



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS
Área de Concentração: Ciência de Alimentos



**AVALIAÇÃO DA TERMOESTABILIDADE DO β -CAROTENO NA PRESENÇA DOS
EXTRATOS ETANÓLICO E METANÓLICO DE JENIPAPO E DA SOLUÇÃO DE
GENIPINA**

Autora: Jéssica Souza Ribeiro

Orientador: Prof. Dr. Marcondes Viana da Silva

ITAPETINGA
BAHIA - BRASIL
Fevereiro de 2017

JÉSSICA SOUZA RIBEIRO

**AVALIAÇÃO DA TERMOESTABILIDADE DO β -CAROTENO NA PRESENÇA DOS
EXTRATOS ETANÓLICO E METANÓLICO DE JENIPAPO E DA SOLUÇÃO DE
GENIPINA**

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

Orientador: Prof. Dr. Marcondes Viana da Silva

Área de Concentração: Ciência de Alimentos

ITAPETINGA
BAHIA - BRASIL
Fevereiro de 2017

634.7 Ribeiro, Jéssica Souza
R369a Avaliação da termoestabilidade do β -caroteno na presença dos extratos etanólico e metanólico de jenipapo e da solução de genipina. / Jéssica Souza Ribeiro. - Itapetinga: UESB, 2017.
67p.

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Sob a orientação do Prof. D.Sc. Marcondes Viana da Silva.

5.

1. Extratos de jenipapo - Estabilidade térmica. 2. Genipina – Geniposídeo - Carotenoides. 3. Aditivos alimentares naturais. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos. II. Silva, Marcondes Viana da. III. Título.

CDD(21): **634.7**

Catálogo na fonte:

Adalice Gustavo da Silva – CRB/5-535

Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para Desdobramento por Assunto:

1. Extratos de jenipapo - Estabilidade térmica.
2. Genipina – Geniposídeo - Carotenoides
3. Aditivos alimentares naturais



Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
Programa de Pós-Graduação
Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos



Áreas de Concentração: Engenharia de Alimentos
Ciência de Alimentos

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: "AVALIAÇÃO DA TERMOESTABILIDADE DO β -CAROTENO NA PRESENÇA DOS EXTRATOS ETANÓLICO E METANÓLICO DE JENIPAPO E DA SOLUÇÃO DE GENIPINA"

Autor (a): JÉSSICA SOUZA RIBEIRO

Orientador (a): Prof.^o Dr. Marcondes Viana da Silva

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de **MESTRE EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CIÊNCIA DE ALIMENTOS**, pela Banca Examinadora.

Prof.^o Dr. Marcondes Viana da Silva (UESB)

Prof.^a Dr.^a Andréa Gomes da Silva (UESB)

Prof.^a Dr.^a Márcia Elena Zanuto (UFBA)

Itapetinga-BA, 21 de fevereiro de 2017.

O que é excesso para uns é fome para outros. Alguns desperdiçam alimentos finos porque não têm como digeri-los: não nasceram para ocupações elevadas e não estão acostumados a elas.

Baltasar Gracián y Morales – A Arte da Prudência

À minha mãe (*in memoriam*), Lurdes, e ao meu pai, Wilson, que sempre se esforçaram ao máximo para promover aos filhos as oportunidades que eles não tiveram...

Aos meus irmãos, Aliny e Israel, que sempre me incentivaram e apoiaram ao longo dessa caminhada...

Aos meus mestres, em especial ao professor Marcondes Viana e à professora Márcia Zanuto, que promoveram a construção desse conhecimento de forma tão comprometida...

...DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por Sua fidelidade, graça e infinita misericórdia;

Sou grata aos meus pais, Wilson e Lurdes (*in memoriam*), pelo carinho, pelo esforço, pelo ensinamento através do exemplo, por me mostrarem que não se consegue nada sem lutar, por me fazerem ser quem eu sou;

Aos meus irmãos, Aliny e Israel, que sempre me apoiaram de forma muito especial;

Agradeço à professora Dra. Márcia Elena Zanuto, por todo o incentivo que sempre me deu para seguir a carreira acadêmica;

Agradeço ao meu orientador, professor Dr. Marcondes Viana da Silva, que acreditou na proposta e possibilitou o desenvolvimento deste trabalho;

Aos colegas do Núcleo de Estudos em Ciência de Alimentos – NECAL, especialmente a Hanna e a Ingridy, que sempre me auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho;

Agradeço à professora Dra. Simone Andrade Gualberto e aos colegas do Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais - LAPRON, especialmente a Marcel, Quirlian e Cléia, pela generosidade e disponibilidade em nos auxiliar em todos os sentidos;

Ao Instituto Multidisciplinar em Saúde da Universidade Federal da Bahia – IMS/UFBA, em especial às professoras Dra. Márcia Zanuto e Dra. Cassiara Camelo, aos professores Me. Daniel Tapia e Dr. Anderson Souza e aos colegas Guilherme Andrade, Larissa Donato e Náthila Lobo, por todo o suporte nas análises físicas e de composição centesimal desse estudo;

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, pela oportunidade de seguir em minha formação acadêmica;

Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos e aos docentes que a ele pertencem, por promoverem a construção desse conhecimento na área de Ciência de Alimentos;

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia – IFBA, pela bolsa concedida e por possibilitar e apoiar minha qualificação;

E agradeço aos meus amigos, colegas e alunos, que estão sempre ao meu lado, me incentivando a me desenvolver espiritual e intelectualmente.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	ix
RESUMO.....	x
SUMMARY	xi
I. REFERENCIAL TEÓRICO.....	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Bioquímica dos carotenoides e do betacaroteno.....	2
2.2 Reações de oxidação.....	4
2.3 Compostos antioxidantes	6
2.4 Capacidade pró e antioxidante dos carotenoides	7
2.5 Capacidade cromófora dos carotenoides	8
2.6 Estabilidade dos carotenoides	10
2.7 Distribuição geográfica e caracterização do jenipapeiro (Genipa americana L.).....	10
2.8 Principais fitoquímicos presentes em jenipapo (Genipa americana L.).....	13
2.9 Aditivos naturais em alimentos, genipósídeo e carotenoides	15
II. OBJETIVOS	16
1. Objetivo Geral	16
2. Objetivos Específicos.....	16
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
1. Aquisição e preparo da amostra	17
2. Secagem.....	17
3. Caracterização física, química e físico-química do fruto de jenipapo.....	17
3.1 Determinação de Sólidos Solúveis Totais.....	18

3.2	Determinação da Acidez Titulável.....	18
3.3	Determinação do pH	18
3.4	Determinação da Umidade.....	18
3.5	Determinação das Cinzas	19
3.6	Determinação dos Lipídeos Totais	19
3.7	Determinação de Proteínas	19
3.8	Determinação dos Carboidratos.....	20
3.9	Determinação da Fibra Bruta.....	20
3.10	Determinação de Minerais	20
3.11	Determinação de Vitamina C.....	21
3.12	Determinação dos Carotenoides Totais	21
3.13	Obtenção dos Extratos e Preparo da Solução de Genipina.....	23
3.14	Polifenóis Totais	23
4.	Capacidade antioxidante dos frutos de jenipapo	25
4.1	Sistema Modelo β -Caroteno-Ácido Linoleico	25
4.2	Ensaio de Captura de Radicais DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)	26
5.	Avaliação da Termoestabilidade do β-caroteno e sua Proteção pelos Extratos de Jenipapo e pela Genipina	28
6.	Análise dos Dados.....	28
IV.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
1.	Caracterização físico-química do fruto do jenipapeiro	29
2.	Capacidade antioxidante dos frutos de jenipapo	35
3.	Avaliação da termoestabilidade do β -caroteno na presença dos extratos etanólico e metanólico de jenipapo e da solução de genipina	40
V.	CONCLUSÕES	48
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química de alguns carotenoides.	2
Figura 2 - Etapas finais da biossíntese de carotenoides.....	3
Figura 3 - Esquema geral do mecanismo de oxidação lipídica.	4
Figura 4 - Mecanismo de ação de antioxidantes primários.	7
Figura 5 - Supressão do oxigênio singlete por carotenoides.	8
Figura 6 - Mecanismo de ação antioxidante do β -caroteno.....	8
Figura 7 - Fruto maduro de jenipapo (<i>Genipa americana</i> L.).....	11
Figura 8 - Iridóides presentes em jenipapo (<i>Genipa americana</i> L.).....	13
Figura 9 - Isopreno e compostos derivados.	14
Figura 10 - Estrutura química da genipina e do geniposídeo.	14
Figura 11: Extração de carotenoides de jenipapo maduro.....	22
Figura 12: Preparo dos extratos de jenipapo maduro.	23
Figura 13 - Curva e equação utilizadas para a determinação dos constituintes fenólicos em jenipapo maduro.	34
Figura 14 - Curva e equação utilizadas para a determinação da EC50	36
Figura 15 - Atividade antioxidante dos extratos de jenipapo liofilizado e seco em estufa ao longo do tempo.	38
Figura 16 - Correlação entre o teor de constituintes fenólicos e a atividade antioxidante de jenipapo.	39
Figura 17 - Percentual de oxidação do betacaroteno + extrato metanólico de jenipapo liofilizado em relação à oxidação do controle.	42
Figura 18 - Percentual de oxidação do betacaroteno + extrato metanólico de jenipapo seco em estufa em relação à oxidação do controle.	42
Figura 19 - Percentual de oxidação do betacaroteno + extrato etanólico de jenipapo liofilizado em relação à oxidação do controle.	43
Figura 20 - Percentual de oxidação do betacaroteno + extrato etanólico de jenipapo seco em estufa em relação à oxidação do controle.	43

Figura 21 - Percentual de oxidação do betacaroteno + genipina em metanol em relação à oxidação do controle.....	44
Figura 22 - Oxidação do betacaroteno a 30°C frente aos diversos extratos	44
Figura 23 - Oxidação do betacaroteno a 60°C frente aos diversos extratos	45
Figura 24 - Oxidação do betacaroteno a 90°C frente aos diversos extratos	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Mecanismos dos diversos tipos de oxidação lipídica nos alimentos.....	5
Tabela 2 - Classificação dos compostos antioxidantes.....	6
Tabela 3 - Dados de absorção no ultravioleta/visível para carotenoides comuns em alimentos.	9
Tabela 4 - Estabilidade do β -caroteno e do retinol em diversas condições.....	10
Tabela 5 - Caracterização físico-química do fruto de jenipapo.....	12
Tabela 6 - Composição nutricional do fruto de jenipapo.	12
Tabela 7 – Valores médios da caracterização física e físico-química do fruto do jenipapeiro no estágio de maturação maduro (Vitória da Conquista - BA, 2015).	29
Tabela 8 - Composição centesimal do fruto de jenipapo maduro (Vitória da Conquista - BA, 2015).....	30
Tabela 9 - Análise de variância (ANOVA) do teor de carotenoides de jenipapo liofilizado obtidos de acordo com o método de extração.....	33
Tabela 10 - Teor de fenólicos totais e taninos no fruto de jenipapo in natura (extrato aquoso).35	
Tabela 11 - Teor de fenólicos totais nos extratos metanólico e etanólico do fruto de jenipapo liofilizado e seco em estufa.	35
Tabela 12 - Capacidade antioxidante dos extratos de jenipapo in natura.....	36
Tabela 13 - Atividade antioxidante dos extratos de jenipapo liofilizado e seco em estufa.	37
Tabela 14 - Percentual de oxidação do β -caroteno frente aos diversos tratamentos.	41
Tabela 15 - Análise de variância do percentual de oxidação do betacaroteno em relação à oxidação do controle.....	46

RESUMO

RIBEIRO, Jéssica Souza. **Avaliação da termoestabilidade do β -caroteno na presença dos extratos etanólico e metanólico de jenipapo e da solução de genipina.** Itapetinga, BA: UESB, 2017. 67 p. Dissertação. (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos).*

É crescente a procura por aditivos naturais pela indústria de alimentos como resposta a um mercado cada vez mais exigente quanto ao apelo do que remete ao natural, além da preocupação relacionada aos riscos à saúde que alguns aditivos artificiais representam. Um grupo de compostos que pode ser utilizado pela indústria com função de corante e que ainda possuem atividade antioxidante é representado pelos carotenoides, com destaque para o β -caroteno. Entretanto, estes compostos se degradam durante o processamento e armazenamento, gerando perda de cor, sendo esta uma limitação do seu uso em escala industrial. Neste trabalho, foi avaliado o efeito de extratos do fruto maduro de jenipapo (*Genipa americana* L.) e de uma solução-padrão de genipina sobre a degradação do β -caroteno submetido a diferentes temperaturas e tempos de tratamento térmico. Para tanto, foram realizadas a caracterização física, química e físico-química, a avaliação da capacidade antioxidante e a determinação do percentual de oxidação do betacaroteno em diferentes temperaturas (30°C, 60°C e 90°C) e tempos de tratamento (30 minutos, 60 minutos e 90 minutos), na presença de extratos metanólicos e etanólicos de frutos de jenipapo maduro liofilizado e seco em estufa e da solução de genipina comercial. Observou-se que, para todos os extratos e para a genipina, quanto maior a temperatura e o tempo de tratamento, maior o percentual de oxidação do β -caroteno. Não foi encontrada diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$), não sendo observada atividade protetora contra a oxidação do β -caroteno em alta temperatura em nenhum deles. São necessários mais estudos para a determinação do binômio tempo x temperatura ideal para o tratamento térmico de produtos cuja cor é proveniente de carotenoides, de modo a reduzir perdas de qualidade sensorial e viabilizar a expansão de sua utilização em escala industrial, possibilitando a redução da utilização de corantes artificiais.

Palavras-chave: genipina; geniposídeo; carotenoides; aditivos alimentares naturais; estabilidade térmica.

* Orientador: Dr. Marcondes Viana da Silva, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB.

SUMMARY

RIBEIRO, Jéssica Souza. **Evaluation of thermostability of β -carotene in the presence of the ethanolic and methanolic extracts of genipap and the genipine solution.** Itapetinga, BA: UESB, 2017. 67 p. Dissertação. (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos).*

The demand for natural additives by the food industry is increasing as a response to a market that is increasingly demanding as to the appeal of what it brings to the natural, as well as the concern related to the health risks that some artificial additives represent. A group of compounds that can be used by the industry with dye function and still has antioxidant activity is represented by carotenoids, especially β -carotene. However, these compounds degrade during processing and store, generating color loss, which is a limitation of their use on an industrial scale. In this work, the effect of extracts of the mature fruit of genipina (*Genipa americana* L.) and of a standard solution of genipine on a degradation of β -carotene submitted to different temperatures (30°C, 60°C and 90°C) and times (30 minutes, 60 minutes and 90 minutes) of treatment were evaluated the evaluation of the antioxidant capacity and determination of the oxidation of beta-carotene at different temperatures and times in the presence of methanolic and ethanolic extracts of fruits mature of genipap lyophilized and dried and commercial genipine solution. It was observed that, for all extracts and for genipine, the higher the temperature and the treatment time, the greater or lesser oxidation of β -carotene. No significant difference was found between treatments ($p < 0.05$), and no protective activity was observed against high-temperature oxidation of β -carotene in any of them. Further studies are needed to determine the ideal time x temperature for the treatment of the products with their origin of carotenoids, in order to reduce the lost sensorial quality and to make possible an expansion of their use in industrial scale, allowing a reduction of the use of artificial colors.

Keywords: genipin; geniposide; carotenoids; natural food additives; thermal stability.

* Orientador: Dr. Marcondes Viana da Silva, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB.

I. REFERENCIAL TEÓRICO

1. INTRODUÇÃO

Diversos estudos indicam que existem riscos potenciais decorrentes do consumo de corantes artificiais. Dentre estes corantes, estão aqueles responsáveis por conferir coloração amarela aos alimentos, como a tartrazina. Pesquisas apontam que os corantes artificiais são os aditivos alimentares mais genotóxicos e que o consumo de tartrazina está associado ao desenvolvimento de urticária, asma, náusea, eczema, bronquite, renite, broncoespasmos, cefaleia, redução da coagulação sanguínea e possível associação com hiperatividade e aumento da excreção urinária de ferro e zinco em crianças. Por conta disso, cresce o interesse pela substituição deste e de outros corantes artificiais por alternativas naturais (PRADO e GODOY, 2003; FREITAS, 2012).

É crescente a procura por aditivos alimentares de fontes naturais que gerem menores riscos e que possuam funcionalidades para a saúde pela indústria de alimentos, em resposta a uma exigência do mercado consumidor. Dentre estes aditivos, podem ser citados os carotenoides, que além de atuarem como corantes ainda possuem ação antioxidante e podem ser precursores da vitamina A.

Apesar dos benefícios à saúde que os carotenoides fornecem e de estes compostos conferirem coloração intensa aos alimentos a que são adicionados, a utilização destes compostos pela indústria alimentícia têm como limitação o fato deles se degradarem durante o processamento térmico, durante o armazenamento e em presença de luz, o que leva à perda de qualidade sensorial e nutricional do produto. Este fenômeno foi observado em diversos alimentos onde os carotenoides são encontrados naturalmente, como frutas, hortaliças e seus derivados, como sucos e óleos, sendo agravado pelos processamentos como secagem solar, secagem em estufa de circulação de ar forçado, irradiação e fritura. Neste sentido, para que sejam utilizados pela indústria de alimentos com função de corante sem que haja perda de qualidade durante o processamento ou armazenamento é necessário que seja adicionado um outro composto antioxidante que os proteja (LIMA et al., 2001; BELÉN-CAMACHO et al., 2007; RODRIGUES et al., 2013).

Um possível composto a ser utilizado para a preservação dos carotenoides é o geniposídeo, um iridoide encontrado nos frutos maduros de jenipapo (*Genipa americana* L.). Este composto foi isolado por Ueda e Iwahashi (1991) e há diversos estudos que mostram que o mesmo possui atividade antioxidante, tendo sido observados diversos estudos com finalidade terapêutica. Entretanto, nas fontes pesquisadas (bases de dados: Science Direct e

SciELO, 1960 a 2015), não foram encontrados estudos com sua utilização como antioxidante em alimentos ou para a preservação de carotenoides (WANG et al., 1992; LIAW e CHAO, 2001; KANG et al., 2012).

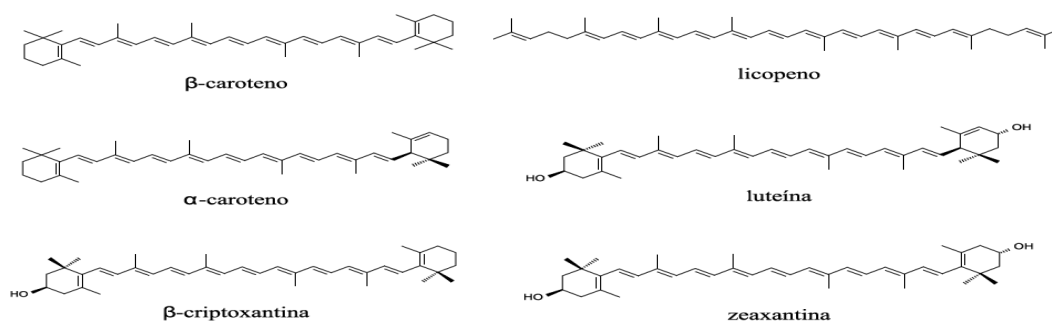
Neste trabalho, foi realizada a avaliação dos extratos metanólico e etanólico de frutos de jenipapo maduro (*Genipa americana* L.) liofilizados e secos em estufa sobre a termoestabilidade do betacaroteno para estimar sua potencial utilização em produtos alimentícios.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Bioquímica dos carotenoides e do betacaroteno

Os carotenoides (Figura 1) são compostos tetraterpenoides, pois são formados pela união de oito unidades isoprenoides, possuindo uma longa cadeia de ligações duplas conjugadas que formam um sistema cromóforo, o que lhe confere a característica de pigmento de coloração variável entre amarelo, laranja e vermelho, presente em vários alimentos. Diversas alterações em sua estrutura molecular primária, como ciclização, hidrogenação, desidrogenação, introdução de grupos contendo oxigênio, rearranjos, encurtamento de cadeias ou combinações dessas modificações, resultam numa imensa variedade de moléculas pertencentes a este grupo, de modo que mais de 650 carotenoides já foram isolados e caracterizados, desconsiderando os isômeros cis e trans, e cerca de 100 destes já foram identificados em alimentos. Os carotenoides β -caroteno (β,β - caroteno), α -caroteno (β,ϵ - caroteno), β -criptoxantina (β, β -caroten-3-ol), licopeno (ψ,ψ -caroteno), luteína (β,ϵ - caroteno-3,3'-diol) e zeaxantina (β,β - caroteno-3,3'-diol) são os mais largamente pesquisados, por conta de suas funcionalidades biológicas e por serem os mais encontrados nos alimentos, com exceção da zeaxantina, sendo o betacaroteno o mais amplamente distribuído (RODRIGUEZ-AMAYA, KIMURA e AMAYA-FARFAN, 2008).

