

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

OBTENÇÃO DE CORANTE NATURAL A PARTIR DE CAROÇO DE ABACATE
(Persea americana)

Juliana Maciel Holbach

Porto Alegre, 2012/2

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

OBTENÇÃO DE CORANTE NATURAL A PARTIR DE CAROÇO DE ABACATE
(Persea americana)

Juliana Maciel Holbach

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia de Alimentos como requisito parcial para obtenção do Título de Engenheiro de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Alessandro de Oliveira Rios

Porto Alegre, 2012/2

OBTENÇÃO DE CORANTE NATURAL A PARTIR DE CAROÇO DE ABACATE
(Persea americana)

Juliana Maciel Holbach

Aprovada em: __/__/__

BANCA EXAMINADORA

Alessandro de Oliveira Rios (Orientador)
Doutor em Ciência dos Alimentos
ICTA/UFRGS

Simone Hickmann Flores
Doutora em Engenharia de Alimentos
ICTA/UFRGS

Kleidson Brito de Sousa Lobato
Engenheiro de Alimentos

Dedicatória

Dedico este trabalho de conclusão aos meus pais, Marecy e Henrique, que me deram todas as condições para ser Engenheira de Alimentos e, mais do que isso, estiveram ao meu lado e sempre me apoiaram em todas as minhas decisões.

Dedico ainda este trabalho a todas as pessoas que buscam alternativas para a reutilização de qualquer resíduo, seja ele da produção de alimentos ou qualquer outro setor. Teremos um mundo melhor quando cada um fizer a sua parte.

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais pelo apoio e compreensão durante todos os anos que estive na UFRGS cursando Engenharia de Alimentos, e por todos os anos anteriores também! À minha mãe, agradeço pelo amor, pelo carinho, pela preocupação e, sobretudo, por me mostrar que não devo desistir na presença do primeiro obstáculo. Ao meu pai, agradeço pelo cuidado, pela confiança depositada e pela constante preocupação com meu futuro profissional.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, agradeço pela oportunidade e aos meus professores que tiveram participação importantíssima na minha formação e serviram de exemplo pra mim. Agradeço principalmente aos professores que demonstraram compreensão e me apoiaram quando fiz intercâmbio: prof. Dr. Julio Nitzke, Prof. Dra. Rosane Rech, Prof. Dra. Roberta Thys, Prof. Dra. Florencia Cladera e Prof. Dr. Marco Antonio Ayub. Em especial, meu orientador Prof. Dr. Alessandro de Oliveira Rios, pela orientação, pela amizade, por toda a ajuda de sempre.

Agradeço também ao ICTA, que se tornou um lugar de boa convivência com colegas, amigos, professores e funcionários.

Aos meus amigos e amigas, sejam eles do colégio, da faculdade, do intercâmbio, meu sincero agradecimento. Obrigada por todos os momentos que passamos juntos. Tê-los na minha vida facilitou toda a minha trajetória e deixou esse caminho muito mais divertido!

Agradeço ao pessoal do Laboratório 211, pela ajuda no início do trabalho, pelas risadas. Agradeço ao Kleidson Lobato e à Karla Moresco, por toda a boa vontade e disponibilidade em me ajudar, pela paciência no ensino do uso dos equipamentos, por tudo.

Aos membros da banca, Prof. Dr. Alessandro, Prof. Dra. Simone e Eng° Kleidson, pelas sugestões e disponibilidade.

A todos que, de alguma forma, colaboraram para que meu trabalho tenha sido realizado com sucesso e a minha jornada, completa.

"Laughter is timeless. Imagination has no age. And dreams are forever."

Walt Disney

RESUMO

Com a crescente busca por alimentos mais saudáveis, naturais e com aparência agradável, a obtenção e uso de corantes naturais tornam-se importantes no mercado atual. Além da função de corante, existem interesses nas propriedades medicinais e seus efeitos na saúde humana. No grupo de corantes naturais, os carotenoides são os principais pigmentos naturais responsáveis pelas colorações amarela, laranja ou vermelha de muitos alimentos. Seus efeitos benéficos estão associados às suas propriedades antioxidantes e antidegenerativas. Uma fonte de carotenoides é o abacate (*Persea americana*), que contém esses pigmentos em sua casca, polpa e caroço. No processamento do fruto, o caroço é descartado, mas contém carotenoides. Logo, o caroço de abacate tem potencial para servir de matéria-prima para a extração de corante natural. Este trabalho teve por objetivo realizar extração de carotenoides a partir do caroço de abacate utilizando etanol como solvente. Os ensaios foram determinados por meio de um Planejamento Experimental Completo (2^3) para avaliar os efeitos do volume de solvente (mL), número de extrações e tempo de extração (minutos). Foram obtidos extratos com concentração de carotenoides totais entre 9,2 mg/100 g e 14,13 mg/100 g de amostra. Através da análise estatística para cada variável, observou-se que as variáveis número de extrações e tempo de extração foram significativas com efeitos positivos, indicando que o aumento dos valores dessas variáveis fazem crescer o teor de carotenoides extraídos. O modelo desenvolvido por superfície de resposta explica essa variabilidade.

Palavras-chave: extração de carotenoides, caroço de abacate, solvente, planejamento experimental.

ABSTRACT

With the growing demand for healthier food, natural and pleasing appearance, obtaining and using natural dyes become important in the current market. Besides the function of dye, there are interests in medicinal properties and their effects on human health. In the group of natural pigments, carotenoids are the main natural pigments responsible for the colors yellow, orange or red in many foods. Its beneficial effects are associated with its antioxidant and antidegeneratives. A source of carotenoids is the avocado (*Persea americana*), which contains these pigments in their peel, pulp and seed. In the processing of the fruit, the seed is discarded, but contains carotenoids. Therefore, the avocado seed has the potential to serve as raw material for the extraction of natural dye. This study aimed to perform extraction of carotenoids from avocado seeds using ethanol as a solvent. The assays were determined by an experimental design (2^3) for evaluating the effects of solvent volume (mL), numbers of extractions and extraction time (minutes). Extracts were obtained with total carotenoid concentration between 9.2 mg/100 g and 14.13 mg/100 g sample. Through statistical analysis for each variable noted that the variable number of extractions and extraction time were significant with positive effects indicating the increased values of these variables do grow the content of carotenoids extracted. The model developed by response surface explains this variability.

Key-words: extraction of carotenoids, avocado seed, solvent, experimental design.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	11
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1	Corantes Naturais	13
2.1.1	Carotenoides.....	14
2.1.2	Ação Antioxidante	15
2.1.3	Fontes de Carotenoides.....	16
2.2	Abacate	16
2.2.1	Caroço de Abacate	17
2.3	Extração e Separação de Carotenoides.....	18
2.4	Mercado e Aplicação em Alimentos	19
2.5	Referências	20
3.	ARTIGO – OBTENÇÃO DE CORANTE NATURAL A PARTIR DE CAROÇO DE ABACATE (<i>PERSA AMERICANA</i>).....	23
3.1	INTRODUÇÃO	23
3.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.2.1	Materiais	24
3.2.2	Umidade.....	25
3.2.3	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	25
3.2.4	Extração de Carotenoides.....	26

3.2.5	Quantificação de Carotenoides.....	28
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
3.3.1	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	28
3.3.2	Teor de Umidade	30
3.3.3	Quantificação dos Extratos de Carotenoides	30
3.4	CONCLUSÃO.....	39
3.5	REFERÊNCIAS.....	40
	ANEXOS	42

1. INTRODUÇÃO

A utilização de corantes em alimentos é um assunto atual e polêmico, uma vez que a principal justificativa, na maioria dos casos, é tornar o produto mais atrativo. Os corantes sintéticos têm sido questionados devido a seus efeitos adversos à saúde e progressivamente banidos da composição de alimentos. Por isso, é crescente o emprego de corantes naturais na indústria alimentícia e de bebidas por apresentarem ausência de toxidez, possibilitando uma qualidade de vida melhor e menos riscos para a saúde do consumidor (CONSTANT; STRINGHETA; SANDI, 2002).

Sabe-se que grande parte da aceitação do produto está relacionada à cor. A cor é uma característica sensorial muito importante e, embora subjetiva, acaba induzindo a sensação global do alimento, sendo associada ao aroma, ao sabor e à textura. Mais que necessária para a sobrevivência, a alimentação é fonte de prazer e satisfação. Dessa forma, a indústria de alimentos preocupa-se com a aparência da cor dos produtos, para que sejam agradáveis aos olhos dos consumidores (COLLINS e PLUMBLY, 1995; FREUND et al., 1988).

Os consumidores se mostram cada vez mais interessados nos benefícios da boa alimentação para controle e até mesmo prevenção de doenças. Dessa forma, a presença de ingredientes e aditivos naturais é muito valorizada, ainda mais quando se trata do uso de corantes em alimentos (HARDY, 2000).

Dentre os corantes naturais disponíveis para utilização em alimentos, tem-se o grupo de carotenoides. São importantes pigmentos naturais e são responsáveis pela cor amarela, laranja ou vermelha de muitos alimentos, o que os caracterizam com propriedade de importância tecnológica, uma vez que a cor é um dos atributos que tem maior influência na aceitação dos alimentos. Alguns carotenoides são precursores de vitamina A e alimentos contendo tais pigmentos podem ser utilizados no combate à deficiência desta vitamina. (RODRIGUEZ-AMAYA et al., 2008).

Uma fonte para extração de carotenoides são os resíduos produzidos no processamento de vegetais: as cascas, folhas, sementes e caroços. Esses resíduos, em sua grande maioria, descartados poderiam ter utilidade benéfica aos seres humanos e ao ambiente, já que contêm nutrientes e compostos bioativos.

Lu et al. (2005) estudaram o abacate e encontraram que a polpa da variedade *Hass* continha os seguintes pigmentos e concentrações: 2,93 $\mu\text{g/g}$ de luteína, 0,11 $\mu\text{g/g}$ de zeaxantina, 0,25 $\mu\text{g/g}$ de β -criptoxantina e α -caroteno, e 0,60 $\mu\text{g/g}$ de β -caroteno.

