



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

**EMANUELA FLOR DE VARGAS**

**OBTENÇÃO DE CORANTES NATURAIS A PARTIR DO RESÍDUO DA**  
**INDÚSTRIA DE POLPA DE MORANGO, AMORA E PÊSSEGO**

**Porto Alegre**

**2015**

**EMANUELA FLOR DE VARGAS**

**Obtenção de Corantes Naturais a partir do Resíduo da Indústria de Polpa de Morango,  
Amora e Pêssego**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Alessandro de Oliveira Rios

Co-Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Simone Hickmann Flôres

Porto Alegre

2015

CIP - Catalogação na Publicação

Flor de Vargas, Emanuela

Obtenção de corantes naturais a partir do resíduo da indústria de polpa de morango, amora e pêssego. / Emanuela Flor de Vargas. -- 2015.  
101 f.

Orientador: Alessandro de Oliveira Rios.  
Coorientador: Simone Hickmann Flôres.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Antocianinas. 2. Carotenoides. 3. Pigmentos.  
4. Extração. I. de Oliveira Rios, Alessandro, orient.  
II. Hickmann Flôres, Simone, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Autora: Emanuela Flor de Vargas (Engenheira de Alimentos /UNISINOS).

Título da dissertação: Obtenção de Corantes Naturais a partir do Resíduo da Indústria de Polpa de Morango, Amora e Pêssego

Submetida como parte dos requisitos para obtenção do grau de

## **MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA)

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil.

Dissertação aprovada por:

Prof. Dr. Alessandro de Oliveira Rios  
Orientador PPGCTA/ UFRGS

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Simone Hickmann Flôres  
Co-orientadora PPGCTA/UFRGS

Prof<sup>a</sup>. Dr. Johnatt Allan Rocha de Oliveira (UFPA)  
Membro da comissão julgadora

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Renata Cristina de Souza Ramos (UNISINOS)  
Membro da comissão julgadora

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Florencia Cladera Olivera (PPGCTA/UFRGS)  
Membro da comissão julgadora

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosane Rech  
Coordenadora do PPGCTA

Prof. Dr. Vitor Manfroi  
Diretor do ICTA/ UFRGS

Porto Alegre, fevereiro de 2015.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho em memória de meus pais. A minha amada mãe Eva que sempre me orientou que o melhor caminho para o sucesso é o conhecimento e ao meu pai Manuel, homem de garra, humilde e batalhador, que me mostrou que não se deve desistir nunca dos nossos objetivos.

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, por me dar forças para enfrentar esta fase de minha vida.

Agradeço as minhas irmãs Patrícia e Evanise, por todo o apoio, tempo, carinho e amor que tiveram comigo e com o Gabriel durante esta fase de tanta mudança na minha vida.

A minha tia Vilma, minha segunda mãe pelo cuidado e amor comigo e com meu Gabriel.

Aos meus cunhados Tiago e Marcio pelo cuidado, carinho e paciência com o Gabriel.

A todos os meus amigos que me deram força, me apoiaram e me incentivaram a seguir em frente e buscar meus objetivos.

Aos meus Orientadores, Professor Alessandro de Oliveira Rios e Professora Simone Hickmann Flôres pela imensa paciência, compreensão e orientação.

As colegas Anne, Priscilla, Luzia e Camila pela parceria, amizade e grande ajuda durante estes dois anos.

A todos os colegas do Laboratório de Compostos Bioativos, especialmente ao Carlos que me apresentou as portas do mestrado no ICTA.

Ao Roberval, pela ajuda no Laboratório 213.

A todos aqueles que torceram por mim (professores e colegas).

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....</b>	<b>09</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>10</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>11</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>13</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>17</b>
<b>Objetivos Específicos.....</b>	<b>17</b>
<b>CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>19</b>
1.1. PRODUÇÃO DE FRUTAS NO BRASIL.....	20
1.1.1. Resíduos do processo de polpas de frutas.....	20
1.2. CORANTES.....	21
1.2.1. Corantes sintéticos.....	22
1.2.2. Corantes naturais.....	24
1.3. CAROTENOIDES.....	26
1.3.1. Poder corante.....	26
1.3.2. Ação antioxidante.....	27
1.4. ANTOCIANINAS.....	30
1.4.1. Poder corante.....	30
1.4.2. Ação antioxidante.....	31
1.5. METODOLOGIAS DE OBTENÇÃO DE CORANTES NATURAIS.....	33
1.5.1. Metodologias de obtenção de corantes de carotenoides.....	33
1.5.2. Metodologias de obtenção de corantes de antocianinas.....	34
<b>CAPÍTULO 2: ARTIGOS CIENTÍFICOS.....</b>	<b>40</b>
<b>PELARGONIDIN 3-GLUCOSIDE EXTRACTION FROM THE RESIDUE FROM STRAWBERRY PROCESSING (<i>Fragaria x ananassa</i>).....</b>	<b>41</b>
1. Introduction.....	42
2. Materials and methods.....	44
2.1. Raw mater.....	44
2.2. Moisture.....	44
2.3. Preliminary tests for obtaining the dye.....	45

2.4. Experimental planning for obtaining the extract dye.....	45
2.5. Analysis of anthocyanins in the raw.....	46
2.6 Identification and Quantification of Anthocyanins.....	46
2.7. Statistical analysis.....	46
3. Results and discussion.....	47
4. Conclusions.....	55
5. References.....	56
<b>OBTENTION OF NATURAL DYES FROM INDUSTRIAL BLACKBERRY PULP</b>	
<b>RESIDUES (<i>Rubus sp</i>).....</b>	<b>59</b>
1. Introduction.....	60
2. Materials and methods.....	62
2.1. Raw mater.....	62
2.2. Moisture.....	62
2.3. Extraction of dyes.....	63
2.4. Identification and quantification of anthocyanins.....	63
2.5. Chromatographic conditions.....	63
2.6 Statistical analysis.....	64
3. Results and discussion.....	64
4. Conclusions.....	72
5. References.....	73
<b>THE WASTE PROCESSING PEACH (<i>Prunus Persica</i>) USED FOR THE</b>	
<b>CAROTENOIDS EXTRACTION.....</b>	<b>76</b>
1. Introduction.....	77
2. Materials and methods.....	79
2.1. Raw mater.....	79
2.2. Moisture.....	79
2.3. Experimental planning for obtaining the extract.....	79
2.4. Identification and quantification of carotenoids.....	80
2.5. Chromatographic conditions.....	8
2.6. Statistical analysis.....	81
3. Results and discussion.....	81
4. Conclusions.....	88



5. References.....	88
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>90</b>
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>92</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>93</b>

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1: Estruturas dos carotenoides considerados importantes para a saúde.....	28
--	----

### CAPÍTULO 2: ARTIGOS CIENTÍFICOS

#### OBTENTION OF NATURAL DYES FROM INDUSTRIAL BLACKBERRY PULP RESIDUES (*Rubus sp*)

Figure 1: Response surface of the anthocyanin content of blackberry residue as a function of the extraction number and amount of solvent.....	70
Figure 2: Response surface of the anthocyanin content of blackberry residue as a function of time (min) and the extraction number.....	70

#### THE WASTE PROCESSING PEACH (*Prunus persica*) USED FOR THE CAROTENOIDS EXTRACTION

Figure 1: Response surface of the carotenoids concentration ( $\mu\text{g/g}$ dry weight) of peach waste as a function of the extraction number and amount of solvent (mL).....	86
---	----

## LISTA DE TABELAS

### **CAPÍTULO 2: ARTIGOS CIENTÍFICOS**

#### **PELARGONIDIN 3-GLUCOSIDE EXTRACTION FROM THE RESIDUE FROM STRAWBERRY PROCESSING (*Fragaria x ananassa*)**

Table 1: Actual and coded values of the variables studied for the full factorial 2 <sup>3</sup> experimental planning.....	45
Table 2: Extraction values of pelargonidin 3-glucoside using 5 different acids.....	49
Table 3: Results of the full 2 <sup>3</sup> factorial planning.....	50
Table 4: Estimated effects and the variance analysis or the process for the anthocyanins extraction yield.....	51
Table 5: Maximum ascent path experimente.....	52
Table 6: Experimental designs composite central using surface methodology and results.....	53

#### **OBTENTION OF NATURAL DYES FROM INDUSTRIAL BLACKBERRY PULP RESIDUES (*Rubus sp*)**

Table 1: Real and coded values of variables for the full 2 <sup>3</sup> factorial design.....	63
Table 2: Experimental designs (composite, using surface methodology) and results.....	68
Table 3: Estimated effects and analysis of variance for anthocyanin yields.....	69

#### **THE WASTE PROCESSING PEACH (*Prunus persica*) USED FOR THE CAROTENOIDS EXTRACTION**

Table 1: Real and coded values of variables for the full 2 <sup>3</sup> factorial design.....	80
Table 2: Experimental designs (composite, using surface methodology) and results.....	84
Table 3: Estimated effects and the variance analysis or the process for the yield carotenoid extraction.....	85

## RESUMO

O Brasil é o terceiro maior produtor de frutas no mundo, sendo estas ricas em muitos nutrientes e compostos antioxidantes, os quais se concentram majoritariamente nas cascas e sementes. A indústria de processamento de frutas produz uma grande quantidade de resíduos agroindustriais, causando problemas ambientais e custos para as empresas. Estes resíduos são ricos em pigmentos que podem representar uma fonte potencial de obtenção de corantes naturais. Na indústria de alimentos, os carotenoides e as antocianinas são usados como corantes alimentares naturais, além de apresentarem importantes funções fisiológicas como a prevenção da degeneração celular, de doenças cardiovasculares, de processos anti-inflamatórios e anticancerígenos. Este trabalho teve como objetivo a obtenção de corantes naturais a partir dos resíduos da indústria de processamento de polpas de frutas, utilizando três tipos de resíduos provenientes do processamento do morango, da amora e do pêssego. As análises foram efetuadas para identificação e quantificação dos pigmentos carotenoides (resíduo de pêssego) e de antocianinas (resíduos de morango e amora). As antocianinas do resíduo do morango foram extraídas utilizando etanol acidificado (1 %) com 5 diferentes ácidos: clorídrico, cítrico, tartárico, láctico e fosfórico. Para a extração das antocianinas do resíduo de amora foram testados etanol e acetato de etila acidificados com ácido clorídrico (0,1 %) e finalmente para a extração de carotenoides do resíduo do pêssego foi utilizado etanol absoluto. Os ensaios de extração foram avaliados com base em um Planejamento Experimental Completo, para determinar a variação do volume de solvente (20 a 50 mL), o número de extrações (1 a 5) e o tempo (10 a 30 minutos) de extração para obter as melhores condições. No estudo com o resíduo do processamento da polpa de pêssego o aumento do número de extrações e quantidade de solvente proporcionou um maior rendimento na produção de carotenoides, com recuperação de 66 % do total de compostos, sendo que as condições otimizadas foram 4 extrações de 10 minutos usando 38,5 mL de etanol, o que representou 168,59 µg/ g de carotenoides totais, sendo que 67,55 µg/ g de β-caroteno, 86,75 µg/ g de criptoxantina, 12,08 µg/ g de zeaxantina e 2,2 µg/ g de luteína. Em relação ao resíduo proveniente do processamento da polpa de amora, o aumento do número de extrações proporcionou um maior rendimento de antocianinas e as condições otimizadas, com recuperação de 59 % dos compostos foram 3 extrações com 20 mL de etanol acidificado ( % HCl) durante 10 minutos. Com tais condições, 25,95 mg de cianidina 3-glicosídeo foram

obtidos em 100 g de resíduo de amora. Finalmente, para extração do resíduo do processamento da polpa de morango, um maior número de extrações e tempo mais prolongado proporcionou melhor rendimento nos extratos. Neste caso, as melhores condições que representaram 98 % de recuperação foram 20 mL de etanol (1 % HCl) em 4 extrações durante 12 minutos, onde obteve-se 703,45 µg/ g de pelargonidina 3-glicosídeo. Os resíduos de pêssego, amora e morango representam potenciais fontes de corantes naturais e a extração de tais compostos uma alternativa para o aproveitamento do material que é gerado e descartado no processamento das polpas.

*Palavras-chaves:* antocianinas; carotenoides; pigmentos; extração.

## ABSTRACT

Brazil is the world's third largest producer of fruits that are rich in many nutrients and antioxidants, which are concentrated mainly in the skins and seeds. The fruit processing industry produces a large quantity of agro-industrial waste, causing environmental problems and costs for businesses. These wastes are rich in pigments that may represent a potential source for obtaining natural dyes. In the food industry, the carotenoids and anthocyanins are used as natural food dyes, and present significant physiological functions such as the prevention of cell degeneration, cardiovascular diseases, anti-inflammation and anti-cancer. This study aimed to obtain natural dyes from waste of processing fruit pulp industry, using three types of waste from the processing of strawberry, blackberry and peach. The samples were analyzed for identification and quantification of the carotenoid pigments (peach waste) and anthocyanins (strawberry and blackberry waste). Anthocyanins were extracted from the strawberry waste using ethanol acidified (1 %) with 5 different acids: hydrochloric, citric, tartaric, lactic and phosphoric acid. For the extraction of anthocyanins from blueberry waste was tested ethyl acetate and ethanol acidified with hydrochloric acid (0.1 %), and finally for the extraction of carotenoids from peach residue was used absolute ethanol. Extraction tests were evaluated on full experimental design to determine the variation of the solvent volume (20 to 50 ml), the number of extractions (1 to 5) and time (10 to 30 minutes) to obtain the optimum conditions. In the study with the waste from peach pulp processing, the increasing of number of extractions and the amount of solvent provided higher yield in the production of carotenoids, with a recovery of 66 % of the composite total, and the optimized conditions were 4 extractions for 10 minutes using 38.5 mL of ethanol, obtaining to 168.59  $\mu\text{g/g}$  of total carotenoids, with 67.55  $\mu\text{g/g}$  of  $\beta$ -carotene, 86.75  $\mu\text{g/g}$  cryptoxanthin, 12.08  $\mu\text{g/g}$  zeaxanthin and 2.2  $\mu\text{g/g}$  lutein. About the waste from the processing of of blackberry pulp, increasing the number of extraction provides a higher yield of anthocyanins and optimized conditions, with 59 % recovery of compounds, were 3 extractions with 20 mL of acidified ethanol (0.1 % HCl) for 10 minutes. In these conditions, 25.95 mg of cyanidin 3-glucoside were obtained from 100 g of of blackberry waste. Finally, for the extraction from the residue of strawberry pulp processing, a greater number of extractions and longer time improved the yield in the extract. Thus, the optimal conditions responsible for 98 % of recovery were 20 mL of ethanol (1 % HCl) in 4extractionfor 12 minutes, which was obtained 703.45  $\mu\text{g/g}$  of

pelargonidin 3-glucoside. The waste peach, blackberry and strawberry represent potential sources of natural dyes, and extraction of these compounds is an alternative to the use of the material generated and disposed in the pulp processing.

*Keywords:* anthocyanins; carotenoids; pigments; extraction.

## INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro maior produtor de frutas no mundo. As frutas são ricas em muitos nutrientes e compostos antioxidantes e estudos têm demonstrado que esses constituintes se concentram majoritariamente nas cascas e sementes (IBRAF, 2013; MELO et al., 2008; ABRAHÃO et al., 2010).

A indústria de processamento de frutas produz, ao longo de sua cadeia produtiva, uma grande quantidade de resíduos agroindustriais, gerando na produção de sucos, por exemplo, entre 30 e 40% de resíduos os quais podem causar problemas ambientais e custos para as empresas (SENA & NUNES, 2006; MARTINS & FARIA, 2002). A maior parte dos resíduos é constituída por cascas e sementes, que são ricos em pigmentos e podem representar uma fonte potencial de obtenção de corantes e/ou compostos bioativos.

O desenvolvimento da indústria alimentícia levou à produção de diferentes corantes, estando disponíveis no mercado corantes artificiais e naturais. Os aditivos químicos, como os corantes artificiais são uns dos mais polêmicos avanços da indústria de alimentos, já que seu uso em muitos alimentos justifica-se apenas por questões de hábitos alimentares, para aumentar a aceitabilidade do consumidor (PRADO & GODOY, 2003). A comercialização desses compostos para fins alimentícios tem requerido rigorosa avaliação de sua toxicidade (AMIN; HAMEID; ABD ELSTAR, 2010; EL-WAHAB & MORAM, 2013), uma vez que vários estudos ao longo dos anos vêm apontando problemas de alergia e outros malefícios à saúde (WANZENNE, 2005). Embora, os corantes artificiais apresentem menores custos de produção e maior estabilidade, o número de aditivos sintéticos permitidos em países desenvolvidos está diminuindo a cada ano, em favor dos pigmentos naturais (NETTO, 2009).

Os corantes obtidos de fontes naturais estão relacionados com importantes atividades biológicas. Seus efeitos benéficos à saúde estão relacionados às suas propriedades antioxidantes, incluindo a proteção contra danos oxidativos a componentes celulares, efeitos anti-inflamatórios e prevenção de doenças crônicas (VOLP; RENHE; STRINGUETA, 2009).



Contudo, os corantes naturais apresentam algumas desvantagens em relação aos artificiais, como a sensibilidade à luz, ao calor, ao oxigênio ou a ação das bactérias, e, conseqüentemente, não são estáveis. Apesar disso, a substituição dos corantes artificiais pelos naturais tem sido gradativa na indústria, e não há evidências de danos à saúde após anos de utilização dos mesmos (NETTO, 2009).

Neste contexto, os carotenoides constituem um grupo importante de pigmentos naturais, responsáveis pelas cores de muitas frutas, hortaliças, gema de ovo, crustáceos e alguns peixes, podendo ser usados como corantes alimentares naturais na indústria. (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFAN, 2008). Os carotenoides possuem importantes funções de promoção da saúde e ações como pró-vitamina A, o aumento da atividade do sistema imunológico e redução do risco de doenças degenerativas, como câncer e doenças cardiovasculares (STRATI & OREOPOULOU, 2011).

Outro grupo de pigmentos vegetais utilizados como corantes naturais são as antocianinas, responsáveis pela maioria das cores vermelho, azul e roxo de frutas, legumes, flores e outros tecidos vegetais. O interesse e o sucesso da aplicação de antocianinas como corante natural estão no fato de que proporcionam uma excelente cor vermelho brilhante em produtos ácidos, como refrigerantes, conservas, geléias e doces. Além da sua função como corante, estes pigmentos são importantes na prevenção da degeneração celular, da ocorrência de doenças cardiovasculares, atuando também como anti-inflamatórios e anticancerígenos (VALLS et al., 2009).

## **OBJETIVO GERAL**

Obter corantes naturais e utilizar como matéria-prima o resíduo do processo de polpas de morango, amora e pêssego.

## **Objetivos Específicos**

- Avaliar condições de extração dos corantes naturais em diferentes subprodutos obtidos de indústrias produtoras de polpas de morango, amora e pêssego;

- Otimizar o processo de extração dos compostos bioativos através de um planejamento experimental;
- Identificar e quantificar carotenoides dos extratos provenientes da extração exaustiva, do planejamento experimental e do ensaio otimizado do resíduo do processo de fabricação de polpa de pêsego;
- Identificar e quantificar flavonoides (antocianinas) do extrato proveniente da extração exaustiva do resíduo do processo de fabricação de polpas de morango e amora;
- Identificar e quantificar flavonoides (antocianinas) dos extratos provenientes do planejamento experimental e do ensaio otimizado do resíduo do processo de fabricação de polpas de morango e amora.

## **CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## **1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **1.1. PRODUÇÃO DE FRUTAS NO BRASIL**

O Brasil produz frutas tropicais, subtropicais e temperadas, devido a sua extensão territorial, posição geográfica, condições climáticas e de solo. Sendo considerado o terceiro maior produtor, com 42,6 milhões de toneladas em 2,2 milhões de hectares distribuídos pelo país, suas principais regiões produtoras são Sudeste; Nordeste e Sul, com destaques para os Estados de São Paulo, Bahia e Rio Grande do Sul (IBRAF, 2013).

#### **1.1.1. Resíduos do processo de polpas de frutas**

A indústria de alimentos, em especial a de processamento de frutas, produz ao longo de sua cadeia produtiva uma grande quantidade de resíduos agroindustriais, o que gera perda de lucro, além de inúmeros problemas ambientais (SENA & NUNES, 2006; LOUSADA JUNIOR et al., 2005).

Segundo Martins e Faria (2002), do total de frutas processadas são gerados na produção de sucos e polpas, entre 30 a 40% de resíduos agroindustriais. Como a quantidade de resíduos pode chegar a muitas toneladas, agregar valor a esses produtos é de interesse econômico e ambiental, necessitando de investigação científica e tecnológica, que possibilite uma utilização eficiente, econômica e segura (SCHIEBER; STINTZING; CARLE, 2001).

Dependendo do tipo da fruta, os principais resíduos gerados na indústria são casca, caroço ou sementes e bagaço. Esses resíduos possuem em sua composição vitaminas, minerais, fibras e compostos antioxidantes importantes para as funções fisiológicas, além do que estudos têm demonstrado que os compostos bioativos de frutas concentram-se majoritariamente nas cascas e sementes (MELO et al., 2008; ABRAHÃO et al., 2010). Apesar destes materiais, possuem todas estas funções benéficas à saúde humana, a maioria das fábricas os desperdiçam (MATIAS et al., 2005; SOUSA et al., 2011).

Para minimizar os custos e diminuir o impacto ambiental as indústrias têm buscado novas alternativas para a utilização dos resíduos e uma opção viável para o aproveitamento deste material é a produção de corantes naturais, já que estes resíduos são ricos em pigmentos.

## 1.2. CORANTES

A portaria 540 da ANVISA (BRASIL, 1997) aprova o regulamento técnico de aditivos alimentares, onde constam as definições, classificações e empregos dos aditivos. Define que aditivo alimentar é qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos, sem propósito de nutrir, com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante a fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação de um alimento. Entre os aditivos encontra-se o corante que é a substância que confere, intensifica ou restaura a cor de um alimento (BRASIL, 2013).

Os corantes são adicionados aos alimentos, principalmente, para restituir a aparência original (afetada durante as etapas de processamento, de estocagem, de embalagem ou de distribuição), para tornar o alimento visualmente mais atraente (ajudando também a identificar o aroma), para conferir cor aos produtos incolores e para reforçar as cores presentes nos alimentos. Duas classes bem distintas de corantes estão disponíveis para uso em alimentos, ou seja, os sintéticos ou artificiais e os naturais. Apesar dos corantes sintéticos apresentarem menores custos de produção e maior estabilidade, o número de aditivos sintéticos permitidos nos países desenvolvidos está diminuindo a cada ano em favor dos pigmentos naturais (CONSTANT; STRINGUETA; SANDI, 2002).

