biochemical Engineering Journal**, v.14, p.217-225, 2003.

GOMES, P.M.A.; FIGUEIRÊDO, R.M.F.; QUEIROZ, A.J.M. Armazenamento da polpa de acerola em pó a temperatura ambiente. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, p.384-389, 2004.

GONZAGA NETO, L.; BEZERRA, J.E.F. Acerola Sertaneja. In: DONADIO, L.C. (Ed). **Novas variedades brasileiras de frutas**, Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2000. p. 26-27.

GONZAGA NETO, L.; MATTUZ, B-H.; SANTOS, C.A.F. Caracterização agronômica de clones de aceroleira (*Malpighia* spp.) na Região do Submédio São Francisco. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 21, p.110-115, 1999.

GONZAGA NETO, L. Melhoramento genético da aceroleira. In: SÃO JOSÉ, A.R., ALVES, R.E. (Ed.). **Acerola no Brasil- produção e mercado**. Vitória da Conquista: DFZ/UESB, 1995. p. 15-27

GROSS, J. Anthocyanins. In: GROSS, J. (Ed.) **Pigments in fruits**. London: Academic Press, 1987. p.59-85.

HALLIWELL, B. Antioxidant in human health and disease. **Annual Review in Nutrition**, v.19, p.33-50, 1996.

HOU, DX.; FUJII, M.; TERAHARA, N.; YOSHIMOTO, M. Molecular mechanisms behind the chemopreventive effects of anthocyanidins. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v.5, 321-352, 2004.

HWANG, J.; HODIS, H.N.; SEVANIAN, A. Soy and alfalfa phytoestrogen extracts become potent low-density lipoprotein antioxidants in the presence of acerola cherry extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.49, p.308-314, 2001.

IGARASHI, K.; TAKANASHI, K.; MAKINO, M.; YASUI, T. Antioxidant activity of major anthocyanin isolated from wild grapes (*Vitis coignetiae*). **Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi**, v.36, n.10, p.852-856, 1989.

IGARASHI, K.; YOSHIDA, T.; SUZUKI, E. Antioxidant activity of nasunin in chouja-nasu (little eggplant, *Solanum melongena* L. 'Chouja'). **Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi**, v.40, n.2, p.138-143, 1993.

JACKMAN, R.L.; YADA, R.Y.; TUNG, M.A. A review: separation and chemical properties of anthocyanins used for their qualitative and quantitative analysis. **Journal of Food Biochemistry**, v.11, p.279-308, 1987.

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

JACOB, R.A.; BURRI, B. Oxidative damage and defense. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.63(s), p.985-990, 1996.

JAYAPRAKASAM, B.; VAREED, S.K.; OLSON, L.K.; NAIR, M.G. Insulin secretion by bioactive anthocyanins and anthocyanidins present in fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, 28-31, 2005.

KÄHKÖNEN, M.P.; HEINONEN, M. Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.628-633, 2003.

KALT, W.; FORNEY, C.F.; MARTIN, A.; PRIOR, R.L. Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics and anthocyanin after fresh storage of small fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, n.11, p.4638-4644, 1999.

KALT, W., McDONALD, J.E., DONNER, H. Anthocyanins, phenolics and antioxidant capacity of processed lowbush blueberry products. **Journal of Food Science**, v.65, n.3, p.390-393, 2000.

KAMMERER, D.; CARLE, R.; SCHIEBER, A. Quantification of anthocyanins in black carrot extracts (*Daucus carota* ssp.*sativus* var. *atrorubens* Alef.) and evaluation of their color properties. **European Food Research and Technology**, v.219, p. 479-486, 2004.

KANDASWAMI, C.; MIDDLETON Jr., E. Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.366, p.351-376, 1994.

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

KANNO, O.Y.; RIZZI, L.C.; KAVATI, R. Acerola Olivier. In: DONADIO, L.C. (Ed). **Novas variedades brasileiras de frutas**, Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2000. p. 24-25.

KUSKOSKI, E.M.; RUZZA, A.; ASUERO, A.G.; BRIGHENTE, I.M.C.; FETT, R. Determinación de antocianos en frutos de baguaçu (*Eugenia umbelliflora* Berg) por cromatografía líquida de alta resolución. **Alimentaria**, v. 39, n. 338, p.113-119, 2002.

LAMIKANRA, O. Development of anthocyanin pigments in muscadine grapes. **HortScience**, v.23, n.3, p.597-599, 1988.

LANGSETH, L. Antioxidants and their effect on health. In: SCHMIDL, M.K.; LABUZA, T.P. (Ed.) **Essentials of functional foods**. Gaithersburg: Aspen Publishers, 2000. p.303-317.

LAPLAUD, P.M.; LELUBRE, A.; CHAPMAN, M.J. Antioxidant action of *Vaccinium myrtillus* extract on human low density lipoproteins in vitro: initial observations. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v.11, p.35-40, 1997.

LEME Jr., J.; FONSECA, H.; NOGUEIRA, J. N. Variação do teor de ácido ascórbico e beta-caroteno em cereja das Antilhas (*Malpighia puniceifolia* L.) liofilizada. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.23, n.2, p. 207-215, 1973.

LILA, M.A. Anthocyanins and human health: an in vitro investigative approach. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v.5, p.306-313, 2004.

LIMA, V.L.A.G.; MÉLO, E.A.; LIMA, D.E.S. Efeito da luz e da temperatura de congelamento sobre a estabilidade das antocianinas da pitanga roxa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, p.92- 94, 2005.

LIMA, V.L.A.G.; MÉLO, E.A.; MACIEL, M.I.S.; LIMA, D.E. S. Avaliação do teor de antocianinas em polpa de acerola congelada proveniente de frutos de 12 diferentes aceroleiras (*Malpighia emarginata* DC.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, p. 101-103, 2003.

LIMA, V.L.A.G.; MÉLO, E.A.; LIMA, D.E. S. Fenólicos e carotenóides totais em pitanga. **Scientia Agricola**, v.59, p.447-450, 2002.

LOPES, R.; PAIVA, J.R. Aceroleira. In: Bruckner, Claudio Horst (Ed.). **Melhoramento de Fruteiras Tropicais**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2002. p.3-99.

MACCARONE, E.; MACCARRONE, A.; RAPISARDA, P. Stabilization of anthocyanins of blood orange fruit juice. **Journal of Food Science**, v.50, p.901-904, 1985.

MACIEL, M.I.S; MÉLO, E.A.; LIMA, V.L.A.G.; SILVA, M.R.F.; SILVA, I.P. Processing and storage of acerola (*Malpighia* sp.) fruit and its products. **Journal of Food Science and Technology**, v.36, n.2, p.142-146, 1999.

MARKAKIS, P. Anthocyanins and their stability in foods. **Critical Reviews in Food Technology**, v.4, p.437-456, 1974.

MATSUI, T.; EBUCHI, S.; KOBAYASHI, M.; FUKUI, K.; SUGITA, K.; TERAHARA, N.; MATSUMOTO, H. Anti-hyperglycemic effect of diacylated anthocyanin derived from *Ipomoea batatas* cultivar Ayamurasaki can be achieved through the α -glucosidase inhibitory action. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.7244-7248, 2002.

MATSUMOTO, H.; INABA, H.; KISHI, M.; TOMINAGA S.; HIRAYAMA, M.; TSUDA, T. Orally administered delphinidin 3-rutinoside and cyanidin 3-rutinoside are directly absorbed in rats and humans and appear in the blood as the intact forms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n.3, p.1546-1551, 2001.

MATSUMOTO, H.; NAKAMURA, Y.; HIRAYAMA, M.; YUMIKO, Y.; OKUBO, Z. Antioxidant activity of black currant anthocyanin aglycons and their glycosides measured by chemiluminescence in a neutral ph region and in human plasma. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.18, p.5034-5037, 2002.

MATSUURA, F.C.A.U.; ROLIM, R.B. Avaliação da adição de suco de acerola em suco de abacaxi visando à produção de um “blend” com alto teor de vitamina C. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, p.138-141, 2002.

MATSUURA, F.C.A.U.; MENEZES, H.C.; BRUSANTIN, P.O.; MARQUES, M.P.R.M. Processamento e avaliação de acerola em calda. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 19, n. 2, p. 235-240, 1997.

MATTA, V.M.; MORETTI, R.H.; CABRAL, L.M.C. Microfiltration and reverse osmosis for clarification and concentration of acerola juice. **Journal of Food Engineering**, v.61, p.477-482, 2004.

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

MAZZA, G.; MINIATI, E. Introduction I. Types of anthocyanins. In: MAZZA, G.; MINIATI, E. (Ed.) **Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains**. Boca Raton: CRC Press, 1993. p.1-28.

MEIRES, S.; KEMÉNY, M.; WEYAND, U.; GASTPAR, R.; von ANGERER, E.; MARKO, D. The anthocyanidins cyanidin and delphinidin are potent inhibitors of the epidermal growth-factor receptor. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.958-962, 2001.

MÉLO, E.A.; GUERRA, N.B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.36, p.1-11, 2002.

MÉLO, E.A.; LIMA, V.L.A.G.; NASCIMENTO, P.P. Formulação e avaliação físico-química e sensorial de geléia mista de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) e acerola (*Malpighia* sp). **Boletim do CEPPA**, v.17, n.1, p.33-44, 1999.

MILBURY, P.E.; CAO, G.; PRIOR, R.L.; BLUMBERG, J. Bioavailability of elderberry anthocyanins. **Mechanisms of Ageing and Development**, v.123, p.997-1006, 2002.

MIYAZAWA, T.; NAKAGAWA, K.; KUDO, M.; MURAISHI, K.; SOMEYA, K. Direct intestinal absorption of red fruit anthocyanins, cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-5-diglucoside, into rats and humans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, n. 3, p.1083-1091, 1999.

MORAZZONI, P.; MALANDRINO, S. Anthocyanins and their aglycons as scavengers of free radicals and antilipoperoxidant agents. **Pharmacological Research Communications**, v.20, p.254, 1988.

MOTOHASHI, N.; WAKABAYASHI, H.; KURIHARA, T.; FUKUSHIMA, H.; YAMADA, T.; KAWASE, M.; SOHARA, Y.; TANI, S.; SHIRATAKI, Y.; SAKAGAMI, H.; SATOH, K.; NAKASHIMA, H.; MOLNÁR, A.; SPENGLER, G.; GYÉMÁNT, N.; UGOCSAI, K.; MOLNÁR, J. Biological activity of Barbados cherry (*Acerola* fruits, fruit of *Malpighia emarginata* DC) extracts and fractions. **Phytotherapy Research**, v.18, p.212-223, 2004.

MÜLLEDER, U.; MURKOVIC, M.; PFANNHAUSER, W. Urinary excretion of cyanidin glycosides. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v.53, p.61-66, 2002.

MUÑOZ-ESPADA, A.C.; WOOD, K.V.; BORDELON, B.; WATKINS, B.A. Anthocyanin quantification and radical scavenging capacity of Concord, Norton, and Marechal Foch grapes and wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.6779-6786, 2004.

MURKOVIC, M.; ADAM, U.; PFANNHAUSER, W. Analysis of anthocyanine glycosides in human serum. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v.366, p.379-381, 2000.

NAKAISHI, H.; MATSUMOTO, H.; TOMINAGA, S.; HIRAYAMA, M. Effects of black currant anthocyanoside intake on dark adaptation and VDT work-induced transient refractive alteration in healthy humans. **Alternative Medicine Review**, v.5, p.553-562, 2000.

NAMIKI, M. Antioxidants/antimutagens in food **CRC-Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v.29, p .273-300, 1990.

NODA, Y.; KNEYUKI, T.; IGARASHI, K.; MORI, A.; PACKER, L. Antioxidant activity of nasunin, an anthocyanin in eggplant peels. **Toxicology**, v.148, p.119-123, 2000.

NODA, Y.; KNEYUKI, T.; MORI, A.; PACKER, L. Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyanidin, and pelargonidin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.1, p.166-171, 2002.

OKI, T.; MASUDA, M.; FURUTA, S.; NISHIBA, Y.; TERAHARA, N.; SUDA, I. Involvement of anthocyanins and other phenolic compounds in radical-scavenging activity of purple-fleshed sweet potato cultivars. **Journal of Food Science**, v.67, n.5, p.1752-1756, 2002.

OLIVEIRA, J.R.P.; SOARES FILHO, W.S. Situação da cultura da acerola no Brasil e ações da Embrapa Mandioca e Fruticultura em recursos genéticos e melhoramento. In: QUEIRÓZ, M.A.; GOEDERT, C.O.; RAMOS, S.R.R. (Eds). **Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste Brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido; Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. Disponível em: www.cpatsa.embrapa.br/servicos/catalogo/livrorg/termos.html (Acesso em 27/9/2005).

OU, B.; HAUNG, D.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J.A.; DEEMER, E.K. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.11, p.3122-3128, 2002.

PAIVA, J.R.; ALVES, R.E.; BARROS, L.M. Melhoramento genético da aceroleira (*Malpighia emarginata* DC) na Embrapa Agroindústria Tropical. In: QUEIRÓZ, M.A.; GOEDERT, C.O.; RAMOS, S.R.R. (Eds). **Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste Brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido; Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. Disponível em: www.cpatsa.embrapa.br/servicos/catalogo/livrorg/termos.html (Acesso em 27/9/2005).

PALAMIDIS, N.; MARKAKIS, P. Stability of grape anthocyanin in a carbonated beverage. **Journal of Food Science**, v.40, p.1047-1049, 1975.

PÉREZ-VICENTE, A.; GIL-IZQUIERDO, A.; GARCIA-VIGUEIRA, C. *In vitro* gastrointestinal digestion study of pomegranate juice phenolic compounds, anthocyanins, and vitamin C. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.8, p.2308-2312, 2002.

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

POEI-LANGSTON, M.S.; WROLSTAD, R.E. Color degradation in an ascorbic acid-anthocyanin-flavanol model system. **Journal of Food Science**, v.46, p.1218-1222, 1981.

POLLONIO, M.A.R. Alimentos funcionais: as recentes tendências e os aspectos de segurança envolvidos no consumo. **Higiene Alimentar**, v.14, n.74, p.26-31, 1999.

PRIOR, R.L.; CAO, G.; MARTIN, A.; SOFIC, E.; McEWEN, J.; O'BRIEN, C.; LISCHNER, N.; EHLENFELDT, M.; KALT, W.; KREWER, G.; MAINLAND, C. M. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, n.7, p.2686-2693, 1998.

PROCTOR, J.T.A.; CREASY, L.L. The anthocyanin of the mango fruit. **Phytochemistry**, v.8, p.2108, 1969.

PRUTHI, J.S.; SUSHEELA, R.; LAL, G. Anthocyanin pigment in passion fruit rind. **Journal of Food Science**, v.26, p.385-388, 1961.

RAJALAKSHMI, D.; NARASIMHAN, S. Food antioxidants: sources and methods of evaluation. In: MADHAVI, D.L.; DESHPANDE, S.S.; SALUNKHE, D.K. (Ed.) **Food antioxidants: technological, toxicological, and health perspectives**. New York: Marcel Dekker, 1995. p.65-157.

REIN, M.J.; HEINONEN, M. Stability and enhancement of berry juice color. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.3106-3114, 2004.

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

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; BOLWELL, P.G.; BRAMLEY, P.M.; PRIDHAM, J.B. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. **Free Radical Research**, v.22, n.4, p.375-383, 1995.

ROBARDS, K.; PRENZLER, P.D.; TUCKER, G.; SWATSITANG, P.; GLOVER, W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. **Food Chemistry**, v.66, p.401-436, 1999.

ROCHA, I.C. **Suco de Acerola: Efeito de temperatura de pasteurização e armazenamento**. Recife: UFPE, 1988. 105 p. (Dissertação de Mestrado).

RODRIGUEZ-SAONA, L.E.; GIUSTI, M.M.; WROLSTAD, R.E. Anthocyanin pigment composition of red-fleshed potatoes. **Journal of Food Science**, v.63, n.3, p.458-465, 1998.

RUBINSKIENE, M.; VISKELIS, P.; JASUTIENE, I.; VISKELIENE, R.; BOBINAS, C. Impact of various factors on the composition and stability of black currant anthocyanins. **Food Reserach International**, v.39, p.867-871, 2005.

SAINT-CRICQ de GAULEJAC, N.; GLORIES, Y.; VIVAS, N. Free radical scavenging effect of anthocyanins in red wines. **Food Research International**, v.32, p. 327-333, 1999.

SAKAMURA, S.; FRANCIS, F.J. The anthocyanins of the American cranberry. **Journal of Food Science**, v.26, p.318-321, 1961.

SAKELLARIADES, H.C.; LUH, B.S. Anthocyanins in Barbera grapes. **Journal of Food Science**, v.39, p.329-333, 1974.

SAUTÉ-GRACIA, M.T.; HEINONEN, M.; FRANKEL, E.N. Anthocyanins as antioxidants on human low-density lipoprotein and lecithin-liposome systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, p.3362-3367, 1997.

SEERAM, N.P.; MOMIN, R.A.; NAIR, M.G.; BOURQUIN, L.D. Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant cyanidin glycosides in cherries and berries. **Phytomedicine**, v.8, n.5, p.362-369, 2001.

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

SEMENSATO, L.R.; PEREIRA, A.S. Características de frutos de genótipos de aceroleira cultivados sob elevada altitude. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, p.2529-2536, 2000.

SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, P.K.J.P.D. Phenolic antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.32, n.1, p.67-103, 1992.

SHRIKHANDE, A. J. Anthocyanins in foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.7, p.193-218, 1976.

SICHEL, G.; CORSARO, C.; SCALIA, M.; DI BILIO, A.J.; BONOMO, R.P. *In vitro* scavenger activity of some flavonoids and melanins against $O_2^{\bullet -}$. **Free Radical Biology & Medicine**, v.11, p.1-8, 1991.

SIEGEL, A.; MARKAKIS, P.; BEDFORD, C.L. Stabilization of anthocyanins in frozen tart cherries by blanching. **Journal of Food Science**, v.36, p.962-963, 1971.

SILVA, F.A.M.; BORGES, M.F.M.; FERREIRA, M.A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v.22, n.1, p. 94-103, 1999.

SILVA, M.F.V.; GUEDES, M.C.; MENEZES, H.C. Caracterização dos pigmentos antociânicos de diferentes cultivares de acerola (*Malpighia glabra*) por CLAE. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE CROMATOGRAFIA, 7, 1998, Águas de São Pedro. p.155.

SKALSKI, C.; SISTRUNK, W.A. Factors influencing color degradation in Concord grape juice. **Journal of Food Science**, v.38, p.1060-1062, 1973.

STARR, M.S.; FRANCIS, F.J. Oxygen and ascorbic acid effect on the relative stability of four anthocyanin pigments in cranberry juice. **Food Technology**, v.22, p.1293-1295, 1968.

STINTZING, F.C.; STINTZING, A.S.; CARLE, R.; FREI, B.; WROLSTAD, R.E. Color and antioxidant properties of cyanidin-based anthocyanin pigments. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.21, p.6172-6181, 2002.

STRACK, D.; WRAY, V. The anthocyanins. In J. B. Harborne (Ed.), **The Flavonoids: advances in research since 1986** (pp. 1-22). Boca Raton, FL: Chapman & Hall. 1994.