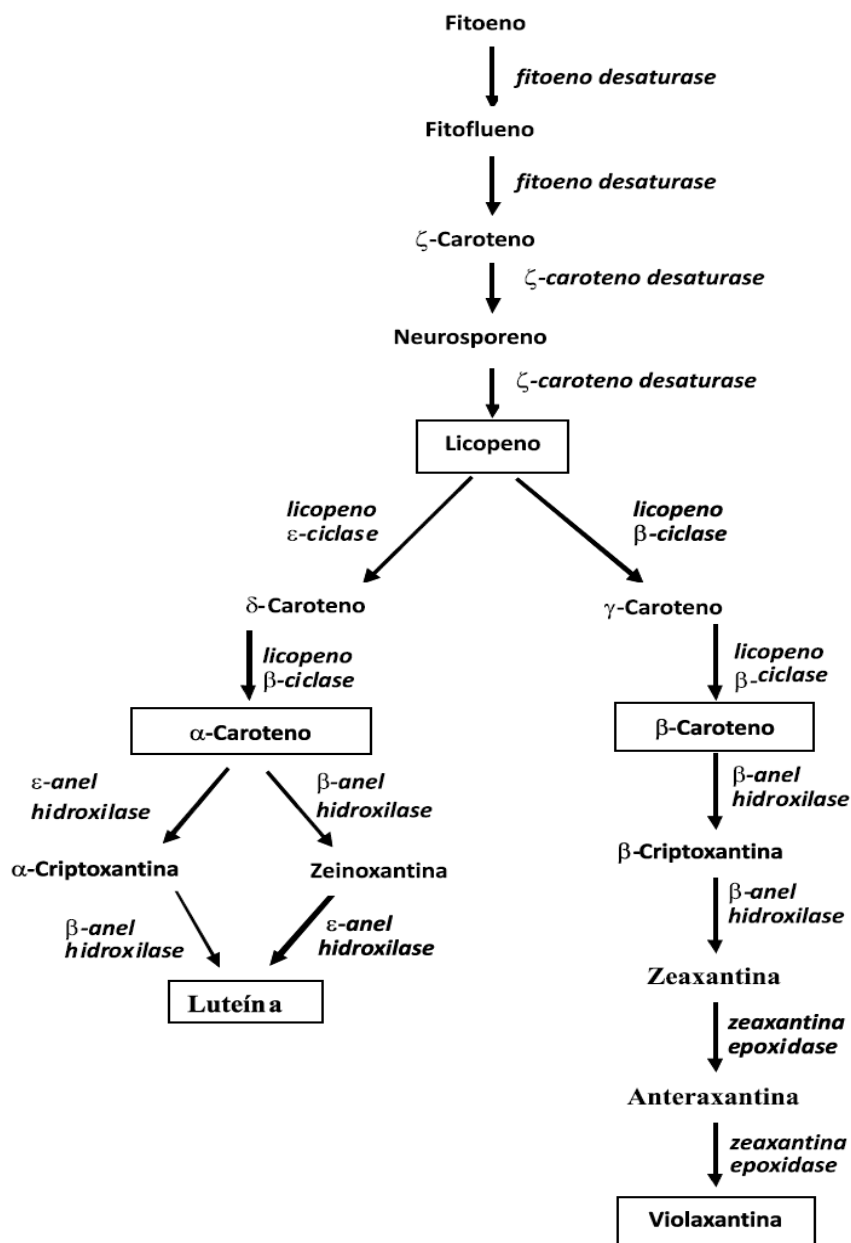
Figura 1 - Estrutura química de alguns carotenoides.



Fonte: RODRIGUEZ-AMAYA, KIMURA e AMAYA-FARFAN, 2008.

A via biossintética dos carotenoides inicia-se com um precursor primário, o acetato (C2), que rege a via da biogênese de esteróis e origina unidades isoprenoides ativas (isopentenil-pirofosfato (C5), geranyl-pirofosfato (C10), farnesil-pirofosfato (C15), geranyl-geranyl-pirofosfato (C20) e fitoeno (C40)). A partir desse ponto, por meio de reações de desidrogenação (com formação de insaturações na cadeia de carbonos) e de posterior ciclização, em alguns casos, dá-se origem aos principais carotenoides encontrados nos alimentos. As etapas finais desta reação são apresentadas na Figura 2 (VILLELA et al. *apud* MORAIS, 2006; RODRIGUEZ-AMAYA, KIMURA e AMAYA-FARFAN, 2008).

Figura 2 - Etapas finais da biossíntese de carotenoides.



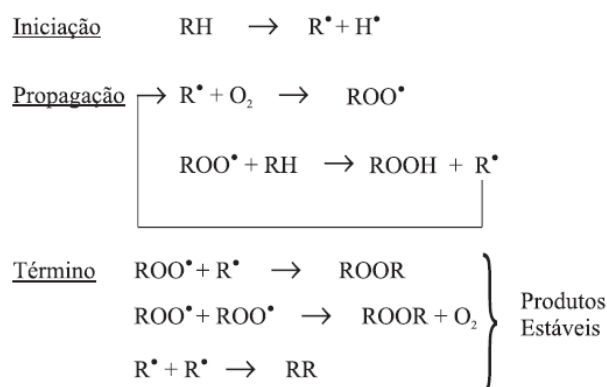
Fonte: RODRIGUEZ-AMAYA, KIMURA e AMAYA-FARFAN, 2008.

O β -caroteno, o α -caroteno e a β -criptoxantina são pró-vitaminas A, pois suas moléculas possuem um anel- β não substituído seguido por uma cadeia poliênica de 11 carbonos. Como no β -caroteno essa situação ocorre duas vezes, esse carotenoide é o com maior atividade de pró-vitamina A, pois sua molécula pode dar origem a duas moléculas de retinol (vitamina A), enquanto que o α -caroteno e a β -criptoxantina têm cerca de 50% da atividade do β -caroteno, por darem origem a apenas uma molécula de retinol, e a luteína, a zeaxantina e o licopeno não possuem essa atividade. A conversão destes carotenoides em retinol ocorre *in vivo* após a ingestão de alimentos que os contenham. Dessa forma, diversos aspectos relacionados ao estado nutricional do indivíduo e à biodisponibilidade (digestibilidade, absorção, transporte e metabolismo) podem interferir na reprodutibilidade da utilização de fatores de conversão de carotenoide em retinol, que devem ser utilizados apenas como estimativas (CAMPOS e ROSADO, 2005; RODRIGUEZ-AMAYA, KIMURA e AMAYA-FARFAN, 2008).

2.2 Reações de oxidação

A oxidação é responsável pela perda de qualidade em diversos alimentos, promovendo alterações de cor, sabor e aroma. Os principais compostos que sofrem processos oxidativos em alimentos são os lipídeos, as proteínas e os pigmentos. A oxidação lipídica é a mais estudada, devido ao grande impacto da perda de qualidade gerada por esta, e os seus diversos mecanismos são apresentados na Tabela 1. Na Figura 3, é apresentado o esquema geral das reações de oxidação lipídica (rancidez oxidativa), mais proeminente em ácidos graxos insaturados (RAMALHO e JORGE, 2006; RIBEIRO e SERAVALLI, 2007).

Figura 3 - Esquema geral do mecanismo de oxidação lipídica.



onde: RH - Ácido graxo insaturado; R^{\bullet} - Radical livre;
 ROO^{\bullet} - Radical peróxido e ROOH - Hidroperóxido

Fonte: RAMALHO e JORGE, 2006.

Tabela 1 - Mecanismos dos diversos tipos de oxidação lipídica nos alimentos.

Tipo de oxidação	Mecanismo de Ação
<i>Reações hidrolíticas</i>	Catalisadas pelas enzimas do grupo das lipases ou pela ação de calor e umidade, com formação de ácidos graxos livres.
<i>Oxidação enzimática</i>	Ocorre pela ação das enzimas lipoxigenases, que atuam sobre os ácidos graxos poli-insaturados catalisando a adição de oxigênio à cadeia poli-insaturada de hidrocarboneto; resulta na formação de peróxidos e hidroperóxidos com duplas ligações conjugadas que podem envolver-se em diferentes reações degradativas.
<i>Fotoxidação</i>	Ocorre em lipídeos insaturados, sendo promovido essencialmente pela radiação ultravioleta em presença de compostos fotossensibilizadores (como clorofila, mioglobina, riboflavina, entre outros), que absorvem a energia luminosa de comprimento de onda na faixa do visível e a transferem para o oxigênio triplete (3O_2), gerando o estado singlete (1O_2), que reage diretamente com as ligações duplas do lipídeo por adição, formando hidroperóxidos diferentes dos formados na ausência de luz e de sensibilizadores, e que por degradação posterior originam aldeídos, álcoois e hidrocarbonetos.
<i>Autoxidação</i>	Principal mecanismo de oxidação dos óleos e gorduras, caracterizado por uma sequência de reações apresentadas na Figura 3. É um processo que pode ser demonstrado em três etapas: <p>Iniciação: em condições favoráveis de luz e calor, ocorre a formação dos radicais livres do ácido graxo devido à retirada de um hidrogênio do carbono alílico na molécula do ácido graxo.</p> <p>Propagação: os radicais livres, susceptíveis ao ataque do oxigênio atmosférico, são convertidos em outros radicais, surgindo os produtos primários de oxidação (peróxidos e hidroperóxidos) cuja estrutura depende da natureza dos ácidos graxos presentes; os radicais livres formados atuam como propagadores da reação, resultando em um processo autocatalítico.</p> <p>Término: ocorre a união de radicais livres com formação de produtos estáveis (produtos secundários de oxidação) obtidos por cisão e rearranjo dos peróxidos (epóxidos, compostos voláteis e não voláteis).</p>

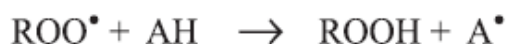
2.3 Compostos antioxidantes

Os compostos antioxidantes atuam na inibição da oxidação de ácidos nucleicos, proteínas, pigmentos e, principalmente, lipídeos, sendo classificados em duas categorias: 1) antioxidantes de quebra de cadeia, que atuam na etapa de propagação radicalar (como fenóis e aminas aromáticas) e 2) antioxidantes preventivos, que atuam na etapa de iniciação do processo radicalar (como as enzimas peroxidase e catalase). Atualmente, a classificação mais usual dos antioxidantes os subdivide em: primários, sinergistas, removedores de oxigênio, biológicos, agentes quelantes e antioxidantes mistos. A descrição de cada uma dessas denominações é apresentada na Tabela 2 (CARDOSO, 1997; RAMALHO e JORGE, 2006).

Tabela 2 - Classificação dos compostos antioxidantes.

Classificação	Mecanismo de Ação
<i>Primários</i>	São compostos fenólicos que removem ou inativam os radicais livres formados durante a iniciação ou propagação da reação, através da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia, conforme demonstrado na Figura 4; o hidrogênio do composto antioxidante é abstraído pelo radical livre com maior facilidade do que o hidrogênio alílico da molécula insaturada a ser protegida (como um lipídeo insaturado), e a espécie formada pelo antioxidante é um radical inerte estabilizado por ressonância, que interrompe a reação em cadeia por não ser capaz de iniciar ou propagar tal reação oxidativa.
<i>Sinergistas</i>	São compostos com pouca ou nenhuma atividade antioxidante quando utilizados isoladamente, mas que podem maximizar a atividade dos antioxidantes primários quando usados em combinação adequada com eles.
<i>Removedores de oxigênio</i>	São compostos capturam o oxigênio presente no meio através de reações químicas estáveis tornando-os indisponíveis para atuarem como propagadores da autoxidação.
<i>Biológicos</i>	Diversas enzimas, como glucose oxidase, superóxido dismutase e catalases, que podem remover o oxigênio ou compostos altamente reativos de um sistema alimentício.
<i>Agentes quelantes</i>	Também conhecidos como sequestrantes, complexam íons metálicos, principalmente cobre e ferro, que catalisam a oxidação lipídica.
<i>Mistos</i>	São diversos compostos vegetais e animais que têm sido amplamente estudados como antioxidantes em alimentos, representados por proteínas hidrolisadas, flavonoides e derivados do ácido cinâmico, por exemplo.

Figura 4 - Mecanismo de ação de antioxidantes primários.



onde: ROO^\bullet e R^\bullet - radicais livres; AH - antioxidante com um átomo de hidrogênio ativo e A^\bullet - radical inerte

Fonte: RAMALHO e JORGE, 2006.

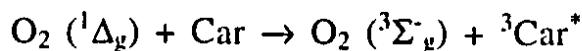
2.4 Capacidade pró e antioxidante dos carotenoides

Os carotenoides podem atuar tanto como compostos pró-oxidantes quanto antioxidantes, seja através da sensibilização ou supressão de espécies reativas de oxigênio (EROs), como o oxigênio singlete, ou pela sua capacidade de estabilizar radicais livres ou promover sua formação. Um carotenoide pode produzir oxigênio singlete sempre que esse composto estiver na forma triplete e a reação for termodinamicamente favorável (a energia do carotenoide triplete for maior ou igual à do oxigênio singlete). Já a produção de radicais livres pelos carotenoides ocorre em condições de alta pressão de oxigênio, onde esses compostos se tornam pró-oxidantes e ocorrem reações autocatalíticas (CARDOSO, 1997).

A função antioxidante dos carotenoides se relaciona tanto à sua capacidade de suprimir oxigênio singlete quanto de estabilizar radicais livres. A supressão do oxigênio singlete pelos carotenoides (Figura 5) ocorre através da transferência de energia do oxigênio singlete para o carotenoide, que assumirá o estado triplete de mais baixa energia, e este será desativado pelo decaimento ao estado fundamental. A capacidade de supressão do oxigênio singlete é diretamente proporcional ao número de duplas ligações conjugadas na cadeia de hidrocarboneto do carotenoide; dentre os carotenoides com 11 ligações duplas conjugadas (como β -caroteno, licopeno, cantaxantina, astaxantina e zeaxantina), o licopeno apresenta maior capacidade de supressão. Quanto à capacidade de inativação de radicais livres, os carotenoides são classificados como antioxidantes biológicos, apesar de não enzimáticos, pois esses compostos não atuam na iniciação nem na propagação da reação em cadeia da forma descrita para os antioxidantes convencionais. Um modelo de mecanismo de ação antioxidante do β -caroteno (Figura 6) sugere que a adição de um radical ROO^\bullet e, possivelmente, também de um radical R^\bullet ao sistema conjugado do β -caroteno promove a formação de um radical inibidor, carbono-centrado e estabilizado por ressonância e determinante de sua capacidade

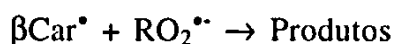
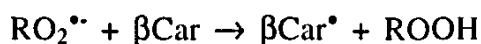
antioxidante; entretanto, em alta pressão de oxigênio, este radical reage rapidamente com o oxigênio, produzindo um radical peroxila carreador de cadeia e promotor de oxidação (CARDOSO, 1997).

Figura 5 - Supressão do oxigênio singlete por carotenoides.



Fonte: CARDOSO, 1997

Figura 6 - Mecanismo de ação antioxidante do β -caroteno.



Fonte: CARDOSO, 1997

Devido ao fato de durante essa reação ocorrer o ataque às duplas ligações conjugadas dos carotenoides, ocorre redução da intensidade de sua coloração quando estes são oxidados.

2.5 Capacidade cromófora dos carotenoides

Para que apresente coloração, um carotenoide deve possuir ao menos sete ligações duplas conjugadas em sua cadeia carbônica. Dessa forma, a coloração de carotenos pode variar de incolor, amarelo, laranja até o vermelho, de modo que quanto maior o número de insaturações, mais escura será a cor produzida, visto que a capacidade de absorver a luz depende da estrutura da molécula. (RIBEIRO e SERAVALLI, 2004).

Devido a essa característica, diferentes carotenoides absorvem em comprimentos de onda diferentes, o que possibilita a sua identificação por diversas técnicas cromatográficas. Na Tabela 3, são apresentados os comprimentos de onda máximos de alguns carotenoides em solventes variados, podendo-se observar que diversos carotenoides possuem três comprimentos de onda de máxima absorção, o que é característico desse grupo (RODRIGUEZ-AMAYA e KIMURA, 2004).

Tabela 3 - Dados de absorção no ultravioleta/visível para carotenoides comuns em alimentos.

Carotenoide	Solvente	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)			%
					III/II
α -caroteno	Acetona	424	448	476	55
	Clorofórmio	433	457	484	
	Etanol	423	445	473	
	Hexano ou éter de petróleo	422	445	473	55
β -caroteno	Acetona	(429)	452	478	15
	Clorofórmio	(435)	461	485	
	Etanol	(425)	450	478	25
	Hexano ou éter de petróleo	(425)	450	477	25
α -criptoxantina / zeinoxantina	Clorofórmio	435	459	487	
	Etanol	423	446	473	60
	Hexano	421	445	475	60
β -criptoxantina	Clorofórmio	(435)	459	485	
	Etanol	(428)	450	478	27
	Éter de petróleo	(425)	449	476	25
Luteína	Clorofórmio	435	458	485	
	Etanol	422	445	474	60
	Éter de petróleo	421	445	474	60
Licopeno	Acetona	448	474	505	
	Clorofórmio	458	484	518	
	Etanol	446	472	503	65
	Éter de petróleo	444	470	502	65
Zeaxantina	Acetona	(430)	452	479	
	Clorofórmio	(433)	462	493	
	Etanol	(428)	450	478	26

Notas:

1. Os parênteses indicam um ombro na análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE.
2. % III / II é a relação entre a altura do pico de absorção de comprimento de onda mais longo, designado por III, e o do pico de absorção médio, designado por II, tomando o mínimo entre os dois picos como linha de base, multiplicado por 100.

Fonte: BRITTON, 1995 e DAVIES 1976 *apud* RODRIGUEZ-AMAYA e KIMURA, 2004.