O decreto 55871 da ANVISA (BRASIL, 1965), referente às normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos, define os corantes como corantes naturais, aqueles pigmentos ou corantes inócuos extraídos de substância vegetal ou animal, e os corantes artificiais, como substâncias de composição química definida, obtida por processo de síntese. A resolução 44 da ANVISA (BRASIL, 1977), alterada pela resolução 11 de 1978, classifica os corantes como corante orgânico natural, corante

orgânico sintético, corante artificial, corante orgânico sintético idêntico ao natural, corante inorgânico, caramelo e caramelo (processo amônia). Os alimentos adicionados de corantes naturais não precisam apresentar o termo “colorido artificialmente” em sua rotulagem, já aqueles que contêm corantes artificiais devem, impreterivelmente, ter essa declaração (BRASIL, 2013).

Devido à diversidade de compostos com poder corante, a lista dos corantes permitidos em cada país varia substancialmente. Em virtude do aumento no número de compostos com poder corante e de seu uso estendido aos alimentos e bebidas, tornou-se necessário o controle de suas aplicações e surgiu uma maior preocupação com possíveis efeitos à saúde humana (PRADO & GODOY, 2003).

Os compostos bioativos ocorrem naturalmente nos alimentos, principalmente em frutas e vegetais, os quais contêm, por exemplo, pigmentos naturais que estão relacionados com importantes atividades biológicas. Seus efeitos benéficos em relação à saúde estão relacionados com suas propriedades antioxidantes, na proteção contra danos oxidativos a componentes celulares, bem como seus efeitos anti-inflamatórios e na prevenção das doenças crônicas. Tais compostos também agem conjuntamente com outras substâncias como as vitaminas e os minerais (VOLP; RENHE; STRINGUETA, 2009). Alguns exemplos desses fitoquímicos presentes em frutas e vegetais são os carotenoides e os compostos fenólicos (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

### 1.2.1. Corantes sintéticos

O emprego de aditivos químicos, como os corantes, é um dos mais polêmicos avanços da indústria, já que seu uso em muitos alimentos justifica-se apenas por questões de hábitos alimentares. Em geral, a importância da aparência do produto para sua aceitabilidade é a maior justificativa para o emprego dos corantes (PRADO & GODOY, 2003).

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; STRINGUETA; SANDI, 2002). Na Noruega e na Suécia, o uso dos corantes artificiais já foi proibido e países como Canadá e Estados Unidos têm restringido diversos deles.

(CANADA, 2014); (Public Citizen Health Research Group, 1985); (NORUEGA, 2014); (SUÉCIA, 2014).

No Brasil, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), com a finalidade de minimizar os riscos à saúde humana, publicou a Resolução nº 4, (BRASIL, 1988) que estabelece o uso e os limites máximos de apenas onze corantes artificiais permitidos no país para alimentos e bebidas. São eles: Amarantho, Vermelho de Eritrosina, Vermelho 40, Ponceau 4R, Amarelo Crepúsculo, Amarelo Tartrazina, Azul de Indigotina, Azul Brilhante, Azorrubina, Verde Rápido e Azul Patente V (BRASIL, 2013).

A avaliação segura dos corantes no âmbito mundial é baseada no controle da IDA (Ingestão Diária Aceitável), desenvolvida pelo JECFA (*Joint FAO/WHO Committee on Food Additives*). Contudo, a utilização de aditivos em alimentos suscita uma série de dúvidas em relação às quantidades utilizadas pelas indústrias, se são adequadas para que o consumo de determinado alimento não permita que seja ultrapassada a IDA, na medida em que não existe obrigatoriedade legal em declarar as quantidades presentes no alimento, mas somente a relação dos aditivos utilizados (BRASIL, 2013; SCHUMANN; POLÔNIO; GONÇALVES, 2008).

Inúmeros estudos assinalam reações adversas aos aditivos alimentares, quer seja aguda ou crônica, tais como reações tóxicas no metabolismo desencadeantes de alergias, alterações comportamentais e carcinogenicidade (POLÔNIO & PERES, 2009).

A comercialização desses compostos para fins alimentícios tem requerido rigorosa avaliação de sua toxicidade (AMIN; HAMEID; ABD ELSTTAR, 2010; EL-WAHAB; MORAM, 2013), uma vez que vários estudos vêm apontando problemas de alergia e outros malefícios à saúde causados por corantes artificiais (WANKENNE, 2005).

Em um estudo para avaliar a exposição a esses corantes, 1020 indivíduos de 1 a 5 anos (grupo 1) e 6 a 18 anos (grupo 2) de idade de áreas urbanas e rurais da Índia foram pesquisados. Através de um levantamento da ingestão de produtos que continham corantes alimentares, os resultados mostraram que ambos os grupo ingeriram alimentos sólidos (2 e 465 g/ dia) e líquidos (25 a 840 mL/ dia) com adição de corantes. Entre os oito corantes permitidos no país, seis foram consumidos pela população estudada. Para alguns indivíduos a ingestão excedeu a IDA em até 200 % para os corantes tartrazina,

amarelo crepúsculo e eritrosina que é de 7,5; 2,5 e 0,1 mg/ kg de peso corporal, respectivamente. A ingestão média de corantes por pessoa foi de 17,2 mg/ dia e os autores observaram que os limites aplicados na Índia devem ser revisados não apenas através do Codex Alimentarius, mas também de acordo com a dieta populacional (RAO et al., 2004).

No estudo de Abrantes e Alves (2004), que determinou a qualidade de bebidas não alcoólicas, consumidas no município do Rio de Janeiro, em relação ao uso de corantes artificiais, as bebidas apresentaram concentrações de corantes artificiais acima do permitido por lei. Observou-se que o consumo de determinados corantes excedeu a IDA. Tal fato é relevante, principalmente para a saúde infantil, uma vez que a IDA é uma medida relacionada à massa corpórea e os principais limites hoje conhecidos são determinados, apenas, para populações adultas.

Contudo, industrialmente os corantes sintéticos apresentam vantagem em relação aos naturais por fornecerem ampla gama de cores, apresentarem maior estabilidade frente a alguns fatores, como pH, luz e temperatura, e por possuírem alto poder de absorção e menor custo de produção (NETTO, 2009).

### 1.2.2. Corantes naturais

No Brasil, a resolução nº 44 da ANVISA (BRASIL, 1977), estabelece as condições gerais de elaboração, classificação, apresentação, designação, composição e fatores essenciais de qualidade dos corantes empregados na produção de alimentos e bebidas. Conforme esta resolução, os corantes orgânicos naturais tolerados em alimentos são: curcumina, riboflavina, cochonilha, ácido carmínico, urzela, orceína, oreína sulfonada, clorofila, carvão medicinal, alfa, beta, e gama-caroteno, bixina, norbixina, capsantina, capsorubina, licopeno, flavoxantina, luteína, criptoxantina, rubixantina, violaxantina, rodoxantina, cantaxantina, vermelho de beterraba, betanina, pelargonidina, cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina e malvidina.

Corantes obtidos a partir de fontes naturais têm atividades biológicas importantes e efeitos benéficos para a saúde ligados à atividade antioxidante, a proteção contra o dano oxidativo aos componentes celulares, efeitos anti-inflamatórios e



prevenção de doenças crônicas não-transmissíveis (Cacace e Mazza, 2002); (Valls et al., 2009); (Paik et al., 2012).

Comercialmente, os tipos de corantes naturais mais largamente empregados pelas indústrias alimentícias têm sido os extratos de urucum, carmim de cochonilha, curcumina, antocianinas e betalaínas (NETTO, 2009; CONSTANT; STRINGUETA; SANDI, 2002).

Os corantes naturais apresentam algumas desvantagens em relação aos artificiais, pois são sensíveis a luz, ao calor, ao oxigênio, e, conseqüentemente, não são estáveis. Apesar destas desvantagens, a substituição dos corantes artificiais pelos naturais na indústria alimentícia tem sido gradativa. Embora apresentem desvantagens, os corantes naturais têm sido utilizados há anos sem evidências de danos à saúde (NETTO, 2009).

Os corantes naturais podem sofrer degradações com prejuízo da cor desejada durante o processo de fabricação e vida útil do alimento processado. Nos últimos anos, as indústrias de formulação de aditivos alimentícios estão prosperando e investindo em pesquisa e desenvolvimento, para deixar os corantes naturais mais estáveis à luz e ao calor, para desenvolver novas aplicações e superar problemas de fornecimento. A técnica de microencapsulação, por exemplo, tem sido utilizada para fornecer proteção aos corantes naturais que são sensíveis às condições adversas do meio, tais como calor, acidez, oxidação, luminosidade, umidade e interações com outros compostos (SANTOS; FÁVARO-TRINDADE; GROSSO, 2005; SPELLMEIER & STÜLP, 2009).

O uso de corantes obtidos a partir de fontes naturais e sua correlação com a atividade antioxidante em alimentos é objeto de interesse tanto para a indústria como para os consumidores (FALCÃO, 2007).

### 1.3. CAROTENOIDES

#### 1.3.1. Poder corante

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; KIMURA; AMAYA-FARFAN, 2008). Estas cores

são uma consequência da presença de ligações duplas conjugadas, fornecendo também propriedades antioxidantes a estes compostos (STRATI & OREOPOULOU, 2011).

Esse sistema de duplas ligações conjugadas constitui o cromóforo responsável pelo poder corante dos carotenoides e, também pela sua atuação contra doenças degenerativas. No entanto, este mesmo sistema é causa da sua instabilidade, e a preservação destes pigmentos, durante o processamento e a estocagem, é um desafio e uma grande preocupação (RODRIGUEZ-AMAYA, 1999).

Na indústria de alimentos, os carotenoides são usados como corantes alimentares naturais substituintes dos corantes sintéticos, que podem representar um potencial alergênico e cancerígeno. Os carotenoides atuam ainda como compostos antioxidantes, combatendo os radicais livres (MATIOLI & RODRIGUEZ-AMAYA, 2003). Entretanto, agentes como calor, ácidos, luz, oxigênio e enzimas como lipoxigenase, provocam a alteração nos carotenoides, resultando em formação de isômeros *cis*, epóxidos, diminuição de cor, perda da atividade pró-vitamina A e quebra da cadeia com formação de apocarotenoides (carotenoides de menos de 40 átomos de carbono) (COSTA; ORTEGA-FLORES; PENTEADO, 2002; MELÉNDEZ-MARTÍNEZ; VICARIO; HEREDIA, 2004).

Mesmo com essas questões controversas, os carotenoides têm sido alvo da biotecnologia com a finalidade de melhorar a coloração, as características físico químicas e o valor nutricional dos alimentos. Para reverter as inconveniências dos carotenoides, como a instabilidade durante o processamento do alimento e o fato de serem lipossolúveis, pesquisas de microencapsulamento de carotenoides têm sido desenvolvidas, tornando estas moléculas hidrossolúveis e protegidas contra fatores que provocam instabilidade (luz, temperatura e oxigênio) (MORAIS, 2006).

Os carotenoides podem ser utilizados para conferir ou intensificar a cor em sucos, gelatinas, pudins, biscoitos (BARROS & BARROS, 2010), bebidas, margarinas, produtos de panificação e confeitaria (DOWNHAM & COLLINS, 2000), manteiga, queijos, produtos cárneos como salsichas, peixes defumados, bebidas instantâneas (CONSTANT; STRINGUETA; SANDI, 2002) entre outros. Indiretamente, através da dieta dos animais, servem para intensificar a cor de alimentos, como por exemplo, da

gema do ovo (GARCIA et al., 2009), bem como na aquicultura (WATHNE et al., 1998).

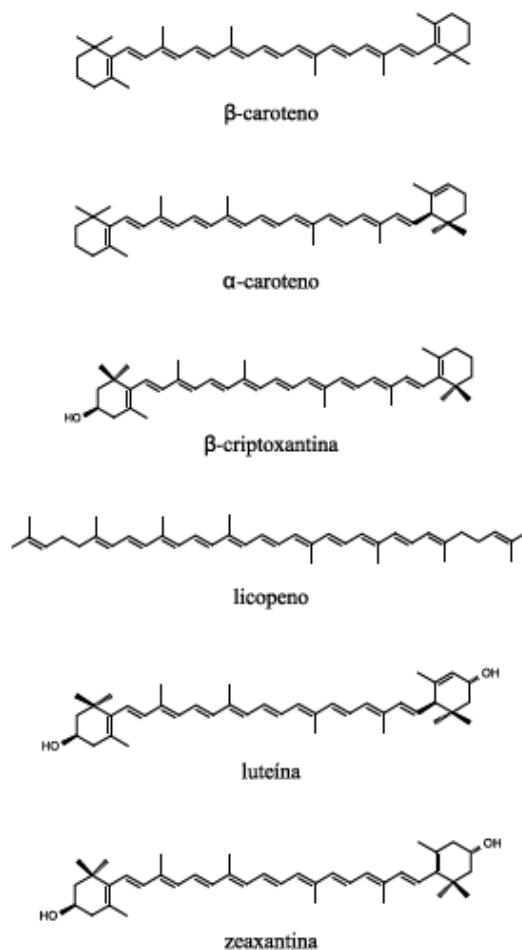
Na indústria alimentícia, os carotenoides podem também ser aplicados em suplementos nutricionais (VALDUGA et al., 2009) sendo estes provenientes da produção por rota biotecnológica, tendo como destaque a comercialização de  $\beta$ -caroteno pelas leveduras como *Xanthophyllomyces dendrorhous* (CHOCIAI et al., 2002) e *Rhodotorula glutinis* (AKSU & EREN, 2007).

O  $\beta$ -caroteno também é encontrado nas microalgas e macroalgas. Geralmente é encontrado numa fração inferior a 1 % de massa seca, mas pode ser acumulado até aproximadamente 10 % em espécies halotolerantes (crescem em elevada concentração de sal). O  $\beta$ -caroteno de fonte microalgal tem sido comercializado sob três formas: extratos, pó e como biomassa seca (DERNER et al., 2006).

### 1.3.2. Ação Antioxidante

A figura 1 apresenta estruturas dos principais carotenoides. Esses compostos são reconhecidos pelas suas propriedades antioxidantes, protegendo as células de danos oxidativos provocados por radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROS). Essas moléculas derivadas do oxigênio, como peróxido de hidrogênio podem ser geradas no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana, atacando lipídios, proteínas, carboidratos e DNA (SHAMI & MOREIRA, 2004).

Figura 1: Estruturas dos carotenoides considerados importantes para a saúde.



Fonte: Tabela Brasileira de Carotenoides, 2008.

Os carotenoides são eficientes principalmente na desativação de oxigênio singlete, que constitui uma forma altamente reativa do oxigênio molecular, o qual apresenta dois elétrons não pareados. A ordem crescente de capacidade de sequestrar o oxigênio singlete por parte dos carotenos e xantofilas é: licopeno, astaxantina ou cantaxantina, β-caroteno ou bixina, luteína e crocina (FONTANA et al., 2000).

Os carotenoides possuem importantes funções de promoção da saúde e ações como pró-vitamina A, aumento da atividade do sistema imunológico e redução do risco de doenças degenerativas, como câncer e doenças cardiovasculares (STRATI & OREOPOULOU, 2011).

Abdel-Aal et al. (2013) aborda que o estresse oxidativo, envelhecimento e tabagismo são conhecidos por causar catarata e degeneração macular relacionada com a idade e que uma dieta contendo luteína e zeaxantina estão relacionadas com diminuição

do risco destas doenças, relatando que estes carotenoides são potentes antioxidantes associados com a redução do risco de doenças da retina.

A atividade antioxidante dos carotenoides também está associada à prevenção de diversas doenças cancerígenas, conforme os trabalhos revisados por Edge, McGarvey e Truscott (1997) o potencial antioxidante dos carotenoides pode prevenir o aparecimento de câncer, bem como evitar o aparecimento de outras doenças como aterosclerose, a catarata, a degeneração macular relacionada com a idade e esclerose múltipla.

As características estruturais e metabólicas básicas de vitamina A e carotenoides, bem como informações sobre o seu potencial como antioxidantes em relação à doença cardíaca foram relatadas em trabalhos revidos por Palace et al. (1999), onde as dietas ricas em antioxidantes têm sido citadas como eficazes para reduzir o dano oxidativo em ratos, especialmente no tecido cardíaco e estes compostos, como os carotenoides são fisiologicamente importantes antioxidantes capazes de inibir o desenvolvimento ou progressão de doenças do coração, como lesão de isquemia-reperfusão, insuficiência cardíaca congestiva, doença arterial coronariana, cardiomiopatia diabética e adriamicina cardiotoxicidade induzida.

Woodside et al. (2015) relacionaram os carotenoides com a promoção da saúde através de sua atividade antioxidante e anti-inflamatória e sua capacidade de melhorar a resposta imunológica do organismo. Estas atividades estão ligadas a uma capacidade de prevenir doenças crônicas, como câncer e doenças cardiovasculares, em preservar a função visual através da proteção contra a degeneração macular relacionada com a idade e também outras funções relacionadas com o envelhecimento, tais como a função cognitiva e a força muscular. Na relação de carotenoides e risco de câncer é provável que o consumo de alimentos que contenham estes compostos proteja contra o câncer de boca, faringe, laringe e esôfago. A diminuição do risco de câncer de próstata foi relacionada com o consumo de licopeno, o consumo de  $\beta$ -caroteno pode ter um efeito benéfico sobre o câncer de pulmão e  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina, luteína, zeaxantina, licopeno e carotenóides totais tem associação com a redução do risco de câncer de mama. Quanto a relação dos carotenoides e a função cognitiva, luteína, zeaxantina e  $\beta$ -caroteno foram relacionados a uma melhor cognição, sendo que concentrações de luteína no cérebro têm sido menores em pacientes de comprometimento cognitivo leve do que naqueles com função cognitiva normal. Quanto ao potencial de carotenoides

para preservar a função física, estudos têm sugerido que o baixo nível sérico ou a baixa ingestão de  $\beta$ -caroteno foi associado com baixa força muscular, que quando prejudicada causa grave limitação física para idosos, sugerindo que um plasma com alta concentração de carotenoides podem proteger contra o declínio da velocidade de caminhada e desenvolvimento de deficiência física presente em idosos.

## 1.4. ANTOCIANINAS

### 1.4.1. Poder Corante

O termo antocianinas (do grego: *anthos* = flores; *kianos* = azul) surgiu para referir-se aos pigmentos azuis encontrados em flores. Atualmente, sabe-se que as antocianinas, pigmentos da classe dos flavonoides, são responsáveis pelas cores: azul, violeta, vermelho e rosa de flores e frutas (TERCI & ROSSI, 2002).

De acordo com Teixeira, Stringheta e Oliveira (2008), as antocianinas formam um dos maiores grupos de pigmentos distribuídos no reino vegetal e provavelmente são os mais conhecidos. A indústria da uva e do vinho já utiliza seus subprodutos na obtenção comercial de antocianinas.

O interesse e o sucesso da aplicação de antocianinas como corante natural estão no fato de proporcionarem coloração vermelho brilhante em produtos ácidos, como refrigerantes, conservas, geléias e doces e que podem ser usadas como um substituto vegetariano para o carmim de cochonilha em produtos com baixo pH (DOWNHAM & COLLINS, 2000).

Para Cabrita, Fossen e Andersen (2000), uma característica própria das antocianinas é a influência de sua estrutura e do pH do meio na expressão da cor. A sua intensidade e estabilidade mudam drasticamente na faixa de pH entre 1 e 12. Em soluções aquosas fortemente acidificadas, apresentam cor vermelho intensa e alta estabilidade, enquanto que a partir do pH 7 adquirem, gradualmente, uma coloração azulada e menor estabilidade.

O uso de antocianinas como corante é indicado para alimentos não submetidos a temperaturas elevadas durante o processamento, com tempo curto de armazenamento e

embalados de forma que a exposição à luz, ao oxigênio e à umidade seja minimizada. (FENNEMA, 2000).

A primeira aplicação das antocianinas em alimentos foi na indústria de bebidas, principalmente nos refrigerantes (incluindo carbonatados, refrescos, isotônicos, águas aromatizadas, entre outros). Os refrigerantes têm o meio perfeito para mostrar o brilho e as cores vivas das antocianinas. O pH ácido (abaixo de 3,5 na maioria dos casos) e o tratamento térmico leve (pasteurização) permitem a estabilidade da cor no produto final. Além dessa ampla utilização em bebidas, as antocianinas são aplicadas também em doces, produtos de confeitaria, cobertura de bolo, gelatinas, geleias, balas, confeitos, sorvetes e molhos (BARROS & STRINGHETA, 2006; HE & GIUSTI, 2010).

#### 1.4.2. Ação Antioxidante

Há evidências de que o consumo de alimentos ricos em antocianinas promova benefícios à saúde. Tal evidência foi relatada pela primeira vez no final de 1980 com a publicação do "Paradoxo Francês", que indica que os franceses têm 30 % menos chances de ter ataques do coração em relação aos americanos, apesar de comerem quatro vezes mais manteiga, tendo índices mais elevados de colesterol no sangue e maior pressão sanguínea. Isto tem sido atribuído ao consumo moderado de vinho tinto diariamente pelos franceses. No início, acreditava-se que a proteção oferecida pelo vinho tinto era devido ao seu teor de álcool, mas constatou-se que os vinhos brancos não ofereciam níveis similares de proteção. Logo, as antocianinas e outros polifenóis contidos no vinho tinto foram considerados importantes compostos com funções bioativas (GLOVER & MARTIN, 2012).

As antocianinas têm sido relatadas como compostos benéficos para a saúde, com potenciais efeitos fisiológicos, como antineoplásicos, proteção contra radiação, vasodilatadores, vasoprotetores, anti-inflamatórios e hepatoprotetores. Estes pigmentos têm ainda um grande apelo mercadológico por ser uma substância antioxidante, protegendo as células de danos oxidativos e, conseqüentemente, retardando o envelhecimento das células (CACACE & MAZZA, 2002).

Segundo Valls et al. (2009), as antocianinas podem prevenir a ocorrência de cataratas em indivíduos diabéticos, doença fibrocística da mama e reduzir os teores elevados de colesterol. Por isso, as antocianinas são largamente utilizadas para a produção de compostos nutracêuticos e novos alimentos funcionais.

O consumo de antocianinas podem também melhorar a função dos adipócitos, e, portanto, evitar a obesidade (TSUDA, 2008). Essa função de controle da obesidade pode ainda contribuir para a prevenção da diabetes do tipo 2 (AL-AWWADI et al., 2005).

