



FACULDADE DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
LICENCIATURA EM ENGENHARIA QUÍMICA

Trabalho de Licenciatura

Produção de corante natural em pó através da secagem por atomização de extractos de cálices de *Hibiscus Sabdariffa L.*, avaliação da actividade antioxidante e sua estabilidade.

Autor:

Machava, Enoque Fernando

Supervisora:

Prof^a.Doutora Maida Abdulssatar Khan, Eng^a

Co-Supervisora:

Mestre Asmina Sulemane, Eng^a

Maputo, Junho de 2024

UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE
FACULDADE DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
LICENCIATURA EM ENGENHARIA QUÍMICA

Trabalho de Licenciatura

Produção de corante natural em pó através da secagem por atomização de extractos de cálices de *Hibiscus Sabdariffa L.*, avaliação da actividade antioxidante e sua estabilidade.

Autor:

Machava, Enoque Fernando

Supervisora:

Prof^a.Doutora Maida Abdulssatar Khan, Eng^a

Co-Supervisora:

Mestre Asmina Sulemane, Eng^a

Maputo, Junho de 2024



FACULDADE DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
LICENCIATURA EM ENGENHARIA QUÍMICA

TERMO DE ENTREGA DO RELATÓRIO DO TRABALHO DE LICENCIATURA

Declaro que o estudante Enoque Fernando Machava entregou no dia ___/___/20___ as ___ cópias do relatório do seu trabalho de Licenciatura intitulado: **Produção de corante natural em pó através da secagem por atomização de extractos de cálices de *Hibiscus Sabdariffa L.*, avaliação da actividade antioxidante e sua estabilidade.**

Maputo, ____ de _____ de 2024

O chefe da Secretaria

Declaração de Honra

Eu, Enoque Fernando Machava, Declaro por minha honra que o presente trabalho foi por mim realizado e o mesmo resulta de pesquisas bibliográficas, e experiências laboratorias.

O tratamento de dados, discussão e interpretação de resultados foram feitos por mim.

Maputo, ____ de _____ de 2024

O autor

(Enoque Fernando Machava)

Dedicatória

Aos Meus Pais:
Fernando Machava (em memória)
Adelina Fastudo Mabui

Aos meus irmãos:
José Fernando Machava (em memória)
E a todos meus irmãos em vida.

Por tudo que eles representam na minha
vida, por toda ajuda durante o meu percurso
acadêmico.

O presente trabalho, dedico.

Agradecimentos

Agradeço ao meu Deus fiel, poderoso, vivo, infinito, misericordioso, glaciioso, e compassivo. Por ter me dado a vida, por cuidar de mim, pelo amor, pela graça, por ter me sustentado e me ajudado a superar todos os obstáculos e dificuldades que se levantaram durante o meu percurso acadêmico. Meu entendimento e reconhecimento é de que sem ele não teria chegado aqui.

Aos meus pais Fernando Machava (em memória), e Adelina Fastudo Mabui agradeço por me terem nascido, por terem cuidado de mim desde pequeno. Em especial agradeço a minha mãe que sozinha cuidou de mim após a morte de meu pai, e por continuamente orar por mim.

Agradeço a minha Supervisora Prof^a.Doutora Eng^a. Maida Abdulssatar Khan, a minha co-supervisora Mestre Asmina Sulemane, Eng^a. pela orientação, apoio, dedicação, paciência, conhecimento transmitido e por todos recursos por elas disponibilizados que tornaram leve e possível a realização deste trabalho. Este agradecimento estende-se também ao Prof.Dr.Eng^o Borges Chambal pela ajuda no manuseio do Spray-Dryer, à dra. Cândida, dra. Nazira, Eng^a Virgínia, e a dra. Victória pela ajuda, partilha de experiência, conhecimento e pela disponibilização de material de trabalho laboratorial.

Aos meus irmãos José Fernando Machava (em memória), Nataniel, Dionísio, Efigénia, Lídia, Caró, Rogério, às minhas cunhadas Celeste, Salmina e Reginalda e a toda família Machava agradeço pela ajuda durante o meu percurso acadêmico, pela atenção e suporte a todos níveis.

Aos irmãos da Igreja Evangélica Assembleia de Deus Maxaquene C agradeço pelas orações, ensinamento e por terem me ensinado a ser uma pessoa de valor.

Aos meus amigos Arcénio Bila, Feliz Wate, e a todos meus colegas de turma agradeço pelo apoio.

Resumo

A cor é um atributo muito importante nos alimentos, sendo um dos factores que ajuda na tomada de decisão no momento da escolha de um produto alimentar. Por causa disso, as indústrias têm envergado esforços no aperfeiçoamento ou restauração da cor perdida durante o processamento. Durante anos, têm sido usados corantes artificiais para colorir ou restaurar a cor dos alimentos por causa da sua fácil produção e estabilidade. Porém estudos revelam uma desvantagem de sua aplicação à saúde humana, facto que tem fomentado a procura por pigmentos de origem natural, que além da capacidade de tingimento, possam agregar valor nutricional e funcional aos alimentos.

Um estudo sobre a produção de corante natural em pó através de cálices de *Hibiscus Sabdariffa L.* foi realizado, tendo sido feita a caracterização físico-química dos cálices em termos de humidade, cinzas, sólidos solúveis, actividade da água, proteínas, fibra alimentar, pH, e Cor. Foi também feita a avaliação do rendimento da atomização, compostos bioactivos (antocianinas totais, taninos, vitamina C, fenóis totais, e flavonóides totais), bem como a sua actividade antioxidante, estabilidade ao pH e temperatura.

A avaliação dos compostos bioactivos deu teores entre 491,55 a 573,4 (mg/100g) para as antocianinas; 2427,87 (mgEAG/100g) para fenóis totais; 169 (mg/100g) para taninos; 1204,64 (mg/100g) de flavonóides totais; e vitamina C igual a 97,6812 mg/100g. A avaliação do potencial antioxidante deu melhores resultados pelo método DPPH tendo apresentado valores entre 155503,44 a 166815,52 (μM Trolox/g) enquanto que o método ABTS deu valores entre 43980,93 a 60587,81 (μM Trolox/g) dependendo do tipo de amostra. O rendimento da atomização foi de 27,4370%, quanto a estabilidade ao pH, apresentou-se estável entre pH 1 a 7, o aquecimento provocou degradação da cor em comparação com a cor de extractos dos cálices frescos.

Palavras-Chave: *Hibiscus Sabdariffa L.*, Corante natural, capacidade antioxidante, compostos funcionais.

ÍNDICE

Dedicatória.....	i
Agradecimentos.....	ii
Resumo	iii
Lista de Símbolos e abreviaturas.....	viii
Lista de figuras	ix
Lista de tabelas.....	x
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Justificativa.....	2
1.2 Objectivos.....	3
1.2.1 Objectivo geral	3
1.2.2 Objectivos Específicos	3
1.3 Metodologia.....	4
1.3.1 Pesquisa bibliográfica.....	4
1.3.2 Aquisição da matéria-prima.....	4
1.3.3 Parte experimental	4
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 Propriedades fitoquímicas	6
2.2 Propriedades Medicinais	7
2.3 Composição química dos cálices secos de <i>H. Sabdariffa L.</i>	7
2.4 Corantes.....	8
2.4.1 Corantes Naturais	9
2.4.1.1 Importância dos corantes nos alimentos.....	9
2.4.1.2 Estabilidade de corantes naturais.....	10
2.5 Propriedades Físico-químicas	11
2.5.1 Humidade.....	11
2.5.2 Cinzas	11

2.5.3	Vitamina C (Ácido ascórbico)	11
2.5.4	Fibra alimentar	12
2.5.5	Actividade da água	12
2.5.6	Proteína.....	12
2.5.7	Cor.....	13
2.5.7.1	Quantificação da Cor	14
2.6	Compostos Bioactivos	16
2.6.1	Polifenóis e Flavonóides.....	16
2.6.2	Antocianinas.....	18
2.6.2.1	Extracção de antocianinas.....	20
2.6.2.2	Estabilidade das antocianinas	21
2.6.2.3	Influência da estrutura e dos substituintes químicos na estabilidade das antocianinas.....	21
2.6.2.4	Influência do pH nas moléculas de antocianinas	22
2.6.2.5	Influência da temperatura na degradação das antocianinas.....	23
2.6.3	Taninos.....	24
2.7	Actividade Antioxidante e Radicais Livres	25
2.7.1	Métodos de determinação da actividade antioxidante.....	26
2.7.2	Método de sequestro do radical livre DPPH.....	27
2.7.3	Método ABTS	28
2.8	Secagem por atomização.....	29
2.8.1	Etapas do processo de secagem por atomização.....	29
3	PARTE EXPERIMENTAL	31
3.1	Fluxograma do processo	33
3.2	Preparação da matéria-prima.....	34
3.3	Determinação de Características físico-químicas da matéria- prima.....	34

3.3.1	Determinação de Humidade.....	34
3.3.2	Determinação do teor de cinzas.....	35
3.4	Secagem por Liofilização	35
3.5	Secagem por atomização.....	36
3.5.1.1	Preparação do extracto.....	36
3.6	Rendimento da secagem por atomização	39
3.6.1	Determinação da cor da amostra fresca e dos produtos.....	40
3.6.2	Determinação da vitamina C ou ácido L-ascórbico.	40
3.6.3	Determinação de fibra bruta	41
3.6.4	Determinação do teor de Proteínas.....	41
3.6.5	Determinação de pH.....	41
3.6.6	Determinação de Brix (sólidos solúveis).....	42
3.6.7	Determinação do teor de Antocianinas e Flavonóides	42
3.6.8	Quantificação de compostos fenólicos totais.....	42
3.6.9	Determinação do conteúdo de taninos	43
3.6.10	Determinação da capacidade antioxidante dos produtos ..	44
3.6.10.1	Método DPPH.....	44
3.6.10.2	Método ABTS.....	45
3.7	Determinação da estabilidade do corante a variações do pH ...	46
3.8	Avaliação da estabilidade do corante a Temperatura.	47
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1	Caracterização físico-química do <i>Hibiscus Sabdariffa L</i>	47
4.2	Rendimento da Atomização	52
4.3	Compostos Bioactivos e Actividade Antioxidante.....	54
4.3.1	Antocianinas.....	54
4.3.2	Compostos fenólicos totais.....	56
4.3.3	Flavonóides totais	56

4.3.4	Vitamina C (ácido ascórbico).....	57
4.3.5	Taninos.....	57
4.3.6	Actividade antioxidante.....	58
4.4	Estabilidade do corante ao pH e temperatura	59
5	CONCLUSÕES.....	62
6	RECOMENDAÇÕES	63
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

Lista de Símbolos e abreviaturas

- %PB – percentagem de proteína bruta
- ABTS – ácido 2,2-azino-bis (3-etilbenzenotiazoline-6-ácido sulfônico)
- AF – amostra fresca
- AOxH – actividade antioxidante hidrofílica
- AOxL – actividade antioxidante lipofílica
- AOxT – actividade antioxidante total
- a_w - actividade da água
- CFT – compostos fenólicos totais
- DEQUI – Departamento de Engenharia Química
- DPPH – 2,2-difenil-1-picril-hidrazina
- EAG – equivalente de ácido gálico
- EtOH – etanol
- FD – factor de diluição
- FRAP – potencial antioxidante de redução do ião férrico
- H.* – Hibiscus
- H₂SO₄ – ácido sulfúrico
- IAL – Instituto Adolfo Lutz
- KOH – hidróxido de potássio
- MeOH – metanol
- mg/100g – miligrama por 100 gramas da amostra
- Na₂CO₃ – carbonato de sódio
- NaOH – hidróxido de sódio
- nm – nanómetro
- SA – secagem por atomização
- SE – secagem na estufa
- SL – secagem por liofilização
- TEAC – actividade antioxidante equivalente de Trolox (Trolox Equivalent Antioxidant Activity)
- Trolox – *6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid*
- UEM – Universidade Eduardo Mondlane
- UV – ultravioleta

Lista de figuras

Figura 1: <i>Hibiscus Sabdariffa L.</i>	6
Figura 2: Imagens ilustrativas de alguns produtos produzidos a base de Roselle (<i>Hibiscus Sabdariffa L.</i>)	8
Figura 3: Espaço de cores CIELab, representada em três dimensões.	14
Figura 4: Espaço de cores L*C*h.	15
Figura 5: Estrutura dos flavonóides.....	17
Figura 6: Estrutura geral das antocianinas. Fonte: Sindi (2013).....	18
Figura 7: Ilustração das posições de Carbono na estrutura das antocianinas.	22
Figura 8: Equilíbrio de algumas antocianinas.....	23
Figura 9. Estrutura de taninos hidrossolúveis.....	24
Figura 10: Estrutura de taninos condensados (em destaque uma unidade de catequina).....	25
Figura 11: Estabilização do radical livre	28
Figura 12: Redução do ABTS*+ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.	28
Figura 13: Representação esquemática do Spray dryer (adaptado).	31
Figura 14: Etapas do processo experimental.	33
Figura 15: Pré-tratamento da matéria-prima. A) Descasque, B) Fruto contendo sementes e C) Cálices de <i>H. Sabdariffa</i> (parte de interesse).....	34
Figura 16: Secagem por liofilização de <i>Hibiscus sabariffa L.</i>	35
Figura 17: Tall Form Spray Dryer FT80/81 usado na secagem por atomização.	37
Figura 18: Ilustração do colorímetro e algumas amostras usadas na medição da cor.	40
Figura 19: Pós obtidos nos 3 tipos de secagem.....	51
Figura 20: Ilustração da adesão do pó às paredes do equipamento.....	52
Figura 21: Comparação do teor de antocianinas das três amostras.	55
Figura 22: Gráfico comparativo dos resultados da Actividade antioxidante total pelos métodos ABTS e DPPH.....	58
Figura 23: Resultado da análise da estabilidade a variações de pH.	60
Figura 24: Comparação da cor entre amostra aquecida e não aquecida.	61

Lista de tabelas

Tabela 1: composição físico-química do H. Sabdariffa L.	7
Tabela 2: Diferenças estruturais entre as classes de flavonóides.....	18
Tabela 3:Tipos de Antocianinas e cores produzidas.	19
Tabela 4: Variáveis que influenciam a secagem por atomização.....	30
Tabela 5: Lista dos materiais, reagentes e equipamentos usados na realização das experiências.	32
Tabela 6: Parâmetros de secagem usados no Spray Dryer	36
Tabela 7: Propriedades físico-químicas do Hibiscus Sabdariffa L.....	47
Tabela 8: Resultados da determinação da Cor.	50
Tabela 9: Resultados da quantificação dos compostos Bioactivos e Actividade antioxidante.	54

1 INTRODUÇÃO

A aparência dos alimentos é um factor importante para a selecção e escolha de um Produto alimentício, exercendo influência na aceitação ou rejeição pelo consumidor. Embora a alimentação devesse depender apenas do valor nutricional, a cor, o aroma e textura são também factores que conduzem a aceitação (Granato & Masson, 2010). O aspecto visual é a primeira característica a ser julgada, sendo a coloração o atributo sensorial que mais desperta a atenção de determinado alimento, exercendo importante indução a preferência (Cortez, 2017). Porém, muitos produtos alimentícios não são naturalmente coloridos, ou tem a estrutura dos pigmentos presentes alterada durante o processamento devido a factores ambientais ou do próprio alimento como pH, temperatura e presença de oxigênio. Assim, as indústrias de alimentos recorrem ao uso de corantes para atender as expectativas dos consumidores, que usualmente associam a cor com a qualidade do produto (Schumann *et al.*, 2008).

Nos últimos tempos, tem havido um interesse acentuado e crescente por alimentos naturais, especificamente aqueles ricos e/ou elaborados com substâncias de origem vegetal. Esses alimentos são chamados de alimentos funcionais, definidos como aqueles que contêm níveis significativos de componentes biologicamente activos, principalmente vitaminas, ácidos polifenólicos, flavonóides e antocianinas, que podem fornecer benefícios específicos à saúde humana além dos nutrientes tradicionais (Hasler, 2002). Investigações científicas têm focado na identificação de substâncias biologicamente activas presentes nos alimentos com potencial de melhorar a condição física e mental dos seres humanos, assim como reduzir o risco de doenças.

A realização deste trabalho consiste na produção de um corante natural extraído de cálices de *Hibiscus Sabdariffa L.*, como forma de valorizar e incentivar o uso de corantes de origem natural que para além de conferir cor quando são aplicados, proporcionam também benefícios à saúde, dada a sua

baixa toxicidade e também a sua riqueza em substâncias activas que protegem o organismo humano contra vários tipos de doenças.

1.1 Justificativa

Do ponto de vista industrial os corantes orgânicos sintéticos são os mais utilizados, pois apresentam vantagens tecnológicas, que muitas vezes não são possíveis de serem obtidas utilizando corantes naturais. A maioria dos corantes artificiais apresenta alta estabilidade durante o processamento e armazenamento, não degradando facilmente na presença da luz, oxigênio, calor e acidez. Além do custo de produção ser relativamente baixo quando comparado com os corantes naturais (Santos, 2017).

No entanto, a utilização de corantes artificiais nos alimentos tem sido questionada devido a sua toxicidade. Alguns estudos mostram evidências de seus efeitos no desenvolvimento de reacções alérgicas como por exemplo a tartrazina (Santos, 2017; Stringheta, 2021).

Os corantes naturais mostram-se vantajosos por serem pigmentos extraídos de fontes naturais renováveis, como folhas, flores e frutas, apresentando assim, baixa toxicidade e menor risco à saúde dos consumidores. Paralelamente, os pigmentos naturais apresentam substâncias funcionais, que previnem ou até mesmo, auxiliam no tratamento de enfermidades, o caso por exemplo de antocianinas e carotenóides que possuem acção antioxidante (Santos, 2017).

O *Hibiscus Sabdariffa L.* para além de possuir propriedades antioxidantes tem um valor representativo de antocianinas (pigmento responsável pelo vermelho do Hibisco), vitamina C e polifenóis, é utilizado como planta medicinal e alimento funcional (Elisângela, 2013).

1.2 Objectivos

1.2.1 Objectivo geral

- ✚ Produzir corante natural em pó através da secagem por atomização de extractos de cálices de *Hibiscus sabdariffa L.*, avaliar a sua estabilidade e capacidade antioxidante.

1.2.2 Objectivos Específicos

- ✚ Determinar as características físico-químicas dos cálices de *H. Sabdariffa L.*;
- ✚ Avaliar o efeito dos diferentes métodos de secagem na retenção da cor, antocianinas e actividade antioxidante total;
- ✚ Quantificar o conteúdo total dos compostos fenólicos, flavonóides, antocianinas, taninos, e antioxidantes dos cálices de *H. Sabdariffa L.*;
- ✚ Produzir corante natural em pó através da secagem por atomização;
- ✚ Determinar a capacidade antioxidante do pó de cálices de *H. Sabdariffa L.* Pelos métodos ABTS e DPPH; e
- ✚ Analisar a estabilidade do corante em função do pH e temperatura.

1.3 Metodologia

Para o alcance dos objectivos traçados seguiu-se a seguinte metodologia:

1.3.1 Pesquisa bibliográfica

A pesquisa bibliográfica consistiu na pesquisa, sistematização de informações (livros, artigos, trabalhos de licenciatura e dissertações de mestrado) relacionadas com o tema.

1.3.2 Aquisição da matéria-prima

As amostras usadas neste trabalho são cálices da flor de *Hibiscus Sabdariffa L.* colhidas no distrito de Marracuene, província de Maputo. Os materiais e reagentes necessários foram fornecidos pelo Departamento de Engenharia Química da UEM.

1.3.3 Parte experimental

Os cálices passaram por um pré-processamento de forma a retirar os resíduos nelas presentes, e dividiu-se a amostra em duas partes. A primeira foi submetida a secagem na estufa e triturada para obter-se o pó, a segunda parte foi congelada e submetida a secagem por liofilização e depois triturada para obter-se o pó. O extracto para a atomização foi obtido através da extracção sólido-líquido de folhas secas por liofilização e trituradas, para maximizar o teor de sólidos solúveis e a área de transferência de massa conforme recomendado na literatura. Para a extracção, usou-se água destilada como solvente extractor. Ao extrato obtido foi adicionado amido de milho e depois atomizado em Spray-dryer para obter-se o pó, e seguiu-se às análises físico-químicas em termos de cor, vitamina C, antocianinas totais, flavonóides totais, compostos fenólicos, taninos, teor de antioxidantes, e estabilidade do corante ao pH e temperatura.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O *Hibiscus Sabdariffa L.* é uma planta pertencente à família malvaceae, é nativo da Ásia ou em zonas tropicais da África. A planta é amplamente cultivada em trópicos como África, Brasil, Austrália, Estados Unidos da América, Ásia (Shruthi, *et al.*, 2016). Tem diferentes nomes em diferentes países, No Brasil é conhecido como Vinagreira ou Hibisco; no Reino Unido e nos Estados Unidos da América como Rosela; na França como, L'Oseille; flor-de-Jamaica, na Espanha e no México; Karkade, no Sudão e Arábia segundo (Morton, 1987).

Caracteriza-se como arbusto de ciclo anual, de modo erecto, ramificado e que pode atingir mais de 1,80m de altura, e o cálice possui formato de taça com tonalidade vermelha (McCaleb *et al.*, 1998). Dentro encontra-se a cápsula e o fruto que possui cerca de 2 cm de comprimento e que abriga as sementes (Duke, 1978).

Segundo estudo feito por Martins (1985), a planta não resiste a baixas temperaturas, sendo que a mínima tolerada varia de 7 a 10°C e é cultivada em regiões tropicais e subtropicais. Requer distribuição de chuva entre 800 a 1600 mm e temperaturas entre 18 a 35°C.

Shruthi *et al.*, (2016) descreveram o *H. Sabdariffa L.* como uma planta tropical de considerável potencial económico. Os seus cálices tem sido sugeridos como corantes alimentares para indústria de alimentos, emulsificante para bebidas carbonatadas, produção de Jam, sumos e outros alimentos naturais.

O Hibisco é considerado um alimento funcional dado ao alto teor de vitamina C, antocianinas, beta-caroteno, licopeno, polifenóis e outros antioxidantes solúveis em água. Estudos feitos por Prenesti (2007) comprovam os benefícios à saúde associados ao consumo de produtos derivados do Hibisco, devido ao potencial antioxidante associado ao teor de antocianinas, vitamina C e polifenóis.

A acção antioxidante do Hibisco é amplamente influenciada por factores genéticos, adubação, condições ambientais, além do grau de maturação e variedade da planta, entre outros. A nutrição das plantas é afectada directamente pela composição do substrato utilizado, pelos níveis de nutrientes disponíveis e conforme a quantidade de adubo adicionado (Prenesti, 2007).

A figura 1 apresenta imagens ilustrativas do *Hibiscus Sabdariffa L.*, onde é possível ver o hibisco colhido do campo, Imagem a), hibisco após um pré-tratamento, imagem b) e por fim na imagem c) ilustra-se a parte interna da flor.

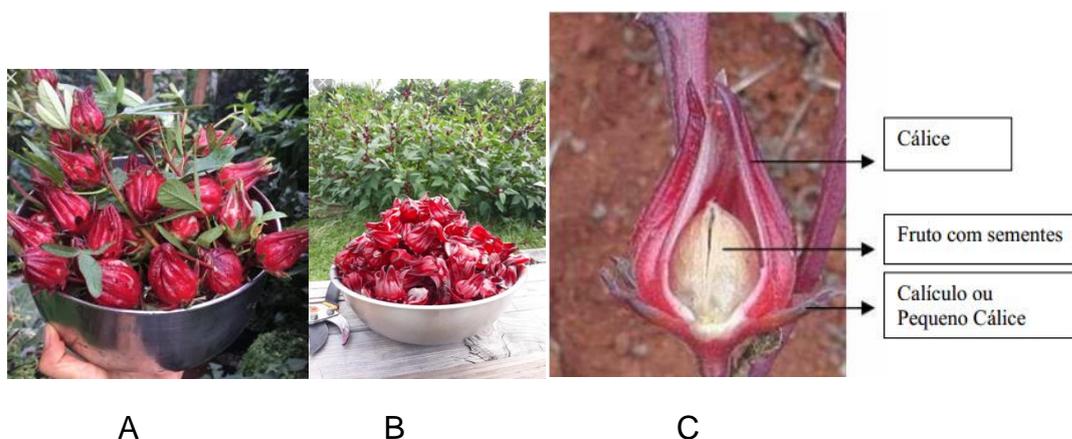


Figura 1: *Hibiscus Sabdariffa L.*

🚧 Imagens (A e B), Fonte: Gardens of wendland, disponível em:

<https://wendiland.com/products/roselle-hibiscus-seeds>.

🚧 Imagem (C) fonte: (Elisângela, 2013)

2.1 Propriedades fitoquímicas

Rosela é rica em antocianinas e ácidos orgânicos. Os cálices secos contêm flavonóides, as sementes de Rosela são uma boa fonte de antioxidantes lipossolúveis particularmente γ -tocoferol (Mohamed *et al.*, 2012). O teor de antocianinas de *Hibiscus Sabdariffa L.* em cinco cepas de planta atingiu 1,7% a 2,5% do peso seco durante o crescimento do cálice (Khafaga, 1980). Os cálices de *Hibiscus sabdariffa L.* contêm grande quantidade de ácidos orgânicos, nomeadamente: ácido cítrico, ácido málico, ácido tartárico e hibisco ácido

protocatecuico (Kerharo,1971). O conteúdo ácido dos cálices aumenta durante o crescimento e diminui quando atinge a maturidade ou amadurece. O extracto aquoso de cálices de *H. Sabdariffa L.* tem uma pigmentação vermelha muito rica devido a presença de antocianinas e as propriedades de cor têm sido objecto de intensa investigação científica (Ali *et al.*, 2005).

2.2 Propriedades Medicinais

A planta *Hibiscus Sabdariffa L.*, é anti-hipertensivo, antisséptico, sedativo, diurético, digestivo, purgativo, emoliente e adstringente (Odigie *et al.*, 2003). Os cálices são usados para tratar doenças cardiovascular, hipertensão, e leucemia. As flores e frutos são usados no tratamento de tosse e bronquite (Margesi *et al.*, 2013). As antocianinas presentes em Roselle são: Delfinidina 3-sambubiosídeo, cianidina 3-sambubiosídeo, delfinidina 3-glucosídeo e cianidina 3-glucosídeo. Contribuem com benefícios para a saúde como uma boa fonte de antioxidantes, bem como corantes alimentares naturais (Kilima *et al.*, 2014). De acordo com muitos autores, as antocianinas inibem o crescimento de células cancerígenas humanas e a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade. Portanto, a adição de antocianinas naturais como corantes alimentares não apenas aumentaria o valor decorativo dos alimentos, mas também melhoraria suas propriedades benéficas a saúde.

2.3 Composição química dos cálices secos de *H. Sabdariffa L.*

A tabela 1 mostra a composição química dos cálices de *H. Sabdariffa L.* encontrados na literatura.

Tabela 1: composição físico-química do *H. Sabdariffa L.*

Nr.	Componentes	Mohamed <i>et al.</i> , (2012) (Cálices secos)	Islam <i>et al.</i> , (2021) (Cálices frescos)
1	Humidade (%)	11.00	85,60
2	Proteína Bruta (%)	7.88	1,15

3	Fibra Bruta (%)	13.20	12
4	Gordura Bruta (%)	0.16	2,61
5	Cinzas (%)	10.60	6,90
6	Carboidratos Totais (%)	57.16	10
7	Ácido ascórbico (mg/100g)	11.00	54
8	Acidez Titulável (mg/100g)	9.00	_____
9	Sólidos solúveis totaisl (%)	5.00	_____
10	Cálcio (mg/100g)	60.00	12,63
11	Ferro (mg/100g)	25.00	8,98

Fonte: Adaptado de (Mohamed *et al.*, 2012; Islam *et al.*,2021)

O *Hibiscus sabdariffa L.* tem sido usado na produção de vários produtos alimentares como Chá, sumos, Jams, vinhos, corantes naturais, entre outros (Islam *et al.*, 2021).

A figura 2 ilustra alguns produtos produzidos à base de *Hibiscus Sabdariffa L.*



A - Saquinhos Chá

B - Chá

C - Xarope

D- Sumo de
folhas secas

E - Jam

Figura 2: Imagens ilustrativas de alguns produtos produzidos a base de Roselle (*Hibiscus Sabdariffa L.*)

Fonte: Islam *et al.*, 2021.