Outras variedades já foram estudadas, onde a luteína foi o carotenoide presente em maior quantidade, com carotenoides totais variando 10 a 14 $\mu\text{g/g}$ em peso fresco. A casca apresentou 40 $\mu\text{g/g}$ (peso fresco), enquanto que a concentração de luteína na polpa, era cerca de 50% do conteúdo da casca (GROSS, 1973).

Assim como a polpa e a casca, o caroço do abacate, mais precisamente a casca que envolve o caroço apresenta relevante quantidade de carotenoides e pode ser reaproveitada. Um modo de reutilização interessante seria a extração desses pigmentos naturais.

De acordo com a legislação brasileira, é permitido o uso de corantes naturais em alimentos obtidos por meio de extração com etanol, que é um solvente de custo acessível (BRASIL, 2012).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Corantes Naturais

A cor dos alimentos é um dos parâmetros sensoriais mais importantes e está diretamente ligado com a sua aceitação pelos consumidores. A cor é a primeira característica percebida pelo público e, muitas vezes, é decisiva para compra ou consumo de um produto.

Essa característica é ainda importante para associação com o sabor dos alimentos. Por isso, os fabricantes preocupam-se em aplicar corantes para reestabelecer uma cor perdida no processamento do alimento, e tornar novamente esse alimento desejável (CLIFFORD, 2000).

Para utilização em alimentos, têm-se disponíveis corantes de duas grandes principais classes: naturais e sintéticos. Os corantes sintéticos possuem baixo custo de produção e, ao mesmo tempo, maior estabilidade. Porém, o uso de aditivos sintéticos permitidos no Brasil diminui a cada ano, abrindo espaço no mercado para os pigmentos naturais (CONSTANT, 2002).

Os anos passam e a expectativa de vida aumenta. Inerente a isso, estão as especulações na mídia sobre questões relativas à saúde e bem-estar. Os consumidores se mostram cada vez mais interessados nos benefícios da boa alimentação para controle e até mesmo prevenção de doenças. Dessa forma, a presença de ingredientes e aditivos naturais é bastante valorizada, principalmente quando se trata do uso de corantes em alimentos (HARDY, 2000).

No Brasil, a legislação vigente para o emprego de corantes em alimentos conta do decreto de 1965, modificada em 1997, pela portaria nº 540. De acordo com o Ministério da Saúde, os corantes são classificados como: corante orgânico natural (obtido a partir de vegetal, ou eventualmente, de animal, cujo princípio corante tenha sido isolado com o emprego de processo tecnológico adequado), corante orgânico sintético (aquele obtido por síntese orgânica mediante o emprego de processo tecnológico adequado), corante artificial (corante orgânico sintético não encontrado em produtos naturais), corante orgânico sintético idêntico ao natural (corante orgânico sintético cuja estrutura química é semelhante à do princípio ativo isolado de corante orgânico natural) e corante inorgânico ou pigmento (obtido a partir de substâncias minerais e submetido a processos de elaboração e purificação

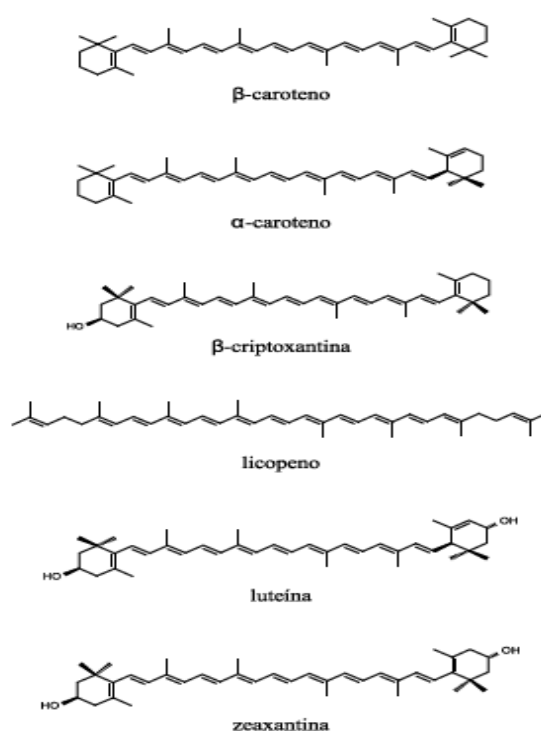
adequados a seu emprego em alimento). Os alimentos adicionados de corantes orgânicos naturais não precisam apresentar o termo “colorido artificialmente” em sua rotulagem, já aqueles que contêm corantes artificiais devem, impreterivelmente, ter essa declaração (BRASIL, 2012).

Segundo Netto (2009), os corantes que têm sido mais empregados pela indústria de alimentos são extratos de urucum, carmim de cochonilha, curcumina, antocianinas e betalaínas.

2.1.1 Carotenoides

Carotenoides são pigmentos naturais responsáveis por conferirem cor amarela, laranja ou vermelha a muitos alimentos. A cor é uma propriedade de grande importância tecnológica, pois influencia diretamente na aceitação dos produtos. No entanto, os benefícios que esses compostos são capazes de trazer à saúde humana é que são alvos de estudo de grupos de pesquisa do mundo inteiro (RODRIGUEZ-AMAYA, 2008). Na Figura 1, são apresentadas as estruturas dos carotenoides considerados mais importantes para a saúde humana.

Figura 1 - Estruturas dos carotenoides considerados importantes para a saúde (Fonte: Tabela Brasileira de Carotenoides, 2008).



Com mais de 600 estruturas já caracterizadas, os carotenoides formam um grande grupo de pigmentos amplamente presentes na natureza (FRASER, 2004; ASTORG, 1997; SU, 2002; WINTHERHALTER, 2002). Identificados em organismos fotossintetizantes e não fotossintetizantes, plantas superiores, algas, fungos, bactérias e em alguns animais (FRASER, 2004; SU, 2002; MALDONADO-ROBLEDO; 2003), são responsáveis pelas cores do amarelo ao vermelho de frutas, vegetais, fungos e flores (MALDONADO-ROBLEDO, 2003). Além disso, são utilizados comercialmente como corantes alimentícios e em suplementos nutricionais, com um mercado global estimado em US\$ 935 milhões no ano de 2005 (FRASER, 2004).

2.1.2 Ação Antioxidante

Alguns carotenoides são precursores de vitamina A e, para combater a deficiência dessa vitamina, alimentos ricos em pró-vitaminas A são bastante indicados. Além disso, o fortalecimento do sistema imunológico, a diminuição do risco de doenças degenerativas como o câncer, doenças cardiovasculares, degeneração macular e catarata tem sido atribuídas aos carotenoides (RODRIGUEZ-AMAYA, 2008).

Estudos indicam que os carotenoides desempenham papel importante na saúde dos seres humanos, sendo, por exemplo, essenciais para a visão. Embora muitas hipóteses já tenham sido comprovadas, suas funções não são consideradas elucidadas por completo em seres vivos. O β -caroteno e outros carotenoides são reconhecidos desde século XX como as principais fontes de vitamina A. Mais recentemente, efeitos benéficos de carotenoides contra cânceres, doenças cardiovasculares e degeneração macular foram detectados e estimularam intensas investigações sobre a função desses compostos como antioxidantes e como reguladores do sistema imune (DELGADO-VARGAS, 2000).

Por exemplo, o licopeno, que é um caroteno presente em produtos de tomate, previne a oxidação do LDL, diminuindo o risco de doenças do coração (AGARWAL, 1998). Carotenoides são eficientes a favor do sistema imunológico e na

comunicação intracelular, sendo considerados benéficos contra males trazidos pelo envelhecimento (UENOJO, 2007).

Estudos demonstram que tanto a luteína e a zeaxantina são seletivamente depositada na retina e que impedem contra a degeneração macular, uma das principais causas de cegueira em pessoas com mais de 60 anos de idade (KRINSKY, LANDRUM, e BONE, 2003). A luteína, embora não tenha atividade de pró-vitamina A, possui atividade antioxidante, o que é uma das propriedades mais importantes do grupo dos carotenoides.

2.1.3 Fontes de Carotenoides

Carotenoides constituem um grupo importante de pigmentos naturais e são responsáveis pelas cores de muitas frutas, hortaliças, gema de ovo, crustáceos e alguns peixes (RODRIGUEZ-AMAYA, 2008).

Apesar de existirem em um número muito maior, apenas cerca de 40 deles estão presentes na dieta diária das pessoas. Quase 90% dos carotenoides ingeridos pelos humanos são representados por β -caroteno, α -caroteno, licopeno, luteína e criptoxantina (GERSTER, 1997).

Segundo Rodriguez-Amaya (2008), buriti, manga e goiaba são fontes de β -caroteno. Já nectarina, cajá, mamão papaia e pitanga são fontes de β -criptoxantina.

Nos vegetais folhosos, os principais carotenoides encontrados são: luteína, β -caroteno, violaxantina e neoxantina (RODRIGUEZ-AMAYA, 2008).

Murillo et al (2010) estudaram o conteúdo de carotenoides totais e comprovaram que a presença desses pigmentos é significativa. Obtiveram resultados como $124 \pm 8,7 \mu\text{g/g}$ para espinafre, $97,7 \pm 10,5 \mu\text{g/g}$ para agrião, $97,2 \pm 12,6 \mu\text{g/g}$ para chicória, $173 \pm 35,2 \mu\text{g/g}$ para abóbora, $140 \pm 18,6 \mu\text{g/g}$ para pimenta vermelha e $91,0 \pm 8,3 \mu\text{g/g}$ para cenoura.

2.2 Abacate

O abacate (*Persea americana* Mill.) é um alimento com boa qualidade nutritiva, porque possui alto teor de fibras, sais minerais, vitamina E (USDA, 2007) e também significativo conteúdo de ácidos graxos insaturados, que auxiliam na prevenção de doenças cardiovasculares (TANGO et al., 2004). Além disso, estudos demonstram

que no abacate tem-se a presença de carotenoides, compostos lipofílicos benéficos para a saúde (DING et al., 2007).