Kruger et al. (2014) verificaram em muitos trabalhos evidências clínicas para a eficácia dos flavonoides contra doenças cardiovasculares e os possíveis mecanismos de ação e vias de sinalização celular envolvidas neste efeito. Estudos sugeriram que a ingestão de antocianinas apresenta uma redução significativa da mortalidade por doenças cardiovasculares, sendo que suplementação de proantocianidina tem um efeito positivo sobre a função vascular e reduz a atividade plaquetária, limitando o stress oxidativo.

O papel das antocianinas na redução de fatores de risco e a prevenção de problemas de saúde cardiovascular (plaquetas, aterosclerose, pressão arterial, marcadores relacionadas à inflamação, etc.), foram relatados na revisão de Pascual-Teresa, Moreno e García-Viguera (2010). As antocianinas são capazes de atuar em diferentes células envolvidas no desenvolvimento de aterosclerose e elas têm mostrado ter um efeito protetor na secreção de células endoteliais humanas primárias. Também no fator de crescimento endotelial vascular (pró-angiogénico e pró-aterosclerótico). As antocianinas têm um efeito sobre a distribuição do colesterol, protegendo as células endoteliais.

## 1.5. METODOLOGIAS DE OBTENÇÃO DE CORANTES NATURAIS

A legislação brasileira vigente, através da resolução 44 da ANVISA (BRASIL, 1977), permite a utilização dos seguintes solventes e veículos na elaboração e processamento dos corantes: água, açúcares, álcool etílico, amidos, cloreto de sódio, dextrina, gelatina, glicerol, óleos e gorduras comestíveis (BRASIL, 2013). Logo, tem-se uma gama de compostos que pode estar presentes na etapa de extração, no caso dos



pigmentos naturais, permitindo a aplicação de diversas tecnologias no processo de obtenção dos mesmos, e, posteriormente, seu uso em alimentos.

#### 1.5.1. Metodologias de extração de carotenoides

Os solventes orgânicos são os mais indicados para a extração de carotenoides. Ajila, Bhat e Prasada Rao (2007) avaliaram, na Índia, o conteúdo de carotenoides totais na casca de manga pela homogeneização da casca com metanol contendo KOH. O melhor resultado obtido foi de 403 mg/ 100 g de casca.

Nunes e Mercadante (2004) desenvolveram e otimizaram um método para extração de licopeno a partir de resíduo de tomate. Isso foi realizado através de um planejamento experimental fatorial que se constituiu de uma etapa preliminar para retirada de água do tomate, com 4 extrações de 30 minutos com etanol, seguida por 4 extrações de 120 minutos com acetato de etila. O teor de carotenoides médio (calculado como licopeno) obtido de 6 lotes de tomate foi de  $59,2 \pm 21,8$  µg/ g.

Li et al. (2013) desenvolveram um método fácil, econômico e ecológico para extrair carotenoides de cenouras frescas. O óleo de girassol foi utilizado como substituto dos solventes orgânicos e o processo foi comparado com o método convencional, utilizando hexano. Os resultados mostraram que ao utilizar óleo de girassol como solvente obteve-se um maior rendimento de β-caroteno (334,75 mg / L), em 20 minutos, enquanto que, usando hexano, para atingir um rendimento o valor manteve-se semelhante (321,35 mg / L), porém foi necessário um maior tempo de extração (60 min). Logo, evidenciou-se que o óleo de girassol pode ser um substituto seguro dos solventes a base de petróleo na extração de carotenoides.

Muitos estudos podem ser encontrados com a utilização de CO<sub>2</sub> supercrítico para extração de carotenoides. Gracia et al. (2011) utilizaram CO<sub>2</sub> supercrítico para extração de tocoferóis, carotenoides e clorofilas de cascas de azeitonas, resíduo da produção do azeite de oliva, para obter extratos livres de resíduos de solventes. Uma metodologia de superfície de resposta foi utilizada para avaliar a influência da pressão (25–35 MPa) e da temperatura (313–333 K) na qualidade do extrato (expressos em tocoferóis, carotenoides e clorofilas). Também foi avaliado o uso de etanol como co-solvente. Os resultados mostraram que a adição de etanol como um co-solvente para o dióxido de

carbono supercrítico aumenta o rendimento de extração de carotenoides e clorofila. Os níveis de concentração dos compostos nos extratos aumentaram ligeiramente com a pressão e diminuíram com o aumento da temperatura, logo os valores máximos obtidos foram com 35 MPa e 313 K .

Filho et al. (2008) utilizaram a extração supercrítica com dióxido de carbono (SC-CO<sub>2</sub>) para obter carotenoides a partir da polpa liofilizada de pitanga (*Eugenia uniflora L.*). A extração SC-CO<sub>2</sub> foi realizada em duas temperaturas (40 e 60 °C) e sete pressões (100, 150, 200, 250, 300, 350 e 400 bar). A recuperação máxima (55 % do total de carotenoides) foi obtida a 60 °C e 250 bar.

No estudo de Abreu et al. (2013) foram extraídos pigmentos carotenoides do subproduto do processamento do suco de caju através de um extrato aquoso. Para a obtenção do extrato aquoso a massa de fibras de caju foi misturada com água (1:1 w/w) e homogeneizada. A mistura foi prensada numa prensa do tipo helicoidal contínuo (Incomap 300), com uma capacidade nominal de 300 kg / h para a produção de suco. A operação foi repetida por seis ciclos consecutivos. Após os seis passos de prensagem, uma suspensão com a cor amarela foi obtida e pré-filtrada através de uma malha de aço inoxidável 0,3 mm para remoção de grandes partículas. Para obtenção do extrato concentrado, o extrato aquoso foi submetido a um sistema de microfiltração equipado com membranas de cerâmica tubular. O extrato de carotenoides do subproduto do caju representou uma interessante fonte de xantofilas (principalmente auroxantofila e  $\beta$ -criptoxantina).

Um resíduo que contém grandes quantidades de carotenoides são cascas de cenouras. Um método de extração assistida por micro-ondas (MAE) foi estudado como alternativa promissora para extrair carotenoides. Foram testadas variáveis como potência do microondas (180 ou 300 W), volume de solvente (75 ou 150 mL) e o uso de radiação de microondas, intermitente a vários valores de razão de intermitência, que refere-se à fração do tempo de radiação de microondas para o tempo total de processamento em um ciclo ( $\alpha = 1/2, 1/3$  e  $1/4$ ), para permitir que não haja degradação térmica excessiva de  $\beta$ -caroteno e carotenoides, já que a MAE prolongada acarreta este tipo de degradação. O uso de  $\alpha = 1/4$  juntamente com potência 180 W, 75 ml: 2 g e 300 W, 150 ml: 2 g resultaram em maiores quantidades de  $\beta$ -caroteno em comparação com a utilização do MAE contínuo. O rendimento máximo de  $\beta$ -caroteno encontrado nas

condições de 180 W/ 75 mL, 300 W/ 75 mL, 180 W/ 150 mL and 300 W/ 150 mL foram 1126, 1327, 1225 e 1109 µg/ g, respectivamente em espectrofotômetro (HIRANVARACHAT & DEVAHASTIN, 2014)

### 1.5.2. Metodologias de obtenção de corantes de antocianinas

As antocianinas podem ser extraídas por diferentes solventes. Por serem moléculas polares, o uso de soluções hidroalcoólicas tem mostrado resultados satisfatórios. O rendimento da extração depende do solvente e do método aplicado, que pode ser baseado em mecanismos químicos diferentes, além do que há grande variação na composição do extrato em função do solvente utilizado. Para a estabilização da antocianina e obtenção de uma cor vibrante, pode-se adicionar pequenas concentrações de ácido (aproximadamente 1 %) ao solvente.

Em um estudo com o bagaço de uva, importante subproduto do processo de vinificação, aplicou-se diferentes sistemas de solventes para determinar a eficiência de extração de compostos com capacidade antioxidante. Realizou-se a quantificação de compostos fenólicos totais, antocianinas totais e atividade antioxidante nos extratos do bagaço de uva *Vitis vinifera* das variedades Tannat e Ancelota, provenientes da região de Videira, Santa Catarina. Os extratos foram preparados com 2,5 g de bagaço seco desengordurado, utilizando, como solventes extratores etanol e acetona em soluções aquosas: etanol e acetona a 0, 30, 50, 70 e 100 % (v/v), acidificados com HCl (0,1 %). A extração (3 x 25 mL) foi procedida sob agitação mecânica e ao abrigo da luz no intervalo de 2 horas, sendo posteriormente filtrados em papel filtro Whatman nº 1 e transferidos para balão volumétrico com volume final ajustado para 50 mL. Os conteúdos de antocianinas totais em ambas as variedades foram maiores no extrato de etanol em concentrações de 50 e 70 % (ROCKEMBACH et al., 2008).

Métodos convencionais de extração de antocianinas usualmente empregam ácido clorídrico diluído em metanol. Metanol contendo 0,001 % de HCl mostra-se mais efetivo, porém o HCl é corrosivo e o metanol é tóxico para o ser humano, conseqüentemente, para utilização em alimentos faz-se necessária a utilização de outros sistemas de extração (LOPES et al., 2007). Zou e colaboradores (2012) utilizaram metanol como solvente e otimizaram a extração de antocianinas de amora (*Roxb.*) sob

condições assistidas em micro-ondas utilizando a metodologia de superfície de resposta (RSM). A concentração de metanol (10 %, 30 %, 50 %, 70 %), potência de micro-ondas (240, 320, 400 e 480 W) e tempo de extração (40, 80, 120, 160 s) foram escolhidas como variáveis independentes. As condições otimizadas em micro-ondas foram: 59,6 % de metanol acidificado, 425 W de potência e 132 segundos, sendo que sob estas condições 54,72 mg de antocianinas foram obtidos a partir de 1,0 g de pó de amora. Além disso, no mesmo trabalho, foi verificado que, em comparação com a extração convencional, o micro-ondas é mais rápido e eficiente para extrair antocianinas de amora.

Outro ponto crítico da extração de antocianinas é o controle de acidez durante o processo. Com metanol, o ácido cítrico é o mais efetivo ácido orgânico, seguido pelos ácidos tartárico, fórmico, acético e propiônico. Com água, os melhores ácidos são ácido acético, cítrico, tartárico e hidrocloreídrico (HARBONE & WILLIAMS, 2000).

Para verificar a influência do pH no perfil espectroscópico do extrato e no teor de antocianinas, Bordignon Jr et al. (2009) prepararam diferentes extratos etanólicos de morango, uma vez que a razão volumétrica de 70 de etanol para 30 de água tem demonstrado ser tão eficiente quanto o metanol. As frutas congeladas foram extraídas por saponificação à temperatura ambiente com solução hidroetanólica sob diferentes valores de pH (1,0; 3,0 ; 4,5; 7,0; 9,0 e 13,0). A extração em meio ácido, com pH 1,0 foi a mais eficiente para a análise de antocianinas.

Gamarra et al. (2009) extraíram os pigmentos do grupo das antocianinas das variedades de milho roxo e do milho vermelho (*Zea. Mays L.*) utilizando três métodos de extração: imersão, lixiviação e extração supercrítica (ESC). Na imersão foi utilizado um tempo de extração de 60 horas, com a rotação de 1500 rpm a cada 4 horas, para que as moléculas a serem extraídas estabilizassem. Durante este processo, o potencial aparente da mistura foi ajustado até pH 1 e reajustado quando necessário (geralmente após 30 minutos). Os resíduos foram removidos utilizando-se o mesmo solvente da extração, até a completa retirada dos pigmentos. Na lixiviação o sistema manteve-se à temperatura de 55 °C e 1 bar de pressão durante 90 minutos, para evitar a degradação dos pigmentos. Nestes processos utilizaram-se água deionizada, etanol, metanol, éter de petróleo, ciclo hexano e isopropanol como solventes. A extração supercrítica foi realizada a temperaturas de 40 e 45 °C e pressões de 250 e 300 bar, durante 4 horas,

depois de ter atingido o equilíbrio termodinâmico. Os resultados mostraram que a lixiviação com algumas modificações foi o método mais eficiente nas extrações dos corantes (aproximadamente 88 % de antocianinas), assim como na recuperação dos solventes (aproximadamente 85 %), enquanto que o metanol foi o solvente mais eficiente durante a extração.

Valduga et al. (2008) obtiveram um corante natural (antocianina), na forma de pó a partir do bagaço de uva da cultivar "Isabel" (*Vitis labrusca*). Nesta pesquisa foram realizados estudos de extração e encapsulamento. Empregou-se o método de extração por imersão mediante técnica de planejamento experimental, onde as variáveis avaliadas foram pH da solução de extração (1-2), volume de etanol (100-250 mL), tempo de extração (3-7 h) e temperatura de extração (15-35 °C). A concentração máxima de antocianinas totais obtidas foi de 300 mg/ 100 g de bagaço de uva (umidade 5 %) nos níveis inferiores de pH (1,0) e tempo (3 horas) e superiores de temperatura (35 °C) e volume de etanol (250 mL).

Kajdžanoska, Petreska e Stefova (2011) avaliaram 8 diferentes misturas de solventes utilizando acetona ou metanol puro e combinados com ácido acético, fórmico e hidrocloreídrico para extração de compostos fenólicos do morango. Os valores para pelargordinina 3-glicosídeo variaram de 42,7 µg/ g (metanol/ácido fórmico 95:5) até 84,6 µg/ g (metanol puro). O valor encontrado para extração com acetona, conforme metodologia deste trabalho foi de 69,0 µg/ g. Os resultados demonstraram que acetona/ácido acético 99:1 apresentou os melhores resultados para a extração dos 28 compostos estudados no trabalho.

Nicoue, Savard e Belkacemi (2007) extraíram antocianinas de uma mistura de variedades de mirtilo provenientes do Canadá utilizando como solvente etanol e etanol acidificado com 5 diferentes ácidos: ácido cítrico, tartárico, láctico, fosfórico e hidrocloreídrico, nas temperaturas de 7,7 °C, 26 °C e 79 °C durante 2 horas para investigar os efeitos destes parâmetros no rendimento da extração. Os melhores resultados foram obtidos com etanol acidificado com ácido fosfórico, a 79 °C, onde o rendimento total de antocianinas foi de 26,7 mg/ g de matéria seca pela quantificação realizada por cromatografia líquida de alta eficiência e 28, 2 mg/g de matéria seca com quantificação por espectrofotometria, sendo neste último caso os resultados expressos em cianidina 3-glicosídeo, representando 98,4 e 100 % de extração respectivamente.

Muitos fatores podem e devem ser considerados no momento da escolha do solvente e das variáveis que podem influenciar uma extração, Lee e Wrolstad (2004) utilizaram resíduos agroindustriais do processamento do mirtilo e avaliaram temperatura (50 e 80 °C) adição de ácido cítrico (0 a 1 %), emprego de SO<sub>2</sub> (0,5 e 100 ppm) e tratamento com enzimas para extrair antocianinas e polifenóis (pectinase, celulase, and hemicellulase activity) de processamento de suco industriais. O total de antocianinas obtido da fruta inteira foi de 230 mg/ 100 g, da casca foi de 188,5 mg/ 100g, da polpa foi 5,8 mg/ 100g e das sementes foi de 0,1 mg/ 100g, utilizando acetona e água (70:30), sendo a quantificação realizada em espectrofotômetro e expressadas como cianidina 3-glicosídeo. A quantidade de antocianinas dos extratos tratados pelas enzimas variou de 20,5 a 28,1 mg de cianidina 3-glicosídeo/ 100 g fruta inteira e 100,4 a 137,9 mg/ 100 g de casca, mas não houve diferença significativa em relação a quantidade de antocianinas entre os extratos tratados com a enzimas (petinase, celulase e hemicelulase) e o controle (sem enzima). Ainda de acordo com os autores, os resultados para a fruta inteira como para as cascas apresentaram diferença significativa para as variáveis temperatura, adição de ácido, SO<sub>2</sub> e para as interações temperatura/SO<sub>2</sub> e SO<sub>2</sub>/adição ácido. A extração de antocianinas da casca e da fruta inteira não podem ser explicadas através de seus efeitos principais isoladamente, pois como mencionado as interações foram significativas. Assim, foram encontrados 99,9 mg/ 100 g quando utilizado 50 ppm de SO<sub>2</sub> a 80 °C e quando foi utilizado 50 ppm de SO<sub>2</sub> com adição de ácido os resultados foram de 99,4mg/ 100 g para a fruta inteira. Para a casca, o teor de pigmentos foi de 499,5 mg/ 100 g nas condições de 100 ppm do aditivo na extração com temperatura de 50 °C e 475,3 mg/ 100 g de antocianinas a 100 ppm e com adição de ácido. Os resultados demonstraram que a combinação de temperatura e aplicação de SO<sub>2</sub> aumentou a extração de antocianinas da fruta inteira e das cascas.

## **CAPÍTULO 2: ARTIGOS CIENTÍFICOS**

**PELARGONIDIN 3-GLUCOSIDE EXTRACTION FROM THE RESIDUE  
FROM STRAWBERRY PROCESSING (*Fragaria x ananassa*)**

**Artigo formatado de acordo com as normas da revista “Food Research  
International”**



## ABSTRACT

Strawberry fruits (*Fragaria x ananassa*) have a high antioxidant capacity *in vitro* that it is associated with the content of polyphenolic compounds and, specifically, anthocyanins, the type of polyphenols that are quantitatively most important in strawberries. These compounds are considered important pigments in preventing cell degeneration and in the prevention of the occurrence of cardiovascular diseases and act as antioxidant, anti-inflammatory and anticancer agents. A potential and economic source of these compounds is the strawberry pulp processing industry, which produces a large quantity of agro-industrial waste in its production chain that is rich in pigments and antioxidant compounds. The anthocyanins were extracted using ethanol acidified with hydrochloric, tartaric, citric, lactic, and phosphoric acids, and based on complete experimental planning; they were evaluated as the amount of solvent (20 to 50 mL). The number of extractions (1 to 5) and the time (10 to 30 minutes) can affect the yield of the extracts of pelargonidin 3-glucoside from the residue of strawberry pulp processing. The best conditions were as follows: 20 mL of solvent, four extractions and 12 minutes using ethanol acidified with 1 % hydrochloric acid, where 703.45  $\mu\text{g/g}$  of pelargonidin 3-glucoside was found, representing 98 % extraction.

*Keywords:* anthocyanins, pelargonidin 3-glucoside, strawberry, pigments, extraction.

### 1. Introduction

Currently, approximately 4.2 million tons of strawberries are produced in the world, and the principal producers are Spain, Korea, Turkey, Egypt and the United States. This production has been growing and is centered in the Americas (38 %) and in Europe (37 %). These two continents represent 75 % of the world production, the rest being distributed among Asia (16 %), Africa (9 %) and Oceania (1 %) (FAO, 2011).

*In vitro* experiments have shown that the strawberry presents high antioxidant capacity associated with the content of polyphenolic compounds, especially anthocyanins, which are present in abundance in this fruit (Wang & Lin, 2000). Polyphenolic compounds are also considered important pigments in preventing cell

degeneration and in the prevention of cardiovascular disease occurrence and act as antioxidant, anti-inflammatory and anticancer compounds (Valls, Millán, Martí, Borràs, & Arola, 2009); (Paik et al., 2012); (Han, Matsumoto, Shimada, Sekikawa, & Fukushima, 2007); (Kruger, Davies, Myburgh, & Lecour, 2014).

Furthermore, anthocyanins also have excellent dye function and are responsible for the majority of the red, blue and purple colors in fruits, vegetables, flowers and other plant tissues. The interest of anthocyanins application as a natural dye is due to the excellent bright color they provide in acidic products, such as soft drinks, jellies and jams (Valls et al., 2009).

Studies show that in most varieties of strawberry, the pelargonidin 3-glucoside compound is predominant in the fruit, followed by pelargonidin 3-rutoid and cyaniding 3-glucoside. These three compounds represent more than 95 % of the total anthocyanins in strawberry (da Silva, Escribano-Bailón, Pérez Alonso, Rivas-Gonzalo, & Santos-Buelga, 2007).

The complete utilization of waste is a growing worldwide necessity in modern industry and is attracting increasing attention due to the environmental, social and economic impacts (Papargyropoulou, Lozano, k., Wright, Steinberger & Ujang, 2014). The fruits and vegetables processing industry produces large quantities of waste, which may generate 10 to 90 % of the agro-industrial wastes in industrial fruit processing (Berardini, Knödler, Schieber, & Carle, 2005); (Ayala-Zavala, Roses-Domínguez, Vega-Vega, & González-Aguilar, 2010); (Viuda-Martos, Fernandez-Lopez, Sayas-Barbera, Sendra, & Perez-Alvarez, 2011); (Martins, Mattoso, & Pessoa, 2009); (Mirabella, Castellani, & Sala, 2014). These by-products are typically unused peels, seeds and pieces of fruit that are generated in different stages of the manufacturing process and do not normally have other uses and are commonly wasted or discarded (Ajila, Bhat, & Prasada Rao, 2007).

Studies have demonstrated that tropical fruit wastes have high levels of functional substances and demonstrate great potential for use. They can be used to isolate phytochemicals for use in nutraceutical supplements, food additives, new food products and pharmaceuticals, thereby contributing to the recovery of the residues of the agro-industrial process, favoring the economic aspect and reducing the environmental

impact (Ayala-Zavala et al., 2011); (Peschel et al., 2006); (Gorinstein et al., 2011); (Lee Wrolstad &, 2004).

Thus, the waste from strawberry processing is a potential source of bioactive compounds, and the use of these abundant and low-cost resources can create an opportunity for the production of anthocyanins, providing a positive environmental and economic impact.

In this way, the objective of this study was to optimize the extraction of anthocyanins, represented as pelargonidin 3-glucoside, from strawberry processing waste, which contains active compounds that have beneficial actions on humans, and also provide an opportunity for the use of this raw material currently discarded into the environment, causing economic and environmental problems.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Raw material

For the implementation of this work, 20 kg of residues from the strawberry pulp manufacturing process was used (*Fragaria x ananassa*). The aromas variety from the mountain region of Rio Grande do Sul (Brazil) was donated by the Mais Frutas company, located in the city of Antonio Prado/RS, during the February 2014 crop period. Samples of waste strawberries are made of fruit pieces, pulp and seeds and were transported and stored frozen at -18° c. Before each experiment, the frozen samples were ground and homogenized in a mix processor.

### 2.2. Moisture

Tests were conducted to determine the moisture level of the waste from the strawberry pulp manufacturing process according to AOAC methodology (2005). The moisture was calculated by the weight loss in an oven set at 105°C.