TAMURA, H.; YAMAGAMI, A. Antioxidant activity of monoacylated anthocyanins isolated from Muscat Bailey A grape. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.42, n.8, p.1612-1615, 1994.

TIMBERLAKE, C.F. Anthocyanins - occurrence, extraction and chemistry. **Food Chemistry**, v.5, p.69-80, 1980.

TOREL, J.; CILLARD, J.; CILLARD, P. Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. **Phytochemistry**, v.25, n.2, p.383-385, 1986.

TORSKANGERPOLL, K.; ANDERSEN, Ø.M. Colour stability of anthocyanins in aqueous solutions at various pH values. **Food Chemistry**, v.98, p.427-440, 2005.

TREVISAN, L.M.; BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. Carbohydrate, organic acids and anthocyanins of *Myrciaria jaboticaba*, Berg. **Journal of Food Science**, v.37, p.818-819, 1972.

TSAI, P.-J.; McINTOCH, J.; PEARCE, P.; CAMDEN, B.; JORDAN, B.R. Anthocyanin and antioxidant capacity in Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract. **Food Research International**, v.35, p.351-356, 2002.

TSUDA, T.; SHIGA, K.; OHSHIMA, K.; KAWAKISHI, S.; OSAWA, T. Inhibition of lipid peroxidation and the active oxygen radical scavenging effect of anthocyanin pigments isolated from *Phaseolus vulgaris* L. **Biochemical Pharmacology**, v.52, n.7, p.1033-1039, 1996.

VANNUCCHI, H.; JORDÃO Jr, A.A. Vitaminas hidrossolúveis. In: DUTRA-de-OLIVEIRA, J.E.; MARCHINI, J.S. (Ed.) **Ciências Nutricionais**. São Paulo: Sarvier, p.191-207, 1998.

WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R.L. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, n.2, p.304-309, 1997.

WANG, H.; NAIR, M.G.; STRASBURG, G.M.; CHANG, Y.-C.; BOOREN, A.M.; GRAY, J.I.; DeWITT, D.L. Antioxidant and antiinflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyanidin, from tart cherries. **Journal of Natural Products**, v.62, n.2, p.294-296, 1999.

WILLIAMS, M.; HRAZDINA, G. Anthocyanins as food colorants: effect of ph on the formation of anthocyanin-rutin complexes. **Journal of Food Science**, v.44, p.66-68, 1979.

WROLSTAD, R.E.; ERLANDSON, J.A. Effect of metal ions on the color of strawberry puree. **Journal of Food Science**, v.38, p.460-463, 1973.

WROLSTAD, R.E.; PUTNAM, T.P.; VARSEVELD, G.W. Color quality of frozen strawberries: effect of anthocyanin, ph, total acidity and ascorbic acid variability. **Journal of Food Science**, v.35, p.448-452, 1970.

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

YAMASHITA, F.; BENASSE, M.T.; TONZAR, A.C.; MORIYA, S.; FERNANDES, J.G. Produtos de acerola: estudo da estabilidade de vitamina C. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, p.92- 94, 2003.

YOUUDIM, K.A.; MARTIN, A.; JOSEPH, J.A. Incorporation of the elderberry anthocyanins by endothelial cells increases protection against oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v.29, p.51-60, 2000.

YUTING, C.; RONGLIANG, Z.; ZHONGJIAN, J.; YONG, J. Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. **Free Radical Biology & Medicine**, v.9, p.19-21, 1990.

ZHANG, Y.; VAREED, S.K.; NAIR, M.G. Human tumor cell growth inhibition by nontoxic anthocyanidins, the pigments in fruits and vegetables. **Life Sciences**, v.76, p.1465-1472, 2005.

ZHENG, W.; WANG, S.Y. Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries, and lingonberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.502-509, 2003.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Caracterizar as antocianinas presentes em frutos de 12 genótipos de aceroleiras do Banco Ativo de Germoplasma da UFRPE.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Quantificar o teor de antocianinas totais e determinar sua inter-relação com os parâmetros cromáticos da polpa;

Identificar as antocianidinas presentes nos genótipos em estudo;

Avaliar atividade antioxidante das antocianinas presentes na acerola.

PLANO DE TRABALHO

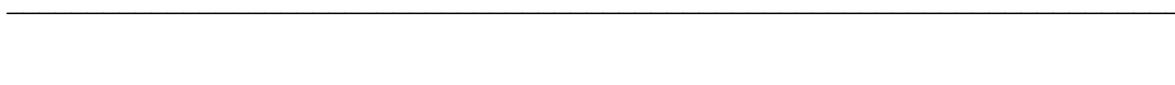
A realização deste trabalho envolveu as seguintes etapas:

- Teor de antocianinas e caracterização cromática de polpas de 12 genótipos de acerola (*Malpighia emarginata* DC.).
 - 1- Determinação do teor de antocianinas totais;
 - 2- Caracterização objetiva da cor das polpas;
 - 3- Avaliação de possíveis correlações entre a cor e o teor de antocianinas.

- Identificação das antocianidinas em polpas de 12 genótipos de acerola (*Malpighia emarginata* DC.).
 - 1- Extração, purificação e precipitação das antocianinas a partir da polpa;
 - 2- Hidrólise ácida das antocianinas para obtenção das antocianidinas;
 - 3- Separação e identificação das antocianidinas.

- Potencial antioxidante de antocianinas presentes em 12 genótipos de acerola (*Malpighia emarginata* DC.).
 - 1- Extração, purificação e precipitação das antocianinas;
 - 2- Determinação da atividade antioxidante.

RESULTADOS



**TEOR DE ANTOCIANINAS E CARACTERIZAÇÃO
CROMÁTICA DE POLPAS DE 12 GENÓTIPOS DE
ACEROLA (*Malpighia emarginata* D.C.)**

RESUMO

Considerando que a cor vermelha da acerola é decorrente da presença de antocianinas e que devido à ampla diversidade genética da aceroleira, ocorrem diferenças quanto ao tipo e teor deste pigmento, com repercussão na cor dos frutos, foi procedida a avaliação de polpas de acerolas maduras, obtidas de 12 genótipos cultivados no Banco Ativo de Germoplasma da Universidade Federal Rural de Pernambuco. O teor de antocianinas totais e características cromáticas foram determinados pelo método de pH diferencial e sistema CIELAB ($L^*a^*b^*$), respectivamente, e os resultados submetidos à correlação de Pearson tendo em vista as possíveis inter-relações entre ambos. Os teores máximos e mínimos de antocianinas de $64,65 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$ a $6,45 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$, foram apresentados pelos genótipos 008-CPA e 002-SPE, respectivamente. Segundo a avaliação colorimétrica, a polpa do genótipo 015-CPA com menor valor de vermelho ($a^* = 14,37$) e os maiores valores de luminosidade ($L^* = 44,40$), de amarelo ($b^* = 36,24$), de h_{ab} ($68,37^\circ$) e de C^* ($38,98$) apresenta-se clara e amarelada, enquanto a do genótipo 005-APE com menor valor de b^* ($14,86$) e do ângulo h_{ab} ($31,38^\circ$) foi caracterizada como a mais vermelha. Foram determinadas correlações positivas entre a concentração de antocianinas e o componente a^* e negativas com os demais: L^* ($r = - 0,86$), b^* ($r = - 0,82$), C^* ($r = - 0,61$) e h_{ab} ($r = - 0,85$). Estes resultados demonstram que a influência da concentração das antocianinas na expressão da cor, é parcial, face à interferência de complexos fatores envolvidos em fenômeno de copigmentação.

Palavras-chave: Antocianinas, Cor, *Malpighia emarginata* DC., Genótipos.

INTRODUÇÃO

A cor é um atributo de importância fundamental no julgamento da qualidade, uma vez que seu estímulo atinge precipuamente o sentido da visão, decisivo na escolha e aceitação de um alimento. No homem, a identificação das cores é obtida a partir de uma complexa sensação de brilho, intensidade e luminosidade, dentre outras; o que torna a percepção das cores primárias bem como de suas combinações, bastante subjetiva.

Dentre os espaços de cores desenvolvidos com o intuito de obter a caracterização objetiva da cor, a Commission Internationale de l'Éclairage (CIE), em 1976, especificou o sistema CIELAB ($L^*a^*b^*$), onde uma particular cor tem uma única localização, especificada numericamente em um espaço tridimensional esférico, definido por três eixos perpendiculares; o eixo L^* (luminosidade), varia do preto (0%) ao branco (100%); o eixo a^* , do verde (-a) ao vermelho (+a) e o eixo b^* , do azul (-b) ao amarelo (+b) (McGUIRE, 1992).

A colorimetria de triestímulos tem sido utilizada para caracterizar a cor de diferentes pigmentos, a exemplo das antocianinas (MONTES et al., 2005), clorofila (SINNECKER, et al., 2002) e carotenóides (MELÉNDEZ-MARTÍNEZ; VICARIO; HEREDIA, 2003), bem como para avaliar a cor de alimentos. Em duas cultivares de abacaxi, Bartolomé, Rupérez e Fúster (1995) encontraram diferenças significativas, especialmente quanto ao parâmetro $-a^*$, indicando que a cor verde foi cerca de 2,37 vezes mais intensa na cultivar “Smooth Cayenne” e que a cultivar “Red Spanish” foi considerada menos amarela (menor valor de b^*) e mais clara (maior valor de L). Em sete variedades de “sea buckthorn” (*Hippohaë rhamnoides*), Tiitinen, Hakala e Kallio, (2005) relataram que, embora as cultivares “Avgustinka” e “Raisa” tenham apresentado os mais altos valores de a^* , não apresentaram diferenças no componente b^* . O anglo “hue” foi o mais elevado nas

cultivares “Oranzhevaya” e Prevosodnaya” enquanto o “Chroma” não apresentou diferença entre as amostras.

Em frutos maduros da aceroleira, a cor vermelha é decorrente da presença de antocianinas cujas características dependem, dentre outros fatores da estrutura, concentração do pigmento, do pH e da presença de copigmentos: polifenóis, ácidos orgânicos, aminoácidos entre outros, bem como das próprias antocianinas que podem, através da copigmentação intensificar e estabilizar a cor desses compostos (MAZZA, MINIATI, 1993). Considerando, ainda, a assertiva de Macheix, Fleuriet e Billot (1990) que diferenças no teor de antocianinas podem ocorrer em diferentes cultivares do mesmo fruto e a ampla diversidade genética da aceroleira, cultivada em vários estados do Brasil, esta pesquisa teve como objetivo determinar o teor desses pigmentos, avaliar as características cromáticas da polpa de 12 genótipos de acerola e as possíveis inter-relações entre ambos.

MATERIAL E MÉTODOS

Frutos

Os frutos, durante o Verão/2004, foram colhidos de 12 genótipos de aceroleira identificados com os códigos 002-SPE, 003-APE, 004-RPE, 005-APE, 006-TPA, 007-TPA, 008-CPA, 011-BPA, 012-CPA, 013-CPA, 014-CPA e 015-CPA, cultivados no Banco Ativo de Germoplasma da UFRPE, instalado na Estação Experimental de Cana-de-Açúcar em Carpina. Frutos no estágio maduro foram colhidos de cada genótipo, no período da manhã, refrigerados, e transportados, em caixa isotérmica, até o Laboratório de Experimentação e Análises de Alimentos (LEAAL) “Nonete Barbosa Guerra” do Departamento de Nutrição da UFPE, onde foram realizados os experimentos. Após a seleção, os frutos foram processados em centrífuga doméstica e, as polpas resultantes,

imediatamente armazenadas sob congelamento ($-18 \pm 1^\circ\text{C}$). A avaliação cromática e a determinação quantitativa das antocianinas monoméricas foram realizadas no prazo de três dias e de um mês, após as polpas terem sido obtidas, respectivamente.

Avaliação objetiva da cor

A avaliação objetiva da cor das polpas foi efetuada através da colorimetria de triestímulos, no sistema CIELAB, por meio de colorímetro Minolta CR-400 (Konica Minolta Sensing, Inc.) no modo de reflectância, utilizando iluminação difusa, iluminante C e os ângulos de 0° e de 2° , referentes aos ângulos de detecção e do observador, respectivamente. Após a calibração do equipamento com placa de azulejo branca padronizada pelo fabricante ($Y=93,40$; $x=0,3136$; $y=0,3196$), as polpas, com temperatura média de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ foram colocadas em placa de vidro transparente redonda (5cm de diâmetro e 1,4cm de altura) sobreposta a uma placa branca e com auxílio do acessório apropriado para amostras úmidas (Glass light, Projection tube, CR-A33f) foram efetuadas as determinações, cujos resultados, expressos como coordenadas de cor no espaço CIELAB ($L^*a^*b^*$), foram obtidos a partir da média de três determinações em três diferentes amostras.

A partir dos valores médios de a^* e de b^* foram calculados a saturação “Chroma” (C^*) que indica a intensidade da cor e o ângulo “hue” (h_{ab}), atributo no qual a cor é percebida, utilizando as fórmulas $C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$ e $h_{ab} = \text{arc tg}(b^*/a^*)$ (McGUIRE, 1992), cujos parâmetros cromáticos encontram-se ilustrado na Figura 1:

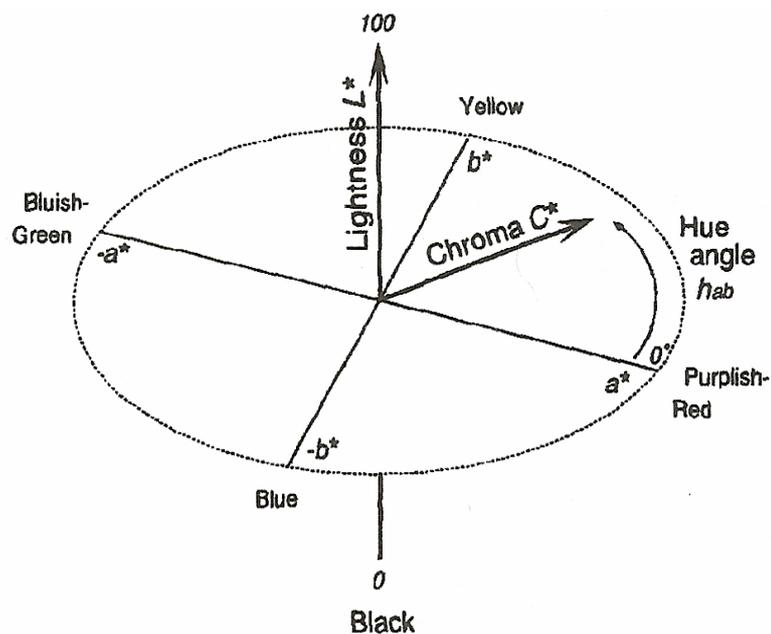


Figura 1: Espaço de cor CIELAB

Extração das antocianinas

As antocianinas foram extraídas com acetona e em seguida, filtradas a vácuo, procedimento repetido até a completa remoção dos pigmentos. O volume do filtrado foi quantificado, transferido para um funil de separação ao qual foi adicionado o dobro do volume de clorofórmio, e estocado durante uma noite à 4°C para a separação das fases: a aquosa (superior), foi levada ao evaporador rotativo a temperatura entre $38 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 10-15 minutos para a remoção da acetona residual e o extrato aquoso, estocado à $-18 \pm 1^\circ\text{C}$ para ser utilizado nas etapas posteriores (RODRIGUEZ-SAONA; WROLSTAD, 2001).

Determinação do teor de antocianinas totais

Efetuada pelo método de pH diferencial, conforme descrito por Giusti e Wrolstad (2001), os extratos aquosos foram apropriadamente diluídos em dois tampões; cloreto de

potássio 0,025 M, pH 1 e acetato de potássio 0,4 M, pH 4,5 e após 15 min de repouso à temperatura ambiente ($22 \pm 2^\circ \text{C}$), foram feitas as medidas de absorvância a 510 nm e 700 nm em espectrofotômetro (GenesysTM 10 vis) e cubetas de 1 cm de largura. O teor dos pigmentos foi calculado utilizando absorvidade molar (ϵ) de $26900 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ e peso molecular de $449,2 \text{ g mol}^{-1}$ da cianidina 3- glicosídeo e os resultados, expressos como mg de cianidina 3-glicosídeo 100g^{-1} de polpa. Todos os extratos foram quantificados em triplicata.

Tratamento estatístico dos dados

Os resultados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo Teste de Tukey, e a correlação de Pearson, ambas ao nível de 5% de significância, utilizando o programa estatístico “Statistica” (versão 5.5, StatSoft, Inc., Tulsa, USA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação quantitativa das antocianinas bem como as características cromáticas da polpa de acerola encontram-se apresentadas na Tabela 1. Os resultados revelam diferenças significativas, devido a considerável variação encontrada $64,65 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$ a $6,45 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$, apresentados por 008-CPA e 002-SPE, respectivamente.

Estes resultados ratificam os obtidos por Musser et al. (2004) em frutos, desses mesmos genótipos colhidos, durante as safras Verão/2000 e Verão/2001, quanto à variação registrada ($4,6$ a $51,5$ e $2,4$ a $39,9 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$, respectivamente) embora os valores médios de antocianinas tenham sido inferiores aos determinados nesse estudo (Figura 2).

Tabela 1: Concentração de antocianinas e caracterização cromática (CIE L*a*b*) de polpa de 12 genótipos de acerola.

Genótipos	Antocianinas totais ^a	Parâmetros de cor				
		L*	a*	b*	C*	h _{ab} ^o
002-SPE	6,45 ^e ± 0,62	42,15 ^b ± 0,09	19,75 ^j ± 0,05	33,49 ^b ± 0,08	38,88 ^a ± 0,05	59,47 ^b ± 0,12
003-APE	7,89 ^e ± 0,94	40,80 ^c ± 0,03	22,88 ^h ± 0,07	29,71 ^c ± 0,09	37,50 ^b ± 0,10	52,40 ^d ± 0,07
004-RPE	31,49 ^c ± 1,97	26,62 ^j ± 0,02	25,02 ^f ± 0,11	17,54 ^j ± 0,08	30,56 ^h ± 0,06	35,04 ^g ± 0,22
005-APE	56,82 ^b ± 1,60	25,57 ^l ± 0,06	23,90 ^g ± 0,06	14,86 ^m ± 0,06	28,14 ⁱ ± 0,05	31,88 ⁱ ± 0,16
006-TPA	33,03 ^c ± 1,72	31,47 ^f ± 0,10	26,94 ^d ± 0,05	20,81 ^g ± 0,10	34,04 ^e ± 0,10	37,69 ^g ± 0,09
007-TPA	57,08 ^b ± 1,19	27,68 ⁱ ± 0,08	27,49 ^c ± 0,03	19,50 ^h ± 0,04	33,70 ^f ± 0,08	35,35 ^g ± 0,10
008-CPA	64,65 ^a ± 1,79	30,52 ^g ± 0,10	29,51 ^a ± 0,09	23,38 ^f ± 0,06	37,65 ^b ± 0,13	38,38 ^f ± 0,04
011-BPA	54,36 ^b ± 1,89	28,93 ^h ± 0,04	27,89 ^b ± 0,02	18,54 ⁱ ± 0,07	33,49 ^g ± 0,07	33,61 ^h ± 0,11
012-CPA	24,77 ^d ± 1,14	35,55 ^e ± 0,07	25,32 ^e ± 0,05	26,90 ^e ± 0,08	36,95 ^c ± 0,03	46,73 ^e ± 0,13
013-CPA	54,16 ^b ± 1,66	25,34 ^l ± 0,09	22,72 ^h ± 0,05	16,42 ^l ± 0,06	28,04 ⁱ ± 0,02	35,86 ^h ± 0,16
014-CPA	25,23 ^d ± 0,86	39,89 ^d ± 0,13	21,68 ⁱ ± 0,08	28,87 ^d ± 0,03	36,11 ^d ± 0,07	53,10 ^c ± 0,08
015-CPA	9,13 ^e ± 0,18	44,40 ^a ± 0,05	14,37 ^l ± 0,04	36,24 ^a ± 0,03	38,98 ^a ± 0,01	68,37 ^a ± 0,07

^a expresso em mg de cianidina-3-glicosídeo.100 g⁻¹ de polpa

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}; h_{ab} = \text{arc tg} (b^*/a^*)$$

Dados expressos como média ± desvio padrão.

Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

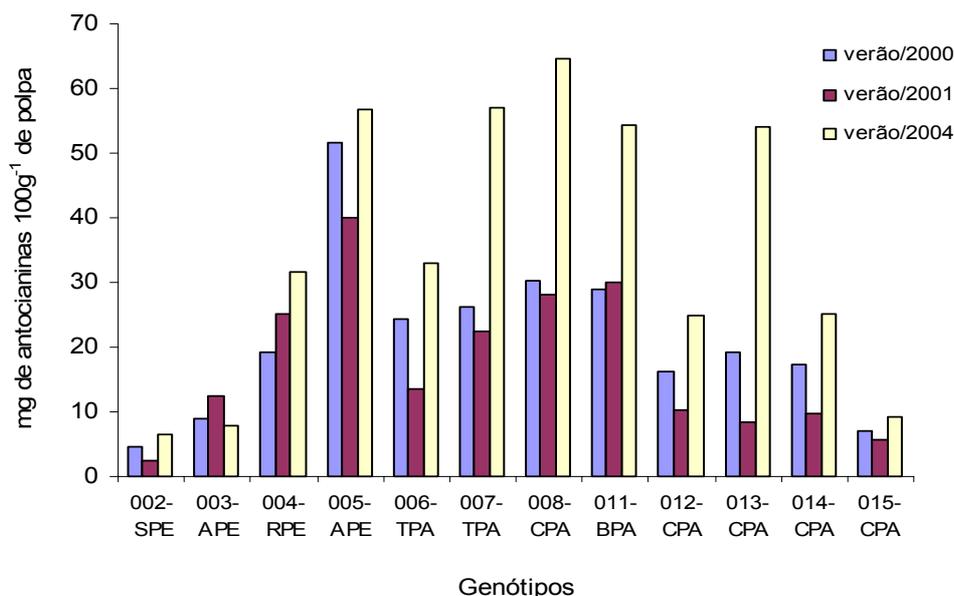


Figura 2: Teores de antocianinas ($\text{mg } 100\text{g}^{-1}$ de polpa) em frutos de 12 genótipos de aceroleira colhidos no verão/2000, verão/2001 e verão/2004. (Os valores das safras verão/2000 e verão/2001 referem-se aos dados de Musser et al., 2004)

Esta divergência é provavelmente decorrente do grau de maturação e da metodologia utilizada na quantificação desses pigmentos.

Diferenças, similares, foram referidas por Paiva et al. (1999) ao realizarem seleção fenotípica de acerola, em um experimento instalado no Campo Experimental de Pacajus da EMBRAPA Agroindústria Tropical, no qual o teor de antocianinas totais oscilou de 1,97 a 46,44 $\text{mg } 100\text{g}^{-1}$ e por Lima et al. (2000) em 05 seleções de acerola, cujos valores ficaram entre 14,06 a 50,98 $\text{mg } 100\text{g}^{-1}$ de polpa. Diferenças significativas foram, também, encontradas em outros frutos, como em onze cultivares de amora preta, nos quais os teores de antocianinas totais variaram de 131 a 256 $\text{mg } 100\text{g}^{-1}$ de fruto (SIRIWOHARN, et al., 2004); em quatro cultivares de framboesa, que conforme Ancos, Gonzáles e Cano (1999) as variações situaram-se entre 31,13 a 122,88 $\text{mg } 100\text{g}^{-1}$ e em diferentes cultivares de

Rubus fruticosus L., *Rubus idaeus* L., *Ribes nigrum* L., *Ribes rubrum* L. e *Aronia melanocarpa* Elliot (BENVENUTI et al., 2004).

Com relação à análise colorimétrica, não obstante a existência de variações significativas entre os genótipos, todas as polpas localizaram-se dentro do primeiro quadrante, apresentando valores positivos de a^* e b^* , ou seja, cores vermelha e amarela, demonstrando que os resultados encontram-se relacionados com outros pigmentos presentes, como carotenóides, cujos teores nesses genótipos, foram objeto de estudo realizado por Lima et al. (2005).

De acordo com a Tabela 1 a polpa do genótipo 015-CPA apresentou o mais baixo valor de vermelho ($a^* = 14,37$) e os mais elevados valores de luminosidade ($L^* = 44,40$), de amarelo ($b^* = 36,24$), de h_{ab} ($68,37^\circ$) e de C^* ($38,98$) conferindo-lhe uma cor clara e amarelada enquanto as polpas dos genótipos 013-CPA e 005-APE foram consideradas as mais escuras, por apresentarem os mais baixos valores de L^* ($25,34$ e $25,57$, respectivamente). Embora a cor vermelha de um considerável número de frutos seja decorrente da presença de antocianinas, há controvérsias quanto à existência de correlação entre o teor destes compostos e medidas objetivas da cor. Bakker, Bridle e Bellworthy (1994) observaram, em sucos de 39 genótipos de morango, que o teor de antocianinas ($333,0$ a $20,7$ mg/L), não influenciou claramente na avaliação da cor, citando que nos genótipos “Toten” e “79RB28” com teores de antocianinas iguais a $330,0$ e $62,1$ mg/L, respectivamente, o ângulo “hue” calculado foi de $33,1$ e $27,4^\circ$, caracterizando como mais vermelho o genótipo “79RB28”. Em quatro cultivares de framboesa, Ancos, Gonzáles e Cano (1999), relataram que embora a cultivar “Ceva” tenha apresentado o mais elevado teor antocianinas, e que o parâmetro “hue” não tenha apresentado diferença significativa entre as quatro cultivares, em decorrência do maior valor de a^* , a cultivar “Rubi”, foi considerada a mais vermelha, se contra pondo aos achados de Lee (2002) que registrou, em

sete variedades de laranja de polpa vermelha, uma forte correlação entre o ângulo “hue” e o teor de antocianinas ($r = -0,927$).

Os achados deste último autor foram ratificados por meio da correlação de Pearson, entre o teor de antocianinas e os parâmetros de cor obtidos nesta pesquisa, que evidenciaram correlações, estatisticamente significativas, em grau moderado a elevado para h_{ab} ($r = -0,85$) e ainda para L^* ($r = -0,86$) e a^* ($r = 0,71$). Os resultados referentes ao h_{ab} demonstraram que o aumento do teor desses pigmentos indica uma cor mais vermelha, uma vez que quanto menor for o ângulo h_{ab} , isto é mais próxima ao eixo a^* , mais vermelha será a polpa. Outros fatores, no entanto, devem ser considerados a exemplo do genótipo 008-CPA que embora tenha apresentado o maior teor de antocianinas, maior valor do parâmetro a^* , a intensidade do componente amarelo (b^*) interferiu na sua avaliação cromática, resultando em um ângulo de $38,38^\circ$, estatisticamente, mais elevado que o ângulo calculado para a polpa do genótipo 005-APE ($31,38^\circ$) que conseqüentemente, caracteriza-se como a mais avermelhada. As correlações negativas entre os componentes b^* ($r = -0,82$) e C^* ($r = -0,61$) demonstraram uma clara interferência do componente amarelo, também observada nos dados dos genótipos 015-CPA e 002-SPE (Tabela 1) que apresentaram os mais elevados valores de b^* (36,24 e 33,49, respectivamente).

Garcia-Vigueira et al. (1998), em duas cultivares de framboesa vermelha evidenciaram que embora a cultivar “Zeva” tenha apresentado o mais elevado teor de antocianinas monoméricas que a cultivar “Heritage”, o valor de a^* desta última foi mais elevado, confirmando que as espécies monoméricas não são o principal fator na expressão da cor. Segundo estes autores, isto pode ser, parcialmente, explicado a luz da concentração de flavonóis tendo em vista o fenômeno de copigmentação.

Considerando que, em acerola, o pH apresenta baixa variabilidade e, para esses genótipos foram relatados valores 3,11 a 3,41 (Musser et al., 2004), pode-se afirmar que

este parâmetro não interferiu na avaliação da cor. No entanto, a presença de flavonóis e de ácidos fenólicos (VENDRAMINI; TRUGO, 2004; HANAMURA; HAGIWARA; KAWAGISHI, 2005), em polpas deste fruto, pode ter influenciado na percepção da cor por meio da copigmentação. Desta forma, além das características genéticas inerentes de cada genótipo, constata-se que complexos fatores exercem um significativo papel na expressão da cor, o que explica os diferentes tons de vermelho exibidos pelas polpas de acerola.

CONCLUSÕES

Os resultados confirmam a considerável variação do teor de antocianinas totais presentes nas polpas dos genótipos e que embora a concentração destes pigmentos reflita sobre nos parâmetros de cor das polpas por si só não é suficiente para caracterizá-la devido à interferência da intensidade do componente amarelo (b^*) na sua determinação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANCOS, B.; GONZALES, E.; CANO, M.P. Differentiation of raspberry varieties according to anthocyanin composition. **Zeitschrift für Lebensmittel -Untersuchung und -Forschung A**, v.208, p.33-39, 1999.

BAKKER, J.; BRIDLE, P.; BELLWORTHY, S.J. Strawberry juice colour: a study of the quantitative and qualitative pigment composition of juice from 39 genotypes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.64, p.31-37, 1994.

BARTOLOMÉ, A.P.; RUPÉREZ, P.; FÚSTER, C. Pineapple fruit: morphological characteristics, chemical composition and sensory analysis of Red Spanish and Smooth Cayenne cultivars. 1995). *Food Chemistry*, v.53, p.75-79, 1995.

BENVENUTI, S.; PELLATI, F.; MELEGARI, M.; BERTELLI, D. Polyphenols, anthocyanins, ascorbic acid, and radical scavenging activity of *Rubus*, *Ribes* and *Aronia*. *Journal of Food Science*, v.69, p. 164-169, 2004.

GARCIA-VIGUERA, C.; ZAFRILLA, P.; ARTÉS, F.; ROMERO, F.; ABELLÁN, P.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A. Colour and anthocyanin stability of red raspberry jam. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.78, p.565-573, 1998.

GIUSTI, M.M., WROLSTAD, R.E. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. In R.E. Wrolstad, **Current Protocols in Food Analytical Chemistry** (pp.F1 2.1-2.13). New York: John Wiley & Sons, 2001.

HANAMURA, T.; HAGIWARA, T.; KAWAGISHI, H. Structural and functional characterization of polyphenols isolated from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, v. 69, p.280-286, 2005.

LEE, H.S. Chracterization of major anthocyanins and the color of red-fleshed budd blood orange (*Citrus sinensis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.50, p.1243-1246, 2002.

LIMA, V.L.A.G.; MÉLO, E.A.; MACIEL, M.I.S.; PRAZERES, F.G.; MUSSER, R.S.; LIMA, D.E.S. Total phenolic and carotenoid contents in acerola genotypes harvested at three ripening stages. **Food Chemistry**, v.90, p.565–568, 2005.

LIMA, V.L.A.G.; MÉLO, E.A.; LIMA, L S.; NASCIMENTO, P. P. Flavonóides em seleções de acerola (*Malpighia* sp L.)1- Teor de antocianinas e flavonóis totais. **Ciência Rural**, v.30, p.1066-1064, 2000.

MACHEIX, J.-J., FLEURIT, A., BILLOT, J. **Fruit Phenolics**. Boca Raton: CRC Press, 1990.

MAZZA, G.; MINIATI, E. **Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains**. Florida: CRC Press, INC. 1993. 363p.

McGUIRE, R. G. Reporting of objective color measurements. **HortScience**, v.27, p. 1254-1555, 1992.

MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A.J.; VICARIO, I.M.; HEREDIA, F.J. Application of tristimulus colorimetry to estimate the carotenoids content in ultrafrozen orange juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.7266-7270, 2003.

MONTES, C.; VICARIO, I.M.; RAYMUNDO, M.; FEET, R.; HEREDIA, F.J. Application of tristimulus colorimetry to optimize the extraction of anthocyanins from jaboticaba (*Myrcia jaboticaba* Berg). **Food Research International**, v.38, p.983-988, 2005.

MUSSER, R.S.; LEMOS, M.A.; LIMA, V.L.A.G.; MÉLO, E.A.; LEDERMAN, I.E.; SANTOS, V.F. Caracterização físico-química de acerolas do Banco Ativo de Germoplasma em Pernambuco. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, p.556-561, 2004.

PAIVA, J.R.; CORDEIRO, E.R.; ALVES, R.E.; ALMEIDA, A.S.; PINTO, S.A.A. Seleção e clonagem de plantas de acerola. In: ENCONTRO DE GENÉTICA DO NORDESTE, 14., 1999 Recife, PE. **Anais...** Recife: Sociedade Brasileira de Genética, 1999. 87 p. p.53.

RODRIGUEZ-SAONA, L.E.; WROLSTAD, R.E. Extraction, isolation, and purification of anthocyanins. In R.E. WROLSTAD, **Current Protocols in Food Analytical Chemistry** (pp.F1 1.1-1.11). New York: John Wiley & Sons, 2001.

SINNECKER, P.; GOMES, M.S.O.; ARÊAS, J.A.G.; LANFER-MARQUEZ, U.M. Relationship between color (instrumental and visual) and chlorophyll contents in soybean seeds during ripening. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.3961-3966, 2002.

SIRIWOHARN, T.; WROLSTAD, R.E.; FINN, C.E.; PEREIRA, C.B. Influence of cultivar, maturity, and sampling on blackberry (*Rubus* L. Hybrids) anthocyanins, polyphenolics, and antioxidant properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.8021-8030, 2004.

TIITINEN, K.M.; HAKALA, M.A.; KALLIO, H.P. Quality components of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.1692-1699, 2005.

VENDRAMINI, A.L.A.; TRUGO, L.C. Phenolic compounds in acerola fruit (*Malpighia puniceifolia*, L.). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.15, p.664-668, 2004.

**IDENTIFICAÇÃO DAS ANTOCIANIDINAS EM POLPAS
12 GENÓTIPOS DE ACEROLA (*Malpighia emarginata* D.C.)**

RESUMO

Antocianinas de acerolas, colhidas de 12 genótipos cultivados no Banco Ativo de Germoplasma da Universidade Federal Rural de Pernambuco, foram extraídas e purificadas com o objetivo de determinar a sua composição antociânica. Os pigmentos foram hidrolisados, separados em coluna de fase reversa C₁₈ através da cromatografia líquida de alta eficiência e identificados, considerando a ordem de eluição e os tempos de retenção dos cromatogramas dos padrões de referência e dos de fontes vegetais. Os cromatogramas obtidos demonstraram que o perfil antociânico dos genótipos de acerola é relativamente simples, apresentando de três a cinco picos, na maioria, comuns entre eles, os quais foram reduzidos a duas agliconas após a hidrólise ácida e identificadas como cianidina e pelargonidina. Comparando os cromatogramas das antocianinas e das antocianidinas e, avaliando os tempos de retenção registrados, constata-se a presença de antocianinas com diferentes graus de glicosilação e ausência de ácidos acilados em suas moléculas e que as agliconas identificadas, cianidina e pelargonidina, encontram-se em diferentes proporções nos genótipos estudados.

Palavras-chave: Antocianidinas, *Malpighia emarginata* DC., genótipos, CLAE.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o foco de interesse pelas antocianinas encontra-se voltado para seus efeitos fisiológicos em benefícios à saúde atribuídos, principalmente, à sua capacidade antioxidante. Neste contexto, destaca-se a pesquisa de Kähkönen e Heinonen (2003) que demonstrou a eficácia das 6 antocianidinas e de 17 diferentes antocianinas, na prevenção da oxidação, *in vitro*, da LDL humana, em concentrações de 10 e 25 μM , na seguinte ordem: delphinidina = cianidina > malvidina > peonidina > pelargonidina > petunidina e que de um modo geral, as formas glicosiladas foram menos ativas que as agliconas. Este resultado assim como os obtidos de outros pesquisadores (WANG; CAO; PRIOR, 1997; NODA et al. 2002; MUÑOZ-ESPADA et al. 2004), apontam para a necessidade de quantificar e identificar estes compostos em frutos e hortaliças consumidos no País.

Entretanto, para identificar e quantificar as antocianinas, individualmente, através da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de fase reversa, o maior desafio é a disponibilidade dos padrões de referência para mais de 600 compostos já identificados; conforme Wrolstad (2004), ao se referir à apresentação de Andersen (2002), durante o Workshop Internacional de Antocianinas. Esta diversidade é resultante do número de grupos hidroxila e metoxila, da natureza e do número de açúcares e de ácidos alifáticos e/ou aromáticos, bem como da localização desse compostos presentes na aglicona (STRACK; WRAY, 1994). Este número, assim como, a complexidade de antocianinas encontradas na natureza, podem ser reduzidos, por hidrólise ácida, a apenas seis antocianidinas mais comumente encontradas em frutos, cujos padrões encontram-se comercialmente disponíveis (NYMAN; KUMPULAINEN, 2001).

Considerando a escassez de estudos voltados para esses compostos em acerola, foi realizado este trabalho com o objetivo de identificar as antocianidinas presentes em frutos de 12 genótipos de aceroleiras.

MATERIAL E MÉTODOS

Frutos

As acerolas foram colhidas de 12 genótipos, identificados com os códigos 002-SPE, 003-APE, 004-RPE, 005-APE, 006-TPA, 007-TPA, 008-CPA, 011-BPA, 012-CPA, 013-CPA, 014-CPA e 015-CPA, cultivados no Banco Ativo de Germoplasma da UFRPE, instalado na Estação Experimental de Cana-de-Açúcar em Carpina. Frutos no estágio maduro foram colhidos de cada genótipo, no período da manhã, refrigerados, e transportados, em caixa isotérmica, até o Laboratório de Experimentação e Análises de Alimentos (LEAAL) “Nonete Barbosa Guerra” do Departamento de Nutrição da UFPE, onde foram realizados os experimentos. Após a seleção, os frutos foram processados em centrífuga doméstica e, as polpas resultantes, imediatamente armazenadas sob congelamento ($-18 \pm 1^{\circ}\text{C}$). Todos os procedimentos subsequentes foram realizados sob reduzida luminosidade.

Extração das antocianinas

As antocianinas da polpa de acerola, de cada genótipo, foram extraídas com acetona, filtradas a vácuo e o resíduo re-extraído com acetona até a completa remoção dos pigmentos. O volume do filtrado foi quantificado, transferido para um funil de separação ao qual foi adicionado o dobro do volume de clorofórmio, e estocado durante uma noite à 4°C para a separação das duas fases. A fase aquosa (fase superior), foi levada ao evaporador rotativo ($38 \pm 2^{\circ}\text{C}$) durante 10-15 minutos para a remoção da acetona residual e o extrato aquoso, estocado à -18°C para ser utilizado nas etapas posteriores (RODRIGUEZ-SAONA; WROLSTAD, 2001).