São muitas variedades de abacates no mundo, o que ajuda a sua difusão e sua qualificação comercial nas diferentes regiões e países consumidores, cuja preferência segue o hábito alimentar, sendo escolhidas conforme suas características. Os cultivares mais consumidos no Brasil são Geada, Quintal, Breda, Fortuna e Margarida, os quais possuem um gosto mais doce, atendendo às características do hábito alimentar do consumidor brasileiro. As regiões sudeste e nordeste do Brasil são aquelas que mais compram a fruta para consumir como fonte de alimentação, para consumo *in natura*. Além disso, o abacate pode ser excelente fonte de óleos e pode ainda ser utilizado em produtos do setor de cosméticos (ABACATE, 2012).

O abacateiro é cultivado por toda a extensão do território brasileiro. Tango e Turatti (1992) afirmam que é uma das plantas que mais rende por unidade de área cultivada.

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, a produção de abacates no Rio Grande do Sul, em 2011, foi de 6.907 toneladas, com uma área plantada de 552 hectares. O rendimento médio do cultivo foi de 12.512 kg/hectare, totalizando um valor de produção de R\$ 6.631.000,00.

Abacates apresentam altos teores de lipídeos em sua polpa e, portanto, constituem-se uma matéria-prima importante para obtenção de óleo. Analisando a quantidade de óleo que pode ser obtida por unidade de área plantada, de acordo com estudos comparativos realizados por Canto et al. (1980) com algodão, amendoim e soja, é bem mais elevada do que de qualquer dessas sementes oleaginosas cultivadas. Ou seja, a extração de óleo de abacate torna-se interessante no cenário brasileiro, mas deve-se pensar ainda em um destino comercial para seus subprodutos: casca e caroço, que representam cerca de 30% do total do fruto.

2.2.1 Caroço de Abacate

O Brasil é um dos grandes exportadores de alimentos do mundo. Porém, é também um dos maiores contribuintes quando se trata de desperdício e geração de lixo no planeta. Com uma produção que alcança cerca de 140 milhões de toneladas

de alimentos por ano (GONDIM et al., 2005), o país exporta grande quantidade de produtos agrícolas, mas mantém uma parcela da sociedade excluída, sem acesso à alimentação de qualidade.

O desperdício, além da enorme geração de resíduos, está ligado a outros problemas sociais, como a fome e a desnutrição, que atingem parte da população brasileira. Fatos como esses motivam estudos para maximizar o aproveitamento dos alimentos e até mesmo sua utilização integral, visando melhorar aspectos nutricionais das refeições, incorporando subprodutos ricos em compostos bioativos na dieta dos brasileiros, além de diminuir o impacto ambiental e a despesa do consumidor.

Ao consumir o abacate, utiliza-se, na grande maioria das vezes, apenas a polpa do fruto. O restante, casca e caroço, não tem nenhum aproveitamento e são jogados no lixo, embora já tenham sido realizados estudos que comprovam a presença de micronutrientes importantes para os seres humanos, tanto na casca quanto no caroço de abacate.

Lu et al. (2005) estudaram o abacate e encontraram que a polpa da variedade *Hass* continha os seguintes pigmentos e concentrações: 2,93 $\mu\text{g/g}$ de luteína, 0,11 $\mu\text{g/g}$ de zeaxantina, 0,25 $\mu\text{g/g}$ de β -criptoxantina e α -caroteno, e 0,60 $\mu\text{g/g}$ de β -caroteno.

Outras variedades já foram estudadas, onde a luteína foi o carotenoide presente em maior quantidade, com carotenoides totais variando 10 a 14 $\mu\text{g/g}$ em peso fresco. A casca apresentou 40 $\mu\text{g/g}$ (peso fresco), enquanto que a concentração de luteína na polpa, era cerca de 50% do conteúdo da casca (GROSS, 1973).

Assim como a polpa e a casca, o caroço do abacate, mais precisamente a casca que envolve o caroço apresenta relevante quantidade de carotenoides e pode ser reaproveitada. Um modo de reutilização interessante seria a extração desses pigmentos naturais.

2.3 Extração e Separação de Carotenoides

O solvente a ser utilizado na extração de carotenoides varia de acordo com a amostra em análise. Segundo Mercadante (1999), a acetona é um solvente eficiente

quando se trabalha com alimentos *in natura*; já o acetato de etila e o dietil éter são capazes de realizar extrações mais eficazes quando aplicados em produtos secos ou liofilizados.

Já foram realizadas pesquisas de extração e separação de carotenoides em diversos alimentos. Ashton et al (2006) estudaram a variedade de abacate *Hass* quanto à presença de pigmentos na sua casca, utilizando acetona como solvente, encontrando 2,05 mg de luteína a cada 100 g de amostra.

Já Ajila et al (2007) pesquisaram, na Índia, o conteúdo de carotenoides totais na casca de manga e essas extrações foram realizadas com etanol e acetona. O melhor resultado obtido foi de 403 mg/100g de casca, utilizando o método espectrofotométrico de Davis.

Outro estudo realizado em subproduto da indústria de alimentos foi uma pesquisa realizada por Lutterodt et al (2011), em farinha de semente de uva, dessa vez utilizando hexano como solvente. O teor mais elevado de β -caroteno foi 466 mg/100g de farinha de semente de uva, para luteína foi de 96 mg/100g, 15,95 mg/100g para zeaxantina e 5,4 mg/100g de criptoxantina.

Um dos métodos mais utilizados para separação de carotenoides é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), onde são utilizadas colunas de sílica gel (C₃₀ ou C₁₈) (MECARDANTE, 1997). Métodos espectrofotométricos também podem ser utilizados para análise de carotenoides, segundo Ajila et al (2007), no estudo da casca de manga.

2.4 Mercado e Aplicação em Alimentos

Sabe-se que as diversas etapas de processamento na indústria de alimentos podem degradar os pigmentos naturais presentes nos produtos. Corantes são adicionados para retomar a cor original do alimento ou até mesmo ligar a cor ao seu aroma, tornando-os mais atrativos aos consumidores (CONSTANT, 2002).

Durante anos o maior representante dos carotenoides, o β -caroteno, tem sido aplicado como corante na indústria de alimentos. Calcula-se que esse mercado tenha movimentado cerca de 242 milhões de dólares em 2004 (GUZMAN, 2005).

A legislação brasileira vigente permite a utilização dos seguintes solventes e veículos de emprego autorizado na elaboração e processamento dos corantes:

água, açúcares, álcool etílico, amidos, cloreto de sódio, dextrina, gelatina, glicerol, óleos e gorduras comestíveis (BRASIL, 2012). Logo, tem-se uma gama de compostos os quais podem estar presentes na etapa de extração, no caso dos pigmentos naturais, ou na etapa de produção dos corantes artificiais, o que permite a aplicação de diversas tecnologias no processo de obtenção dos mesmos, permitindo, posteriormente, seu uso em alimentos.

2.5 Referências

ABACATE: uma fruta nutritiva e lucrativa. Coopercitrus. Revista Agropecuária, Bebedouro, SP, n. 256. Disponível em: <<http://www.revistacoopercitrus.com.br/?pag=materia&codigo=5269>>. Acesso em: 19 nov. 2012.

AGARWAL, S.; RAO, A. V. Tomato lycopene and low-density lipoprotein oxidation: a human dietary intervention study. **Lipids**, v. 33, p. 981 – 984, 1998.

AJILA, C.M.; BHAT, S.G.; RAO, U.J.S. Prasada. Valuable components of raw and ripe peels from two Indian mango varieties. **Food Chemistry**, Mysore, India, n. 102, p.1006-1011, 22 jun. 2006.

ASHTON, Ofeliz B. O. et al. Pigments in Avocado Tissue and Oil. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, Auckland, p. 10151-10158. 12 ago. 2006.

ASTORG, P. Food carotenoids and cancer prevention: An overview of current research. Trends Food Science and Technology, Dijon Cedex, v.8, n. 12 p. 406 - 413, 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – CNNPA n.º 44, de 25 de novembro de 1977. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/44_77.htm>. Acesso em: 17 nov. 2012.

CANTO, W. L.; SANTOS, L. C.; TRAVAGLINI, M. M. E. **Óleo de abacate:** extração, usos e seus mercados atuais no Brasil e na Europa. Estudos Econômicos. Campinas: ITAL, 1980. 144p. (Alimentos Processados, 11).

CLIFFORD, M.N. Review anthocyanins: nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Londres, v. 80, n.7, p.1063-1072, maio 2000.

COLLINS, P.; PLUMBLY, J. Natural colors: stable future? **Food Tech Europe**, v.49, n.2, p.64-70, 1995.

CONSTANT, Patrícia B. Lessa, STRINGHETA, Paulo C.; SANDI, Délcio. Corantes Alimentícios. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos – CEPPA**, Curitiba, v.20, n. 2, jul./dez. 2002.

CONSTANT, Patrícia B. Lessa; STRINGHETA, Paulo C. ; SANDI, Délcio. Corantes alimentícios. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos – CEPPA**, Curitiba, v. 20, n. 2, p. 203-220, jul./dez. 2002.

DELGADO-VARGAS, F.; JIMÉNEZ, A. R.; PAREDES-LÓPES, O. Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains — Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Culiacán, v. 40, n. 3, p.173 - 289, 2000.

DING, H. et al. Chemopreventive characteristics of avocado fruit. **Seminars in Cancer Biology**, Stockholm v.17, n.5, p.386–394, 2007.

FRASER, P. D.; BRAMLEY, P. M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid Research*, Egham, v. 43, p. 228 - 265, 2004.

FREUND, P.R.; WASHAN, C.J.; MAGGION, M. Natural color for use in foods. **Cereal Foods World**, v.33, n.7, p.553-559, 1988.