### 2.3. Preliminary tests for obtaining the dye

Anhydrous ethanol (minimum 99.5 %) acidified at 1 % was used for the extraction of the pigments. Preliminary tests were performed with 5 different acids: hydrochloric acid, phosphoric acid, tartaric acid, citric acid and lactic acid, to obtain the best extraction yield. Thus, the pigments were extracted from a 1 g sample for 20 minutes with 35 mL of solvent under stirring in shaker water bath (DMG) at room temperature (25°C) and were subsequently analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC). After extraction with each solvent, the pH was measured with a Quimis brand pH meter.

#### 2.4. Experimental planning for obtaining the extract dye

For the extraction method optimization a rotational full planning was performed ( $2^3$ ) with three central points and 4 axial points, totaling 17 experiments to assess the variables: volume of solvent (X 1), number of extractions (X 2) and extraction time (X 3). The actual values of the variables studied are shown in table 1.

Table 1: Actual and coded values of the variables studied for the full factorial  $2^3$  experimental planning.

Variables	Encoded/actual levels				
	-1.68	-1	0	+1	+1.68
Volume of solvent (mL/g) (X 1)	20	26	35	44	50
Number of extractions (X 2)	1	2	3	4	5
Extraction time (min) (X 3)	10	14	20	26	30

#### 2.5. Analysis of anthocyanins in the raw material

To determine the total content of pigments present in the waste used as raw material, an exhaustive extraction of anthocyanins from 2 g of the sample using acidified methanol (1 % HCl) was performed. The suspension was filtered, and the solids were washed with 1 % HCl in methanol to achieve the total removal of all color from the sample. The extract was quantified by high performance liquid chromatography (Zanatta, Cuevas, Bobbio, Winterhalter, & Mercadante, 2005).

## 2.6. Identification and Quantification of Anthocyanins

Strawberry residue anthocyanins and the various extracts obtained through the experimental planning were identified and quantified through a high-efficiency liquid chromatograph (Agilent) equipped with a degasser, a quaternary solvent pump and a visible UV detector. The pigments were separated on a C18 Shim-pak CLC-ODS (5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4.6 mm) reversed-phase column, using as a mobile phase a linear gradient elution of aqueous phosphoric acid (4 %)/methanol at 85:15 (v/v) to 20:80 for 25 minutes. The isocratic proportion was then maintained for 15 minutes. The mobile phase flow rate was 1.0 mL/ min, and the column temperature was maintained at 25 °C.

The chromatograms were processed at a fixed wavelength of 520 nm for anthocyanins. The identification of pigments was performed by comparing the retention times of the peaks of the sample and of the control (default) under the same conditions. The standard used was the Sigma-Aldrich brand: Pelargonidin 3-glucoside (Calystephin chloride)  $\geq 97\%$  (HPLC)-CAS: 1846651-8. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) for pelargonidin 3-glucoside were 0.047 and 0.157  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . The anthocyanins were quantified using the standard curves obtained for pelargonidin 3-glucoside (4-49  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

## 2.7. Statistical analysis

The statistical results were analyzed according to ANOVA and Tukey tests considering 5 % the level of significance ( $p < 0,05$ ) and using the Statistica 12 software (Statsoft, São Paulo, Brazil).

## 3. Results and Discussion

The moisture content of the residue was 88 %, and pelargonidin 3-glucoside was found to be the primary anthocyanin pigment in the strawberry residue (*Fragaria x ananassa*), aromas variety. The exhaustive extraction of the residue, performed to

define the total amount of anthocyanins present in the sample, featured a content of 718.56  $\mu\text{g}/\text{g}$  of pelargonidin 3-glucoside/ $\text{g}$  DW.

Da Silva et al. (2007) analyzed the composition of anthocyanins of 5 different strawberry cultivars: Eris, Oso Grande, Carisma, Tudnew and Camarosa. The values ranged from 200 and 600  $\mu\text{g}/\text{g}$ , with pelagornidin-3-glucoside constituting 77-90 % of the anthocyanins in the strawberry extracts, followed by pelagornidin 3-rutoside (6–11 %) and cianidin 3-glucoside (3-10 %).

Kajdžanoska, Petreska, & Stefova (2011) evaluated 8 different mixtures of solvents using acetone or pure methanol combined with acetic acid, formic acid and hydrochloric acid for the extraction of phenolic compounds from strawberry. The values for pelargonidin 3-glucoside varied from 42.7  $\mu\text{g}/\text{g}$  (methanol/formic acid 95:5) up to 84.6  $\mu\text{g}/\text{g}$  (pure methanol). The value for the extraction with acetone, as in the methodology for this project, was 69.0  $\mu\text{g}/\text{g}$ . The results showed that acetone/acetic acid 99:1 had the best results for the extraction of the 28 compounds studied in the project.

Samples of conventional and organic strawberries of varieties siba, camarosa, festival and san andreas from Portugal were compared by Fernandes, Domingues, de Freitas, Delerue-Matos, & Matthew (2012). Pelargonidin 3-glucoside was the principle anthocyanin with values for organic farming of 280 to 853.1  $\mu\text{g}/\text{g}$  FW and for conventional methods of 224.5 to 487.16  $\mu\text{g}/\text{g}$  of pelargonidin 3-glucoside, followed by pelargonidin 3-rutoside and cyaniding 3-glucoside. All samples showed significant differences between the conventional and organic farming methods.

The figures presented by the project cited above are from the whole fruit, which is different from the present study that assessed the fruit residue, finding 718.56  $\mu\text{g}/\text{g}$ .

It is possible to find significant quantities of anthocyanins in other sources of organic waste of vegetable origin. Silva et al. (2014) quantified the total anthocyanins from pulp waste, such as hulls and seeds, obtained from the processing of various fruits. The values found for pulp and waste were, respectively: pineapple 116.2 and 101.0  $\mu\text{g}/\text{g}$ , antilles cherry 1442.7 and 2459.0  $\mu\text{g}/\text{g}$ , cashew apple 76.2 and 147.4  $\mu\text{g}/\text{g}$ , guava 87.9 and 9.0  $\mu\text{g}/\text{g}$ , papaya 224.3 and 18.7  $\mu\text{g}/\text{g}$ , mango 78.4 and 22.9  $\mu\text{g}/\text{g}$ , passion fruit 34.8 and 37.0  $\mu\text{g}/\text{g}$  and Surinam cherry 2269.0 and 10212.2  $\mu\text{g}/\text{g}$ . According to

these results, the residue of Surinam cherry and antilles cherry presented higher values than the present study (718.56 µg/ g).

Due to their polarity, anthocyanins are soluble in different solvents, such as methanol, ethanol, acetone and water. The choice of solvent for extraction is the first step to determining the total or the individual content of these compounds and usually involves the use of acidified methanol or ethanol (Fuleki & Francis, 1968). The addition of acids or bases in the extraction solvent is a parameter that must be considered in an extraction, thereby changing the pH of the medium. Depending on the raw material used, acidification of the extracting solution may be needed for the rupture of the cell wall. A feature specific to anthocyanins is the influence of their structure and the pH of the medium on the expression of color. The color intensity and stability dramatically change in the pH range between 1 and 12 and in heavily acidified aqueous solutions (Cabrita, Fossen, & Andersen, 2000). The choice of a solvent will depend on the matrix where it is applied. For food, this solvent cannot be toxic and is preferably non-polluting. In this case, the use of ethanol, considered a food-grade solvent, is more appropriate.

Considering these characteristics, acids that would obtain higher yields of anthocyanins in the extracts from the strawberry waste were tested. The extractions performed with 5 different acids ranged from the 231.85 to 589.16 µg of pelargonidin 3-glucoside/ g dry basis (Table 2). The results presented a significant difference, with hydrochloric acid being the solvent with the best extraction yield with 589.16 µg/ g and a pH (solvent) of less than 1, followed by phosphoric acid with 434.21 µg/ g and a pH (solvent) of 2.34. The acid that showed the lowest extraction yield was lactic acid with 231.85 µg/ g and a pH (solvent) 3.74.

Table 2: Extraction values of pelargonidin 3-glucoside using 5 different acids

	pelargonidin 3-glucoside µg/ g (DW)	pH (solvent)
Hydrochloric Acid	589.16 <sup>a</sup>	<1
Phosphoric acid	434.21 <sup>b</sup>	2.34
Citric Acid	307.98 <sup>c</sup>	3.34
Tartaric Acid	331.99 <sup>c</sup>	2.31
Lactic Acid	231.85 <sup>d</sup>	3.74

<sup>a,b,c,d</sup> Different superscript letters in the same column indicate a significant difference ( $p < 0.05$ ).

Nicoue, Savard, & Belkacemi (2007) extracted anthocyanins from a mixture of Blueberry varieties from Canada using ethanol as a solvent and acidified with 5 different acids: citric acid, tartaric acid, lactic acid, hydrochloric and phosphoric, at temperatures of 7.7 °C, 26 °C and 79 °C for 2 hours to investigate the effects of these parameters on the efficiency of the extraction. The best results were obtained with ethanol acidified with phosphoric acid at 79 °C, where the total anthocyanin yield was 26.7 mg/ g of dry matter by quantification performed by high-performance liquid chromatography and 28.2 mg/ g of dry matter by spectrophotometry quantification. In the latter case, the results were expressed as cyaniding 3-glycoside, representing 98.4 and 100 % of the extraction.

After the completion of the preliminary trials for determining the best extraction acid, 17 tests were performed from the full  $2^3$  factorial planning that evaluated the variables of the volume of solvent (mL/ g), number of extractions and extraction time (min) to determine the best extraction conditions. Table 3 shows the treatments with coded levels and the experimental results of the pelargonidin 3-glucoside yield in strawberry residue. The yield ranged from 183.28 to 578.83  $\mu\text{g/ g}$ . The maximum yield was recorded under the experimental conditions of X 1= 26 mL, X 2= 4 extractions and X3= 26 min.



Table 3 – Results of the full 2<sup>3</sup> factorial planning.

Test	Coded levels			Anthocyanin yield (µg/ g)
	X 1	X 2	X 3	
1	-1	-1	-1	321.26
2	1	-1	-1	289.94
3	-1	1	-1	323.58
4	1	1	-1	386.81
5	-1	-1	1	420.63
6	1	-1	1	453.80
7	-1	1	1	578.83
8	1	1	1	531.48
9	0	0	0	323.01
10	0	0	0	312.57
11	0	0	0	310.34
12	-1.68	0	0	398.42
13	1.68	0	0	183.28
14	0	-1.68	0	208.47
15	0	1.68	0	339.55
16	0	0	-1.68	536.84
17	0	0	1.68	567.64

**Table 4** – Estimated effects and the variance analysis of the process for the anthocyanins extraction yield.

Variable	Yield	
	Effects ( $\pm S$ )	p-Value
X 1 (Linear)	-50.3789	0.262907
X 1 (Quadratic)	-0.6703	0.988679
X2 (Linear)	81.3914	0.089920
X2 (Quadratic)	-12.6034	0.790192
X3 (Linear)	104.7863	0.039114
X3 (Quadratic)	184.5550	0.004883
X1 by X2	3.5075	0.950070
X1 by X3	-11.5225	0.837250
X2 by X3	34.1725	0.547291

Legend: x1: volume; x2: n° extractions; x3: time

Table 4 shows the experimental design analysis. The p-values show that the number of extractions (X2) ( $p < 0.10$ ) and time (X3) ( $p < 0.05$ ) have the most statistically significant influences on the extraction yield and that in the experimental range analyzed, the solvent and the combined solvent/extraction, solvent/time, time/extraction interactions are not significant.

For the proposed model, the explanation percentage was 80.8 %, and the model was validated by ANOVA. The calculated F value was 9.27 and the table F value was 3.20.

According to the results, the proposed model is represented by the equation below:

$$Y = 312.3903 - 25.1895 X1 + 40.6957 X2 - 6.2031 X2^2 + 52.3931 X3 + 92.3762 X3^2$$

Because the variables of the number of extractions (x2) and time (x3) had significant and positive effects, an increase in the number of extractions and extraction time increases the efficiency of the extraction, i.e., the concentration of anthocyanins will increase when performing a greater number of extractions over a longer time interval. Based on this data, a maximum ascent path experiment, shown in table 5, to assess the best range of these variables (x 2 and x 3) was performed in the next stage, keeping the solvent at 20 mL because the volume had presented no significant effect.

Table 5: Maximum ascent path experiment.

Test (*)	Amount of solvent (mL)	Number of extractions	Time (min)
	(X 1)	(X2)	(X3)
1	20	3	20
2	20	4	28
3	20	5	36
4	20	6	44

(\*)Tests performed in duplicate.

According to the results from the tests in table 5, the extracts did not show a significant difference until the fifth test, extraction 3, and when performing six extractions, test 4, the yield decreased significantly. From these results and with the goal of optimizing the extraction process, a new central 2<sup>2</sup> Complete Rotational Experimental Plan was conducted in a new range for the significant variables (number of extractions and time). Table 6 shows the treatments with the coded levels and the results of the central 2<sup>2</sup> Complete Rotational Experimental Plan of the pelargonidin-3-glucoside yield in strawberry waste. The yield ranged from 497.69 to 731.03 µg/ g, with the highest values found in tests 2, 4, 9 and 10.

Table 6: Experimental designs composite central using surface methodology and results.

Test	Coded levels	Real levels	Coded levels	Real levels	Anthocyanin yield (µg/ g)
	X 2	X2	X 3	X3(min)	
<b>1</b>	-1	3	-1	17	497.70
<b>2</b>	1	5	-1	17	707.34
<b>3</b>	-1	3	1	39	632.33
<b>4</b>	1	5	1	39	731.04
<b>5</b>	0	4	0	28	587.97
<b>6</b>	0	4	0	28	587.17
<b>7</b>	0	4	0	28	570.61
<b>8</b>	-1.41	2	0	28	525.72
<b>9</b>	0	4	-1.41	12	703.45
<b>10</b>	1.41	6	0	28	698.86
<b>11</b>	0	4	1.41	44	506.82

Legend: x2: n° extractions; x3: time.

For this design, a model was not obtained because the explanation percentage was 64%. Thus, we opted solely for analysis of the effects of the plan. Tests 2, 4, 9 and 10 presented values that represented more than 95 % extraction of the compound pelargonidin 3-glucoside and, when repeated, there was no significant difference between them. Test 9 (4 extractions of 12 minutes) was chosen because under these conditions there is an economy of time and a yield exceeding 95 %. This percentage of anthocyanin extraction from waste demonstrated that this method has a potential for use in obtaining pelargonidin 3-glucoside.

As mentioned previously, authors such as Nicoue, Savard, & Belkacemi (2007) in their research with varieties obtained the best results with ethanol acidified with phosphoric acid at 79 °C. The anthocyanin yield accounted for 98.4 % by HPLC quantification and 100 % by quantification with a spectrophotometer. The yield derived by these authors may be due to the use of higher temperature during extraction, which

affected the equilibrium and mass transfer. Generally high temperatures promote greater solubility of phytochemicals in solvent and result in a higher equilibrium constant. According to Fick's second law, the temperature has an important role in the rate of extraction because the diffusion of solute through the particle to the particle surface is the rate limiting step. The diffusion coefficient and, consequently, the rate of increase of the extraction with temperature, is limited by the boiling point of the solvent, which is 79 °C for ethanol (Nicoue et al., 2007) apud (John Shi & Mazza .2002).

The use of temperature in the extraction process of bioactive compounds may or may not influence the result. Verbeyst, Oey, Van der Plancken, Hendrickx, & Van Loey, (2010) researched the effects of the variables temperature (80-130 °C) and pressure (200, 400, 550 and 700 Mpa) in the degradation of anthocyanins (pelargonidin 3-glucoside) in strawberries (*Fragaria*) for 1 minute. The concentration of anthocyanins decreased as a function of time, and degradation was accelerated at high temperatures. The anthocyanin (Pelargonidin 3-glucoside) value found in strawberry was 288.6 µg/ g, and with the temperature application, these values decreased to 245 µg/ g (95 °C), 116 µg/ g (100 °C), 163 µg/ g (110 °C), 82.2 µg/ g (120 °C) and 53.2 µg/ g (130 °C). Considering the negative influence of the temperature increase on the concentration of anthocyanins, this work chose to use ambient temperature during the extractions (25 °C).

Many factors can and should be considered when choosing a solvent and variables that can influence an extraction. Lee & Wrolstad (2004) used blueberry processing agro-industrial wastes and evaluated temperature (50 and 80 °C), the addition of citric acid (0 to 1 %), employment of SO<sub>2</sub> (0.5 and 100 ppm) and treatment with enzymes to extract anthocyanins and polyphenols (pectinase, cellulase, hemicellulase, and cellobiase activity) from industrial juice processing. The total anthocyanins obtained from the whole fruit was 230 mg/ 100 g, the peel was 188.5 mg/ 100 g, the pulp was 5.8 mg/ 100 g and from seeds was 0.1 mg/ 100 g, using acetone and water (70:30), with spectrophotometer quantification, and expressed as cyaniding 3-glucoside. The quantity of anthocyanins of the extracts treated with enzymes ranged from 20.5 to 28.1 mg of cyanidin-3-glucoside/ 100 g of whole fruit and 100.4 to 137.9 mg/ 100 g of peel, but there was no significant difference between the amount of

anthocyanins among extracts treated with enzymes (pectinase, cellulase, hemicellulase, and cellobiase activity) and the control (no enzyme).

According to the authors, the results for the entire fruit and peels presented significant difference for the variables temperature, addition of acid, SO<sub>2</sub> and temperature interactions/ SO<sub>2</sub> and SO<sub>2</sub>/ acid added. The extraction of anthocyanins from the peel and whole fruit cannot be explained separately via their principle effects because as previously mentioned, the interactions were significant. Thus, 99.9 mg/ 100 g was achieved when 50 ppm of SO<sub>2</sub> at 80 °C was used. When 50 ppm of SO<sub>2</sub> with the addition of citric acid was used, the results were of 99.4 mg/ 100 g of whole fruit. For peels, the pigment content was 499.5 mg/ 100 g with the conditions of 100 ppm of additive in the extraction with a temperature of 50 °C and 475.3 mg/ 100 g of anthocyanins at 100 ppm and with addition of acid. The results showed that the combination of temperature and application of SO<sub>2</sub> increased the extraction of anthocyanins from whole fruit and peels.

Because most industrial wastes are currently discarded or used for animal feed, the use of strawberry pulp processing residue as a source of pelargonidin 3-glucoside has great economic and nutritional potential.

Extracts rich in anthocyanin pigments can be used in the food industry to improve the appearance of various products, considering their function as natural dyes, and also to add compounds that are considered important in preventing cell degeneration and preventing cardiovascular disease, due to their action as antioxidant, anti-inflammatory and anticancer compounds (Valls et al., 2009); (Paik et al., 2012); (Han et al., 2007); (Kruger et al., 2014).

#### 4. Conclusion

Several factors can influence an extraction process, including the time, the amount of solvent and the number of extractions, which were analyzed in this study to obtain pelargonidin 3-glucoside from strawberry pulp processing residue. The increase in the number and time of extractions provided a higher yield in the production of anthocyanins, recovering more than 95 % of the compounds from the residue. The residue from strawberry pulp processing is rich in anthocyanins and can be a potential

source of pelargonidin 3-glucoside. The results are promising for food industries that seek to recover waste from the processing of strawberry, exploring these abundant and low-cost resources for the generation of new food products and aggregating the functional capabilities of processed foods.

## 5. References

- Ajila, C. M., Bhat, S. G., & Prasada Rao, U. J. S. (2007). Valuable components of raw and ripe peels from two Indian mango varieties. *Food Chemistry*, *102*(4), 1006-1011. doi: 10.1016/j.foodchem.2006.06.036
- Ayala-Zavala, J. F., Rosas-Domínguez, C., Vega-Vega, V., & González-Aguilar, G. A. (2010). Antioxidant Enrichment and Antimicrobial Protection of Fresh-Cut Fruits Using Their Own Byproducts: Looking for Integral Exploitation. *Journal of Food Science*, *75*(8), R175-R181. doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01792.x
- Ayala-Zavala, J. F., Vega-Vega, V., Rosas-Dominguez, C., Palafox-Carlos, H., Villa-Rodriguez, J. A., Siddiqui, M. W., . . . Gonzalez-Aguilar, G. A. (2011). Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. *Food Research International*, *44*(7), 1866-1874. doi: 10.1016/j.foodres.2011.02.021
- Berardini, N., Knödler, M., Schieber, A., & Carle, R. (2005). Utilization of mango peels as a source of pectin and polyphenolics. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *6*(4), 442-452. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2005.06.004>
- Cabrita, L., Fossen, T., & Andersen, O. M. (2000). Colour and stability of the six common anthocyanidin 3-glucosides in aqueous solutions. *Food Chemistry*, *68*(1), 101-107. doi: 10.1016/s0308-8146(99)00170-3
- da Silva, F. L., Escribano-Bailón, M. T., Pérez Alonso, J. J., Rivas-Gonzalo, J. C., & Santos-Buelga, C. (2007). Anthocyanin pigments in strawberry. *LWT - Food Science and Technology*, *40*(2), 374-382. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2005.09.018>
- FAO. (2011).
- Fernandes, V. C., Domingues, V. F., de Freitas, V., Delerue-Matos, C., & Mateus, N. (2012). Strawberries from integrated pest management and organic farming: Phenolic composition and antioxidant properties. *Food Chemistry*, *134*(4), 1926-1931. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.130>
- Fuleki, T., & Francis, F. J. (1968). QUANTITATIVE METHODS FOR ANTHOCYANINS .2. DETERMINATION OF TOTAL ANTHOCYANIN AND DEGRADATION INDEX FOR CRANBERRY JUICE. *Journal of Food Science*, *33*(1), 78-&. doi: 10.1111/j.1365-2621.1968.tb00888.x
- Gorinstein, S., Poovarodom, S., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Namiesnik, J., Vearasilp, S., . . . Tashma, Z. (2011). Antioxidant properties and bioactive constituents of some rare exotic Thai fruits and comparison with conventional fruits In vitro and in vivo studies. *Food Research International*, *44*(7), 2222-2232. doi: 10.1016/j.foodres.2010.10.009
- Han, K.-H., Matsumoto, A., Shimada, K.-i., Sekikawa, M., & Fukushima, M. (2007). Effects of anthocyanin-rich purple potato flakes on antioxidant status in F344