Purificação e precipitação das antocianinas

As antocianinas foram isoladas através da técnica de extração em fase sólida utilizando cartuchos Sep-Pak C₁₈ (Waters Associates, Milford, MA), conforme a metodologia descrita por Rodriguez-Saona e Wrolstad (2001), a qual propicia a remoção de açúcares, de ácidos e de outros compostos fenólicos das amostras. O extrato metanólico obtido após a purificação foi concentrado sob pressão reduzida ($38 \pm 2^\circ\text{C}$) até a obtenção de um resíduo seco ao qual foi adicionado éter dietílico com a finalidade de precipitar os pigmentos. As antocianinas foram, então, coletadas, centrifugadas (20 minutos, 2500g), e secas sob atmosfera de nitrogênio. Os pigmentos em pó foram acondicionados em vidros âmbar, os quais, antes de serem fechados, receberam um fluxo de nitrogênio, e em seguida, armazenados sob refrigeração (4°C), até o momento das análises (ESPÍN et al., 2000).

Preparação das antocianinas

Antocianinas purificadas de cada genótipo (1 mg), dissolvidas em 2-3 gotas de metanol (0,01% HCl), com posterior adição de 1 mL de ácido fosfórico 4% (água Milli-Q) foram filtradas em membranas Millipore, de poro de $0,45 \mu\text{m}$ e 13 mm de diâmetro, tipo HV (Millipore Corp. Bedford, MA) antes de serem injetadas no cromatógrafo.

Hidrólise ácida das antocianinas

A hidrólise ácida das antocianinas foi realizada conforme descrito por Drust e Wrolstad (2001), com algumas modificações. Em tubos de vidro rosqueados, cerca de 3 a 5 mg de antocianinas purificadas de cada genótipo foram dissolvidas em 2-3 gotas de metanol (0,01% HCl), adicionado um volume 10 ml de HCl 2M e fechados, após aplicação de fluxo de gás nitrogênio. Os pigmentos foram hidrolisados por 60 min em banho de água fervente e, então, imediatamente resfriados em banho de gelo. O hidrolisado foi purificado

através da extração em fase sólida utilizando cartuchos Sep-Pak C₁₈ (Waters), previamente ativados com metanol (0,01% HCl) seguida com água acidificada (0,01% HCl). As amostras foram aplicadas nos cartuchos, lavadas com 10 ml de água acidificada (0,01% HCl) e, as antocianidinas, eluídas com 5 mL de metanol acidificado (0,01% HCl), foram coletadas e conduzidas a um evaporador rotativo (38 ± 2 °C, sob vácuo) até que o metanol fosse removido até próximo a secura. As antocianidinas foram dissolvidas com 1 mL de ácido fosfórico 4% (água Milli-Q) e filtradas em membranas Millipore, de poro de 0,45 µm e 13 mm de diâmetro, tipo HV (Millipore Corp. Bedford, MA) antes de serem injetadas no cromatógrafo.

Separação das antocianinas e das antocianidinas

As antocianinas e antocianidinas foram separadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) segundo metodologia descrita por Drust e Wrolstad (2001). Esta etapa foi realizada no Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Antibióticos/UFPE, utilizando um cromatógrafo analítico Hewlett-Packard série 1100 equipado com desgaseificador, bomba quaternária e detectores de ultravioleta-visível e índice de refração. Todo o cromatógrafo foi controlado através do software Chemstation, também responsável pela obtenção e tratamento dos dados, instalado em um computador Kayak Hewlett-Packard com o sistema operacional Windows NT. A separação foi realizada com uma coluna de fase reversa C₁₈ (Merck, Lichrospher 100RP-18, Darmstadt, Alemanha) de 250 mm de comprimento, 4 mm de diâmetro interno e com partículas de 5-µm de diâmetro médio, acoplada a uma coluna de guarda de 4 mm de comprimento e 3 mm diâmetro interno (Merck, Lichrospher 100RP-18, Darmstadt, Alemanha). O volume de injeção foi de 20 µL, o comprimento de onda utilizado de 520 nm e, a temperatura e a vazão, controladas em 30° C e 1 ml/min, respectivamente. Para eluição foi utilizada uma

alimentação em gradiente formada a partir de duas soluções: solvente A (100% acetonitrila, grau HPLC) e solvente B (1% ácido fosfórico, 10% ácido acético e 5% acetonitrila (v/v), em água Milli-Q). A eluição seguiu um gradiente linear variando de 5% a 20 % a participação do solvente A na composição da fase móvel num intervalo de 20 min e então um gradiente linear para este mesmo solvente de 20% a 5% em 5 min, retornando à composição inicial da fase móvel (5% solvente A e 95% solvente B).

Identificação das antocianidinas

A identificação das antocianidinas foi realizada a partir da comparação dos tempos de retenção obtidos nos cromatogramas das amostras, com os tempos de retenção dos padrões de cloretos de cianidina, pelargonidina e malvidina (Extrasynthese, Genay, França) e com os tempos de retenção obtidos das antocianidinas de uvas Isabel, Patrícia e Red Globe, ameixa, cebola roxa, morango e manga Tommy Atkins (DONNER; GAO; MAZZA, 1997; BERARDINI et al., 2005; WU; PRIOR, 2005), adquiridos no mercado local, com a finalidade de se obter o perfil cromatográfico das seis antocianidinas, diante da impossibilidade de aquisição dos padrões referência da delphinidina, petunidina e peonidina, sendo analisadas de acordo com os procedimentos anteriormente descritos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os perfis antociânicos das polpas dos diferentes genótipos de acerola são relativamente simples quando comparados aos de frutos como “lowbush blueberries”, nos quais foram identificadas pelo menos 25 antocianinas (GAO, MAZZA, 1995) e aos extratos de “bilberry” nos quais ZHANG et al. (2004) encontraram mais de 15 picos

referentes à presença de antocianinas, que após a hidrólise ácida, foram reduzidos a cinco, identificados como delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina e malvidina.

No que diz respeito às antocianinas das acerolas, Figuras de 1 a 6, verifica-se que os genótipos 002-SPE, 004-RPE, 005-APE, 006-TPA, 011-BPA, 013-CPA e o 014-CPA apresentaram três picos similares, enquanto os 003-APE, 007-TPA, 008-CPA e 015-CPA, quatro picos com o mesmo perfil e o 012-CPA que além dos picos comuns aos demais, apresentou mais um. Tendo como base a área dos picos, constata-se que o registrado em menor tempo de retenção, em todos os cromatogramas, encontrava-se, provavelmente, presente em maior quantidade.

Convém ressaltar que o tempo de retenção, parâmetro baseado na hidrofobicidade da molécula, é influenciado pelo grau de glicosilação e pela natureza dos açúcares presentes nesses pigmentos. Chaovanalikit, Thompson e Wrolstad (2004), em frutos de “blue honeysuckle”, relataram que seis antocianinas foram separadas em CLAE de fase reversa na seguinte ordem de eluição: cianidina 3,5-diglicosídeo, cianidina 3-glicosídeo, cianidina 3-rutinosídeo, pelargonidina 3- glicosídeo, peonidina 3- glicosídeo, peonidina 3-rutinosídeo.

De acordo com a metodologia descrita por Drust e Wrolstad (2001), o tempo de eluição indicado para separação de antocianinas aciladas, em CLAE de fase reversa, é de 70 min, devido à presença de ácidos acilados na molécula que aumenta o tempo de retenção (STRACK; WRAY, 1994). Como nos cromatogramas obtidos nesta pesquisa os picos foram registrados antes de 15 min, infere-se que esses pigmentos não possuem ácidos em suas moléculas. Este resultado corrobora os obtidos por Hanamura, Hagiwara e Kawagishi (2005), os quais relataram, em acerolas cedidas pela Nichirei do Brasil (Recife, Brasil), a ausência de acilação nas moléculas das antocianinas identificadas.

Pesquisas realizadas por Longo e Vasapollo (2005) e por Kallithraka et al. (2005), em frutos de *Ruscus aculeatus* L. e em uvas, respectivamente, os picos referentes às antocianinas aciladas foram os últimos a serem eluídos e que nas uvas, os picos referentes aos glicosídeos de delphinidina, cianidina, petunidina e malvidina foram eluídos antes de 13 min, enquanto o pico referente a malvidina, acilada com ácido *p*-cumárico, foi registrado no cromatograma, aproximadamente, aos 22 min de eluição.

Diante da impossibilidade de obter padrões que permitissem a identificação das antocianinas foi procedida a hidrólise ácida para obtenção das antocianidinas. Embora Drust e Wrolstad (2001) recomendem 30 min para hidrólise ácida, neste estudo foram utilizados 60 min, uma vez que em experimentos implementados por Zhang et al. (2004), foi constatado, após 30 min a $100 \pm 2^\circ$ C, a presença de 10% de antocianinas, cujo desaparecimento quase completo ocorreu somente após 60 min de hidrólise. Posteriormente, Longo, Vasapollo e Rescio, (2005) constataram que este tempo também não foi suficiente para hidrolisar totalmente as antocianinas purificadas de “buckthorn” (*Rhamnus alaternus* L), cuja hidrólise total foi obtida apenas com cinco horas.

Comparando os cromatogramas, antes e após a hidrólise, pode-se constatar que para o fruto em estudo, o tempo utilizado foi efetivo para obter apenas as antocianidinas e confirmar a presença de pigmentos glicosilados na medida em que os picos presentes nos cromatogramas das antocianinas desapareceram após a hidrólise ácida dando origem, nos cromatogramas das agliconas, a novos picos, de maior intensidade e de diferentes tempos de retenção (Figuras 1-6).

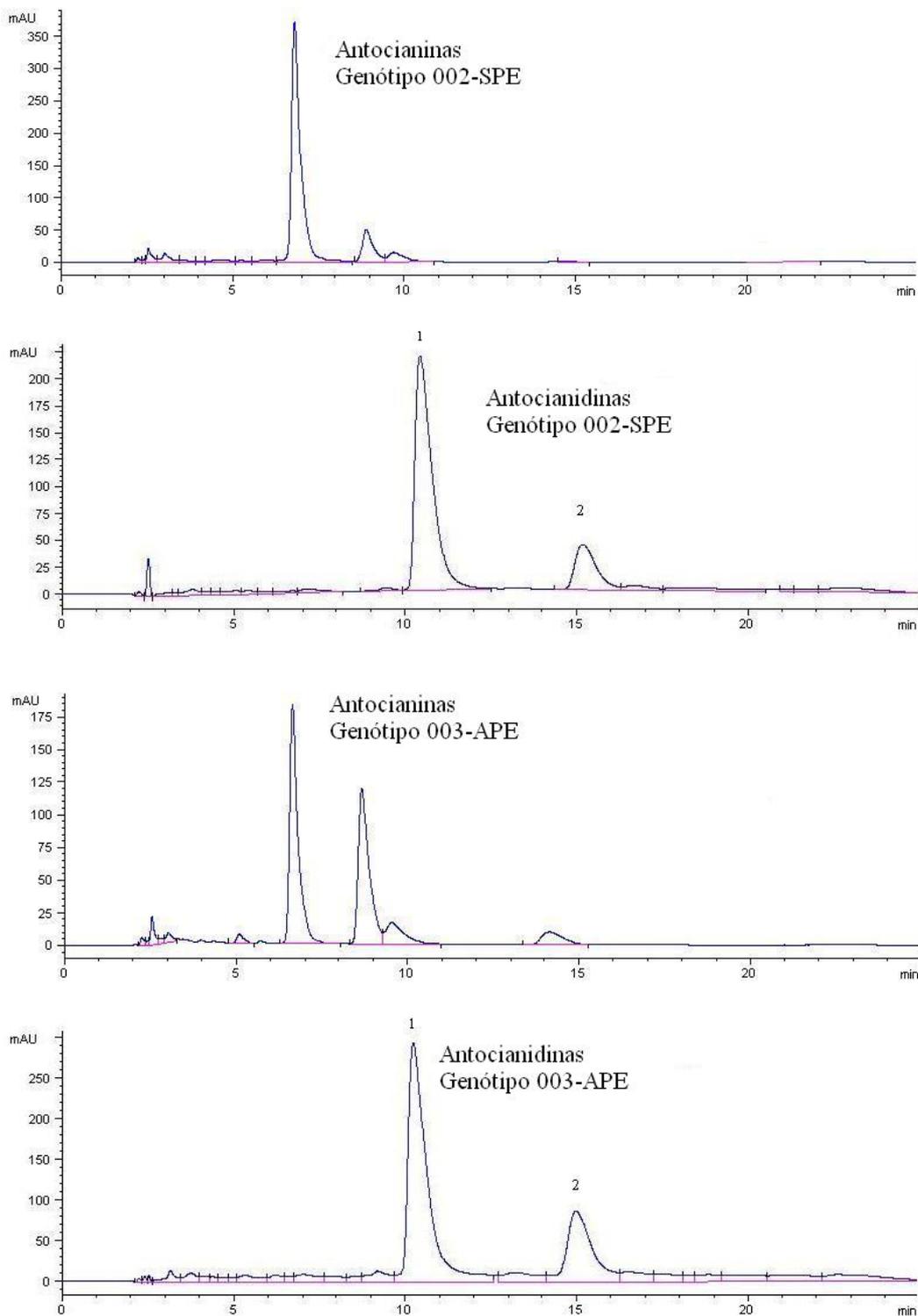


Figura 1: Perfil cromatográfico obtido por CLAE das antocianinas e antocianidinas presentes em genótipos de acerola. Condições cromatográficas: coluna de fase reversa C₁₈ Lichrospher 100RP-18 (250 x 4 mm), acoplada a uma coluna de guarda Lichrospher 100RP-18 (4 x 3 mm). Solvente A: 100% acetonitrila (grau HPLC); solvente B: 1% ácido fosfórico, 10% ácido acético e 5% acetonitrila (v/v, em água Milli-Q). Gradiente linear de 5% a 20% do solvente A em 20 min e de 20% a 5% em 5 min, retornando à composição inicial da fase móvel (5% solvente A e 95% solvente B). Temperatura de 30 °C, vazão de 1 ml/min, volume de injeção de 20 µL e detecção em 520 nm. Pico 1: cianidina; Pico 2: pelargonidina.

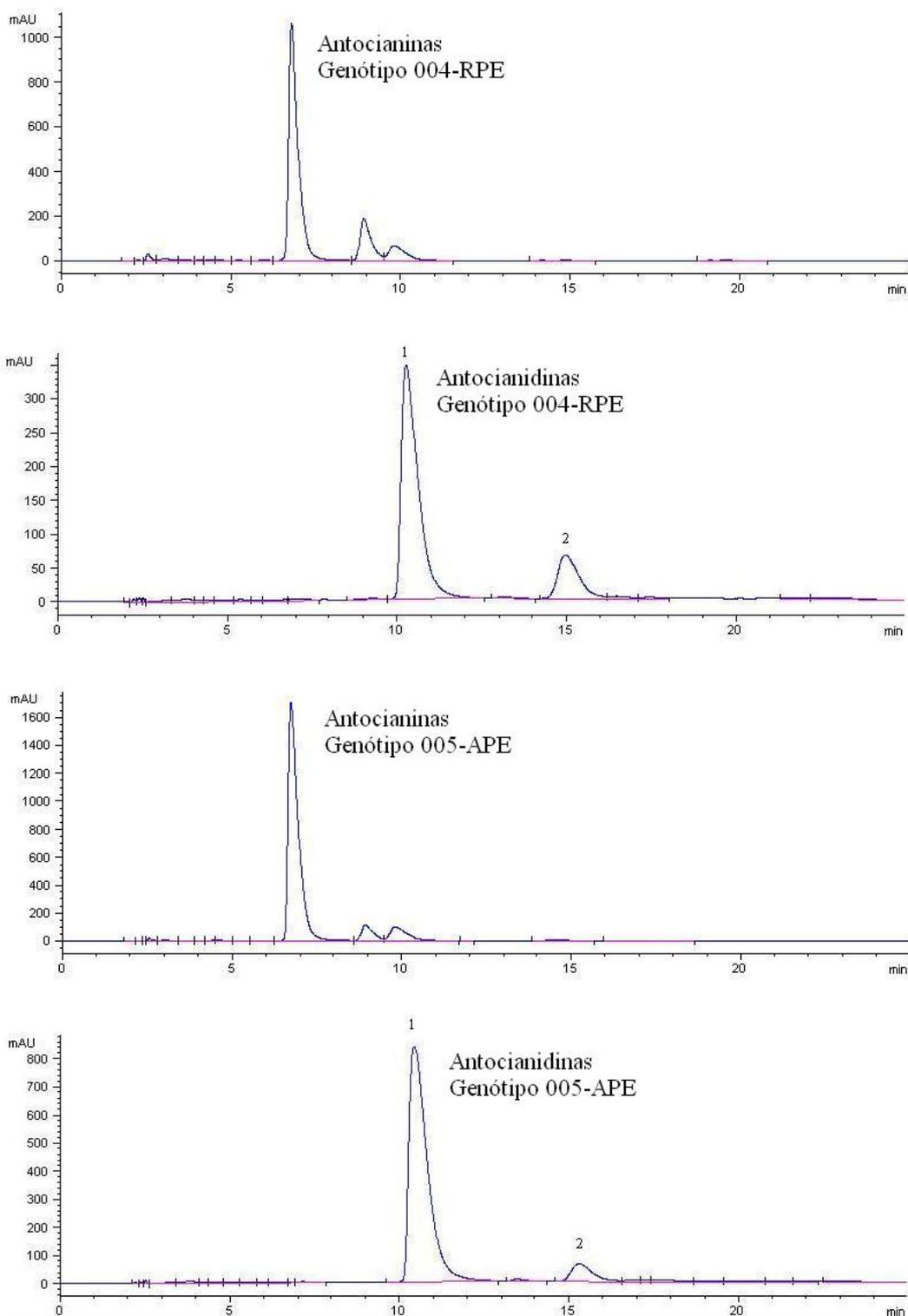


Figura 2: Perfil cromatográfico obtido por CLAE das antocianinas e antocianidinas presentes em genótipos de acerola. Condições cromatográficas: coluna de fase reversa C_{18} Lichrospher 100RP-18 (250 x 4 mm), acoplada a uma coluna de guarda Lichrospher 100RP-18 (4 x 3 mm). Solvente A: 100% acetonitrila (grau HPLC); solvente B: 1% ácido fosfórico, 10% ácido acético e 5% acetonitrila (v/v, em água Milli-Q). Gradiente linear de 5% a 20% do solvente A em 20 min e de 20% a 5% em 5 min, retornando à composição inicial da fase móvel (5% solvente A e 95% solvente B). Temperatura de 30 °C, vazão de 1 ml/min, volume de injeção de 20 μ L e detecção em 520 nm. Pico 1: cianidina; Pico 2: pelargonidina