2.4 Corantes

Corantes são substâncias químicas obtidas a partir de fontes naturais ou de maneira sintética, de origem orgânica ou inorgânica, e empregadas para colorir substratos diversos (Zanoni & Yamanaka, 2016). Nesse sentido, corantes

alimentares podem ser definidos como toda substância que quando adicionada confere, intensifica ou restaura a cor de um alimento. No entanto, para a adição de corantes aos alimentos devem ser consideradas razões tecnicamente válidas, como por exemplo, restaurar a cor perdida no processamento e preservar a identidade natural do produto, ou para servir como um indicador visual de qualidade (Brasil, 1997).

2.4.1 Corantes Naturais

Santos (2017) define corante natural como aquele que é obtido a partir de vegetal, ou eventualmente, de animal, cujo princípio corante tenha sido isolado com o emprego de processo tecnológico adequado.

2.4.1.1 Importância dos corantes nos alimentos

Na maioria das vezes, a cor é o primeiro atributo básico de percepção sensorial do consumidor no momento de escolha de um produto alimentício e comumente é associada com a qualidade do alimento, com seu frescor, grau de maturação e nível de desidratação (Freitas & Stringheta, 2021).

Os corantes são usados para manter atraente a cor do alimento, mesmo após o seu processamento, e, ou, para reforçar sua coloração natural. Tecnicamente falando, um corante é uma substância ou uma mistura de substâncias, que possuem a propriedade de conferir ou intensificar a coloração do alimento (Freitas & Stringheta, 2021).

Freitas & Stringheta (2021) acrescentam que os corantes naturais têm sido explorados, não somente por conferir cor aos alimentos, mas também por estarem associados a benefícios à saúde, principalmente na prevenção de várias doenças crônicas causadas pelo estresse oxidativo. Isso se deve ao facto de apresentarem elevada capacidade antioxidante, actividade antimicrobiana, antiviral, anti-inflamatória, cardioprotetora e anticancerígena.

2.4.1.2 Estabilidade de corantes naturais

Muitas vezes há desafios associados à incorporação de corantes naturais em alimentos e bebidas, por causa de suas características de solubilidade e devido à baixa estabilidade química. De maneira geral, operações de processamento como tratamento térmico, desidratação prolongada, congelamento, moagem, dentre outros, têm efeito significativo sobre a cor dos alimentos coloridos por pigmentos naturais.

O conhecimento sobre a estrutura química desses pigmentos naturais e seu comportamento em diferentes processos, além do desenvolvimento de novas tecnologias de estabilização e incorporação, têm tornado cada vez mais viável a aplicação industrial destes como corantes (Freitas & Stringheta, 2021).

Carotenoides, por exemplo, possuem geralmente boa estabilidade durante o processamento e armazenamento de frutas e vegetais. Contudo, a presença de alta actividade enzimática é um problema tecnológico na produção de sucos com alto teor de carotenoides. Já a aplicação de betalaínas extraídas de beterraba depende do pH, luz, presença de oxigênio e actividade de água, apresentando menor taxa de degradação por reacções hidrolíticas no armazenamento em baixos valores de actividade de água (Castellar, *et al.*, 2003).

Em alimentos contendo clorofila, pode ocorrer danos ao pigmento desde o processamento térmico brando como o branqueamento, até aos tratamentos mais potentes como a esterilização comercial, com uma degradação mais considerável que pode chegar à perda total do pigmento (Khachik, 1992; MinguetsMosquera & JarensGalan, 1995; Stinco, 2019).

A aplicação de corantes de antocianinas em alimentos mais ácidos confere maior estabilidade principalmente durante o armazenamento deste pigmento apesar das antocianinas apresentarem baixa estabilidade ao calor prolongado originando compostos de degradação de cor escura, em condições

de pasteurização rápida (HTST – do inglês High Temperature and Short Time) esse efeito é diminuído. (Freitas & Stringheta, 2021).

2.5 Propriedades Físico-químicas

2.5.1 Humidade

A humidade representa a água contida no alimento, pode ser classificada em humidade de superfície, que refere-se à água livre ou presente na superfície externa do alimento, facilmente evaporada e humidade absorvida, referente à água ligada, encontrada no interior do alimento, sem combinar quimicamente com o mesmo (IAL, 2008).

2.5.2 Cinzas

As Cinzas ou resíduo por incineração é o nome dado ao resíduo obtido por aquecimento de um produto em temperatura próxima a (550-570°C). Nem sempre este resíduo representa toda substância inorgânica presente na amostra, pois alguns sais podem sofrer redução ou volatilização nesse aquecimento (IAL, 2008).

2.5.3 Vitamina C (Ácido ascórbico)

A **vitamina C** é um nutriente essencial para o corpo humano, sendo responsável por diversas funções importantes, como fortalecer o sistema imunológico, combater os radicais livres (função antioxidante) e ajudar na absorção de ferro (Batistuzzo *et al.*, 2006). É um activo encontrado em diversos alimentos, principalmente em frutas cítricas como laranja, limão e acerola. Além disso, a vitamina C é frequentemente utilizada como suplemento alimentar para prevenir e tratar doenças, como resfriados e gripes, além de contribuir para a saúde da pele.

2.5.4 **Fibra alimentar**

A definição mais aceite, para fins analíticos, é a que define as fibras, considerando os aspectos fisiológicos, como polissacarídeos (excepto amido) e lignina que não são digeridos pelo intestino delgado humano. De acordo com a sua solubilidade, as fibras podem ser classificadas em fibras solúveis, as que são responsáveis pelo aumento da viscosidade do conteúdo gastrointestinal, retardando o esvaziamento e a difusão de nutrientes, incluem as gomas, mucilagens, a maioria das pectinas e algumas hemiceluloses. E fibras insolúveis, as que diminuem o tempo de trânsito intestinal, aumentam o peso das fezes, tornam mais lenta a absorção da glicose e retardam a digestão do amido; Incluem a celulose, lignina, hemicelulose e algumas pectinas IAL (2008).

2.5.5 **Actividade da água**

Segundo Ditchfield (2000) a actividade da água é um parâmetro que representa o grau de disponibilidade de água livre num alimento, esta que propicia o desenvolvimento de micro-organismos. É actualmente considerado o principal factor de estabilidade e controlador de crescimento de micro-organismos deterioradores e causadores de infecções e intoxicações alimentares.

2.5.6 **Proteína**

De acordo com o descrito pela ILA (2008), a determinação de protídeos baseia-se na determinação de nitrogênio, geralmente feita pelo processo de digestão de Kjeldahl. Este método, idealizado em 1883, tem sofrido numerosas modificações e adaptações, porém sempre se baseia em três etapas: digestão, destilação e titulação. A matéria orgânica é decomposta e o nitrogênio existente é finalmente transformado em amônia.

2.5.7 Cor

Freitas & Stringheta (2021) definem cor como a sensação provocada pela luz sobre o órgão da visão, segundo a própria natureza da luz ou de acordo com a maneira pela qual é refletida pelos corpos.

Para Camargos & Gonzalez (2001), a cor pode ser definida como a propriedade dos corpos em absorver e refletir luz, e tem como atributos principais o matiz, a luminosidade e a saturação. É o aspecto gerado pelas percepções do órgão visual em radiação electromagnética visível de comprimento de onda entre 370 nm (violeta) e 750 nm (vermelho), sendo comum afirmar-se por aproximação que os comprimentos de onda desta faixa localizam-se entre os 400 a 700nm e frequências entre 400 THz e 790 THz, determinada basicamente pela fonte de luz e a superfície refletora.

As cores dos alimentos promovem sensações no consumidor que podem afectar seu julgamento em relação ao sabor, bem como sua decisão de consumir ou não esses alimentos, portanto, as cores podem ser usadas como elementos estratégicos para chamar atenção do consumidor (Freitas & Stringheta, 2021). Os publicitários desenvolvem propagandas manipulando as cores nas embalagens dos alimentos com a intenção de despertar maior atenção do consumidor.

Na gastronomia, as cores podem actuar de modo distinto como estimulantes ou supressoras do apetite, além de ressaltar ou mascarar características dos alimentos como sabor, doçura e acidez.

É importante ressaltar que, na indústria de alimentos, a cor tem se tornado cada vez mais importante em termos de como os alimentos são exibidos e vendidos e, portanto, é um parâmetro indicativo usado no controle de qualidade pelos consumidores. Assim, fica claro que a cor é elemento decisivo na escolha e no consumo de inúmeros produtos alimentícios disponíveis nos mercados (Freitas & Stringheta, 2021).

2.5.7.1 Quantificação da Cor

A cor pode ser medida por espectrofotômetros ou colorímetros, sendo o colorímetro menos preciso pois avalia a cor do objecto da mesma forma que o ser humano percebe ao passo que o espectrofotômetro determina o espectro de reflectância da amostra, avaliando a cor de forma mais complexa e precisa. Foram instituídos vários sistemas de cores, como o CIE Lab, Hunter Lab e Adobe RGB “Red Green Blue” (Mate, 2022).

O sistema de cores CIE $L^*a^*b^*$ (CIELab) é constituído pelos seguintes parâmetros que definem a cor: L^* , a^* e b^* . São três coordenadas, onde L^* é referente à luminosidade do objecto a ser avaliado, podendo variar do preto ao branco, a^* é a medida do croma no eixo vermelho-verde e b^* é a medida do croma no eixo amarelo-azul. Assim, as informações poderão estar disponíveis como $L^*a^*b^*$, valor, croma e tonalidade ou matiz (Takatsui, 2011).

A figura 3 mostra o sistema de cor CIELab definindo em três eixos perpendiculares – L^* eixo principal (preto = 0 ao branco = 100); a^* (verde (-) ao vermelho (+)) e b^* (azul (-) ao amarelo (+)).

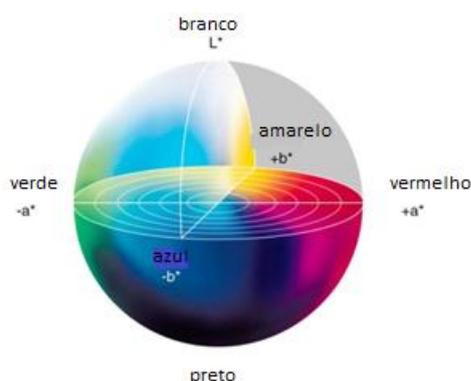


Figura 3: Espaço de cores CIELab, representada em três dimensões.

Fonte: (Minolta, 2016)

O espaço $L^*C^*h^0$ é um espaço de coordenadas representado por luminosidade (L^*), como no espaço $L^*a^*b^*$, cromaticidade (C^*) e ângulo hue (h^0)

A luminosidade é a escala que varia do preto (0) ao branco (100). As coordenadas polares C^* definidas como sendo a saturação, e h° , que é o ângulo tomado no espaço $L^*C^*h^\circ$. A saturação, C^* , é definida como a distância radial do centro do espaço até o ponto da cor. No centro do espaço $L^*C^*h^\circ$, estão os valores mínimos de saturação e, à medida que se caminha para as extremidades, aumenta-se este valor (Parhare *et al.*, 2013).

A saturação está ligada directamente à concentração do elemento corante e representa um tributo quantitativo para intensidade. Quanto maior o croma maior a saturação das cores perceptíveis aos humanos (Parhare *et al.*, 2013). Croma representa a hipotenusa de um triângulo retângulo criado pela união dos pontos (0, 0), (a^* , b^*), e (a^* , 0) (McGuire, 1992). Graficamente consideramos o ângulo de 0° como a cor vermelha, o ângulo de 90° , amarelo, o ângulo de 180° , verde, e o ângulo de 270° , azul (Swewfelt *et al.*, 1988). Por meio do ângulo é possível comparar amostras.

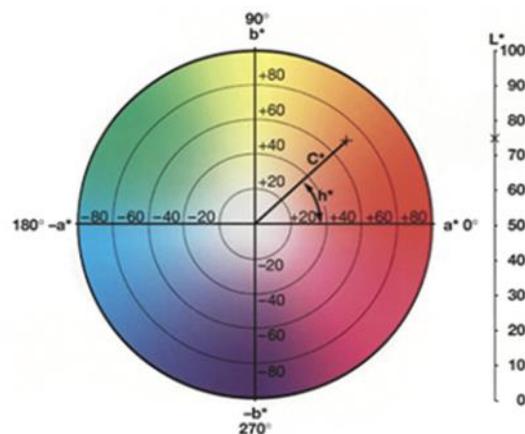


Figura 4: Espaço de cores L^*C^*h .

Fonte: (Ferreira & Spricigo, 2001)

Alguns conceitos importantes relacionados com a cor como o Matiz, luminosidade ou brilho, saturação e croma foram propostos por Freitas & Stringheta (2021).

Matiz ou tonalidade: é o nome da cor. Refere-se à característica que permite diferenciar visualmente uma cor da outra. Define-se pela qualidade da

luz predominante que a superfície reflete, ou seja, pelos comprimentos de onda que predominam na luz que refletem. Ela é representada pelo símbolo h (do inglês, hue) e está associada aos comprimentos de onda do espectro visível. Por exemplo, há muitos azuis, mais luminosos ou mais escuros (Parhare *et al.*, 2013). Eles podem diferir em luminosidade mas pertencem ao mesmo matiz: azul.

Luminosidade ou brilho: Caracteriza o grau de claridade da cor, indicando se é clara ou escura. Ela varia do preto ao branco e está relacionada à forma com que vemos as diferenças relativas à presença de luz branca, não apresentando relação com o tipo de fonte ou intensidade de luz empregada. É representada pelo símbolo L (do inglês, lightness) e também pode ser referida como value (Parhare *et al.*, 2013).

Saturação: Define a intensidade ou quantidade de uma tonalidade, indicando a proporção em que ela está misturada ao branco, preto ou cinza. Pode ser denotada como pureza da cor e é a qualidade que nos permite diferenciar cores fortes ou fracas, ou cores vivas ou opacas. Baixos valores de saturação denotam cores pálidas ou acinzentadas, enquanto altos valores denotam cores saturadas (Parhare *et al.*, 2013). É representada pelo símbolo C (do inglês, Chroma).

Croma: é semelhante à saturação e é essencialmente a intensidade ou vivacidade da cor.

2.6 Compostos Bioactivos

2.6.1 Polifenóis e Flavonóides

Os polifenóis podem ser definidos como compostos complexos com dois ou mais anéis aromáticos anexados (Sindi, 2013). São encontrados em diferentes partes de todas as plantas como frutas, legumes, nozes e flores. Os polifenóis podem ser classificados dependendo de suas estruturas químicas, em 10 categorias. A família dos polifenóis encontrados em plantas incluem ácidos

fenólicos, flavonóides, estilbenos, e 30% dos ácidos fenólicos totais da dieta (Sindi, 2013).

Nichenametla *et al*, (2006) relataram os efeitos antioxidantes "in vitro" de compostos polifenólicos. Compostos antioxidantes podem proteger o corpo dos riscos de doenças crônicas. Além disso, polifenóis têm sido reportados como tendo potencial farmacológico em muitos tipos de doenças.

Ainda de acordo com Nichenametla *et al*, (2006), cinco (5) categorias de polifenóis que são particularmente importantes: ácidos fenólicos, flavonoides, isoflavonas, antocianinas e proantocianidinas. Os ácidos fenólicos comuns nas plantas vêm de ácidos hidroxibenzóicos, como ácido gálico, ácido vanílico, ácido protocatecuico ou siríngico ácido, ou de ácidos hidroxicinâmicos, que consistem em ácido p-cumárico, ácido cafeico e ácido ferúlico.

Os flavonóides também podem ser subclassificados em: Flavonóis que são conhecidos como (flavan-3-ol), flavanonas e flavanonóis. A figura 5 mostra a estrutura básica de flavonóides, que contém dois anéis de benzeno ligados ao anel de carbono heterocíclico.

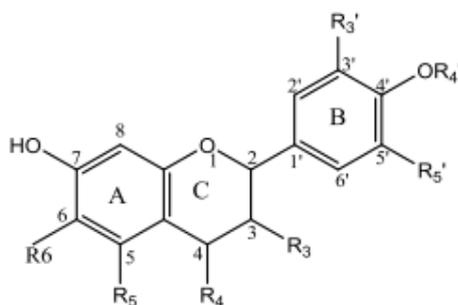


Figura 5: Estrutura dos flavonóides

Fonte: Sindi (2013)

A diferença entre flavonas e flavonóis é que os flavonóis têm um grupo hidroxila na posição 3. Da mesma forma, os flavanonóis diferem das flavanonas pela adição de um grupo hidroxila na posição C3. As diferenças nas estruturas de flavonóides são revisados na Tabela 2 (Nichenametla *et al.*, 2006).

Tabela 2: Diferenças estruturais entre as classes de flavonóides.

Classe dos flavonóides	Carbonos envolvidos em dupla ligação no anel benzeno	Grupo funcional no anel benzeno
Flavanóis	_____	3-hidroxi, 3-o-galato
Flavonóis	2 e 3	3-hidroxi, 4-oxo
Flavonas	2 e 3	4-oxo
flavanonas	_____	4-oxo
Antocianidina	1 e 2, 3 e 4	3-hidroxi

Fonte: Sindi (2013)

2.6.2 Antocianinas

As antocianinas são um dos mais importantes tipos de flavonóides. O nome antocianina vem da palavra grega (antho), que significa flor e (Kaynos) que significa vermelho ou azul (Sindi, 2013), as antocianinas são metabólitos secundários de plantas, encontrados em muitos vegetais, frutas e são subclasses de polifenóis. Segundo Sindi (2013) As antocianinas podem ser definidas como pigmentos solúveis em água, responsáveis pelas cores vermelho, azul, e roxo. Ocorrem em frutas, vegetais e particularmente em flores. Após a clorofila, as antocianinas são o mais importante grupo de pigmentos de origem vegetal visível a olho nu (Mate, 2022).

A figura 6 mostra a estrutura química geral das antocianinas. Ela contém três anéis benzeno. A estrutura principal das antocianinas existe na forma de cátions flavilium

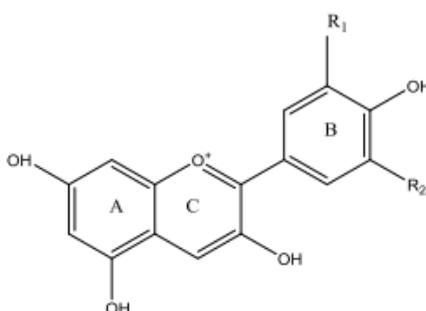


Figura 6: Estrutura geral das antocianinas. Fonte: Sindi (2013)

A tabela 3 mostra os nomes das diferentes classes de antocianinas dependendo dos radicais substituintes R₁ e R₂, assim como as respectivas cores produzidas.

Tabela 3: Tipos de Antocianinas e cores produzidas.

Antocianina	Radical	Cor Produzida
Cianidina	R ₁ =OH, R ₂ =H	Vermelho
Malvidina	R ₁ =R ₂ =OCH ₃	Roxo avermelhado
Pelargonidina	R ₁ =R ₂ =H	Vermelho alaranjado
Peonidina	R ₁ =OCH ₃ , R ₂ =H	Roxo azulado
Petunidina	R ₁ =OCH ₃ , R ₂ =OH	Roxo
Delfinidina	R ₁ =R ₂ =OH	Rosa

Fonte: Adaptado de (Sindi, 2013 ; Mate, 2022)

Seis agliconas comuns estão presentes na natureza. A Cianidina é a principal aglicona das antocianinas. Os glicosídeos são normalmente formados pela conjugação de moléculas de açúcares às formas de aglicona, na maioria das vezes a glicosilação ocorre no carbono 3 (Sindi, 2013). Glicose é o açúcar predominante ligado, enquanto arabinose, galactose, ramnose e xilose estão ligados com glicose para formar o di-glicosídeo (Schwartz *et al.*, 2008).

Existem três características importantes em antocianinas: a estrutura da aglicona, a porção de açúcar e os grupos de acilação. As estruturas e os tipos de antocianinas variam consoante a posição do grupo hidroxila e metoxila, o número e a localização dos açúcares e a extensão do açúcar acilante. O grupo metoxila pode doar electrões mais facilmente do que o grupo hidroxila, o grupo metoxila é responsável pela cor vermelha e o grupo hidroxila é responsável pela cor azul. (Prior, 2004; Jackman & Smith, 1996; Brat & Amiot-Carlin, 2008; Schwartz *et al.*, 2008).

As funções desempenhadas pelas antocianinas nas plantas são variadas: antioxidantes, protecção à acção da luz, mecanismo de defesa e função ecológica (Mate, 2022).

2.6.2.1 **Extracção de antocianinas**

De acordo com Giusti & Jing (2008), a extracção de antocianinas geralmente depende da complexidade das matrizes da amostra e em que tecido o pigmento está localizado.

Os pigmentos de antocianinas estão localizados no vacúolo perto da superfície. O primeiro passo é secando e triturando as amostras para reduzir o tamanho da partícula. Nitrogênio líquido tem sido usado para maximizar a estabilidade das antocianinas pela redução da temperatura, o que inativa as enzimas responsáveis pela deterioração das antocianinas e fornece um pó muito fino que aumenta a área de superfície (Giusti & Jing, 2008).

Métodos de extracção

No geral, não existe apenas um procedimento que possa ser usado para extrair todos os tipos de antocianinas das plantas. Wrolstad (2005) reportou que a escolha de um método apropriado para extrair antocianinas deve estar baseada naquele que dá melhor recuperação e reduz a degradação da amostra. Para Jackman & Smith (1996) o procedimento precisa ser de menores custos e que leve menor tempo possível. Os métodos usados para a extracção de polifenóis são: extracção por solvente, extracção em fase sólida, extracção supercrítica e extracção em líquido pressurizado (Santos-Buelga & Williamson, 2003).

Factores que afectam a extracção de antocianinas

Santos-Buelga & Williamson (2003) consideram que vários factores podem afectar a extracção: o tipo de solvente, pH, temperatura, número de estágios da extracção, volume do solvente, forma e tamanho das partículas. Giusti & Jing (2008) reportam que três factores devem ser considerados antes de iniciar se uma extracção: o motivo da extracção, o carácter das antocianinas e os recursos materiais.

Solventes de extracção

De acordo com o descrito por Jackman & Smith (1996); Santos-Buelga & Williamson (2003); e Giusti & Jing (2008), os solventes mais comuns usados para a extracção de antocianinas são: metanol, acetona, etanol ou solventes aquosos, por causa da polaridade desses solventes e das antocianinas. Shruthi *et al* (2016) descreveram que o carácter polar das antocianinas torna-as solúveis em solventes polares. Para Du & Francis (1973), a extracção de antocianinas é feita com etanol ou metanol, contendo uma pequena quantidade de ácido com o objectivo de obter a forma do catião flavílico, o qual é vermelho e estável em meio altamente ácido.

Abou *et al* (2011) usaram água destilada e soluções de etanol acidificado com 1.5 N de HCl (85:15), etanol acidificado com 1% de ácido cítrico, e 2% de ácido cítrico na extracção de pigmentos de antocianinas de cálices de Rosela. Eles concluíram que: a adição de ácidos à água e etanol aumentou a eficiência da extracção do que quando usaram apenas água destilada. Segundo Abou *et al* (2011), o HCl foi mais efectivo em relação ao ácido cítrico. O etanol acidificado com 1.5 N de HCl mostrou melhores resultados.

2.6.2.2 Estabilidade das antocianinas

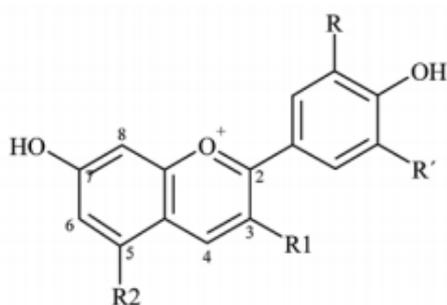
O processamento e fabricação de produtos derivados de antocianinas favorecem a deterioração destas e da sua cor. Segundo Schiozer & Barata (2007), a estabilidade de antocianinas é afectada pelo pH, solventes, temperatura, concentração e estrutura, presença de oxigénio, luz, enzimas e outras substâncias presentes na planta.

2.6.2.3 Influência da estrutura e dos substituintes químicos na estabilidade das antocianinas

As unidades glicosil e os grupos acila, hidroxila e metoxila encontrados nas antocianinas têm um efeito significativo sobre a estabilidade e reactividade dessas últimas. O aumento do número das hidroxilas estabiliza as agliconas

(antocianidinas) e o aumento da metilação dos grupos hidroxila diminui a estabilidade das antocianinas (Schiozer & Barata, 2007).

No entanto existem inconsistências como relatam Cabrita *et al* (2000), as posições dos grupos metoxila e hidroxila também afetam a cor. Com o aumento do número de grupos hidroxila, a cor muda de rosa para azul (Doa *et al.*, 1998). A posição e o tipo de grupo glicosila também influenciam na estabilidade. Um estudo mostra que este grupo na posição C-3 produz a antocianina mais estável. As antocianinas 3-glicosídeos são mais coloridas que as 3,5 ou 5-glicosídeos, e o aumento das unidades de glicose torna os pigmentos mais amarelos (Giusti *et al.*, 1999).



R1 = O-Gli / OH

R2 = O-Gli/OH

R e R' = OH, H ou OCH₃

Figura 7: Ilustração das posições de Carbono na estrutura das antocianinas.

Fonte: Giusti *et al.*, (1999).

A acilação também aumenta a estabilidade das antocianinas assim como a poli-acilação são mais estáveis que as mono-aciladas. O aumento da concentração das antocianinas também promove maior estabilidade da cor através de auto-associação (Schiozer & Barata, 2007).

2.6.2.4 Influência do pH nas moléculas de antocianinas

As antocianinas apresentam uma grande variedade de cores na escala de pH 1 a 14, no entanto são mais estáveis em meio ácido do que em soluções alcalinas. Num meio bastante ácido (pH<2) o catião flavílico vermelho é a única espécie presente no equilíbrio. O aumento do pH resulta na diminuição da intensidade da cor e da concentração do catião flavílico, devido à hidratação pelo

ataque nucleofílico da água, formando carbinol, incolor (Wahyuningsih *et al.*,2017).

Segundo Wahyuningsih *et al.*, (2016), algumas antocianinas são vermelhas em condições ácidas, violeta ou roxo em condições neutras e azuis em condições alcalinas. Isso é explicado pelo facto de a estrutura das antocianinas (anel vermelho) existir como catião flavílio, o qual a baixo pH é protonado e forma um ião positivo (catião), a medida que o pH aumenta a molécula sofre desprotonação, e em altos valores de pH a molécula forma um anião conforme ilustrado na fugura 8. Corantes contendo antocianinas só podem ser usados em pH abaixo de 4.

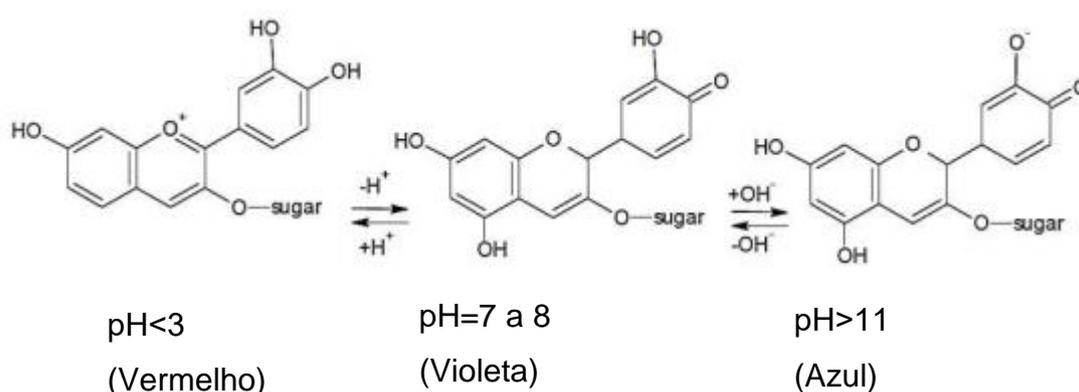


Figura 8:Equilíbrio de algumas antocianinas.

Fonte: Wahyuningsih *et al.*, (2016).

2.6.2.5 Influência da temperatura na degradação das antocianinas

A taxa de degradação das antocianinas aumenta durante o manuseio e armazenamento, elas degradam-se rapidamente quando submetidas a altas temperaturas. O aumento da temperatura em pH entre 2 a 4 induz a perda de radicais glicosila através da hidrólise da ligação glicosídica, o que induz a perda da cor. As enzimas de degradação mais comuns das antocianinas são as glicosidases, que quebram a ligação do radical glicosil da antocianina, resultando

na formação da altamente instável antocianidina correspondente (Schiozer & Barata, 2007).