2.6 Estabilidade dos carotenoides

Na Tabela 4, são apresentados dados de estabilidade do β -caroteno e da vitamina A (retinol) em diferentes condições, de acordo com Ottaway (1993). Apesar dos benefícios à saúde que os carotenoides fornecem e de estes compostos conferirem coloração intensa aos alimentos a que são adicionados, além da instabilidade nas condições apresentadas na Tabela 4, estudos mais recentes demonstram que estes compostos têm como limitação o fato de se degradarem durante o processamento térmico, durante o armazenamento e em presença de luz, o que leva à perda de qualidade sensorial e nutricional do produto (RODRIGUEZ-AMAYA, KIMURA e AMAYA-FARFAN, 2008; GHIDOUCHE et al., 2013; DIAS, 2014). Este fenômeno foi observado em diversos alimentos que possuem carotenoides, como frutas, hortaliças e seus derivados, como sucos e óleos, sendo agravado pelos processamentos como irradiação, secagem solar, secagem em estufa de circulação de ar forçado e fritura (LIMA et al., 2001; BELÉN-CAMACHO et al., 2004; AQUINO et al., 2009; RODRIGUES et al., 2013).

Tabela 4 - Estabilidade do β -caroteno e do retinol em diversas condições.

	β -caroteno	Retinol
Aquecimento	-----	Instável
Luz (UV)	Instável	Instável
Oxigênio atmosférico	Instável	Muito instável
pH na faixa de acidez	Instável	Instável
pH na faixa de alcalinidade	-----	Estável
Íons metálicos	-----	Instável
Radiação ionizante	-----	Instável

Fonte: OTTAWAY, 1993.

2.7 Distribuição geográfica e caracterização do jenipapeiro (*Genipa americana* L.)

O jenipapeiro é uma árvore frutífera, pertencente à família *Rubiacea* que habita todo o continente sul-americano, ocorrendo principalmente nas regiões de clima quente e úmido. No Brasil sua distribuição ocorre nas regiões Centro-Oeste, Sudeste, Norte e no Nordeste, sendo comumente encontrado no Estado da Bahia (SANDRI, 1998; SOUSA et al., 2007). Conhecido como jenipapo na maior parte do território brasileiro, este recebe outras denominações como: jenipá ou jenipapinho no Pará, huito na fronteira entre Brasil e Peru, genipa na Guiana Francesa, guayatil no Panamá, nandipáguazú na Argentina e jagua em outros países de língua espanhola. Incluindo o gênero *Genipa*, são reconhecidas duas

espécies: *Genipa americana* (planta jovem com folhas inteiras e corola hipocrateriforme) natural e cultivada em toda a América Central e América do Sul, e *Genipa infundibuliformis* (planta jovem com folhas lobadas e corola infundibuliforme), até o momento, encontrada somente no Brasil centro-meridional (XAVIER e XAVIER, 1976; DELPRETE et al., 2005; PRADO NETO et al., 2007).

A frutificação ocorre uma vez por ano, geralmente de novembro a março e, às vezes, entre abril e agosto, ocorrendo florescimento das plantas entre outubro e dezembro, com maturação do fruto entre maio e agosto, sendo o pico de maturação em junho. O fruto do jenipapeiro é uma baga, subglobosa, medindo de 8 a 10 cm de comprimento e 6 a 7 cm de diâmetro, apresenta coloração amarelada quando maduro, observando-se variações entre a cor parda ou pardacento-amarelada, casca mole e solta ou firme e aderida à polpa, membranosa, fina e enrugada. A polpa apresenta coloração parda, é suculenta, adocicada e mole, contendo numerosas sementes alongadas ou arredondadas no centro. As sementes são fibrosas, albuminadas, castanho-escuras e comprimidas e achatadas, medindo de 6 mm a 12 mm de comprimento. Seu sabor é característico e pronunciado (SANTOS, 2001; SOUSA, 2007; MESQUITA et al., 2009).

O fruto de jenipapo (*Genipa americana* L.) é apresentado na Figura 7.

Na Tabela 5 é apresentada a composição físico-química do fruto de jenipapo colhido na região de Cruz das Almas, no estado da Bahia (SANTOS, 2001) e do jenipapo em condições ideais de comercialização (WONG, 1995).

Figura 7 - Fruto maduro de jenipapo (*Genipa americana* L.).



Fonte: Acervo pessoal.

Tabela 5 - Caracterização físico-química do fruto de jenipapo.

	Frutos maduros de Cruz das Almas – BA (SANTOS, 2001)	Frutos para comercialização (WONG, 1995)
Umidade	73,75%	-
pH	3,60	-
Acidez Titulável (AT)	1,66%	0,20 a 0,40%
Sólidos Solúveis Totais (SST)	18,34° Brix	18° a 20° Brix
Açúcares Totais	15,69%	-
Relação SST/AT	11,58	-
Ácido Ascórbico	-	1,00 a 2,00 mg.100 g ⁻¹ de polpa
Cinzas	1,22%	-

Na Tabela 6, são apresentadas as informações nutricionais de 100g do fruto de jenipapo (IBGE, 1981). Conforme se pode observar, o jenipapo é uma boa fonte de proteínas, fibras e ferro, mostrando o potencial nutritivo deste fruto. De acordo com Morton (1987), o fruto ainda apresenta um teor elevado de taninos.

Tabela 6 - Composição nutricional do fruto de jenipapo.

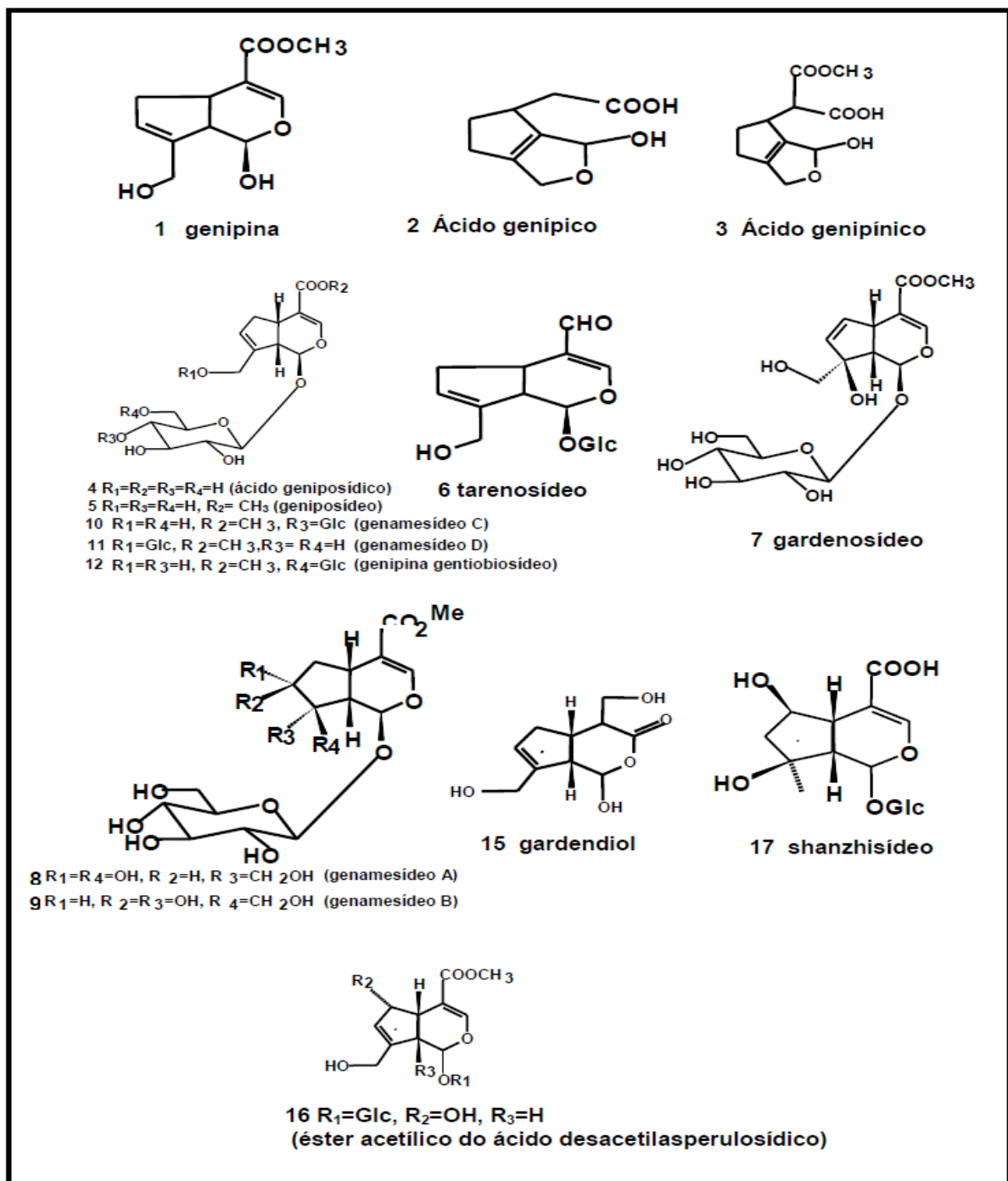
Composição	Quantidade
Energia (kcal.100 ⁻¹)	113,0
Água (g.100 ⁻¹)	67,6
Proteínas (g.100 ⁻¹)	5,2
Lipídios (g.100 ⁻¹)	0,3
Glicídios (g.100 ⁻¹)	25,7
Fibras (g.100 ⁻¹)	9,4
Cinzas (g.100 ⁻¹)	1,2
Cálcio (mg.100 ⁻¹)	40,0
Fósforo (mg.100 ⁻¹)	58,0
Ferro (mg.100 ⁻¹)	3,6
Equivalentes de Retinol (µg.100 ⁻¹)	30,0
Riboflavina (Vitamina B2) (mg.100 ⁻¹)	0,04
Niacina (Vitamina B3) (mg.100 ⁻¹)	0,5
Ácido Ascórbico (Vitamina C) (mg.100 ⁻¹)	33,0
Aminoácidos Essenciais (mg.100 ⁻¹)	1766,0
Lisina (mg.100 ⁻¹)	316,0
Metionina (mg.100 ⁻¹)	178,0
Treonina (mg.100 ⁻¹)	219,0
Triptofano (mg.100 ⁻¹)	57,0

Fonte: IBGE, 1981.

2.8 Principais fitoquímicos presentes em jenipapo (*Genipa americana* L.)

Os principais fitoquímicos presentes no jenipapeiro e encontrados em praticamente toda a planta (folhas, casca, frutos e raízes) são representados por iridóides, taninos, fitosteróis e tocoferóis. Na Figura 8 são apresentados os principais iridóides presentes no jenipapo (BARBOSA, 2008; DEMBITSKY et al, 2011, SOUZA, MENDONÇA e SILVA, 2013).

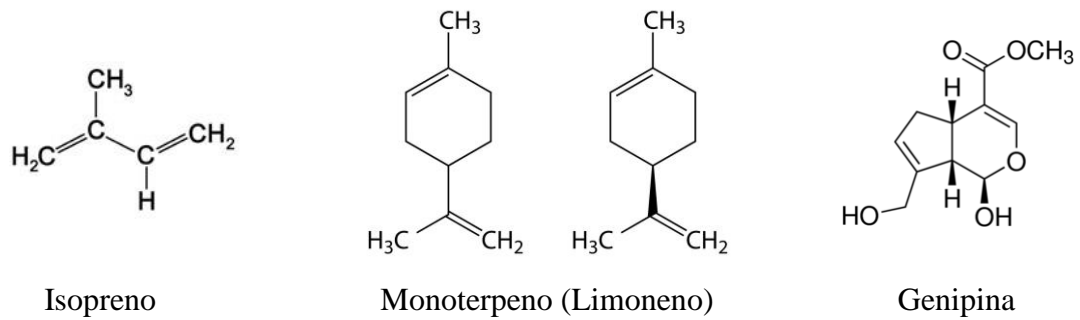
Figura 8 - Iridóides presentes em jenipapo (*Genipa americana* L.).



Fonte: BARBOSA, 2008.

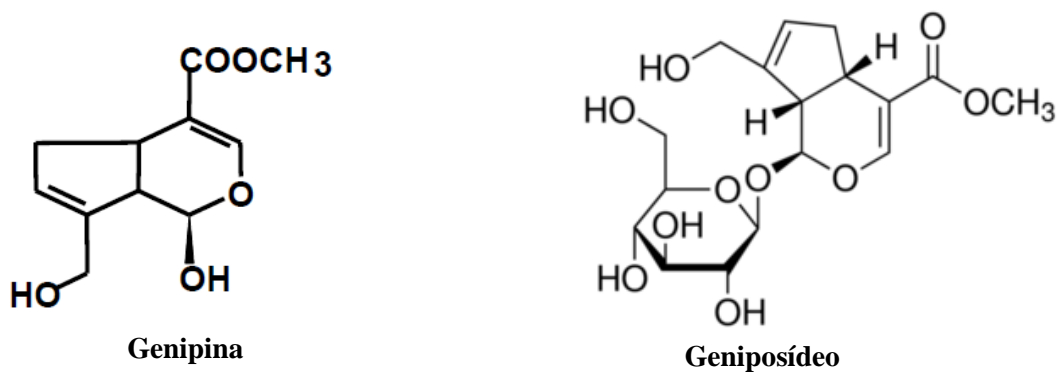
Assim como os carotenoides, os iridoídeos também são isoprenoides, mas do tipo monoterpenoides, pois são formados por duas unidades de isopreno. Na Figura 9 são apresentadas as estruturas do isopreno, de um monoterpeno (limoneno) e do iridoídeo genipina.

Figura 9 - Isopreno e compostos derivados.



Ueda e Iwahashi (1991) isolaram a partir do jenipapo a molécula do geniposídeo (Figura 2). Este composto é a forma glicosilada e incolor do iridoídeo genipina (Figura 10), sendo esta última a substância responsável pela formação de um pigmento de coloração que varia do azul escuro ao preto quando oxidada na presença de aminoácidos. O geniposídeo é a forma encontrada nos frutos maduros, já a genipina está presente nos frutos verdes.

Figura 10 - Estrutura química da genipina e do geniposídeo.



Fonte: WANG et al., 2004.

Os dois compostos têm sido estudados nos últimos anos devido às suas propriedades farmacológicas, dentre elas a sua atividade antioxidante *in vivo* e *in vitro*, atividade colerérgica, antitumoral, antiasmática e capacidade de inibição enzimática, e tecnologicamente para a produção de corante azul e reticulação de gelatina e quitosana (LIAW e CHAO, 2001;

KIM et al., 2005; RENHE et al., 2009; GHIDOUCHE et al., 2013; CUI et al., 2014). Entretanto, os estudos utilizam majoritariamente a gardênia (*Gardenia jasminoides* Ellis) – uma planta ornamental da mesma família do jenipapeiro (*Rubiaceae*) – como fonte destas moléculas, além de investigarem principalmente as funcionalidades da genipina devido ao fato de esta ser metabolicamente mais ativa (já que antes de ser absorvido o geniposídeo é convertido a genipina pela enzima β -glicosidase produzida pela microbiota intestinal) e por ser a forma padrão de análise disponível no mercado (AKAO et al., 1994; DING et al., 2013; RAMOS-DE-LA-PENÑA et al., 2014). Considerando-se a toxicidade, o geniposídeo/genipina possuem citotoxicidade ente 5.000 e 10.000 vezes menor que o glutaraldeído, e o geniposídeo é menos tóxico que a genipina. (WANG et al., 1992; KANG et al., 2012).

2.9 Aditivos naturais em alimentos, geniposídeo e carotenoides

Na indústria de alimentos, é crescente a procura por aditivos alimentares naturais, que gerem menores riscos e que possuam funcionalidades para a saúde. Estes aditivos visam preservar ou melhorar as características dos alimentos, como aroma, aparência, sabor e textura, bem como aumentar a sua vida de prateleira. Dentre eles, encontram-se os antioxidantes e os corantes (BRASIL, 1977; DELGADO-VARGAS, 2000).

Apesar de sua atividade antioxidante, a utilização da genipina e do geniposídeo com finalidade antioxidante em alimentos não foi observada nos estudos consultados através das bases de dados Science Direct e Scielo, entre os anos de 1960 e 2015. Por este mesmo motivo, não foi observada a avaliação de seu uso concomitante com outros compostos naturais que podem ser utilizados como aditivos de alimentos, como é o caso dos carotenoides, que além de atuar como corantes também possuem ação antioxidante (DELGADO-VARGAS, 2000).

Devido à escassez de estudos sobre a extração de compostos bioativos do jenipapo com atividade antioxidante e sua utilização para fins tecnológicos em alimentos, o objetivo deste trabalho foi a avaliar o efeito da genipina/geniposídeo sobre a estabilidade térmica do betacaroteno, visando a possível utilização destes compostos combinados na indústria de alimentos para conferência e preservação da cor de alimentos processados e consequente redução da utilização de corantes artificiais.

II. OBJETIVOS

1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito dos extratos metanólico e etanólico de frutos maduros de jenipapo (*Genipa americana* L.) liofilizado e seco em estufa sobre a estabilidade térmica do betacaroteno.

2. Objetivos Específicos

- Realizar a análise físico-química do jenipapo para estimar o ponto de maturação dos frutos (sólidos solúveis totais - SST, acidez titulável - AT, relação SST/AT, pH, umidade);
- Preparar os extratos etanólico e metanólico do jenipapo;
- Avaliar o potencial antioxidante dos extratos etanólico e metanólico de jenipapo;
- Determinar o efeito dos extratos etanólico e metanólico e da genipina na proteção contra a degradação do betacaroteno ao longo do tempo, submetido a diferentes temperaturas.

III. MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de uma pesquisa quantitativa, do tipo experimental, que se caracteriza por um trabalho instrumental para a identificação de compostos de interesse no jenipapo (*Genipa americana* L.) e seu potencial tecnológico na indústria de alimentos, desenvolvida no Núcleo de Estudos em Ciência dos Alimentos – NECAL e no Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais – LAPRON, na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, e no Instituto Multidisciplinar em Saúde – IMS, na Universidade Federal da Bahia.

1. Aquisição e preparo da amostra

Os frutos foram adquiridos entre os meses de junho e agosto de 2015, na região Sudoeste da Bahia, sendo selecionados os frutos maduros de acordo com sua textura e coloração.

Após isso, os frutos passaram por um processo de seleção, onde foram descartados os injuriados. A higienização foi feita por lavagem em água potável e corrente, seguida da imersão em água com hipoclorito de sódio a 20 mg.L^{-1} , por 15 minutos. A secagem foi realizada à temperatura ambiente.

2. Secagem

Os frutos foram, inicialmente, separados em duas frações: epicarpo com mesocarpo (casca e polpa) e endocarpo com sementes, sendo a primeira parte cortada em fatias de 1 cm, aproximadamente. Após este processamento inicial, as partes dos frutos foram armazenadas sob congelamento a $-80^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ para, então, serem liofilizadas.

Parte dos frutos foi liofilizada a -40°C por 24 horas. Distribuiu-se porções de 100 g por placa de Petri, que foram colocadas, uma por bandeja, em liofilizador de bancada (Christ, Alpha 1-2 LDplus).

Uma parte dos frutos foi seca em estufa de renovação e circulação de ar forçado (Schaly Sistemas Térmicos Ltda.), a $55 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas, para comparação com a liofilização em análise do teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante.

3. Caracterização física, química e físico-química do fruto de jenipapo

As análises físicas realizadas no fruto de jenipapo compreenderam a determinação da resistência à pressão, diâmetros transversal e longitudinal e peso.

As análises físico-químicas abrangeram a determinação do teor de sólidos solúveis totais (SST), acidez titulável (AT), relação SS/AT (sendo estas três determinações utilizadas para estimar o estágio de maturação dos frutos) e pH.

Já as análises de composição química realizadas foram a determinação da composição centesimal, do teor de carotenoides totais, de compostos fenólicos e a atividade antioxidante.