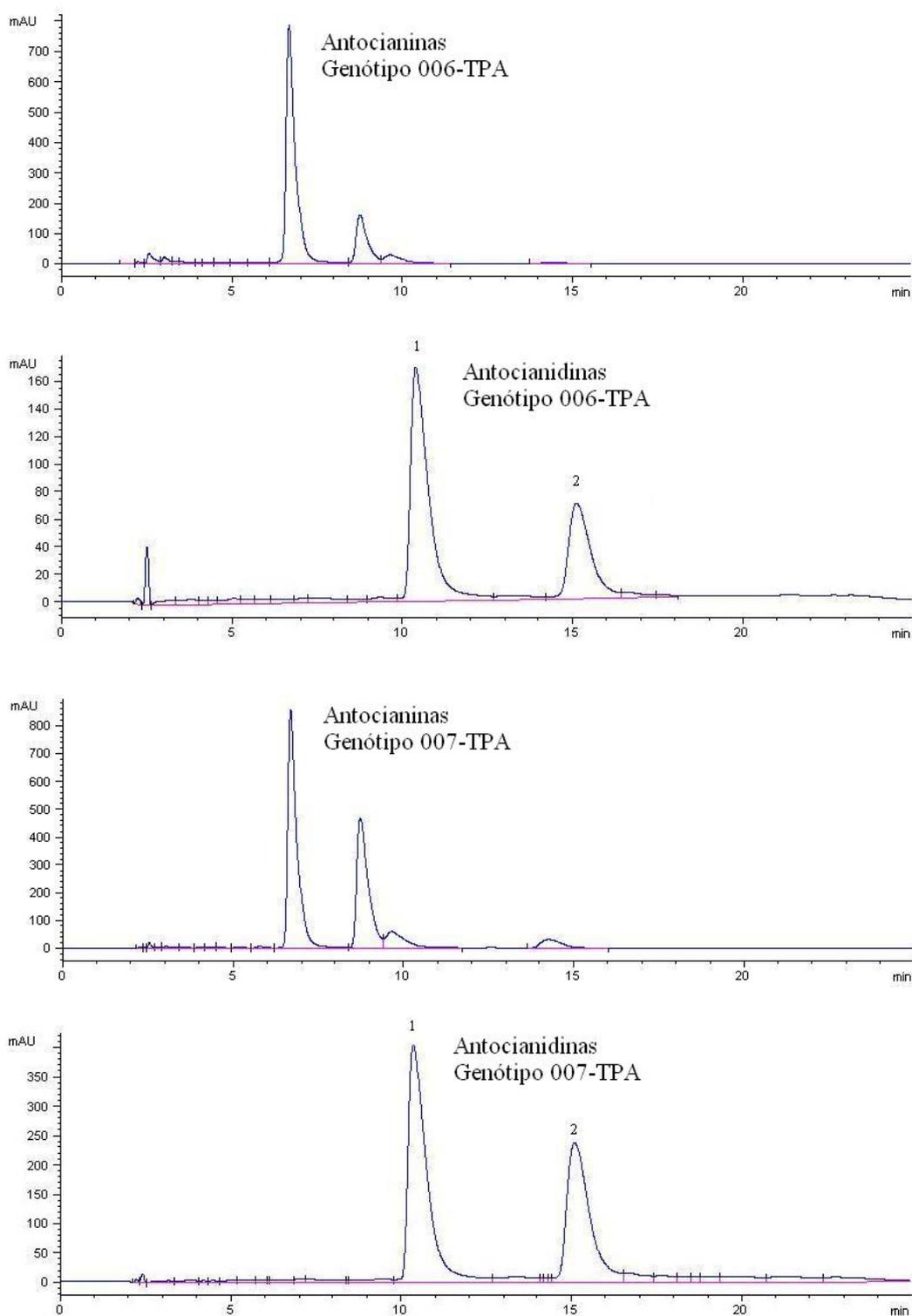


Figura 3: Perfil cromatográfico obtido por CLAE das antocianinas e antocianidinas presentes em genótipos de acerola. Condições cromatográficas: coluna de fase reversa C₁₈ Lichrospher 100RP-18 (250 x 4 mm), acoplada a uma coluna de guarda Lichrospher 100RP-18 (4 x 3 mm). Solvente A: 100% acetonitrila (grau HPLC); solvente B: 1% ácido fosfórico, 10% ácido acético e 5% acetonitrila (v/v, em água Milli-Q). Gradiente linear de 5% a 20% do solvente A em 20 min e de 20% a 5% em 5 min, retornando à composição inicial da fase móvel (5% solvente A e 95% solvente B). Temperatura de 30 °C, vazão de 1 ml/min, volume de injeção de 20 µL e detecção em 520 nm. Pico 1: cianidina; Pico 2: pelargonidina

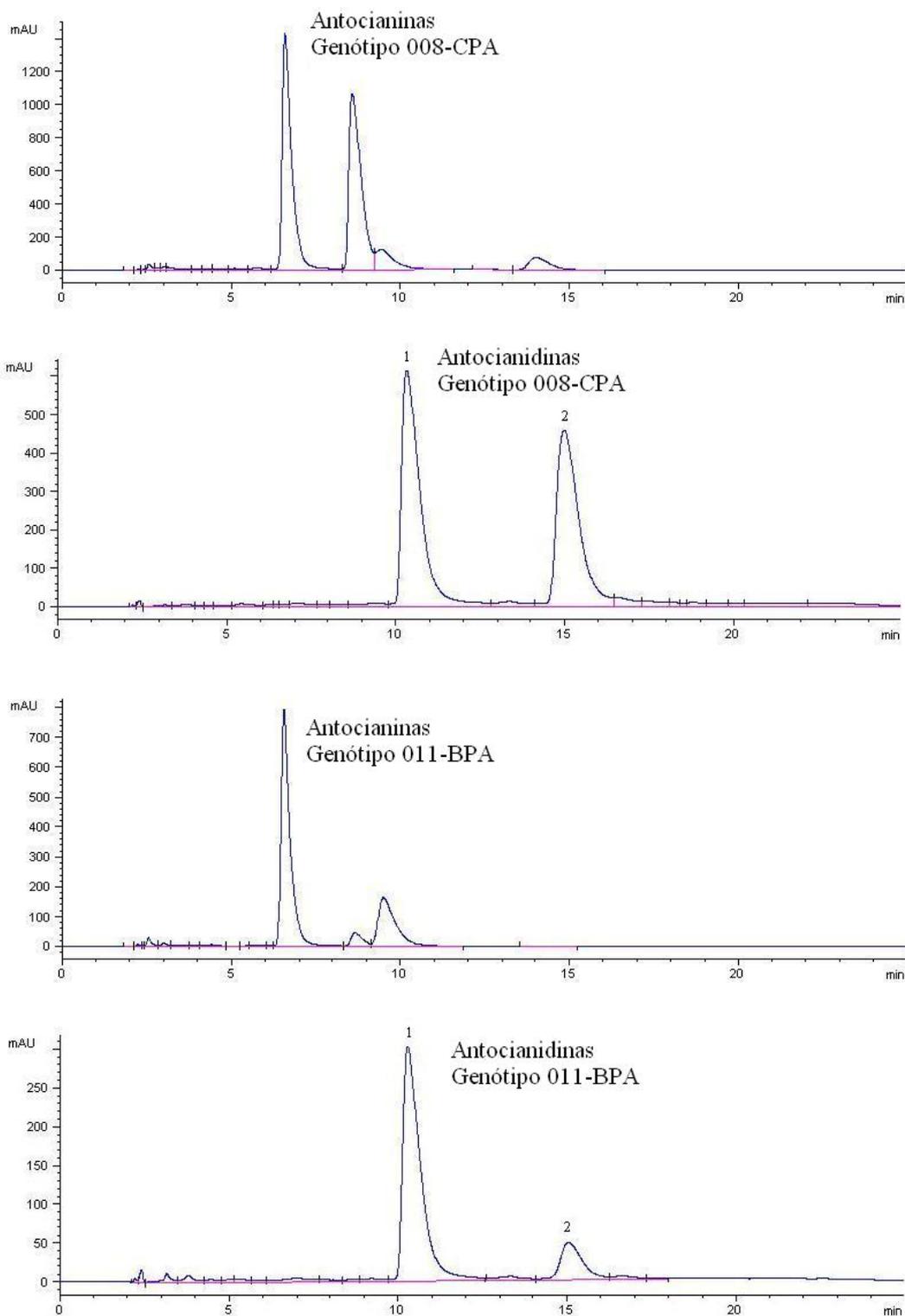


Figura 4: Perfil cromatográfico obtido por CLAE das antocianinas e antocianidinas presentes em genótipos de acerola. Condições cromatográficas: coluna de fase reversa C_{18} Lichrospher 100RP-18 (250 x 4 mm), acoplada a uma coluna de guarda Lichrospher 100RP-18 (4 x 3 mm). Solvente A: 100% acetonitrila (grau HPLC); solvente B: 1% ácido fosfórico, 10% ácido acético e 5% acetonitrila (v/v, em água Milli-Q). Gradiente linear de 5% a 20 % do solvente A em 20 min e de 20% a 5% em 5 min, retornando à composição inicial da fase móvel (5% solvente A e 95% solvente B). Temperatura de 30 °C , vazão de 1 ml/min, volume de injeção de 20 μ L e detecção em 520 nm. Pico 1: cianidina; Pico 2: pelargonidina

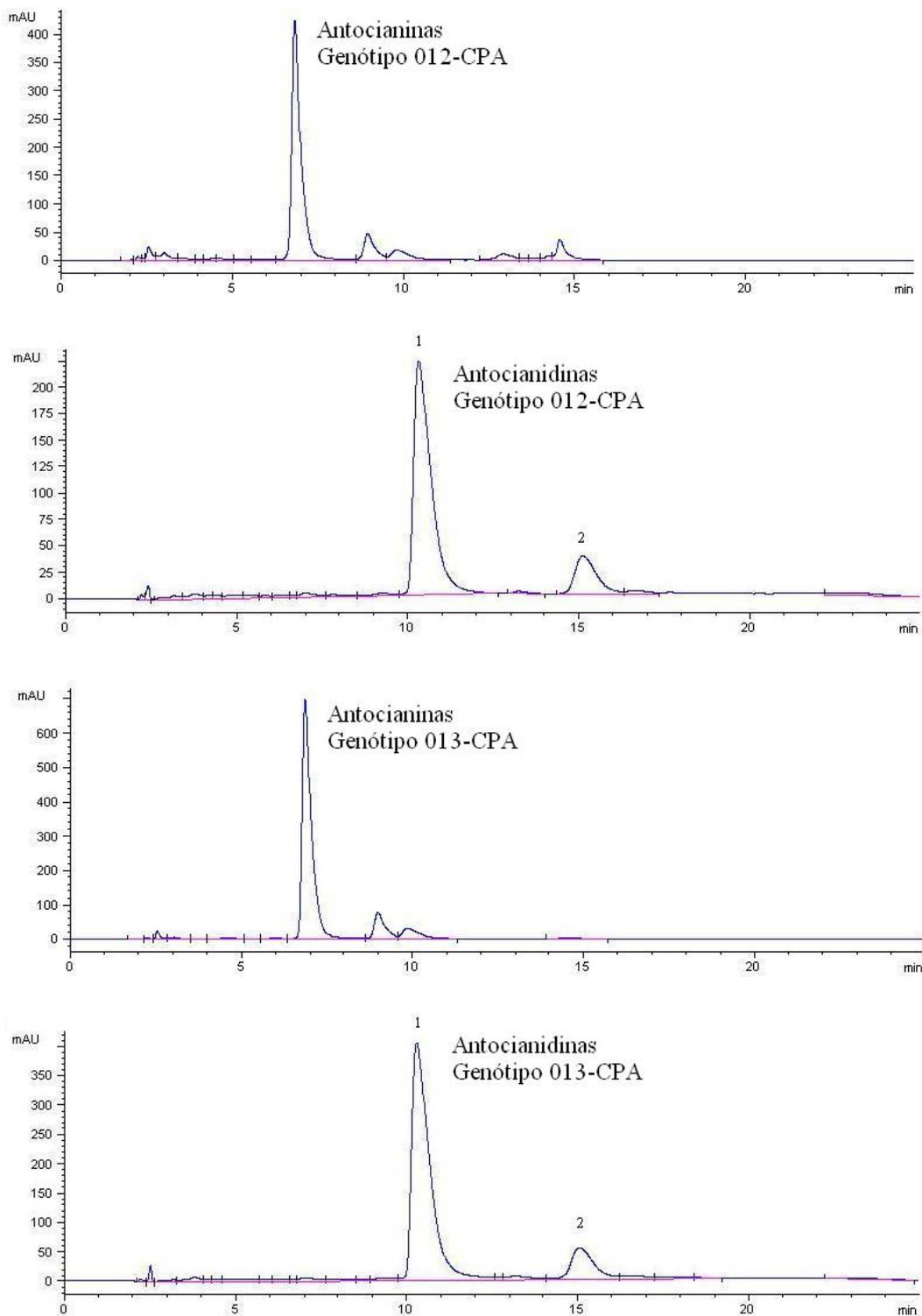


Figura 5: Perfil cromatográfico obtido por CLAE das antocianinas e antocianidinas presentes em genótipos de acerola. Condições cromatográficas: coluna de fase reversa C₁₈ Lichrospher 100RP-18 (250 x 4 mm), acoplada a uma coluna de guarda Lichrospher 100RP-18 (4 x 3 mm). Solvente A: 100% acetonitrila (grau HPLC); solvente B: 1% ácido fosfórico, 10% ácido acético e 5% acetonitrila (v/v, em água Milli-Q). Gradiente linear de 5% a 20% do solvente A em 20 min e de 20% a 5% em 5 min, retornando à composição inicial da fase móvel (5% solvente A e 95% solvente B). Temperatura de 30 °C, vazão de 1 ml/min, volume de injeção de 20 µL e detecção em 520 nm. Pico 1: cianidina; Pico 2: pelargonidina

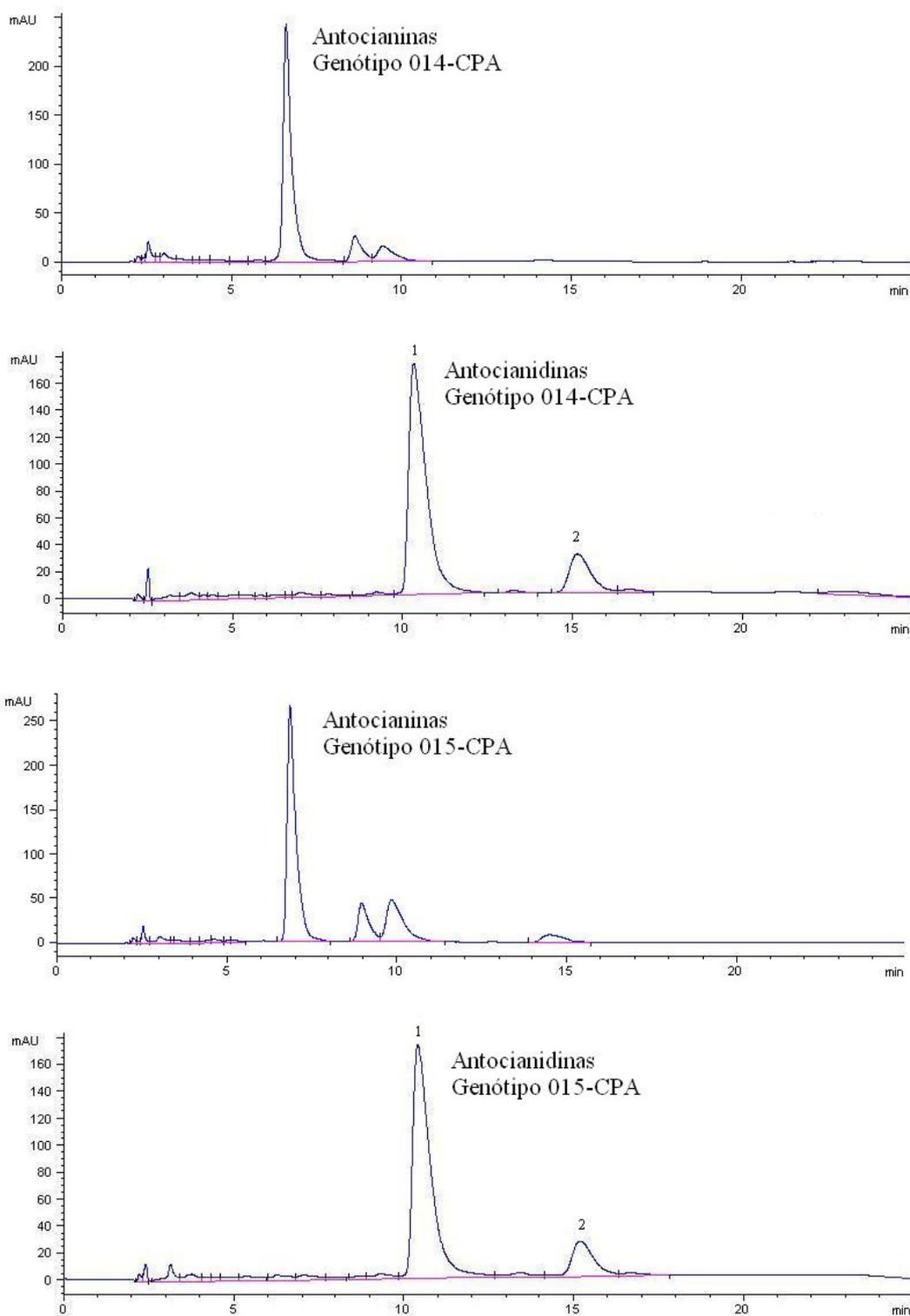


Figura 6: Perfil cromatográfico obtido por CLAE das antocianinas e antocianidinas presentes em genótipos de acerola. Condições cromatográficas: coluna de fase reversa C_{18} Lichrospher 100RP-18 (250 x 4 mm), acoplada a uma coluna de guarda Lichrospher 100RP-18 (4 x 3 mm). Solvente A: 100% acetonitrila (grau HPLC); solvente B: 1% ácido fosfórico, 10% ácido acético e 5% acetonitrila (v/v, em água Milli-Q). Gradiente linear de 5% a 20% do solvente A em 20 min e de 20% a 5% em 5 min, retornando à composição inicial da fase móvel (5% solvente A e 95% solvente B). Temperatura de 30 °C, vazão de 1 ml/min, volume de injeção de 20 μ L e detecção em 520 nm. Pico 1: cianidina; Pico 2: pelargonidina

A natureza e o grau de substituição no anel B das agliconas influenciam no tempo de retenção, tendo em vista que a presença de grupos hidroxilas aumenta a mobilidade da molécula enquanto de grupos metoxilas, decresce; características que, em análise realizada em CLAE de fase reversa, estabelecem a ordem de eluição das antocianidinas: delphinidina, cianidina, petunidina, pelargonidina, peonidina e malvidina (STRACK; WRAY, 1994; COSTA; HORTON; MARGOLIS, 2000). Considerando a ordem de eluição e os tempos de retenção exibidos nos cromatogramas dos padrões (Figura 7) e dos vegetais citados em 2.9 (Tabela 1), as duas agliconas presentes em todos os genótipos de acerola, em estudo, foram identificadas como cianidina e a pelargonidina (Figuras 1-6).