GERSTER, H. The potential role of lycopene for human health. **Journal of the American College of Nutrition**, Basel, v. 16, p.109-126, 1997.

GONDIM, J.A.M. et al. Composição centesimal e de minerais em cascas de frutas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, p. 825-827, 2005.

GROSS, J. et al. Carotenoids in pulp, peel and leaves of *Persea americana*. **Phytochemistry**, Tel Aviv, v. 12, p. 2259-2263, 1973.

GUZMAN, D. Value of carotenoids sector to cross billion dollar mark. **Chemical Market Reporter**, New York, v. 268, n.1, p.33, jul. 2005.

HARDY G. Nutraceuticals and functional foods: introduction and meaning. **Nutrition**, New York, v. 16, n.7, p. 688-689, jul. 2000.

IBGE. **Produção Agrícola Municipal 2011**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=rs&tema=lavourapermanente2011>>. Acesso em: 18 nov. 2012.

KRINSKY, N. I., LANDRUM, J. T.; BONE, R. A. Biologic mechanisms of the protective role of lutein and zeaxanthin in the eye. **Annual Review of Nutrition**, Miami, v. 23, n. 1, p. 171-201, 2003.

LU, Q-Y. et al. Inhibition of prostate cancer cell growth by an avocado extract: Role of lipid-soluble bioactive substances. **The Journal of Nutrition Biochemistry**, Los Angeles, v. 16, p. 23-30, 2005.

LUTTERODT, Herman et al. Fatty acid composition, oxidative stability, antioxidant and antiproliferative properties of selected cold-pressed grape seed oils and flours. **Food Chemistry**, College Park, p. 391-399. 15 mar. 2011.

MALDONADO-ROBLEDO, G. et al. Applied Microbiology and Biotechnology, Production of tobacco aroma from lutein. Specific role of the microorganisms involved in the process, v. 62, n. 5, p. 484 - 488, 2003.

MERCADANTE, A. Z.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; BRITTON, G. HPLC and mass spectrometric analysis of carotenoids from mango. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Campinas, v. 45, p. 120-123, 1997.

MURILLO, Enrique; MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, Antonio J.; PORTUGAL, Falcón. Screening of vegetables and fruits from Panama for rich sources of lutein and zeaxanthin. **Food Chemistry**, Sevilla, v. 122, n. , p.167-172, 15 fev. 2010.

NETTO, R.C.M. Dossiê Corantes. **Food Ingredients Brasil**, São Paulo, v. 2, n.9, p.40-59, ago./set. 2009.

RODRIGUEZ-AMAYA, Délia B.; KIMURA, Mieko; AMAYA-FARFAN, Jaime. **Fontes brasileiras de carotenóides**: tabela brasileira de composição de carotenoides em alimentos. Brasília: MMA/SBF, 2008. 100 p.

SU, Q.; ROWLEY, K. G.; BALAZS, N. D. H. Journal of Chromatography B. Carotenoids: separation methods applicable to biological samples, Melbourne, v. 781, n. 1, p. 393 - 418, 2002.

TANGO, J. S.; CARVALHO, C. R. L.; SOARES, N. B. Caracterização física e química de frutos de abacate visando a seu potencial para extração de óleo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.6, n.1, p,17-23, 2004.

TANGO, J. S.; TURATTI, J. M. Óleo de abacate. In: **ABACATE: cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos**. Campinas: ITAL, 1992. p. 156-192.

UENOJO, Mariana; MARÓSTICA JUNIOR, Mário Roberto; PASTORE, Gláucia Maria. Carotenoides: propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. **Química Nova**, Campinas, SP, v. 30, n. 3, p.616-622, 22 fev. 2007.

USDA - U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. **USDA national nutrient database for standard reference**: release 20. 2007. Disponível em: <<http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl>>.

WINTHERHALTER, P.; ROUSSEFF, R. **Carotenoid-Derived Aroma Compounds**. Washington D.C: American Chemical Society, v. 802, p. 1 – 17, 2001.

3. ARTIGO – OBTENÇÃO DE CORANTE NATURAL A PARTIR DE CAROÇO DE ABACATE (*Persa americana*)

3.1 INTRODUÇÃO

Os carotenoides são importantes pigmentos naturais e são responsáveis pela cor amarela, laranja ou vermelha de muitos alimentos, o que os caracterizam com propriedade de importância tecnológica, uma vez que a cor é um dos atributos que tem maior influência na aceitação dos alimentos. Alguns carotenoides são precursores de vitamina A e alimentos contendo tais pigmentos podem ser utilizados no combate à deficiência desta vitamina. Outras atividades biológicas têm sido atribuídas aos carotenoides, como fortalecimento do sistema imunológico e a diminuição do risco de doenças degenerativas como câncer, doenças cardiovasculares, degeneração macular e catarata (RODRIGUEZ-AMAYA et al., 2008).

Os carotenoides podem ser encontrados em frutos como abacate, uma vez que estudos revelaram que este contém tais componentes lipofílicos potencialmente anticarcinogênicos (Ding, Chin, Kinghorn, & D'Ambrosio, 2007). O abacate também é rico em ácidos graxos insaturados, fibras, vitaminas B e E, dentre outros nutrientes (Gomez Lopez, 1998).

Segundo dados do IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, a área plantada para produção de abacate no Brasil, em 2010, foi de 11.051 hectares e seu volume de produção foi de 152.181 toneladas. Essa produção teve um aumento de 9,4% em relação ao ano anterior e equivale à aproximadamente R\$ 73,5 milhões.

No Brasil, existem algumas indústrias que realizam a extração do óleo de abacate, mas esse volume ainda é muito pequeno. O óleo de abacate apresenta propriedades semelhantes ao óleo de oliva, que possui alto custo sendo amplamente consumido (CANTO, 1980). Embora haja uma pequena produção desse óleo e não existam ainda muitas tecnologias para melhorar suas qualidades sensoriais e assim difundi-lo, resíduos como a casca e o caroço do abacate não têm aproveitamento comercial.

Devido à preocupação com o meio ambiente torna-se cada vez mais importante a o desenvolvimento de tecnologias que sejam capazes de aproveitar ao máximo todos os resíduos gerados pelas indústrias. Segundo pesquisa realizada pela FEPAM, instituição responsável pelo licenciamento ambiental no Rio Grande do Sul, no ano de 2003, o setor de alimentos foi responsável por 665.451 toneladas/ano de resíduos sólidos industriais não perigosos, esse valor equivale a 30% de todos os resíduos sólidos gerados por todos os setores industriais no Estado. Diante do exposto, a utilização do caroço de abacate como fonte para extração de carotenoides, que possam ser utilizados como corantes naturais em alimentos, torna-se uma opção de interesse econômico.

Aliado a estes fatos, nos últimos tempos a utilização de corantes artificiais vem sendo questionada pela população, e cada vez mais, o público se interessa pela aplicação de corantes naturais, o que os torna uma tendência no mercado e possui apelo comercial positivo pelos seus benefícios à saúde humana (MICROENCAPSULAMENTO, 2006).

A utilização de corantes naturais ainda é vantajosa na questão de que, atualmente, os consumidores valorizam os produtos naturais como substitutos de corantes sintéticos. Dessa forma, o desenvolvimento de produtos atrativos e naturais torna-se uma oportunidade no mercado de alimentos.

Em busca de alternativas para aproveitamento de resíduos de alimentos, este trabalho teve por objetivo avaliar parâmetros para de extração de carotenoides a partir de caroço de abacate (*Persa americana*).

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Materiais

Os abacates (*Persea americana*) da variedade Fortuna foram adquiridos nas Centrais de Abastecimento do Rio Grande do Sul S.A – CEASA/RS, em Porto Alegre, no mês de setembro de 2012. Todos os frutos foram provenientes do mesmo lote, para evitar variações inerentes às análises realizadas.

Visualmente, os abacates foram selecionados no mesmo grau de maturidade, sendo mantidos a temperatura ambiente, até a retirada do caroço, quando o fruto apresentava estágio ótimo de maturação para o consumo.

Devido à cor mais intensa na parte externa do caroço (casca) e a coloração branca do miolo, para controle da amostragem, evitando variações inerentes, optou-se pela retirada da casca do caroço e a utilização da mesma nos ensaios experimentais.

Após a retirada dos caroços dos abacates, estes foram descascados manualmente e as cascas foram trituradas em liquidificador para formação de pequenas partículas, para realização dos ensaios de extração. O processamento foi realizado no Laboratório de Compostos Bioativos do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICTA/UFRGS).

O solvente utilizado para extração dos carotenoides da casca do caroço de abacate foi etanol absoluto (mínimo 99,5%; marca Nuclear).

3.2.2 Umidade

Para expressar os resultados em base seca, foi realizado ensaio para determinação de umidade na casca do caroço de abacate, de acordo com metodologia da AOAC (2005), obtida pela perda de peso em estufa regulada a 105 °C.

3.2.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As análises de separação e identificação de carotenoides presentes no caroço de abacate foram realizadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Os carotenoides foram obtidos por meio de extração exaustiva de uma amostra de 1,0 g através do equipamento Ultra-Turrax® da marca IKA®, modelo T25 digital.

O extrato foi concentrado em rotaevaporador (marca Fisatom, modelo 801) em temperatura de 35 °C, posteriormente foi diluído em 1,0 mL de éter terc-metil-

butílico (MTBE) grau HPLC, colocado em ultrassom (Unique, modelo USC 1400, São Paulo, Brasil) por 5 minutos e filtrado em filtro Millipore (0,45µm).

As análises foram realizadas em Cromatógrafo Agilent 1100 Series equipado com sistema quaternário de bombeamento de solventes (Waters série 2695) e detector UV/Vis (Waters série 2487 Dual I).