Nas caracterizações física, físico-química e na determinação da composição centesimal foram utilizados frutos in natura do jenipapo, enquanto que foram utilizados extratos de frutos liofilizados e secos em estufa nas demais análises químicas.

As análises de composição centesimal e a caracterização física dos frutos foram realizadas no Instituto Multidisciplinar em Saúde da Universidade Federal da Bahia – IMS/UFBA.

3.1 Determinação de Sólidos Solúveis Totais

A determinação do teor de sólidos solúveis totais dos frutos de jenipapo foi realizada através da análise por refratometria do sumo da fruta em Refratômetro de Abbé, com escala graduada em °Brix (IAL, 2008).

3.2 Determinação da Acidez Titulável

Foram pesados entre 5 e 10 g da polpa do fruto com casca de jenipapo, triturada em liquidificador, diluindo-se a mesma com aproximadamente 100 mL de água e se adicionando 0,3 mL de solução de fenolftaleína para cada 100 mL da solução a ser titulada. A titulação foi realizada contra uma solução de hidróxido de sódio 0,1 M sob agitação constante, até coloração rósea persistente por 30 segundos (IAL, 2008).

3.3 Determinação do pH

A medida do pH foi realizada por potenciometria, utilizando-se entre 5 e 10 g da polpa do fruto com casca de jenipapo, triturada em liquidificador, diluindo-se a mesma com aproximadamente 100 mL de água, sendo esta amostra avaliada em pH-metro (IAL, 2008).

3.4 Determinação da Umidade

O teor de umidade foi determinado pela secagem direta em estufa (SX-DTME, Marca Prolab - Brasil) a 105°C, através do método proposto pela AOCA (2010). Foram pesados 5 g da amostra em cápsula de porcelana, previamente estabilizada e tarada. As amostras foram aquecidas a 105°C durante 3 horas. Após este período, estas foram resfriadas em dessecador até a temperatura ambiente e pesadas em balança analítica. A operação de aquecimento e

resfriamento foi repetida a cada hora, até peso constante. Foram realizados os devidos cálculos para a determinação do teor de umidade.

3.5 Determinação das Cinzas

A determinação das cinzas da amostra será realizada através de incineração (IAL, 2008). Foram pesados 5 g da amostra em cápsula de porcelana, previamente estabilizada e tarada. As amostras foram aquecidas em forno mufla (Marconi - Brasil) a 550°C durante 2 horas. Após este período, estas foram resfriadas em dessecador até a temperatura ambiente e pesadas em balança analítica. A operação de aquecimento e resfriamento foi repetida a cada hora, até peso constante. Foram realizados os devidos cálculos para a determinação do teor de cinzas.

3.6 Determinação dos Lipídeos Totais

A determinação dos lipídeos totais foi realizada por meio da extração direta em Soxhlet (IAL, 2008). Foi pesado 1 g da amostra em cartucho de papel de filtro e o conjunto será seco em estufa a 105°C por uma hora. O cartucho foi transferido para o aparelho extrator tipo Soxhlet, utilizando-se 100 mL de éter de petróleo para a extração. A temperatura de extração foi de 65°C, e o tempo de extração entre 6 e 8 horas, com gotejamento de 4 a 5 gotas por segundo. Após o período de extração, os copos com o éter + extrato foram deixados por uma noite no equipamento, para a volatilização do éter. Após isso, o copo foi colocado em estufa por 2 horas, a 105°C, resfriado em dessecador à temperatura ambiente e pesado. A operação de aquecimento e resfriamento foi repetida a cada hora, até peso constante. Foram realizados os devidos cálculos para a determinação do teor de gordura.

3.7 Determinação de Proteínas

As proteínas foram determinadas pelo Método de Micro-Kjeldahl (IAL, 2008). Foi pesado 1 g da amostra e transferido para tubos de digestão. Foram adicionados 25 mL de ácido sulfúrico concentrado e cerca de 6 g da mistura catalítica (Dióxido de titânio anidro, sulfato de cobre anidro e sulfato de potássio anidro, na proporção 0,3:0,3:6). Os tubos foram levados ao bloco digestor, em capela, aumentando-se a temperatura em 50°C a cada hora, atingindo-se a temperatura máxima de 250°C, até a solução se tornar azul-esverdeada e livre de material não digerido (pontos pretos), ficando sob aquecimento por mais uma hora. Após esfriar, os tubos foram levados ao destilador de nitrogênio, com adição de hidróxido de sódio a 30%, até que houvesse um ligeiro excesso de base. Foram adicionadas 10 gotas do indicador fenolftaleína e 1 g de zinco em pó (para ajudar a clivagem das moléculas grandes de protídeos). No erlenmeyer que recebeu a amônia destilada, foram adicionados 25 mL de ácido

bórico 0,033 M, com 3 gotas do indicador vermelho de metila. A solução no tubo foi aquecida à ebulição e destilada até se obter cerca de 250 a 300 mL de destilado. A solução de hidróxido de amônio foi diretamente titulada com solução de ácido sulfúrico 0,05 M, utilizando vermelho de metila como indicador. Foram realizados os devidos cálculos para a determinação do teor de proteínas.

3.8 Determinação dos Carboidratos

O teor de carboidratos digeríveis foi calculado pela diferença entre 100 e a soma dos percentuais de umidade, proteína, lipídeos e cinzas (IAL, 2008).

3.9 Determinação da Fibra Bruta

As fibras foram determinadas a partir da análise de fibra bruta adaptada (AOAC, 2010). Foi pesado 1g da amostra que foi, posteriormente, desengordurada. O resíduo foi transferido para o digestor de fibras, com adição de 200 mL de ácido sulfúrico a 1,25%, aquecendo-se a 190°C por 30 minutos. O resíduo digerido foi filtrado a vácuo em papel filtro nº 40, previamente seco e pesado, lavando-se o resíduo com 2 L de água destilada em ebulição, até que filtrado estivesse neutro (controlando-se o pH com o auxílio de papel indicador). Transferiu-se o resíduo para o digestor, lavando-se o filtro com 200 mL de NaOH a 1,25% e 5 gotas de álcool amílico concentrado. Procedeu-se com aquecimento a 190°C por mais 30 minutos. O resíduo foi novamente filtrado a vácuo, utilizando-se o mesmo filtro da primeira filtração e água destilada em ebulição para lavar o copo do digestor. Ainda a vácuo, o resíduo foi lavado com 20 mL de acetona e 20mL de éter etílico. O filtro com o resíduo foi seco em estufa a 105°C por 2 horas, esfriado em dessecador e pesado. Em uma cápsula de porcelana previamente estabilizada e tarada, o papel + resíduo foram incinerados em forno mufla a 550°C por 2 horas. Após esfriar em dessecador, as cápsulas foram pesadas para a determinação do teor de cinzas a da amostra. Foram realizados os devidos cálculos para a determinação do teor de fibras.

3.10 Determinação de Minerais

A composição mineral da amostra foi determinada através da digestão nitro-sulfúrica, seguida de leitura em Espectrofotômetro de Absorção Atômica em Chama para ferro, cobre, zinco, cálcio, e magnésio, e determinação colorimétrica de fósforo (AOAC, 1996; IAL, 2008). Foi pesado 1 g de amostra, que foi transferida para um tubo de digestão, sendo adicionados 10 mL de água destilada e deionizada e 5 mL de ácido nítrico concentrado. O tubo foi levado ao bloco digestor, aumentando-se a temperatura em 50°C a cada 30 minutos, até atingir 250°C.

Após cessar a liberação de uma fumaça amarelada, foram adicionados 2 mL de ácido sulfúrico concentrado. Quando a liberação de fumaça de coloração amarela-escuro e branca cessaram, foi gotejado 1 mL de peróxido de hidrogênio a cada 30 minutos, até que a amostra estivesse transparente e livre de resíduos. As soluções dos tubos foram transferidas para balões volumétricos de 20 mL, sendo avolumadas com ácido nítrico a 0,1 M. Para as determinações de ferro, cobre e zinco a leitura foi feita diretamente em espectrofotômetro de absorção atômica em chama. Para a determinação de cálcio e magnésio, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro de absorção atômica em chama, com o auxílio de um tampão eletrônico de óxido de lantânio. Para a determinação de fósforo, foi realizado um método colorimétrico através da adição de ácido ascórbico e molibdato de amônio, e a leitura foi realizada em espectrofotômetro de absorção molecular. Foram realizadas as diluições necessárias e efetuados os cálculos para a determinação do teor de minerais na amostra.

3.11 Determinação de Vitamina C

A determinação de vitamina C foi realizada pelo método de Tillmans, que baseia-se redução do corante sal sódico de 2,6-diclorofenol indofenol por uma solução ácida de vitamina C (IAL, 2008).

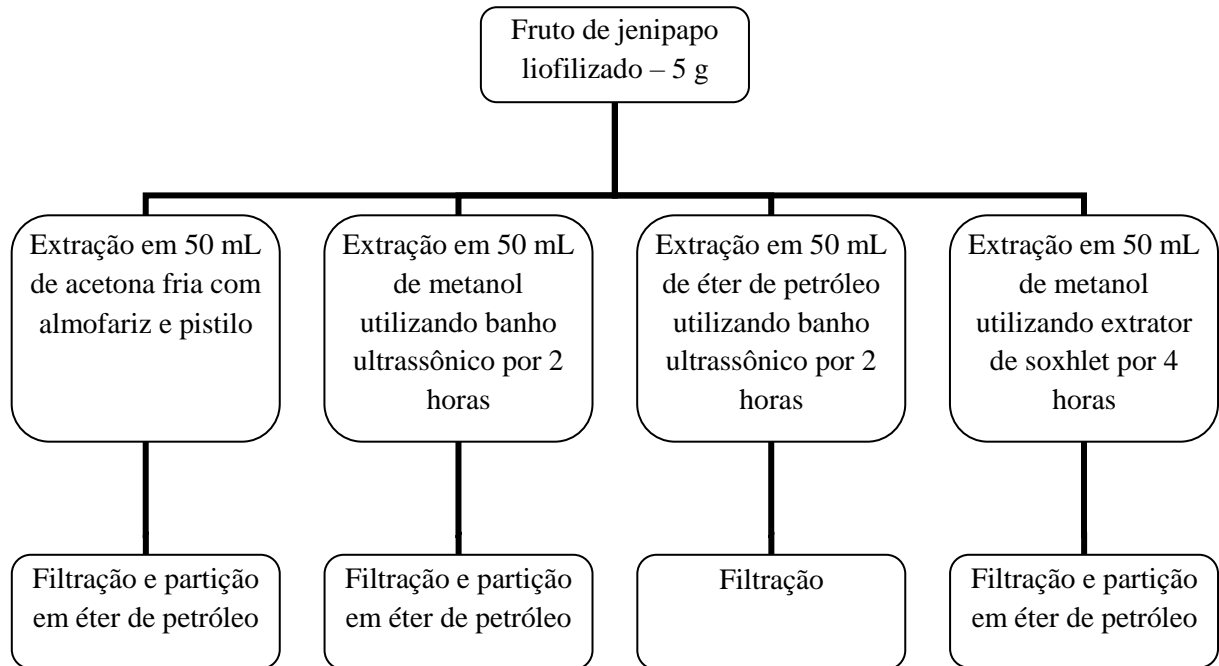
3.12 Determinação dos Carotenoides Totais

Os carotenoides totais foram determinados por meio de extração em acetona fria e separação com éter de petróleo, protegido da luz, seguida de leitura espectrofotométrica, e foram realizadas adaptações ao método com o objetivo de otimizar esta extração (RODRIGUEZ-AMAYA e KIMURA, 2004; XAVIER e MERCADANTE, 2012).

Foram pesados 5 g de amostra em um béquer, que foi transferida para um almofariz e macerada com 50 mL da acetona fria (acetona refrigerada por aproximadamente 2 horas). O preparado foi filtrado a vácuo em papel de filtro. O almofariz, o pistilo, o funil, e o resíduo foram lavados com quantidades pequenas de acetona, recebendo as lavagens em kitassato através do funil. Foram colocados 40 mL de éter de petróleo em um funil de separação de 500 mL e adicionou-se o extrato de acetona. Foi adicionada, lentamente, água destilada (aproximadamente 300 mL), deixando-se escorrer pela parede do funil. O funil foi deixado em repouso por uma noite, para que houvesse a separação em duas fases, onde a fase inferior (aquosa) foi descartada. Coletou-se o extrato etéreo em um balão volumétrico de 50 mL, fazendo a solução passar por funil contendo algodão e aproximadamente 15 g de sulfato de sódio anidro para remover a água residual. O extrato foi avolumado com éter de petróleo e a leitura da absorbância realizada em 450 nm.

Foram testados três métodos de extração dos carotenoides presentes em jenipapo liofilizado: A – Extração utilizando metanol por 2 horas em banho ultrassônico; B – Extração em éter de petróleo por 2 horas em banho ultrassônico; C – Extração em soxhlet por 4 horas, utilizando metanol. Utilizou-se, para todos os testes, 5 g de jenipapo liofilizado e 50 mL do respectivo solvente, em triplicata. Todos os métodos se seguiram de filtração e partição em éter de petróleo, conforme Figura 11.

Figura 11: Extração de carotenoides de jenipapo maduro.



Os extratos foram avolumados até 50 mL com éter de petróleo, seguindo-se a leitura em espectrofotômetro de absorção molecular (UV Mini 1240, Shimadzu Co.), com comprimento de onda igual a 450 nm, realizando-se os devidos cálculos para a determinação do teor de carotenoides totais (Equação 1).

$$\text{Carotenóides totais } (\mu\text{g } 100\text{g}^{-1}) = \frac{A \cdot \text{volume}(\text{mL}) \cdot 10^4}{A_{1\text{cm}}^{1\%} \cdot \text{peso da amostra}(\text{g})} \cdot 100$$

Onde: $A_{450\text{nm}}$ = absorbância; volume = volume total do extrato (50 mL);

$A_{1\text{cm}}^{1\%}$ = coeficiente de extinção molar do β -caroteno em éter de petróleo =

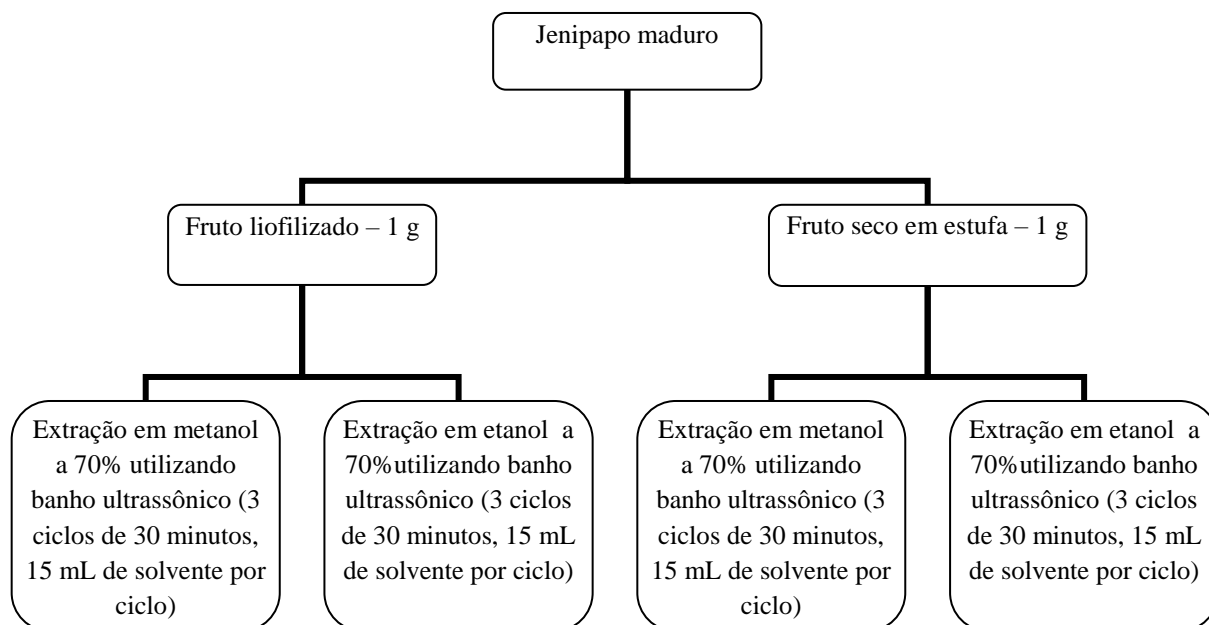
2592.

(1)

3.13 Obtenção dos Extratos e Preparo da Solução de Genipina

Os extratos etanólico e metanólico de jenipapo maduro foram obtidos de acordo com a Figura 12.

Figura 12: Preparo dos extratos de jenipapo maduro.



Para cada extração, foram realizadas três repetições. Os extratos foram utilizados nas determinações de polifenóis totais, de capacidade antioxidante e da termoestabilidade do betacaroteno.

A solução de genipina foi preparada a partir da dissolução desse composto (genipina, Sigma) em solução de metanol:água (1:1), com concentração final de 0,25 mg.mL⁻¹.

3.14 Polifenóis Totais

A determinação de constituintes fenólicos totais foi realizada de acordo com a metodologia ISO (ISO, 2005). Os compostos fenólicos totais do jenipapo foram extraídos em solução hidrometanólica a 70%. A determinação destes polifenóis se deu através de sua reação com o reagente fosfomolibdotúngstico (Folin-Ciocalteu), diluído em água (10%) no momento do uso, na presença de carbonato de sódio (solução a 7,5%). Para tanto, foram transferidos, volumetricamente, 1 mL dos extratos hidrometanólico e hidroetanólico de jenipapo a 1 mg.mL⁻¹ para um tubo de ensaio, onde foram adicionados 5 mL da solução do reagente fosfomolibdotúngstico (Folin-Ciocalteu) e agitado. Após 3 a 8 minutos, foram adicionados 4 mL de solução de carbonato de sódio e o tubo foi agitado novamente. A solução foi mantida em temperatura ambiente por 60 minutos, sendo determinada a sua

absorbância em espectrofotômetro de absorção molecular (UV Mini 1240, Shimadzu Co.) a 765 nm. Os resultados obtidos foram confrontados com uma curva analítica linear utilizando uma solução padrão de ácido gálico.