- rats fed a cholesterol-rich diet. *British Journal of Nutrition*, 98(5), 914-921. doi: 10.1017/s0007114507761792
- John Shi, G., & Mazza, M. L. M. Functional Foods
- Kajdžanoska, M., Petreska, J., & Stefova, M. (2011). Comparison of Different Extraction Solvent Mixtures for Characterization of Phenolic Compounds in Strawberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(10), 5272-5278. doi: 10.1021/jf2007826
- Kruger, M. J., Davies, N., Myburgh, K. H., & Lecour, S. (2014). Proanthocyanidins, anthocyanins and cardiovascular diseases. *Food Research International*, 59(0), 41-52. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.046>
- Lee, J., & Wrolstad, R. E. (2004). Extraction of anthocyanins and polyphenolics from blueberry-processing waste. *Journal of Food Science*, 69(7), C564-C573.
- Martins, M. A., Mattoso, L. H. C., & Pessoa, J. D. C. (2009, 2009/12//). Thermogravimetric evaluation of acai fruit (*Euterpe oleracea* Mart.) agro industry waste/Comportamento termico e caracterizacao morfologica das fibras de mesocarpo e caroco do acai (*Euterpe oleracea* Mart.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 31, 1150+.
- Mirabella, N., Castellani, V., & Sala, S. (2014). Current options for the valorization of food manufacturing waste: a review. *Journal of Cleaner Production*, 65(0), 28-41. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2013.10.051>
- Nicoue, E. E., Savard, S., & Belkacemi, K. (2007). Anthocyanins in wild blueberries of Quebec: Extraction and identification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(14), 5626-5635. doi: 10.1021/jf0703304
- Paik, S.-S., Jeong, E., Jung, S. W., Ha, T. J., Kang, S., Sim, S., . . . Kim, I.-B. (2012). Anthocyanins from the seed coat of black soybean reduce retinal degeneration induced by N-methyl-N-nitrosourea. *Experimental Eye Research*, 97(1), 55-62. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exer.2012.02.010>
- Papargyropoulou, E., Lozano, R., K. Steinberger, J., Wright, N., & Ujang, Z. b. (2014). The food waste hierarchy as a framework for the management of food surplus and food waste. *Journal of Cleaner Production*, 76(0), 106-115. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2014.04.020>
- Peschel, W., Sanchez-Rabaneda, F., Diekmann, W., Plescher, A., Gartzia, I., Jimenez, D., . . . Codina, C. (2006). An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. *Food Chemistry*, 97(1), 137-150. doi: 10.1016/j.foodchem.2005.03.033
- Silva, L. M. R. d., Figueiredo, E. A. T. d., Ricardo, N. M. P. S., Vieira, I. G. P., Figueiredo, R. W. d., Brasil, I. M., & Gomes, C. L. (2014). Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, 143(0), 398-404. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.001>
- Valls, J., Millán, S., Martí, M. P., Borràs, E., & Arola, L. (2009). Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols. *Journal of Chromatography A*, 1216(43), 7143-7172. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2009.07.030>
- Verbeyst, L., Oey, I., Van der Plancken, I., Hendrickx, M., & Van Loey, A. (2010). Kinetic study on the thermal and pressure degradation of anthocyanins in



- strawberries. *Food Chemistry*, 123(2), 269-274. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.04.027
- Viuda-Martos, M., Fernandez-Lopez, J., Sayas-Barbera, E., Sendra, E., & Perez-Alvarez, J. A. (2011). PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF THE ORANGE JUICE WASTE WATER OF A CITRUS BY-PRODUCT. *Journal of Food Processing and Preservation*, 35(2), 264-271. doi: 10.1111/j.1745-4549.2009.00450.x
- Wang, S. Y., & Lin, H. S. (2000). Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(2), 140-146. doi: 10.1021/jf9908345
- Zanatta, C. F., Cuevas, E., Bobbio, F. O., Winterhalter, P., & Mercadante, A. Z. (2005). Determination of anthocyanins from camu-camu (*Myrciaria dubia*) by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(24), 9531-9535. doi: 10.1021/jf051357v

**OBTENTION OF NATURAL DYES FROM INDUSTRIAL BLACKBERRY  
PULP RESIDUES (*Rubus sp*)**

**Artigo formatado de acordo com as normas da revista “Food Chemistry”**

## ABSTRACT

The fruit processing industry generates large amounts of waste residues carrying environmental and financial costs. These residues, like a waste of blackberry pulp processing are composed mostly of peels and seeds rich in pigments and antioxidants, representing a potential source of natural dyes. We used complete experimental planning and response surface methodology (RSM) to evaluate how the quantity of solvent (20 to 50 mL), number of extractions (1 to 5) and time (10 to 30 minutes) affect the anthocyanin yield from blackberry residues (*Rubus sp*). The optimal conditions were: 20 mL of acidified ethanol (0.1 % HCl), 3 extractions and 10 minutes. Under these conditions, 25.9 mg of cyanidin-3-glucoside were obtained from 100 g of blackberry residue (DW), a 59% yield.

*Keywords:* anthocyanins, blackberry, pigment, extraction.

### 1. Introduction

According to the Food and Agriculture Organization (Fao, 2009), Brazil is the third largest producer of fresh and processed fruit in the world, followed by China and India. Today Brazil is among the major world producers, at 43 million tons of tropical, subtropical and temperate fruit per year (Ibraf, 2014).

Numerous studies have found that tropical fruits are rich in bioactive compounds (De Souza et al., 2014); (Moo-Huchin et al., 2014); (Scalzo, Stevenson e Hedderley, 2013).

The economic efficiency of tropical fruit processing can be improved through the utilization of residues. Residues such as bark, seeds and unused fruit pieces are generated in various stages of industrial processing. These residues are commonly discarded (Ajila, Bhat e Prasada Rao, 2007). Studies show that tropical fruit residues contain high levels of bioactive substances. Phytochemicals can be isolated for use in nutraceutical supplements, food additives, pharmaceuticals and food products, contributing to the recovery of residues, thereby bringing economic benefits and

reducing the environmental impact (Ayala-Zavala et al., 2011); (Peschel et al., 2006); (Gorinstein et al., 2011); (Lee e Wrolstad, 2004a).

Species of the genus *Rubus* are natural sources of anthocyanins with high antioxidant capacities and strong pigmentation (Deighton et al., 2000). The blackberry (*Rubus sp*) is high in anthocyanins and antioxidant activity. Compared to other small fruits, such as raspberries, strawberries and cherries, blackberries exhibit higher antioxidant activity and higher levels of phenols, flavonoids, anthocyanins and carotenoids (De Souza et al., 2014); (Connor et al., 2002); (Wang e Lin, 2000).

The food industry produces dyes, both artificial and natural. Artificial dyes are among the most controversial aspects of the food industry because studies have suggested that they lead to allergy problems and other health hazards. Producing these dyes for food requires rigorous assessments of toxicity (Amin, Hameid e Abd Elsttar, 2010); (Abd El-Wahab e Moram, 2013); (Rao et al., 2004). The number of synthetic additives permitted in developed countries is decreasing every year, even with lower production costs and increased stability; these dyes are therefore being replaced by natural dyes. In Norway and Sweden, the use of artificial dyes has been prohibited, and countries including Canada and the United States have restricted several dyes (Canadian Food Inspection Agency, 2014); (Public Citizen Health Research Group, 1985); (Norwegian Food Safety Authority, 2014); (Swedish National Food Agency, 2014).

Dyes obtained from natural sources have important biological activities and beneficial effects on health connected with antioxidant activity, protection against oxidative damage to cellular components, anti-inflammatory effects and prevention of chronic non-communicable diseases (Cacace e Mazza, 2002); (Valls et al., 2009); (Paik et al., 2012).

One group of plant pigments used as natural dyes are anthocyanins, which are responsible for most of the red, blue and purple colors of fruits, vegetables, flowers and other plant tissues and products. Anthocyanins, as natural dyes, lend a bright red color to acidic products, such as soft drinks, pickles, jams and sweets. In addition to their role as colorants, these dyes can prevent cellular degeneration and cardiovascular disease and can exert antioxidant, anti-inflammatory and anticancer effects (Valls et al., 2009); (Paik, et al., 2012); (Han et al., 2007).

However, natural dyes have disadvantages relative to artificial ones: they are sensitive to light, heat, oxygen and bacterial action. Consequently, they are not stable. Despite these facts, the substitution of artificial for natural dyes in the industry has been gradual. These additives have been used for years without evidence of damage to health (Castaneda-Ovando et al., 2009); (Shahid, Shahid Ul e Mohammad, 2013); (Munawar e Jamil, 2014).

Residues from fruit processing are thus potential sources of bioactive compounds. Exploitation of these cheap, abundant resources may generate opportunities for the development of food products with positive economic and environmental impacts. The objective of this work was to optimize the extraction of natural dyes from mulberry residues. These active compounds, such as anthocyanins, may have beneficial actions on humans, are non-toxic, and can be obtained with few negative environmental impacts from blackberry pulp residues.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Raw Material

For this study, we used pulp residues from the production of the blackberry varieties Tupi and Guarani. These were harvested in February 2014 in Rio Grande do Sul by the company Mais Fruta (Antônio Prado/RS). Samples of waste strawberries are made of fruit pulp and seeds and were transported and stored frozen at -18° c. Before each experiment, the frozen samples were ground and homogenized in a mix processor.

### 2.2. Moisture

The assay for moisture in blackberry pulp residues was conducted according to AOAC methods (2005) by weight loss at 105 °C.

### 2.3. Extraction of dyes

For extraction, rotational full planning ( $2^3$ ) was undertaken, with 3 central points and 4 axial points totaling 17 experiments. We evaluated the variables solvent volume

(X1), number of extractions (X2) and extraction time (X3). Extraction of pigments was performed in absolute ethanol (> 99.5 %) acidified with 0.1 % hydrochloric acid. Thus, the pigments were extracted from a 1 g sample, under stirring in shaker water bath (DMG) at room temperature (25°C) and were subsequently analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC).

The values of all variables are shown in Table 1.

Table 1: Real and coded values of variables for the full 2<sup>3</sup> factorial design.

Variables	Coded /real levels				
	-1,64	-1	0	+1	+1,64
Solvent volume (mL/g) (X1)	20	26	35	44	50
Number of extraction (X2)	1	2	3	4	5
Extraction time (min) (X3)	10	14	20	26	30

#### 2.4. Identification and quantification of anthocyanins

Extraction of anthocyanins was performed using 2 g of sample in acidified methanol (1% HCl). The suspension was filtered and the solids washed with 1 % HCl in methanol until colorless. Anthocyanins were quantified by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Zanatta et al., 2005).

#### 2.5. Chromatographic conditions

Analyses were performed using a high performance liquid chromatography (HPLC) system (Agilent series 1100, Santa Clara, CA, USA) with an online degasser, quaternary pump and automatic injector coupled to a C18 Shim-pak CLC-ODS (5 µm, 250 x 4.6 mm) adjusted to 25 °C. Data acquisition and processing were performed using CHEMSTATION® software. Pigments were separated using linear gradient elution with aqueous phosphoric acid (4 %)/methanol, 85:15 to 20:80 (v/v) over 25 minutes,

followed by isocratic elution for 15 minutes. The flow rate was 1.0 mL/ min ( Zanatta et al., 2005).

A detection wavelength of 520 nm was used for anthocyanins. Pigments were identified by comparing retention times with standards under the same conditions. Standards were from Sigma-Aldrich: cyanidin chloride ( $\geq 95\%$ , HPLC grade, CAS 528-58-5) and cyanidin 3-glucoside (500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in methanol with 2 % HCl, SIGMA - C-069).

The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) for cyanidin-3-glucoside were 0.169 and 0.565  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectively. Anthocyanins were quantified using the standard curves for cyaniding 3-glucoside (3–37  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

## 2.6. Statistical Analysis

The results were evaluated by analysis of variance (ANOVA). The means were analyzed by Tukey's test considering 5 % the level of significance ( $p < 0,05$ ) using STATISTICA® 12.0 software (Statsoft, São Paulo, Brazil).

## 3. Results and Discussion

The first step for optimal extraction was to choose the extraction solvent. Preliminary experiments were conducted using absolute ethanol (99.5 %), ethyl acetate, absolute ethanol (99.5 %) acidified with 1 % hydrochloric acid or ethyl acetate acidified with 1 % hydrochloric acid. These experiments were conducted with a fixed volume (35 mL) and stirring for 20 minutes. The solvent with the highest color and spectrophotometric reading was ethanol acidified with hydrochloric acid (1 %). Using ethyl acetate, acidified ethyl acetate or ethanol alone, the extracts showed no color or spectrophotometric reading. Blends of different solvents probably lead to different rates of solute transport from the matrix and consequently lead to different extraction yields (Seabra et al., 2010). Thus, the yield of the extraction process depends strongly on the solvent used due to the polarity of the compounds to be extracted. Selection of the optimal solvent is therefore of extreme importance (Fellows, 2006).

Anthocyanins are soluble in many solvents such as methanol, ethanol, acetone and water - due to their polarity. The choice of extraction solvent is the first step to determine the total or individual content of these compounds: often methanol or acidified ethanol (Fuleki e Francis, 1968).

Silva et al. (2014) analyzed bioactive compounds from pulp and residues of pineapple, acerola, cashew, guava, soursop, papaya, mango, passion fruit, pitanga, sapoti and tamarind. The extraction solvent for anthocyanins was 1.5 N HCl in 85 % ethanol. Acerola and pitanga pulp residues contained more anthocyanins, with values of 245 and 1021.22 mg/ 100 g (DW), respectively, demonstrating that byproducts of agroindustry can be good sources of bioactive compounds.

Another parameter that must be considered is the extraction solvent pH. Depending on the raw material, acidification may be needed to break cell walls. One characteristic of anthocyanins influenced by structure and pH is color. The color intensity and stability of anthocyanins change between pH values of 1 and 12. Strongly acidified aqueous solutions exhibit an intense red color and high stability, while above a pH of 7, a bluish color develops and stability declines (Cabrita, Fossen e Andersen, 2000).

Cyanidin 3-glucoside is the major anthocyanin in blackberry residues (*Rubus sp*, Tupi and Guarani varieties) at 43.72 mg/100 g DW. The results of our study are consistent with those reported previously for this fruit.

Bowen-Forbes, Zhang, & Nair (2010) analyzed the anthocyanin content of three species of wild mulberry from Jamaica: *Rubus jamaicensis*, *rosifolius* and *racemosus*. Cyanidin 3-glucosirutinoside, cyaniding 3-glucoside, cyaniding 3-rutinoside, pelargonidinina 3-glucoside, pelargonidin 3-rutinoside and cyaniding 3-glucosilmalonate were identified in fruits. Cyanidin 3-glucoside comprised the majority of total anthocyanin content, ranging from 17 mg/ 100 g (DW) in *Rubus rosifolius* to 1437.00 mg/ g FW 100 for *Rubus racemosus*.

Stefanut et al. (2013) studied blueberry, blackberry and mulberry as antihyperglycemic agents in diabetic rats. Extracts were prepared using ultrasound at 40 kHz for 0 to 60 minutes then separated by HPLC. In the blackberry, cyaniding 3-sambubioside, cyaniding 3-xiloside, cyaniding 3-malonylglucoside, cyaniding 3-



dioxalylglucoside and cyaniding 3-glucoside were identified. Cyanidin 3-glucoside accounted for 91 % of the total ( $1343 \pm 2.2$  mg/ L after 60 minutes of extraction).

De Souza et al., (2014) evaluated the composition of blackberry, raspberry, strawberry, cherry and blueberry, identifying bioactive compounds and measuring the antioxidant activity. They found that the chemical properties of these fruits were similar in the subtropical and temperate areas of Brazil. Using a spectrophotometer, the cyanidin 3-glucoside content was  $58.61 \pm 2.19$  mg/ 100 g (fw) for blackberry,  $29.72 \pm 4.20$  for blueberry,  $16.03 \pm 0.50$  for strawberry and  $14.69 \pm 2.03$  for red raspberry.

Anthocyanins were extracted from several Canadian varieties of blueberry at 7.7, 26 or 79 °C for 2 hours using ethanol alone or acidified with citric, tartaric, lactic, hydrochloric and phosphoric acids. The best results were obtained in ethanol acidified with phosphoric acid at 79 °C: the total yield of anthocyanins was 26.7 mg/ g dry weight by HPLC and 28.2 mg/ g by spectrophotometry (expressed as cyaniding 3-glucoside equivalent), representing 98.4 % and 100 % recovery, respectively (Nicoue, Savard e Belkacemi, 2007).

Temperature may or may not influence extraction efficiency. Verbeyst et al. (2010) investigated the effects of pressure and temperature on degradation of anthocyanins (pelargonidin 3-glucoside) in strawberries (*Fragaria*). In these experiments the pressure was 200, 400, 550 or 700 MPa at 80, 95 or 110 °C for 1 minute. The concentration of anthocyanins decreased as a function of time, and degradation accelerated at higher temperatures. The concentration of pelargonidin 3-glucoside found in strawberry was 288.6 µg/ g at 80 °C, decreasing to 245 µg/ g (95 °C), 116 µg/ g (100 °C), 163 µg/ g (110 °C), 82.2 µg/ g (120 °C) and 53.2 µg/ g (130 °C).

Buckow, Kastell, Terefe, & Versteeg (2010) studied the degradation kinetics of anthocyanins in blueberry juice (*Vaccinium myrtillus*) during thermal processing at selected temperatures (60-121 °C) or high pressure-temperature processing (100-700 MPa, 40-121 °C). Anthocyanin stability was also studied after several of these treatments storage at 4, 25, and 40 °C. Pressure and temperature increased degradation of anthocyanins in blueberry juice: 32% degradation was observed after 20 min at 100 °C and atmospheric pressure; at 100 °C and 600 MPa, approximately 50 % of total anthocyanins were lost.

In the study of Nicoue, Savard, & Belkacemi (2007) mentioned previously, the authors obtained 98.4 and 100 % extraction. The yield obtained in this study may be due to the temperature during extraction, which probably affected balance and mass transfer. High temperatures promote greater solubility of phytochemicals and thus a higher equilibrium constant. According to Fick's Second Law, temperature strongly affects the rate of extraction because the diffusion of a solute to the particle surface is rate limiting. The diffusion coefficient, and consequently the increase in extraction rate with temperature, is limited by the boiling point of the solvent: 79 °C in the case of ethanol (Nicoue, Savard e Belkacemi, 2007) apud (Shi, Maguer e Mazza, 2002).

Considering the adverse effect of increased temperature on anthocyanin recovery, we chose to perform extractions at room temperature (25 °C).

Table 2 shows treatments with coded levels and the resulting anthocyanin yields from blackberry. Yields of cyaniding 3-glycoside ranged from 11.70 to 29.60 mg/ 100 g. Maximum yield occurred at 26 mL, 4 extractions and 14 min.

Table 2: Experimental designs (composite, using surface methodology) and results.

Treatment no.	Variables			Anthocyanin yield (mg/100 g DW)
	X1	X2	X3	
<b>1</b>	-1	-1	-1	18.66
<b>2</b>	1	-1	-1	19.63
<b>3</b>	-1	1	-1	29.59
<b>4</b>	1	1	-1	27.93
<b>5</b>	-1	-1	1	21.81
<b>6</b>	1	-1	1	22.56
<b>7</b>	-1	1	1	28.50
<b>8</b>	1	1	1	29.39
<b>9</b>	0	0	0	23.89
<b>10</b>	0	0	0	25.60
<b>11</b>	0	0	0	25.82
<b>12</b>	-1.68	0	0	21.89
<b>13</b>	1.68	0	0	25.98
<b>14</b>	0	-1.68	0	11.70
<b>15</b>	0	1.68	0	29.57
<b>16</b>	0	0	-1.68	22.60
<b>17</b>	0	0	1.68	24.19

Table 3 shows an analysis of the experimental design. It can be observed from the p-value that the number of extractions (X2) has the most statistically significant influence on the yield ( $p < 0.05$ ). In the ranges analyzed, solvent, time and combined solvent/extraction, solvent/time and time/extraction interactions are not significant.

Table 3: Estimated effects and analysis of variance for anthocyanin yields.

Variable	Yield
	Effects ( $\pm S$ )
<b>X1</b>	1.14600
<b>X2</b>	9.20185
<b>X3</b>	1.33773
<b>X1/X2</b>	-0.62333
<b>X1/X3</b>	0.58140
<b>X2/X3</b>	-1.42927

Legend: x1: volume; x2: n° extractions, x3: tempo.

Our model explained 91.75 % of the variation. The model was validated by ANOVA; F was 8.66 and F (tabulated) was 3.67.

Figure 1 shows the response surface between number of extractions and amount of solvent. Note that more anthocyanins were obtained after more extractions. Increasing the amount of solvent did not increase the recovery of anthocyanins. The same result was observed for time and the number of extractions (Figure 2). The anthocyanin content increased after a larger number of extractions, demonstrating that the effect was significant and positive. Increasing extraction time did not affect anthocyanin recovery: this variable had no significant effect. Thus, the volume and extraction time were set at 20 mL and 10 minutes, respectively.

Figure 1: Response surface of the anthocyanin content of blackberry residue as a function of the extraction number and amount of solvent.

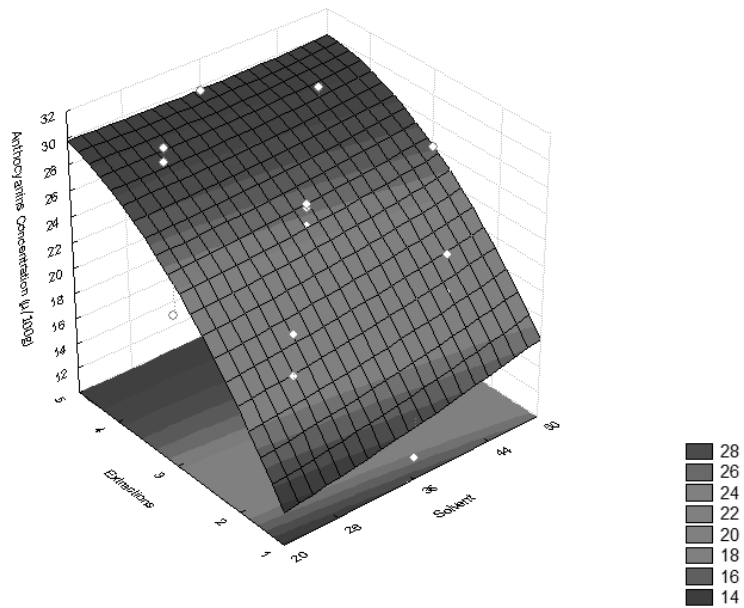
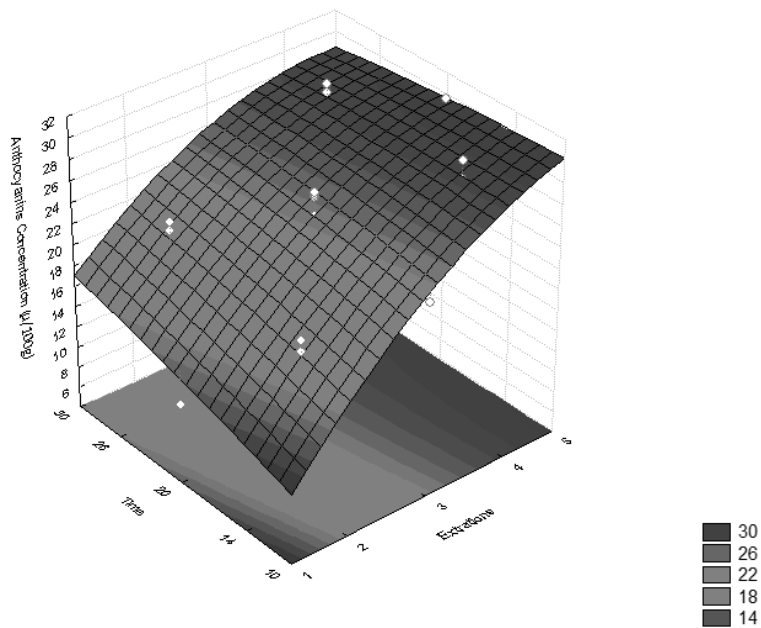


Figure 2: Response surface of the anthocyanin content of blackberry residue as a function of time (min) and the extraction number.