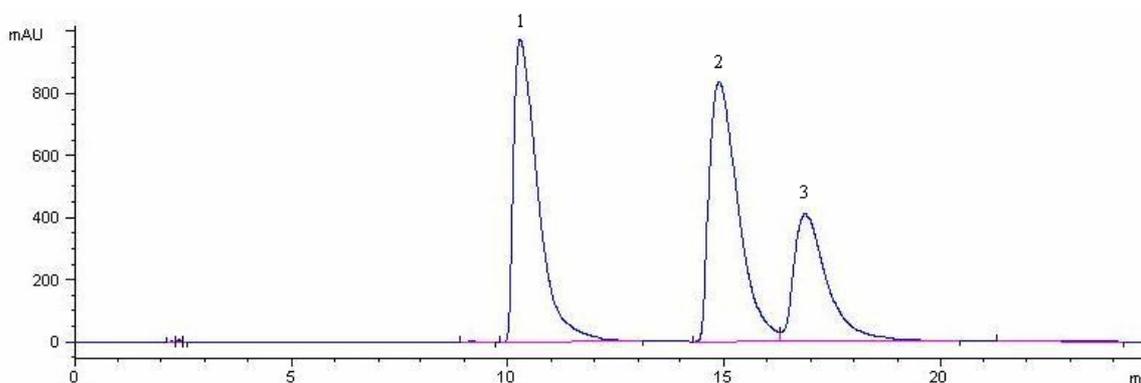


Figura 7: Perfil cromatográfico obtido por CLAE dos padrões de referência. Condições cromatográficas: coluna de fase reversa C_{18} Lichrospher 100RP-18 (250 x 4 mm), acoplada a uma coluna de guarda Lichrospher 100RP-18 (4 x 3 mm). Solvente A: 100% acetonitrila (grau HPLC); solvente B: 1% ácido fosfórico, 10% ácido acético e 5% acetonitrila (v/v, em água Milli-Q). Gradiente linear de 5% a 20 % do solvente A em 20 min e de 20% a 5% em 5 min, retornando à composição inicial da fase móvel (5% solvente A e 95% solvente B). Temperatura de 30 °C, vazão de 1 ml/min, volume de injeção de 20 μ L e detecção em 520 nm. Pico 1: cianidina; Pico 2: pelargonidina; Pico 3: malvidina

Este achado concorda com Macheix, Fleuriet e Billot (1990), ao afirmarem que a maioria dos frutos contém duas antocianidinas, das quais a cianidina é a mais encontrada, acompanhada pela peonidina, delphinidina ou pelargonidina e com Hanamura, Hagiwara e Kawagishi (2005), ao relatarem que em acerolas, as antocianinas identificadas foram cianidina 3-ramnosídeo e a pelargonidina 3-ramnosídeo, as mesmas agliconas encontradas neste estudo.

Tabela 1: Tempo de retenção e identificação das antocianidinas presentes em diferentes vegetais.

Fontes	Tempo de retenção (min)					
	Antocianidinas					
	Df [*]	Cy	Pt	Pg	Pn	Mv
Vegetais						
Uva Isabel	6,83	10,47	11,47	nd	nd	16,88
Uva Patrícia	6,77	10,42	nd	nd	nd	17,04
Uva Red Globe	6,45	9,94	nd	nd	16,15	nd
Ameixa	nd	10,26	nd	nd	nd	nd
Cebola roxa	nd	9,60	nd	nd	16,00	nd
Morango	nd	10,40	nd	15,16	nd	nd
Manga Tommy	nd	10,01	nd	15,17	16,03	nd
Atkins						

* Df: delphinidina; Cy: cianidina; Pt: petunidina; Pg: pelargonidina; Pn: peonidina; Mv: malvidina

nd: não detectada

Em pesquisas anteriormente realizadas por Vendramini e Trugo (2004) e Silva (1999), em acerolas oriundas de um plantio comercial instalado no Rio de Janeiro (RJ) e em acerolas de quatro diferentes cultivares, provenientes da região de Campinas-SP, respectivamente, além da presença de pelargonidina e cianidina também foi detectada a

malvidina. Este resultado pode ser decorrente da diversidade genética gerada pela propagação da aceroleira por sementes (OLIVEIRA; SOARES FILHO, 1999) e de complexos fatores, como incidência de luz solar, pluviosidade, topografia, tipo de solo, localização geográfica, estação do ano, fertilização do solo e grau de maturação (HARRIS, 1977) e ainda, das diferentes técnicas analíticas utilizadas na identificação desses compostos.

Tendo como base a percentagem da área dos picos registrados nos cromatogramas, constata-se através da Tabela 2 que os genótipos possuem diferenciadas proporções das agliconas identificadas, as quais variaram de 48,51 a 76,11% de cianidina e 8,16 a 44,56% de pelargonidina.

Tabela 2: Distribuição relativa das antocianidinas presentes em 12 genótipos de acerola.

Genótipos	Antocianidinas (% da área do pico registrado a 520 nm.)	
	Cianidina	Pelargonidina
002-SPE	64,88	14,98
003-APE	48,51	19,25
004-RPE	71,74	16,93
005-APE	75,27	8,16
006-TPA	54,73	27,35
007-TPA	54,94	38,08
008-CPA	50,72	44,56
011-BPA	76,11	14,26
012-CPA	70,39	14,30
013-CPA	74,95	12,54
014-CPA	67,10	14,32
015-CPA	69,28	12,97

Boyles e Wrolstad (1993), em 46 amostras de sucos de framboesa vermelha obtidos de diferentes cultivares, de diferentes locais de origem, de diferentes estádios de maturação e de diferentes métodos de processamento, relataram que embora não tenham encontrado as mesmas antocianinas, os cromatogramas das antocianidinas revelaram, com diferentes proporções das áreas dos picos, que todas as amostras continham cianidina e pelargonidina.

Diferenças qualitativa e quantitativa do perfil antociânico também foram relatadas por: Ancos, Gonzáles e Cano (1999) em quatro cultivares de framboesa, das quais apenas na cultivar “Ceva” apresentou a delfinidina; por Kallithraka et al. (2005), em de 17 cultivares de uvas e por Siriwoharn et al. (2004) em 11 cultivares de amora preta. Mozetč, Trebše e Hribar, (2002), por meio da CLAE, detectaram um perfil semelhante composto por oito antocianinas, com pequena variação na intensidade relativa dos picos em cinco cultivares de cereja doce. Resultados similares foram obtidos por Donner, Gao e Mazza (1997) em quatro cultivares de cebola roxa ao relatarem um perfil cromatográfico qualitativo idêntico, com variação na quantidade relativa de antocianinas demonstrando a complexidade envolvida na determinação destes compostos.

CONCLUSÕES

O simplificado perfil antociânico apresentado pelos 12 genótipos sugere a ocorrência de diferentes graus de glicosilação e ausência de ácidos acilados nas moléculas das antocianinas e que apenas duas agliconas, cianidina e pelargonidina, em diferenciadas proporções, encontram-se presentes nos genótipos estudados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANCOS, B.; GONZALES, E.; CANO, M.P. Differentiation of raspberry varieties according to anthocyanin composition. **Zeitschrift für Lebensmittel -Untersuchung und -Forschung A**, v.208, p.33-39, 1999.

ANDERSEN, O.M. Anthocyanin occurrences and analyses. Oral presentation at International Workshop on Anthocyanins; Adelaide, Australia; April 17-19, 2002.

BERARDINI, N.; FEZER, R.; CONRAD, J.; BEIFUSS, U.; CARLE, R.; SCHIEBER, A. Screening of mango (*Mangifera indica* L.) cultivars for their contents of flavonol O- and xanthone C-glycosides, anthocyanins, and pectin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.1563-1570, 2005.

BOYLES, M.J.; WROLSTAD, R.E. Anthocyanin composition of red raspberry juice: influences of cultivar, processing, and environmental factors. **Journal of Food Science**, v.58, p.1135-1141, 1993.

CHAOVANALIKIT, A.; THOMPSON, M.M.; WROLSTAD, R.E. Characterization and quantification of anthocyanins and polyphenolics in blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.848-852, 2004.

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

DONNER, H.; GAO, L.; MAZZA, G. Separation and characterization of simple and malonylated anthocyanins in red onions, *Allium cepa* L. **Food Research International**, v.30, p.637-643, 1997.

DRUST, R.W.; WROLSTAD, R.E. Separation and characterization of anthocyanins by HPLC. In R.E. WROLSTAD, **Current Protocols in Food Analytical Chemistry** (pp.F1 3.1-3.13). New York: John Wiley & Sons, 2001.

ESPÍN, J.C.; SOLER-RIVAS, C.; WICHERS, H.J.; GARCÍA-VIGUERA, C. Anthocyanin-based natural colorants: a new source of antiradical activity for foodstuff. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.1588-1592, 2000.

GAO, L.; MAZZA, G. Characterization of acetylated anthocyanins in lowbush blueberries. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 18, p.245-259, 1995.

HANAMURA, T.; HAGIWARA, T.; KAWAGISHI, H. Structural and functional characterization of polyphenols isolated from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 69, p.280-286, 2005.

HARRIS, R.S. Effects of agricultural practices on the composition of foods. In R.S HARRIS & E. KARMAS. **Nutritional evaluation of food processing**, (pp. 33-57). Westport: The Avi Publishing Company, Inc.,1977.

KÄHKÖNEN, M.P.; HEINONEN, M. Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.628-633, 2003.

KALLITHRAKA, S.; MOHDALY, A.A-A.; MAKRIS, D.P.; KEFALAS, P. Determination of major anthocyanin pigments in Hellenic native grapes varieties (*Vitis vinifera* sp.): association with antiradical activity. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.18, p.375-386, 2005.

LONGO, L.; VASAPOLLO, G.; RESCIO, L. Identification of anthocyanins in *Rhamnus alaternus* L. berries . **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.1723-1727, 2005.

LONGO, L.; VASAPOLLO, G. Determination of anthocyanins in *Ruscus aculeatus* L. Berries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.475-479, 2005.

MACHEIX, J.-J.; FLEURIT, A.; BILLOT, J. **Fruit Phenolics**. Boca Raton: CRC Press, 1990.

MOZETČ, B.; TREBŠE, P.; HRIBAR, J. Determination and quantitation of anthocyanins and hidroxicinnamic acids in different cultivars of sweet cherries (*Prunus avium* L.) from Nova Gorica Region (Slovenia). **Food Technology and Biotechnology**, v.40, p.207-212, 2002.

MUÑOZ-ESPADA, A.C.; WOOD, K.V.; BORDELON, B.; WATKINS, B.A. Anthocyanin quantification and radical scavenging capacity of Concord, Norton, and Marechal Foch grapes and wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.6779-6786, 2004.

NODA, Y.; KNEYUKI, T.; MORI, A.; PACKER, L. Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyanidin, and pelargonidin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.1, p.166-171, 2002.

NYMAN, N.A., KUMPULAINEN, J.T. Determination of anthocyanins in berries and red wine by high-performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.4183-4187, 2001.

OLIVEIRA, J.R.P.; SOARES FILHO, W.S. Situação da cultura da acerola no Brasil e ações da Embrapa Mandioca e Fruticultura em recursos genéticos e melhoramento. In: QUEIRÓZ, M.A.; GOEDERT, C.O.; RAMOS, S.R.R. (Eds). **Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste Brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido; Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. Disponível em: www.cpatsa.embrapa.br/servicos/catalogo/livrorg/termos.html (Acesso em 27/9/2005).

RODRIGUEZ-SAONA, L.E.; WROLSTAD, R.E. Extraction, isolation, and purification of anthocyanins. In R.E. WROLSTAD, **Current Protocols in Food Analytical Chemistry** (pp.F1 1.1-1.11). New York: John Wiley & Sons, 2001.

SILVA, M.F.V. Efeito dos diferentes tratamentos e embalagens nas características da polpa de acerola e na determinação dos teores de ácido ascórbico e das antocianinas durante o armazenamento. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas. 1999. 224 p.

SIRIWOHARN, T.; WROLSTAD, R.E.; FINN, C.E.; PEREIRA, C.B. Influence of cultivar, maturity, and sampling on blackberry (*Rubus* L. Hybrids) anthocyanins, polyphenolics, and antioxidant properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.8021-8030, 2004.

STRACK, D.; WRAY, V. The anthocyanins. In J.B. HARBORNE (Ed.), **The Flavonoids: advances in research since 1986** (pp. 1-22). Boca Raton: Chapman & Hall, 1994.

VENDRAMINI, A.L.A.; TRUGO, L.C. Phenolic compounds in acerola fruit (*Malpighia puniceifolia*, L.). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.15, p.664-668, 2004.

WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R.L. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, n.2, p.304-309, 1997.

WROLSTAD, R.E. Anthocyanins pigments - bioactivity and coloring properties. **Journal of Food Science**, v. 69, p. C419-C421, 2004.

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

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

POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE ANTOCIANINAS

PRESENTES EM 12 GENÓTIPOS DE ACEROLA

(Malpighia emarginata D.C.)



RESUMO

Antocianinas de acerolas, isoladas de 12 genótipos cultivados no Banco Ativo de Germoplasma da Universidade Federal Rural de Pernambuco, foram testadas quanto à atividade antioxidante e à capacidade de sequestrar radicais livres através do sistema modelo β -caroteno/ácido linoléico e do radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), respectivamente. A atividade antioxidante das antocianinas dos genótipos de acerola situou-se entre 28,58 a 47,07%, inferior a exibida pelo BHT. No teste de avaliação da capacidade de sequestrar o radical livre DPPH, também foi observada uma variação entre os genótipos, a concentração e o tempo de reação. Na concentração 16,7 $\mu\text{g/ml}$ e após 5 min e 2h de reação, o percentual variou de 36,97 a 63,92% e de 73,27 a 94,54%, respectivamente. A especificidade e sensibilidade de cada método utilizado, bem como o uso de diferentes concentrações de antocianinas dificulta a comparação entre os resultados obtidos. No entanto, constata-se, independentemente do método utilizado, que as antocianinas isoladas de todos os genótipos de acerola exibiram atividade antioxidante e habilidade de agirem como sequestradoras de radical livre e que dentre os genótipos estudados, o 008-CPA pelo elevado teor de antocianinas totais, apresenta maior potencial antioxidante por ambos os métodos utilizados.

Palavras-chave: Atividade antioxidante, Antocianinas, *Malpighia emarginata* DC., Genótipos.

INTRODUÇÃO

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que o consumo de frutas e hortaliças exerce efeitos benéficos à saúde e contribui para redução de risco de doenças degenerativas (AMES; SHIGENAGA; HAGEN, 1993). A proteção atribuída a esses alimentos tem sido relacionada à presença de compostos fenólicos, os quais possuem capacidade antioxidante (WANG; CAO; PRIOR, 1996; VINSON et al., 1998).

Dentre os compostos fenólicos destacam-se as antocianinas, glicosídeos polihidroxilados e polimetoxilados, derivados do 2-fenilbenzopirilium (cátion flavilium) (Francis, 1989). As diferenças entre as antocianinas encontram-se relacionadas: ao número de grupos hidroxilas; à natureza, número e posição de açúcares ligados à molécula e à natureza e número de ácidos alifáticos ou aromáticos presentes nos açúcares (STRACK; WRAY, 1994). Estes pigmentos vêm sendo estudados quanto a sua habilidade em reduzir o risco da oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL), de agir como seqüestrantes de radicais livres e de quelar metais (SAUTÉ-GRACIA; HEINONEN; FRANKEL, 1997; KÄHKÖNEN; HEINONEN, 2003). Essas ações encontram-se relacionadas com a posição e o grau de hidroxilação e metoxilação (SEERAM; NAIR, 2002), com a glicosilação (WANG; CAO; PRIOR, 1997) e com a presença de ácidos acilados na molécula (TAMURA, YAMAGAMI, 1994).

Grande parte da produção mundial de acerola, uma das mais ricas fontes naturais de vitamina C, ocorre no Brasil onde esta cultura tem sido amplamente propagada devido à boa adaptação ao solo e ao clima (JOHNSON, 2003). Embora o conteúdo de vitamina C decresça durante o processo de maturação, frutos maduros ainda apresentam altos teores dessa vitamina. Alves, Chitarra e Chitarra (1995), Vendramini e Trugo (2000), e Assis, Lima e Oliveira (2001) constataram 1.021; 1.074, e 957 mg de vitamina C/100g de polpa do fruto maduro, respectivamente. Não obstante a cor vermelha deste fruto seja decorrente

da presença de antocianinas (MAZZA; MINIATI, 1993), a maioria dos artigos publicados sobre as antocianinas presentes em acerola (CHAN Jr.; YAMAMOTO, 1994; LIMA et al., 2003; VENDRAMINI; TRUGO, 2004; MUSSER et al., 2004) não abordam sua atividade antioxidante, que será o objeto desta pesquisa.

MATERIAL E MÉTODOS

Frutos

As acerolas foram colhidas de 12 genótipos, identificados com os códigos 002-SPE, 003-APE, 004-RPE, 005-APE, 006-TPA, 007-TPA, 008-CPA, 011-BPA, 012-CPA, 013-CPA, 014-CPA e 015-CPA, cultivados no Banco Ativo de Germoplasma da UFRPE, instalado na Estação Experimental de Cana-de-Açúcar em Carpina. Frutos no estágio maduro (1 a 2 Kg), foram colhidos de cada um dos genótipos, no período da manhã, refrigerados e transportados, em caixa isotérmica, até o Laboratório de Experimentação e Análises de Alimentos (LEAAL) “Nonete Barbosa Guerra” do Departamento de Nutrição da UFPE, onde foram realizados os experimentos. Após a seleção, os frutos foram processados em centrífuga doméstica e, as polpas resultantes, imediatamente armazenadas sob congelamento ($-18 \pm 1^\circ\text{C}$). Todos os procedimentos subsequentes foram realizados sob reduzida luminosidade.

Extração das antocianinas

As antocianinas da polpa de acerola (200 a 500g), de cada genótipo, foram extraídas com acetona, filtradas a vácuo e o resíduo re-extraído com acetona até a completa remoção dos pigmentos. O volume do filtrado foi quantificado, transferido para um funil de separação, ao qual foi adicionado o dobro do volume de clorofórmio, e estocado durante

uma noite à 4°C para a separação de duas fases. A fase aquosa (fase superior), foi levada ao evaporador rotativo ($38 \pm 2^\circ\text{C}$) durante 10-15 minutos para a remoção da acetona residual e o extrato aquoso, estocado à $-18 \pm 1^\circ\text{C}$ para ser utilizado nas etapas posteriores (RODRIGUEZ-SAONA; WROLSTAD, 2001).

Purificação e precipitação das antocianinas

A extração em fase sólida (SPE, solid phase extraction), em cartuchos Sep-Pak C₁₈ (Waters Associates, Milford, MA) foi empregada para purificação das antocianinas de acordo com a metodologia descrita por Rodriguez-Saona e Wrolstad (2001), modificada quanto ao volume de água acidificada (0,01% HCl) utilizada para lavar os cartuchos após a aplicação do extrato antociânico. Os cartuchos foram ativados com metanol e, após lavagem com água acidificada (0,01% HCl), foi aplicado o extrato aquoso de acerola (5 a 10mL). Para assegurar a remoção do elevado teor de ácido ascórbico presente na acerola, os cartuchos contendo os pigmentos adsorvidos foram lavados com água acidificada (0,01% HCl) em um volume 10 vezes superior ao do volume do extrato aquoso aplicado. A eficácia deste procedimento foi avaliada em 10 mL da última água eluída por meio de método titulométrico utilizando 2,6 diclorofenol indofenol (AOAC, 1990). Após o término da lavagem com água acidificada (0,01% HCl), os compostos fenólicos não antociânicos foram removidos com acetato de etila e, as antocianinas, eluídas com metanol acidificado (0,01% HCl).