Dentre os constituintes fenólicos, foram determinados, ainda, os taninos totais. preparada uma solução estoque (solução-mãe) através da pesagem de 0,750 g da amostra e sua transferência para um balão de fundo redondo de 250 mL com boca esmerilhada. Foram adicionados 150 mL de água destilada, e levado ao aquecimento em manta aquecedora (Marconi, MA 552/089) durante 30 minutos, à temperatura de 100°C, sob refluxo, com o auxílio de um sistema de condensadores. O balão foi resfriado em banho de gelo e teve seu conteúdo transferido para um balão volumétrico de 250 mL, completando-se o volume com água destilada. Após decantar, o líquido sobrenadante foi filtrado, em papel de filtro, para um erlenmeyer de 250 mL, desprezando-se os primeiros 50 mL do filtrado. A partir desta solução, foram preparadas soluções para a determinação de polifenóis totais em extrato aquoso e polifenóis não-adsorvidos em PVPP (Polivinilpirrolidona). Para a determinação de polifenóis totais em extrato aquoso foram diluídos 10 mL da solução-mãe em balão volumétrico de 50 mL com água destilada, e transferidos, volumetricamente, 10 mL desta solução e 4 mL de reagente fosfomolibdotúngstico (Folin-Ciocalteu) para balão volumétrico de 100 mL, completando-se o volume com solução de carbonato de sódio a 10,6% (p.v⁻¹). A absorbância foi determinada em 760 nm (Espectrofotômetro de Absorção Molecular Microprocessado, Spectrum Sp 2000) exatamente 3 minutos após a adição do último reagente, utilizando água destilada para ajuste do zero. Para o preparo da solução amostra de polifenóis não adsorvidos por PVPP, foram transferidos 20 mL da solução-mãe para um erlenmeyer de 125 mL, adicionando-se 0,2 g de PVPP e agitando-se mecanicamente (agitador orbital) durante 60 minutos. A solução foi filtrada em papel de filtro. Foram diluídos 10 mL desse filtrado em balão volumétrico de 50 mL com água destilada. Após isso, foram transferidos, volumetricamente, 10 mL desta solução e 4 mL de reagente fosfomolibdotúngstico (Folin-Ciocalteu ou Folin-Denis) para balão volumétrico de 100 mL e se completou o volume com solução de carbonato de sódio a 10,6% (p.v⁻¹). A absorbância foi determinada em 760nm exatamente 3 minutos após a adição do último reagente, utilizando água destilada para ajuste do zero. A solução padrão de taninos totais foi preparada através da dissolução, imediatamente antes do uso, de 50 mg de pirogalol em balão volumétrico de 100 mL com água destilada. Foram transferidos volumetricamente 5 mL dessa solução para balão volumétrico de 100 mL, completando-se o volume com água destilada. Foram transferidos 4mL dessa solução, 4 mL de reagente fosfomolibdotúngstico (Folin-Ciocalteu ou FolinDenis) para balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com solução de

carbonato de sódio a 10,6% (p.v⁻¹). A absorvância foi determinada em 760 nm exatamente 3 minutos após a adição do último reagente, utilizando água destilada para ajuste do zero. Foram construídas curvas de calibração e realizados os devidos cálculos para a determinação dos teores de polifenóis totais em extrato aquoso e taninos totais na amostra. Os valores de fenólicos totais foram expressos como equivalentes de ácido gálico (mg de ácido gálico/g de amostra), e o de taninos em equivalentes de pirogalol (g.100g⁻¹ de pirogalol).

4. Capacidade antioxidante dos frutos de jenipapo

4.1 Sistema Modelo β -Caroteno-Ácido Linoleico

A capacidade antioxidante dos extratos foi avaliada utilizando-se um sistema modelo β -caroteno-ácido linoleico (MARCO, 1968; MILLER, 1971; DUARTE-ALMEIDA et al., 2005). Os extratos etanólico e metanólico dos frutos de jenipapo foram avaliados de acordo com a capacidade de inibir a oxidação da emulsão β -caroteno-ácido linoleico através da diminuição da intensidade da cor resultante. A solução de β -caroteno foi preparada pela dissolução de 2 mg de β -caroteno (Sigma) em 20 mL de clorofórmio. O sistema β -caroteno-ácido linoleico (Emulsão A) foi constituído de 3 mL da solução de β -caroteno, 40 mg de ácido linoleico e 400 mg do emulsificante Tween 20. Após a dissolução da mistura, o solvente foi removido em evaporador rotativo a 50°C. À mistura seca foram adicionados 100 mL de água destilada e oxigenada sob agitação vigorosa. Alíquotas de 3 mL da emulsão A foram transferidas para uma sequência de nove tubos de ensaio contendo 40 μ L dos respectivos extratos obtidos. Com o material do primeiro tubo, foi realizada a leitura imediata em comprimento de onda igual a 470 nm em espectrofotômetro de absorção molecular (UV Mini 1240, Shimadzu Co.), tempo zero, e os demais foram aquecidos em banho-maria a 45°C para monitoramento da reação de oxidação, sendo as leituras realizadas em intervalos de 15 minutos até perfazer um total de 2 horas. A amostra em branco foi constituída de 3 mL da emulsão ácido linoleico-tween 40 (Emulsão B) e água destilada aerada. A amostra controle foi preparada adicionando-se 3 mL da emulsão A em uma sequência de nove tubos de ensaio e 40 μ L do respectivo solvente (etanol a 70%, metanol e éter de petróleo). A ação antioxidante da amostra foi comparada a dois antioxidantes, BHT (hidroxibutiltolueno) e ácido gálico, ambos na concentração de 0,1 mg.mL⁻¹, que foram determinadas nas mesmas condições acima descritas. A capacidade antioxidante foi expressa como percentual de inibição da oxidação e calculada de acordo com a Equação 2.

$$\% \text{ de Inibição} = 100 \frac{DT_c - DT_a}{DT_c}$$

Sendo,

$$DT_c = \text{taxa de degradação do controle} = \ln \frac{A_{t=0}}{A_{t=120}}$$

$$DT_a = \text{taxa de degradação da amostra} = \ln \frac{A_{t=0}}{A_{t=120}}$$

(2)

4.2 Ensaio de Captura de Radicais DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)

A capacidade antioxidante também foi avaliada pelo ensaio de captura de radicais DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), que indica o percentual de proteção contra oxidação e percentual de atividade antioxidante (BRAND-WILLIAMS, CUVELIER e BERSET, 1995, RUFINO et al., 2007). Os extratos etanólico e metanólico dos frutos de jenipapo tiveram o seu potencial antioxidante avaliado pelo método DPPH. O método baseia-se na transferência de elétrons, ocorrendo a redução do composto púrpura de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) por ação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar, formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, sendo esta monitorada pelo decréscimo da absorbância. Foram preparadas soluções das amostras nas seguintes concentrações: 280, 140, 70, 35, 14, 7 e 1,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Um controle negativo foi realizado pela adição de etanol (teste do extrato etanólico) ou metanol (testes do extrato metanólico) e DPPH e o controle positivo foi feito pela adição de solução de um padrão (BHT) e DPPH. Às cubetas de vidro, foram adicionados 3,9 mL de uma solução de DPPH de concentração de 300 μM , sendo realizada a leitura inicial. Foram adicionados, então, 0,1 mL dos extratos. Após a adição do extrato, procedeu-se a leitura em espectrofotômetro de absorção molecular (UV Mini 1240, Shimadzu Co.), com comprimento de onda igual a 515 nm, nos tempos de 0 min, 15 min, 30 min e 60 min para a determinação da cinética de degradação do radical DPPH. A capacidade de eliminar o radical DPPH (% de atividade antioxidante) foi calculada utilizando-se a seguinte equação (Equação 3):

$$\text{Atividade Antioxidante (\%)} = \frac{A_{\text{controle(-)}} - A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle(-)}}} \times 100$$

Sendo:

$A_{\text{controle(-)}}$ = Absorvância da solução de DPPH sem a amostra

A_{amostra} = Absorvância da amostra com DPPH

(3)

Para a determinação do EC_{50} foi transferida, para cubetas de vidro e em ambiente escuro, uma alíquota de 3 mL de solução de DPPH em diferentes concentrações (10 μM , 20 μM , 30 μM , 40 μM , 50 μM e 60 μM) e foi realizada a leitura em espectrofotômetro de absorção molecular (UV Mini 1240, Shimadzu Co.) a 515 nm, utilizando álcool metílico como branco para calibrar o espectrofotômetro. Após isso, foi plotada a curva de concentração de DPPH, com as concentrações de DPPH (μM) no eixo X e as respectivas absorvâncias no eixo Y, determinando-se a equação da reta, que segue o modelo expresso na Equação 4.

Equivalência de controle e DPPH

$$y = ax - b$$

Onde:

y = Absorvância da leitura

x = resultado em μM DPPH

Obs.: converter para g DPPH, através da transformação:

g DPPH = (μM DPPH / 1.000.000) * 394,3 (peso molecular do DPPH).

(4)

Para o cálculo da EC_{50} , foi utilizada a equação exposta na Equação 5, obtida a partir da equação anterior.

Cálculo do EC_{50}

$$y = -ax + b$$

Onde:

y = Absorvância inicial do controle / 2

x = EC_{50} (mg/L).

(5)

O Y da equação foi substituído pelo valor correspondente à metade da absorbância inicial do controle negativo (solvente + DPPH), e o valor encontrado para X foi correspondente à concentração de amostra necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH (EC₅₀).

5. Avaliação da Termoestabilidade do β -caroteno e sua Proteção pelos Extratos de Jenipapo e pela Genipina

A avaliação da estabilidade térmica do β -caroteno (Sigma) em presença dos extratos do fruto de jenipapo e da genipina foi realizada através da adaptação do método que utiliza o sistema modelo β -caroteno-ácido linoleico. Os extratos etanólico e metanólico dos frutos de jenipapo, bem como uma solução de genipina, foram avaliados de acordo com a capacidade de inibir a oxidação da emulsão β -caroteno-ácido linoleico através da diminuição da intensidade da cor resultante. O aquecimento em banho-maria foi realizado a 30, 60 e 90°C, e foi comparada a perda de coloração da amostra na presença e na ausência dos extratos etanólico e metanólico dos frutos de jenipapo e da genipina, sendo realizadas leituras nos tempos: 0 min, 30 min, 60 min e 90 min. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro de absorção molecular (UV Mini 1240, Shimadzu Co.) em comprimento de onda igual a 450 nm. Foram plotados gráficos com a variação da absorbância ao longo do tempo, e a capacidade antioxidante foi expressa como percentual de inibição da oxidação.

6. Análise dos Dados

Todas as determinações foram realizadas em triplicata. Os resultados obtidos foram expressos em média e desvio padrão, foi realizada a análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas através do Teste de Tukey, a 5% de significância.

Os resultados das determinações de polifenóis totais e de atividade antioxidante foram analisados mediante as equações de regressão linear obtidas por meio de plotagem de curva de calibração.

Os resultados do teste de termoestabilidade do betacaroteno frente aos diversos extratos e à solução de genipina foram avaliados mediante a plotagem de gráficos de superfície de reposta.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. Caracterização físico-química do fruto do jenipapeiro

Os resultados da caracterização físico-química do fruto de jenipapo estão apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7 – Valores médios da caracterização física e físico-química do fruto do jenipapeiro no estágio de maturação maduro (Vitória da Conquista - BA, 2015).

Parâmetros	Fruto de jenipapo (polpa com casca)
Resistência à pressão (kgF)	1,40 ± 0,24
Diâmetro transversal (cm)	8,18 ± 0,56
Diâmetro longitudinal (cm)	8,68 ± 1,72
Peso do fruto (g)	295,00 ± 106,86
Sólidos solúveis totais - SST (°Brix a 20°C)	17,77 ± 0,51
pH (a 20°C)	2,23 ± 0,07
Acidez titulável total - ATT (% de ácido cítrico, p.v ⁻¹)	1,54 ± 0,11
SST/ATT	11,58 ± 0,95

Os valores de sólidos solúveis totais encontrados neste estudo estão próximos aos apresentados por Souza (2007), que referiram 18,49°Brix em frutos de jenipapo classificados como moles, e por Santos (2001) que, ao analisar frutos de jenipapo na região de Cruz das Almas-BA, encontrou 18,34°Brix em frutos maduros. Já o valor de pH encontrado foi inferior e o de acidez titulável superior ao encontrado por Souza (2007) em frutos moles, onde o pH foi igual a 2,84 e a acidez total titulável igual a 0,71%. Quando comparado ao estudo realizado por Santos (2001), a medida de pH e a acidez titulável apresentados no presente estudo foram inferiores àqueles referidos (pH de 3,60 e acidez titulável igual a 1,66%).

De acordo com Silva e colaboradores (2009), parâmetros físico-químicos podem ser utilizados na determinação do ponto de maturação do jenipapo. Os autores demonstraram que jenipapos com ponto de maturação “de vez” apresentaram, em média, 308,47 g de peso, 4,63 kgF de firmeza, 18,28°Brix, 0,27% de acidez titulável, SST/ATT de 67,70, pH igual a 4,58 e 32,00 mg.100 g⁻¹ de vitamina C. Já os frutos maduros apresentaram 195,63g, 1,20 kgF de firmeza, 21,80°Brix, 0,93% de acidez titulável, SST/ATT de 23,44, pH igual a 3,54 e 21,27 mg.100 g⁻¹ de vitamina C. Considerando a firmeza como um dos principais parâmetros para a

determinação do ponto de maturação, os frutos utilizados neste trabalho podem ser classificados como maduros.

Quanto ao rendimento da polpa contendo a casca em relação ao fruto também foi avaliado e resultou em $80,84 \pm 2,62\%$, valor superior ao encontrado por Souza (2007), que relatou rendimento igual a $65,59\%$. Esta diferença provavelmente se deve à adição da casca do fruto no presente estudo. O rendimento de polpa é um parâmetro de qualidade importante para a indústria de produtos concentrados, e variedades cujas frutas possuem alto rendimento de polpa apresentam maiores rendimentos no processamento dos produtos finais (concentrados), o que pode representar maior lucratividade para as indústrias (JESUS et al., 2004).

Na Tabela 8, é apresentada a composição centesimal dos frutos de jenipapo.

Tabela 8 - Composição centesimal do fruto de jenipapo maduro (Vitória da Conquista - BA, 2015).

Constituintes	Fruto de jenipapo (polpa com casca)
Umidade (%)	$77,72 \pm 0,69$
Cinzas (%)	$0,93 \pm 0,02$
Proteínas (g.100 g ⁻¹)	$1,55 \pm 0,05$
Carboidratos (g.100 g ⁻¹)	$14,05 \pm 1,22$
Lipídios (g.100 g ⁻¹)	$1,78 \pm 0,83$
Fibras (g.100 g ⁻¹)	$4,64 \pm 2,27$
Ácido Ascórbico (g.100 g ⁻¹)	Tr
Carotenoides totais (µg.100 g ⁻¹)	$874,49 \pm 47,15$
Ferro (mg.100 g ⁻¹)	$15,94 \pm 2,13$
Cálcio (mg.100 g ⁻¹)	$458,44 \pm 72,88$
Potássio (mg.100 g ⁻¹)	$350,42 \pm 37,58$
Sódio (mg.100 g ⁻¹)	$8,58 \pm 1,44$

Tr: Traços.

Quanto aos teores de umidade e cinzas obtidos no fruto de jenipapo, obtiveram-se resultados próximos aos descritos por Souza (2007), que relatou percentual de umidade e cinzas iguais a $74,04\%$ e $0,69\%$, respectivamente. Quando comparados aos resultados de Santos (2001) (umidade: $73,75\%$; cinzas: $1,22\%$), os resultados também podem ser considerados próximos.

Os valores de lipídios, proteínas e fibras totais encontrados no fruto foram diferentes dos relatados por Morton (1987) que obteve $0,3$ g de lipídios, $5,2$ g e $9,4$ g de fibras em 100 g do fruto de jenipapo. Entretanto, o valor de fibras totais obtido neste estudo foi semelhante ao relatado por Silva (2008), igual a $4,86$ g de fibras por 100 g de polpa de jenipapo.

Em relação ao teor de ácido ascórbico encontrado no jenipapo, apenas traços foram obtidos, diferentemente do resultado apresentado por Morton (1987), que encontrou 33,0 mg.100 g⁻¹ do fruto, e por Pinto (2009), que encontrou 2,28 mg.100 g⁻¹ de ácido ascórbico em 100 g de polpa de jenipapo. Destaca-se que o método de cultivo e os fatores ambientais podem influenciar na síntese de vitamina C dos frutos. Silva, Lima e Vieites (1998) demonstraram, em estudo avaliando as alterações físico-químicas que os frutos de jenipapo sofrem durante o armazenamento, que ocorre um decréscimo acentuado de vitamina C no jenipapo armazenado, mesmo em condições de refrigeração, o que pode explicar os teores valores de ácido ascórbico encontrados no presente estudo. No experimento realizado pelos autores citados, o teor de vitamina C chegou a 0 mg.100 g⁻¹ em 21 dias após a colheita quando este é armazenado à temperatura ambiente. Os frutos utilizados no presente estudo foram adquiridos em feiras-livres da região Sudoeste da Bahia e, de acordo com os vendedores, haviam sido colhidos entre 7 e 21 dias anteriores à aquisição, permanecendo em temperatura ambiente durante este período, concordando com os dados descritos na literatura.

Por outro lado, os teores de carotenoides totais encontrado no jenipapo mostrou-se próximo ao encontrado no maracujá (*Passiflora edulis* – 750 µg.100 g⁻¹) e superior ao encontrado no piquí (*Caryocar brasiliense* – 560 µg.100 g⁻¹), frutos considerados fontes de carotenoides. Desta forma, pode-se considerar que o jenipapo também seja boa fonte de carotenoides (RODRIGUES-AMAYA, KIMURA, AMAYA-FARFAN, 2008). Pacheco e colaboradores (2014) não encontraram betacaroteno em frutos de jenipapo, e na literatura consultada não foram encontrados dados referentes ao teor de carotenoides totais em jenipapo, o que revela a necessidade da realização de estudos para a caracterização química mais completa dos frutos, sejam eles exóticos ou não, para determinar o seu potencial nutritivo para a população consumidora. Assim, este trabalho também contribui com dados para esta finalidade.

Alguns minerais também foram avaliados no fruto de jenipapo, e os resultados mostraram valores diferentes dos relatados por Souza (2007) (0,37 mg.100 g⁻¹ de ferro, 56,26 mg.100 g⁻¹ de cálcio, 213,44 mg.100 g⁻¹ de potássio), assim como dos valores obtidos por Oliveira e, colaboradores (2006) (7,9 mg.100 g⁻¹ de ferro, 130 mg.100 g⁻¹ de cálcio e 1003 mg.100 g⁻¹ de potássio), sendo superiores ao descrito na literatura para a maioria dos minerais avaliados. Quando comparado a outros frutos exóticos, o jenipapo pode ser considerado como boa fonte de ferro. Os teores deste mineral para frutos como jambo rosa (*Eugenia jambos* L.) e macaúba (*Acrocomia aculeata* Jacq. Lood.) são de 11,40 mg.100 g⁻¹ e 10,10 mg.100 g⁻¹, respectivamente, valores próximos aos encontrados para o jenipapo no presente estudo (OLIVEIRA et al., 2006).

As diferenças encontradas no teor de ferro, bem como nos demais constituintes do jenipapo citados em diversos estudos, podem ser justificadas por diversos fatores, como qualidade do solo, estado de maturação dos frutos, clima, entre outros (CHITARRA e CHITARRA, 2005). Além disso, Oliveira e colaboradores (2003), estudando outra espécie vegetal, relataram que a heterogeneidade entre espécies de um gênero está relacionada a fatores genéticos e ambientais (tipo de solo, clima e período de frutificação) que podem ser determinantes nas diferenças de tamanho, peso e constituição dos frutos.

Os resultados obtidos até o momento indicam a grande qualidade nutricional do fruto de jenipapo, principalmente no que se refere ao teor de fibras, carotenoides totais, ferro, cálcio e potássio, embora não seja boa fonte de ácido ascórbico.

Destacando o jenipapo como boa fonte de carotenoides e ferro, é importante relatar a existência da relação entre os baixos níveis de ferro no organismo e a deficiência de vitamina A. O mecanismo proposto seria uma menor mobilização do ferro armazenado, decorrente da deficiência de vitamina A, o que compromete a hematopoese e leva a um estado de anemia (HODGES et al., 1980; MEIJA e ARROYAVE, 1982; AMENY et al., 2002). No Brasil estima-se que a deficiência de ferro atinja 53% das crianças de 0 a 72 meses (WHO, 2001; WHO, 2007; WHO, 2008) e a deficiência de vitamina A ocorra principalmente nas regiões Norte, Nordeste e Sudeste, sendo os principais grupos de risco compostos por gestantes e pré-escolares (WHO, 1995; McLAREN e FRIGG, 1999; BRASIL, 2000). Estes grupos são consumidores em potencial do jenipapo. Desta forma, o jenipapo e seus derivados poderão, após o estudo de sua biodisponibilidade, ser utilizados no combate à deficiência de vitamina A e do ferro.