2.6.3 Taninos

Os taninos são compostos fenólicos de grande interesse económico e ecológico estando presentes em muitas plantas. Caracterizam-se por serem polímeros fenólicos de grande peso molecular, solúveis em água e em solventes polares, possuindo a habilidade de formar complexos insolúveis em água com proteínas, gelatinas e alcalóides. Sua concentração varia de acordo com o clima e com as condições geográficas (Mate, 2022). Segundo Braga (2019), os taninos dividem-se em dois grupo dependendo da sua estrutura: Hidrossolúveis e condensados.

Os taninos hidrossolúveis (figura 9) consistem de ésteres de ácidos gálicos e ácidos elágicos glicosilados, formados a partir de chiquimato, onde os grupos hidroxila do açúcar são esterificados com os ácidos fenólicos (Braga, 2019; Mate, 2022). São caracterizados por um poliol central, geralmente uma molécula de glicose (ou outro açúcar) esterificada com ácido gálico ou elágico, quando submetidos a hidrólise ácida liberam ácidos fenólicos: gálico, caféico, elágico e um açúcar (Mate, 2022).

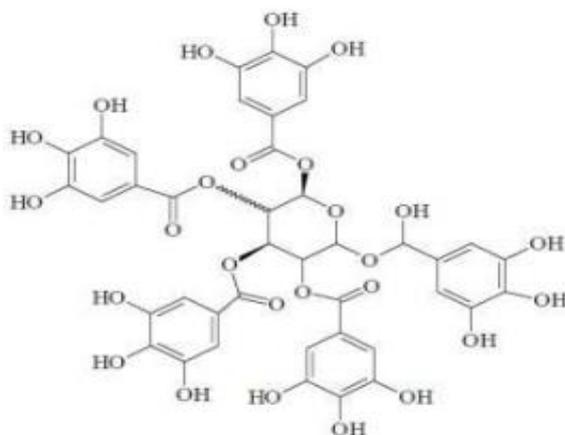


Figura 9. Estrutura de taninos hidrossolúveis

Fonte: Ribeiro (2014)

Os taninos condensados (figura 10) são formados por polímeros de catequina e leucoantocianidinas. A presença de taninos condensados é mais comum na dieta humana do que os taninos hidrossolúveis. Estão presentes em concentrações relativamente importantes em alguns frutos (uvas, maçãs, etc.) e suas bebidas derivadas, no cacau e chocolate (Mate, 2022).

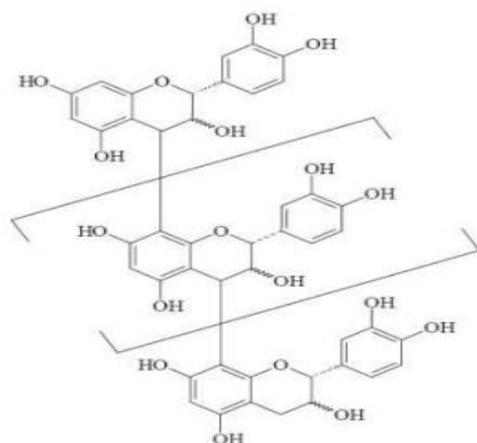


Figura 10: Estrutura de taninos condensados (em destaque uma unidade de catequina)

Fonte: Ribeiro (2014)

2.7 Actividade Antioxidante e Radicais Livres

Os radicais livres são moléculas instáveis, altamente reactivos e energizadas que são caracterizados por possuir electrões desemparelhados. Podem ser gerados a partir de muitos elementos, porém, nos sistemas biológicos, aqueles que envolvem oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) são os mais importantes (Oliveira, 2014b). Geralmente, eles atacam as moléculas estáveis mais próximas, para “roubar” seus electrões. Quando a molécula atacada perde o seu electrão, esta se torna um novo radical livre, dando início a uma reacção em cadeia. Uma vez que o processo é iniciado, a reacção pode ocorrer como cascata, iniciando a peroxidação lipídica que resulta na desestabilização e desintegração das membranas celulares, ou na oxidação de outros componentes celulares, tais como proteínas e DNA, resultando finalmente na ruptura das células. Os danos às membranas celulares e ao DNA podem

provocar mutações cancerosas e a peroxidação lipídica está associada com a promoção de doenças cardíacas (Oliveira, 2014a).

Segundo Oliveira (2014b), factores ambientais, tais como o fumo, a poluição do ar, a radiação UV e solar em excesso, levam a um aumento na formação de radicais livres. A abundância destes compostos danifica membranas celulares, fosfolípidios, proteínas e ácidos nucleicos, essenciais para o funcionamento celular. Para se defenderem dos radicais livres, as plantas desenvolveram mecanismos antioxidantes em diferentes compartimentos intracelulares. Estes servem para controlar as concentrações de radicais livres, aumentar a resistência contra estes e reparar os danos causados.

Tiveron (2010) definiu antioxidantes como quaisquer substâncias que, presentes em baixas concentrações, quando comparada a um substrato oxidável, retardam ou inibem a oxidação desse substrato de maneira eficaz. Segundo Mate (2022) os antioxidantes neutralizam a acção dos radicais livres doando um de seus electrões, encerrando assim a reacção de "Roubo" de electrões. Ao doar seus electrões, os antioxidantes não se convertem em novos radicais livres porque estes são estáveis nas duas formas. Estes desactivam os radicais livres antes que eles possam causar danos ao organismo. Assim, eles podem também ser definidos como substâncias capazes de cessar ou estabilizar a acção dos radicais livres evitando ou retardando a oxidação de lípidos, proteínas e ADN.

2.7.1 Métodos de determinação da actividade antioxidante

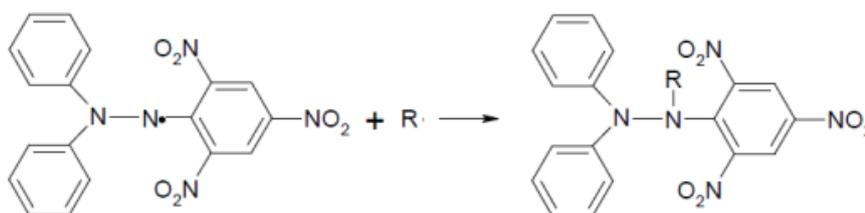
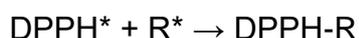
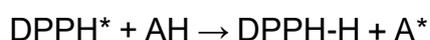
Dentre os métodos utilizados para estimar a capacidade antioxidante estão o ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), desenvolvido originalmente por Cao & Cutler (1993), que mede a capacidade do antioxidante em sequestrar radicais peróxido gerado por uma fonte radicalar; a autooxidação do sistema β -caroteno/ácido linoléico, que actua como gerador de radicais livres, os quais interagem com o β -caroteno ocasionando o decaimento da sua absorbância (Tiveron, 2010); Teste de redução do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazil), que é baseado na capacidade do DPPH* reagir com doadores de

hidrogénio (Tiveron, 2010); FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), que está baseado na capacidade dos fenóis em reduzir o Fe^{3+} em Fe^{2+} (Tiveron, 2010); ABTS^{•+} (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazonie-6-sulfonic acid)), que consiste em se monitorar o decaimento do catião-radical ABTS produzido pela oxidação do ABTS^{•+}, quando a amostra contendo antioxidantes é adicionada e o rancimat, que determina a estabilidade oxidativa da amostra, por meio da detecção de ácidos voláteis a 110°C (Tiveron, 2010).

Essas metodologias vêm sendo bastante utilizadas na determinação da actividade antioxidante de alimentos e produtos naturais devido a sua relativa simplicidade, principalmente os métodos indiretos (reação de oxi-redução entre o oxidante e o antioxidante) como o ABTS^{•+} e o DPPH[•]. Sendo o último o mais utilizado, pois é adequado para análise de antioxidantes solúveis em meios orgânicos e amplamente aplicado à análise desta actividade em frutas (Mate, 2022).

2.7.2 Método de sequestro do radical livre DPPH

O método de sequestro de radical livre DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), foi sugerido primeiramente em meados da década 50, originalmente para descobrir doadores de hidrogênio em produtos naturais, e, mais tarde para descobrir o potencial antioxidante em fenólico e em alimentos. Actualmente é o método mais utilizado para a verificação da actividade antioxidante (Tiveron, 2010).



Difenilpicrilidrazil (radical livre)

Cor: Violeta-escura

Difenilpicrilidrazina (não radical)

Cor: Amarela (ou violeta-clara)

Figura 11: Estabilização do radical livre

Fonte: Tiveron (2010).

2.7.3 Método ABTS

O método indirecto do sequestro do radical ABTS 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) foi proposto primeiramente por Miller *et al.* (1993) em teste de amostras biológicas. Assim como o DPPH*, o ABTS^{•+} apresenta excelente estabilidade em determinadas condições de análise. Porém, estes radicais apresentam algumas diferenças importantes. O radical DPPH* já vem pronto para uso e é solúvel em solventes orgânicos, permitindo a análise tanto de amostras hidrofílicas como lipofílicas (Arnao, 2000).

Por meio da adição do persulfato de potássio, ocorre a formação do radical ABTS, que apresenta cor esverdeada. Na medida em que o antioxidante é misturado com esse radical, ocorre a redução do ABTS^{•+} a ABTS, provocando a perda da coloração do meio reacional. Os resultados são expressos em função do Trolox, um padrão antioxidante submetido às mesmas condições de análise (Tiveron, 2010).

Uma das vantagens do método é a sua simplicidade, além disso oferece valores máximos da absorção e uma boa solubilidade (Tiveron, 2010). A figura 12 mostra a reação do ABTS^{•+} com um antioxidante formando o ABTS.

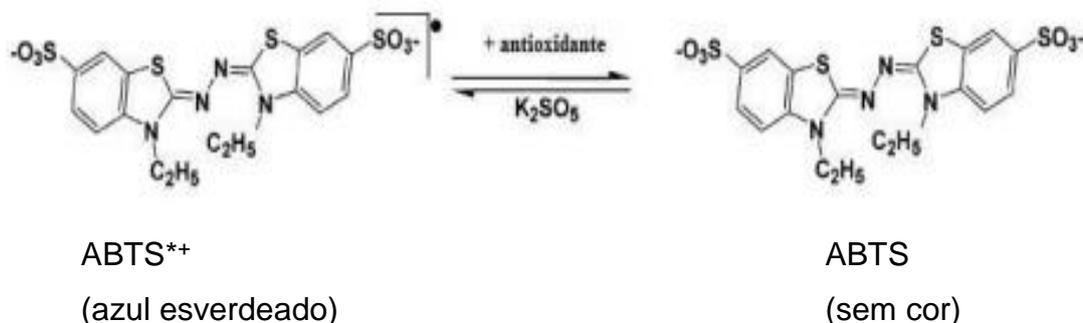


Figura 12: Redução do ABTS^{•+} por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.

Fonte: Tiveron (2010)

2.8 Secagem por atomização

Secagem por atomização, pulverização ou spray drying é a remoção de humidade por aspersão de um produto fluído (solução, pasta ou dispersão) na forma de gotículas atomizadas em um meio de secagem gasoso (ar ou gás inerte, N₂), transformando-se em partículas isoladas sólidas, grânulos ou aglomerados em operação única e contínua (Parruque, 2018).

O manual do utilizador Armfield Tall Form Spray Dryer FT80 (2008) define spray drying como a técnica usada para converter sólidos solúveis e suspensos em forma de pó. Os líquidos são atomizados em gotículas para produzir maior área de transferência de massa, em seguida, são misturados com ar aquecido que vaporiza o conteúdo do solvente.

Toda a humidade da superfície das gotículas é vaporizada poucos centímetros depois de entrar em contacto com o gás de secagem. A humidade residual dentro da partícula migra para a superfície durante o tempo em que está suspensa na corrente de gás de secagem dentro da câmara e depois vaporiza também. Este tempo é conhecido como tempo de residência da partícula (Armfield, 2008).

Existem muitas indústrias hoje em dia que aplicam a secagem por aspersão para obter variados produtos como: Leite e derivados, Café, resinas, detergentes, porcelanas, caulinos, emulsões de PVC, Farmacêuticos (Armfield, 2008).

2.8.1 Etapas do processo de secagem por atomização

Oliveira & Petrovick (2010) dividiram o processo de secagem por atomização em 3 etapas: Na primeira etapa, o fluído é disperso Como gotículas, produzindo uma grande área superficial. Na segunda, ocorre contacto destas com uma corrente de ar aquecido, havendo transferência de calor. Na terceira

etapa acontece a evaporação do solvente e a formação da partícula sólida. Com a transferência de calor do ar aquecido às gotículas, o líquido da superfície evapora-se rapidamente. As partículas solidificadas geralmente apresentam o mesmo tamanho e forma da gotícula que as originou. Na última etapa, o produto de secagem é transportado por uma corrente de ar sendo posteriormente coletado (Rankell *et al.*, 2001; Broadhead *et al.*, 1992; Shaw, 1997). A evaporação superficial da gotícula conduz à formação de uma camada de material seco externa. Através desta camada, o líquido situado no interior da gotícula propaga-se para o exterior.

Algumas variáveis do processo que influenciam as propriedades de produtos secos por atomização foram descritas por Parruque (2018), e são apresentados na tabela 4.

Tabela 4: Variáveis que influenciam a secagem por atomização.

Variáveis do processo	Variáveis inerentes ao produto
Temperatura de entrada e saída do ar	Densidade
Caudal do ar ou do fluido de arraste	Volume
Humidade do ar	Granulometria
Tempo de residência	Humidade
Geometria da câmara	Tendência à aglomeração
Tipo de atomizador	Retenção da qualidade desejada
Velocidade de alimentação	Uso de adjuvantes

A figura 13 mostra o desenho esquemático do spray dryer, seus componentes e sentido de fluxo do ar de entrada, bem como do produto no caso em que o processo é executado em co-corrente.

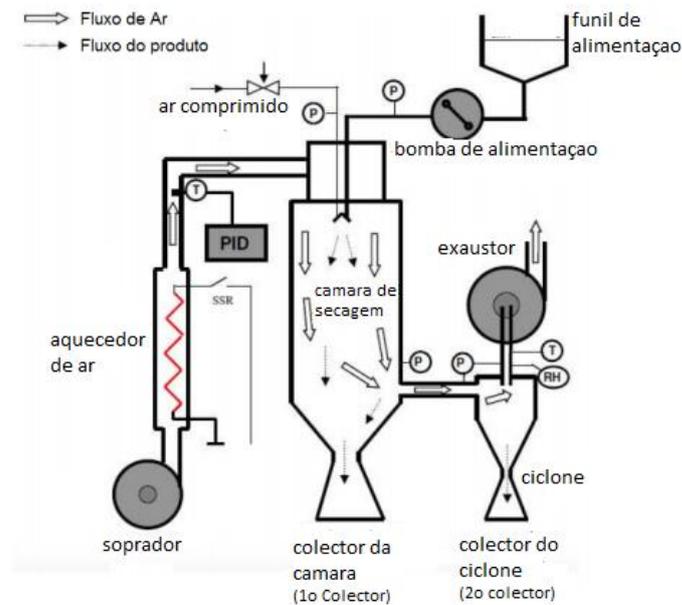


Figura 13: Representação esquemática do Spray dryer (adaptado).

Fonte: Armfield (2008).

3 PARTE EXPERIMENTAL

As experiências laboratoriais deste trabalho foram feitas nos laboratórios do Departamento de Engenharia Química (DEQUI), da Faculdade de Engenharia, da Universidade Eduardo Mondlane.

A Tabela 5 apresenta a lista dos materiais, reagentes e equipamentos utilizados na realização das experiências.

Tabela 5: Lista dos materiais, reagentes e equipamentos usados na realização das experiências.

Materiais	Reagentes	Equipamentos
Espátula	Água destilada	Espectrofotômetro
Balões volumétricos	Etanol, Etanol	Balança analítica
Buretas	Ácido clorídrico	Placas de aquecimento
Pipeta graduada	Hidróxido de sódio	Bloco de digestão
Balão de destilação	Comprimido Kjeldahl	Bloco de destilação
Béqueres	Cloreto de sódio	Estufa
Provetas	Ácido sulfúrico	Mufla
Funil de vidro	Vermelho de dimetil	Bomba a vácuo
Tubos de ensaio	Verde de bromocresol	Aqualab
Papel de filtro	Ácido bórico	Colorímetro
Algodão	Acetona, Vanilina	pH-metro
Vareta de vidro	Persulfato de potássio	Liofilizador
Vidro de relógio	Ácido gálico	Centrífuga
Exsicador	Fenolftaleína, amido 1%	Cronómetro
Termômetro	D-catequina	Spray-Dryer
Doseadores	Folin-Ciocalteu	Congelador
Pinça	Carbonato de sódio	Geleira
Cadinhos de porcelana	Nitrito de sódio	Compressor
Tubos de digestão	Hidróxido de potássio	Refratômetro
Cadinhos de Goosh	ABTS, DPPH	Banho de aquecimento
Cubeta	Iodato de potássio	
Placas de petri	Iodeto de potássio	

3.1 Fluxograma do processo

A figura 14 mostra as etapas seguidas na execução das experiências laboratoriais até o objectivo final.

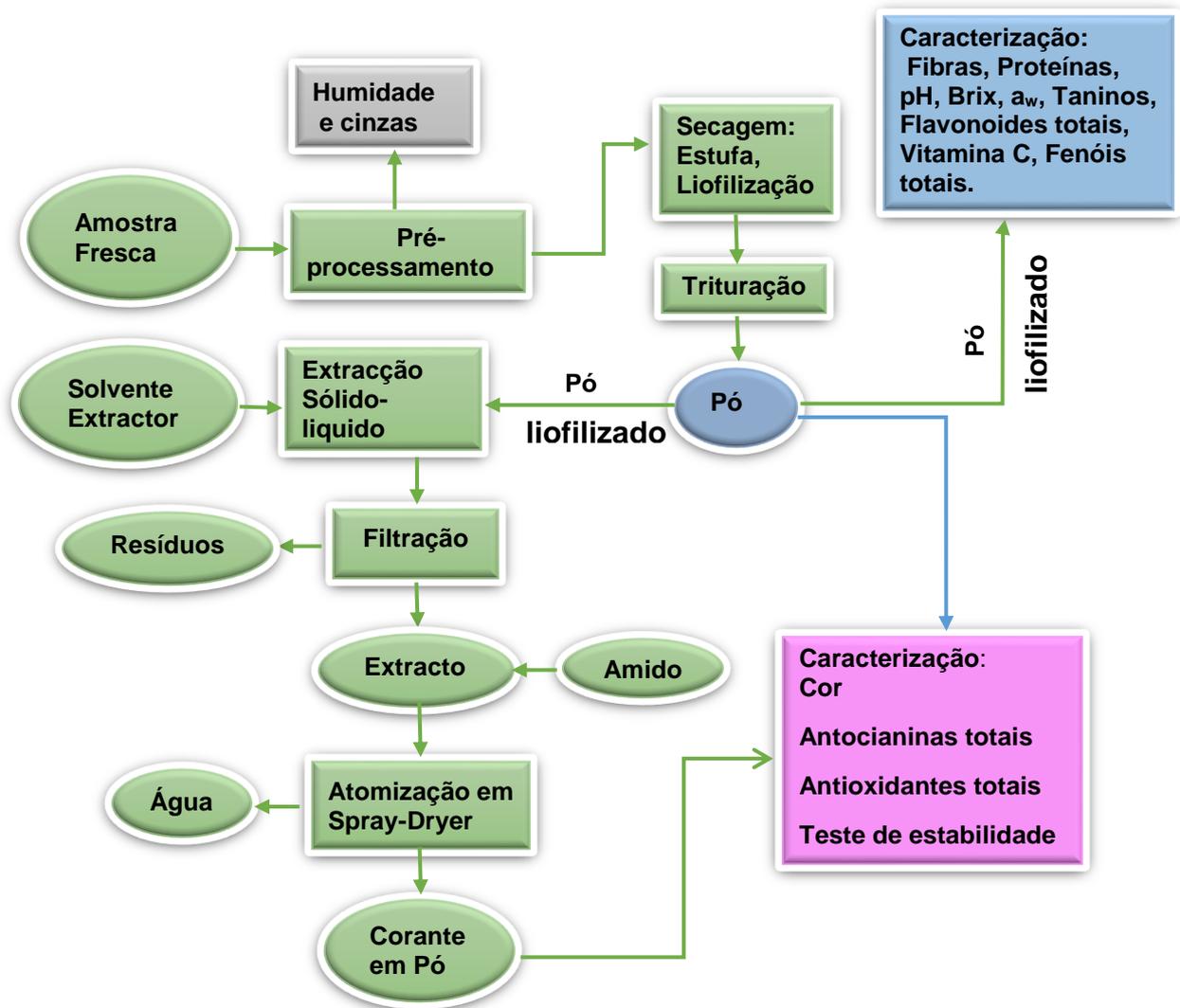


Figura 14: Etapas do processo experimental.

3.2 Preparação da matéria-prima

A preparação da matéria-prima consistiu em separar os cálices do fruto contendo sementes, remoção das folhas, e outros resíduos presentes na amostra que foram colhidas em conjunto mas que não constituem parte de interesse para este trabalho.



Figura 15: Pré-tratamento da matéria-prima. A) Descasque, B) Fruto contendo sementes e C) Cálices de *H. Sabdariffa* (parte de interesse).

3.3 Determinação de Características físico-químicas da matéria-prima.

3.3.1 Determinação de Humidade

A humidade foi determinada segundo descrito pelas normas IAL (2008), método 012/IV. O material é seco na estufa a 105°C durante 3 horas, e a humidade é calculada pela perda de massa como resultado da água removida durante o aquecimento.

$$\text{Humidade (\%)} = \frac{Ma - Ms}{Ma} \times 100$$

(Equação 1)

Onde: Ma – massa da amostra húmida, Ms – massa da amostra após a secagem.

3.3.2 Determinação do teor de cinzas

As cinzas foram determinadas por incineração do resíduo obtido na determinação de humidade, na múfla a 550°C durante 5 horas. Seguida de arrefecimento no dessecador até a temperatura ambiente e pesagem do conteúdo de cinzas conforme as normas do IAL (2008), método 018/IV.

$$Cinzas(\%) = \frac{(\text{Peso do cadinho} + \text{Cinzas} - \text{Peso do cadinho})}{\text{Peso da amostra (g)}} \times 100$$

(Equação 2)

3.4 Secagem por Liofilização

A liofilização (freeze-drying) iniciou com o congelamento da amostra e posterior secagem propriamente dita num equipamento chamado (Freeze-Dryer), conforme o arranjo mostrado na figura 16. Nesse processo, a água congelada passa do estado sólido directamente para o estado gasoso (Sublimação). Segundo Mate (2022), este processo é vantajoso em relação aos outros processos convencionais de secagem de alimentos, pelo facto de não sujeitar os produtos à degradação térmica, mantendo assim as propriedades nutritivas dos alimentos, e pela sua eficiência na remoção da água. Este método de secagem foi feito com objectivo de fazer-se um estudo comparativo da retenção dos componentes, assim como o de maximizar a disponibilidade do teor de sólidos solúveis da amostra.



Figura 16: Secagem por liofilização de *Hibiscus sabariffa* L.

3.5 Secagem por atomização

A secagem por atomização foi efectuada usando-se o Tall Form Spray Dryer FT80/81, fabricado pela Armified 2008. Para prover o ar comprimido para a atomização, um equipamento auxiliar (Compressor) é necessário, neste trabalho foi usado o compressor de ar (Ryobi AC-3100, S/N: 14300105, China) acoplado ao spray dryer. O processo foi executado em co-corrente, por forma a reduzir o tempo de residência do produto dentro da câmara de secagem, visto que este é sensível a altas temperaturas que se fazem sentir dentro da câmara. Segundo o manual do utilizador, cada produto tem suas variáveis óptimas de secagem no que concerne à temperatura de entrada, a pressão de entrada, a frequência do soprador de entrada e de saída, a frequência da bomba de alimentação, a adição ou não de agentes de secagem como amido, etc. por isso, fez-se ensaios preliminares por forma a observar-se quais são as melhores condições para a secagem do Hibisco Assim, a tabela 6 apresenta as variáveis operatórias adoptadas para secagem baseadas nos ensaios preliminares efectuados.

Tabela 6: Parâmetros de secagem usados no Spray Dryer

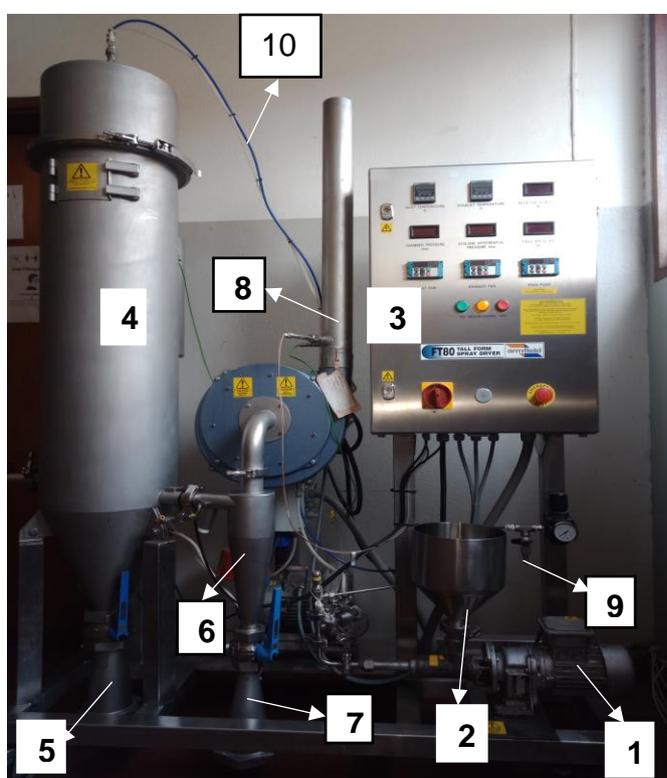
Parâmetro	Valor
Pressão de atomização	2 bar
Temperatura do ar de secagem	150°C
Temperatura de saída do ar	Não controlada
Velocidade da Bomba de alimentação	2 Hz
Soprador de entrada	20 Hz
Exaustor	15 Hz
Quantidade de amido	15/100 de sólidos totais

3.5.1.1 Preparação do extracto

A preparação do extracto consistiu na secagem por liofilização descrito na secção 3.4, os cálices secos foram triturados em um liquidificador e empacotados em plásticos, a razão de 1 g de hibisco seco para 10 ml de água destilada foi usada na extracção sólido-líquido, que foi efectuada a 60°C durante

60 minutos, segundo a metodologia descrita por (Ahiduzzaman *et al.*, 2021). Um banho foi usado para manter a temperatura de 60°C, controlada com um termômetro. Após a extracção, filtrou-se o extracto e mediu-se o volume com ajuda de uma proveta. Ao extracto obtido, adicionou-se amido de milho, na proporção estabelecida na tabela 6 e homogeneizou-se a mistura com ajuda de uma vareta de vidro.

A figura 17 apresenta a imagem do Tall Form Spray Dryer FT80/81 usado na secagem de extractos de cálices de *Hibiscus Sabdariffa L.* para a produção de corante em pó.



Legenda:

- 1 – bomba de alimentação;
- 2 – funil de alimentação;
- 3 – Painel de controle;
- 4 – Câmara de secagem;
- 5 – Colector da câmara De secagem;
- 6 – Ciclone;
- 7 – Colector do Ciclone;
- 8 – Exaustor;
- 9 – Entrada do ar comprimido;
- 10 – Conduitas da amostra e Ar comprimido.

Figura 17: Tall Form Spray Dryer FT80/81 usado na secagem por atomização.

Antes de iniciar a secagem propriamente dita, é preciso verificar-se algumas medidas de segurança:

- Liga-se o equipamento, remove-se o bico de pulverização no topo da câmara de secagem e é posicionado num recipiente adequado (pode ser um balde);

- Coloca-se aproximadamente um litro de água potável no funil de alimentação, certifica-se de que a válvula reguladora do ar comprimido está completamente fechada (sentido anti-horário);
- Ajusta-se a rotação da bomba para 7.5 Hz e liga-se a mesma para verificar se as condutas estão limpas ou não, uma condição obrigatória é nunca ligar a bomba com o funil de alimentação seco (sem líquido);
- Ajusta-se o soprador de entrada e o exaustor para 42 Hz e 40 Hz respectivamente, os dois são ligados;
- Pressiona-se o botão de emergência, fazendo isso, o equipamento deve desligar-se completamente. Isso nos permite saber se em caso de necessidade podemos recorrer ao botão de emergência para desligar completamente o equipamento;
- Desabilita-se o botão de emergência e o equipamento liga automaticamente.