Utilizou-se o método proposto por Zanatta e Mercadante, (2007), coluna C₃₀ YMC polimérica de fase reversa, 250 mm de comprimento x 4,6 mm de diâmetro interno, 3 µm de tamanho das partículas. O gradiente de eluição da fase móvel foi composto por: água / metanol / terc-metil-butil-éter (MTBE) iniciando na proporção de 5:90:5, atingindo em 12 minutos: 0:95:5, em 25 minutos: 0:89:11, em 40 minutos: 0:75:25 e, finalmente, após 60 minutos 00:50:50, com vazão de 1 mL/min, a 33°C.

Os cromatogramas foram processados em comprimento de onda fixo de 450 nm. A identificação foi realizada comparando os tempos de retenção dos picos obtidos para o padrão e para as amostras, analisados sob as mesmas condições.

A quantificação foi realizada através da construção de curvas padrões para os carotenoides. As faixas de concentração utilizadas nas curvas foram de 5 a 50 µg/mL para β-caroteno, α-caroteno de 2 a 25 µg/mL, luteína de 1 a 65 µg/mL, criptoxantina de 4 a 100 µg/mL e zeaxantina de 1 a 40 µg/mL.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) são, respectivamente, para β-caroteno: $6,53 \times 10^{-2}$ e $10,89 \times 10^{-2}$ mg/kg; para luteína: $6,9 \times 10^{-3}$ e $1,15 \times 10^{-2}$ mg/kg; para criptoxantina: $2,11 \times 10^{-2}$ e $3,51 \times 10^{-2}$ mg/kg; para zeaxantina: $9,56 \times 10^{-2}$ e $1,59 \times 10^{-2}$ mg/kg e para α-caroteno: $1,97 \times 10^{-2}$ e $3,28 \times 10^{-2}$ mg/kg.

3.2.4 Extração de Carotenoides

Os ensaios de extração foram realizados baseados em um Planejamento Experimental Completo (2³), para avaliar a variação do volume de solvente (mL), o número de extrações e o tempo (minutos) das mesmas e, dessa forma, obter as melhores condições para essa extração (Tabela 1).

Tabela 1 - Níveis das variáveis para o planejamento experimental fatorial completo 2^3 .

Variáveis	Níveis				
	$-\alpha$	-1	0	1	α
Volume de Solvente (mL)	24,8	35	50	65	75,2
Número de Extrações	1	2	4	6	7
Tempo de Extração (min)	1,6	5	10	15	18,4

A extração foi realizada por meio de agitador magnético (marca Fisatom, modelo 752A). Após o tempo estabelecido, o material foi filtrado a vácuo em funil de Buchner com papel filtro, para reter o resíduo, sendo o extrato foi evaporado totalmente em rotaevaporador (marca Fisatom, modelo 801) em temperatura de 35°C. Na etapa seguinte, o extrato foi redissolvido para posterior leitura em espectrofotômetro (Agilent 8453 Sistema de Espectroscopia UV-visible).

Todos os ensaios foram realizados em ordem aleatória (Tabela 2).

Tabela 2 - Condições experimentais para o planejamento fatorial completo 2^3 .

Ensaio	Volume de Solvente (mL)	Número de Extrações	Tempo de Extração (minutos)
1	35	2	5
2	65	2	5
3	35	6	5
4	65	6	5
5	35	2	15
6	65	2	15
7	35	6	15
8	65	6	15
9	50	4	10
10	50	4	10
11	50	4	10
12	24,8	4	10
13	75,2	4	10
14	50	1	10
15	50	7	10
16	50	4	1,6
17	50	4	18,4

3.2.5 Quantificação de Carotenoides

A quantificação dos carotenoides presentes no extrato obtido a partir da casca do caroço do abacate foi realizada em espectrofotômetro UV/Visível da (Agilent 8453 Sistema de Espectroscopia UV-visible), efetuando-se leituras das absorvâncias em comprimento de onda de 445 nm de acordo com Rodriguez-Amaya (2001).

O cálculo do teor de Luteína por 100 gramas de casca de caroço de abacate foi obtido pela Equação.

$$x (\mu\text{g}) = \frac{A \cdot y (\text{mL}) \cdot 10^6}{A_{1\text{cm}}^{1\%} \cdot 100} \quad x (\mu\text{g/g}) = \frac{x (\mu\text{g})}{\text{weight of sample (g)}}$$

Onde:

A: absorvância da amostra.

Y: volume da solução que originou a absorvância A.

$A_{1\text{cm}}^{1\%}$: coeficiente de absorvância do carotenoide no solvente utilizado, nesse caso com valor de 2550.

Os resultados foram analisados estatisticamente pela utilização do Software Statistica 7.1, com um intervalo de confiança de 95%.

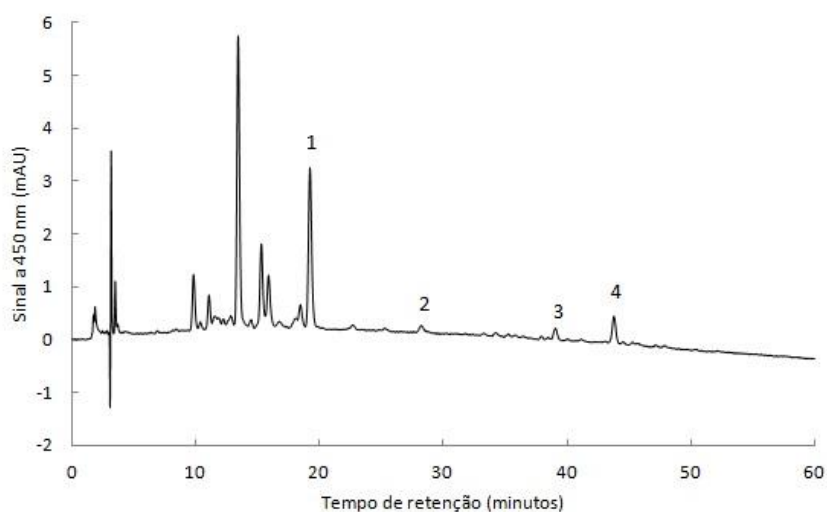
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As análise realizada por cromatografia líquida de alta eficiência indicou que o carotenoide encontrado em maior quantidade no caroço do abacate foi a luteína. Também foram identificados os carotenoides α -caroteno, β -caroteno e zeaxantina, em menores quantidades (Figura 1 e Tabela 3). A luteína tem sido indicada como um carotenoide importante, sobretudo para a visão. Segundo Krinsky et al (2003), a

luteína é um carotenoide com efeito protetor oftalmológico. Bone et al (2001) ainda ressalta que altas concentrações de luteína na retina diminuem consideravelmente as chances de desenvolvimento de degeneração macular.

Figura 2 – Cromatograma obtido para análise de carotenoides a partir da casca do caroço de abacate. Identificação dos picos vide Tabela 1. Condições cromatográfica vide texto.



Pico	Tempo de Retenção (min)	Carotenoide Identificado
1	19,2	Luteína
2	28,2	Zeaxantina
3	39	α -Caroteno
4	43,7	β -Caroteno

Tabela 3 – Identificação dos picos numerados na Figura 2.

3.3.2 Teor de Umidade

O teor de umidade da casca, encontrado de acordo com a metodologia AOAC (2005), foi de 94,8% \pm 0,14. Esse resultado foi utilizado para expressar a quantificação dos extratos de carotenoides em quantidade de matéria seca.

3.3.3 Quantificação dos Extratos de Carotenoides

Os resultados da quantificação de carotenoides totais em teores de luteína para cada ensaio de extração realizado são mostrados na tabela 3.

Tabela 4 - Resultados da extração de carotenoides totais da casca do caroço de abacate para cada ensaio do planejamento experimental completo 2³.

Ensaio	Volume de Solvente (mL)	Número de Extrações	Tempo de Extração (minutos)	Concentração*
				(mg/100g)
1	35	2	5	9,692
2	65	2	5	10,284
3	35	6	5	13,303
4	65	6	5	10,130
5	35	2	15	11,719
6	65	2	15	13,849
7	35	6	15	12,100
8	65	6	15	12,087
9	50	4	10	10,571
10	50	4	10	10,930
11	50	4	10	9,812
12	24,8	4	10	12,487
13	75,2	4	10	11,592
14	50	1	10	9,205
15	50	7	10	13,613
16	50	4	1,6	10,451
17	50	4	18,4	14,139

*Os valores estão expressos em matéria seca.

Os valores de concentração de carotenoides totais obtidos nos ensaios de extração variaram de 9,205 até 14,139 mg/100g de amostra. O ensaio número 14 apresentou o menor valor e foi realizado com apenas uma extração de dez minutos, utilizando 50 mL de solvente.

A maior concentração de carotenoides foi encontrada no ensaio 17, que foi realizado por meio de 4 extrações de 18,4 minutos, com 50 mL de solvente. Na tabela 4 são apresentados os efeitos das variáveis independentes e suas interações para o conteúdo de carotenoides totais de cada ensaio.

Tabela 5 - Efeitos estimados pelo modelo de regressão para a quantificação de carotenoides a partir da casca de caroço de abacate.