Destaque-se que, para a determinação dos carotenoides, foi necessário realizar adaptações no método de extração destes compostos.

Foram testados quatro métodos de extração dos carotenoides presentes em jenipapo liofilizado: A – Extração utilizando metanol e 2 horas em banho ultrassônico; B – Extração convencional, com maceração em acetona fria utilizando almofariz e pistilo; C – Extração em éter de petróleo e 2 horas em banho ultrassônico; D – Extração em soxhlet por 4 horas, utilizando metanol. Utilizou-se, para todos os testes, 5 g de jenipapo liofilizado e 50 mL do respectivo solvente, em triplicata. Todos os métodos se seguiram de partição em éter de petróleo, e a leitura foi realizada com 50 mL deste mesmo solvente em espectrofotômetro de absorção molecular, com comprimento de onda igual a 450 nm (RODRIGUEZ-AMAYA e KIMURA, 2004; XAVIER e MERCADANTE, 2012).

Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, com 5% de significância, conforme apresentado na Tabela 9.

Como pode ser observada, a extração dos carotenoides em banho ultrassônico utilizando metanol como solvente mostrou-se mais eficiente do que os demais métodos, inclusive o método tradicional que utiliza acetona fria como solvente. Apesar de o metanol ser mais polar do que solventes com polaridade intermediária, como acetato de etila, acetona e tetraidrofurano, este solvente mostrou-se mais adequado à extração dos carotenoides presentes nos frutos de jenipapo liofilizado (XAVIER e MERCADANTE, 2012).

Tabela 9 - Análise de variância (ANOVA) do teor de carotenoides de jenipapo liofilizado obtidos de acordo com o método de extração.

Método de Extração	Teor de Carotenoides ($\mu\text{g}\cdot 100^{-1}$ g de betacaroteno)
A	$874,49 \pm 47,15^a$
C	$497,69 \pm 24,09^b$
B	$379,37 \pm 36,67^c$
D	$263,63 \pm 11,79^d$

A – Extração utilizando metanol e 2 horas em banho ultrassônico; B – Extração convencional, com maceração em acetona fria utilizando almofariz e pistilo; C – Extração em éter de petróleo e 2 horas em banho ultrassônico; D – Extração em soxhlet por 4 horas, utilizando metanol.

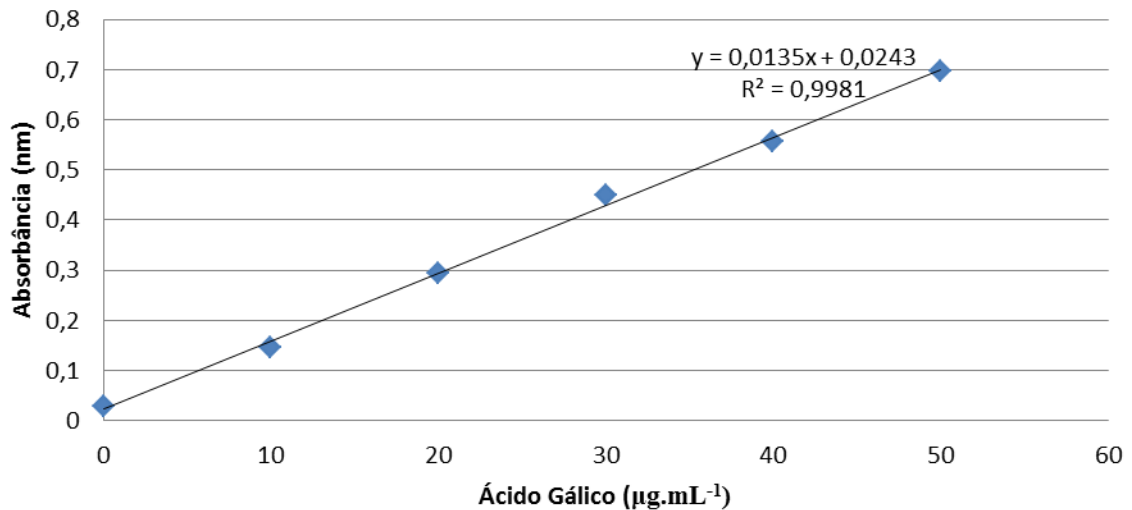
$p < 0,01$, teste de Tukey a 5% de significância.

Os métodos de extração utilizando ultrassom têm sido largamente empregado em pesquisas de otimização de processos de extração dos mais diversos tipos de compostos, que vão desde constituintes de baixo peso molecular a enzimas e óleos, e têm demonstrado diversas vantagens, sendo a principal a redução do tempo e do volume de reagentes empregados na extração e, por vezes, a maior eficiência. Estas vantagens podem ser explicadas pelo fenômeno de cavitação promovido pelas ondas de ultrassom, que se caracteriza pela formação, crescimento e colapso de microbolhas no centro do líquido. Esse colapso ocorre quando a bolha cessa de absorver a energia da sonicação e acabam por implodir, gerando altas pressões e temperaturas em minúsculos pontos quentes que não são perceptíveis nas condições ambientais normais. Dessa forma, diversos compostos presentes na amostra podem ser extraídos para o meio líquido a partir desse processo, visto que ocorre uma diminuição do tamanho das partículas e/ou desagregação de aglomerados (LUQUE-GARCIA e LUQUE DE CASTRO, 2003; CAPELO et al., 2005). Essa maior eficiência ficou

evidente neste trabalho, visto que as extrações utilizando banho ultrassônico apresentaram melhor resultado.

A curva de calibração e a equação de regressão utilizadas para a determinação de constituintes fenólicos nos extratos são apresentadas na Figura 13.

Figura 13 - Curva e equação utilizadas para a determinação dos constituintes fenólicos em jenipapo maduro.



O resultado da determinação de polifenóis em jenipapo in natura é apresentado na Tabela 10. Já os resultados do teor de constituintes fenólicos em extratos etanólico e metanólico de jenipapo liofilizado e seco em estufa (padronizados em 1 mg.mL^{-1}), corrigidos para o valor por grama de fruto, são apresentados na Tabela 11.

O teor de fenólicos totais encontrados no extrato aquoso do fruto do jenipapo foi superior ao presente no jambolão ($2,29 \text{ mg.g}^{-1}$), na polpa de uva ($1,17 \text{ mg.g}^{-1}$) e na polpa de açaí ($1,36 \text{ mg.g}^{-1}$), ficando próximo ao encontrado nas polpas de manga ($5,44 \text{ mg.g}^{-1}$) e acerola ($5,80 \text{ mg.g}^{-1}$). Os extratos metanólico e etanólico apresentaram valores muito superiores a estes, demonstrando uma maior eficiência na extração com a utilização dos solventes utilizados. Esse achado é de grande relevância, visto que estes compostos são os principais responsáveis pela atividade antioxidante dos diversos frutos, estando envolvidos na prevenção e auxiliando no tratamento de diversas enfermidades cardiovasculares, neoplasias e infecções (KUSKOSKI et al., 2007). Valores tão elevados de constituintes fenólicos encontrados no presente estudo podem se justificar tanto pelos solventes utilizados na extração (pois alguns estudos realizam a extração de fenólicos a quente em água) quanto pela própria extração em banho ultrassônico.

Tabela 10 - Teor de fenólicos totais e taninos no fruto de jenipapo in natura (extrato aquoso).

Constituintes	Fruto de jenipapo (polpa com casca)
Fenólicos Totais (mg.g ⁻¹)	5,21±0,69
Taninos Totais (g.100g ⁻¹ de pirogalol)	0,05±0,04

Tabela 11 - Teor de fenólicos totais nos extratos metanólico e etanólico do fruto de jenipapo liofilizado e seco em estufa.

Tratamento	Teor de fenólicos nos extratos (µg.mL ⁻¹)	Teor de fenólicos no fruto (mg.g ⁻¹)
MET-L 1mg.mL ⁻¹	30,25±6,69	30,25±6,69
MET-E 1mg.mL ⁻¹	48,15±5,73	48,15±5,73
ET-L 1mg.mL ⁻¹	14,50±3,77	14,50±3,77
ET - E 1mg.mL ⁻¹	15,01±1,48	15,01±1,48

Legenda: MET-L – extrato metanólico de jenipapo liofilizado; MET-E – extrato metanólico de jenipapo seco em estufa; ET-L – extrato etanólico de jenipapo liofilizado; ET-E – extrato etanólico de jenipapo seco em estufa.

E quanto ao teor de taninos totais, a baixa concentração encontrada é desejável, pois os mesmos podem agir como componentes antinutricionais quando em elevadas quantidades, interferindo na absorção de minerais (MECHI et al., 2005).

2. Capacidade antioxidante dos frutos de jenipapo

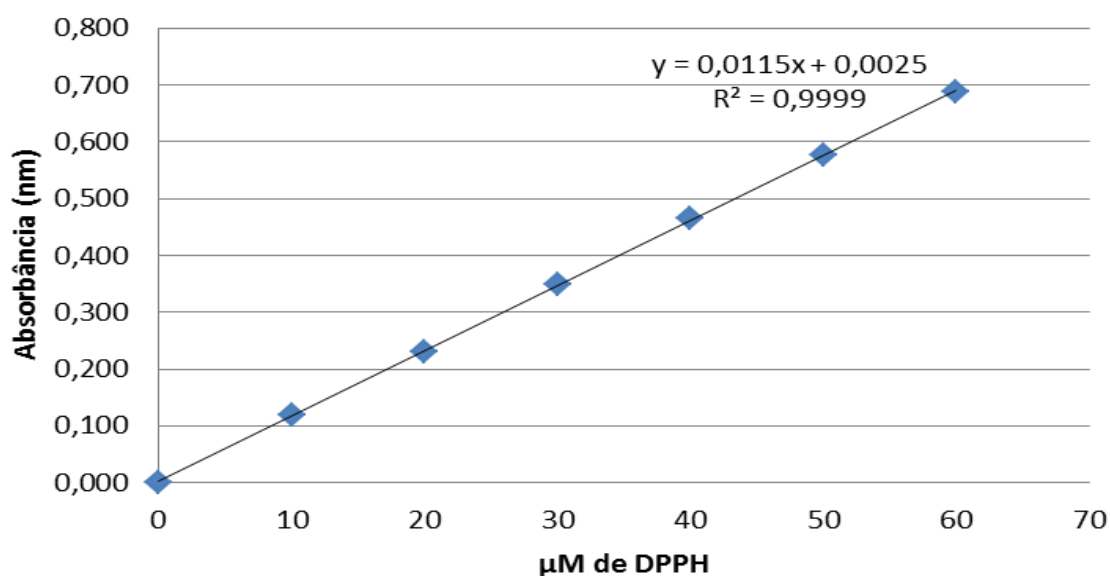
Os resultados das análises da capacidade antioxidante dos extratos de jenipapo in natura pelo método do DPPH e pelo Método Betacaroteno/Ácido Linoleico são apresentados na Tabela 12.

Os resultados do teste de DPPH mostraram que a atividade antioxidante do extrato etanólico do jenipapo in natura é superior ao do BHT em concentração usuais (0,1 mg.mL⁻¹), sendo esta atividade 3,9 vezes maior que a do BHT. Contrariamente, o resultado do teste pelo método do Betacaroteno/Ácido Linoleico demonstrou uma atividade antioxidante do extrato de jenipapo in natura inferior à do BHT. Apesar desta divergência, ambos os testes indicaram atividade antioxidante para o extrato de jenipapo maduro liofilizado, não havendo diferença entre os métodos analisados pelo teste Tukey, com 5% de significância.

Tabela 12 - Capacidade antioxidante dos extratos de jenipapo in natura.

Constituintes	Atividade Antioxidante / % de Inibição da Oxidação
Método DPPH	
Extrato Hidroetanólico de Jenipapo Liofilizado 300 mg.mL ⁻¹	28,16
BHT 0,1 mg.mL ⁻¹	7,13
Método Betacaroteno/Ácido Linoleico	
Extrato Hidroetanólico de Jenipapo Liofilizado 300 mg.mL ⁻¹	45,31
BHT 0,1 mg.mL ⁻¹	80,22

O gráfico plotado para a análise de regressão utilizada para a determinação da EC₅₀ é apresentado na Figuras 14.

Figura 14 - Curva e equação utilizadas para a determinação da EC₅₀.

Os resultados da atividade antioxidante de extratos etanólico e metanólico de jenipapo liofilizado e seco em estufa em diferentes concentrações e com sua respectiva EC₅₀ são apresentados na Tabela 13.

Tanto a análise da Tabela 13 quanto da Figura 13 permite identificar o extrato metanólico de jenipapo seco em estufa como o que apresenta melhor atividade antioxidante dentre os extratos avaliados, sendo a sua atividade superior à do BHT a 0,05 mg.mL⁻¹.

A presença dos compostos antioxidantes avaliados, e de possivelmente outros que não foram aqui analisados, justifica estes resultados. Um importante composto antioxidante relatado na literatura e encontrado no jenipapo é a genipina, um pigmento azul escuro presente no fruto verde e que se apresenta incolor, na forma de glicosídeo (geniposídeo), no fruto maduro. Além deste pigmento, outros compostos possivelmente presentes no jenipapo que podem possuir capacidade antioxidante são os alcaloides. Diversos estudos demonstram que os alcaloides são fitoquímicos presentes em diversas rubiáceas, inclusive no jenipapo, e a depender do tipo e da quantidade de ingerida podem gerar sintomas não desejáveis, como sonolência e desatenção, sendo importante a realização de estudos toxicológicos para a determinação da quantidade de ingestão segura (BARBOSA, 2008).

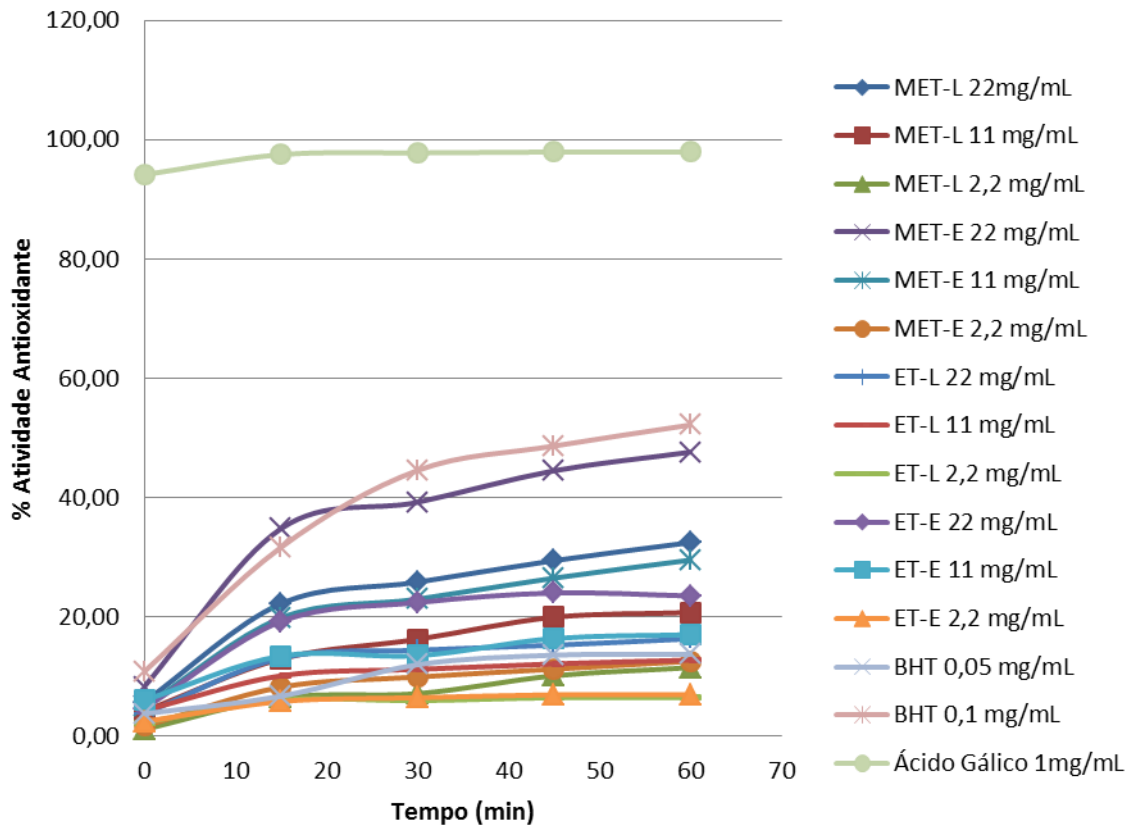
Tabela 13 - Atividade antioxidante dos extratos de jenipapo liofilizado e seco em estufa.

Tratamento	Concentração	Atividade Antioxidante %	EC ₅₀ .
MET-L	22 mg.mL ⁻¹	32,50	
	11 mg.mL ⁻¹	20,77	38,67 mg.mL ⁻¹ (3,28 g de fruto . g DPPH ⁻¹)
	2,2 mg.mL ⁻¹	11,53	
MET-E	22 mg.mL ⁻¹	47,65	
	11 mg.mL ⁻¹	29,57	23,17 mg.mL ⁻¹ (1,97 g de fruto . g DPPH ⁻¹)
	2,2 mg.mL ⁻¹	12,61	
ET-L	22 mg.mL ⁻¹	16,37	
	11 mg.mL ⁻¹	12,81	88,00 mg.mL ⁻¹ (7,47 g de fruto . g DPPH ⁻¹)
	2,2 mg.mL ⁻¹	6,50	
ET-E	22 mg.mL ⁻¹	23,56	
	11 mg.mL ⁻¹	17,06	53,38 mg.mL ⁻¹ (4,53 g de fruto . g DPPH ⁻¹)
	2,2 mg.mL ⁻¹	6,99	
BHT	0,05 mg.mL ⁻¹	13,78	
BHT	0,1 mg.mL ⁻¹	52,20	
Ácido Gálico	1 mg.mL ⁻¹	97,95	

Legenda: MET-L – extrato metanólico de jenipapo liofilizado; MET-E – extrato metanólico de jenipapo seco em estufa; ET-L – extrato etanólico de jenipapo liofilizado; ET-E – extrato etanólico de jenipapo seco em estufa.

A atividade antioxidante, ao longo do tempo, para os diferentes extratos e para os controles é apresentada na Figura 15.

Figura 15 - Atividade antioxidante dos extratos de jenipapo liofilizado e seco em estufa ao longo do tempo.