After fixing time and the solvent volume, a path of maximum ascendancy was designed to evaluate the response to 3-6 extractions in terms of pigment recovery. After

6 trials, 26.7 to 32.9 mg/100 g DW of cyanidin-3-glucoside was found in blackberry residue. These results did not show statistically significant differences, so we opted for the smaller number of extractions. To validate the model and the maximum result obtained, we conducted a new test with 3 replications using 20 mL of acidified ethanol for 10 min. This gave  $25.95 \pm 0.89$  mg/ 100 g DW of cyaniding 3-glucoside in blackberry residue, which represents 59 % extraction of anthocyanins in the blackberry residue. This result is consistent with the maximum extraction experimental design (assay 15, 29.57 mg/ 100 g after  $5 \times 20$  min extractions with 35 mL solvent).

Considering the industrial residues that are currently wasted, 59% recovery of anthocyanins from this residue may be a good source of these compounds.

Zou et al. (2012) optimized methanol extraction of anthocyanins from mulberry (*M. atropurpurea* Roxb.) under controlled conditions in a microwave using response surface methodology (RSM). The methanol concentration (30 % to 70 %), microwave power (320-480 W) and extraction time (80 and 160 s) were the independent variables. The optimal conditions were 59.6 % acidified methanol, 425 W and 132 seconds. Cyanidin 3-glucoside and cyaniding 3-rutinoside predominated, with total anthocyanins of 54.72 mg/ g from powdered cranberry.

Lee & Wrolstad (2004) extracted anthocyanins and polyphenols from blueberry residues (skin, pulp and seeds). They evaluated temperature (50 and 80 °C), citric acid (0 to 1 %), SO<sub>2</sub> (0, 50, and 100 ppm free SO<sub>2</sub>) and enzymes in the processing of industrial juice. Anthocyanins were extracted using acetone: water (70:30), quantified using a spectrophotometer and expressed as cyaniding 3-glucoside equivalent. Total anthocyanins were: whole fruit 230 mg/ 100 g, peel 188.5 mg/ 100 g, pulp 5.8 mg/ 100 g and seeds 0.1 mg/ 100 g. Anthocyanins (as cyaniding 3-glucoside equivalent) after enzyme treatment ranged from 20.5 to 28.1 mg/ 100 g whole fruit and 100.4 to 137.9 mg/ 100 g peel, but there was no significant difference in anthocyanins after treatment with enzymes (pectinase, cellulose, and hemicellulase activity). Both whole fruit and peels showed significantly different yields depending upon temperature, acid addition, and SO<sub>2</sub> as well as upon interactions between temperature/SO<sub>2</sub> and SO<sub>2</sub>/acid addition. Recovery of anthocyanins from peels and whole fruit could not be explained by main effects alone. Interactions were significant: for whole fruit, 50 ppm of SO<sub>2</sub> at 80 °C gave 99.9 mg/ 100 g (the best result), while 50 ppm and acid gave 99.4 mg/ 100 g. For

peels, 100 ppm at 50 °C gave 499.5 mg/ 100 g, while 100 ppm with acid gave 475.3 mg/ 100 g. The combination of temperature and SO<sub>2</sub> gave increased extraction of anthocyanins from whole fruit and peel.

Considering that most industrial residues are discarded or used as animal feed, they have great potential as a source of natural dyes, such as anthocyanins. These can be used in the food industry to improve appearance and to enhance nutritional value (antioxidants).

#### 4. Conclusion

Many factors influence the extraction process, including time, amount of solvent, and number of extractions. These were optimized in this study to obtain anthocyanins from processed blackberry pulp residues. Increasing the number of extractions gave a higher yield of anthocyanins. The residue of mulberry pulp is rich in anthocyanins and is a potential source of natural dyes. These results may be useful for industries wishing to make use of blackberry processing residues. These abundant resources and the cheap production of new food products may have positive economic and environmental impacts.

#### 5. References

- Abd El-Wahab, H. M. F., & Moram, G. S. E.-D. (2013). Toxic effects of some synthetic food colorants and/or flavor additives on male rats. *Toxicology and Industrial Health*, 29(2), 224-232.
- Ajila, C. M., Bhat, S. G., & Prasada Rao, U. J. S. (2007). Valuable components of raw and ripe peels from two Indian mango varieties. *Food Chemistry*, 102(4), 1006-1011.
- Amin, K. A., Hameid, H. A., II, & Abd Elstar, A. H. (2010). Effect of food azo dyes tartrazine and carmoisine on biochemical parameters related to renal, hepatic function and oxidative stress biomarkers in young male rats. *Food and Chemical Toxicology*, 48(10), 2994-2999.
- Ayala-Zavala, J. F., Vega-Vega, V., Rosas-Dominguez, C., Palafox-Carlos, H., Villa-Rodriguez, J. A., Siddiqui, M. W., Davila-Avina, J. E., & Gonzalez-Aguilar, G. A. (2011). Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. *Food Research International*, 44(7), 1866-1874.
- Bowen-Forbes, C. S., Zhang, Y., & Nair, M. G. (2010). Anthocyanin content, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer properties of blackberry and raspberry fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(6), 554-560.

- Buckow, R., Kastell, A., Terefe, N. S., & Versteeg, C. (2010). Pressure and Temperature Effects on Degradation Kinetics and Storage Stability of Total Anthocyanins in Blueberry Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(18), 10076-10084.
- Cabrita, L., Fossen, T., & Andersen, O. M. (2000). Colour and stability of the six common anthocyanidin 3-glucosides in aqueous solutions. *Food Chemistry*, 68(1), 101-107.
- Cacace, J. E., & Mazza, G. (2002). Extraction of anthocyanins and other phenolics from black currants with sulfured water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 5939-5946.
- Canadian Food Inspection Agency. (2014)).
- Castaneda-Ovando, A., de Lourdes Pacheco-Hernandez, M., Elena Paez-Hernandez, M., Rodriguez, J. A., & Andres Galan-Vidal, C. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113(4), 859-871.
- Connor, A. M., Luby, J. J., Hancock, J. F., Berkheimer, S., & Hanson, E. J. (2002). Changes in fruit antioxidant activity among blueberry cultivars during cold-temperature storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(4), 893-898.
- de Souza, V. R., Pereira, P. A. P., da Silva, T. L. T., de Oliveira Lima, L. C., Pio, R., & Queiroz, F. (2014). Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. *Food Chemistry*, 156(0), 362-368.
- Deighton, N., Brennan, R., Finn, C., & Davies, H. V. (2000). Antioxidant properties of domesticated and wild *Rubus* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(9), 1307-1313.
- FAO, (2009).
- Fellows, P. (2006). Tecnologia do processamento de alimentos: princípios e prática. In Artmed (Ed.), 2<sup>a</sup> ed., (pp. 602).
- Fuleki, T., & Francis, F. J. (1968). Quantitative methods for anthocyanins .2. determination of total anthocyanin and degradation index for cranberry juice. *Journal of Food Science*, 33(1), 78-&.
- Gorinstein, S., Poovarodom, S., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Namiesnik, J., Vearasilp, S., Haruenkit, R., Ruamsuke, P., Katrich, E., & Tashma, Z. (2011). Antioxidant properties and bioactive constituents of some rare exotic Thai fruits and comparison with conventional fruits In vitro and in vivo studies. *Food Research International*, 44(7), 2222-2232.
- Han, K.-H., Matsumoto, A., Shimada, K.-i., Sekikawa, M., & Fukushima, M. (2007). Effects of anthocyanin-rich purple potato flakes on antioxidant status in F344 rats fed a cholesterol-rich diet. *British Journal of Nutrition*, 98(5), 914-921.
- IBRAF, I. B. d. F. (2014)).
- Lee, J., & Wrolstad, R. E. (2004). Extraction of Anthocyanins and Polyphenolics from Blueberry Processing Waste. *Journal of Food Science*, 69(7), 564-573.
- Moo-Huchin, V. M., Estrada-Mota, I., Estrada-Leon, R., Cuevas-Glory, L., Ortiz-Vazquez, E., de Lourdes Vargas y Vargas, M., Betancur-Ancona, D., & Sauri-Duch, E. (2014). Determination of some physicochemical characteristics, bioactive compounds and antioxidant activity of tropical fruits from Yucatan, Mexico. *Food Chemistry*, 152, 508-515.



- Munawar, N., & Jamil, H. M. T. b. H. (2014). The Islamic Perspective Approach on Plant Pigments as Natural Food Colourants. *Procedia - Social and Behavioral Sciences*, 121(0), 193-203.
- Nicoue, E. E., Savard, S., & Belkacemi, K. (2007). Anthocyanins in wild blueberries of Quebec: Extraction and identification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(14), 5626-5635.
- Norwegian Food Safety Authority. (2014)).
- Paik, S.-S., Jeong, E., Jung, S. W., Ha, T. J., Kang, S., Sim, S., Jeon, J. H., Chun, M.-H., & Kim, I.-B. (2012). Anthocyanins from the seed coat of black soybean reduce retinal degeneration induced by N-methyl-N-nitrosourea. *Experimental Eye Research*, 97(1), 55-62.
- Peschel, W., Sanchez-Rabaneda, F., Diekmann, W., Plescher, A., Gartzia, I., Jimenez, D., Lamuela-Raventos, R., Buxaderas, S., & Codina, C. (2006). An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. *Food Chemistry*, 97(1), 137-150.
- Public Citizen Health Research Group. (1985). Dyes in Your Food. In).
- Rao, P., Bhat, R. V., Sudershan, R. V., Krishna, T. P., & Naidu, N. (2004). Exposure assessment to synthetic food colours of a selected population in Hyderabad, India. *Food Additives and Contaminants*, 21(5), 415-421.
- Scalzo, J., Stevenson, D., & Hedderley, D. (2013). Blueberry estimated harvest from seven new cultivars: Fruit and anthocyanins. *Food Chemistry*, 139(1-4), 44-50.
- Seabra, I. J., Braga, M. E. M., Batista, M. T., & de Sousa, H. C. (2010). Effect of solvent (CO<sub>2</sub>/ethanol/H<sub>2</sub>O) on the fractionated enhanced solvent extraction of anthocyanins from elderberry pomace. *Journal of Supercritical Fluids*, 54(2), 145-152.
- Shahid, M., Shahid ul, I., & Mohammad, F. (2013). Recent advancements in natural dye applications: a review. *Journal of Cleaner Production*, 53, 310-331.
- Shi, J., Maguer, M., & Mazza, G. (2002). Functional foods : biochemical & processing aspects : Volume 2. In, vol. volume 2). Lancaster.
- Silva, L. M. R. d., Figueiredo, E. A. T. d., Ricardo, N. M. P. S., Vieira, I. G. P., Figueiredo, R. W. d., Brasil, I. M., & Gomes, C. L. (2014). Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, 143(0), 398-404.
- Stefanut, M. N., Cata, A., Pop, R., Tanasie, C., Boc, D., Ienascu, I., & Ordodi, V. (2013). Anti-hyperglycemic Effect of Bilberry, Blackberry and Mulberry Ultrasonic Extracts on Diabetic Rats. *Plant Foods for Human Nutrition*, 68(4), 378-384.
- Swedish National Food Agency. (2014)).
- Valls, J., Millán, S., Martí, M. P., Borràs, E., & Arola, L. (2009). Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols. *Journal of Chromatography A*, 1216(43), 7143-7172.
- Verbeyst, L., Oey, I., Van der Plancken, I., Hendrickx, M., & Van Loey, A. (2010). Kinetic study on the thermal and pressure degradation of anthocyanins in strawberries. *Food Chemistry*, 123(2), 269-274.
- Wang, S. Y., & Lin, H. S. (2000). Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(2), 140-146.

- Zanatta, C. F., Cuevas, E., Bobbio, F. O., Winterhalter, P., & Mercadante, A. Z. (2005). Determination of anthocyanins from camu-camu (*Myrciaria dubia*) by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(24), 9531-9535.
- Zou, T., Wang, D., Guo, H., Zhu, Y., Luo, X., Liu, F., & Ling, W. (2012). Optimization of Microwave-Assisted Extraction of Anthocyanins from Mulberry and Identification of Anthocyanins in Extract Using HPLC-ESI-MS. *Journal of Food Science*, 77(1), C46-C50.

**The waste processing peach (*Prunus persica*) used for the carotenoids extraction**

**Artigo formatado de acordo com as normas do Jornal “Journal of Agriculture and  
Food Chemistry”**

## ABSTRACT

The generation of food waste in global supply chains has become a new challenge to reconcile competitiveness and environmental management for industries. The use of waste from this sector not only improves environmental impacts but also represents an opportunity to obtain valuable materials that may contain high levels of functional substances and can be used in various applications and the development of new food products. As the peach process (*Prunus persica*) to fruit pulp production generates solid and liquid waste rich in phytochemicals, such as carotenoids, and phenolic compounds and high functional value substances, the objective of this work was to study the use of this waste for carotenoid extraction based on a complete experimental design and using response surface methodology (RSM). The following variables were studied: amount of solvent (20-50 mL), number of extractions (1-5) and extraction time (10-30 minutes), which can affect the performance of carotenoid extract from this waste. The optimized conditions were four extractions of 10 minutes using 38.5 mL of ethanol, which presented a score of 168.59  $\mu\text{g/ g DW}$  of total carotenoids where 67.55  $\mu\text{g/ g}$  corresponds to  $\beta$ -carotene, 86.75  $\mu\text{g/ g}$  corresponds to cryptoxanthin, 12.08  $\mu\text{g/ g}$  corresponds to zeaxanthin and 2.2  $\mu\text{g/ g}$  corresponds to lutein, which represents a percentage of 66 % extraction pigments relative to the total content of carotenoids present in the peach waste.

*Keywords:* experimental design, dye,  $\beta$ -carotene, cryptoxanthin

### 1. Introduction

The generation of food waste is observed in settings ranging from agriculture to industrial manufacturing. This amount generated in the global food supply chains is attracting increasing attention due to the environmental, social and economic impacts, and the industrial ecology concepts are becoming essential, so that an approach of sustainable production and consumption can be adopted to combat the surplus and waste throughout the production chain.<sup>2</sup> In developed countries, 42 % of food waste is

produced by households, 39 % occurs in the food manufacturing industry, 14 % occurs in the food service industry, and 5 % occurs in retail and distribution.<sup>1</sup>

Every year, tons of food waste are generated worldwide. In the United States in 2009, 34 million of these materials were accumulated, and less than 3 % were recovered and recycled.<sup>3</sup> This matter often contains large amounts of suspended solids and presents high biological and chemical oxygen demand (BOD and COD), which influences the possible recovery solutions and treatment costs.<sup>1</sup> However, there is a growing interest in the development and recovery of waste with the purpose of reducing greenhouse gases, in addition to providing energy and resources for other purposes.<sup>3</sup>

The amount of waste that is wasted in nature may represent the loss of valuable materials because it has great potential to be reused in other production systems. Waste processing fruits are skin, seeds and fruit pieces, in addition to organic material which has a high potential for use containing high levels of functional substances that can be used to isolate phytochemicals for applications in nutraceutical supplements, food additives, new food and pharmaceuticals products, contributing to the recovery of waste from industrial processes, promoting the economic aspect and reducing environmental impact.<sup>4; 5; 6; 7</sup>

Peach tons (*Prunus persica*) are used for the production of juices and pickled fruit. Accordingly, thousands of tons of waste are not utilized in this fruit causing increased solid waste on the environment. Solid and liquid peach waste are rich in phytochemicals such as carotenoids and phenolic compounds that have high aggregate value due to their remarkable biological activities that contribute to many applications in food, cosmetics and pharmaceuticals products.<sup>8</sup>

Several compounds can be extracted from the utilization of this waste, as carotenoids have important functions to health benefits and actions as pro-vitamin A activity, strengthening the immune system, reducing the risk of degenerative diseases and preventing cardiovascular disease<sup>9</sup>. Furthermore, these pigments can be used as natural food dyes, which have high aggregate value with great potential for use in technological and commercial areas.

Natural and synthetic dyes are among the most used additives in the food industry to enhance, compensate and add color in industrialized products to improve the appearance or provide the natural color of products.<sup>10</sup> Based on these industrial

applications, natural dyes can substitute synthetic dyes that are related to several recent studies that indicate allergy problems and other health hazards. In addition, the marketing for food requires a rigorous assessment for its toxicity<sup>11, 12, 13</sup>.

Therefore, adopting an approach of sustainable production to combat the disposal of organic waste from the fruit processing chain and providing a solution of recovery materials that has great potential for utilization and high functional properties, the aim of this study was to use the waste of peach pulp processing for carotenoid extraction, which can promote actions beneficial to health.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Raw Material

In this study, we used 20 kg of pulp residues from the production of the peach (*Prunus persica*) varieties Eldorado, Precocinho, Jade and Granada. These were harvested in February 2014 in Rio Grande do Sul by the company Mais Fruta (Antônio Prado/RS). Samples of waste peach are made of fruit pieces, pulp and peels and were transported and stored frozen at -18° c. Before each experiment, the frozen samples were ground and homogenized in a mix processor.

### 2.2. Moisture

The assay for moisture in peach pulp residues was conducted according to AOAC methods (2005) by weight loss at 105 °C.

### 2.3. Experimental design for obtaining the extract dye

For extraction, rotational full planning ( $2^3$ ) was undertaken, with 3 central points and 4 axial points totaling 17 experiments. We evaluated the variables solvent volume ( $X_1$ ), number of extractions ( $X_2$ ) and extraction time ( $X_3$ ). The extraction of pigments was performed in absolute ethanol (> 99.5 %) from 1g of sample under stirring and at

room temperature (25 °C), and the extracts were analyzed by spectrophotometry using a UV-Visible spectrophotometer (Shimadzu, UV-1800, Japan) with a wavelength of 450 nm and absorptivity coefficient ( $A^{1\%}_{1\text{cm}}$ ) of 2620. The values of all variables are shown in Table 1.

Table 1: Real and coded values of variables for the full  $2^3$  factorial design.

Variables	Coded /real levels				
	-1,64	-1	0	+1	+1,64
Solvent volume (mL/ g) (X1)	20	26	35	44	50
Number of extraction (X2)	1	2	3	4	5
Extraction time (min) (X3)	10	14	20	26	30

#### 2.4 Identification and quantification of carotenoids

The carotenoid extract was prepared according to the method described by Mercadante and Rodriguez-Amaya (1998)<sup>14</sup>. The pigments were extracted with chilled acetone until discoloration occurred, and the extract was saponified overnight with 10 g.L<sup>-1</sup> KOH in methanol solution at room temperature (25 °C). The extract was then washed to remove the alkali and concentrated in a rotary evaporator (Fisatom 802 water bath with ultrathermostatic Quimis 0214 M2). The concentrated extract was transferred to an amber flask, dried under a nitrogen stream and stored at -18 °C until it was analyzed via high performance liquid chromatography (HPLC).

#### 2.5 Chromatographic conditions

Analyses were performed using a high performance liquid chromatography (HPLC) system equipped with a degasser, a quaternary pump solvent and detector UV / visible. For carotenoid analysis, the extract was diluted with methyl tert-butyl ether (MTBE), transferred to ultrasound for 5 minutes and then filtered (Millex LCR 0.45, 13 mm) for subsequent injection into the chromatograph. The column used was a polymer column to reverse phase YMC C30 (3µm, 250 mm x 4.6 mm ID). The mobile phase consisted of water / methanol / methyl tert-butyl ether (MTBE) from 5: 90: 5, in 12

minutes reaching 0: 95: 5, 25 minutes 0:89:11, 0: 75:25 in 40 minutes, and finally 00:50:50 after a total of 60 minutes at a flow rate of 1 mL / min at 33 ° C<sup>15</sup>.

The carotenoids were quantified using the standard curves obtained for lutein (1–65 mg.mL<sup>-1</sup>), zeaxanthin (1–40 mg.mL<sup>-1</sup>), cryptoxanthin 4-100 mg.mL<sup>-1</sup> and  $\beta$ -carotene (5-50 mg.mL<sup>-1</sup>). The results were expressed in micrograms per g of sample.

The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were as follows:  $\beta$ -carotene, 6.53x10<sup>-2</sup> and 10.89x10<sup>-2</sup>  $\mu$ g/ g; lutein, 6.9x10<sup>-3</sup> and 1.15x10<sup>-2</sup>  $\mu$ g/ g; cryptoxanthin, 2.11x10<sup>-2</sup> and 3.51x10<sup>-2</sup>  $\mu$ g/ g; zeaxanthin, 9.56x10<sup>-2</sup> and 1.59x10<sup>-2</sup>  $\mu$ g/ g.

## 2.6 Statistical Analysis

The results were evaluated by analysis of variance (ANOVA). The means were analyzed by Tukey's test considering 5 % the level of significance ( $p < 0,05$ ) using STATISTICA® 12.0 software (Statsoft, São Paulo, Brazil).

## 3. Results and Discussion

The residue presented a moisture content of 88.6%, and the exhaustive extraction performed to determine the total quantity of carotenoids presented a total content of 256.10  $\mu$ g/ g DW, of which there was 70.23  $\mu$ g/ g of  $\beta$ - carotene, 159.39  $\mu$ g/ g of cryptoxanthin, 18. 92  $\mu$ g/ g of zeaxanthin and 7.56  $\mu$ g/ g of lutein quantified by HPLC. In the spectrophotometer, the total content determined was 816.23  $\mu$ g/ g DW. These results demonstrate the importance of using such methods as high performance liquid chromatography for analysis of bioactive compounds because the results obtained by spectrophotometry can overestimate the amount of the compounds.