Após a verificação das medidas de segurança do equipamento, procede-se à limpeza da conduta da amostra:

- Circula-se água potável até o ponto em que começa a se verificar água limpa na saída da conduta. A amostra é adicionada ao funil da alimentação exactamente no momento em que a última quantidade de água abandona o funil;
- Com o bico de pulverização removido da câmara de secagem, verifica-se o padrão do spray no bico de pulverização. para tal, liga-se a bomba a baixas velocidades e com o compressor ligado, abre-se a válvula reguladora de ar comprimido e o Spray é formado;
- Desliga-se a bomba, fecha-se a válvula de ar comprimido e posiciona-se o pulverizador no topo da câmara de secagem.

Para ligar o aquecedor de ar, o soprador de entrada e o exaustor devem ser ajustados para 20 e 15 Hz respectivamente, ajusta-se também a temperatura de secagem desejada, e pressiona-se o botão Verde, ligando assim o aquecedor de ar. A temperatura começa a subir e a humidade relativa dentro da câmara de secagem baixa, é preciso esperar até que o valor desta reduza até valores

próximos de zero (dependendo da temperatura do ar de secagem programada), para este trabalho usou-se 150°C e a humidade relativa alcançada foi de 7±1%. Abrir o regulador de pressão e ajustar a pressão desejada, ligar a bomba. A medida que o líquido entra na câmara de secagem, a humidade começa a subir, é preciso verificar se os colectores do produto permanecem secos para assim assegurar que toda água que está sendo evaporada é removida através do exaustor. O pó é formado, arrastado pelos soprador de ar, centrifugado no ciclone e colhido no colector, a água evaporada é removida através do exaustor.

No final do trabalho é necessário fazer a limpeza. Desliga-se o equipamento, Remove-se os colectores do produto e são lavados separadamente, quando estiver arrefecido remove-se o Pulverizador e é lavado a parte, lava-se a câmara de secagem, garantindo antes que todos suprimentos eléctricos estejam isolados para que não molham. Ajustar a bomba para a máxima velocidade 50 Hz, circular 1 litro de solução de Hipoclorito 2%, e depois água potável. Desligar o equipamento e montar todos componentes removidos durante a limpeza.

3.6 Rendimento da secagem por atomização

O rendimento da secagem foi calculado dividindo a massa do pó obtido, pela massa dos sólidos totais aplicados na extracção mais a massa de amido adicionado, multiplicando por 100 segundo a equação 3.

$$\eta = \frac{M_p}{M_s + M_a} \times 100\%$$

(Equação 3)

Onde: M_p – é a massa do pó obtido na atomização (g), M_s – massa de sólidos usados na extracção (g), M_a – massa de amido adicionado (g).

3.6.1 Determinação da cor da amostra fresca e dos produtos

A quantificação da cor foi feita usando o colorímetro Konica Minlota CR10, que forneceu os parâmetros da cor no sistema CIELab (L, a, b) seguindo a metodologia descrita pelo IAL (2008).

Uma forma mais prática de quantificar a cor é representá-la em forma dos parâmetros (L, C, h). Onde C é o croma (equação 4), e h é o hue (equação 5).



$$Croma = \sqrt{a^2 + b^2}$$

(Equação 4)

$$hue = \tan^{-1} \left(\frac{a}{b} \right)$$

(Equação 5)

Figura 18: Ilustração do colorímetro e algumas amostras usadas na medição da cor.

3.6.2 Determinação da vitamina C ou ácido L-ascórbico.

O teor de vitamina C foi determinado pelo método descrito pelo IAL (2008). Pesou-se 0,2 g da amostra (houve necessidade de pesar-se esta pequena quantidade devido à forte intensidade da cor do hibisco), transferiu-se para Erlenmeyer com auxílio de 50ml de água destilada, adicionou-se 10ml de ácido sulfúrico a 20% homogeneizou-se, em seguida filtrou-se com papel de filtro, lavando-se primeiro o filtro com água e em seguida com solução de ácido sulfúrico a 20%. Adicionou-se ao extracto 1 ml de solução de iodeto de potássio a 10%, 1ml de solução de amido a 1% e titulou-se com solução de iodato de potássio a 0,02M até a coloração azul. A equação 6 foi usada para determinar o teor de vitamina C.

$$\%Vitamina C \left(\frac{mg}{100g} \right) = \frac{V \times F \times 100}{P}$$

(Equação 6)

Onde: V – volume gasto na titulação em (ml); F – factor de correcção de KIO_3 8,806 ou 0,8806 para 0,02M ou 0,002m, respectivamente; P – peso da amostra em (g).

3.6.3 Determinação de fibra bruta

O teor de fibra foi determinado com base no método de Weende descrito por Adrian *et al* (2000). Nesta metodologia, o resíduo final, subtraído do peso das cinzas, é designado de celulose bruta, sendo constituído por lenhina e uma fracção da celulose da amostra. Na verdade este valor é muito inferior à massa do indigestível glucídico. De acordo com Adrian *et al* (2000), as perdas de glúcidos ingestíveis devem-se principalmente, ao tratamento alcalino, que solubiliza, sobretudo as hemiceluloses. A quantificação de fibra bruta consistiu de 4 etapas, digestão ácida, digestão básica, secagem na estufa a 105°C e incineração na mufla a 550°C. Vide a descrição mais detalhada nos anexos 3.

3.6.4 Determinação do teor de Proteínas

O teor de proteínas foi determinado pelo método Kjeldahl descrito pelo IAL (2008), o procedimento consiste de três fases: Digestão, Destilação, e Titulação. Vide a descrição mais detalhada nos anexos 3.

3.6.5 Determinação de pH

A determinação do pH seguiu o método electrométrico descrito pelo IAL (2008), tratando-se de uma amostra sólida, pesou-se 1 g em um béquer e diluiu-se com auxílio de 10 ml de água destilada, agitou-se a mistura com agitador magnético durante 5 minutos e determinou-se o pH com o pH-metro previamente calibrado com soluções tampão de pH 4 e 7. A medição é feita introduzindo o eléctrodo na mistura até a estabilização do pH.

3.6.6 Determinação de Brix (sólidos solúveis)

O Brix foi determinado por refractometria fazendo-se leitura directa no refractómetro do tipo Abbe. Colocou-se uma gota da amostra entre dois primas e fazendo a leitura. No fim de cada leitura, limpa-se os prismas com ajuda de um pedaço de papel.

3.6.7 Determinação do teor de Antocianinas e Flavonóides

As antocianinas e os flavonoides são extraídos segundo a metodologia descrita por Fuleki & Francis (1968), e Francis (1982) respectivamente, e determinados espectrofotometricamente fazendo-se leituras das absorbâncias a 535nm e 374 nm respectivamente. A extração foi feita usando 0,1 g da amostra para 10 ml da solução de etanol-HCl 1,5N na proporção (85:15). As equações 7 e 8 são usadas para o cálculo das antocianinas e flavonóides.

$$\text{Antocianinas totais} \left(\frac{\text{mg}}{100\text{g}} \right) = \frac{V_{ED} \times V_{EC} \times Abs_{535\text{nm}} \times 1000}{V_{aliq} \times m \times E_{1\text{cm}}^{1\%}} \quad (\text{Equação 7})$$

$$\text{Flavonoides totais} \left(\frac{\text{mg}}{100\text{g}} \right) = \frac{FD \times Abs_{374\text{nm}}}{76.6} \quad (\text{Equação 8})$$

Onde FD – é o factor de diluição, $Abs_{535\text{nm}}$ é a absorbância a 535 nm, V_{ED} – volume do extracto diluído, V_{EC} – Volume do extracto concentrado, $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ - é o coeficiente de extinção e é igual a 982, $Abs_{374\text{nm}}$ é a absorbância a 374 nm.

3.6.8 Quantificação de compostos fenólicos totais

A técnica utilizada para a determinação do conteúdo fenólico total baseia-se no método descrito por Swain & Hillis (1959). O extracto é obtido por homogeneização da amostra em metanol (1:4, p:v) e incubação overnight (16-18 h) a 5 °C. Posteriormente, procede-se à centrifugação da mistura (3500 rpm,

30 min a 4 °C), reservando-se o extracto metanólico límpido. O doseamento envolve a diluição de 150 µL do extracto metanólico em 2400 µL água nanopura, seguido pela adição de 150 µL do reagente de Folin-Ciocalteu diluído (0.25 N). A mistura é incubada durante 3 min (temperatura ambiente), seguindo-se a adição de 300 µL Na₂CO₃ a 1 N e incubação durante 2 h no escuro (temperatura ambiente). As leituras espectrofotométricas são realizadas a 725 nm, sendo o conteúdo fenólico total expresso em mg de equivalentes de ácido gálico. 100 g⁻¹ de tecido, resultante da média de *n* determinações por amostra, de acordo com a equação 9.

$$CFT (mg EAG.100 g^{-1}) = \left(\frac{Abs_{725nm} - b}{m} \right) \times \left(\frac{volume\ ext\ fenólico}{peso\ amostra} \right) \times FD \times 100$$

(Equação 9)

Onde:

CFT – conteúdo fenólico total expresso em mg de equivalentes a ácido gálico (EAG) por 100 g de produto;

Abs_{725nm} – valor da absorvância a 725 nm obtido após o doseamento;

b – ordenada na origem da recta de calibração do padrão do ácido gálico;

m – declive da recta de calibração do padrão de ácido gálico;

FD – factor de diluição no doseamento, caso necessário;

100 – factor multiplicativo para expressar o resultado por 100 g de produto.

3.6.9 Determinação do conteúdo de taninos

O conteúdo de tanino foi determinado pelo método de Burns (1971) modificado por Maxson & Rooney (1972), usando catequina como padrão de tanino. Preparou-se também uma solução de HCl 8% em metanol e outra de vanilina 4% em metanol, sendo essas duas soluções misturadas equitativamente, obtendo-se assim, uma solução vanilina-HCl.

A extracção foi feita pesando-se 0,1 g de amostra de hibisco em pó, em tubos de ensaio com tampa de rosca e, adicionou-se 10 ml de 1% HCl em

metanol, tapado, agitado, e deixados na geleira por 24 horas. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 1000 rpm. Em cada tudo de ensaio adicionou-se 1 ml do extracto (amostra) e 5 ml da solução vanilina-HCl, com intervalos de 1 minuto. A leitura da absorvância em espectrofotômetro foi feita a 500 nm. Com ajuda da curva padrão de Catequina e a equação 10, determinou-se o teor de taninos.

$$\text{Taninos} \left(\frac{mg}{g} \right) = \frac{\text{Abs}_{500nm} - b}{a \times \text{massa da amostra}}$$

(Equação 10)

Onde:

b – é a ordenada na origem da curva padrão de catequina

a – é o declive da curva padrão

Abs_{500nm} – Absorbância a 500 nanômetros

3.6.10 Determinação da capacidade antioxidante dos produtos

A capacidade antioxidante foi determinada usando dois métodos: Método DPPH e Método ABTS.

3.6.10.1 Método DPPH

A capacidade antioxidante (AOx) foi determinada de acordo com os procedimentos descritos por Brand-Williams *et al.* (1995) e Arnao *et al.*, (2001), com algumas modificações. Brevemente, o radical DPPH foi diluído em metanol (1:4.5, v:v) para obter uma absorvância inicial de 1.100 ± 0.020 unidades a $\lambda = 515$ nm prévio à sua utilização. A determinação da capacidade antioxidante foi realizada a partir da reacção de 150 μ L de extracto antioxidante (hidrofílico ou lipofílico) com 2850 μ L da solução radical DPPH, durante 2h no escuro, à temperatura ambiente. Após a reacção, a redução da absorvância foi medida espectrofotometricamente a 515 nm. Uma curva padrão foi preparada utilizando Trolox como referência e os resultados expressos em equivalentes de Trolox por

100 g de produto (TEAC.100 g⁻¹), resultantes da média de *n* determinações por amostra.

3.6.10.2 Método ABTS

A capacidade antioxidante (AOx) foi determinada de acordo com os procedimentos descritos por Arnao et al., (2001), com algumas modificações. Brevemente, o radical ABTS•+ foi produzido pela reacção equitativa de ABTS (15 mM) com persulfato de potássio (4.9 mM), desenvolvida em condições de pouca luminosidade por um período mínimo de 12 h (temperatura ambiente). O radical ABTS•+ foi diluído em etanol (1:60, v:v) para obter uma absorvência inicial de 1.100 ± 0.020 unidades a λ= 734 nm previamente à sua utilização. A determinação da capacidade antioxidante foi realizada a partir da reacção de 150 µL de extracto antioxidante (hidrofílico ou lipofílico) com 2850 µL da solução radical ABTS, durante 2h no escuro, à temperatura ambiente. Após a reacção, a redução da absorvência foi medida espectrofotometricamente a 734 nm. Uma curva padrão foi preparada utilizando Trolox como referência e os resultados expressos em equivalentes de Trolox por 100 g de produto (TEAC.100 g⁻¹), resultantes da média de *n* determinações por amostra. A equação 11 foi usada para calcular a actividade pra DPPH assim como para o ABTS.

$$AOx (TEAC.100 g^{-1}) = \left(\frac{\Delta ABTS-b \text{ (ou } \Delta DPPH-b)}{m} \right) \times \left(\frac{g \text{ amostra} + mL \text{ solvente}}{g \text{ amostra}} \right) \times FD \times 100$$

(Equação 11)

AOx – Capacidade antioxidante, expressa em µM de equivalentes a Trolox por 100g de produto;

ΔABTS ou ΔDPPH – Decréscimo da Abs_{580nm} (Abs_{515nm}) pela acção dos antioxidantes;

$$\Delta DPPH = Abs_{515nm} DPPH_d - Abs_{515nm} amostra$$

$Abs_{515nm} DPPH_d$ representa a Abs da solução de trabalho de DPPH devida ao efeito de diluição introduzido pelo solvente (deverá rondar 1.03) e poderá variar durante o ensaio mas não mais do que 5%;

$$\Delta ABTS = Abs_{734nm} ABTS_d - Abs_{734nm} amostra$$

$Abs_{734nm} ABTS_d$ representa a Abs da solução de trabalho de ABTS devida ao efeito de diluição introduzido pelo solvente (deverá rondar 1.06) e poderá variar durante o ensaio mas não mais do que 5%;

b – Ordenada na origem da recta de calibração do padrão de Trolox;

m – Declive da recta de calibração do padrão de Trolox;

g amostra – massa da amostra usada;

mL de Solvente – volume do solvente usado na extracção;

FD – Factor de diluição no doseamento, caso necessário;

100 – Factor multiplicativo para expressar o resultado por 100 g de produto.

Nota: Para reportar a CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL do produto, considera-se a soma das capacidades obtidas nos extractos hidrofílicos e lipofílicos.

3.7 Determinação da estabilidade do corante a variações do pH

A avaliação da estabilidade do corante quanto ao pH foi feita através do método descrito por Tibolla *et al* (2009), submeteu-se o extracto do corante a diferentes pH's e controlou-se a variação da cor em função do pH do meio. Para a obtenção do extracto fez-se a extracção de 1 g da amostra em 20 ml de água destilada, e deixou se over night. Em seguida, uma alíquota de 2000µL foi transferida para tubos de ensaio de 15 ml, adicionou-se 8 ml de solução com pH 1, 2, 3, 4, 7, 13, 14 para cada tubo e verificou-se a cor obtida.

3.8 Avaliação da estabilidade do corante a Temperatura.

A estabilidade do corante à temperatura foi avaliada por cocção de 10 g da amostra em 100ml de água por 20min. O efeito do cozimento foi avaliado comparando-se a cor dos extratos obtidos a partir dos vegetais crus e cozidos segundo a metodologia descrita por Tibolla *et al.*, (2009).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização físico-química do *Hibiscus Sabdariffa L.*

A tabela 7 apresenta os resultados experimentais obtidos na determinação das características físico-químicas do *Hibiscus Sabdariffa L.*, o resultado final apresentado corresponde à média aritmética dos ensaios paralelos. É também apresentado o desvio padrão entre os resultados dos ensaios paralelos.

Tabela 7: Propriedades físico-químicas do *Hibiscus Sabdariffa L.*

Roselle (<i>Hibiscus Sabdariffa L.</i>)	
Análise	Resultado Experimental
Humidade amostra Fresca (%)	88,71 ± 0,44
cinzas (%)	5,22 ± 0,07
a _w (amostra seca por liofilização)	0,51 ± 0,00
Brix	6,15 ± 0,24
pH	2,30 ± 0,01
Fibra (%)	10,08 ± 0,25
Proteína (%)	1,51 ± 0,13

Humidade dos cálices frescos

O valor da humidade obtido foi de 88,71 ± 0,44 %, valor este que é maior que 85,6% reportado por Owoade *et al.* (2019) na determinação de humidade de cálices de *Hibiscus Sabdariffa L.*, Shruthi & Ramachandra (2019) reportam 88,3% para cálices verdes e 86,5% para cálices vermelhos. Juhari *et al.*, (2021) obtiveram 89,4%. Essas diferenças implicam que a humidade pode variar não

somente em função da região em que são colhidas as amostras, mas também em função do grau de maturação dos cálices, quanto mais amadurecem menor será a sua humidade, devido ao efeito de secagem parcial na sua matriz.

Uma vez que a humidade promove e favorece a proliferação de microorganismos nos alimentos, Recomenda-se o uso de técnicas adequadas para a conservação dos cálices por forma a manter a sua qualidade.

Cinzas

O teor de cinzas foi de $5,22 \pm 0,07\%$ valor este que é compatível com os valores encontrados na literatura. Na determinação de cinzas em cálices de Hibisco, Meher *et al* (2019) encontraram 4,64%, Mohamed *et al* (2012) reportou um teor de 10,60%, Karma & Chavan (2016) reportaram um valor de 4,40%, Sarhadynejad *et al* (2013) obtiveram 6,83%. Na maioria das vezes as cinzas representam toda a substância inorgânica presente na amostra, porém segundo IAL (2008) nem sempre este resíduo representa toda substância inorgânica presente na amostra, pois alguns sais podem sofrer redução ou volatilização durante o aquecimento.

Actividade da água do Hibisco Seco

O valor de actividade da água obtido foi de $0,51 \pm 0,00$. Na avaliação das propriedades de *Hibiscus sabdariffa L.* após diferentes métodos de secagem, Juhari *et al.*, (2021) obtiveram 0,727 para secagem ao sol, valores entre 0,395 a 0,482 para a secagem com ar quente e liofilização, a amostra obtida na secagem a vácuo apresentou 0,605. Ainda segundo Juhari *et al.*, (2021), a baixa actividade da água está relacionada a baixa humidade das amostras após a secagem, que foi de 10%, enquanto que a secagem ao sol foi influenciada pelas condições climáticas. Para Juhari *et al.*, (2021) materiais com teor excessivo de humidade estão susceptíveis a bactérias e fungos, segundo eles, os alimentos tornam-se seguros para o armazenamento quando a actividade de água é menor ou igual a 0,6.

Total de Sólidos Solúveis

O teor de sólidos solúveis foi de $6,15 \pm 0,24\%$, valor este que encontra-se no intervalo de valores obtidos por outros autores. Mohamed *et al* (2012) reportou um valor de 5%, Mahadevan & kamboj (2009) encontraram 6.90%; Shruthi & Ramachandra (2019) obtiveram um valor de 6,5% na determinação de sólidos solúveis de cálices de *Hibiscus Sabdariffa L.* O baixo valor mostra a baixa quantidade de sólidos que podem solubilizar em água.

Proteína

O teor de proteína obtido experimentalmente foi de $1,51 \pm 0,13 \%$, valor este que é ligeiramente menor que 1.9%, valor reportado por Owoade *et al.* (2019); mas superior a 1,145% encontrado por Mahadevan & kamboj (2009) ambos na determinação da proteína em cálices de Hibisco. O baixo valor está provavelmente relacionado ao facto de o Hibisco ser de origem vegetal. No geral, vegetais e legumes apresentam baixo valor proteico. No estudo sobre as proteínas de vegetais, Nichele (2021) reportou teores de proteínas de diferentes vegetais que variaram entre 0,11 a 1,67%.

Fibra bruta

Na determinação da fibra bruta obteve-se $10,08 \pm 0,25\%$, valor menor que 13,20% obtido por Mohamed *et al* (2012); na determinação do teor de fibra em cálices de *Hibiscus Sabdariffa L.*, Nzikou *et al* (2011) obtiveram 16,44%; Mahadevan & kamboj (2009) encontraram 12%, Shruthi & Ramachandra (2019) obtiveram 11,2% para cálices verdes e 8,5% para cálices vermelhos. Essas diferenças podem estar relacionadas às diferentes proveniências das amostras, bem como ao estado de maturação das mesmas.

Apesar da fibra não ser um nutriente e não ser digerida pelo intestino delgado, desempenha um papel preponderante na dieta humana. As fibras solúveis aumentam a viscosidade do conteúdo gastrointestinal, retardando o esvaziamento e a difusão de nutrientes, enquanto que as fibras insolúveis reduzem o tempo de trânsito intestinal, aumentam o peso das fezes, tornam mais lenta a absorção da glicose e retardam a digestão do amido; incluem a celulose, lignina, hemicelulose e algumas pectinas IAL (2008).

✚ PH

A avaliação do pH resultou num valor correspondente a $2,30 \pm 0,01$. Outros autores como Meher *et al* (2019) encontraram $\text{pH}=2,3$; Lema *et al.*, (2022) encontraram valores de pH que variaram entre 2,35 a 2,7 dependendo do tipo de vegetal. Valores estes que mostram conformidade entre o valor experimental obtido neste trabalho e os resultados obtidos por outros autores. O pH é um parâmetro importante na conservação dos alimentos, segundo Gava *et al.*, (2008) baixos valores de pH diminuem a acção microbiológica estendendo o prazo de vida útil do alimento.

✚ Cor

A tabela 8 apresenta os resultados da determinação da cor para amostra fresca (AF), amostra liofilizada (SL), amostra seca na estufa (SE) e amostra seca por atomização (SA).

Tabela 8: Resultados da determinação da Cor.

Parâmetro da Cor	Tipo de amostra			
	SL	SE	SA	AF
L	$27,47 \pm 0,16$	$28,45 \pm 0,28$	$30,2 \pm 0,1$	$26,51 \pm 0,03$
a	$16,24 \pm 0,19$	$11,53 \pm 0,16$	$26,47 \pm 0,21$	$15,47 \pm 0,05$
b	$16,37 \pm 0,10$	$17,02 \pm 0,03$	$17,2 \pm 0,03$	$16,14 \pm 0,03$
Croma	$23,06 \pm 0,21$	$20,56 \pm 0,17$	$31,57 \pm 0,21$	$22,36 \pm 0,06$
hue	$44,76 \pm 0,32$	$34,12 \pm 0,14$	$56,99 \pm 0,21$	$43,79 \pm 0,08$

Os parâmetros da cor mostraram entre si, diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). A amostra (SA) mostrou maior valor do croma, o que significa que é mais saturada do que as outras, ao mesmo tempo, a amostra (SA) apresentou maior valor de luminosidade (L^*) o que significa que apresenta maior grau de claridade. Os valores de L^* estão próximos do valor obtido por Duangmal *et al* (2008) na avaliação da cor dos extractos de *H. Sabdariffa L.* liofilizado e obteve os seguintes resultados $L^* = 29,2 \pm 1,4$; $a^* = 73,0 \pm 2,1$;

$b^*=49,9 \pm 2,4$. Os valores do croma das amostras (SL) e (SE) encontram-se no intervalo de valores obtidos por Hernandez *et al* (2018) que encontraram Croma (C) que variou de 20 a 25 e Hue (h) que variou entre 14 a 24°, porém o valor do croma da amostra (SA) está fora desse intervalo. Esta diferença pode estar relacionada ao facto da amostra (SA) ter sido obtida por um diferente tipo de secagem e também pelo facto de, a ela ter sido adicionado o amido que alterou a sua cor. Os valores do Hue (h) variam entre 44,76 a 56,99, valores esses que encontram se no intervalo de 12 a 74°Hue, apresentados por Salinas-Moreno *et al.*, (2012) para o Hibisco de México. Juhari *et al.*, (2021) determinaram a cor da amostra fresca e amostras secas por diferentes métodos e obtiveram $L^*=34,7$; $a^* = 4,5$; $b^* = 5,9$ para amostra fresca; para as amostras submetidas a diferentes tipos de secagem L^* variou de 35,2 a 39,1; a^* entre 4,5 a 11,8; b^* entre 5,8 a 8,2.

Através desses valores é possível ver que os processos de secagem alteram significativamente a cor dos alimentos, ao mesmo tempo é possível verificar que a secagem por liofilização conservou melhor a cor porque é a que deu valores mais próximos da amostra fresca.

A figura 19 mostra as imagens dos pós obtidos nos 3 tipos de secagem aplicados neste trabalho. A imagem (A) mostra o pó obtido na secagem por ar quente, (B) mostra o pó obtido na secagem por liofilização e (C) o pó obtido na secagem por atomização.

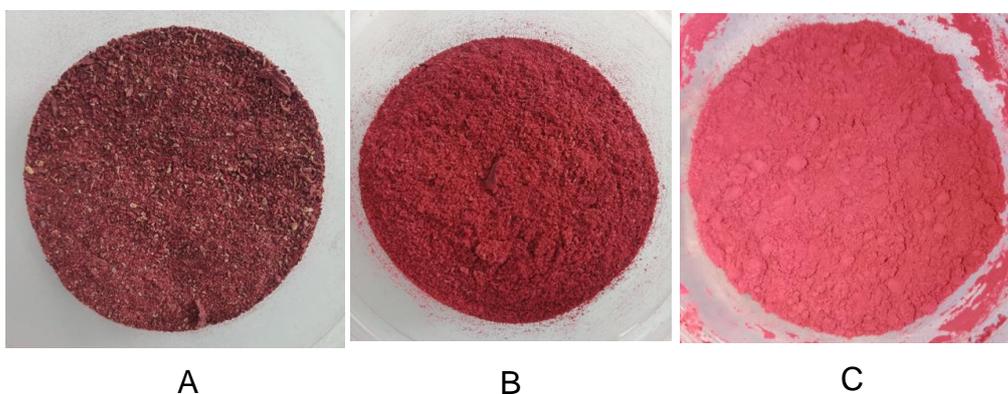


Figura 19: Pós obtidos nos 3 tipos de secagem.

Conforme mostram as imagens, a secagem por ar quente (estufa) resultou num pó com cor mais escura (baixa luminosidade) do que as outras duas, provavelmente pela degradação das antocianinas devido a exposição prolongada ao calor, a secagem por liofilização apresentou uma cor de luminosidade média e mais próxima do Hibisco fresco, enquanto que a secagem por atomização resultou numa cor mais luminosa e saturada, próxima do Rosa, devido ao facto de a ela, ter sido adicionado o amido de milho com vista a aumentar o teor de sólidos solúveis, aumentando conseqüentemente a densidade do extracto e assim optimizar o processo da atomização. Outros factores que podem estar ligados a cor rósea do pó atomizado é o facto de ter-se usado uma amostra proveniente de outro tipo de secagem (liofilização) que já tinha perdido algumas características, pelo facto de a extracção sólido-líquido ter sido feita com água destilada, sendo que recomenda-se extracção com álcoois (em particular etanol devido à sua baixa toxicidade) acidificados com 1,5 N de HCl de forma a maximizar a extracção, e o último, pode estar relacionado às altas temperaturas de secagem que se usam no Spray-Dryer.

4.2 Rendimento da Atomização

O rendimento da atomização foi de 27,44 %, o baixo valor provavelmente está relacionado ao baixo teor de sólidos solúveis do Hibisco, bem como as perdas durante o processo. O pó apresentou forte tendência de aderir às paredes do equipamento, e não foi colhido no colector acoplado ao ciclone. A figura 20 mostra algumas imagens do pó que aderiu às paredes e por conta disso não foi possível ser recuperado na totalidade, comprometendo assim o rendimento final.

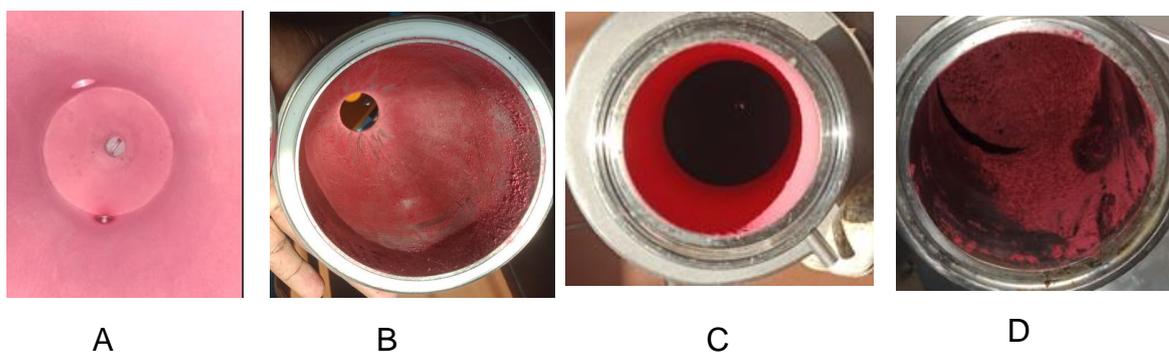


Figura 20: Ilustração da adesão do pó às paredes do equipamento.