O extrato metanólico foi concentrado sob pressão reduzida ($38 \pm 2^\circ\text{C}$) até a obtenção de um resíduo seco ao qual foi adicionado éter dietílico com a finalidade de precipitar os pigmentos. As antocianinas foram, então, coletadas, centrifugadas (20 minutos, 2500g) e secas sob atmosfera de nitrogênio. Os pigmentos em pó foram pesados,

aconicionados em vidros âmbar, os quais, antes de serem fechados, receberam um fluxo de nitrogênio e, em seguida, armazenados sob refrigeração (4°C) até o momento das análises (ESPÍN et al., 2000).

Determinação da atividade antioxidante utilizando sistema modelo β-caroteno/ácido linoléico

A atividade antioxidante das antocianinas foi determinada por oxidação acoplada do β-caroteno e do ácido linoléico segundo metodologia descrita por Marco (1968) e modificada por Hammerschmidt e Pratt (1978). Este método avalia a redução dos valores de absorvância, os quais se encontram relacionados com a perda de cor do β-caroteno, como resultado dos produtos de peroxidação do ácido linoléico. As soluções de antocianinas foram preparadas numa concentração de 0,2 mg/mL utilizando metanol acidificado (0,01% HCl), tendo como padrão, o hidroxil butil tolueno (BHT) em concentração igual a da solução de antocianinas.

Todas as determinações foram efetuadas em triplicata e a atividade antioxidante (AA), calculada como percentual de inibição relativa ao controle utilizado a seguinte equação (Al-Saikhan; Howard; Miller Jr, 1995):

$$AA = \frac{\text{Taxa de degradação do controle} - \text{Taxa de degradação da amostra}}{\text{Taxa de degradação do controle}} \times 100$$

Determinação da capacidade de seqüestrar radical livre utilizando DPPH (1, 1-difenil-2-picrilhidrazina)

A capacidade de seqüestrar radical livre foi realizada de acordo com o método descrito por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) com algumas modificações. Neste método, a redução do DPPH pelo composto antioxidante resulta na perda de absorvância e, o grau de descoloração da solução, indica a eficácia do composto testado. Antocianinas em pó de cada genótipo foram solubilizadas em metanol e 0,1 mL destas soluções com diferentes concentrações (1,0; 0,5 e 0,1 mg/mL) foram adicionados em tubos de ensaio rosqueados contendo 5,9 mL de uma solução metanólica de DPPH com concentração de 0,1mM, obtendo, no final do teste, as concentrações de 16,7; 8,3 e 1,7 µg/mL, respectivamente. Com o propósito de estabelecer comparação foi utilizada uma solução metanólica de BHT nas mesmas concentrações das soluções de antocianinas. Após leve agitação, os tubos foram deixados no escuro à temperatura ambiente ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) e o decréscimo da absorvância foi registrado a 517 nm em intervalos de 05, 15, 30, 60, 90 e 120 min, utilizando metanol para zerar o espectrofotômetro e uma solução contendo 0,1 mL de metanol e 5,9 mL de DPPH como branco. Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata.

Os resultados foram calculados pela seguinte fórmula e expressos como percentual de seqüestro de radical livre (MILIAUSKAS; VENSKUTONIS; van BEEK, 2004):

$$\% \text{ de seqüestro de radical livre} = [(A_B - A_A)/A_B] \times 100,$$

onde: A_B = absorção do branco ($t = 0$ min); A_A = absorção das soluções das antocianinas ($t =$ diferentes intervalos de tempo)

Tratamento estatístico dos dados

Com o objetivo de comparar a atividade antioxidante bem como a capacidade de sequestrar radical livre das antocianinas dos diferentes genótipos, os resultados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade utilizando o programa estatístico “Statistica” (versão 5.5, StatSoft, Inc., Tulsa, USA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Remoção do ácido ascórbico

Considerando que os extratos de frutos contêm quantidades apreciáveis de compostos com ação antioxidante e/ou pro-oxidante, foi utilizada a extração em fase sólida (EFS), técnica de separação que promove uma partição seletiva de um ou mais componentes. A eficiência desta técnica requer adequada escolha do tipo de sorbente, do sistema de solvente usado e sua relação com o analito de interesse (DEAN, 1998).

A eficácia da metodologia empregada neste estudo foi comprovada pela ausência de ácido ascórbico em todas das amostras, evitando, desta forma, sua interferência na avaliação da atividade antioxidante das antocianinas. Este resultado corrobora os encontrados por Heinonen, Lehtonen e Hopia (1998) e Espin et al. (2000) que relataram a remoção total do ácido ascórbico após utilizarem a técnica EFS com cartuchos Sep-Pak C₁₈ na purificação de vinho de frutos e extratos de frutos, respectivamente.

Potencial antioxidante das antocianinas de genótipos de acerola

Método do sistema modelo β -caroteno/ácido linoléico

A atividade antioxidante das antocianinas isoladas dos 12 genótipos de acerola, tendo como padrão o BHT, encontra-se apresentada no Figura 1, na qual constata-se a superioridade deste último. Este resultado ratifica os obtidos por outros autores os quais referem o BHT como o melhor inibidor da oxidação no sistema β -caroteno/ácido linoléico (van GADOW; JOUBERT; HANSMANN, 1997; BURDA; OLESZEK, 2001; KULISK et al. 2004; GUERRA; MÉLO; MANCINI FILHO, 2004; TEPE et al., 2005). Com relação às antocianinas ensaiadas, o maior percentual (47,07%) foi apresentado pelo genótipo 002-SPE. Este percentual foi, estatisticamente, semelhante aos demais, com exceção dos genótipos 005-APE e 011-BPA (31,73% e 28,58%, respectivamente), cujos valores foram significativamente inferiores.

Por este mesmo método, Velioglu et al (1998) relataram para extratos metanólico (80%) de “blueberry” e cereja doce alta atividade antioxidante (92,1 e 82,5%, respectivamente) e Cordenunsi et al (2005) também em extratos metanólico a 70% adicionado de 5% de ácido acético, de morangos de cultivares “Dover”, “Campineiro” e “Oso Grande”, 55,2; 51,7 e 56,6%, respectivamente, de atividade antioxidante. Em extratos aquoso, etéreo e etanólico de coentro, foi demonstrado que diferentes procedimentos de extração podem influenciar, de forma marcante, a composição dos extratos e, conseqüentemente, a sua atividade antioxidante (MÉLO et al. 2003). Além desse fato, sabe-se que a composição dos extratos varia de acordo com o material em estudo, ou seja, o extrato bruto, além de antocianinas, contém outras substâncias como açúcares, ácidos orgânicos e outros compostos fenólicos, os quais podem interferir na avaliação da atividade antioxidante. A influência entre nove genótipos sobre a atividade antioxidante de

“blueberry” foi referida por Connor et al. (2002), ratificando Wang e Stretch (2001) em pesquisa efetuada com cultivares de cranberry”.

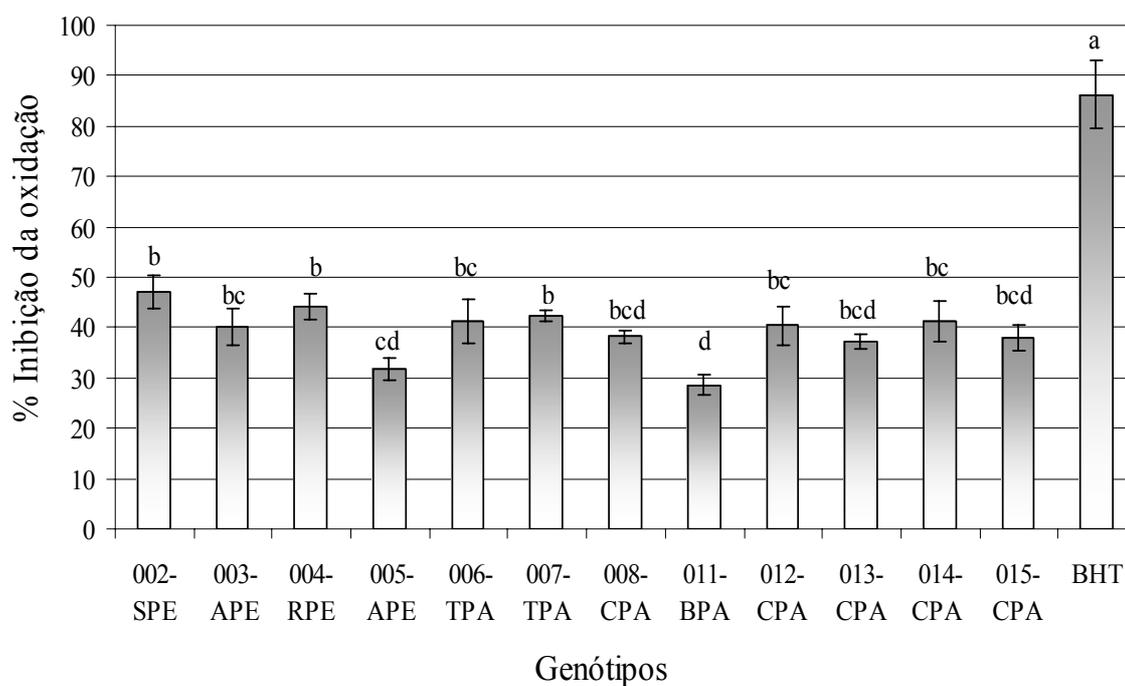


Figura 1: Atividade antioxidante de antocianinas presentes em 12 genótipos de acerola e padrão BHT (0,2mg/mL) avaliada pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico. Colunas com a mesma letra não diferem significativamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Uma vez que nesta pesquisa foi utilizada uma concentração equânime dos pigmentos, a variação encontrada deve ser decorrente das características químicas das antocianinas presentes nos diferentes genótipos, face à comprovada relação entre capacidade antioxidante e a estrutura química destes pigmentos (SEERAM; NAIR, 2002; WANG; CAO; PRIOR, 1997; TAMURA; YAMAGAMI, 1994).

Capacidade de seqüestrar radical livre (DPPH)

O composto antioxidante, ao doar hidrogênio, reduz o DPPH acarretando alteração da cor violeta-escuro para amarelo-claro. Convém ressaltar que embora as antocianinas absorvam luz no comprimento de onda utilizado neste teste, quando em baixa concentração não contribuem para a absorbância total (KÄHKÖNEN et al., 2003).

Vários autores têm utilizado diferentes tempos de reação, como 5 min (BURDA; OLESZEK, 2001; NAKAJIMA et al., 2004), 15 min (MILIAUSKAS et al., 2004; BENVENUTI et al., 2004), 30 min (AMAKURA, et al., 2000; TEPE et al., 2005), 1 h (BERMÚDEZ-SOTO; TOMÁS-BARBERÁN, 2004; KULISIC, et al., 2004), 2 h (CARDADOR-MARTÍNEZ; LOARCA-PIÑA; OOMAH, 2002), bem como por tempo suficiente até que a absorbância não mais apresente decréscimo (SÁNCHEZ-MORENO; LARRAURI; SAURA-CALIXTO, 1998; LEONG; SHUI, 2002).

A capacidade das antocianinas isoladas dos diferentes genótipos de aceroleiras de seqüestrar radical livre encontra-se registrada nas Tabelas 1-3, nas quais observam-se variações em função dos genótipos, da concentração e do tempo de reação. Estes resultados são respaldados por: Oki et al. (2002) que em frações antociânicas obtidas de cultivares de batata doce de cor roxa, verificaram que a capacidade de seqüestrar o DPPH foi proporcional à concentração de antocianinas empregadas no ensaio e, por Cardador-Martínez et al. (2002) em extratos metanólicos de produtos obtidos a partir de feijão nos quais a absorbância diminuiu ao longo do tempo da reação com o DPPH.

Analisando as Tabelas de *per si* verifica-se que na Tabela 1, após 5 min de reação as antocianinas do genótipo 014-CPA exibiram a maior ($P < 0,05$) capacidade de seqüestrar radical livre DPPH (63%). Este resultado foi superior aos reportados por Kähkönen et al., (2003) que demonstraram, após 4 min de reação, que as antocianinas isoladas de amora preta na mesma concentração testada (16.7 µg/ml), foram as mais eficientes em seqüestrar

o radical DPPH (58%), seguida pelas da “bilberry” (52%) e da “cowberry” (36%). Antocianinas de blueberry (*Vaccinium myrtillus*), rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*), black currant (*Ribes nigra*), chokeberry (*Aronia melanocarpa*) e elderberry (*Sambucus nigra*) apresentaram atividades similares, variando de 45 a 55%, após 5 min de reação na concentração de 1mg/ml. Convém ressaltar que além das antocianinas, outros compostos fenólicos encontravam-se presentes nestes extratos (NAKAJIMA et al., 2004).

Embora as antocianinas dos genótipos 014-CPA e 003-APE tenham exibido os mais elevados percentuais de inibição (94,54 e 94,47%), não diferiram significativamente, dos genótipos 004-RPE, 008-CPA, e 012-CPA (93,75; 93,60 e 93,68%, respectivamente), após 2 h de reação (Tabela 1).

O fato do BHT ter apresentado o menor valor de inibição após 5 min de reação, independente da concentração utilizada (17,36; 9,98 e 3,12%, Tabelas 1-3), ratifica Bondet; Brand-Williams e Berset (1997) ao afirmarem que este antioxidante reage lentamente com o DPPH atingindo a absorbância constante em 5 h. Esta tendência, também, foi observada por Chen e Ho (1997); Moure et al. (2000) e posteriormente ratificada por Koleva et al. (2002) e Tepe et al. (2005). Quanto mais rapidamente ocorre o decréscimo da absorbância, maior a capacidade do composto em seqüestrar radical, isto é, mais potente, mais hábil em termos de doar hidrogênio.

Tabela 1: Capacidade de seqüestrar radical livre DPPH (%) de antocianinas isoladas de genótipos de acerola e BHT na concentração final de 16,7 µg/ml.

Genótipos	Tempo de reação (min)					
	5	15	30	60	90	120
002-SPE	39,55 ^{de} ± 0,68	54,34 ^{fg} ± 0,81	65,37 ^f ± 0,74	74,53 ^f ± 0,83	78,33 ^f ± 0,75	81,77 ^f ± 0,59
003-APE	50,62 ^c ± 0,51	71,27 ^{cd} ± 0,64	84,75 ^{cd} ± 0,37	92,77 ^a ± 0,20	94,18 ^a ± 0,12	94,47 ^a ± 0,09
004-RPE	58,23 ^b ± 0,24	76,72 ^b ± 0,49	86,51 ^{bc} ± 0,61	92,34 ^a ± 0,33	93,40 ^a ± 0,12	93,75 ^{ab} ± 0,10
005-APE	51,20 ^c ± 0,87	67,41 ^e ± 0,53	77,06 ^e ± 0,74	83,93 ^e ± 0,58	88,27 ^d ± 0,84	90,31 ^d ± 0,63
006-TPA	36,97 ^e ± 0,82	49,54 ^h ± 0,95	58,39 ^h ± 0,96	65,59 ^h ± 0,95	70,49 ^h ± 0,90	73,27 ^h ± 0,91
007-TPA	52,08 ^c ± 0,75	69,39 ^{de} ± 0,44	79,39 ^e ± 0,22	87,21 ^{cd} ± 0,43	90,77 ^{bc} ± 0,08	92,29 ^{bc} ± 0,06
008-CPA	56,13 ^b ± 0,69	73,14 ^c ± 0,86	82,58 ^d ± 0,85	89,67 ^{bc} ± 0,90	92,52 ^{ab} ± 0,64	93,60 ^{ab} ± 0,35
011-BPA	41,94 ^d ± 0,29	55,97 ^f ± 0,70	64,68 ^{fg} ± 0,38	73,29 ^{fg} ± 0,51	75,96 ^g ± 0,39	78,99 ^g ± 0,68
012-CPA	59,03 ^b ± 0,87	78,51 ^b ± 0,89	87,65 ^{ab} ± 0,60	92,11 ^{ab} ± 0,75	93,13 ^a ± 0,82	93,68 ^{ab} ± 0,77
013-CPA	52,74 ^c ± 0,81	67,74 ^e ± 0,61	77,34 ^e ± 0,74	85,20 ^{de} ± 0,88	89,02 ^{cd} ± 0,96	90,82 ^{cd} ± 0,74
014-CPA	63,92 ^a ± 0,50	81,79 ^a ± 0,36	90,07 ^a ± 0,26	93,96 ^a ± 0,17	94,37 ^a ± 0,10	94,54 ^a ± 0,05
015-CPA	37,10 ^e ± 0,74	51,90 ^{gh} ± 0,81	62,43 ^g ± 0,77	71,04 ^g ± 0,52	76,31 ^{fg} ± 0,86	79,17 ^g ± 0,73
BHT	17,36 ^f ± 0,27	39,10 ⁱ ± 0,33	59,73 ^h ± 0,45	75,70 ^f ± 0,49	83,54 ^e ± 0,34	86,89 ^e ± 0,23

Dados expressos como média ± desvio padrão.

Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

A superioridade das antocianinas do genótipo 014-CPA, após 5 min de reação (42,35%), é confirmada na Tabela 2 sem, contudo, diferir significativamente dos genótipos 004-RPE (40,22%) e 008-CPA (39,43%). Estes valores foram um pouco mais elevados que os reportados por Kähkönen et al., (2003) utilizando esta mesma concentração (8,3 µg/ml) após 4 min de reação, demonstrando que as antocianinas isoladas de amora preta, “bilberry” e “cowberry”, apresentaram menor capacidade de seqüestrar radical DPPH de 38, 38 e 25%, respectivamente. Após 2 h de reação, embora as antocianinas dos genótipos 003-APE e 014-CPA tenham apresentado os mais elevados valores (75,64 e 75,32%), foram estatisticamente similares ao genótipo 004-RPE (72,64%).

Na Tabela 3 fica demonstrado que apesar da menor concentração utilizada (1,7µg/ml), as antocianinas de acerola foram ainda capazes de seqüestrar radical DPPH. A superioridade do genótipo 014-CPA (11,03%) também foi ratificada após 5 min embora não tenha diferido estatisticamente dos genótipos 003-APE, 004-RPE, 005-APE, 008-CPA e 012-CPA. Esses resultados encontram-se próximos aos relatados por Kähkönen et al. (2003) que detectaram valores de percentuais de seqüestro do radical DPPH de 12%, 13% e 9% para antocianinas isoladas de amora preta, “bilberry” e “cowberry”, respectivamente, na mesma concentração testada após 4 min de reação. Na presente pesquisa, após 2 h de reação, o BHT foi mais eficiente ($P < 0,05$) que as amostras testadas.

Tabela 2: Capacidade de seqüestrar radical livre DPPH (%) de antocianinas isoladas de genótipos de acerola e BHT na concentração final de 8,3 µg/ml.