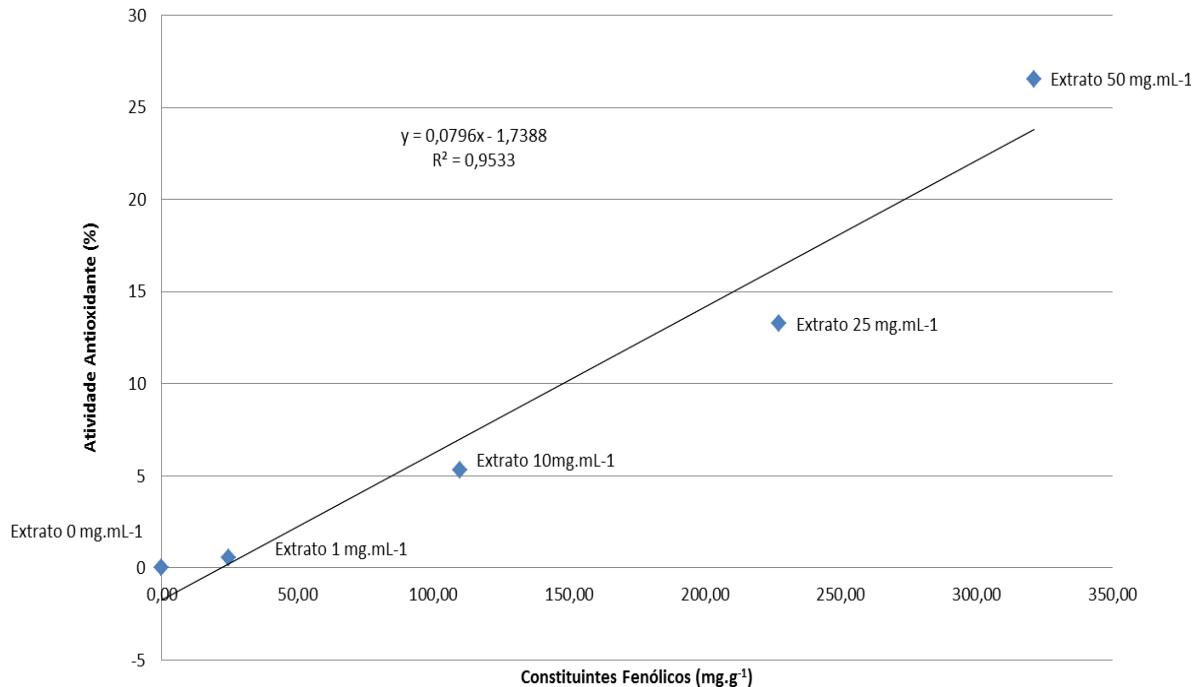


Legenda: MET-L – extrato metanólico de jenipapo liofilizado; MET-E – extrato metanólico de jenipapo seco em estufa; ET-L – extrato etanólico de jenipapo liofilizado; ET-E – extrato etanólico de jenipapo seco em estufa.

A correlação entre o teor de constituintes fenólicos e a atividade antioxidante do extrato etanólico de jenipapo liofilizado é apresentada na Figura 16.

A atividade antioxidante do extrato etanólico de jenipapo é diretamente proporcional à concentração de constituintes fenólicos no mesmo, conforme demonstrado na Figura 14. O coeficiente de correlação de Pearson (ρ) entre a atividade antioxidante e o teor de fenólicos foi igual a 0,9763, demonstrando uma correlação positiva muito forte entre as duas variáveis, confirmando a informação apresentada no gráfico. Esse resultado é semelhante ao encontrado por Kuskoski e colaboradores (2007), que analisaram 13 frutos/polpas (bagaço, jambolão, amora, uva, açaí, goiaba, morango, acerola, abacaxi, manga, graviola, cupuaçu e maracujá) e obtiveram um coeficiente de correlação entre a atividade antioxidante e o teor de constituintes fenólicos igual a 0,9828.

Figura 16 - Correlação entre o teor de constituintes fenólicos e a atividade antioxidante de jenipapo.



Estudos demonstram que os constituintes fenólicos são os maiores responsáveis pela atividade antioxidante em frutos, tendo sido demonstrada maior contribuição desses compostos do que do ácido ascórbico (vitamina C) sobre essa característica, o que está de acordo com os dados deste trabalho, visto que apenas traços de vitamina C foram encontrados no jenipapo (HEIM et al., 2002). Neste trabalho, os extratos com maior concentração de compostos fenólicos (extratos metanólicos) apresentaram aproximadamente o dobro de atividade antioxidante dos demais extratos, e a atividade do extrato metanólico de jenipapo seco em estufa foi comparável à do BHT em condições usuais, corroborando com a informação apresentada no estudo citado.

Estes dados demonstram a importância dos compostos fenólicos sobre a atividade antioxidante do fruto de jenipapo e revelam a importância da concentração utilizada sobre os resultados observados e, possivelmente, da quantidade de fruto ingerida sobre seus efeitos fisiológicos.

3. Avaliação da termoestabilidade do β -caroteno na presença dos extratos etanólico e metanólico de jenipapo e da solução de genipina

O resultado do teste de estabilidade térmica do betacaroteno é apresentado na Tabela 14 e nas Figuras 17 a 24.

Na temperatura de 90°C a partir de 60 minutos, a oxidação do betacaroteno em todos os tratamentos foi superior à do controle (Tabela 14). Em 90 minutos de tratamento térmico a 60°C e 90°C esse efeito também foi observado. Além disso, para todos os tratamentos, quanto maior a temperatura e o tempo de exposição, maior o percentual de oxidação do betacaroteno (Figuras de 19 a 23).

Os resultados da análise de variância (ANOVA) e do teste Tukey com 5% de significância para as variáveis tipo de extrato, tempo, temperatura e tempo x temperatura são demonstrados na Tabela 15.

Tabela 14 - Percentual de oxidação do β -caroteno frente aos diversos tratamentos.

Tempo (minutos)	30			60			90		
	30	60	90	30	60	90	30	60	90
MET-L 1 mg.mL ⁻¹	1,24	18,80	40,53	5,31	31,10	70,19	10,28	44,58	143,11
MET-E 1 mg.mL ⁻¹	2,13	22,88	37,32	4,57	32,36	99,05	8,61	44,46	155,24
ET-L 1 mg.mL ⁻¹	2,06	14,03	31,10	5,26	30,40	69,42	10,83	50,76	119,44
ET-E 1 mg.mL ⁻¹	1,97	22,54	43,50	4,21	28,02	68,28	8,26	42,06	168,82
Genipina 0,25 mg.mL ⁻¹	2,71	22,56	37,61	5,94	37,85	74,09	10,67	51,86	125,96
Controle	3,8	29,12	46,46	6,02	33,54	62,39	10,44	42,12	92,39

Legenda: MET-L – extrato metanólico de jenipapo liofilizado; MET-E – extrato metanólico de jenipapo seco em estufa; ET-L – extrato etanólico de jenipapo liofilizado; ET-E – extrato etanólico de jenipapo seco em estufa.

Figura 17 - Percentual de oxidação do betacaroteno + extrato metanólico de jenipapo liofilizado em relação à oxidação do controle.

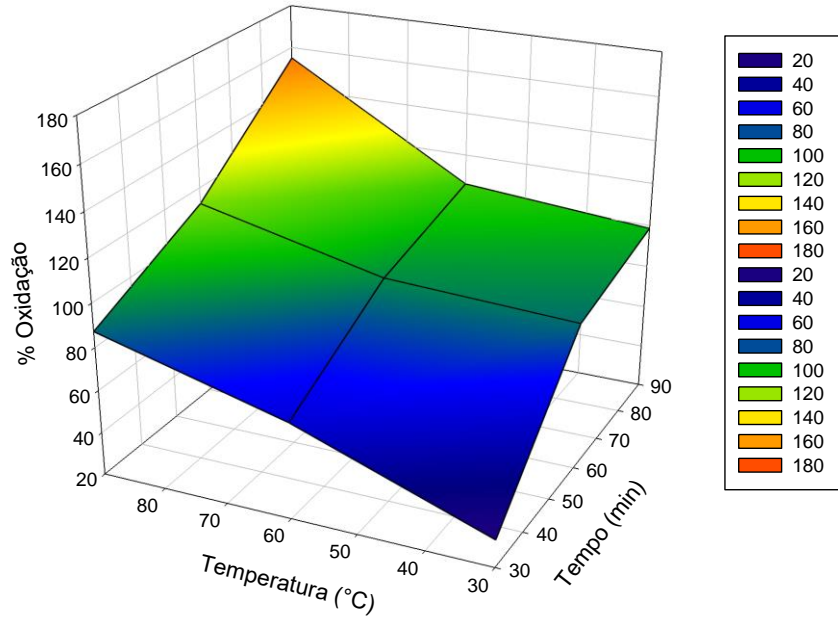


Figura 18 - Percentual de oxidação do betacaroteno + extrato metanólico de jenipapo seco em estufa em relação à oxidação do controle.

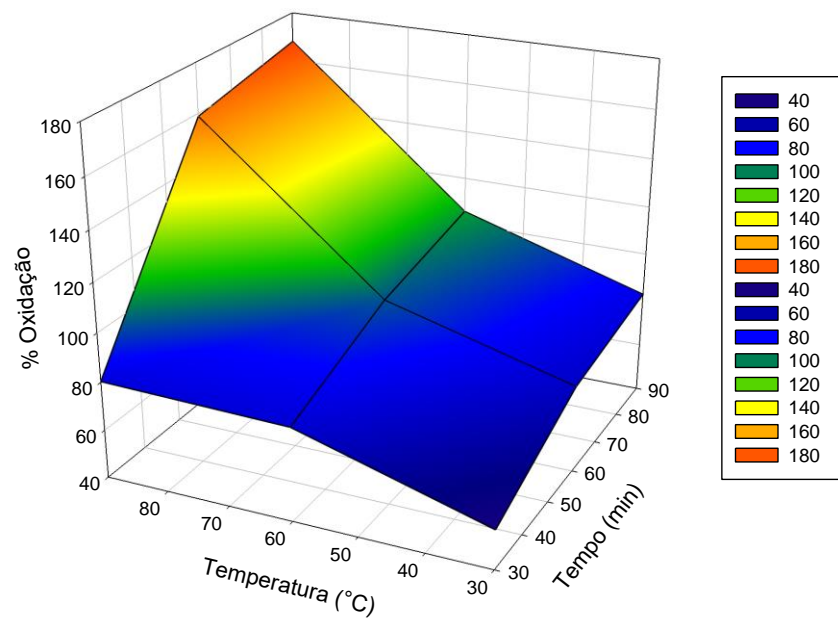


Figura 19 - Percentual de oxidação do betacaroteno + extrato etanólico de jenipapo liofilizado em relação à oxidação do controle.

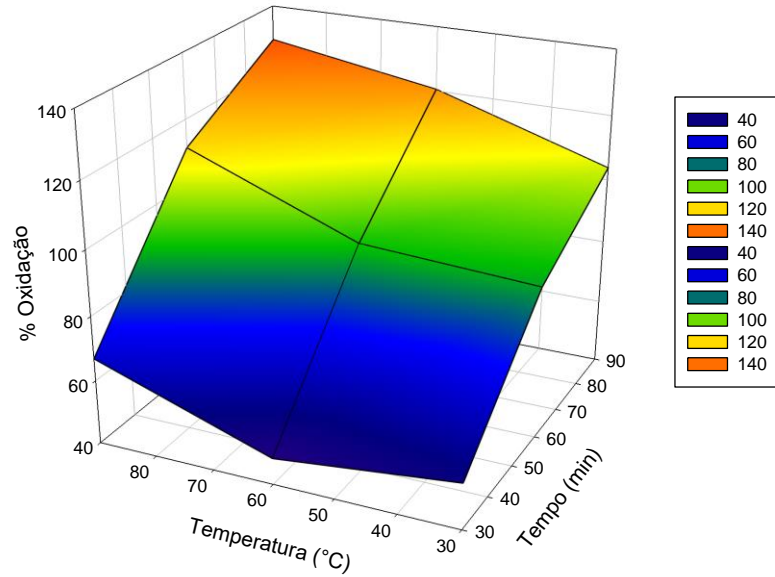


Figura 20 - Percentual de oxidação do betacaroteno + extrato etanólico de jenipapo seco em estufa em relação à oxidação do controle.

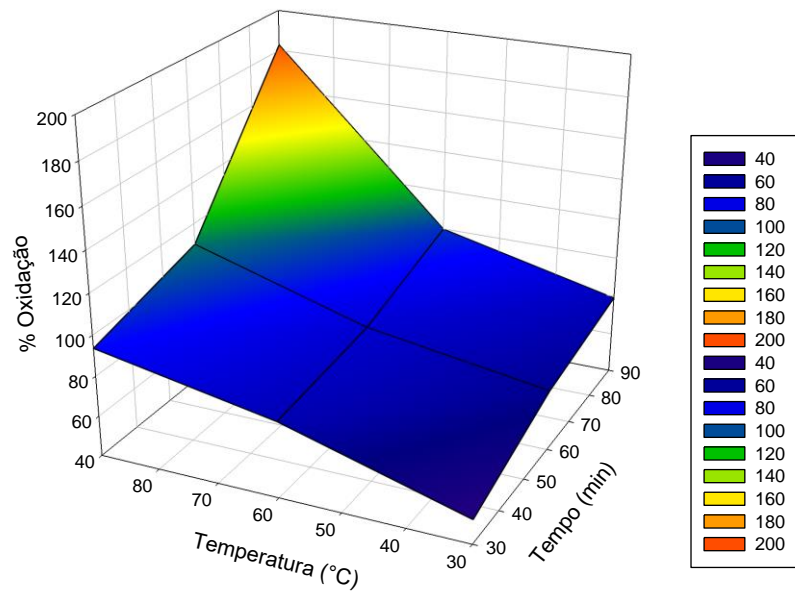


Figura 21 - Percentual de oxidação do betacaroteno + genipina em metanol em relação à oxidação do controle.

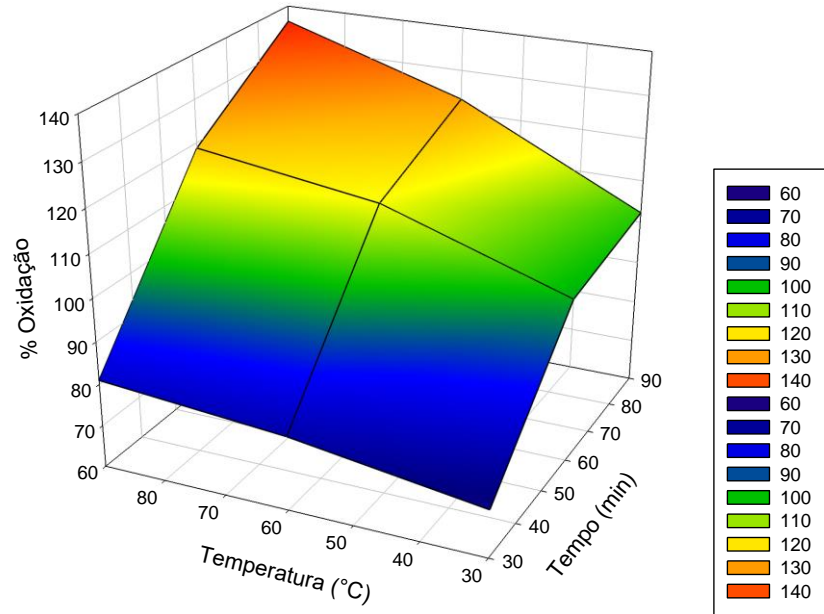
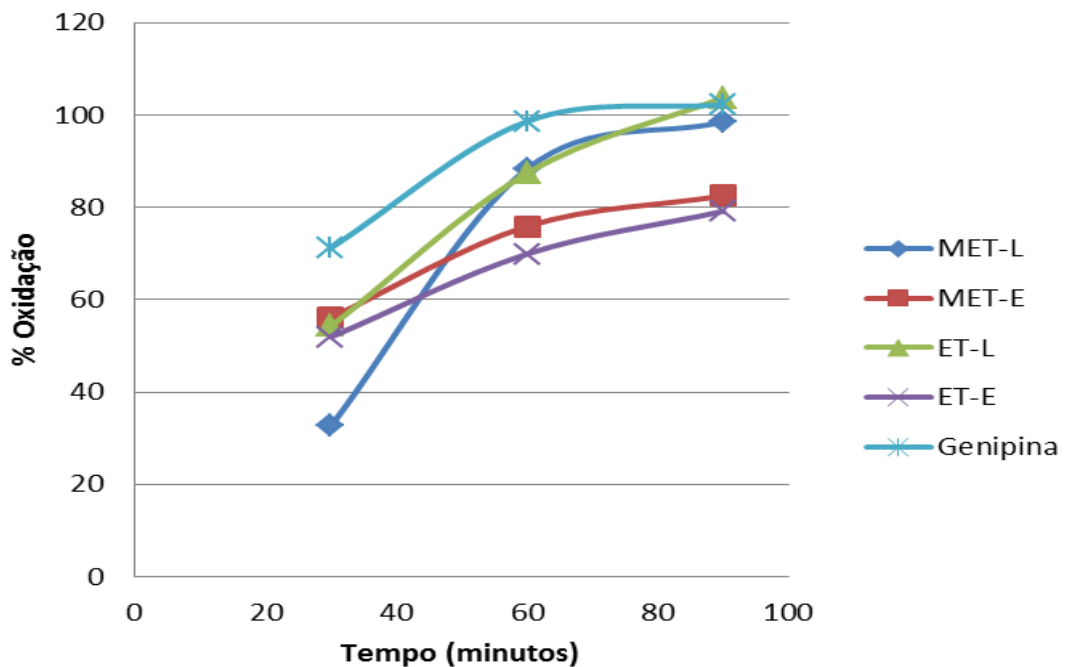


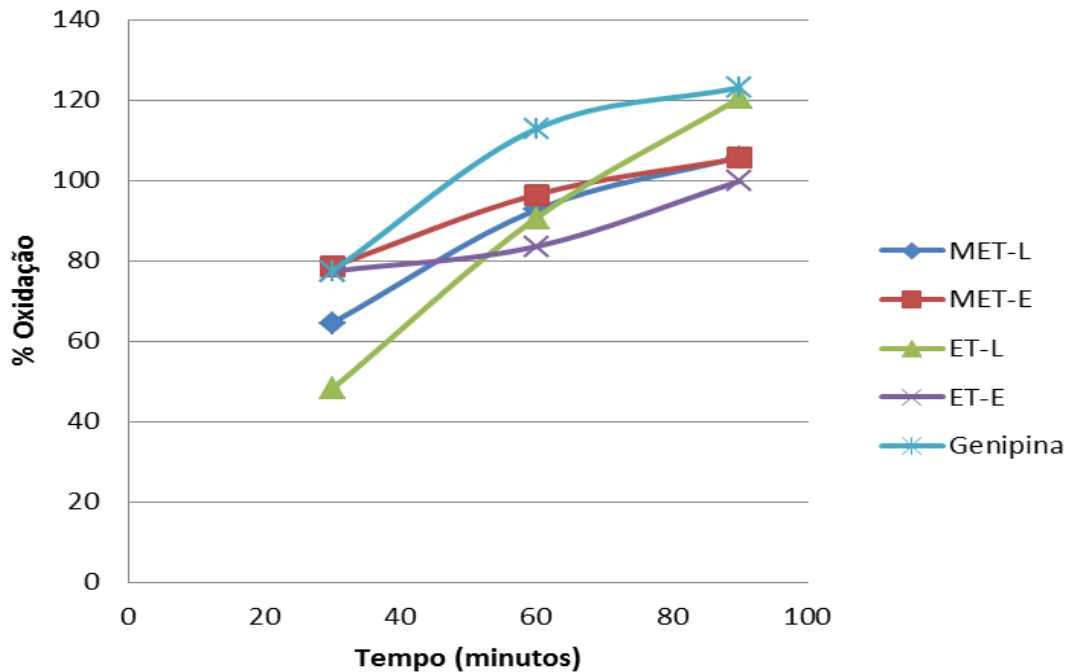
Figura 22 - Oxidação do betacaroteno a 30°C frente aos diversos extratos em relação à oxidação do controle.



oxidação do controle.