- A – Parte interna da câmara de secagem,
- B – Parte interna do ciclone
- C – entrada do ciclone,
- D – conduta que liga a câmara de secagem ao ciclone.

O baixo rendimento pode estar também relacionado ao processo de obtenção do extracto para a posterior atomização, nesse caso usou-se como solvente extractor água destilada, enquanto que é relatado na literatura que o uso de etanol, metanol acidificados com 1,5N de HCl otimiza a extracção porém, não foi possível usar esses últimos dois solventes por serem inflamáveis e pela necessidade de evitar explosões devido as altas temperaturas de secagem usadas no Spray Dryer.

O amido de milho foi usado com vista a aumentar o teor de sólidos e assim otimizar o processo. Segundo Oliveira & Petrovick (2010) a utilização de adjuvantes como amido, maltodextrina, dióxido de Silício coloidal, ciclodextrinas entre outros, aumenta a estabilidade e a qualidade do produto, ao mesmo tempo que reduz a adesão das partículas às paredes internas do equipamento.

Na literatura são reportados outros autores que estudaram a secagem por atomização de vários vegetais, como Azevedo (2013) que fez a secagem de extractos de *Aspidosperma Pyrifolium* e *Aspidosperma Macrocarpum* onde obteve um rendimento de 48,62% e 77,62% respectivamente. Ahiduzzaman *et al.*, (2021) secaram extractos de *Hibiscus Sabdariffa L.* por atomização usando Maltodextrina como adjuvante e obtiveram rendimento de 79,41%; Vuong *et al.*, (2012) secaram extractos de *Rhamnus Purshiana* também por atomização e obtiveram rendimentos que variaram de 26,7 à 48,4% dependendo das temperaturas de entrada usadas. Em estudo da secagem de extractos de *Ilex Paraguariensis*, Yatsu *et al.*, (2011) obtiveram um rendimento de 67%.

As variações dos rendimentos estão relacionados não apenas com o tipo de amostra seca, mas também com algumas variáveis do processo como temperatura de secagem, pressão de entrada, adição do adjuvante ou agente de

secagem, o baixo teor de sólidos solúveis bem como o tipo de equipamento usado.

4.3 Compostos Bioativos e Actividade Antioxidante

A tabela 9 apresenta os resultados resumidos da determinação dos compostos Bioativos e Actividade antioxidante total.

Tabela 9: Resultados da quantificação dos compostos Bioativos e Actividade antioxidante.

Compostos Bioativos		
Análise	Valor Experimental	
Taninos (mg/100g)	169,02 ± 9,80	
CFT (mgEAG/100g)	2427,87 ± 84,44	
Flavonóides totais (mg/100g)	1204,65 ± 8,95	
Vitamina C mg/100g	97,68 ± 11,75	
Actividade Antioxidante total (µM trolox/g)		
Tipo de Amostra	Método	
	ABTS	DPPH
SL	60587,81 ± 142,89	166815,52 ± 3625,04
SE	43980,93 ± 213,35	155503,44 ± 312,17
SA	57713,88 ± 539,56	160370,86 ± 347,13

4.3.1 Antocianinas

A figura 21 apresenta os resultados comparativos obtidos na determinação das antocianinas em três amostras, os quais apresentam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

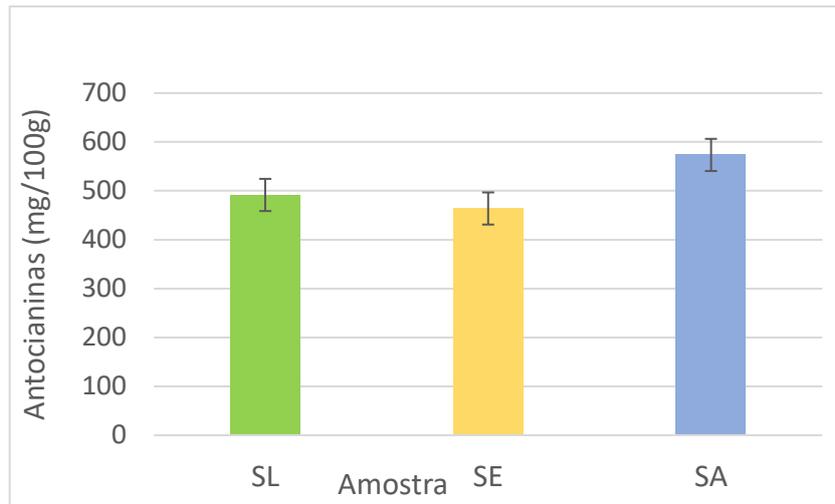


Figura 21: Comparação do teor de antocianinas das três amostras.

Conforme indicado no gráfico, a amostra obtida através da secagem por atomização (SA) apresentou maior teor de antocianinas do que a amostra obtida por liofilização (SL), que por sua vez apresentou maior teor de antocianinas do que a amostra obtida através da secagem em estufa (SE). Essas diferenças indicam que os processos de secagem afectam os constituintes dos alimentos. O alto teor de antocianinas para a amostra atomizada está relacionada ao facto de o extracto usado para a atomização ter sido obtido por extracção de 80g da amostra liofilizada em água, portanto, o extracto contém elevada concentração de antocianinas e o produto obtido ainda conserva maior teor de antocianinas do que a quantificação directa da amostra liofilizada onde usou-se apenas 0,1g para a extracção. Paralelamente, o pó atomizado possui uma granulometria muito reduzida e assim, para a mesma quantidade de massa consegue-se maior concentração de antocianinas para o pó atomizado do que para o pó proveniente dos outros dois tipos de secagem onde a granulometria é maior, e certa porção dessa massa são fibras. Wu *et al.*, (2018) estudaram as propriedades antioxidantes, estabilidade ao aquecimento e ao pH, obtiveram um valor de 361,99 mg/100g da amostra. Mgaya *et al.*, (2014) obtiveram valores entre 118,2 a 493,5 mg/100g na determinação de antocianinas em cálices de Hibisco.

4.3.2 Compostos fenólicos totais

O teor de fenóis totais encontrado foi de $2427,87 \pm 84,44$ (mgEAG/100g) valor este que está no intervalo dos valores encontrados por outros actores. Sirag *et al* (2014) fizeram a determinação dos compostos fenólicos totais em cálices de *Hibiscus Sabdariffa L.* e encontraram 4107 mgEAG/100g, Purbowati & Maksum (2019) reportaram um valor de 2377 mgEAG/100, Linares *et al.*, (2015) avaliaram os compostos fenólicos totais em variedades de Roselle (*Hibiscus Sabdariffa*) no México e encontraram valores que variaram entre 2400 a 10000 (mgEAG/1000g). Na avaliação de compostos fenólicos totais de diferentes extractos vegetais, De Souza (2013) encontrou valores que variaram entre 2449 a 20626 (mgEAG/100g). Pelas diferenças dos valores obtidos é possível verificar que os compostos fenólicos podem variar em função do local onde são colhidas as amostras e das condições climáticas. Segundo De Souza (2013) há vários factores que podem interferir no teor de metabólitos secundários das plantas, dos quais os compostos fenólicos fazem parte. Dentre eles está a sazonalidade, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, poluição atmosférica, ataque de patógenos. O alto valor obtido reforça as vantagens que podem ser adquiridas ao aplicar-se o Hibisco como corante alimentar.

4.3.3 Flavonóides totais

Para os Flavonoides foi obtido o valor de $1204 \pm 8,95$, valor este que encontra-se dentro dos valores encontrados na literatura apesar de no geral os dados encontrados na literatura variarem também entre si. Dolores *et al.*, (2018) determinaram os flavonoides presentes em algumas variedades de Roselle no México e reportaram os seguintes resultados: 1120 para Sudán, 2102 para Tecuanapa (vermelho), 2060 para Rosaliz (rosa), 2260 para Alma blanca (Branca) e 793 para Cotzalzin (rosa). Nerdy *et al.*, (2022) avaliaram os Flavonóides de duas variedades (vermelho e rosa) de Roselle (*Hibiscus Sabdariffa L.*), e encontraram os seguintes resultados: 2755mgEQ/100g para cálices vermelhos e 3918 mgEQ/100g para cálices rosas. As diferenças

provavelmente se devem a proveniência das amostras, onde podem ter sido expostas a diferentes condições climáticas.

O alto teor de flavonoides reforça não só a sua forte capacidade de actuar como antioxidante mas também a forte intensidade do vermelho do Hibisco, Sendo as antocianinas o pigmento responsável pelo vermelho do Hibisco apresentarem-se sob a forma do catião flavílico (com cor vermelha).

4.3.4 **Vitamina C (ácido ascórbico)**

O valor encontrado na determinação da vitamina C foi $97,68 \pm 11,75$ mg/100g valor este que é maior do que valores reportados por Meher *et al.*, (2019) que encontraram 56 mg/100g, Shruthi & Ramachandra (2019) que reportaram um valor de 63,5 mg/100g. Porém, é menor que 121,44mg/100g reportado por Pourbowati & Maksum (2019). Essas diferenças podem estar relacionadas ao facto da amostra ser colhida em diferentes regiões, uma vez que as propriedades químicas dos alimentos podem às vezes variar em função das regiões onde são cultivados ou condições climáticas. O valor é um bom indicador do benefício encontrado ao consumir produtos com aplicação do Hibisco.

Para Batistuzzo *et al* (2006), a Vitamina C é um nutriente essencial para o corpo humano, sendo responsável por diversas funções importantes como fortalecer o sistema imunológico, combater radicais livres (função antioxidante), ajuda na absorção do ferro, é usado para prevenir e tratar doenças como resfriados e gripes, além de contribuir para a saúde da pele.

4.3.5 **Taninos**

A análise de taninos deu um valor de $169 \pm 9,8$ (mg/100g). Pozos *et al.*, (2020) determinaram os taninos de *Hibiscus sabdariffa L.* e obtiveram valores que variaram de 34,4 a 74,5 mgECat/100g dependendo do tempo de extracção sólido-líquido, eles verificaram maior teor de taninos no tempo de extracção de 120 minutos. O alto teor de taninos explica a adstringência do Hibisco, contudo a presença destes compostos é de extrema importância pelo facto de serem um

dos responsáveis pela defesa da planta contra fungos, bactérias, vírus e insectos Nozella (2001).

4.3.6 Actividade antioxidante

Na figura 22 estão apresentados os resultados da actividade antioxidante total dos cálices de *Hibiscus sabdariffa L.* feita através dos métodos ABTS e DPPH para as amostras provenientes de três tipos de secagem: Liofilização (SL), Ar quente (SE) e secagem por atomização (SA).

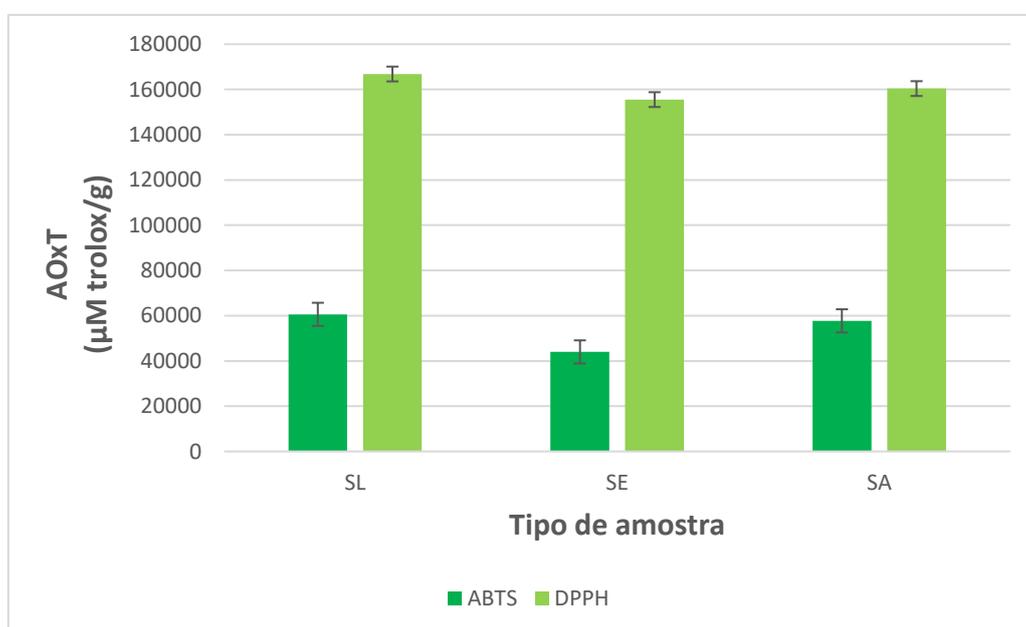


Figura 22: Gráfico comparativo dos resultados da Actividade antioxidante total pelos métodos ABTS e DPPH.

A determinação da actividade antioxidante pelo método DPPH mostrou melhores resultados em relação ao método ABTS, tendo se obtido $166815,52 \pm 3625,04$ para a amostra (SL), $155503,44 \pm 312,17$ para amostra (SE) e $160370,86 \pm 347,13$ μMTrolox/g para amostra (SA). Enquanto que a análise pelo método ABTS deu $60587,81 \pm 142$ para amostra (SL), $43980,93 \pm 213,35$ para (SE) e $57713,88 \pm 539,56$ μMTrolox/g para (SA).

Em termos estatísticos, os resultados da determinação da atividade antioxidante total pelo método ABTS apresentaram entre si diferenças

estatisticamente significativas ($p < 0,05$), o mesmo foi verificado pelo método DPPH onde também ($p < 0,05$). A comparação entre os resultados dos métodos DPPH versus ABTS, deu também resultados com diferenças significativas.

Os valores apresentados são maiores que o intervalo de valores obtidos por Salazar-González *et al.*, (2012) na determinação da actividade antioxidante de cálices de *Hibiscus Sabdariffa L.* pelo método ABTS, que variaram de 3111 a 8035 $\mu\text{Mtrolox/g}$ dependendo do solvente usado para extracção. De Souza (2013) avaliou a actividade antioxidante de diferentes extractos vegetais e encontrou um mínimo de 3040,85 $\mu\text{Mtrolox/g}$ para folha de acerola e um máximo de 13439,45 $\mu\text{Mtrolox/g}$ no extracto de Guabiroba.

As diferenças podem estar relacionadas ao alto teor de compostos bioactivos encontrado nesse trabalho, bem como à diferente proveniência das amostras, uma vez que as condições climáticas podem influenciar as propriedades químicas dos alimentos. Os altos valores reforçam o alto potencial antioxidante do Hibisco.

4.4 Estabilidade do corante ao pH e temperatura

✚ Estabilidade ao pH

Após submeter-se o extracto de Hibisco a variações de pH obteve-se os resultados mostrados na figura 23 que ilustra a cor do extracto em função do pH do meio.

pH 14 pH 13 pH 7 pH 4 pH 3 pH 2 pH 1



Figura 23: Resultado da análise da estabilidade a variações de pH.

Da imagem é possível ver que o corante manteve-se estável no intervalo de pH ácido e neutro, apresentando uma coloração vermelha e ligeiramente mais intensa em meios extremamente ácidos, ou seja em pH's de 1 e 2. Em meio básico, o corante revelou-se instável, apresentando uma coloração verde e mais intensa no pH de 14, onde a concentração do NaOH é de 1N.

Tibolla *et al.*, (2009) avaliaram a estabilidade de pigmentos naturais quanto ao pH e temperatura, e verificaram que as antocianinas sofrem modificações com o excesso de base, ocorrendo mudanças na sua cor. Segundo eles, as antocianinas exibem coloração vermelha intensa em uma faixa de pH de 1 a 3. Wahyuningsih *et al.*, (2017) estudaram o efeito do pH na estabilidade da antocianina no corante alimentar, verificaram em suas análises que as antocianinas são vermelhas a baixos pH (condições ácidas), quanto maior for o pH do meio as antocianinas sofrem degradação da cor transformando-se em amarelo, roxo e azul. Ainda segundo Wahyuningsih *et al.*, (2017) as antocianinas são estáveis a baixos valores de pH.

✚ Estabilidade a Temperatura

Após submeter-se a amostra a cocção durante 20min, obteve-se o resultado apresentado na figura 24 que mostra a comparação entre a cor entre o extracto aquecido e sem aquecimento.

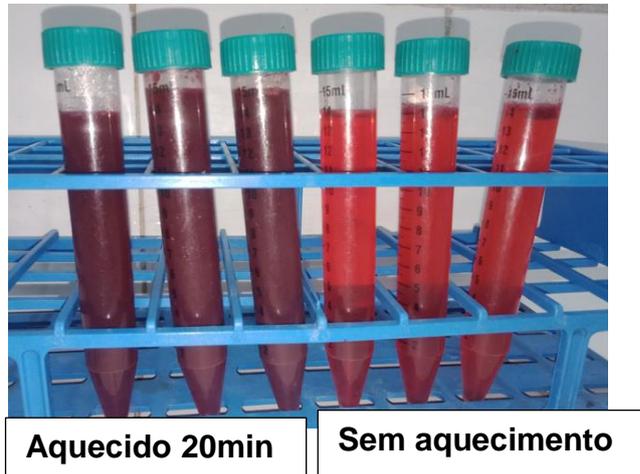


Figura 24: Comparação da cor entre amostra aquecida e não aquecida.

Da imagem é visível que o extracto obtido após o aquecimento durante 20min apresenta uma coloração degradada e escura devido a exposição ao calor, a amostra não aquecida apresenta uma coloração mais viva e clara. Sendo as antocianinas os pigmentos responsáveis pela cor vermelha do Hibisco, o aquecimento pode ter provocado a degradação destas, ou seja, são sensíveis ao calor.

Segundo Wahyuningsih *et al.* (2017) as antocianinas apresentam-se menos estáveis quando expostas ao aquecimento, provocando a perda da cor e escurecimento. Tibolla *et al* (2009) avaliaram a estabilidade de pigmentos naturais quanto ao pH e temperatura, segundo eles, as antocianinas mostraram-se sensíveis ao aquecimento tendo formado uma coloração mais escura.

5 CONCLUSÕES

- Com base nos resultados obtidos na determinação das propriedades físico-químicas e comparando-os aos dados apresentados na literatura, é possível concluir que o *H. Sabdariffa L.* têm valores consideráveis de vitamina C, fibra alimentar, cor vermelha, porém apresenta baixo teor de proteínas, sólidos solúveis e cinzas. A sua actividade de água apresentou-se abaixo de 0,6 que é o limite máximo seguro para a conservação de alimentos, o pH mostrou-se baixo, o que ajuda a diminuir a acção microbiológica estendendo o seu tempo de vida útil;
- A produção do corante natural em pó por atomização foi possível após a adição de amido ao extracto obtido através de cálices secos e triturados;
- A avaliação de fenóis totais, flavonóides totais, antocianinas totais, taninos, e actividade antioxidante total deu resultados muito satisfatórios, e os altos valores revelam a alta capacidade de reduzir radicais livres no organismo e protegê-lo contra doenças, e o alto teor de antocianinas sustenta a sua possível aplicação como corante alimentar;
- A secagem por liofilização mostrou melhores resultados na avaliação da cor, actividade antioxidante, porém apresentou baixo teor de antocianinas do que a amostra seca por atomização devido a diferenças na proporção mássica usada na extracção sólido-líquido. A secagem por ar quente apresentou cor degradada e escura, baixo teor de antocianinas e antioxidantes do que os outros dois métodos de secagem. A secagem por atomização resultou numa cor rósea, mais alto teor de antocianinas e melhor actividade antioxidante do que a amostra seca na estufa;
- O método DPPH apresentou melhores resultados do que o método ABTS, tendo apresentado quase o dobro dos valores;
- Quanto ao pH, o corante mostrou-se estável na faixa de pH 1 a 7, e mudou de cor para verde em pH 13 e 14. Pelo que pode recomendar-se o seu uso em meios ácidos;
- As antocianinas revelaram-se sensíveis ao calor, tendo apresentado uma coloração degradada e escura após o aquecimento durante 20 minutos.

6 RECOMENDAÇÕES

Para trabalhos futuros voltados a melhorar ou dar continuidade a presente pesquisa recomenda-se:

- Fazer o teste de solubilidade do corante;
- Determinar o teor de carotenoides;
- Avaliar a estabilidade do corante a luz e oxigênio;
- Estudar a influência do amido adicionado, nos compostos bioactivos, cor e actividade antioxidante total; e
- Avaliar o efeito da incorporação de diferentes tipos de amido no rendimento da atomização.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abou, A. A., Abu, S. F., & Abou, E. A. (2011). Physico-chemical properties of natural pigments (anthocynin) extracted from Roselle Calyces (*Hibiscus Sabdariffa*). *Journal of American Science*, 7(7), 445-456.
- Abreu, B. B., Marinho, A. R., Passos, J. d., Sousa, C. r., Brandão, A. d., & Araújo, R. S. (2019). *Composição Centesimal, compostos bioactivos e actividade antioxidante em cálices de Hibisco*. Univeridade Federal do Piaui, Departamento de nutrição, centro de ciências da Saúde.
- Adrian, J., Potus, J., Poiffait, A., & Dauvillier, P. (2000). *Análisis nutricional de los alimentos*. Acribia S. A.
- Ahiduzzaman, M., Jamini, T. S., & Aminul Islam, A. K. (2021). Roselle (*Hibiscus Sabdariffa* L.): Processing for Value Addition .
- Ali, B. H. (2005). phytochemical, pharmacological and toxicological aspects of *Hibiscus Sabdariffa* L. *Phytotherapy Research*, V. 19, 369-375.
- Ali, B. H., Wabel, N. A., & Blunden, G. (2005). Phytochemical, Pharmacological and toxicological aspects of *Hibiscus Sabdariffa* L.: *phytother Research*., 19(5), 91-94.
- AOAC. Official methods of analysis of association of official analytical Chemistry 16th edition. (1995). *Official methods of analysis*. Washington DC, USA.
- Armfield Industrial food technology equipment (2008). *Tall form spray drier/chiller FT80/81 - Instruction Manual*.
- Arnao, M. B. (2000). Some methodological problems in determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a pratical case. *Trends in food & Technology*, 11(11), 419-412.
- Arnao, M. B., Cano, A., & Acosta, M. (2001). The Hydrophophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*, 73, 239-244.
- Azevedo, E. P. (2013). *Atomização por Spray Dryer dos extractos de *Aspidosperma Pyrifolium* e *Aspidosperma Macrocarpum**. Universidade Federal de Alagoas, Programa de Pos-Graduação em Química e Biotecnologia.
- Batistuzzo, J. A., Itaya, M., & Eto, Y. (2006). *Formulário Médico-farmacêutico* (3 ed.). são paulo: tecnopress.

- Biehler, E., Mayer, F., Hoffman, L., Krause, E., & Bohn, T. (2010). Comparison of 3 Spectrophotometric methods for Carotenoid determination in frequently consumed fruits and vegetables. *Journal of Food Science C: Food Chemistry*, 75(1), C55-C61.
- Braga, D. C. (2019). Pedúnculos de clones de cajueiro e a relação com a adstringencia e suas subqualidades. *Fortaleza-CE*.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, 28, 25-30.
- Brasil, Agencia nacional de vigilância sanitaria (ANVISA.). (1997). *Portaria nr. 540-SVS/MS, de 27 out. 1997. Regulamento Tecnico: aditivos alimentares-definicoes, classificacao e emprego*. Brasília: Diário oficial da Uniao.
- Brat, P. T., & Amiot-Carlin, F. M. (2008). Stability and analysis of phenolic pigments. in: Socaciu, C. *Food colorants: chemical and funtional properties*, 25-109.
- Broadhead, J., Edmond, R. S., & Rhodes, C. T. (1992). The Spray Drying of pharmaceuticals. *Drug Dev Ind Pharm* 18, 1169-1206.
- Burns, R. E. (1971). Method for estimation og Tannin in Sorghum Grain. *Agronomy Journal*, 63, 511-512.
- Cabrita, L., Fossen, T., & Andersen, O. M. (2000). Colour and stability of the six common anthocyanidin 3-glucosides in aqueous splutions. *food Chemistry*, 68, 101-107.
- Camargos, J. A., & Goncalez, J. C. (2001). A colorimetrria aplicada como instrumento na elaboração de uma tabela de cores de madeira. *Brasil Florestal* (71), 30-41.
- Cao, G. H., Alessio, H. M., & Cutler, R. G. (1993). Oxigen-radical obsorbency capacity essay for antioxidants. *Free radical and Biology and and Medicine*, 14(3), 303-331.
- Castellar, R., Obón, J. M., & Fernández-López, J. A. (2003). Color properties and stability of betacynins from opnuntia fruits. *Journal of agriculture and food chemistry* (51), 2772-2776.
- Cortez, R. (2017). Natural pigments: stabilization methods of anthocynins for food applications. *Comprehensive reviews in food safety*. 16, 180-198.

- De Moraes, F. L. (2006). *Carotenóides: Características biológicas e químicas*. pós graduação, Universidade de Brasília, Brasília.
- De souza, W. (2013). *Avaliação da actividade antioxidante e compostos fenólicos de extractos vegetais*. Relatório de conclusão de curso, Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
- Ditchfield, C. (2000). *Estudo dos métodos para a medida da actividade de água*. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo.
- Doa, L. T., Takeoka, G. R., Edwards, R. H., & Berrios, J. D. (1998). Improved method for the stabilization of anthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3564-3569.
- Dolores, V.-A., Placida, C.-P., Agustin, D.-N., Francisco, P.-A., Elias, H.-C., & Marcos, S.-G. (2018). Quercetin, Kaempferol and apigenin in Roselle (*Hibiscus Sabdariffa* L.). *International Journal of advanced Research in Biological Sciences*, 62-65.
- Du, C. T., & Francis, F. J. (1973). Anthocyanins of Roselle (*Hibiscus Sabdariffa* L.). *J. Food Sci.*, 38(5), 810-812.
- Duangmal, K., Saicheua, B., & Sueeprasan, S. (2008). Colour evaluation of freeze-dried roselle extract as a natural food colorant in a model system of a drink. *LWT - Food Science and Technology*, 1437-1445.
- Duke, J. A. (1978). The quest for tolerant germplasm. *Madison: American society of Agronomy*.
- Elisângela, d. S. (2013). *Características nutricionais e fitoquímicas em diferentes preparações e apresentações de Hibiscus Sabdariffa L. (Hibisco, Vinagreira, Rosela, Quiabo-de-Angola, Caruru-da-guiné)-Malvaceae*. TCC, Porto Alegre.
- Ferreira, M. D., & Spricigo, P. C. (2001). *Colorimetria-princípios e aplicações na agricultura*.
- Francis, F. J. (1982). Analysis of anthocyanins. In: MARKAKIS, P. (Ed.), *Anthocyanins as food colors*. Academic Press, 181-207.
- Francis, F. (1989a). *Food Colorants: anthocyanins*. *Food Science and Nutrition*.
- Francis, F. J. (1989b). *Analysis of anthocyanins in foods*. In: Markakis P, *Anthocyanins as food colors*. New York: Academic Press.
- Freitas, P. A., & Stringheta, P. C. (2021). *Corantes naturais: do laboratório ao mercado* (1 ed.). Viçosa, Minas Gerais.