Genótipos	Tempo de reação (min)					
	5	15	30	60	90	120
002-SPE	26,45 ^{gh} ± 0,61	33,68 ^f ± 0,73	38,63 ^{fg} ± 0,63	44,54 ^f ± 0,88	46,82 ^e ± 0,73	49,17 ^g ± 0,59
003-APE	38,83 ^{bc} ± 0,76	52,27 ^{ab} ± 0,81	61,10 ^{ab} ± 0,72	68,62 ^a ± 0,75	72,73 ^a ± 0,83	75,64 ^a ± 0,71
004-RPE	40,22 ^{ab} ± 0,82	52,93 ^{ab} ± 0,74	60,17 ^b ± 0,85	66,60 ^a ± 0,90	70,34 ^a ± 0,85	72,64 ^{ab} ± 0,80
005-APE	33,65 ^{de} ± 0,82	44,47 ^d ± 0,82	50,91 ^d ± 0,57	56,06 ^c ± 0,70	59,44 ^c ± 0,80	61,73 ^e ± 0,84
006-TPA	25,24 ^h ± 0,68	31,70 ^f ± 0,74	36,87 ^f ± 0,88	41,14 ^g ± 0,61	44,36 ^e ± 0,56	46,45 ^g ± 0,52
007-TPA	33,19 ^{de} ± 0,96	44,12 ^d ± 0,84	50,74 ^d ± 0,88	57,09 ^c ± 0,74	60,30 ^c ± 0,83	62,85 ^{de} ± 0,73
008-CPA	39,43 ^{ab} ± 0,81	50,24 ^{bc} ± 0,85	56,87 ^c ± 0,94	61,92 ^b ± 0,87	65,27 ^b ± 0,87	67,34 ^c ± 0,78
011-BPA	31,47 ^{ef} ± 0,56	39,66 ^e ± 0,44	44,36 ^e ± 0,64	49,21 ^d ± 0,25	51,76 ^d ± 0,29	53,85 ^f ± 0,20
012-CPA	36,06 ^{cd} ± 0,80	48,25 ^c ± 0,70	54,82 ^c ± 0,83	60,44 ^b ± 0,74	64,52 ^b ± 0,61	65,93 ^{cd} ± 0,66
013-CPA	31,40 ^e ± 0,51	42,93 ^d ± 0,70	48,82 ^d ± 0,66	54,47 ^c ± 0,36	58,11 ^c ± 0,45	60,29 ^e ± 0,45
014-CPA	42,35 ^a ± 0,47	54,93 ^a ± 0,31	63,55 ^a ± 0,67	68,98 ^a ± 0,52	72,57 ^a ± 0,37	75,32 ^a ± 0,51
015-CPA	28,67 ^{fg} ± 0,51	37,92 ^e ± 0,57	43,62 ^e ± 0,68	49,21 ^d ± 0,22	52,54 ^d ± 0,12	54,45 ^f ± 0,12
BHT	9,98 ⁱ ± 0,39	24,74 ^g ± 0,29	40,30 ^g ± 0,34	55,89 ^c ± 0,36	65,54 ^b ± 0,39	70,96 ^b ± 0,30

Dados expressos como média ± desvio padrão.

Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Tabela 3: Capacidade de seqüestrar radical livre DPPH (%) de antocianinas isoladas de genótipos de acerola e BHT na concentração final de 1,7 µg/ml.

Genótipos	Tempo de reação (min)					
	5	15	30	60	90	120
002-SPE	7,66 ^{defg} ± 0,79	9,76 ^{ef} ± 0,61	10,85 ^f ± 0,70	12,19 ^{efg} ± 0,68	13,17 ^{efg} ± 0,47	13,77 ^{fg} ± 0,58
003-APE	10,60 ^{abc} ± 0,22	14,08 ^a ± 0,32	15,96 ^{ab} ± 0,53	17,73 ^a ± 0,48	18,97 ^{ab} ± 0,69	19,68 ^b ± 0,28
004-RPE	10,31 ^{abc} ± 0,55	12,85 ^{abc} ± 0,33	14,47 ^{bcd} ± 0,26	16,24 ^{abc} ± 0,22	17,37 ^{bc} ± 0,10	18,04 ^{bcd} ± 0,40
005-APE	9,31 ^{abcd} ± 0,38	11,73 ^{bcd} ± 0,21	13,21 ^{cde} ± 0,17	14,69 ^{bc} ± 0,22	15,36 ^{cde} ± 0,30	15,96 ^{def} ± 0,38
006-TPA	5,94 ^g ± 0,68	7,49 ^g ± 0,74	8,85 ^g ± 0,87	10,30 ^g ± 0,71	11,16 ^g ± 0,89	11,94 ^g ± 0,63
007-TPA	8,91 ^{bcde} ± 0,46	11,06 ^{cde} ± 0,62	12,83 ^{de} ± 0,56	14,32 ^{cde} ± 0,69	15,34 ^{de} ± 0,70	16,05 ^{def} ± 0,64
008-CPA	10,70 ^{ab} ± 0,78	13,52 ^{ab} ± 0,80	15,17 ^{abc} ± 0,87	16,73 ^{ab} ± 0,78	17,65 ^{bc} ± 0,88	18,46 ^{bc} ± 0,76
011-BPA	7,08 ^{efg} ± 0,38	10,14 ^{def} ± 0,39	11,45 ^{ef} ± 0,29	12,75 ^{def} ± 0,34	13,93 ^{def} ± 0,30	14,87 ^{efg} ± 0,39
012-CPA	9,24 ^{abcd} ± 0,61	11,84 ^{bcd} ± 0,72	13,06 ^{de} ± 0,80	14,56 ^{cd} ± 0,79	15,50 ^{cd} ± 0,87	16,20 ^{cde} ± 0,71
013-CPA	8,66 ^{cdef} ± 0,80	11,19 ^{cde} ± 0,73	13,03 ^{de} ± 0,84	14,59 ^{bcd} ± 0,93	15,56 ^{cde} ± 0,89	16,35 ^{cde} ± 0,73
014-CPA	11,03 ^a ± 0,30	13,98 ^a ± 0,34	16,60 ^a ± 0,57	17,97 ^a ± 0,61	19,21 ^{ab} ± 0,20	20,05 ^b ± 0,05
015-CPA	6,81 ^{fg} ± 0,27	8,89 ^{fg} ± 0,45	10,14 ^{fg} ± 0,32	11,18 ^{fg} ± 0,47	11,79 ^{fg} ± 0,37	12,76 ^g ± 0,44
BHT	3,12 ^h ± 0,26	7,27 ^g ± 0,16	11,86 ^{ef} ± 0,20	17,44 ^a ± 0,23	20,94 ^a ± 0,27	23,24 ^a ± 0,17

Dados expressos como média ± desvio padrão.

Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Comparação entre os métodos

Vários métodos têm sido utilizados para monitorar e determinar a atividade antioxidante em alimentos e em sistemas biológicos. De acordo com Sánchez-Moreno (2002), os testes podem ser classificados em dois grupos: os que avaliam a peroxidação medindo o grau de inibição da oxidação, e os que avaliam a capacidade de seqüestrar radicais livres, como por exemplo, o da oxidação acoplada do β -caroteno/ácido linoléico e o uso do reagente DPPH, respectivamente.

Os resultados obtidos neste estudo por meio do sistema β -caroteno/ácido linoléico indicam que este teste não é o mais apropriado para a avaliação da atividade antioxidante das antocianinas, uma vez que as condições empregadas, de alta temperatura e suprimento de oxigênio para acelerar a reação, proporcionam a ocorrência de indesejáveis alterações no composto estudado. Em contraposição, o método que utiliza o DPPH apresenta a vantagem de não empregar temperatura elevada e de ser conduzido em ausência de oxigênio e luz, fatores que afetam drasticamente a estabilidade das antocianinas (MARKAKIS, 1982).

Essas considerações explicam a divergência encontrada em função da metodologia. Além disso, Koleva et al. (2002), também, constataram que a mesma amostra pode exibir diferentes valores de atividade antioxidante dependendo do parâmetro avaliado. Não obstante estas considerações, fica demonstrado, neste estudo, que todas as antocianinas isoladas dos genótipos de acerola exibem propriedade antioxidante e que esses compostos possuem um forte potencial de seqüestrar radical livre.

A avaliação quantitativa das antocianinas da polpa de acerola, realizada na etapa inicial desta pesquisa, demonstrou que, nos genótipos estudados, o teor deste pigmento variou de 64,65 mg 100g⁻¹ a 6,45 mg 100g⁻¹, apresentados pelos genótipos 008-CPA e 002-SPE, respectivamente (dados não publicados). Considerando que quantidades equânimes

de antocianinas isoladas foram utilizadas nos dois métodos empregados e que os genótipos diferem entre si quanto à quantidade do teor destes pigmentos, o 008-CPA apresenta um maior potencial antioxidante.

CONCLUSÕES

Extração em fase sólida, com o uso de cartuchos Sep-Pak C₁₈, e o procedimento descrito neste estudo para remover o ácido ascórbico dos extratos aquosos de antocianinas de acerola, propiciaram a exclusão deste ácido e, conseqüentemente, sua influência sobre os resultados. A utilização de mais de um método para avaliar a ação antioxidante das antocianinas demonstrou que estes compostos apresentam maior habilidade de agirem como seqüestradores de radical livre. Dos genótipos estudados, o 008-CPA pelo elevado teor de antocianinas totais, apresenta maior potencial antioxidante por ambos os métodos utilizados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-SAIKHAN, M.S.; HOWARD, L.R.; MILLER Jr., J.C. Antioxidant activity and total phenolics in different genotypes of potato (*Solanum tuberosum*, L). **Journal of Food Science**, v.60, p.341-343, 1995.

ALVES, R.E.; CHITARRA, A.B.; CHITARRA, M.I.F. Postharvest physiology of acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) fruits: maturation changes, respiratory activity and refrigerated storage at ambient and modified atmospheres. **Acta Horticulturae**, v.370, p.223-229, 1995.

AMAKURA, Y.;UMINO, Y.; TSUJI, S.; TONOGAI, Y. Influence of jam processing on the radical scavenging activity and phenolic content in berries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.6292-6297, 2000.

AMES, B.N.; SHIGENAGA, M.K.; HAGEN, T.M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proceedings of National Academy of Sciences USA**, v.90, p.7915-7922, 1993.

AOAC. **Official methods of analysis**. (15th ed.). Arlington: Association of Official Analytical Chemists, 1990.

ASSIS, S.A.; LIMA, D.C.; OLIVEIRA, O.M.M.F. Activity of pectinmethylesterase, pectin content and vitamin C in acerola fruit at various stages of fruit development. **Food Chemistry**, v.74, p.133-137, 2001.

BENVENUTI, S.; PELLATI, F.; MELEGARI, M.; BERTELLI, D. Polyphenols, anthocyanins, ascorbic acid, and radical scavenging activity of *Rubus*, *Ribes* and *Aronia*. **Journal of Food Science**, v.69, p.164-169, 2004.

BERMÚDEZ-SOTO, M.J.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A. Evaluation of commercial red fruit juice concentrates as ingredients for antioxidant functional juices. **European Food Research and Technology**, v.219, p.133-141, 2004.

BONDET V.; BRAND-WILLIAMS W.; BERSET C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, v.30, p.609-615, 1997.

BRAND-WILLIAMS W.; CUVELIER M.E.; BERSET C. Use of a free method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, v.28, p.25-30, 1995.

BURDA, S.; OLESZEK, W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.2774-2779, 2001.

CARDADOR-MARTÍNEZ, A.; LOARCA-PIÑA, G.; OOMAH, B.D. Antioxidant activity in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.6975-6980, 2002.

CHAN Jr., H.T.; YAMAMOTO, H.Y. Kinetics of anthocyanin decomposition in acerola juice. **ASEAN Food Journal**, v.9, p.132-135, 1994.

CHEN J.H.; HO C-T. Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, p.2374-2378, 1997.

CONNOR, A.M.; LUBY, J.J.; TONG, C.B.S.; FINN, C.E.; HANCOCK, J.F.. Genotypic and environmental variation in antioxidant activity among blueberry cultivars. **Acta Horticulturae**, v.574, p.209-213, 2002.

CORDENUNSI, B.R.; GENOVESE, M.I.; NASCIMENTO, J.R.O.; HASSIMOTTO, N.M.A.; SANTOS, R.J.; LAJOLO, F.M. Effects of temperature on the chemical composition and antioxidant activity of three strawberry cultivars. **Food Chemistry**, v.91, p.113-121, 2005.

DEAN, J.R. **Extraction methods for environmental analysis**. Chichester: John Wiley & Sons, 1998.

ESPÍN, J.C.; SOLER-RIVAS, C.; WICHERS, H.J.; GARCÍA-VIGUERA, C. Anthocyanin-based natural colorants: a new source of antiradical activity for foodstuff. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.1588-1592, 2000.

FRANCIS, F.J. Food colorants: anthocyanins. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.28, p.273-314, 1989.

GUERRA, N.B.; MELO, E.A.; MANCINI FILHO, J. Antioxidant compounds from coriander (*Coriandrum sativum* L.) etheric extract. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.18, p.193-199, 2004.

HAMMERSCHMIDT, P.A.; PRATT, D.E. Phenolic antioxidants of dried soybeans. **Journal of Food Science**, v.43, p.556-559, 1978.

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

JOHNSON, P.D. Acerola (*Malpighia glabra* L., *M. puniceifolia* L., *M. emarginata* D.C.): agriculture, production and nutrition. **World Review of Nutrition and Dietetics**, v.91, p.67-75, 2003.

KÄHKÖNEN, M.P.; HEINONEN, M. Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.628-633, 2003.

KÄHKÖNEN, M.P., HEINÄMÄKI, J., OLLILAINEN, V., HEINONEN, M. Berry anthocyanins: isolation, identification and antioxidant activities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.83, p.1403-1411, 2003.

KOLEVA, I.I.; VAN BEEK, T.A.; LINSSEN, J.P.H.; DE GROOT, A.; EVSTATIEVA, L.N. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. **Phytochemical Analysis**, v.13, p.8-12, 2002.

KULISIC, T.; RADONIC, A.; KATALINIC, V.; MILOS, M. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. **Food Chemistry**, v.85, p.633-640, 2004.

LEONG, L.P.;SHUI, G. An investigation of antioxidant capacity of fruit in Singapore markets. **Food Chemistry**, v.76, p.69-75, 2002.

LIMA, V.L.A.G.; MÉLO, E.A.; MACIEL, M.I.S.; LIMA, D.E.S. Avaliação do teor de antocianinas em polpa de acerola congelada proveniente de frutos de 12 diferentes aceroleiras (*Malpighia emarginata* D.C.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, p.101-103, 2003.

MARKAKIS, P. Stability of anthocyanins in foods. In P. Markakis (Ed.). **Anthocyanins as food colors** (pp. 163-180). New York: Academic Press, 1982.

MARCO, G.J. A rapid method for evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v.45, p.594-598, 1968.

MAZZA, G.; MINIATI, E. **Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains**. Florida: CRC Press, INC. 1993. 363p.

MÉLO, E.A.; MANCINI FILHO, J.; GUERRA, N.B.; MACIEL, G.R. Atividade antioxidante de extratos de coentro (*Coriandrum sativum* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23 (supl), p. 195-199, 2003.

MILIAUSKAS G.; VENSKUTONIS P.R.; van BEEK, T.A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. **Food Chemistry**, v.85, p.231-237, 2004.

MOURE A.; FRANCO D.; SINEIRO J.; DOMÍNGUEZ H.; NÚÑEZ M. J.; LEMA J. M. Evaluation of extracts from *Gevuina avellana* hulls as antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.3890-3897, 2000.

MUSSER, R.S.; LEMOS, M.A.; LIMA, V.L.A.G.; MÉLO, E.A.; LEDERMAN, I.E.; SANTOS, V.F. Caracterização físico-química de acerolas do Banco Ativo de Germoplasma em Pernambuco. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, p.556-561, 2004.

NAKAJIMA, J-I.; TANAKA, I.; SEO, S.; YAMAZAKI, M.; SAITO, K. LC/PDA/ESI-MS profiling and radical scavenging activity of anthocyanins in various berries. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v.5, p.241-247, 2004.

OKI, T.; MASUDA, M.; FURUTA, S.; NISHIBA, Y.; TERAHARA, N.; SUDA, I. Involvement of anthocyanins and other phenolic compounds in radical-scavenging activity of purple-fleshed sweet potato cultivars. **Journal of Food Science**, v.67, p.1752-1756, 2002.

RODRIGUEZ-SAONA, L.E.; WROLSTAD, R.E. Extraction, isolation, and purification of anthocyanins. In R.E. Wrolstad, **Current Protocols in Food Analytical Chemistry** (pp.F1 1.1-1.11). New York: John Wiley & Sons, 2001.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J.A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.76, p.270-276, 1998.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science and Technology International**, v.8, p.121-137, 2002.

SAUTÉ-GRACIA, M.T.; HEINONEN, M.; FRANKEL, E.N. Anthocyanins as antioxidants on human low-density lipoprotein and lecithin-liposome systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, p.3362-3367, 1997.

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

STRACK, D.; WRAY, V. The anthocyanins. In J. B. Harborne (Ed.), **The Flavonoids: advances in research since 1986** (pp. 1-22). Boca Raton, FL: Chapman & Hall. 1994.

TAMURA, H.; YAMAGAMI, A. Antioxidant activity of monoacylated anthocyanins isolated from Muscat Bailey A grape. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.42, p.1612-1615, 1994.

TEPE, B.; SOKMEN, M.; AKPULAT, H.A.; SOKMEN, A. In vitro antioxidant activities of the methanol extracts of four *Helichrysum* species from Turkey. **Food Chemistry**, v.90, p.685-689, 2005.

VON GADOW, A.; JOUBERT E.; HANSMANN, C.F. Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea (*Aspalathus linearis*), α -tocoferol, BHT, and BHA. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, p.632-638, 1997.

VELIOGLU, Y.S.; MAZZA, G.; GAO, L.; OOMAH, B.D. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p.4113-4117, 1998.

VENDRAMINI, A.L.; TRUGO, L.C. Chemical composition of acerola fruit (*Malpighia puniceifolia* L.) at three stages of maturity. **Food Chemistry**, v.71, p.195-198, 2000.

VENDRAMINI, A.L.; TRUGO, L.C. Phenolic compounds in acerola fruit (*Malpighia puniceifolia*, L.). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.15, p.664-668, 2004.

VINSON, J.A.; HAO, Y.; SU, X.; ZUBIK, L. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: vegetables. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p.3630-3634, 1998.

WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R.L. Total antioxidant capacity of fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.44, p.701-705, 1996.

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

WANG, S.Y.; STRETCH, A.W. Antioxidant capacity in cranberry is influenced by cultivar and storage temperature. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.969-974, 2001.

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados desta pesquisa, nas condições em que foram obtidos, permitem concluir que:

- as polpas dos genótipos apresentaram uma ampla variação no teor de antocianinas totais e diferenças significativas quanto aos parâmetros de cor;
- embora a concentração destes pigmentos reflita sobre as características cromáticas das polpas, apenas esta quantificação não é suficiente para caracterizá-la devido à interferência da intensidade do componente amarelo (b^*) na sua avaliação;
- o perfil antociânico sugere a ocorrência de diferentes graus de glicosilação e ausência de ácidos acilados nas moléculas das antocianinas e que apenas duas agliconas, cianidina e pelargonidina, em diferenciadas proporções, encontram-se presentes nos genótipos estudados;
- independentemente do método utilizado, as antocianinas isoladas de todos os genótipos de acerola exibiram atividade antioxidante e habilidade de agirem como sequestradoras de radical livre e que dentre os genótipos estudados, o 008-CPA pelo elevado teor de antocianinas totais, apresenta maior potencial antioxidante por ambos os métodos utilizados.