Variáveis Independentes	Efeitos Estimados	Erro Puro	t - valor	p - valor
Interceptação	10,46160	0,511308	20,46046	0,000000
Volume (L)	-0,28834	0,480510	-0,60007	0,567368
Volume (Q)	0,97380	0,529367	1,83955	0,108416
Número de Extrações (L)	1,38996	0,480510	2,89268	0,023227
Extrações (Q)	0,52683	0,529367	0,99521	0,352785
Tempo (L)	1,83816	0,480510	3,82544	0,006496
Tempo (Q)	1,15488	0,529367	2,18161	0,065484
Volume - Extrações	-1,47711	0,627540	-2,35381	0,050802
Volume - Tempo	1,17404	0,627540	1,87086	0,103547
Extrações - Tempo	-1,20927	0,627540	-1,92700	0,095342

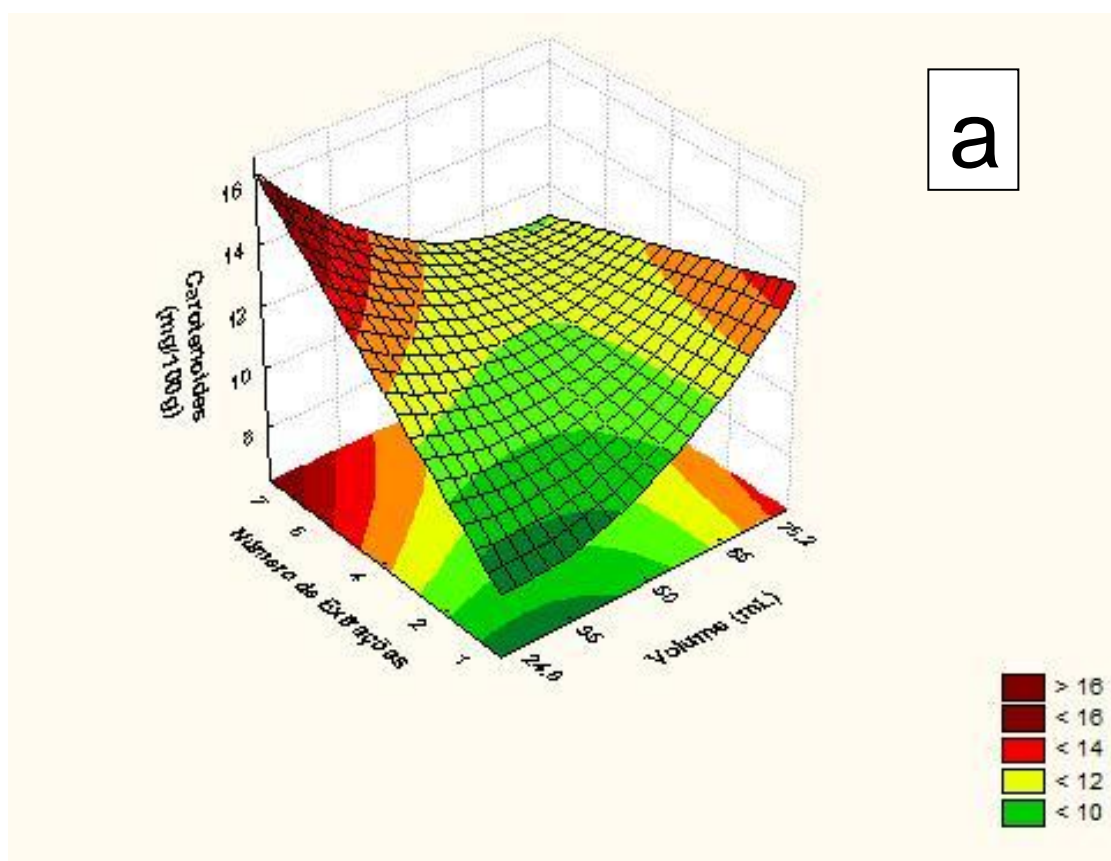
Os resultados indicaram que as duas variáveis número de extrações ($p = 0,023227$) e tempo ($p = 0,006496$) foram significativas com efeitos positivos. Esse fato indica que para aumentar o teor de carotenoides no extrato, devem-se aumentar tais variáveis.

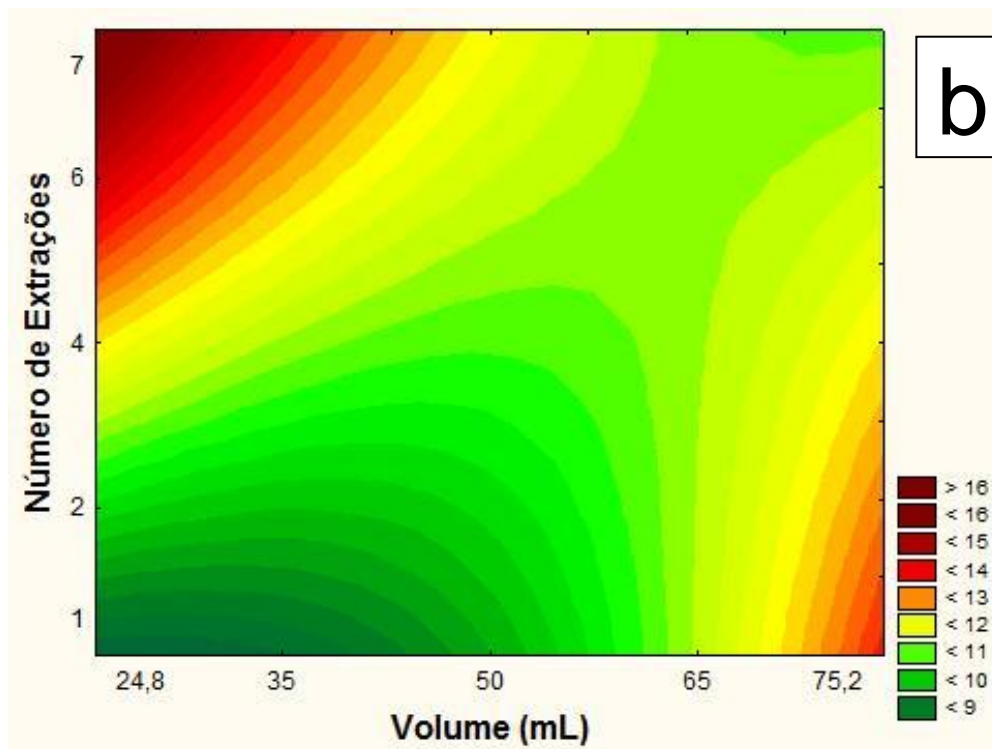
O modelo desenvolvido por meio de análise de superfície de resposta para o total rendimento de carotenoides (Tabela 4) foi significativo para $p < 0,05$ e 85,8% da variabilidade foi explicada pelo modelo ($R^2 = 0,858$). Através da ANOVA da

regressão (anexo 1), observou-se que F calculado (6,3284) foi maior que o F tabelado (3,2927), validando o modelo e tornando possível, dessa forma, a apresentação das superfícies de resposta e contorno. As duas variáveis são responsáveis por afetarem linearmente o resultado da extração de carotenoides.

As superfícies de resposta (Figura 3a) e de contorno (Figura 3b) mostram os efeitos volume de solvente (mL) e do número de extrações na quantificação de carotenoides a partir de casca de caroço de abacate.

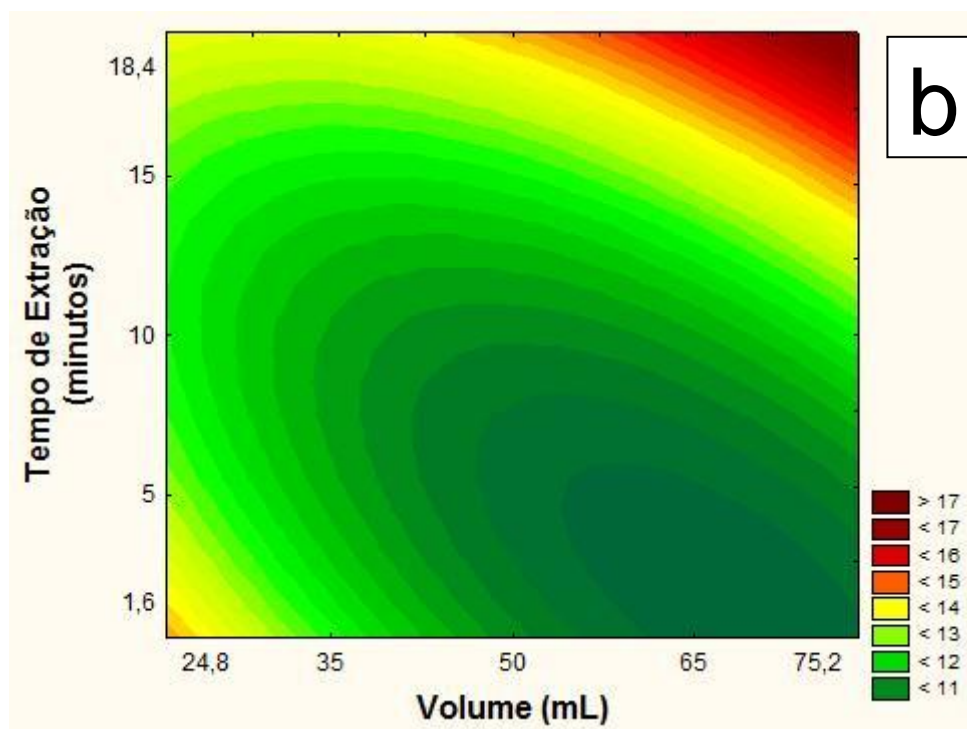
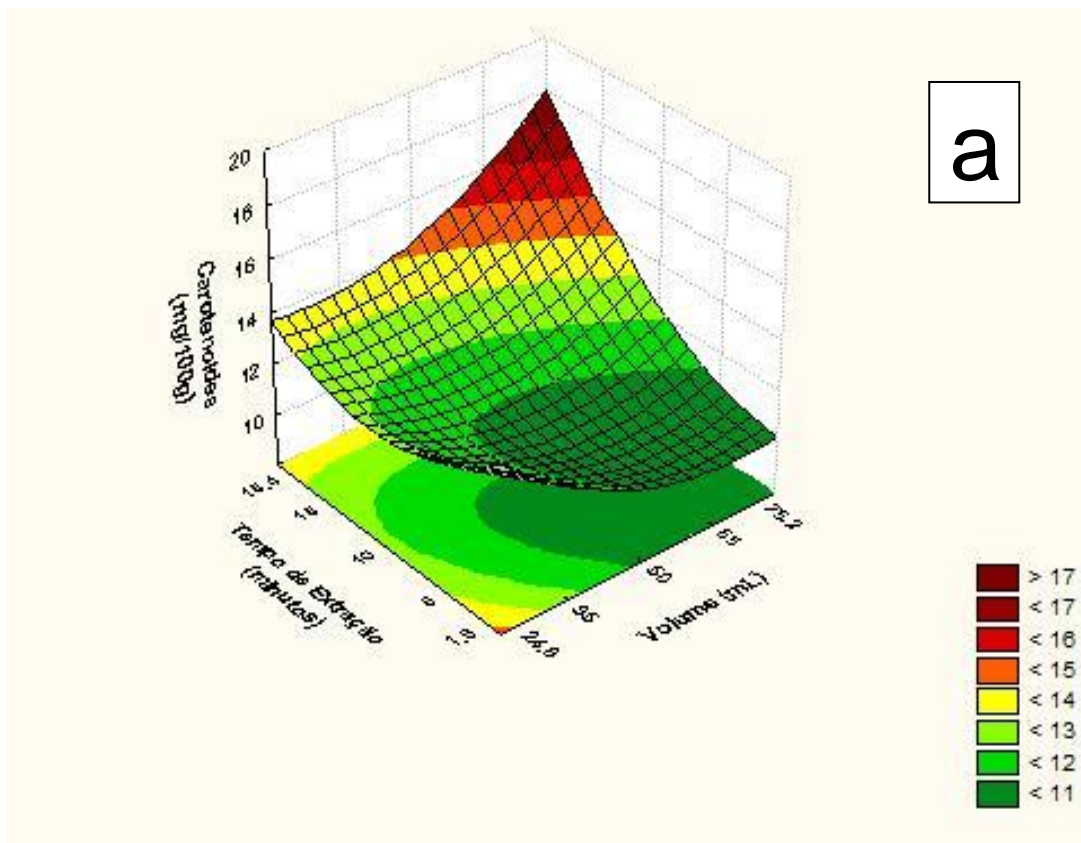
Figura 3 - Superfície de resposta (a) e superfície de contorno (b) para os efeitos de volume de solvente (mL) e número de extrações expresso em conteúdo de carotenoides (mg/100g).