- Fuleki, T., & Francis, F. J. (1968). Quantitative methods for anthocyanins: 1. Extraction and Determination of total anthocyanin in cranberries. *Journal of Food Science* (33), 72-77.
- Gava, A. J., Silva, C. A., & Frias, J. R. (2008). *Tecnologia de alimentos*. São Paulo: Nobel.
- Giusti, M. M., & Jing, P. (2008). Analysis of anthocyanins. in: Socaciu, C. ed. *Food colorants: chemical and functional properties*, 429-547.
- Giusti, M. M., Rodriguez-Saona, L. E., & Wrolstad, R. E. (1999). Molar absorptivity and color characteristics of acylated and non-acylated pelargonidin-based anthocyanins. *Journal of Agricultural and food chemistry*, 47, 4631-4637.
- Gorocica-Buenfil, M. A., Fluharty, F. L., Bohn, T., Schwartz, S. J., & Loerch, S. C. (2007). Effect of low vitamin A diets with high-moisture or dry corn on marbling and adipose fatty acid composition of beef steers. *Journal of Animal Science*.
- Granato, D., & Masson, M. L. (2010). Instrumental color and sensory acceptance of soy-based emulsions: a response surface approach. *ciência e tecnologia de alimentos*. 30, 1090-1096.
- Guaratini, C. C., & Zanoni, M. V. (2000). Corantes textéis. 23, 71-78.
- Hasler. (2002). Functional foods: benefits, concerns and challenges. (*A position paper from the American Council on Science and health*). *Journal of Nutrition* 132(12), 3772-3781.
- Hernandez, C. S., Leon-felix, J., Heredia, J. B., & Tomas, O. (2018). Roselle(Hibiscus Sabdariffa L.) Cultivars Calyx produced hydroponically: Physicochemical and nutritional quality. *Chilean Journal of agricultural* .
- Instituto Adolfo Lutz (2008). *Métodos físico-químicos para análise de alimentos* (IV ed.). São Paulo.
- Islam, A. K., Jamini, T. S., Islam, A. K., & Yeasmin, S. (2021). Roselle: A functional food with high nutritional and medicinal values. *fundamental and applied agriculture*, 44-49.

- Jackman, R. L., & Smith, J. L. (1996). *Anthocyanins and betalains*. In: Hendry, G.A.F. and Houghton, J.D. eds. Blackie Academic and professional, London.
- Juhari, N. H., Martens, H. J., & Petersen, M. A. (2021). Changes in physicochemical properties and volatile compounds of Roselle (*Hibiscus Sabdariffa* L.) Calyx during different drying methods. *Molecules*.
- Karma, B. R., & Chavan, U. D. (2016). Physical properties and nutritional potentials of Indian Roselle (*Hibiscus Sabdariffa* L.) Seeds. *International Journal of current research* , 38645-38648.
- Khachik, F. (1992). Effect of food preparation on quantitative and qualitative distribution of major carotenoid constituents of tomatoes and several green vegetables. *Journal of food Science and agriculture*.(40), 390-398.
- Khafaga, E. R. (1980). Stage of maturity and quality of Roselle (*Hibiscus Sabdariffa* L. Var. *Sabdariffa*). 2. Anthocyanins . *Angew. Bot.*, 295-933.
- Kherharo, J. (1971). Senegal Bisap (*Hibiscus Sabdariffa*) or Guinea Sorrel or red sorrel. *plant med. phytother*, 277-281.
- Kilima, B. M., Remberg, S. F., & Wicklund, B. E. (2014). Physicochemical, mineral composition and antioxidant properties of Roselle (*Hibiscus Sabdariffa* L.) extract blended with tropical fruit juices. *African Journal of food Agriculture, Nutrition and Development.*, 14(3).8963-8978.
- Lema, A. A., Mahmood, N. H., Kandaker, M. M., & Nur, F. H. (2022). The effects of various drying techniques on physicochemical and nutritional qualities of (*Hibiscus Sabdariffa* L.) Roselle Calyx. *Plant Science Today*, 1-7.
- Linares, B., Roman, A., Suárez, P., Gonzáles, A., Gutiérrez, F., Carretero, S., . . . Leyva, G. (2015). Characterization of phenolic compounds, anthocyanidin, antioxidant and antimicrobial activity of 25 varieties of Mexican Roselle (*Hibiscus Sabdariffa*). *Industrial Crops and products*.
- Mahadevan, N., & Kamboj, P. (2009). *Hibiscus Sabdariffa* Linn.-An overview. *Environmental Science, Medicine*.
- Margesi, S., Kagashe, G., & Dhokia, D. (2013). Determination of Iron contents in *Hibiscus Sabdariffa* Calyces and *kigelia africana* fruit. *Scholars Academic Journal of Biosciences. (Biosci)*, 1(4), 108-111.
- Martins, M. A. (1985). *Vinagreira (Hibiscus Sabdariffa L.) uma riqueza pouco conhecida*. São Luiz: Emapa.

- Mate, A. (2022). *Avaliação dos compostos Bioativos e da actividade antioxidante do cajú (Anacardium Occidentale L.)*. Maputo: UEM, Faculdade de Engenharia, Departamento de Engenharia Química.
- Maxson, E. D., & Rooney, L. W. (1972). Evaluation of method for Tannin analysis in Sorghum Grain. *Cereal Chemistry*, 49, 719-729.
- McCaleb, R. S. (1998). Hibiscus production manual.
- McMGuire, R. G. (1992). Reporting of objective color measurements. *HortScience*, 27(12), 1254-1255.
- Meher, J. M., Keshav, A., & Mazundar, B. (2019). Rheological and functional properties of Roselle (Hibiscus Sabdariffa L.) leaves puree. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 46-55.
- Mgaya, B. K., Remberg, S. F., Chove, B. E., & Wicklund, T. (2014). Physiochemical, mineral composition and antioxidant properties of Roselle (Hibiscus Sabdariffa L.) extract blended with tropical fruit juices. *African journal of food, agriculture, nutrition and development*, 8964-8975.
- Miller, N. J., Rice-Evans, C. A., Davies, M. J., Gopinathan, V., & Milner, A. (1993). A novel method for measuring oxidant capacity and its application to monitoring antioxidant status in premature neonates. *Clinical science*, 84(4), 407-412.
- MinguezMosquera, M. I., & JarensGalan, M. (1995). Kinetics of the decolouring of carotenoid pigments. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.(67), 153-161.
- Minolta, K. (2016). Representação de espaço de cores.
- Mohamed, B. B., Sulaiman, A. A., & Dahab , A. (2012). Rosselle (Hibiscus Sabdariffa L.) in Sudan, cultivation and their uses. *Bulletion environment, pharmacology and life Sciences.*, 48-54.
- Morton, R. A. (1987). *In: Fruits of warm climates*. Maiami, USA.
- Nerdy, N., Barus, B. R., El-Matury, H. J., Ginting, S., Zebua, N. F., & Bakri, T. K. (2022). Comparison of flavonoid content and antioxidant activity in calyces of two roselle varieties (Hibiscus Sabdariffa L.). *Earth and environmental Science*.
- Nichele, S. (2021). *Tendência do consumo de proteínas vegetais e a eficiência na síntese proteica muscular: uma revisão global*. Universidade Federal de santa Catarina, Departamento de Nutrição .

- Nichenametla, S. N., Barney, T. G., & Exon, J. H. (2006). A review of the effects and mechanisms of polyphenolics in cancer. *Critical reviews in food Science and Nutrition*, (46), 161-183.
- Nozella, E. F. (2001). *Determinação de taninos em plantas com potencial forrageiro para ruminantes*.
- Nzikou, J. M., Bouanga-Kalou, G., Matos, L., Ganongo-Po, F. B., Mboungou-Mboussi, P. S., & Moutoula, F. E. (2011). Characteristics and nutritional evaluation of seed oil from Roselle (*Hibiscus Sabdariffa* L.) in Congo-Brazzaville. *Journal of Biological Sciences*, 3(2), 141-146.
- Odigie, I. P., Ettarh, R. R., & Adigun, S. A. (2003). Chronic administration of aqueous extract of *Hibiscus Sabdariffa attenuates* hypertension and reverses cardiac hypertrophy in 2K-1 Chypertensive rats. *Journal of Ethnopharmacol*, 86, 181-185.
- Oliveira, D. S. (2014a). *Nova Metodologia para extracção de compostos fenólicos de vinho tinto e avaliação da estabilidade dos extratos obtidos*. Minas gerais-Brasil: Viçosa.
- Oliveira, O. W., & Petrovick, p. R. (2010). Secagem por aspersão (Spray Drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. *Revista brasileira de farmacologia*, 20(4), 641-650.
- Oliveira, T. C. (2014b). *Principais compostos Bioactivos e capacidade antioxidante na polpa do camu-camu (*Myrciaria bubia*) em diferentes estágios de maturação*. Belém-Pará.
- Owoade, A. O., Adetuu, A., & Olorunnisola, O. S. (2019). *A review of chemical constituents and pharmacological properties of Hibiscus Sabdariffa L.* Ladoke Akintola University of Technology, Department of Biochemistry, Ogbomosho.
- Parruque, E. D. (2018). *Efeito da secagem por atomizacao do tomate nas propriedades antioxidantes e reconstituicao do pó*. Universidade Eduardo Mondlane, Departamento de Engenharia Quimica.
- Parhare, P. B., Opara, U. L., & AL-Said, F. A. (2013). Colour Measurement and analysis in fresh and processed foods: a review. *Food Bioprocess Technol*, 6, 36-60.
- Pozos, G. I., López, M. A., Nátera, J. F., Moya, C. Á., Ramírez, L. B., Silva, M. R., Radilo, J. V. (2020). Antioxidant capacity and antigenotoxic effect of

- Hibiscus sabdariffa L. extracts obtained with ultrasound-assisted extraction process. *Applied sciences*.
- Prenești, E. (2007). Antioxidant Power quantification of decoction and cold infusions of hibiscus Sabdariffa flowers. *food chemistry*, p. 433-438.
- Prior, R. L. (2004). Absorption and metabolism of anthocyanins: potential health effects. in: Meskin, M.S., et al. eds. *Phytochemicals: Mechanisms of action*(4), 1-9.
- Pourbowati, I. S., & Maksum, A. (2019). The antioxidant activity of Roselle (Hibiscus Sabdariffa L.) phenolic compounds in different variations microwave-assisted extraction time and power. *Earth and Environmental Science*, 1-6.
- Rankell, A. S., Lieberman, H. A., & Schiffman, R. F. (2001). *Secagem: Teoria prática na indústria farmacêutica* (Vol. 1). Lisboa: Caloust Gulbenkian.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an Improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9), 1231-1237.
- Ribeiro, C. S. (2014). Determinação espectrofotométrica de flavonóides totais presentes nas folhas de Arruda (Ruta graveolens L).
- Romero-Rodriguez, A., Oderiz, L. A., Hernandez, J. L., & Gandara, S. (1992). Comparaison de deux méthodes de dosage par HPLC de L'acide ascorbique dans carica pentagonal. *Sciences des aliments*, 12, 593-600.
- Salazar-González, C., Vergara-Balderas, F., Ortega-Regules, A., & Guerrero-Beltrán, J. (2012). *Antioxidant Properties and Color of Hibiscus Sabdariffa extracts*. Universidade de las Américas Puebla, Departamento de Ciencias Biológicas.
- Salinas-Moreno, Y., Zuniga-Hernandez, A. R., Jimenez-De la Torre, L. B., Serrano-Altamirano, V., & Sanchez-Feria, C. (2012). Efecto de genotipo y ambiente en la calidad fisicoquímica de variedades mexicanas de Hibiscus Sabdariffa L. *Agrociencia*, 525-541.
- Santos, N. L. (2017). Parametrização das condições de obtenção dos extratos de matrizes vegetais para utilização como aditivo em alimentos: Universidade Federal do Rio grande.
- Santos-Buelga, C., & Williamson, G. (2003). *Methods in polyphenol analysis*. Cambridge Royal Society of chemistry.

- Sarhadynejad, Z., Dogaheh, M. A., & Eslaminejad, T. (2013). An Overview of the Roselle Plant with Particular . *European Journal of Medicinal Plants*, 136-142.
- Schiozer, A. L., & Barata, L. E. (2007). Stability of natural pigments and dyes. *Fitos*.
- Schumann, S. P., Polonio, M. L., & Goncalves, E. B. (2008). Avaliação do consumo de corantes artificiais por lactentes, pré-escolares e escolares. *Ciencia e tecnologia de alimentos, campinas*. 28, 534-539.
- Schwartz, S. J., Elbe, J. H., & Giusti, M. M. (2008). Colorants. In: Damodaran, S., et al. eds. *fennema's food chemistry*, 571-638.
- Shaw, F. V. (1997). Spray Drying as an alternative granulation technique. IN: Parikj DM. *Handbook of Pharmaceutical Granulation Technology*, 75-96.
- Shewfelt, R. L., Thai, C. M., & Davis, J. W. (1988). Prediction of changes in color of tomatoes during ripening different constant temperatures. *Journal of Food Science*.(53), 1433-1437.
- Shruthi, C. T., Udaykumar, N., Hiregoudar, S., Nagarajnaik, & Kuruba, A. R. (2016). Roselle (*Hibiscus Sabdariffa* L.) as a source of natural colour. *PlantArchives*, 2, 515-522.
- Shruthi, V. H., & Ramachandra, C. T. (2019). Roselle(*Hibiscus Sabdariffa* L.) Calyces: a pontential source of natural color and its Health Benefits. *Food Bioactives*, 169-190.
- Sindi, H. A. (2013). *Bioactivity of anthocynins from Hibiscus sabdariffa*. TCC, University of Leeds, School of Food Science and Nutrition, Leeds.
- Sirag, N., Elhadi, M., Algaili, M., Hassan, M., & Ohaj, M. (2015). Determination of total phenolic content and antioxidant activity of Roselle(*Hibiscus Sabdariffa* L.) calyx ethanolic extract . *Standard Research journal of pharmacy and Pharmacology* , 34-37.
- Stinco, C. M. (2019). Effect of high-pressure processing on carotenoids profile, colour, microbial and enzymatic stability of cloudy carrot juice. *Food chemistry*.(299).
- Stringheta, P. C. (2021). *Corantes naturais do laboratório ao mercado*. São Paulo, Brasil: MG.

- Swain, T., & Hillis, W. E. (1959). The Phenolic constituents of *Prunus domestica* 1. The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 10, 63-68.
- Takatsui, F. (2011). *Sistema CIE LAB: analise computacional de fotografias*. dissertacao de mestrado, Universidade Estadual Paulista, sao paulo.
- Talcott, S. T., & Howard, L. R. (1999). Phenolic autoxidation is responsible for color degradation in processed carrot puree. *Journal of Agricultural and Food Science*, 47, 2109-2115.
- Tibolla, H., Silveira, C. M., Prigol, E., Zanatta, M., Cristina de Costa, M., Montagna, P. S., & Folle, T. (2009). Estabilidade de pigmentos naturais quanto ao pH e temperatura. *VI simposio de alimentos*.
- Tiveron, A. p. (2010). *Actividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil*. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.
- Vizzotto, M., Pereira, M. c., & Castilho, P. M. (2015). Compostos bioactivos e actividade antioxidante em cálices de Hibisco (*Hibiscus Sabdarifa* L.). *ResearchGate*, 2-8.
- Vuong, Q. V., Golding, J. B., Nguyen, M. H., & Roach, P. D. (2012). Preparation of decaffeinated and rich caffeine powders from green tea. *Trans IChemE*.
- Wahyuningsih, S., Wulandari, L., Wartono, M. W., Munawaroh, H., & Ramelan, A. H. (2016). The effect of pH and color stability of anthocyanin on food colorant. *Materials Science and engineering*, 2-9.
- Wrolstad, R. E. (2005). *Handbook of food analytical chemistry hoboken*. New Jersey: Wiley-Interscience.
- Wu, H.-Y., kai-Min, Y., & Chiang, P.-Y. (2018). Roselle Anthocyanins: Antioxidant properties and Stability to Heat and pH. *Molecules*, 1-13.
- Yatsu, F. K., Borhhetti, G. S., & Bassani, V. L. (2011). Technological Characterization and Stability og *ILex Paraguariensis* St. Hil Aquifoliaceae (Maté) Spray-Dried Powder. *Journal of Medicinal Food*, 14(4), 413-419.
- Zanoni, M. V., & Yamanaka, H. (2016). *Corantes: caracterização química, toxicológica, métodos de obtenção e tratamento*. (1 ed.). são paulo: Cultura academica.

<https://wendiland.com/products/roselle-hibiscus-seeds>

Anexos

A. ANEXO 1: Determinação de compostos Bioactivos

✚ Quantificação de Taninos.

Determinação do conteúdo de tanino pelo método de Burns (1971) modificado por Maxsom e Rooney (1972), usando catequina como padrão de tanino. A D-catequina será usada como padrão para determinação de tanino condensado.

Procedimento.

- (1) Pesar cerca de 0,1g de gervão-roxo em triplicata em tubos de ensaio com tampa de rosca e extrair com 10ml de HCl 1% em metanol por 24 horas em temperatura ambiente com agitação mecânica.
- (2) Após agitar por 24 horas e, em seguida, centrifugar a 1000 RPM por 5 minutos.
- (3) Misturar 1ml do sobrenadante com 5ml do reagente vanilina-HCl (preparado combinando volume igual de HCl concentrado a 8% em metanol e vanilina a 4% em metanol) e deixe a mistura repousar por 20 minutos para completar a reacção.

Preparação da solução padrão.

- (1) Pesar 4mg de D-catequina e dissolver em 100ml de HCl 1% em metanol para usar como solução estoque.
- (2) Pegue 0; 1,2; 2,4; 3,6; 4,8 e 6,0 ml da solução estoque no tubo de ensaio e ajuste o volume de cada tubo de ensaio para 10ml com HCl 1% em metanol.
- (3) Adicione 5ml de reagente vanilina-HCl em cada tubo de ensaio.
- (4) Após 20 minutos, meça a absorbância das soluções de amostra e a solução padrão a 500nm usando água para zerar o espectrofotômetro, e
- (5) Construa a curva de calibração a partir da série da solução padrão e faça uma curva padrão de absorbância vs. Concentração e a

inclinação e a interceptação serão usadas para o cálculo de acordo com a seguinte relação:

$$Taninos \left(\frac{mg}{100g} \right) = \left(\frac{Abs_{500nm} - b}{I \times w} \right) \quad \text{Equação A1- 1}$$

Onde:

- Abs_{500nm} – absorbância a 500 nm obtido após o doseamento;
- B – ordenada na origem da recta de calibração do padrão de D-catequina;
- I – Declive da recta de calibração de D-catequina;
- w – Massa inicial de amostra.

Quantificação do teor de fenólico total.

Descrição da técnica

A técnica utilizada para a determinação do conteúdo fenólico total baseia-se no método descrito por Swain & Hillis (1959). O extracto é obtido por homogeneização da amostra em metanol (1:4, p:v) e incubação *overnight* (16-18 h) a 5 °C. Posteriormente, procede-se à centrifugação da mistura (19 000 g, 15 min a 4 °C), reservando-se o extracto metanólico límpido. O doseamento envolve a diluição de 150 µL do extracto metanólico em 2400 µL água nanopura, seguido pela adição de 150 µL do reagente de Folin-Ciocalteu diluído (0.25 N). A mistura é incubada durante 3 min (temperatura ambiente), seguindo-se a adição de 300 µL Na₂CO₃ a 1 N e incubação durante 2 h no escuro (temperatura ambiente). As leituras espectrofotométricas são realizadas a λ 725 nm, sendo o conteúdo fenólico total expresso em mg de equivalentes de ácido gálico.100 g⁻¹ de tecido, resultante da média de *n* determinações por amostra.

a) Extração:

- (1) Homogeneizar em polytron 0,1 g de produto em 20 ml de MeOH (100%) e reservar o homogeneizado a 4° - 5 °C *overnight* (12 – 24h);
- (2) Centrifugar o homogeneizado (19000 rpm x 15 min x 4 °C - Sorvall RC5C, rotor SS34, Sorvall® Instruments);
- (3) Recuperar o sobrenadante (extracto metanólico);

b) Doseamento:

- (4) Diluir 150 µl do extracto metanólico (e 150 µl de MeOH 100%, correspondente ao branco da reacção) em 2400 µl H₂O nanopura;
- (5) Adicionar 150 µl de 0,25 N reagente de Folin;
- (6) Agitar/misturar e incubar (i.e., permitir a reacção) durante 3 min;
- (7) Adicionar 300 µl de 1 N Na₂CO₃;
- (8) Agitar/misturar e incubar (i.e., permitir a reacção) durante 2 h no escuro;
- (9) Realizar as leituras espectrofotométricas a 725 nm;

[NOTA: caso a Abs_{725nm} > 0,600, proceder à diluição do extracto metanólico (em 100% MeOH) e repetir o doseamento].

c) Calibração:

- 1) Preparar padrões de ácido gálico numa gama de concentrações entre 0,0 e 0,60 mg.ml⁻¹;
- 2) Proceder ao doseamento como descrito no ponto b).

d) Expressão dos resultados:

$$\text{CFT (mg EAG.100 g}^{-1}\text{)} = \left(\frac{\text{Abs}_{725\text{nm}} - b}{m} \right) * \left(\frac{\text{volume ext fenólico}}{\text{peso amostra}} \right) * \text{FD} * 100$$

Equação A1- 2

Em que:

- CFT** Conteúdo fenólico total expresso em mg de equivalentes a ácido gálico (EAG) por 100 g de produto
- Abs725nm** Valor de Abs a 725 nm obtido após o doseamento
- B** Ordenada na origem da recta de calibração do padrão de ácido gálico
- M** Declive da recta de calibração do padrão de ácido gálico
- Volume ext fenólico** volume de solvente [20 ml] + volume de amostra [0,1 g], em que se considera o volume da amostra equivalente à respectiva massa (assume-se $\rho = 1 \text{ g.ml}^{-1}$)
- Peso amostra** Toma inicial de amostra [0,1 g]
- FD** Factor de diluição no doseamento, caso necessário, isto é, usa-se 0.15 ml (150 μl ; FD=1) de extracto para a reacção, mas na eventualidade da $\text{Abs}_{725\text{nm}} > 0,600$, procede-se à respectiva diluição em MeOH.
- Exp:
- Diluir o extracto duas (1:1) vezes [0.075 ml de extracto + 0.075 ml de metanol] equivale a um FD de $(0.15/0.075) = 2$.
- 100** Factor multiplicativo para expressar o resultado por 100 g de produto.

e) Soluções necessárias:

- i. *Metanol (MeOH) a 100%;*
- ii. *0,25 N Reagente Folin-Ciocalteu (equivalente a uma diluição de 1:8, v:v)*

Diluir 12,5 ml de Reagente de Folin (comercialmente disponível na concentração de 2 N [Sigma]) em 100 ml de H₂O nanopura. Esta solução é estável à temperatura ambiente por um período que não

exceda 1 mês em condições de opacidade (preparar em vidro escuro ou proteger o balão com papel de prata).

iii. *1 N Na₂CO₃*;

Dissolver 5,29 g de Na₂CO₃ (anidro) em 100 ml de H₂O nanopura. A solução é estável à temperatura ambiente.

Verificar se o Na₂CO₃ disponível é anidro [MM=105,98 g/mol], monohidratado [MM=124,00 g/mol] ou decahidratado [MM=286,14 g/mol] e refazer os cálculos da toma, caso necessário.

Para determinar a concentração 1 N:

1 N Na₂CO₃ significa que se pretende preparar uma solução de 1 equivalente grama (eq-g) por litro, logo é necessário determinar quanto de Na₂CO₃, em massa, são 1 eq-g. O Na₂CO₃ tem dois equivalentes, duas cargas positivas e duas cargas negativas, logo:

2 eq-g correspondem a 105,98 g (MM) então 1 eq-g corresponde a x, com $x = [(1 \text{ eq-g} \times 105,98) / 2 \text{ eq-g}] = 52,99$ g de Na₂CO₃ por litro de solução.

iv. *Padrões de ácido gálico (GA) (teórico)*

- a. Solução padrão Mãe na concentração de 0,600 mg.ml⁻¹: v Pesar 6 mg de ácido gálico e dissolver em 10 ml de MeOH;
- b. Soluções padrão na gama 0,004 – 0,600 mg/ml (seleccionar o aplicável).

B. Anexo 2: Determinação da actividade antioxidante pelos métodos ABTS E DPPH.

✚ Quantificação da capacidade antioxidante pelo método ABTS (Redução do radical 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazilino-6-sulfonato)).

A capacidade antioxidante (AOx) foi determinada de acordo com os procedimentos descritos por Arnao et al., (2001), com algumas modificações.

a) Extração:

- (1) Pesar 0,1 g de produto e adicionar um dos seguintes solventes:
 - 20 ml de MeOH (100%) para a determinação da capacidade antioxidante hidrofílica;
 - 20 ml de diclorometano (100%) para a determinação da capacidade antioxidante lipofílica;
- (2) Homogeneizar em polytron. Os extractos hidrofílicos deverão ser reservados a 4° - 5 °C overnight (12 – 24 h). Aos extractos lipofílicos dever-se-á permitir a separação de fases (poderá ser por centrifugação, como descrito no passo 3);
- (3) Centrifugar o homogeneizado hidrofílico (19000 rpm x 15 min x 4 °C - Sorvall RC5C, rotor SS34, Sorvall® Instruments) e recuperar o sobrenadante (extracto metanólico);

b) Doseamento:

- (4) Diluir uma alíquota de 150 µl do extracto aquoso ou orgânico (e 150 µl de MeOH ou diclorometano, correspondente ao branco da reacção para determinação do factor de correcção devida à diluição) em 2850 µl da solução ABTS de trabalho (ABTS_{working});

(Nota 1: os extractos podem ser analisados de imediato ou armazenados a -20 °C para análise posterior)

(Nota 2: Verificar se a ABTS_{working} apresenta uma Abs_{734nm} de 1.1 ± 0.02)

- (5) Incubar as misturas reactivas (temperatura ambiente) em condições de obscuridade;
- (6) Transferir a mistura reactiva para cuvettes de vidro e realizar as leituras espectrofotométricas a 734 nm periodicamente (intervalos de 30 min) até obter leituras sem diferenças significativas. Nesta situação atinge-se o “steady state”, tomando-se o valor de Abs final para o cálculo da capacidade antioxidante total.

(Nota: caso a Abs_{734nm} < 0,2, proceder à diluição do extracto no respectivo solvente e repetir o doseamento).

c) Calibração:

- (7) Preparar padrões de Trolox numa gama de concentrações entre 82 e 10000 µM;
- (8) Proceder ao doseamento como descrito no ponto b).

d) Expressão dos resultados:

- (9) Calcular o decréscimo na Abs acometida aos antioxidantes:

$$\Delta ABTS = Abs_{734nm} ABTS_d - Abs_{734nm} amostra$$

- $\Delta ABTS$ representa o decréscimo da Abs pela acção dos antioxidantes;
- $Abs_{580nm} ABTS_d$ representa a Abs da solução de trabalho de ABTS devida ao efeito de diluição introduzido pelo solvente (deverá rondar 1.06) e poderá variar durante o ensaio mas não mais do que 5%;
- $Abs_{580nm} amostra$ representa a Abs da amostra após reacção.

(10) Estimar a capacidade antioxidante, expressa em equivalentes de Trolox, por interpolação da respectiva curva de calibração:

$$AOx (TEAC.100 g^{-1}) = \left(\frac{\Delta ABTS - b}{m} \right) * \left(\frac{g amostra + mL solvente}{g amostra} \right) * FD * 100$$

Equação A2- 1

Em que:

AOx	Capacidade antioxidante, expressa em μM de equivalentes a Trolox por 100 g de produto
$\Delta ABTS$	decréscimo da Abs_{580nm} pela acção dos antioxidantes
B	Ordenada na origem da recta de calibração do padrão de Trolox
M	Declive da recta de calibração do padrão de Trolox
g amostra	Toma inicial de amostra [5 g]
mL solvente	Volume de solvente [20 ml]
FD	Factor de diluição no doseamento, caso necessário, isto é, usa-se 0.15 ml (150 μl ; FD=1) de extracto para a reacção, mas na eventualidade da $Abs_{734nm} < 0,200$, procede-se à respectiva diluição no solvente adequado.

Exp:

Diluir o extracto duas (ou mais) vezes [0.075 ml de extracto + 0.075 ml de solvente] equivale a um FD de $(0.15/0.075) = 2$.

100

Factor multiplicativo para expressar o resultado por 100 g de produto.

Caso os cálculos da capacidade antioxidante sejam efectuados considerando um tempo de reacção de apenas 30 min, reporta-se a capacidade antioxidante como CAPACIDADE ANTIRADICAL RELATIVA;

Caso os cálculos da capacidade antioxidante sejam efectuados considerando um tempo de reacção em que já não se verifica qualquer alteração significativa na Abs734nm, reporta-se a capacidade antioxidante como CAPACIDADE ANTIOXIDANTE;

Para reportar a CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL do produto, considera-se a soma das capacidades obtidas nos extractos hidrofílicos e lipofílicos.

e) Soluções necessárias

- i. Metanol (MeOH) a 100% e/ou Diclorometano a 100%*
- ii. Etanol (EtOH) a 100%*
- iii. Solução-mãe de ABTS (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazilina-6-sulfonate))*

Mistura equitativa do reagente A e B incubada overnight. A mistura tem uma validade reduzida (~16h), pelo que é necessário preparar diariamente.

Reagente A - Dissolver 78,4 mg de ABTS em 10 ml de água nanopura.

Esta solução pode ser armazenada ao abrigo da luz à temperatura ambiente por um período de uma semana.