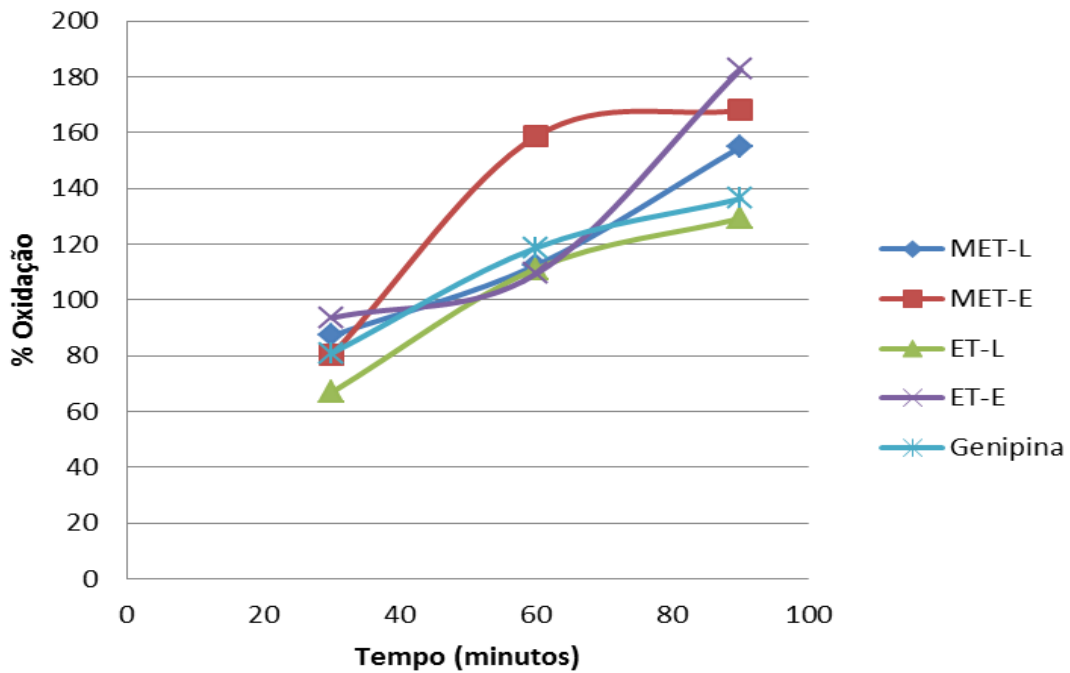
*Legenda: MET-L – extrato metanólico de jenipapo liofilizado; MET-E – extrato metanólico de jenipapo seco em estufa; ET-L – extrato etanólico de jenipapo liofilizado; ET-E – extrato etanólico de jenipapo seco em estufa.

Figura 23 - Oxidação do betacaroteno a 60°C frente aos diversos extratos em relação à oxidação do controle.



*Legenda: MET-L – extrato metanólico de jenipapo liofilizado; MET-E – extrato metanólico de jenipapo seco em estufa; ET-L – extrato etanólico de jenipapo liofilizado; ET-E – extrato etanólico de jenipapo seco em estufa.

Figura 24 - Oxidação do betacaroteno a 90°C frente aos diversos extratos em relação à oxidação do controle.



*Legenda: MET-L – extrato metanólico de jenipapo liofilizado; MET-E – extrato metanólico de jenipapo seco em estufa; ET-L – extrato etanólico de jenipapo liofilizado; ET-E – extrato etanólico de jenipapo seco em estufa.

Tabela 15 - Análise de variância do percentual de oxidação do betacaroteno em relação à oxidação do controle.

Tratamento	% Oxidação
Tipo de Extrato	
ET-L 1 mg.mL ⁻¹	90,25 ^a
MET-L 1 mg.mL ⁻¹	93,03 ^a
ET-E 1 mg.mL ⁻¹	94,18 ^a
MET-E 1 mg.mL ⁻¹	100,25 ^a
Genipina 0,25 mg.mL ⁻¹	102,40 ^a
Tempo	
30 minutos	68,10 ^a
60 minutos	100,47 ^b
90 minutos	119,49 ^c
Temperatura	
30°C	76.83 ^a
60°C	91.82 ^b
90°C	119.40 ^c
Temperatura em 30 minutos	
30°C	53,25 ^a
60°C	69,24 ^{a b}
90°C	81,81 ^b
Temperatura em 60 minutos	
30°C	84,03 ^a
60°C	95,25 ^a
90°C	122,14 ^b
Temperatura em 90 minutos	
30°C	93,23 ^a
60°C	110,98 ^a
90°C	154,25 ^b

Legenda: MET-L – extrato metanólico de jenipapo liofilizado; MET-E – extrato metanólico de jenipapo seco em estufa; ET-L – extrato etanólico de jenipapo liofilizado; ET-E – extrato etanólico de jenipapo seco em estufa.

De acordo com os resultados apresentados, não houve diferença significativa de oxidação na presença dos extratos e do padrão de genipina, mas houve diferença entre as

temperaturas e os tempos de tratamento (figuras 6 a 8). A análise do tempo x temperatura demonstrou que, para os diferentes tempos de tratamento, a temperatura de 90°C promoveu maior oxidação que as temperaturas de 30°C e 60°C, que não diferiram significativamente.

Não foi observada a preservação do β -caroteno submetido a alta temperatura na presença de nenhum dos extratos testados ou da genipina. Os resultados apresentados demonstram a importância do conhecimento do binômio tempo x temperatura no tratamento térmico, não só para a garantia da segurança microbiológica dos produtos alimentícios, mas para a preservação dos atributos sensoriais e estabilidade de seus diversos componentes, conforme pode ser observado para o β -caroteno, que sofreu maior oxidação em temperaturas mais elevadas (FELLOWS, 2006). Essas observações condizem com o encontrado por Rodrigues e colaboradores (2013), que aqueceram azeite de pequi a $180 \pm 5^\circ\text{C}$, por 0, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos e observaram que o aquecimento do azeite de pequi altera acentuadamente a tonalidade e a saturação de cor das amostras nas condições avaliadas, devido à degradação exponencial dos carotenoides durante o aquecimento, e que a cinética da perda de cor reflete as alterações visuais observadas na coloração do azeite. Desta forma, a utilização de temperaturas mais brandas para o tratamento térmico de produtos que possuem carotenoides em sua composição, como o β -caroteno, pode ser uma alternativa viável para a sua preservação durante o processamento.

V. CONCLUSÕES

A análise física e físico-química do jenipapo permitiu classificar os frutos utilizados neste estudo no estágio de maturação maduro, e a determinação da composição centesimal dos frutos demonstrou sua qualidade nutricional, sendo uma boa fonte de fibras, ferro e carotenoides, dentre outros nutrientes. Apesar de possuírem atividade antioxidante razoável e serem ricos em constituintes fenólicos, nenhum dos extratos de jenipapo testados nem a genipina promoveu a estabilidade do β -caroteno submetido a processamento térmico, mas foi possível demonstrar que a temperatura de tratamento foi determinante na oxidação do β -caroteno e, conseqüentemente, na sua descoloração. Desta forma, são necessários mais estudos para a determinação do binômio tempo x temperatura ideal para o tratamento térmico de produtos cuja cor é proveniente de carotenoides, de modo a reduzir perdas de qualidade sensorial e possibilitar a utilização mais eficiente desses pigmentos naturais pela indústria alimentícia. Além disso, outras concentrações dos extratos, assim como a utilização de frutos verdes, devem ser consideradas na realização de futuros estudos sobre a influência de constituintes do jenipapo sobre a estabilidade térmica de carotenoides.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKAO, T.; KOBASHI, K; ABURADA, M. Enzymic studies on the animal and intestinal bacterial metabolism of geniposide. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 17, p. 1573–1576, 1994.
- ALMOG, J.; COHEN, Y.; AZOURY, M.; HAHN, T. Genipin - a novel fingerprint reagent with colorimetric and fluorogenic activity. **Journal of Forensic Sciences**, v. 49, p. 255-257, 2004.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**. 18 ed. Washington: AOAC, 2010. 1094p.
- AQUINO, L. P.; FERRUA, F. Q.; BORGES, S. V.; ANTONIASSI, R.; CORREA, J. L. G.; CIRILLO, M. A. Influência da secagem do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) na qualidade do óleo extraído. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.29, p. 354-357, 2009.
- BARBOSA, D. A. Avaliação fitoquímica e farmacológica de *Genipa americana* L. (*Rubiaceae*). Rio de Janeiro, 2008. **Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)** - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.
- BELÉN-CAMACHO, D. R.; MORENO-ÁLVAREZ, M. J.; ALEMÁN, R.; ÁLVAREZ, F. J. Efectos de la temperatura de secado sobre la degradación de carotenoides em frutos de coroba (*Jessenia polycarpa* Karst). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 4, p. 206-210, 2004.
- BELÉN-CAMACHO, D. R.; ROMÁN, J. C.; PANTALEÓN, D. G.; MORENO-ÁLVAREZ, M. J.; MATÍNEZ, C. M.; ESCALINA, C. E. O. Efecto del secado solar em los contenidos de humedad, carbohidratos, carotenoides totales e índice de peróxidos del mesocarpio de la palma coroba (*Attalea* ssp.). **Interciencia: Revista de Ciencia y Tecnología de América**, v. 32, p. 257-261, 2007.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, London, v. 28, p. 25-30, 1995.
- BRASIL. **Resolução CNNPA N° 17, de 9 de maio de 1977**. Ministério da Saúde, Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. Diário Oficial da União 09.05.1997.
- BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**, volume 2/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010.
- CAMPOS, F. M.; ROSADO, G. P. Novos fatores de conversão de carotenoides provitamínicos A. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 3, p. 571-578, 2005.
- CARDOSO, S. L. Fotofísica de carotenoids e o papel antioxidante de β -caroteno. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 535-540, 1997.

CUI, L.; JIA, J.; GUO, Y.; LIU, Y.; ZHU, P. Preparation and characterization of IPN hydrogels composed of chitosan and gelatin cross-linked by genipin. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, p. 31–38, 2014.

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

DELPRETE, P.G.; SMITH, L.B.; KLEIN, R.M. In: REIS, A. (Ed.). **Rubiáceas: Flora Ilustrada Catarinense**. vol. 2. Itajaí – SC: Ademir Reis, 2005. p. 353-360.

DEMBITSY, V. M.; POOVARODOM, S.; LEONTOWICZ, H.; LEONTOWICZ, M.; VEARASILP, S.; TRAKHTENBERG, S.; GORINSTEIN, S. The multiple nutrition properties of some exotic fruits: Biological activity and active metabolites. **Food Research International**, v. 44, p. 1671-1701, 2011.

DIAS, M. G.; CAMÕES, M. F. G.F.C.; OLIVEIRA, L. Carotenoid stability in fruits, vegetables and working standards – Effect of storage temperature and time. **Food Chemistry**, v. 156, p. 37–41, 2014.

DING, Y.; HOU, J. W.; ZHANG, Y.; ZHANG, L. Y.; ZHANG, T.; CHEN, Y.; CAI, Z. Z.; YANG, L. Metabolism of genipin in rat and identification of metabolites by using ultraperformance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1-13, 2013.

DUARTE-ALMEIDA, J.M.; SANTOS, R.J.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Avaliação da Atividade Antioxidante utilizando Sistema β - Caroteno/Ácido Linoleico e Método de Sequestro de Radicais DPPH¹. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 2, p. 446-452, 2005.

FELLOWS, P. J. **Tecnologia do processamento de alimentos: princípios e práticas**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

FREITAS, A. S. Tartrazina: uma revisão das propriedades e análises de quantificação. **Acta Tecnológica**, v. 2, p. 65-72, 2012.

GHIDOUCHE, S.; REY, B.; MICHEL, M.; GALAFFU., N. A Rapid tool for the stability assessment of natural food colours. **Food Chemistry**, v. 139, p. 978–985, 2013.

HEIM, K.E. et al. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.13, p.572-584, 2002.

IAL - Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Tabelas de composição de alimentos**. 2 ed. Estudo nacional da despesa familiar. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Rio de Janeiro, 1981.

ISO - International Standard. **Determination of substances characteristic of green and black tea**. ISO 14502-1:2005 (E). Geneva: ISO Copyright, 2005.

- KANG, M. J.; KHANAL, T.; KIM, H. G. Role of metabolism by human intestinal microflora in geniposide-induced toxicity in HepG2 cells. **Archives of Pharmacal Research**, v. 35, p. 733-738, 2012.
- KIM; B.C.; KIM, H.G.; LEE, S. A.; LIM, S.; PARK, E. H.; KIM, S. J.; LIM, C. J. Genipin-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by reactive oxygen species/c-Jun NH2-terminal kinase-dependent activation of mitochondrial pathway. **Biochemical Pharmacology**, v. 70, p. 1398-1407, 2005.
- KOO, H. J.; SONG, Y. S.; KIM, H. J.; LEE, Y. H.; HONG, S. M.; KIM, S. J.; KIM, B. C.; JIN, C.; LIM, C. J.; PARK, E. H. Antiinflammatory effects of genipin, an active principle of gardenia. **European Journal of Pharmacology**, v. 495, p. 201-208, 2004.
- LIAW, J.; CHAO, Y. Effect of in vitro and in vivo aerosolized treatment with geniposide on tracheal permeability in ovalbumin-induced guinea pigs. **European Journal of Pharmacology**, v. 433, p. 115 – 121, 2001.
- LIMA, K. S. C.; GROSSI, J. L. S.; LIMA, A. L. S.; ALVES, P. F. M. P.; CONEGLIAN, R. C. C.; GODOY, R. L. O.; SABAA-SRUR, A. U. O. Efeito da irradiação ionizante γ na qualidade pós-colheita de cenouras (*Daucus carota* L.) cv. Nantes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, p. 202-208, 2001.
- MARCO, G. J. A rapid method for evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 45, p. 594-598, 1968.
- MESQUITA, J. B.; SANTOS, M. J. C.; RIBEIRO, G. T.; MOURA, A. O. Avaliação da composição de substratos e recipientes na produção de mudas de jenipapo (*Genipa americana* L.). **Acta Forestalis**, v.1, p.47-58, 2009.
- MILLER, H. E. A simplified method for the evaluation of antioxidant. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 48, p. 91, 1971.
- MORAIS, F. L. Carotenoides: características biológicas e químicas. Brasília, 2006. **Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Qualidade em Alimentos)** – Centro de Excelência em Turismo, Universidade de Brasília, Brasília, 2006.
- MORTON, J. F. Genipapo. In: MORTON, J. F. (Ed.) **Fruits of warm climates**. 1987. p. 441-443.
- OLIVEIRA, A. L.; ALMEIDA, E.; SILVA, F. B. R.; NASCIMENTO FILHO, V. F. Elemental contents in exotic Brazilian tropical fruits evaluated y energy dispersive X-ray fluorescence. **Scientia Agricola**, v. 63, n. 1, p. 82-84, 2006.
- OTTAWAY, P. B. **The technology of vitamins in foods**. Glasgow: Blackie Academic & Professional, Chapman & Hall, 1993.
- PACHECO, P.; PAZ, J. G.; SILVA, C. O.; PASCOAL, G. B. Composição centesimal, compostos bioativos e parâmetros físico-químicos do jenipapo (*genipa americana* L.) in natura. **Demetra**, v. 9, p. 1041-1054, 2014.
- PRADO, M. A.; GODOY, H. T. Corantes Artificiais em Alimentos. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 14, p. 237-250, 2003.

PRADO NETO, M.; DANTAS, A. C. V. L.; VIEIRA, E. L.; ALMEIDA, V. O. Germinação de sementes de jenipapeiro submetidas à pré-embebição em regulador e estimulante vegetal. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, p. 693-698, maio/jun., 2007.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4 p. 755-760, 2006.

RAMOS-DE-LA-PEÑA, A. M.; RENARD, C. M.; WICKER, L.; MONTAÑEZ, J. C.; GARCÍA-CERDA, L. A.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C. Environmental friendly cold-mechanical/sonic enzymatic assisted extraction of genipin from genipap (*Genipa americana*). **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 21, p. 43-49, 2014.

RENHE, I. R. T.; STRINGHETA, P. C.; SILVA, F. F.; OLIVEIRA, T. V. Obtenção de corante natural azul extraído de frutos de jenipapo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, p. 649-652, 2009.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Instituto Mauá de Tecnologia, Edgard Blucher, 2007.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M. **Harvestplus Handbook for Carotenoid Analysis**. HarvestPlus Technical Monograph 2. Washington, DC and Cali: International Food Policy Research Institute (IFPRI) and International Center for Tropical Agriculture (CIAT). Copyright HarvestPlus, 2004.

RODRIGUES, M. L.; SOUZA, A. R. M.; LIMA, J. C. R.; MOURA, C. J.; GERALDINE, R. M. Cinética da degradação de carotenoides e da alteração de cor do azeite de pequi submetido ao aquecimento em temperatura de fritura. **Ciência Rural**, v.43, p.1509-1515, 2013.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. **Fontes brasileiras de carotenoides**: tabela brasileira de composição de carotenoides em alimentos. Brasília: MMA/SBF, 2008.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; JIMENEZ, J. P.; CALIXTO, F. D. S. Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Comunicado Técnico Embrapa**, v. 127, p. 1-4, 2007.

SANDRI, S. Jenipapo. **Globo Rural**, v.13, p. 60-63, 1998.

SANTOS, R. O. S. Caracterização de jenipapeiros (*Genipa americana L.*) em Cruz das Almas-BA. 2001. 70 f. **Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias)** – Escola de Agronomia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2001.

SILVA, A. P.; LIMA, C. L. C.; VIEITES, R. L. Caracterização química e física do jenipapo (*Genipa americana L.*) armazenado. **Scientia Agricola**, v. 55 n. 1 Piracicaba, jan./abr. 1998.

SILVA, A. V. C.; YAGUIU, P.; ALMEIDA, C. S.; FEITOSA, R. B. **Caracterização físico-química de jenipapo**. Aracaju: EMBRAPA, 2009.

SOUSA, C. S. da; SILVA, S.A.; HANSEN, D. S.; FONSECA, A. A. O. Correlações entre caracteres físicos e químicos de jenipapeiros nativos do Recôncavo Baiano. Nota Científica. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 270-272, jul. 2007.

SOUZA, C. N. Características físicas, físico-químicas e químicas de três tipos de jenipapos (*Genipa americana* L.), 2007. 72 f. **Dissertação** (Mestrado em Produção Vegetal) – Programa de Pós-Gradual em Produção Vegetal, Universidade Estadual de Santa Cruz, 2007.

SOUZA, R. K. D.; MENDONÇA, A. C. A. M.; SILVA, M. A. P. Aspectos etnobotânicos, fitoquímicos e farmacológicos de espécies de Rubiaceae no Brasil. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 18, n. 1, p. 140-156, 2013.

TONDA-TURO, C.; GENTILE, P.; SARACINO, S.; CHIONO, V.; NANDAGIRI, V. K.; MUZIO, G.; CANUTO, R. A.; CIARDELLI, G. Comparative analysis of gelatin scaffolds crosslinked by genipin and silane coupling agente. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 49, p. 700–706, 2011.

UEDA, S.; IWAHASHI, Y. Production of anti-tumor-promoting iridoid glucosides in *Genipa americana* and its cell cultures. **Journal of Natural Products**, v. 54, p. 1677-1680, 1991.

WANG, S. W.; LAI, C. Y.; WANG, C. J. Inhibitory effect of geniposide on aflatoxin B1-induced DNA repair synthesis in primary cultured rat hepatocytes. **Cancer Letters**, v. 65, p. 133 – 137, 1992.

WANG, S.; TSENG, T.; HUANG, C.; TSAI, T. Gardenia herbal active constituents: applicable separation procedures. **Journal of Chromatography B**, v. 812, p. 193-202, 2004.
WONG, S.W.S. **Química de los alimentos: mecanismos y teoría**. Zaragoza: Acribia, 1995. 475p.

XAVIER, M.; XAVIER, A. T. T. N. Jenipapo: uma espécie indígena para reflorestar. **Cerrado**, v.8, p. 20-23, 1976.