A extração de carotenoides da casca do caroço de abacate desse estudo foi influenciada, também, pelo volume de solvente e pelo tempo de extração. O volume de solvente não aumentou significativamente a extração dos pigmentos, para 95% de confiança no modelo quadrático, sendo que os melhores resultados foram obtidos com os valores de volume de solvente de 50 mL. Porém, para 90% de confiança, esse parâmetro seria considerado significativo. As superfícies de resposta (Figura 4a) e de contorno (Figura 4b) mostram tais efeitos.

Figura 4 - Superfície de resposta (a) e superfície de contorno (b) para os efeitos de volume de solvente (mL) e tempo (minutos) de extração expresso em conteúdo de carotenoides (mg/100g).



O tempo de extração (minutos) mostrou-se estatisticamente significativo quanto à extração de carotenoides totais, sendo os melhores resultados obtidos com

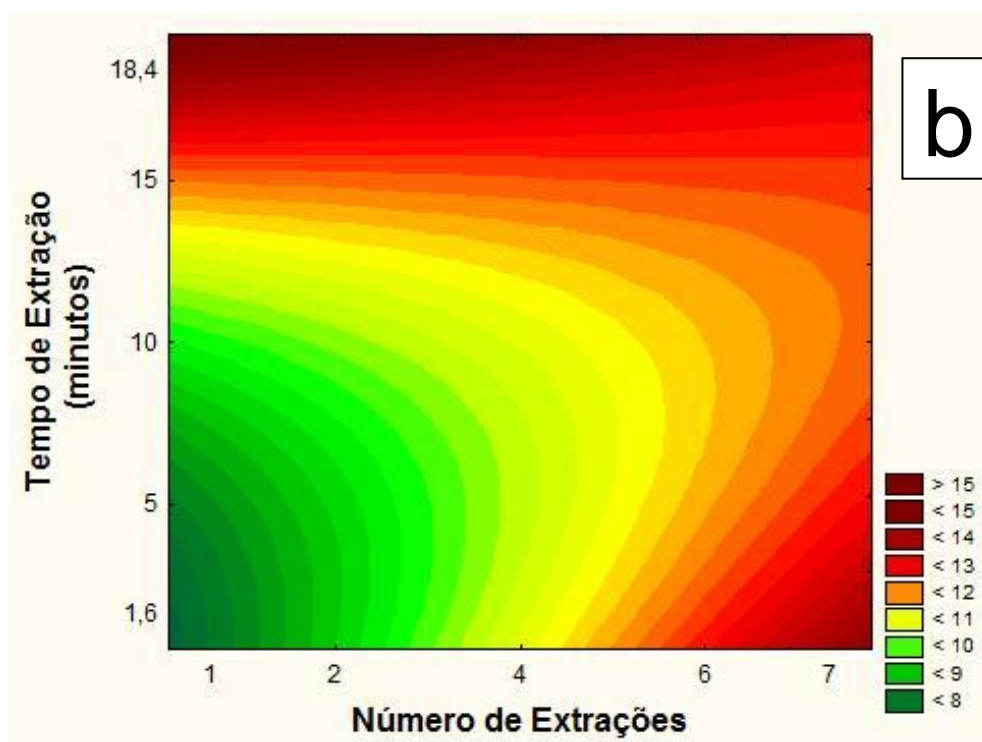
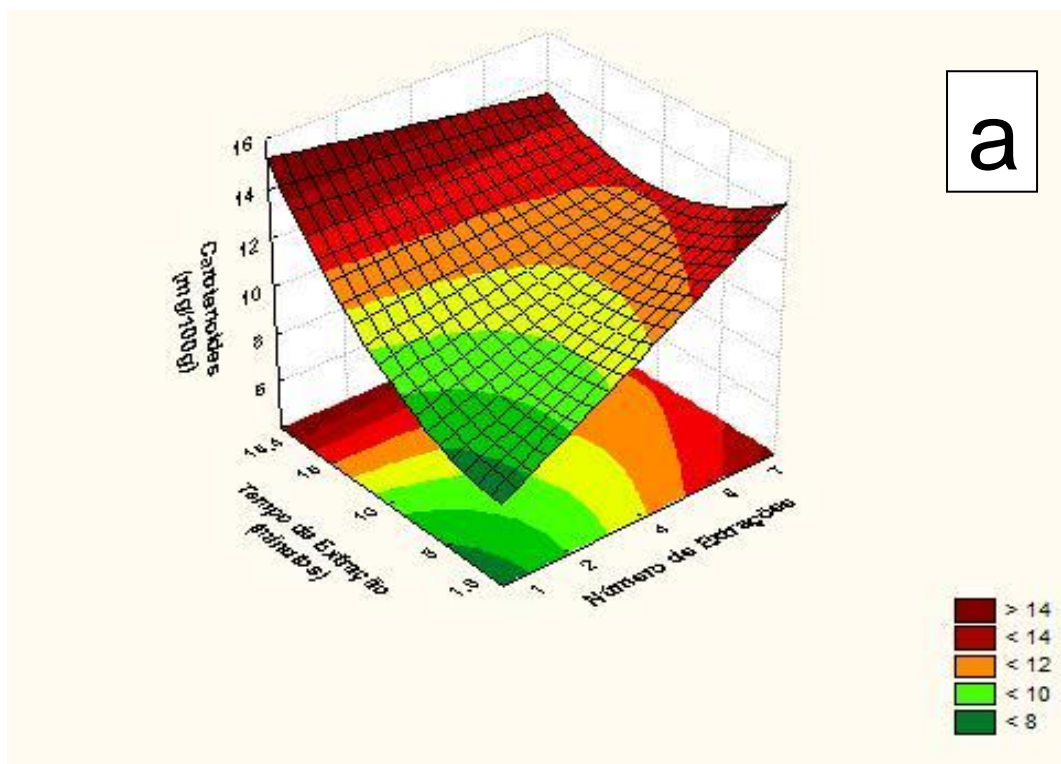
os valores dessas variáveis sendo de 4 extrações e 18,4 minutos, o tempo máximo utilizado nos ensaios (14,139 mg/100g).

Durante a realização dos ensaios, percebeu-se que as primeiras extrações apresentaram maior efetividade, com coloração mais intensa. Dessa forma, não é de interesse extrair muito mais do que 2 a 4 vezes, pois isso representaria um perda de solvente e tempo de extração para obtenção de uma pequena quantidade de pigmento.

Os efeitos das variáveis tempo de extração (minutos) e número de extrações, parâmetros significativos no planejamento, são bem representados pelas superfícies de resposta (Figura 5a) e de contorno (Figura 5b), tratando-se da obtenção de carotenoides a partir de casca do caroço de abacate. Os maiores teores de carotenoides totais foram obtidos nos ensaios com número de extrações ≥ 4 e com tempo ≥ 15 minutos.

A mesma observação em relação ao número de extrações vale para o tempo, uma vez que foi observado que nos primeiros minutos ocorre maior extração dos carotenoides. Uma extração por longo tempo não apresentaria vantagens, pois esses compostos degradam-se facilmente com na presença de luz, oxigênio e temperaturas mais elevadas (Rodriguez-Amaya, 2008).

Figura 5 - Superfície de resposta (a) e superfície de contorno (b) para os efeitos de tempo de extração (minutos) e número de extrações expresso em conteúdo de carotenoides (mg/100g).



Na literatura consultada não foram encontradas pesquisas avaliando a quantidade de carotenoides presentes na casca do caroço de abacate, mas existem estudos referentes à casca externa do fruto. Ashton et al (2006) estudaram a

variedade de abacate *Hass* quanto à presença de pigmentos na sua casca. Foram realizadas extrações com 5 mL de BHT 0,1% em acetona, com adição de 100 mg de NaCO_3 para cada 1g de amostra. A maceração foi feita em homogeneizador Ultra Turrax por até 2 minutos. Posteriormente, foi adicionado Na_2SO_4 e a solução foi deixada em repouso por uma noite, sendo mantida a 4°C. Já em temperatura ambiente, 2 mL de éter dietílico e 8 mL de NaCl 10% foram adicionados a 2 mL do extrato. A nova solução foi seca sob N_2 em 30°C. O concentrado foi redissolvido em 0,8 mL de BHT 0,1%/acetona e agitado em vórtex. O sobrenadante foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência.