Reagente B - Dissolver 26,4 mg de persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$) em 20 ml de água nanopura. Esta solução pode ser armazenada ao abrigo da luz à temperatura ambiente por um período de uma semana.

- iv. Solução de trabalho de ABTS*+ ($ABTS_{working}$)*

A partir da solução-mãe ABTS, tomar 1 ml e adicionar 60 ml EtOH. Verificar se a Abs_{734nm} é de 1.1 ± 0.02 (autozero do espectrofotómetro realizado com EtOH). Caso necessário, adicionar EtOH até obter a Abs exigida.

v. *Padrões de Trolox (teórico)*

Solução padrão Mãe na concentração de 10 000 µM:

Dissolver 25 mg de Trolox em 10 ml de solvente (MeOH, no caso de AOx hidrofílica; Diclorometano, no caso de AOx lipofílica).

✚ Quantificação da capacidade antioxidante pelo método DPPH (Redução do radical 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl).

A capacidade antioxidante (AOx) foi determinada de acordo com os procedimentos descritos por Brand-Williams et al. (1995) e Arnao et al., (2001), com algumas modificações.

a. Extracção:

(1) Pesar 0,1 g de produto e adicionar um dos seguintes solventes:

- 20 ml de MeOH (100%) para a determinação da capacidade antioxidante hidrofílica;
- 20 ml de diclorometano (100%) para a determinação da capacidade antioxidante lipofílica;

(2) Homogeneizar em polytron. Os extractos hidrofílicos deverão ser reservados a 4° - 5 °C overnight (12 – 24 h). Aos extractos lipofílicos dever-se-á permitir a separação de fases (poderá ser por centrifugação, como descrito no passo 3);

(3) Centrifugar o homogeneizado hidrofílico (19000 rpm x 15 min x 4 °C - Sorvall RC5C, rotor SS34, Sorvall® Instruments) e recuperar o sobrenadante (extracto metanólico);

b. Doseamento:

- (4) Diluir uma alíquota de 150 µl do extracto aquoso ou orgânico (e 150 µl de MeOH ou diclorometano, correspondente ao branco da reacção para determinação do factor de correcção devida à diluição) em 2850 µl da solução DPPH de trabalho (DPPH_{working});

(Nota 1: os extractos podem ser analisados de imediato ou armazenados a -20 °C para análise posterior)

(Nota 2: Verificar se a DPPH_{working} apresenta uma Abs_{515nm} de 1.1 ± 0.02)

- (5) Incubar as misturas reactivas (temperatura ambiente) em condições de obscuridade;
- (6) Transferir a mistura reactiva para cuvettes de vidro e realizar as leituras espectrofotométricas a 515 nm periodicamente (intervalos de 30 min) até obter leituras sem diferenças significativas. Nesta situação atinge-se o “steady state”, tomando-se o valor de Abs final para o cálculo da capacidade antioxidante total.

(Nota: caso a Abs_{515nm} < 0,2, proceder à diluição do extracto no respectivo solvente e repetir o doseamento)

c. Calibração:

- (7) Preparar padrões de Trolox numa gama de concentrações entre 82 e 10000 µM;
- (8) Proceder ao doseamento como descrito no ponto b).

d. Expressão dos resultados:

- (9) Calcular o decréscimo na Abs acometida aos antioxidantes:

$$\Delta DPPH = Abs_{515nm} DPPH_d - Abs_{515nm} amostra$$

- $\Delta DPPH$ representa o decréscimo da Abs pela acção dos antioxidantes;
- $Abs_{515nm} DPPH_d$ representa a Abs da solução de trabalho de DPPH devida ao efeito de diluição introduzido pelo solvente (deverá

rondar 1.03) e poderá variar durante o ensaio mas não mais do que 5%;

➤ **Abs_{515nm} amostra** representa a Abs da amostra após reacção

(10) Estimar a capacidade antioxidante, expressa em equivalentes de Trolox, por interpolação da respectiva curva de calibração:

$$AOx (\mu M \text{ eq. Trolox. } 100 \text{ g}^{-1}) = \left(\frac{\Delta DPPH - b}{m} \right) * \left(\frac{\text{g amostra} + \text{mL solvente}}{\text{g amostra}} \right) * FD * 100$$

Equação A2- 2

Em que:

AOx Capacidade antioxidante, expressa em μM de equivalentes a Trolox por 100 g de produto

$\Delta DPPH$ decréscimo da Abs_{515nm} pela acção dos antioxidantes

b Ordenada na origem da recta de calibração do padrão de Trolox

m Declive da recta de calibração do padrão de Trolox

g amostra Toma inicial de amostra [5 g]

mL solvente Volume de solvente [20 ml]

FD Factor de diluição no doseamento, caso necessário, isto é, usa-se 0.15 ml (150 μl ; FD=1) de extracto para a reacção, mas na eventualidade da Abs_{515nm} < 0,200, procede-se à respectiva diluição no solvente adequado.

Exp:

Diluir o extracto duas (ou mais) vezes [0.075 ml de extracto + 0.075 ml de solvente] equivale a um FD de (0.15/0.075) = 2.

100 Factor multiplicativo para expressar o resultado por 100 g de produto.

Caso os cálculos da capacidade antioxidante sejam efectuados considerando um tempo de reacção de apenas 30 min, reporta-se a capacidade antioxidante como CAPACIDADE ANTIRADICAL RELATIVA;

Caso os cálculos da capacidade antioxidante sejam efectuados considerando um tempo de reacção em que já não se verifica qualquer alteração significativa na Abs_{515nm}, reporta-se a capacidade antioxidante como CAPACIDADE ANTIOXIDANTE;

Para reportar a CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL do produto, considera-se a soma das capacidades obtidas nos extractos hidrofílicos e lipofílicos.

e. Soluções necessárias

i. Metanol (MeOH) a 100% e/ou Diclorometano a 100%

ii. Solução-mãe de DPPH (2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl)

Dissolver 24 mg de DPPH em 100 ml de MeOH. Esta solução pode ser armazenada ao abrigo da luz a -20 °C por um período de uma semana.

iii. Solução de trabalho de DPPH (DPPH_{working})

A partir da solução-mãe DPPH (permitir que esteja à temperatura ambiente), tomar 10 ml e adicionar 45 ml MeOH. Verificar se a Abs_{515nm} é de 1.1 ± 0.02 (autozero do espectrofotómetro realizado com MeOH). Caso necessário, adicionar MeOH até obter a Abs exigida.

iv. Padrões de Trolox (teórico)

Solução padrão Mãe na concentração de 10 000 µM:

Dissolver 25 mg de Trolox em 10 ml de solvente (MeOH, no caso de AOx hidrofílica; Diclorometano, no caso de AOx lipofílica)

Soluções padrão na gama 82 – 10000 µM (seleccionar o aplicável).

C. ANEXO 3: Determinação de propriedades físico-químicas

✚ Determinação de fibra alimentar

O teor de fibra foi determinado com base no método de Weende descrito por Adrian *et al* (2000). Nesta metodologia, o resíduo final, subtraído do peso das cinzas, é designado de celulose bruta, sendo constituído por lenhina e uma fracção da celulose da amostra. Na verdade este valor é muito inferior a massa do ingestível glucídico. De acordo com Adrian *et al* (2000), as perdas de glúcidos ingestíveis devem-se principalmente, ao tratamento alcalino, que solubiliza, sobretudo as hemiceluloses.

A quantificação de fibra bruta consistiu de 4 etapas, digestão ácida, digestão básica, secagem na estufa a 105°C e incineração na mufla a 550°C.

a. Digestão ácida

Pesou-se 1g de amostra que ficou 24 horas na estufa a 105°C e introduziu-se num erlenmeyer de 500ml, adicionou-se 150 ml de H₂SO₄ (0,128M), aqueceu-se e a partir do momento em que iniciou a ebulição começou-se a contagem do tempo e deixando-se ebulir por 30 minutos. Finda a ebulição, filtrou-se a amostra com auxílio de bomba a vácuo e funil de goosh, em seguida fez-se 3 lavagens com 30ml de água destilada cada, para eliminar todos os traços alcalinos na amostra.

b. Digestão básica

Depois da filtração levou-se novamente a amostra para o erlenmeyer e adicionou-se 150ml de KOH (0,223M), aqueceu-se durante 30 minutos contados a partir do momento que iniciou a ebulição. Após a ebulição, filtrou-se com auxílio de bomba a vácuo e funil de goosh, em seguida fez-se três lavagens com 30ml de água destilada a cada lavagem, para eliminar todos traços alcalinos na amostra.

c. Secagem na estufa

Depois da filtração a amostra foi colocada no cadinho previamente lavado, seco, e pesado. Introduziu-se na estufa a 105°C durante duas horas, depois

retirou-se da estufa e arrefeceu-se no exsicador por 30 minutos e pesou-se (G_1) com ajuda de uma balança analítica.

d. Incineração na mufla

Introduziu-se na mufla os cadinhos contendo amostra proveniente da secagem, e incinerou-se a 550°C durante 3 horas. Após desligou-se a mufla e deixou-se arrefecer até 100°C , atingida essa temperatura, retirou-se o cadinho com a amostra e arrefeceu-se no exsicador por 30 minutos e pesou-se (G_2) usando balança analítica.

Calcula-se o teor de celulose bruta, expresso em % de massa da amostra original, usando a equação 6 ou a equação 7 para o cálculo na base húmida.

$$\% \text{ Celulose bruta} = [(G_1 - G_2) \times 100] \quad (\text{Fibra na base húmida})$$

Equação A3- 1

$$\text{Fibra (base seca)} = \left(\frac{\% F_H}{100} - \% H_A \right) \times 100$$

Equação A3- 2

Onde: G_1 – peso do cadinho após a estufa (g), G_2 – peso do cadinho após a mufla (g), m – massa da amostra (g), H_A – humidade da amostra, F_H – fibra na base húmida.

Determinação de proteína

O teor de proteínas foi determinado pelo método Kjeldahl descrito pelo IAL (2008), o procedimento consiste de três fases: Digestão, Destilação, e Titulação. Na digestão pesou-se 1 g da amostra em 3 tubos de digestão e adicionou-se um comprimido Kjeldahl, 15ml de ácido sulfúrico e 7ml de água destilada em cada tudo. No quarto tubo (sem amostra), adicionou-se as mesmas quantidades do comprimido Kjeldahl, ácido sulfúrico e água destilada. O bloco de digestão foi ligado e aquecido a 420°C durante 45 minutos.

Na Destilação, Foi preparada uma solução de NaOH 40%, onde primeiro foram pesados 400g de NaOH que em seguida foram colocados num balão de 1L, com adição de água destilada para perfazer esse volume. Em seguida, uma mistura de 0,1g de vermelho dimetil e 0,15g de verde de bromocresol foram dissolvidos num balão de 100mL de metanol, e retirados 7mL da solução para adicionar ao ácido bórico 2%. O equipamento de destilação de proteína está programado para 10mL de solução de NaOH, então foram colocados três vezes para ter 30mL na amostra. A amostra foi destilada por um determinado período de tempo.

Na Titulação Foi colocado ácido clorídrico na bureta a 1,4mL, e adicionado gradualmente à amostra destilada, agitando o recipiente que o contém, até mudar de cor para amarelo.

A Percentagem de Nitrogénio é calculada pela

$$\%N_2 = \frac{(V - B) \times N \times F \times 0,14 \times 100\%}{W}$$

Equação A3- 3

Onde:

V – volume do HCl gastos na titulação da amostra (ml), B – volume de HCl gastos no ensaio em branco (1,4 ml), W – peso da amostra em gramas; N – normalidade do HCl (0,1N); F – factor de correcção (F=10).

Cálculo da proteína bruta (PB)

$$\%PB = \%N_2 \times 6,25$$

Equação A3- 4

Onde 6,25 é o factor de conversão.

Apêndices

1. APÊNDICE 1: Resultados das propriedades físico-químicas dos cálices do *Hibiscus Sabdariffa L.*, e rendimento da atomização.

Neste apêndice são apresentados os resultados experimentais obtidos na determinação das propriedades físico-químicas de cálices de *Hibiscus Sabdariffa L.*

Tabela Ap1-1: Resultados da determinação da humidade.

Humidade (amostra fresca)						
Amostra	Réplica	Cadinho (g)	Amostra Humida (g)	Cadinho + amostra seca (g)	amostra seca (g)	Humidade (%)
A	1	44,8215	3,0418	45,1559	0,3344	89,0065
	2	42,4547	3,0316	42,8031	0,3484	88,5077
	3	36,3785	3,0232	36,7416	0,3631	87,9895
Média A						88,5013
B	1	38,7535	3,0003	39,09	0,3365	88,7845
	2	42,3467	3,0113	42,6685	0,3218	89,3136
	3	25,4051	3,0117	25,7214	0,3163	89,4976
Média B						89,1986
C	1	25,09	3,0145	25,4412	0,3512	88,3496
	2	27,9263	3,019	28,2763	0,35	88,4068
	3	29,1522	3,0139	29,497	0,3448	88,5597
Média C						88,4387
Média Global (n=3)						88,7128
Desvio padrão						0,4218

Tabela Ap1-2: Resultados de cinzas.

Cinzas (Amostra Fresca)						
Amostra	Réplica	Cadinho (g)	Amostra Humida (g)	Cadinho + Cinzas	Cinzas (g)	Cinzas (%)
A	1	44,8215	3,0418	44,973	0,1515	4,9806
	2	42,4547	3,0316	42,6131	0,1584	5,2250
	3	36,3785	3,0232	36,537	0,1585	5,2428
Média A						5,1495

B	1	38,7535	3,0003	38,917	0,1635	5,4495
	2	42,3467	3,0113	42,4976	0,1509	5,0111
	3	25,4051	3,0117	25,5671	0,162	5,3790
Média B						5,2799
C	1	25,09	3,0145	25,2514	0,1614	5,3541
	2	27,9263	3,019	28,083	0,1567	5,1905
	3	29,1522	3,0139	29,309	0,1568	5,2026
Média C						5,2490
Média (n=3)						5,2261
Desvio padrão						0,0682

Tabela Ap1-3: Resultados de Brix. (Sólidos solúveis).

Sólidos solúveis (Brix)					
Amostra	Réplica	nD	Brix	T(°C)	Bx-TC
A	1	1,3337	6,1	27,1	1
	2	1,3339	6,6	27,2	1,1
	3	1,3339	6,11	27,2	1,1
Média A		1,3338	6,1050	27,1667	1,0667
B	1	1,334	5,891	27,1	1,2
	2	1,334	5,943	27,2	1,2
	3	1,334	5,988	27,3	1,2
Média B		1,334	5,94067	27,2	1,2
C	1	1,334	6,42	27,1	1,2
	2	1,334	6,5	27,2	1,2
	3	1,334	6,35	27,3	1,2
Média C		1,334	6,42333	27,2	1,2
Média (n=3)		1,3339	6,1563	27,1889	1,1556
Desvio padrão		9,62E-05	0,2454	0,0192	0,0770

Tabela Ap1-4: Resultados de pH.

PH			
Amostra	réplica	pH	T (°C)
A	1	2,29	26,4

	2	2,31	26,2
	3	2,3	26,2
Média A		2,3	26,2667
B	1	2,32	26,3
	2	2,32	26,4
	3	2,31	26,4
Média B		2,3167	26,3667
C	1	2,28	26,3
	2	2,3	26,4
	3	2,32	26,2
Média C		2,3	26,3
Média (n=3)		2,3056	26,3111
Desvio padrão		0,0096	0,0501

Tabela Ap1-5: Resultados da determinação da actividade da água.

	Actividade da água					
	A		B		C	
Ordem	a _w	T(°C)	a _w	T(°C)	a _w	T(°C)
1°	0,5	26,3	0,51	26,3	0,51	26,6
2°	0,5	27,5	0,5	27,4	0,52	28,1
3°	0,52	28,8	0,51	29,4	0,51	29,6
Média	0,5067	27,5333	0,5067	27,7	0,5133	28,1
Média (n=3)	$a_w = 0,5089 \pm 0,0038$					

Tabela Ap1-6: Resultados de Fibras.

Fibra					
Amostra	Peso do Cadinho (g)	peso da amostra(g)	G1	G2	%Fibra (BH)
1	25,4435	1,002	25,5396	25,441	9,840319
2	25,2929	1,0014	25,3959	25,2951	10,06591
3	25,4535	1,006	25,5351	25,431	10,34791
Média					10,08471
Desvio Padrão					0,2543

Tabela Ap1-7: Resultados de Proteínas.

Proteína				
amostra	Peso da amostra (g)	volume final (ml)	%N2	%PB
1	1,008	1,9	0,253	1,58125
2	1,0277	1,84	0,219	1,36875
3	1,005	1,91	0,257	1,60625
Branco	1,42
Média				1,5188
Desvio padrão				0,1305

Tabela Ap1-8: Resultados da cor amostra fresca.

Cor (Amostra Fresca)				
Amostra	Réplica	L	a	b
A	1	26,5	15,4	16,1
	2	26,5	15,4	16,3
	3	26,4	15,5	16,1
Média A		26,4667	15,4333	16,1667
B	1	26,7	15,5	16,1
	2	26,4	15,6	16,1
	3	26,5	15,5	16,1
Média B		26,5333	15,5333	16,1
C	1	26,5	15,5	16,2
	2	26,5	15,4	16,1
	3	26,6	15,5	16,2
Média C		26,5333	15,4667	16,1667
Media (n=3)		26,5111	15,4778	16,1444
Desvio Padrão		0,0385	0,0509	0,0385

Tabela Ap1-9: Resultados da cor amostra liofilizada.

Cor (Liofilizada)				
Amostra	Réplica	L	a	b
A	1	27,2	15,5	16,3
	2	28	17,3	16,4
	3	27,3	16	16,1
Média A		27,5	16,2667	16,2667
B	1	27,6	16,6	16,4
	2	27,6	16,5	16,4
	3	27,7	16,7	16,4
Média B		27,6333	16,6	16,4
C	1	27,3	15,9	16,5
	2	27,3	15,8	16,5
	3	27,3	15,9	16,4
Média C		27,3	15,8667	16,4667
Média (n=3)		27,4778	16,2444	16,3778
Desvio padrão		0,1678	0,1992	0,1018

Tabela Ap1-10: Resultados da cor amostra seca por ar quente.

Cor (estufa)				
Amostra	Réplica	L	A	b
A	1	28,8	12,1	17
	2	28,3	11,2	17
	3	28,1	11,3	17
Média A		28,4	11,5333	17
B	1	28,2	11,4	17
	2	28,2	11,3	17
	3	28,2	11,4	17
Média B		28,2	11,3667	17
C	1	28,7	11,8	17
	2	28,7	11,7	17,1
	3	28,9	11,6	17,1
Média C		28,7667	11,7	17,0667
Média (n=3)		28,4556	11,5333	17,0222
Desvio padrão		0,2874	0,1667	0,0385

Tabela Ap1- 11: Resultados da cor, amostra seca por atomização.

Cor (Spray-dryer)				
Amostra	réplica	L	A	b
A	1	30,1	26,5	17,2
	2	30,3	26,8	17,3
	3	30,2	26,5	17,2
Média A		30,2	26,6	17,2333
B	1	30,3	26,6	17,2
	2	30,3	26,6	17,2
	3	30,3	26,6	17,2
Média B		30,3	26,6	17,2
C	1	30,1	26,2	17
	2	30,1	26,3	17,1
	3	30,1	26,2	17,2
Média C		30,1	26,2333	17,1
Média (n=3)		30,2	26,4778	17,2
Desvio padrão		0,1	0,2117	0,0694

Feito o teste de Tukey em termos de cor para as amostras SL, SA e SE a nível de significância de 5% verificou-se: $p < 0,05$ para os parâmetros L (luminosidade) entre sí, a* entre sí, b* entre sí, Cromo (C) entre sí, e angulo hue (h) entre sí. Pelo que pode-se concluir que as diferenças entre as médias de cada parâmetro foram significativas.

Tabela Ap1 12: Dados e rendimento da atomização

Rendimento da atomização	
Obtenção do extracto	
Massa da amostra (g)	80
Massa do amido (g)	12
Volume de água da extracção (ml)	800
Temperatura da Extracção (C)	60
Volume obtido na filtracção (ml)	634
Massa do Po obtido (g)	25,242
Rendimento (%)	27,4370

2. APÊNDICE 2: Resultados dos compostos bioativos e actividade antioxidante.

Neste apêndice são apresentados os resultados encontrados na determinação dos compostos bioativos e da actividade antioxidante dos cálices do *Hibiscus Sabdariffa L.* bem como as respectivas curvas de calibração.

✚ Determinação de antocianinas totais

Tabela Ap2-1: Resultados das antocianinas, amostra liofilizada.

Antocianinas amostra Liofilizada				
Amostra	Réplica	massa (g)	Absorvância a 535 nm	Antocianinas em (mg/100g)
A	1	0,1017	0,4331	477,0330
	2	0,1009	0,4321	479,7051
	3	0,1012	0,4345	480,9395
Média A				479,2259
B	1	0,1021	0,4756	521,7919
	2	0,1015	0,4651	513,2885
	3	0,102	0,4762	522,9623
Média B				519,3476
C	1	0,1001	0,4273	478,1675
	2	0,1004	0,4267	476,0692
	3	0,1008	0,4266	474,0690
Média C				476,1019
Média (n=3)				491,5584
Desvio padrão				24,1167

Tabela Ap2-2: Resultados das antocianinas, amostra seca por ar quente.

Antocianinas (Estufa)				
Amostra	Réplica	peso (g)	Absorvância a 535 nm	Antocianinas em (mg/100g)
A	1	0,1021	0,4287	427,5789
	2	0,1007	0,4657	470,9397
	3	0,1012	0,4721	475,0529

Média A				457,8572
B	1	0,1002	0,4325	439,5486
	2	0,1008	0,4316	436,0230
	3	0,102	0,4361	435,3860
Média B				436,9859
C	1	0,1015	0,4585	460,0042
	2	0,1006	0,4606	466,2453
	3	0,1017	0,4646	465,2076
Média C				463,8190
Média (n=3)				452,8874
Desvio padrão				14,09002974

Tabela Ap2-3: Resultados das antocianinas, amostra seca por atomização.

Antocianinas amostra Spray-dryer				
Amostra	Réplica	massa (g)	Absorvância a 535 nm	Antocianinas em (mg/100g)
A	1	0,1004	0,6289	637,8762
	2	0,1011	0,5303	534,1448
	3	0,1003	0,5339	542,0602
Média A				571,3604
B	1	0,1011	0,503	506,6468
	2	0,1005	0,5897	597,5216
	3	0,1015	0,6265	628,5554
Média B				577,5746
C	1	0,1021	0,4976	496,2987
	2	0,1011	0,5976	601,9327
	3	0,1006	0,6058	613,2249
Média C				570,4854
Média (n=3)				573,1401
Desvio padrão				3,8652

Feito o teste de Tukey para as antocianinas, amostras SL, SA, e SE a 5% de significância, constatou-se $p < 0,05$, pelo que, pode-se concluir que existem diferenças significativas do teor de antocianinas entre os grupos.

Tabela Ap2-4: Resultados dos Flavonoides totais.

Flavonoides totais				
Amostra	Réplica	massa (g)	Absorvancia a 374 nm	Flavonoides (mg/100g)
A	1	0,1017	1,8554	1190,85212
	2	0,1009	1,8563	1200,8762
	3	0,1012	1,9426	1252,9799
Média A				1214,9027
B	1	0,1021	1,8364	1174,0397
	2	0,1015	1,9405	1247,9260
	3	0,102	1,8332	1173,1429
Média B				1198,3695
C	1	0,1001	1,8588	1212,1038
	2	0,1004	1,8453	1199,7051
	3	0,1008	1,838	1190,2172
Média C				1200,6754
Média (n=3)				1204,6492
Desvio Padrão				8,9543

✚ Determinação da vitamina C

Tabela Ap2-5: Resultados da determinação da Vitamina C.

Vitamina C				
Amostra	Réplica	Peso (g)	Volume titulação ml	Vitamina C
A	1	0,2001	0,2	88,0160
	2	0,2004	0,2	87,8842
	3	0,2001	0,22	96,8176
Média A				90,9059
B	1	0,2005	0,3	131,7606
	2	0,2005	0,25	109,8005
	3	0,2004	0,23	101,0669
Média B				114,2093
C	1	0,2001	0,2	88,0160
	2	0,2002	0,2	87,9720

	3	0,2006	0,2	87,7966
Média C				87,9282
Média (n=3)				97,6812
Desvio padrão				11,7502

✚ Determinação de Taninos.

Tabela Ap2-6: Dados da curva padrão de Catequina.

Curva Padrão de Catequina		
Padrão	Coc. (mg/ml)	Abs
1	5	0,0127
2	10	0,0174
3	20	0,0268
4	45	0,0456
5	75	0,0788
6	100	0,102

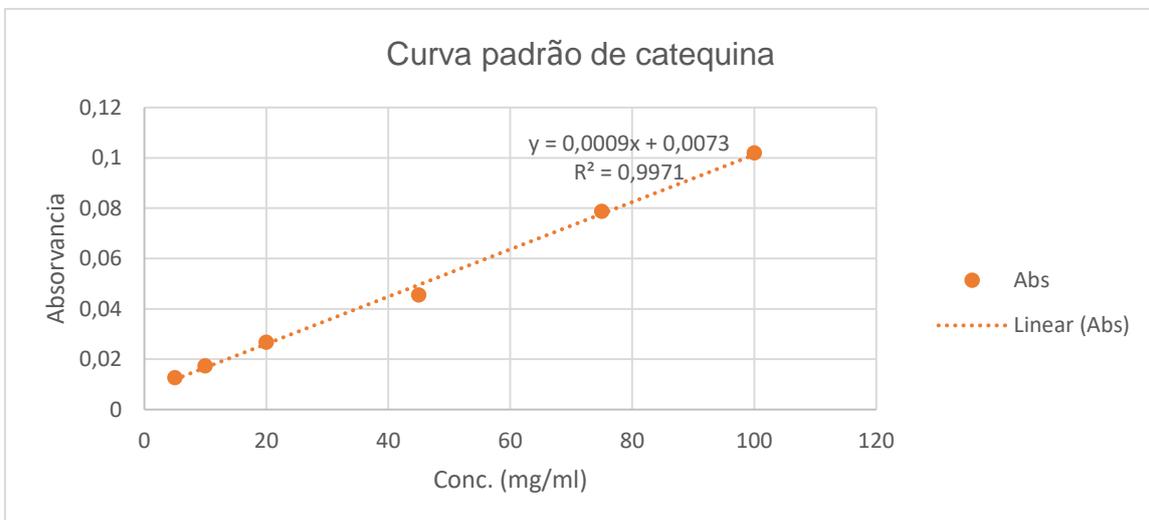


Figura Ap2-1: Curva padrão de Catequina.

Tabela Ap2-7: Resultados de Taninos.

Taninos amostra liofilizada				
Amostra	Réplica	Peso (g)	Absorvâncias	Taninos
A	1	0,1038	0,0158	161,3145
	2	0,1003	0,015	158,0813
	3	0,1011	0,0155	162,3255
Média de A				160,5738
B	1	0,1002	0,0172	182,6347
	2	0,1003	0,0172	182,4526
	3	0,1012	0,0166	174,2424
Média de B				179,7766
C	1	0,1021	0,0145	149,8531
	2	0,1004	0,016	168,9907
	3	0,1003	0,0171	181,3449
Média de C				166,7295
Média (n=3)				169,0266
Desvio Padrão				9,8053

✚ Determinação de compostos fenólicos totais.

Tabela Ap2-8: Dados da curva padrão de ácido Gálico.

conc.	Abs
0,004	0,0914
0,15	0,093
0,3	0,1453
0,45	0,1896
0,5	0,2329

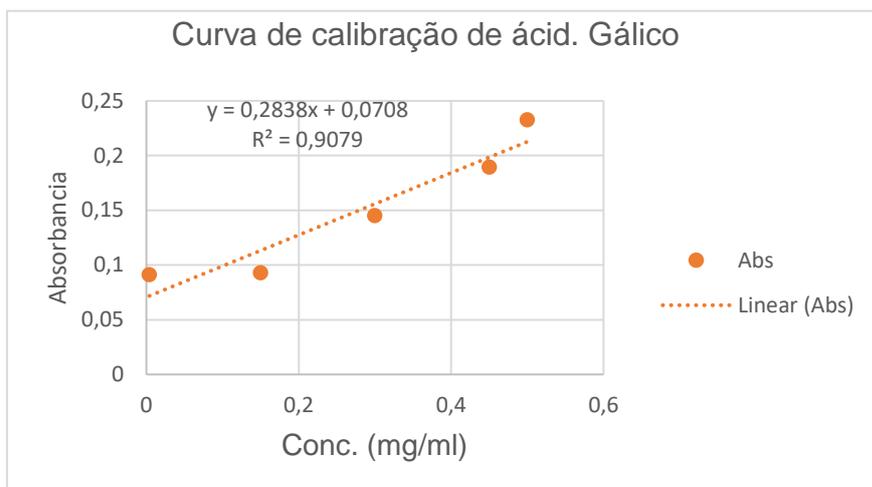


Figura Ap2-2: Curva de calibração de ácido Gálico.