The effects of processing anthocyanins, carotenoids and vitamin C were evaluated in cherries, nectarines, apricots, peaches, plums, carrots and red bell peppers. In all samples studied,  $\beta$  -carotene,  $\beta$  -cryptoxanthin,  $\alpha$ -carotene, lycopene and lutein were most commonly detected. Red peppers had the highest carotenoid content (3750  $\mu$ g/ g), followed by carrots (1970  $\mu$ g/ g), apricots (970  $\mu$ g/ g), nectarines (430  $\mu$ g/ g),



plums (170 µg/ g ), peaches (140 µg/ g) and cherries (90 µg/ g). The values found for fresh peaches determined by spectrophotometry were 30 µg/ g of β-carotene, 30 µg/ g of β-cryptoxanthin, 30 µg/ g of α-carotene, 20 µg/ g of lycopene and 30 µg/ g of lutein. Freezing (-20 °C) and heating (98 °C, 10 min) increased the levels of compounds compared with fresh products, indicating that processing in certain cases may facilitate the extraction of bioactive compounds, and freezing the samples to the time of obtaining the carotenoid extracts can be a positive factor.<sup>16</sup>

The antioxidant capacity, phenolic compounds, carotenoid and vitamin C content of nectarine, peach, plum of cultivars from California were studied. The authors obtained a total content of carotenoids (µg / 100 g of fresh weight) determined by HPLC of 7-14 (white-flesh nectarines), 80-186 (yellow-flesh nectarines), 7-20 (white-flesh peaches), 71-210 (yellow-flesh peaches), and 70-260 (plums). These values are slightly higher than those reported in the USDA Food Composition Database (Carotenoids Section), in which the mean carotenoid concentrations are reported as 160, 179, and 114 µg /100 g of fresh weight for yellow-flesh nectarines, yellow-flesh peaches, and plums, respectively. The ranges of total ascorbic acid (vitamin C) (in mg/100 g of fresh weight) were 5-14 (white-flesh nectarines), 6-8 (yellow-flesh nectarines), 6-9 (white-flesh peaches), 4-13 (yellow-flesh peaches), and 3-10 (plums), and the total phenolics (in mg/100 g of fresh weight) were 14-102 (white-flesh nectarines), 18-54 (yellow-flesh nectarines), 28-111 (white-flesh peaches), 21-61 (yellow-flesh peaches), and 42-109 (plums). Antioxidant capacity evaluated by the FRAP method was higher than DPPH, particularly in the case of plums, and its correlations were equally good for both methods. These results are in accordance with previously reported studies on the antioxidant activity of fruits such as strawberries, raspberries and other berries, indicating that vitamin C is not the main antioxidant in these fruits and that polyphenols are primarily responsible for the activity observed.<sup>17</sup>

The quantity of phenolic compounds and carotenoids of 3 varieties of peaches (*Prunus persica*) and 3 varieties of apricots (*Prunus armeniaca*) to verify the effects of peeling the fruit canning and storage at 20 ° C for 6 months were evaluated. HPLC analysis indicated that peaches with skin were associated with values of 870 to 1010 µg/ 100 g of β-carotene, 160 to 170 µg/ 100 g of β- cryptoxanthin, and 70 to 110 µg/ 100 g of zeaxanthin. The values for peeled peach were 707 to 860 µg/ 100 g of β-carotene,

110 to 190  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  of  $\beta$ -criptoxanthin, and 96 to 130  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  of zeaxanthin. The results demonstrated that the phenolic compounds and carotenoids declined with the fruit peeling and storage time indicating that wastes as fruit peel may contain high levels of bioactive compounds. The phenolic compounds demonstrated the same behavior of carotenoids and showed losses peeling the fruit up to 20 %.<sup>18</sup> The total carotenoid values found in the papers presented are inferior to this study, but it is important to emphasize that such carotenoid contents were determined in whole fruit and not the waste from the processing. After exhaustive extraction of the residue peach, 17 assays were performed from the rotational full experimental design ( $2^3$ ) to evaluate the following variables: solvent volume (mL/g), number of extractions and extraction time (min) to determine the optimal method to obtain dye extract.

Table 2 shows the treatments with coded levels and the experimental results of  $\beta$ -carotene yield in waste peach determined by a spectrophotometer. The yield ranged from 332.63 to 814.03  $\mu\text{g}/\text{g}$ . The maximum yield was recorded under the experimental conditions of  $X_1 = 44\text{ mL}$ ,  $X_2 = 2$  extractions and  $X_3 = 14\text{ min}$ .

Table 2: Experimental designs (composite, using surface methodology) and results.

Test	Coded levels			$\beta$ -caroteno yield ( $\mu\text{g/ g DW}$ )
	X1	X2	X3	
<b>1</b>	-1	-1	-1	470.61
<b>2</b>	1	-1	-1	814.03
<b>3</b>	-1	1	-1	601.66
<b>4</b>	1	1	-1	716.75
<b>5</b>	-1	-1	1	387.89
<b>6</b>	1	-1	1	617.89
<b>7</b>	-1	1	1	662.37
<b>8</b>	1	1	1	723.16
<b>9</b>	0	0	0	707.63
<b>10</b>	0	0	0	713.15
<b>11</b>	0	0	0	718.68
<b>12</b>	-1.68	0	0	473.07
<b>13</b>	1.68	0	0	737.10
<b>14</b>	0	-1.68	0	332.63
<b>15</b>	0	1.68	0	767.71
<b>16</b>	0	0	-1.68	587.02
<b>17</b>	0	0	1.68	681,14

Table 3 shows the experimental design analysis. It can be observed from the p-value that the number of extractions (X2) and (X1) volume ( $p < 0,05$ ) are the most statistically significant influence on the extraction yield and that in the experimental range analyzed, the time and combined solvent/extraction, solvent/time, time/extraction interaction are not significant.

Table 3: Estimated effects and variance analysis of the process for the yield carotenoids extraction.

Variable	Yield	
	Effects ( $\pm S$ )	p-Value
X1 (Linear)	174.8471	0.002592
X1(Quadratic)	-60.8749	0.192407
X2 (Linear)	167.7498	0.00339
X2 (Quadratic)	-99.7866	0.050021
X3(Linear)	-7.8606	0.843266
X3 (Quadratic)	-40.3312	0.371101
X1 by X2	-99.3860	0.087347
X1 by X3	-41.9298	0.429680
X2 by X3	86.4912	0.127487

Legend: x1: volume; x2: Extraction number x3: time

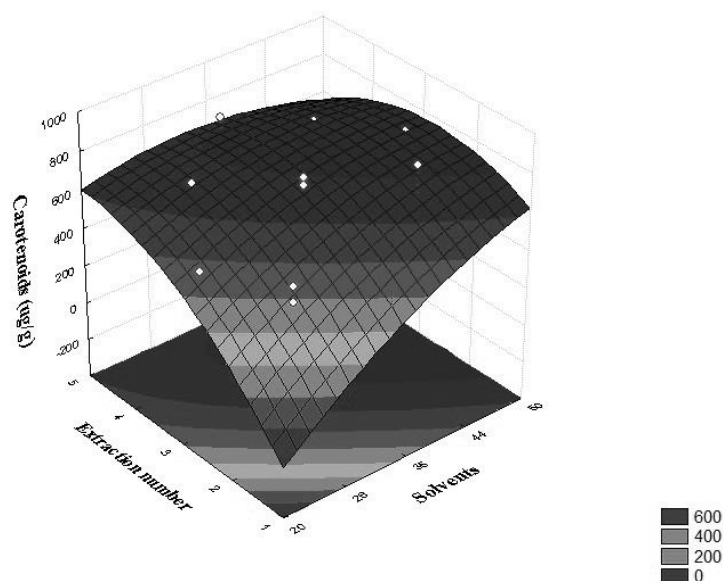
To the proposed model, the explanation percentage was 85.8 %, and the model was validated using ANOVA, with the value of F determined to be 10.06 and the value of F tabulated to be 3.22.

According to the results, the model was reduced represented by the following equation:

$$Y = 685.0975 + 87.4236 X1 - 24.5017 X1^2 + 83.8749 X2 - 43.9576 X2^2 - 49.6930 X1.X2 + 43.2456 X2.X3$$

The solvent variables (X1) and the number of extractions (X2) had a significant positive effect because the increase of solvent volume and number of extractions increases the yield of the process to obtain carotenoids (Figure 1).

Figure 1 - Response surface of carotenoids concentration ( $\mu\text{g/ g}$  dry weight) of peach waste as a function of the extraction number and amount of solvent (mL).



From the derivation of the regression equation, the maximum value of carotenoid extraction of peach waste was obtained (encoded values  $x_1 = x_2 = 0.38$  and  $0.97$ ). The model validation was then performed using a new test utilizing 38.5 mL of ethanol ( $x_1 = 0.38$ ) by 4 extractions ( $x_2 = 0.97$ ) 10 mins ( $p > 0.05$ ), which exhibited a score of 168.59  $\mu\text{g/g}$  of carotenoids, representing 67.55  $\mu\text{g/g}$  of  $\beta$ -carotene, 86.75  $\mu\text{g/g}$  cryptoxanthin, 12.08  $\mu\text{g/g}$  of zeaxanthin and 2.2  $\mu\text{g/g}$  lutein. These values indicate a percentage of 66 % of extraction in relation to the total carotenoid content present in the peach waste analyzed by HPLC. Spectrophotometer analysis determined that 811.14  $\mu\text{g/g}$  was expressed in  $\beta$ -carotene, representing 99.4 % of the extraction.

The total carotenoids were extracted from the by-product of cashew juice processing. To obtain the aqueous extract, the mass of cashew fiber was mixed with water (1:1 w/w) and homogenized. The mixture was compressed in a press of continuous axial (Incomap 300), with a nominal capacity of 300 kg/h for juice production. The operation was repeated for six consecutive cycles. After the six steps of pressing, a suspension of the yellow color was obtained and prefiltered through a stainless steel mesh of 0.3 mm to remove large particles. To obtain a concentrated extract, the aqueous extract was submitted to a microfiltration system with tubular ceramic membranes. The carotenoid content measured by HPLC increased from 10 to

54  $\mu\text{g}/\text{g}$  to concentrate the extract. The by-product of the cashew represented a source of xanthophylls. Auroxanthin and  $\beta$ -cryptoxanthin were the major carotenoids found.<sup>19</sup>

Other waste containing large amounts of carotenoids include carrots bark. An extraction method assisted by microwave (MAE) was studied as a promising alternative to extract carotenoids. Variables were tested including microwave power (180 to 300W), volume of solvent (75 or 150 mL) use of microwave radiation, and different blink intermittency ratio values, which refers to the fraction of the radiation time of microwave to the total processing time in a cycle ( $\alpha = 1/2, 1/3$  and  $1/4$ ), to ensure no excessive thermal degradation of  $\beta$ -carotene and other carotenoids because prolonged MAE caused this type of degradation. The use of  $\alpha = 1/4$  with power 180 W with 75 ml: 2 g and 300 W, 150 ml: 2 g resulted in higher amounts of  $\beta$ -carotene in comparison with the use of continuous MAE. The maximum yield of  $\beta$ -carotene found in the conditions of 180 W/ 75 mL, 300 W/ 75 mL, 180 W/ 300 W and 150 mL/ 150 mL were 1126, 1327, 1225 and 1109  $\mu\text{g}/\text{g}$ , respectively, determined by a spectrophotometer.<sup>20</sup>

Many studies can be found using supercritical  $\text{CO}_2$  to extract carotenoids. The supercritical  $\text{CO}_2$  was used for the extraction of tocopherols, carotenoids and chlorophylls olive peel, as well as waste from the production of olive oil to obtain extracts free of solvent residues. A response surface methodology was used to evaluate the influence of pressure (25-35 MPa) and temperature (313-333 K) in the extract quality (expressed tocopherols, carotenoids and chlorophylls). Also evaluated was the use of ethanol as a co-solvent. The results showed that the addition of ethanol as a co-solvent to supercritical carbon dioxide increases the yield of carotenoids and chlorophyll extraction. The concentration levels of the compounds in the extract increased slightly with pressure and decreased with increasing temperature, so the maximum values were 35 MPa and 313 K, which obtained approximately 15 ppm of carotenoids in a spectrophotometer.<sup>21</sup>

Many food wastes can be exploited and used to develop new products in the food industry. This utilization, while preventing waste disposal in nature, causes environmental damage and costs for companies and can be used for the extraction of bioactive compounds such as carotenoids, which are pigments with high added value and functional with benefits to human organisms. The residue peach pulp process has proven to be a potential source of these compounds, and the extraction of these

pigments under the conditions presented in this study may be an alternative to the use of waste generated in the processing of peach pulp.

#### 4. Conclusions

In the extraction process, the influence of various factors, such as time, amount of solvent and the number of extractions, were considered, which were analyzed in this study for obtaining carotenoids from waste peach pulp processing. The increased number of extractions and quantity of solvent provided a higher yield in the production of carotenoids, recovering 66 % of waste compounds. The residue peach pulp processing is rich in carotenoids, and the extraction process can be an alternative to the use of the material that is generated and not used in this process. Exploring these valuable materials with great functional capabilities and contributing to the adoption of a sustainable production approach can be utilized to combat waste surplus within the food industry chain <sup>2</sup>.

#### 5. References

1. Mirabella, N.; Castellani, V.; Sala, S., Current options for the valorization of food manufacturing waste: a review. *Journal of Cleaner Production* **2014**, *65*, 28-41.
2. Papargyropoulou, E.; Lozano, R.; K. Steinberger, J.; Wright, N.; Ujang, Z. b., The food waste hierarchy as a framework for the management of food surplus and food waste. *Journal of Cleaner Production* **2014**, *76*, 106-115.
3. Kosseva, M.; Webb, C., *Food Industry Wastes - Assessment and Recuperation of Commodities*. 2013.
4. Ayala-Zavala, J. F.; Vega-Vega, V.; Rosas-Dominguez, C.; Palafox-Carlos, H.; Villa-Rodriguez, J. A.; Siddiqui, M. W.; Davila-Avina, J. E.; Gonzalez-Aguilar, G. A., Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. *Food Research International* **2011**, *44*, 1866-1874.
5. Peschel, W.; Sanchez-Rabaneda, F.; Diekmann, W.; Plescher, A.; Gartzia, I.; Jimenez, D.; Lamuela-Raventos, R.; Buxaderas, S.; Codina, C., An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. *Food Chemistry* **2006**, *97*, 137-150.
6. Gorinstein, S.; Poovarodom, S.; Leontowicz, H.; Leontowicz, M.; Namiesnik, J.; Vearasilp, S.; Haruenkit, R.; Ruamsuke, P.; Katrich, E.; Tashma, Z., Antioxidant properties and bioactive constituents of some rare exotic Thai fruits and comparison with conventional fruits In vitro and in vivo studies. *Food Research International* **2011**, *44*, 2222-2232.
7. Lee, J.; Wrolstad, R. E., Extraction of Anthocyanins and Polyphenolics from Blueberry Processing Waste. *Journal of Food Science* **2004**, *69*, 564-573.

8. Zerva, E.; Abatis, D.; Skaltsounis, A. L.; Fokialakis, N., Development and application of a methodology for the recovery of high added value products from peach industry waste. *Planta Med* **2012**, *78*, PJ98.
9. Strati, I. F.; Oreopoulou, V., Process optimisation for recovery of carotenoids from tomato waste. *Food Chemistry* **2011**, *129*, 747-752.
10. Santos, L. F.; Dias, V. M.; Pilla, V.; Andrade, A. A.; Alves, L. P.; Munin, E.; Monteiro, V. S.; Zilio, S. C., Spectroscopic and photothermal characterization of annatto: Applications in functional foods. *Dyes and Pigments* **2014**, *110*, 72-79.
11. Amin, K. A.; Hameid, H. A., II; Abd Elsttar, A. H., Effect of food azo dyes tartrazine and carmoisine on biochemical parameters related to renal, hepatic function and oxidative stress biomarkers in young male rats. *Food and Chemical Toxicology* **2010**, *48*, 2994-2999.
12. Abd El-Wahab, H. M. F.; Moram, G. S. E.-D., Toxic effects of some synthetic food colorants and/or flavor additives on male rats. *Toxicology and Industrial Health* **2013**, *29*, 224-232.
13. Rao, P.; Bhat, R. V.; Sudershan, R. V.; Krishna, T. P.; Naidu, N., Exposure assessment to synthetic food colours of a selected population in Hyderabad, India. *Food Additives and Contaminants* **2004**, *21*, 415-421.
14. Mercadante, A. Z.; Rodriguez-Amaya, D. B.; Britton, G., HPLC and Mass Spectrometric Analysis of Carotenoids from Mango. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1997**, *45*, 120-123.
15. Zanatta, C. F.; Mercadante, A. Z., Carotenoid composition from the Brazilian tropical fruit camu-camu (*Myrciaria dubia*). *Food Chemistry* **2007**, *101*, 1526-1532.
16. Leong, S. Y.; Oey, I., Effects of processing on anthocyanins, carotenoids and vitamin C in summer fruits and vegetables. *Food Chemistry* **2012**, *133*, 1577-1587.
17. Gil, M. I.; Tomás-Barberán, F. A.; Hess-Pierce, B.; Kader, A. A., Antioxidant Capacities, Phenolic Compounds, Carotenoids, and Vitamin C Contents of Nectarine, Peach, and Plum Cultivars from California. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, *50*, 4976-4982.
18. Campbell, O. E.; Padilla-Zakour, O. I., Phenolic and carotenoid composition of canned peaches (*Prunus persica*) and apricots (*Prunus armeniaca*) as affected by variety and peeling. *Food Research International* **2013**, *54*, 448-455.
19. de Abreu, F. P.; Dornier, M.; Dionisio, A. P.; Carail, M.; Caris-Veyrat, C.; Dhuique-Mayer, C., Cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) extract from by-product of juice processing: A focus on carotenoids. *Food Chemistry* **2013**, *138*, 25-31.
20. Hiranvarachat, B.; Devahastin, S., Enhancement of microwave-assisted extraction via intermittent radiation: Extraction of carotenoids from carrot peels. *Journal of Food Engineering* **2014**, *126*, 17-26.
21. Gracia, I.; Rodríguez, J. F.; de Lucas, A.; Fernandez-Ronco, M. P.; García, M. T., Optimization of supercritical CO<sub>2</sub> process for the concentration of tocopherol, carotenoids and chlorophylls from residual olive husk. *The Journal of Supercritical Fluids* **2011**, *59*, 72-77.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS



No processo de extração diversos fatores podem ser considerados e sua influência dependerá do tipo de composto a ser analisado e as interações entre eles com a matriz alimentar. Quando se trata de resíduos alimentícios, esta matriz pode variar muito, pois dependerá de como o processamento da fruta é realizado e como será feita a separação destes. Por exemplo, no processamento de polpa de amora, o material que é descartado é praticamente composto apenas de sementes, já o pêssego possui grande quantidade de casca e polpa compactadas no mesmo descarte e no caso do morango, o processo consegue isolar restos de polpa e partes da fruta que são descartadas separadamente das sementes e folhas, gerando um resíduo com grande quantidade de pedaços de frutas.

Dependendo da fruta, o descarte de resíduos agroindustriais pode alcançar de 30 a 90 % de material orgânico, logo para extrair compostos deste percentual deve-se considerar quais partes serão utilizadas e se elas terão as mesmas características, pois dependendo da distribuição dos diferentes materiais na mesma amostragem os resultados poderão ser muito divergentes.

Outro parâmetro que pode influenciar nas características do resíduo gerado no processo são as variáveis de plantio e de todo desenvolvimento do fruto até a industrialização. Estes fatores, como tipo de solo, clima, período do ano de cultivo, cultivar, método orgânico ou convencional, as práticas de colheita em que o fruto foi submetido, métodos de conservação das frutas antes do processo poderão influenciar na quantidade de compostos bioativos presentes na matriz alimentar, conseqüentemente no seu resíduo. No caso deste trabalho, os resíduos foram conservados sob congelamento (-18 °C) que segundo muitos estudos proporcionam um aumento na extração de compostos bioativos, já que este processo causa um rompimento da parede celular facilitando a liberação dos pigmentos.

Uma matriz alimentícia complexa pode interagir com variáveis como quantidade de solvente, número de extrações, tempo de extração, etc e outros fatores como tipo de solvente, utilização de ácidos e temperatura também poderão influenciar no processo. A escolha do solvente para extração é o primeiro passo para determinação do total ou do conteúdo individual de compostos, pois diferentes solventes ou misturas deles provavelmente causam diferentes taxas de transporte de solutos, a partir da matriz para a maior parte do fluido de extração, e, por conseguinte, diferentes rendimentos de

extração. No caso das antocianinas, sua característica polar as tornam solúveis em muitos tipos de solventes como o metanol, etanol, acetona e água, mas cada um deles poderá apresentar uma resposta diferente. Deve-se considerar também na escolha do solvente para extração de alimentos, que este, não poderá ser tóxico e dê preferência não poluente. Outro parâmetro que deve ser considerado é a adição de ácidos ou bases no solvente de extração, alterando o seu pH, pois dependendo da matéria prima utilizada, pode ser necessário acidificar a solução para romper a parede celular, que é o caso das antocianinas onde a intensidade e estabilidade da cor mudam drasticamente na faixa de pH (entre 1 e 12).

A temperatura também é um fator que pode ou não influenciar e proporcionar melhores resultados num processo de extração, entretanto sabe-se que os compostos bioativos são termosensíveis e muitos estudos relatam a degradação dos pigmentos com o emprego desta variável.

Neste trabalho pôde-se observar diferentes interações e a resposta de cada amostra em relação às variáveis e fatores empregados durante as análises. No estudo com o resíduo do processamento da polpa de pêsego, o aumento do número de extrações e quantidade de solvente proporcionaram um maior rendimento na produção de carotenoides, com recuperação de 66 % dos compostos do resíduo. Por sua vez, para o resíduo da polpa de amora, somente o aumento do número de extrações foi uma variável significativa, o que proporcionou um maior rendimento no extrato de antocianinas, com recuperação de 59 % dos compostos. Entretanto, para o resíduo do morango obteve-se melhor rendimento nos extratos de antocianinas com um maior número de extrações e tempo mais prolongado, com recuperação de 98 % dos pigmentos.

Assim, este trabalho demonstrou que os resíduos do processamento de polpa de pêsego, amora e morango podem ser potenciais fontes para extração de corantes naturais, apresentando quantidades elevadas de compostos bioativos (168,59 µg/ g de carotenoides no pêsego, 25,9 mg/ 100g e 703,45 µg/ g de antocianinas na amora e morango, respectivamente), o que representa uma alternativa para aproveitamento destes materiais valiosos de grande capacidade funcional que podem gerar novos

produtos alimentícios de alto valor agregado e contribuir para que seja adotada uma abordagem de produção sustentável para combater a geração dos resíduos dentro da cadeia produtiva, favorecendo assim o aspecto econômico e com redução do impacto ambiental.