Segundo Ashton et al (2006) a luteína foi o carotenoide encontrado em maior quantidade na casca do abacate *Hass*, 2,05 mg/100g de amostra. Esse pigmento é muito importante sob a perspectiva de saúde e em mais um estudo demonstra-se a sua presença em parte do fruto que é geralmente descartada.

Ajila et al (2007) pesquisaram, na Índia, o conteúdo de carotenoides totais na casca de manga, madura e verde. Foram realizadas extrações com etanol e acetona. O teor desses pigmentos foi estimado utilizando os métodos espectrofotométricos de Davis (1976) e Litchenthaler (1987). O melhor resultado foi obtido pelo método de Davis, para manga madura, de 403 mg/100g de casca. Os autores não identificaram qual o carotenoide majoritário presente na casca do fruto. O subproduto do processamento de frutas gerado em maior quantidade são as cascas, que, no caso da manga equivalem até 20% em peso da fruta. Atualmente, o tratamento de resíduos tem alto custo e por isso, a utilização das cascas como fonte de compostos antioxidantes torna-se interessante, principalmente do ponto de vista de benefícios à saúde humana. No caso do abacate, a casca externa representa em torno de 12% da fruta, e o caroço, em torno de 18%. Ou seja, aproximadamente 30% não tem aproveitamento e acaba como resíduo sólido no meio ambiente. Esse dado é um incentivo para o desenvolvimento de técnicas de aproveitamento de compostos bioativos presentes no abacate.

Wang et al (2010) estudaram, separadamente, a casca, a polpa e o caroço do abacate (inteiro) de sete diferentes cultivares. Anteriormente à extração com solvente, as porções foram liofilizadas. A extração foi realizada com amostras de 0,5g com clorofórmio/metanol (2:1, v/v). Os tubos de extração foram agitados em vórtex e mantidos a baixas temperaturas. Depois de filtrado e seco, o extrato foi

redissolvido em acetona 80%. A absorvância foi medida em espectrofotômetro UV/Visível, utilizando acetona 80% como branco. A concentração de carotenoides totais foi calculada utilizando $A_{1\text{cm}}^{1\%} = 2290$ com comprimento de onda fixo de 470 nm.

Os melhores resultados de carotenoides totais obtidos por Wang et al (2010) foram de 0,67 mg/100g para o caroço inteiro, 0,77 mg/100g para a polpa e 1,93 mg/100g para a polpa do abacate. Comparando esses teores com o estudo em questão, pode-se dizer que os resultados são coerentes, já que visualmente percebe-se que a maior quantidade de pigmentos encontra na casca do caroço de abacate. Wang et al (2010) utilizaram o caroço inteiro e por isso obtiveram um teor de carotenoides totais bastante reduzido em relação à casca do caroço em particular.

Outro estudo realizado em subproduto da indústria de alimentos foi uma pesquisa realizada por Lutterodt et al (2011), em farinha de semente de uva de quatro cultivares diferentes. Foram analisados teores de β -caroteno, luteína, zeaxantina e criptoxantina. A extração desses componentes foi realizada utilizando hexano como solvente. A identificação de carotenoides foi obtida por meio de comparação de tempos de retenção, através de cromatografia líquida de alta eficiência.

O teor mais elevado de β -caroteno foi 466 mg/100g de farinha de semente de uva, para luteína foi de 96 mg/100g, 15,95 mg/100g para zeaxantina e 5,4 mg/100g de criptoxantina. Esses valores apresentam-se bem mais altos em relação à casca de caroço de abacate, mas ressaltam a presença de compostos antioxidantes importantes e em grande quantidade em mais um resíduo da agroindústria que pode agregar valor à produção agrícola e diminuir impactos ambientais.

Muitas etapas de processamento na indústria de alimentos podem degradar os pigmentos naturais presentes nos produtos. Adicionam-se corantes novamente para retomar a cor original do alimento ou até mesmo ligar a cor ao seu aroma, tornando-os mais atrativos aos consumidores. (CONSTANT, 2002)

O extrato alcoólico deste estudo contém carotenoides, obtidos através do caroço de abacate, que é um resíduo, e pode ser utilizado como corante natural em alimentos. Industrialmente, esse tipo de corante pode, sem problema algum, ser utilizado em bebidas carbonatadas, confeitos, sorvetes, gelatinas e produtos lácteos,

conferindo cor aos alimentos, de forma natural, além dos benefícios intrínsecos desses pigmentos.

3.4 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que as variáveis tempo de extração (minutos) e o número de extrações afetam significativamente a extração de carotenoides a partir da casca do caroço de abacate. Melhores rendimentos de carotenoides totais foram alcançados com os valores altos dessas variáveis. O maior conteúdo de pigmento extraído (14,139 mg/100g) foi obtido com 4 extrações de 18,4 minutos, com 50 mL de solvente. Este valor equivale a 93,7% do valor total de carotenoides presentes na casca de caroço de abacate. Essa porcentagem é bastante satisfatória e foi alcançada em um ensaio com 4 extrações, o que indicou que as primeiras extrações foram as que extraem a maior quantidade desses pigmentos e as mesmas foram mais influenciadas pelo tempo dessa extração do que pelo volume de solvente utilizado.

3.5 REFERÊNCIAS

AJILA, C.M.; BHAT, S.G.; RAO, U.J.S. Prasada. Valuable components of raw and ripe peels from two Indian mango varieties. **Food Chemistry**, Mysore, India, n. 102, p.1006-1011, 22 jun. 2006.

ASHTON, Ofeliz B. O. et al. Pigments in Avocado Tissue and Oil. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, Auckland, p. 10151-10158. 12 ago. 2006.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Official methods of analysis. 18. ed. Gaithersburg, 2005.

BONE, R. A. et al. Macular pigment in donor eyes with and without AMD: A case-control study. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Miami, v. 42, p. 235-240, 2001.

CANTO, W. L.; SANTOS, L. C.; TRAVAGLINI, M. M. E. Óleo de abacate: extração, usos e seus mercados atuais no Brasil e na Europa. Estudos Econômicos. Campinas: ITAL, 1980. 144p. (Alimentos Processados,11).

CONSTANT, Patrícia B. Lessa; STRINGHETA, Paulo C.; SANDI, Délcio. Corantes Alimentícios. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos – CEPPA**, Curitiba, v. 20, n. 2, jul./dez. 2002.

DAVIES, B.H. Carotenoids. In: GOODWIN, T.W. (Ed.). **Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments**. 2. ed., London: Academic Press. v.2, 1976.

DAVIS, B. H. Carotenoids. In: T. W. Goodwin (Ed.), **Chemistry and biochemistry of plant pigments**. London: London Press, 1976. p. 38-166.

DING, H. et al. Chemopreventive characteristics of avocado fruit. **Seminars in Cancer Biology**, Columbus, v. 17, n. 5, p. 386-394, 2007.

GOMEZ-LOPEZ, V. M. Characterization of avocado (*Persea americana* Mill.) varieties of very low oil content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Caracas, v. 46, n. 9, p. 3643–3647, 1998.

IBGE. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE Produção Agrícola Municipal Culturas Temporárias e Permanentes, 2010, Brasil.

KRINSKY, N. I.; LANDRUM, J. T.; BONE, R. A. Biologic mechanisms of the protective role of lutein and zeaxanthin in the eye. **Annual Review of Nutrition**, Cidade, v. 23, p. 171-201, 2003.

LITCHENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, Pasadena, v.148, p. 350–383, 1987.

LUTTERODT, Herman et al. Fatty acid composition, oxidative stability, antioxidant and antiproliferative properties of selected cold-pressed grape seed oils and flours. **Food Chemistry**, College Park, p. 391-399, 15 mar. 2011.

MERCADANTE, A. Z.; BRITTON, G.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Carotenoids from yellow passion fruit (*Passiflora edulis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Liverpool, v. 46, p. 4102-4106, 1998.

MICROENCAPSULAMENTO de antocianinas. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 9, n. 36, 01 jun. 2006.

MONTENEGRO, M. A. et al. Singlet molecular oxygen quenching ability of carotenoids in a reverse micelle membrane mimetic system. **Photochemistry and Photobiology**, Río Cuarto, v. 75, p. 353-361, 2002.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. A guide to carotenoid analysis in foods. Some physicochemical properties of carotenoids, p. 14-22, Campinas, 1999.

RODRIGUEZ-AMAYA, Délia B.; KIMURA, Mieko; AMAYA-FARFAN, Jaime. **Fontes brasileiras de carotenóides**: tabela brasileira de composição de carotenóides em alimentos. Brasília: MMA/SBF, 2008. 100 p.

TEE, E. S.; LIM, C. L. Carotenoid composition and content of Malaysian vegetables and fruits by the AOAC and HPLC methods. **Food Chemistry**, Kuala Lumpur, v. 41, p. 309–339, 1991.

WANG, Wei; BOSTIC, Terrell R.; GU, Liwei. Antioxidant capacities, procyanidins and pigments in avocados of different strains and cultivars. **Food Chemistry**, Gainesville, p. 1193-1198. 26 mar. 2010.

ZANATTA, C. F.; MERCADANTE, A. Z. Carotenoid composition from the Brazilian tropical fruit camu–camu (*Myrciaria dubia*). **Food Chemistry**, Campinas, v.101, p.1526–1532, 2007.

ANEXOS**ANEXO 1 – TABELA ANOVA PARA O MODELO DE REGRESSÃO PARA A EXTRAÇÃO DE CAROTENOIDES DE CASCA DE CAROÇO DE ABACATE**

0.1. Tabela ANOVA para o modelo de regressão para a extração de carotenoides de casca de caroço de abacate.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado	F tabelado
Regressão	32,3722	7,0000	4,6246	6,3284	3,2927
Resíduo	6,5770	9,0000	0,7308		
Total	38,9492	16,0000			