Tabela Ap2-9: Resultados dos compostos fenólicos totais.

Compostos fenólicos totais					
Amostra	Réplica	Peso	Absorvância a 725 nm	Comp. fenólicos totais	Outros dados
A	1	0,102	0,5251	2354,0812	FD =2 declive m=0,2838 origem b= 0,0708 volume do extracto = 0,150ml
	2	0,1002	0,5248	2394,7876	
	3	0,1001	0,525	2398,2360	
Média A				2382,3683	
B	1	0,1005	0,5283	2406,0459	
	2	0,1026	0,5288	2359,3751	
	3	0,1024	0,5285	2362,4348	
Média B				2375,9519	
C	1	0,1002	0,5549	2553,5610	
	2	0,1007	0,5452	2489,9698	
	3	0,1011	0,5552	2532,3973	
Média C				2525,3094	
Média (n=3)				2427,8765	
Desvio padrão				84,4403	

✚ Determinação da capacidade antioxidante pelo método ABTS.

Tabela Ap2-10: Dados da curva padrão de Trolox para ABTS.

Curva padrão de Trolox para ABTS						
Hidrofílica				Lipofílica		
Abs a 734 nm				Abs a 734		
[Trolox]μM	t=0 min	t=30 min	media	t=0 min	t=30 min	media
82	0,3938	0,3936	0,3937	0,6543	0,5142	0,5843
123	0,2926	0,2922	0,2924	0,5467	0,4193	0,483
185	0,3067	0,305	0,3059	0,4532	0,4532	0,4532
278	0,2567	0,2567	0,2567	0,3423	0,3422	0,3423
417	0,2227	0,224	0,2234	0,2432	0,2435	0,2434
625	0,2183	0,2186	0,2185	0,1324	0,1324	0,1324
800	0,0381	0,0392	0,0387	0,0764	0,0766	0,0765

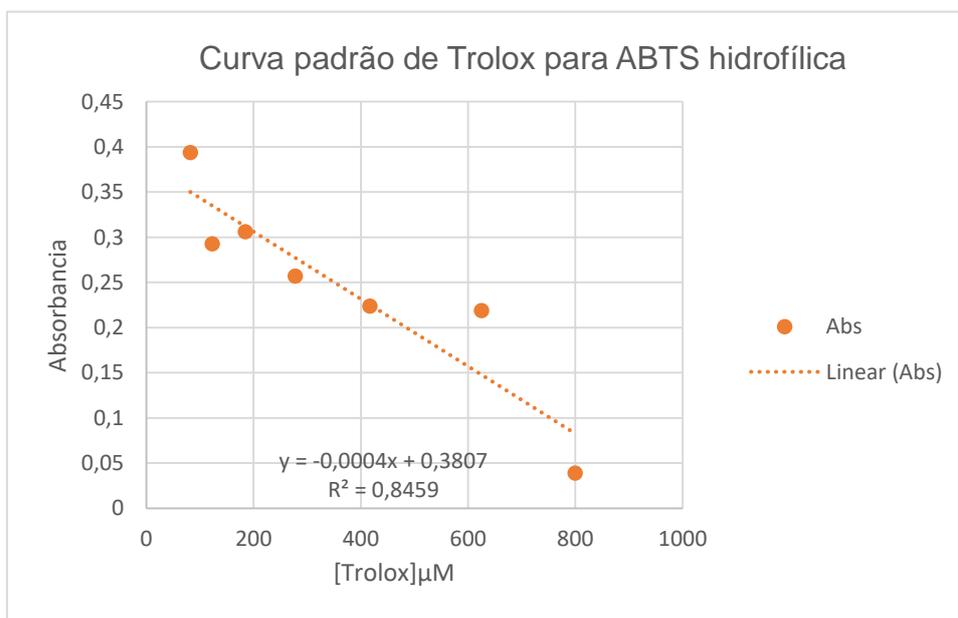


Figura Ap2-3: Curva padrão de Trolox para ABTS hidrofílica.

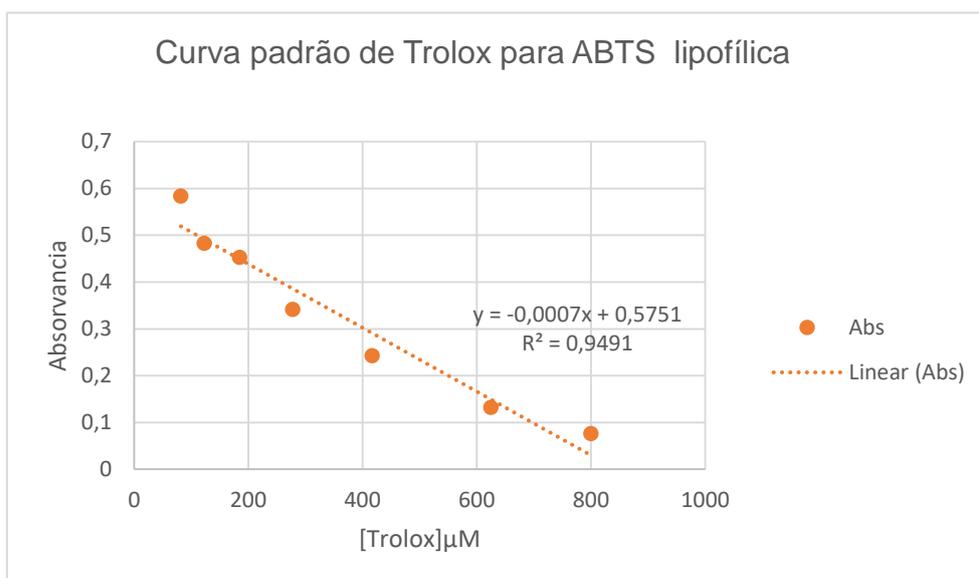


Figura Ap2-4: Curva padrão de Trolox para ABTS lipofílica.

Tabela Ap2-11: Resultados da actividade antioxidante hidrofílica para a amostra liofilizada, pelo método ABTS.

ABTS-Hidrofílica (Liofilizada)							
Amostra	Abs 734 nm					Δ ABTS	AOxH (μ M trolox/100g)
	Replica	Peso(g)	t=0 min	t=30 min	t=60 min		
A	1	0,102	0,4356	0,3134	0,2782	0,8261	855274,3697
	2	0,1003	0,4158	0,3267	0,2811	0,8232	890483,6491
	3	0,1013	0,4158	0,3173	0,2795	0,8248	870384,1912
Média A							872047,4033
B	1	0,1014	0,4183	0,3109	0,27793	0,82637	858362,836
	2	0,1011	0,414	0,3215	0,2823	0,822	892071,146
	3	0,1007	0,412	0,3209	0,2768	0,8275	856173,6771
Média B							868869,2197
C	1	0,1018	0,4231	0,3108	0,27921	0,82509	864096,5745
	2	0,102	0,4196	0,3145	0,2808	0,8235	875366,4749
	3	0,1009	0,4172	0,3136	0,2832	0,8211	900257,1924
Média C							879906,7473
Média (n=3)							873607,7901
Desvio padrão							5681,80067
Outros Dados	ABTS (trabalho) Abs=1,1043; m=-0,0004; b=0,3807; Volume do solvente=10ml; Branco (Etanol) Abs=0,0458; FD=1.						

Tabela Ap2-12: Resultados da actividade antioxidante lipofílica para a amostra liofilizada, pelo método ABTS.

ABTS-Lipofílica (Liofilizada)							
Amostra	Abs 734 nm					Δ ABTS	AOxL (μ M trolox/100g)
	Réplica	Peso(g)	t=0 min	t=30 min	t=60 min		
A	1	0,1028	1,1079	0,9311	0,8956	0,2087	5144060,478
	2	0,1012	1,1075	0,9156	0,8945	0,2098	5208876,849
	3	0,1009	1,1119	0,9343	0,8967	0,2076	5255671,457
Média A							5208876,849
B	1	0,1024	1,1046	0,9317	0,8987	0,2056	5207640,625
	2	0,102	1,1046	0,9176	0,8954	0,2089	5181165,826
	3	0,1016	1,1058	0,9189	0,8926	0,2117	5161588,076
Média B							5183464,843
C	1	0,1012	1,1222	0,9355	0,8946	0,2097	5210302,767
	2	0,1001	1,1227	0,9331	0,8898	0,2145	5197796,575
	3	0,1021	1,224	0,9317	0,8887	0,2156	5081439,695
Media C							5163179,679
Media (n=3)							5185173,79
Desvio padrao							22896,46744
Outros Dados	ABTS (Trabalho) Abs=1,1043; m=-0,0007; b=0,5751; Volume do solvente=10ml; Branco (Diclorometano) Abs=0,0419; FD=1.						

Tabela Ap2-13: Resultados da actividade antioxidante hidrofílica para a amostra seca na estufa, pelo método ABTS.

ABTS-Hidrofílica (Estufa)							
Amostra	Abs 734 nm					Δ ABTS	AOxH (μ M trolox/100g)
	Réplica	Peso(g)	t=0 min	t=30 min	t=60 min		
A	1	0,1025	0,4419	0,3269	0,2827	0,8205	1172171,603
	2	0,102	0,427	0,3173	0,2795	0,8237	1155221,709
	3	0,1007	0,4246	0,3157	0,2787	0,8245	1164252,908
Média A							1163882,073
B	1	0,1023	0,40144	0,3163	0,284	0,8192	1183609,789
	2	0,1018	0,4036	0,3245	0,2806	0,8226	1165265,17
	3	0,1021	0,4062	0,3167	0,2789	0,8243	1149861,249
Média B							1166245,403
C	1	0,1005	0,4423	0,3274	0,2793	0,8239	1170853,98
	2	0,1015	0,4354	0,3426	0,2812	0,822	1172939,831

	3	0,1014	0,4531	0,3209	0,2831	0,8201	1187604,72
Média C							1177132,844
Média (n=3)							1169086,773
Desvio padrão							7067,585749
Outros Dados	ABTS (trabalho) Abs=1,1032; m=-0,0004; b=0,3807; Volume do solvente = 10ml ; Branco (Etanol) Abs=0,0456, FD=1.						

Tabela Ap2-14: Resultados da actividade antioxidante lipofílica para a amostra seca na estufa, pelo método ABTS.

ABTS-Lipofílica (Estufa)							
Amostra	Abs 734 nm					Δ ABTS	AOxL (μ M trolox/100g)
	Réplica	Peso(g)	t=0 min	t=30 min	t=60 min		
A	1	0,1024	1,1122	0,8644	0,7564	0,3468	3217603,125
	2	0,1014	1,1081	0,8585	0,7518	0,3514	3183549,141
	3	0,1024	1,1181	0,8568	0,7489	0,3543	3111900
Média A							3171017,422
B	1	0,101	1,1117	0,8604	0,7575	0,3457	3277467,327
	2	0,1007	1,1095	0,8565	0,74922	0,35398	3168487,422
	3	0,10025	1,1087	0,8549	0,7547	0,3485	3261441,61
Média B							3235798,786
C	1	0,1008	1,118	0,8551	0,7548	0,3484	3245254,195
	2	0,10023	1,0981	0,8534	0,74898	0,35422	3179742,025
	3	0,1005	1,1103	0,8523	0,7553	0,3479	3262023,596
Média C							3229006,606
Média (n=3)							3229006,606
Desvio padrão							35603,14673
Outros Dados	ABTS (Trabalho) Abs=1,1032; FD=1; m=-0,0007; b=0,5751; Volume do solvente=10 ml; Branco Diclorometano)=0,0421						

Tabela Ap2-15: Resultados da actividade antioxidante hidrofílica para a amostra seca por atomização, pelo método ABTS.

ABTS-Hidrofílica (Spray-Dryer)							
Amostra	Abs 734 nm					Δ ABTS	AOxH (μ M trolox/100g)
	Réplica	Peso(g)	t=0 min	t=30 min	t=60 min		
A	1	0,1008	0,1106	0,0231	0,2091	0,8859	437329,1383
	2	0,1006	0,0846	0,0229	0,2101	0,8849	445361,5876
	3	0,101	0,0981	0,0227	0,212	0,883	457188,1188

Média A							446626,2816
B	1	0,1005	0,1772	0,0301	0,2095	0,8855	441493,0704
	2	0,1009	0,1366	0,0302	0,212	0,883	457636,6983
	3	0,1002	0,1283	0,0296	0,2078	0,8872	430561,7052
Média B							443230,4913
C	1	0,1006	0,1464	0,0396	0,2108	0,8842	450381,7665
	2	0,1003	0,1196	0,0378	0,2103	0,8847	448118,993
	3	0,1008	0,1118	0,0372	0,21	0,885	443770,9751
Média C							447423,9115
Média (n=3)							445760,2281
Desvio padrão							2226,820565
Outros Dados	ABTS (Trabalho) Abs=1,095; m=-0,0004; b=0,3807; FD=1; Volume do solvente=10 ml; Branco (Etanol) Abs=0,0325						

Tabela Ap2-16: Resultados da actividade antioxidante lipofílica para a amostra seca por atomização, pelo método ABTS.

ABTS-Lipofílica (Spray-Dryer)							
Amostra	Abs 734 nm					ΔABTS	AOxL (μM trolox/100g)
	Réplica	Peso(g)	t=0 min	t=30 min	t=60 min		
A	1	0,1005	1,0712	1,0238	0,867	0,228	4983487,633
	2	0,1002	1,0708	1,0242	0,9001	0,1949	5474901,682
	3	0,1011	1,0708	1,024	0,8812	0,2138	5156884,881
Média A							5205091,399
B	1	0,1003	1,0745	1,0517	0,903	0,192	5511216,251
	2	0,1009	1,0736	1,0528	0,8921	0,2029	5322886,847
	3	0,1003	1,0737	1,0508	0,8934	0,2016	5373112,164
Média B							5402405,087
C	1	0,1004	1,0759	1,0571	0,8943	0,2007	5380748,093
	2	0,101	1,0754	1,0569	0,8943	0,2007	5349100,99
	3	0,1005	0,0758	1,0563	0,8945	0,2005	5378318,834
Média C							5369389,306
Média (n=3)							5325628,597
Desvio padrão							105685,4892
Outros Dados	ABTS (Trabalho) Abs=1,095; m=-0,0004; b=0,3807; FD=1; Volume do solvente=10ml; Branco (Diclorometano) Abs=0,0425						

Tabela Ap2-17:Resumo dos resultados da actividade antioxidante para as três amostras, pelo método ABTS.

Tipo de análise	Tipo de amostra		
	Liofilização	Estufa	Spray-dryer
lipofílica	5185173,79	3229006,606	5325628,597
Hidrofílica	873607,7901	1169086,773	445760,2281
Total	6058781,58	4398093,379	5771388,825
Desvio padrão	14289,13406	21335,36624	53956,15489

✚ Determinação da actividade antioxidante pelo método DPPH.

Tabela Ap2-18:Dados da curva de calibração de Trolox para o método DPPH.

[Trolox]µM	Curva Padrão Trolox para DPPH						
	Hidrofílica			Lipofílica			
	Abs a 515 nm			Abs a 515 nm			
	t=0 min	t=30 min	media	t=0 min	t=30 min	t=60 min	Média
82	0,8061	0,8045	0,8053	1,0127	1,0012	0,9984	1,0041
123	0,7343	0,7343	0,7343	0,9903	0,9365	0,93653	0,9544
185	0,6701	0,6657	0,6679	0,8564	0,8564	0,8564	0,8564
278	0,5349	0,53433	0,5346	0,7766	0,7478	0,7486	0,7577
417	0,4002	0,4001	0,4002	0,7795	0,7505	0,7499	0,7600
625	0,3931	0,3899	0,3915	0,6543	0,6538	0,6533	0,6538
800	0,3032	0,3111	0,3072	0,5467	0,5381	0,5377	0,5408

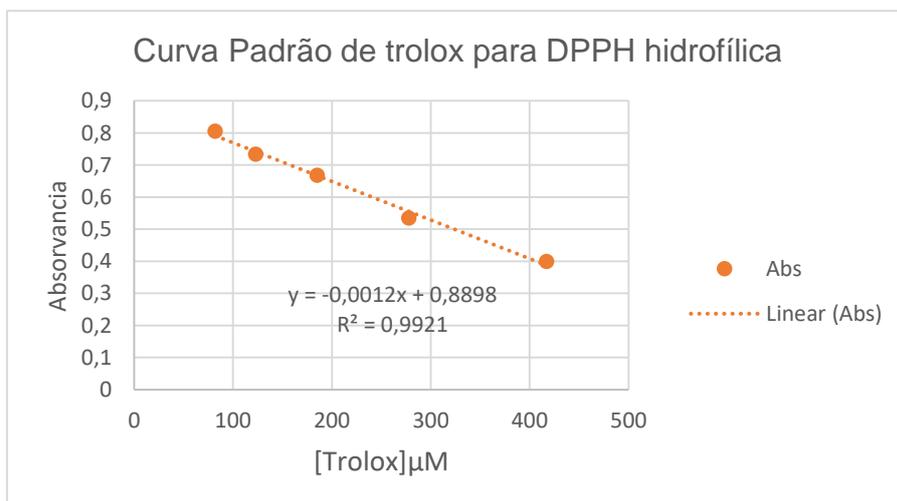


Tabela Ap2-19: Curva de calibração de Trolox para DPPH lipofílica.

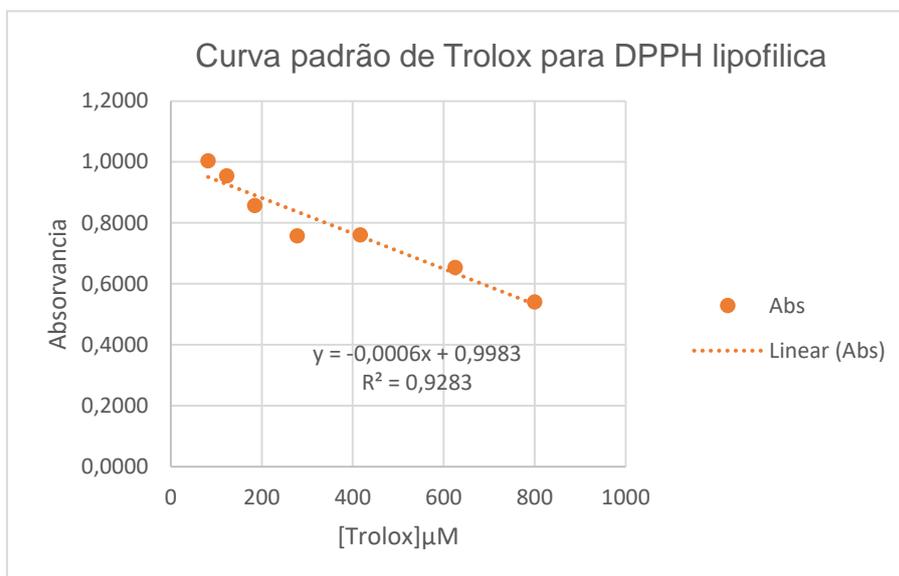


Tabela Ap2 20: Curva padrão de Trolox para DPPH lipofílica.

Tabela Ap2-21: Resultados da actividade antioxidante hidrofílica para a amostra seca por liofilização, pelo método DPPH.

DPPH-Hidrofílica (Liofilizado)							
Amostra	Abs 515nm					ΔDPPH	AOxH (μM trolox/100g)
	Réplica	Peso(g)	t=0 min	t=30 min	t=60 min		
A	1	0,1058	0,475	0,3194	0,30143	0,80347	687172,1125
	2	0,1022	0,4674	0,3188	0,30256	0,80234	720432,4951
	3	0,1043	0,4703	0,3179	0,30801	0,79689	750072,3178
Média A							719225,6418
B	1	0,1011	0,4977	0,3538	0,31009	0,79481	790886,4894
	2	0,1021	0,4948	0,3332	0,3123	0,7926	801439,8629
	3	0,1035	0,4931	0,3527	0,3106	0,7943	776879,4283
Média B							789735,2602
C	1	0,1001	0,4773	0,3478	0,3112	0,7937	808041,6334
	2	0,1022	0,47746	0,3463	0,313	0,7919	806429,6967
	3	0,101	0,4767	0,3462	0,3151	0,7898	833415,8416
Média C							815962,3905
Média (n=3)							774974,4309

Desvio padrão		50029,10355
Outros Dados	DPPH(trabalho) Abs=1,1049 ; FD = 1 ; Branco (MetOH)Abs= 0,0513; b=0,8898; m=-0,0012; Volume do solvente=10ml	

Tabela Ap2-22: Resultados da actividade antioxidante lipofílica para a amostra seca por liofilização, pelo método DPPH.

DPPH-Lipofílica (liofilizada)							
Amostra	Absorvância a 515 nm					Δ DPPH	AOxL (μ M trolox/100g)
	Réplica	Peso(g)	t=0 min	t=30 min	t=60 min		
A	1	0,1011	1,0371	1,0468	1,0513	0,0556	15697835,43
	2	0,1007	1,0344	1,0471	1,0486	0,0583	17530114,25
	3	0,1021	1,0339	1,0465	1,0492	0,0577	15510994,55
Média A							16246314,74
B	1	0,1003	1,0493	1,0856	1,0841	0,0228	16372287,55
	2	0,1002	1,0488	1,0838	1,0839	0,023	16385104,89
	3	0,1008	1,0482	1,0844	1,0831	0,0238	16275181,22
Media B							16344191,22
C	1	0,1013	1,0534	1,1011	1,0101	0,0968	14982431,64
	2	0,1005	1,0532	1,0987	1,0188	0,0881	15246227,36
	3	0,1016	1,0532	1,1025	1,0234	0,0835	15159028,35
Media C							15129229,12
Media (n=3)							15906578,36
Desvio Padrao							674980,6184
Outros Dados	DPPH(trabalho) Abs=1,1069; FD = 1; Branco (Diclorometano) Abs = 0, 04922; b=0,9983; m=-0,0006; Volume do solvente = 10ml						

Tabela Ap2-23: Resultados da actividade antioxidante hidrofílica para a amostra seca por ar quente, pelo método DPPH.

DPPH-Hidrofílica(Estufa)							
Amostra	Abs 515 nm					Δ DPPH	AOxH (μ M trolox/100g)
	Réplica	Peso(g)	t=0 min	t=30 min	t=60 min		
A	1	0,1004	0,7189	0,31668	0,2737	0,8344	464444,0239
	2	0,1004	0,6924	0,3652	0,2728	0,8353	456898,9044
	3	0,1011	0,6885	0,3645	0,2729	0,8352	454599,456
Média A							458647,4614
B	1	0,102	0,6607	0,3391	0,282	0,8261	525733,1699
	2	0,1013	0,6462	0,337	0,2817	0,8264	526836,4758

	3	0,1021	0,6436	0,3377	0,2815	0,8266	521100,8162
Média B							524556,8206
C	1	0,1025	0,6458	0,362	0,2796	0,8285	503482,3171
	2	0,10221	0,6511	0,3633	0,2784	0,8297	495012,573
	3	0,1002	0,6385	0,318	0,2838	0,8243	550202,179
Média C							516232,3563
Média (n=3)							499812,2128
Desvio padrão							35891,87573
Outros Dados	DPPH (Trabalho) Abs=1,1081; Branco (MetOH) Abs=0,0448; FD=1 Volume do solvente = 10ml						

Tabela Ap2-24: Resultados da actividade antioxidante lipofílica para a amostra seca por ar quente, pelo método DPPH.

DPPH-Lipofílica (Estufa)							
Amostra	Abs 515 nm					Δ DPPH	AOxL (μ M trolox/100g)
	Réplica	Peso(g)	t=0 min	t=30 min	t=60 min		
A	1	0,1005	1,0528	1,0023	1,0101	0,098	15080398,26
	2	0,1004	1,0523	1,0015	1,0108	0,0973	15107005,98
	3	0,101	1,0549	1,0035	1,0105	0,0976	15013152,97
Média A							15066852,4
B	1	0,1003	1,0594	1,0051	1,011	0,0971	15125274,78
	2	0,1011	1,056	1,0042	1,0108	0,0973	15003447,25
	3	0,1007	1,0596	1,0052	1,011	0,0971	15065790,86
Média B							15064837,63
C	1	0,1025	1,0581	1,0078	1,0114	0,0967	14810429,27
	2	0,1005	1,0583	1,0087	1,0108	0,0973	15092123,55
	3	0,1003	1,0579	1,009	1,0129	0,0952	15157163,39
Média C							15019905,4
Média (n=3)							15050531,81
Desvio padrão							26542,37126
Outros Dados	DPPH (Trabalho) Abs=1,1081; m=-0,0006; b=0,9983; FD=1 Branco (Diclorometano) Abs=0,04922; Vol. solvente=10 ml						

Tabela Ap2-25: Resultados da actividade antioxidante hidrofílica para a amostra seca por atomização, pelo método DPPH.

DPPH-Hidrolífica (Spray-dryer)

Amostra	Abs 515 nm					Δ DPPH	AOxH (μ M trolox/100g)
	Réplica	Peso(g)	t=0 min	t=30 min	t=60 min		
A	1	0,1000	0,8324	0,6184	0,2589	0,8502	333300,0000
	2	0,1005	0,8193	0,6185	0,2563	0,8528	309798,9179
	3	0,1003	0,8151	0,6186	0,2548	0,8543	297848,0790
Média A							313648,9990
B	1	0,1008	0,7859	0,6091	0,2570	0,8521	314906,8029
	2	0,1009	0,7833	0,6094	0,2565	0,8526	310359,9130
	3	0,1004	0,7821	0,6088	0,2571	0,8520	316727,3506
Média B							313998,0222
C	1	0,1003	0,7979	0,6402	0,2553	0,8538	302121,9929
	2	0,1001	0,7953	0,6404	0,2581	0,8510	326413,1710
	3	0,1002	0,7939	0,6401	0,2550	0,8541	299965,1880
Média C							309500,1173
Média (n=3)							313648,9990
Desvio padrao							2502,2052
Outros Dados	DPPH (Trabalho) Abs=1,1091; Zero (MetOH) = 0,0474; FD=1; m=-0,0012 b=0,8898; Volume do solvente = 10ml						

Tabela Ap2-26: Resultados da actividade antioxidante lipofílica para a amostra seca por atomização, pelo método DPPH.

DPPH-Lipofílica (Spray-dryer)							
Amostra	Abs 515 nm					Δ DPPH	AOxL (μ M trolox/100g)
	Réplica	Peso(g)	t=0 min	t=30 min	t=60 min		
A	1	0,1039	1,3038	1,2573	1,073	0,0361	15595079,53
	2	0,1022	1,3033	1,2581	1,0737	0,0354	15863353,52
	3	0,1018	1,3031	1,257	1,0744	0,0347	15936631,43
Média A							15798354,83
B	1	0,1027	1,3245	1,2538	1,0642	0,0449	15631149,27
	2	0,1023	1,3241	1,2544	1,0613	0,0478	15643916,83
	3	0,1017	1,3236	1,2547	1,0612	0,0479	15733621,24
Média B							15669562,45
C	1	0,1006	1,2594	1,2099	1,0566	0,0525	15826950,76
	2	0,1015	1,2591	1,2096	1,0556	0,0535	15810216,83
	3	0,103	1,2592	1,2123	1,0571	0,052	15470014,4
Média C							15702394
Média (n=3)							15723437,09
Desvio padrão							66925,16954

Outros Dados	DPPH (Trabalhalho) Abs = 1,1091; FD=1; Branco (Diclorometano) Abs=0,0419; Volume do solvente = 10ml
---------------------	--

Tabela Ap2- 27:Resumo dos resultados da actividade antioxidante para as três amostras, pelo método DPPH.

Tipo de análise	Tipo de amostra		
	Liofilização	Spray-dreyer	Estufa
Lipofílica	15906578,36	15723437,09	15050531,81
Hidrofílica	774974,4309	313648,999	499812,2128
Total (µMtrolox/100g)	16681552,79	16037086,09	15550344,02
Desvio padrão	362504,861	34713,6874	31217,1235
Análise de Significância	p<0,05 entre os grupos, para o método ABTS entre si, DPPH entre Sí, e DPPH versos ABTS. As diferenças entre as médias foram significativas.		