## CONCLUSÃO

Em um processo de extração deve-se considerar a influência de diversos fatores como tempo, quantidade de solvente e o número de extrações, os quais foram analisados neste estudo para obtenção de carotenoides e antocianinas a partir de resíduo do processamento de polpa de frutas.

O resíduo do processamento da polpa de pêsego é rico em carotenoides e das polpas de amora e morango é rico em antocianinas. Dentro das condições estudadas, estes resíduos representam potenciais fontes de corantes naturais e suas extrações uma alternativa para o aproveitamento do material que é gerado e descartado no processamento das polpas. Assim, a exploração destes materiais de grande capacidade funcional ajuda a combater o excedente de resíduos dentro da cadeia da indústria de polpa de frutas.

## REFERÊNCIAS

ABDEL-AAL, E.-S.M.et al. Dietary Sources of Lutein and Zeaxanthin Carotenoids and Their Role in Eye Health. **Nutrients**, p.1169-1185, 2013.

ABD EL-WAHAB, H. M. F.; MORAM, G. S. E. Toxic effects of some synthetic food colorants and/or flavor additives on male rats. **Toxicology and Industrial Health**, p. 224-232, 2013.

ABRAHÃO, S.A. et al. Compostos bioativos e atividade antioxidante do café (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.34, n.2, p.414-420, mar./abr. 2010.

ABRANTES, S.; ALVES, B. Avaliação das bebidas não alcoólicas e não gaseificadas, em relação ao uso de corantes artificiais. **Higiene Alimentar**, v. 18, p. 51-54, 2004.

ABREU, F. P. de et al. Cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) extract from by-product of juice processing: A focus on carotenoids. **Food Chemistry, local**, v. 138, n. 1, p. 25-31, 2013.

AKSU, Z.; EREN, A. T. Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 35, n. 2, p. 107-113, 2007.

AYALA-ZAVALA, J. F. et al. Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. **Food Research International**, vol. 44, p. 1866-1874, 2011.

AYALA-ZAVALA, J. F. et al. Antioxidant Enrichment and Antimicrobial Protection of Fresh-Cut Fruits Using Their Own Byproducts: Looking for Integral Exploitation. **Journal of Food Science**, p., 2010.

AJILA, C. M.; BHAT, S. G.; PRASADA RAO, U. J. S. Valuable components of raw and ripe peels from two Indian mango varieties. **Food Chemistry**, v. 102, n. 4, p. 1006-1011, 2007.

AL-AWWADI, N. A. et al. Extracts enriched in different polyphenolic families normalize increased cardiac NADPH oxidase expression while having differential effects on insulin resistance, hypertension, and cardiac hypertrophy in high-fructose-fed rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 1, p. 151-157, Jan 2005.

AMIN, K. A.; HAMEID, H. A., II; ABD ELSTTAR, A. H. Effect of food azo dyes tartrazine and carmoisine on biochemical parameters related to renal, hepatic function and oxidative stress biomarkers in young male rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 10, p. 2994-2999, Oct 2010.

BARROS, A. A.de.; BARROS, E. de P. A. Química dos Alimentos: Produtos Fermentados e Corantes. **Coleção Química no cotidiano**, Sociedade Brasileira de Química, v.4, 2010.

BARROS, F.A.R.; STRINGHETA, P.C. Microencapsulamento de Antocianinas: uma alternativa para o aumento de sua aplicabilidade como ingrediente alimentício. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, nº 36, janeiro-junho 2006.

BERARDINI, N. et al. Utilization of mango peels as a source of pectin and polyphenolics. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, p. 442-452, 2005.

BORDIGNON JUNIOR, C. L. et al. Influência do pH da solução extrativa no teor de antocianinas em frutos de morango. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 29, p. 183-188, 2009.

BOWEN-FORBES, C. S.; ZHANG, Y.; NAIR, M. G. Anthocyanin content, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer properties of blackberry and raspberry fruits. **Journal of Food Composition and Analysis**, p. 554-560, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 4, de 24 de novembro de 1988. Aprova revisão das tabelas I, III, IV e V referente a aditivos intencionais, bem como os anexos I, II, III e VII, todas do decreto n.º 55.871,

de 26 de março de 1965. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 1988. Acesso em: 14 de maio de 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria 540, de 27 de outubro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares - definições, classificação e emprego. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 1997. Acesso em: 14 de maio de 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Decreto 55871, de 26 de março de 1965, Referente a normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 1965. Acesso em 14 de maio de 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 44, de 1977. Estabelece as condições gerais de elaboração, classificação, apresentação, designação, composição e fatores essenciais de qualidade dos corantes empregados na produção de alimentos e bebidas. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 1978. Acesso em: 6 de maio de 2013.

BUCKOW, R.; KASTELL, A.; TEREFE, N. S.; VERSTEEG, C. Pressure and Temperature Effects on Degradation Kinetics and Storage Stability of Total Anthocyanins in Blueberry Juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, p. 10076-10084, 2010.

CABRITA, L.; FOSSEN, T.; ANDERSEN, O.M. Colour and stability of the six common anthocyanidin 3-glucosides in aqueous solutions. **Food Chemistry**, Toronto, ano 68, n.1, p.101-107, jan. 2000.

CACACE, J.E.; MAZZA, G. Extraction of Anthocyanins and Other Phenolics from Black Currants with Sulfured Water. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, ano 50, n.71, p. 5939–5946, set. 2002.

CAMPBELL, O. E.; PADILLA-ZAKOUR, O. I. Phenolic and carotenoid composition of canned peaches (*Prunus persica*) and apricots (*Prunus armeniaca*) as affected by variety and peeling. **Food Research International**, p. 448-455, 2013.

CANADA. Canadian Food Inspection Agency, 2014.

CASTANEDA-OVANDO, A. et al. Chemical studies of anthocyanins: A review. **Food Chemistry**, p. 859-871, 2009.

CHOCIAI, M.B. et al. Cultivo da levedura *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) em processo descontínuo alimentado para produção de astaxantina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 38, n.4, Oct./Dec. 2002.

CONNOR, A. M. et al. Changes in fruit antioxidant activity among blueberry cultivars during cold-temperature storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, p. 893-898, 2002.

CONSTANT, P.; STRINGHETA, P.; SANDI, D. CORANTES ALIMENTÍCIOS. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, América do Norte, mar. 2005.

COSTA, M.A.L.; ORTEGA-FLORES, C.I.; PENTEADO, M.D.V.C. Alterações estruturais in vivo dos isômeros *trans*, 9-*cis* e 13-*cis* do  $\beta$ -caroteno. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, vol.22, nº3, p.224-228, 2002.

DA SILVA, F. L. et al. Anthocyanin pigments in strawberry. **LWT - Food Science and Technology**, p. 374-382, 2007.

DE ABREU, F. P. et al. Cashew apple (*Anacardium occidentale L.*) extract from by-product of juice processing: A focus on carotenoids. **Food Chemistry**, p. 25-31, 2013.

DEIGHTON, N. et al. Antioxidant properties of domesticated and wild *Rubus* species. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, p.1307-1313, 2000.

DE SOUZA, V. R. et al. Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. **Food Chemistry**, p. 362-368, 2014.

DERNER, R.B. et al. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36 n.6, Nov./Dec. 2006.

DIAS, M.V.; GUIMARÃES, P.I.C.; MERÇON, F. Corantes naturais - extração e emprego como indicadores de pH. **Química Nova na Escola**, São Paulo, ano 9, n.17, p. 27-31, maio 2003.

DOWNHAM, A.; COLLINS, P. Colouring our foods in the last and next millennium. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 35, n. 1, p. 5-22, 2000. EL-WAHAB, H. M. F. A.; MORAM, G. S. E.D. Toxic effects of some synthetic food colorants and/or flavor additives on male rats. **Toxicology and Industrial Health**, v. 29, n. 2, p. 224-232, 2013.

FALCÃO, A.P. et al. Índice de polifenóis, antocianinas totais e atividade antioxidante de um sistema modelo de geléia de uvas. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, ano 27, n.3, p. 637-642, julho-setembro, 2007.

FAO, 2009.

FAO. FAOSTAT: Agricultural Production/strawberry. 2011.

FELLOWS, P. Tecnologia do processamento de alimentos: princípios e prática. 2ª ed. Artmed, 2006, 602 p.

FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**. 4ª ed. Porto Alegre: Artmed 2010.

FERNANDES, V. C. et al. Strawberries from integrated pest management and organic farming: Phenolic composition and antioxidant properties. **Food Chemistry**, p. 1926-1931, 2012.

FILHO, G. L. et al. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of carotenoids from pitanga fruits (*Eugenia uniflora L.*). **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 46, n. 1, p. 33-39, 2008.

FONTANA, J.D. et al. Carotenoides Cores Atraentes e Ação Biológica. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, nº13, p.40-45, 2000.

FULEKI, T.; FRANCIS, F. J. Quantitative methods for anthocyanins: Determination of total anthocyanin and degradation index for cranberry juice. **Journal of Food Science**, p. 78, 1968.

GAMARRA, F. M. C. et al. Extração de corantes de milho (*Zea mays L.*). **Food Science and Technology**, Campinas, v. 29, p. 62-69, 2009.

GARCIA, E.A. et al. Desempenho e qualidade dos ovos de poedeiras comerciais alimentadas com sementes de Urucum (*Bixa orellanaL.*) moída na dieta. **Veterinária e Zootecnia**, v.16, n.4, 2009.

GIL, M. I. et al. Antioxidant Capacities, Phenolic Compounds, Carotenoids, and Vitamin C Contents of Nectarine, Peach, and Plum Cultivars from California. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, p. 4976-4982, 2002.

GORINSTEIN, S. et al. Antioxidant properties and bioactive constituents of some rare exotic Thai fruits and comparison with conventional fruits In vitro and in vivo studies. **Food Research International**, p. 2222-2232, 2011.

GLOVER, B.J., MARTIN, C. Anthocyanins. **Current Biology**, Cambridge, março 2012.

GRACIA, I. et al. Optimization of supercritical CO<sub>2</sub> process for the concentration of tocopherol, carotenoids and chlorophylls from residual olive husk. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 59, n. 0, p. 72-77, 2011.

HAN, K.H. et al. Effects of anthocyanin-rich purple potato flakes on antioxidant status in F344 rats fed a cholesterol-rich diet. **British Journal of Nutrition**, v. 98, n. 5, p. 914-921, Nov 2007..

HARBONE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992.

**Phytochemistry**, Oxford, ano 40, n.6, p. 481-504, novembro, 2000.

HE, J.; GIUSTI, M. M. Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 1, p. 163-187, 2010..

HIRANVARACHAT, B.; DEVAHASTIN, S. Enhancement of microwave-assisted extraction via intermittent radiation: Extraction of carotenoids from carrot peels. **Journal of Food Engineering**, p. 17-26, 2014.

IBRAF. **Projeto de Promoção das Exportações de Frutas Brasileiras e Derivados, denominado Brazilian Fruit**, 2013.

INOUE, T. et al. Tropical fruit camu-camu (*Myrciaria dubia*) has anti-oxidative and anti-inflammatory properties. **Journal of Cardiology**, v. 52, n. 2, p. 127-132, 2008. 2013.

KAJDŽANOSKA, M.; PETRESKA, J.; STEFOVA, M. Comparison of Different Extraction Solvent Mixtures for Characterization of Phenolic Compounds in Strawberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, p.5272-5278, 2011.

KOSSEVA, M.; WEBB, C. Assessment and Recuperation of Commodities. **Food Industry Wastes**, 2013.

KRUGER, M. J. et al. Proanthocyanidins, anthocyanins and cardiovascular diseases. **Food Research International**, p. 41-52, 2014.

LEONG, S. Y.; OEY, I. Effects of processing on anthocyanins, carotenoids and vitamin C in summer fruits and vegetables. **Food Chemistry**, p.1577-1587, 2012.

LOPES, T.J. et al. Antocianinas: uma breve revisão das características estruturas e da estabilidade. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, ano 6, n.3, p. 291-297, julho setembro, 2007.

LEE, J.; WROLSTAD, R. E. Extraction of Anthocyanins and Polyphenolics from Blueberry Processing Waste. **Journal of Food Science**, v. 69, n. 7, p. 564-573, 2004.

LI, Y. et al. Green ultrasound-assisted extraction of carotenoids based on the bio-refinery concept using sunflower oil as an alternative solvent. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, n. 1, p. 12-18, 2013.

LOUSADA JUNIOR, J.E. et al. Consumo e digestibilidade de subprodutos do processamento de frutas em ovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.34, n.2, p.659-669, 2005.

MATIAS, M.F.O. et al. Use of fibres obtained from the cashew (*Anacardium occidentale*, L) and guava (*Psidium guajava*) fruits for enrichment of food products. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.48, p.143-150, 2005.



MARTINS, C.R.; FARIAS, R.M. Produção de alimentos x desperdício: tipos, causas e como reduzir perdas na produção agrícola. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v.9, n.1, p.83-93, 2002.

MARTINS, M. A.; MATTOSO, L. H. C.; PESSOA, J. D. C. Thermogravimetric evaluation of acai fruit (*Euterpe oleracea Mart.*) agro industry waste/Comportamento termico e caracterizacao morfologica das fibras de mesocarpo e caroco do acai (*Euterpe oleracea Mart.*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, 2009.

MATIOLI, G.; RODRIGUES-AMAYA, D.B., Microencapsulação do licopeno com ciclodextrinas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, vol.23, dez. 2003.

MELO, E.A. et al. Capacidade antioxidante de frutas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v.44, n.2, p.193-201, 2008.

MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J.; VICARIO, I. M.; HEREDIA, F. J. Estabilidad de los pigmentos carotenoides en los alimentos. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 54, p. 209-215, 2004.

MERCADANTE, A. Z.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; BRITTON, G. HPLC and Mass Spectrometric Analysis of Carotenoids from Mango. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, p. 120-123, 1997.

MIRABELLA, N.; CASTELLANI, V.; SALA, S. Current options for the valorization of food manufacturing waste: a review. **Journal of Cleaner Production**, p. 28-41, 2014.

MOO-HUCHIN, V. M. Determination of some physicochemical characteristics, bioactive compounds and antioxidant activity of tropical fruits from Yucatan, Mexico. **Food Chemistry**, p. 508-515, 2014.

MORAIS, F.L. **Carotenoides: características biológicas e químicas**. Monografia do curso de qualidade em Alimentos, Brasília 2006.

MUNAWAR, N.; JAMIL, H. M. T. B. H. The Islamic Perspective Approach on Plant Pigments as Natural Food Colourants. **Procedia - Social and Behavioral Sciences**, p. 193-203, 2014.

NETTO, R.C.M. Dossiê Corantes. **Food Ingredients Brasil**, São Paulo, ano 2, n.9, p.40-59, agosto – setembro, 2009.

NICOUE, E. E.; SAVARD, S.; BELKACEMI, K. Anthocyanins in wild blueberries of Quebec: Extraction and identification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, p. 5626-5635, 2007.

NUNES, I. L.; MERCADANTE, A. Z. Obtenção de cristais de licopeno a partir de descarte de tomate. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 24, p. 440-447, 2004.

NORUÉGA. Norwegian Food Safety Authority, 2014.

PAIK, S.S. et al. Anthocyanins from the seed coat of black soybean reduce retinal degeneration induced by N-methyl-N-nitrosourea. **Experimental Eye Research**, Korea, v. 97, n. 1, p. 55-62, 2012.

PALACE, V.P. et al. Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 746-761, mar 1999.

PASCUAL-TERESA, S.; MORENO, D.A.; GARCÍA-VIGUERA, C. Flavanols and Anthocyanins in Cardiovascular Health: A Review of Current Evidence. **International Journal of Molecular Sciences**, p. 1679-1703, 2010.

PAPARGYROPOULOU, E. et al. The food waste hierarchy as a framework for the management of food surplus and food waste. **Journal of Cleaner Production**, p. 106-115, 2014.

PESCHEL, W. et al. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. **Food Chemistry**, p. 137-150, 2006.

POLÔNIO, M. L. T.; PERES, F. Consumo de aditivos alimentares e efeitos à saúde: desafios para saúde pública brasileira. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.25, n.8, Agosto, 2009.

PRADO, M. A.; GODOY, H.T., Corantes artificiais em alimentos. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.14, n.2, p. 237-250, 2003.

PUBLIC CITIZEN HEALTH RESEARCH GROUP. Dyes in Your Food. 1985.

RAO, P. et al. Exposure assessment to synthetic food colours of a selected population in Hyderabad, India. **Food Additives And Contaminants**, England, v. 21, n. 5, p. 415-421, 2004.

ROCKENBACH, I. I. et al. Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades Tannat e Ancelota. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 28, p. 238-244, dez 2008.

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

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. A Guide to Carotenoid Analysis in Food. **ILSI Press**, Washington, p.37-51, 1999.

SANTOS, A. B. D.; FÁVARO-TRINDADE, C. S.; GROSSO, C. R. F. Preparo e caracterização de microcápsulas de oleoresina de páprica obtidas por atomização. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 25, p. 322-326, 2005.

SANTOS, L. F. et al. Spectroscopic and photothermal characterization of annatto: Applications in functional foods. **Dyes and Pigments**, p. 72-79, 2014.

SCALZO, J.; STEVENSON, D.; HEDDERLEY, D. Blueberry estimated harvest from seven new cultivars: Fruit and anthocyanins. **Food Chemistry**, p. 44-50, 2013.

SCHIEBER, A.; STINTZING, F.C.; CARLE, R. Byproducts of plant food processing as a source of functional compounds: recent developments. **Trends Food Science Technology**, Cambridge, v.12, n.11, p.401- 413, 2001.

SCHUMANN ; POLÔNIO, M GONÇALVES, E.C.B.A., S.P.A.;L.T. Avaliação do consumo de corantes artificiais por lactentes, pré-escolares e escolares. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28, nº3, Jul/Set, 2008.

SEABRA, I. J. et al. Effect of solvent (CO<sub>2</sub>/ethanol/H<sub>2</sub>O) on the fractionated enhanced solvent extraction of anthocyanins from elderberry pomace. **Journal of Supercritical Fluids**, p. 145-152, 2010.

SENA, R.F.; NUNES, M.L. Utilização de resíduos agroindustriais no processamento de rações para carcinicultura. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Bahia, v.7, n.2, p.94-102, 2006.

SHAHID, M.; SHAHID UL, I.; MOHAMMAD, F. Recent advancements in natural dye applications: a review. **Journal of Cleaner Production**, p.310-331, 2013.

SHAMI, N.J.I.E.; MOREIRA, E.A.M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista. Nutrição.**, Campinas, v. 17, n. 2, Abril./Junho, 2004.

SHI, J.; MAGUER, M.; MAZZA, G. Functional foods : biochemical and processing aspects, v. 2, Lancaster, 2002.

SILVA, L. M. R. D. et al. Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, p. 398-404, 2014.

SOUSA, M.S.; VIEIRA, L.M., SILVA, M.J.M.; LIMA, A., Caracterização nutricional e compostos antioxidantes em resíduos de polpas de frutas tropicias. **Ciência. e agrotecnologia.**, Lavras, v. 35, n. 3, p. 554-559, maio/jun., 2011.

SPELLMEIER,J.G.; STÜLP,S. Avaliação da degradação e toxicidade dos corantes alimentícios eritrosina e carmim de cochonilha através de processo fotoquímico. **Revista Acta Ambiental Catarinense**, v. 6, 2009.

STEFANUT, M. N. et al. Anti-hyperglycemic Effect of Bilberry, Blackberry and Mulberry Ultrasonic Extracts on Diabetic Rats. **Plant Foods for Human Nutrition**, p. 378-384, 2013.

STRATI, I. F.; OREOPOULOU, V. Process optimisation for recovery of carotenoids from tomato waste. **Food Chemistry**, v. 129, n. 3, p. 747-752, 2011.

SUÉCIA. Swedish National Food Agency, 2014.

TERCI, D.B.L.; ROSSI, A.V. Natural pH indicators: using paper or solution. **Química Nova**, São Paulo, ano 25, n.4, p. 684-688, julho-agosto, 2002.

TEIXEIRA, L.N.; STRINGHETA, P.C.; OLIVEIRA, F.C. Comparação de métodos para quantificação de antocianinas. **Revista Ceres**, Viçosa, ano 55, n.4, p. 297-304, agosto, 2008.

TSUDA T. Regulation of adipocyte function by anthocyanins; possibility of preventing the metabolic syndrome. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Japão, p. 642–646, 2008.

VALLS, J. et al. Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols. **Journal of Chromatography**, v. 1216, n. 43, p. 7143-7172, 2009.

VERBEYST, L. et al. Kinetic study on the thermal and pressure degradation of anthocyanins in strawberries. **Food Chemistry**, p. 269-274, 2010.

VIUDA-MARTOS, M. et al. Physicochemical characterization of the orange juice waste water of a citrus by-product. **Journal of Food Processing and Preservation**, p. 264-271, 2011.

VOLP, A.C.P.; RENHE, I.R.T.; STRINGHETA, P.C., Pigmentos Naturais Bioativos. **Alimentos e Nutrição**., Araraquara, 2009.

VALDUGA, et al. Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, São Paulo, vol.32 nº 9, 2009.

VALDUGA, et al. Extração, secagem por atomização e microencapsulamento de antocianinas do bagaço da uva Isabel (*vitis labrusca*). **Ciência e agrotecnologia**., Lavras, v. 32, n. 5, p. 1568-1574, set./out., 2008.

WANG, S. Y.; LIN, H. S. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, p. 140-146, 2000.

WATHNE, E. et al. Pigmentation of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed astaxanthin in all meals or in alternating meals. **Aquaculture**, v. 159, n. 3–4, p. 217-231, 1998.

WANKENNE, M. A. Os Corantes Naturais. **Revista Aditivos e Ingredientes**. Ed. Insumos. Maio/Junho, n38, p.32 e 50, 2005.

ZANATTA, C. F. et al. Determination of anthocyanins from camu-camu (*Myrciaria dubia*) by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 24, p. 9531-9535, Nov 2005.

ZANATTA, C. F.; MERCADANTE, A. Z. Carotenoid composition from the Brazilian tropical fruit camu-camu (*Myrciaria dubia*). **Food Chemistry**, v. 101, n. 4, p. 1526-1532, 2007.

ZERVA, E. et al. Development and application of a methodology for the recovery of high added value products from peach industry waste, **Planta Medica**, 2012.

ZOU, T. et al. Optimization of Microwave-Assisted Extraction of Anthocyanins from Mulberry and Identification of Anthocyanins in Extract Using HPLC-ESI-MS. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 1, p. C46-C50, Jan 2012.