



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO TECNOLÓGICO

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA DE
ALIMENTOS

**EXTRAÇÃO DAS ANTOCIANINAS DE CASCAS DE “BANDINHAS”
DE FEIJÃO PRETO (*Phaseolus vulgaris* L.)**

Amanda Losi de Oliveira

Florianópolis

2019

AMANDA LOSI DE OLIVEIRA

**EXTRAÇÃO DAS ANTOCIANINAS DE CASCAS DE “BANDINHAS” DE FEIJÃO
PRETO (*Phaseolus vulgaris* L.)**

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina apresentado como requisito para a obtenção do Título de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Acácio Antonio Ferreira Zielinski

Florianópolis

2019

Aos meus pais e amigos.

AGRADECIMENTOS

À minha família que nunca mediu esforços pela minha educação.

Ao meu orientador, Acácio Antonio Ferreira Zielinski por todo suporte prestado durante a execução do trabalho.

Aos colegas do LATESC, especialmente à Renata Fialho Teixeira, pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho, pelo carinho ao me ensinar e pelo incentivo.

Aos membros da banca, Patrícia Poletto e Pedro Henrique Santos, pela disponibilidade.

Aos meus colegas de curso e amigos, que me incentivaram no desenvolvimento deste trabalho e ao longo de toda graduação.

A vocês, muito obrigada.

RESUMO

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é a leguminosa mais consumida mundialmente, sendo o Brasil um dos maiores produtores e consumidores do grão. Acompanhando o volume de sua produção, é elevada a quantidade de resíduos gerados a partir do beneficiamento do feijão. Grãos quebrados e avariados perdem seu valor comercial e são comumente destinados à alimentação animal. Desta forma, as “bandinhas” de feijão passam a ser estudadas como uma alternativa de aproveitamento de resíduos para a obtenção das antocianinas presentes na casca. Com o objetivo de otimizar a obtenção de tais compostos bioativos, é proposta a comparação entre três métodos de extração: extração com líquido pressurizado (ELP), extração assistida por ultrassom e por maceração. De acordo com a literatura, uma maior eficiência de extração é esperada utilizando o processo que emprega líquido pressurizado. Assim, foi determinada a cinética de extração pelo método ELP e diferentes condições de temperatura, concentração e vazão de solvente foram comparadas para aperfeiçoar o processo. As condições de 60 °C, solvente 30% etanol, vazão de 4 mL/min e tempo de 26 minutos foram definidas como condições ótimas e utilizadas nas extrações realizadas para comparação entre os métodos. Para avaliar o teor de antocianinas monoméricas totais entre os extratos obtidos, foi utilizado o método de diferenças de pH, onde foram encontrados valores de até 3,98 mg/g para extratos obtidos pelo método ELP, valor cerca de 2,5 vezes maior que os obtidos por maceração. O potencial antioxidante de cada extrato foi avaliado por ensaios de DPPH. Nestes ensaios, novamente o maior valor encontrado (249,58 µmol ET/g) foi para extratos obtidos por ELP, entretanto variando apenas até 10% em relação aos outros métodos de extração. Avaliando o teor de compostos fenólicos totais, os extratos obtidos por ELP apresentaram o melhor resultado com valores de até 19,10 mg/g. Os extratos obtidos pelo método de extração assistida por ultrassom apresentaram resultados melhores quando comparados à extração por maceração, porém menores em relação a ELP. Por fim, conclui-se que as antocianinas presentes nas cascas de feijões pretos possuem potencial para aplicação como aditivos em alimentos e que o método de extração com líquido pressurizado é o mais eficiente em comparação aos métodos convencionais na recuperação de seus compostos bioativos.

Palavras-chave: Compostos fenólicos. Antioxidantes. Extração por líquido pressurizado.

ABSTRACT

Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is the most consumed pulse worldwide, with Brazil being one of the largest producers and consumers. Following the volume of its production, the amount of residue generated from the processing of the beans is high. Broken and damaged grains lose their commercial value and are commonly intended for animal feed. Thus, the broken bean cotyledons begin to be studied as an alternative to use waste to obtain the anthocyanins present in the peel. In order to optimize the attainment of such bioactive compounds, the comparison between three extraction methods is proposed: pressurized liquid extraction (PLE), ultrasound assisted extraction and maceration. According to the literature, greater extraction efficiency is expected using the process that employs pressurized fluid. Thus, the extraction kinetics was determined by the PLE method and different conditions of temperature, concentration and solvent flow were compared to improve the process. The conditions of 60 °C, 30% ethanol solvent, 4 mL/min flow and time of 26 minutes were defined as optimal conditions and used in extractions performed for comparison between the methods. To evaluate the total monomeric anthocyanin content among the extracts obtained, the pH difference method was used, where values up to 3.98 mg/g were found for extracts obtained by the PLE method, about 2.5 times higher than those obtained by maceration. The antioxidant potential of each extract was evaluated by DPPH method. In these trials, again the highest found value (249.58 $\mu\text{mol ET/g}$) went to extracts obtained by PLE, however, varying only up to 10% in relation to other extraction methods. Evaluating the content of total phenolic compounds, the extracts obtained by PLE presented the best result with values up to 19.09 mg/g. Extracts obtained by the ultrasound assisted extraction method presented better results when compared to maceration extraction, but lower in relation to PLE. Finally, it was concluded that anthocyanins present in black bean peels have the potential for application as additives in food and that the PLE method is more efficient compared to conventional methods in the recovery of their bioactive compounds.

Keywords: Phenolic compounds. Antioxidants. Pressurized liquid extraction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fotografia de planta madura de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. com seus frutos completamente desenvolvidos.....	11
Figura 2 - Estrutura química das antocianinas.	19
Figura 3 - Cascas de "bandinhas" de feijão.	24
Figura 4 - "Bandinhas" de feijão descascado (cotilédones).	25
Figura 5 - Sistema utilizado para a extração líquida pressurizada.	26
Figura 6 - Banho termostático utilizado para o controle de temperatura da extração por maceração.....	28
Figura 7 - Lavadora ultrassônica utilizada no processo de extração assistida por ultrassom.....	29
Figura 8 - Ensaio para determinação de antocianinas monoméricas totais em pH 1,0	30
Figura 9 - Ensaio para determinação de antocianinas monoméricas totais em pH 4,5.	30
Figura 10 - Foto aproximada de microplaca utilizada em análise DPPH.	31
Figura 11 - Curva cinética de extração pelo método ELP.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Planejamento Box-Behnken.....	27
Tabela 2 - Resultados das análises de atividade antioxidante, teor de antocianinas monoméricas totais e compostos fenólicos totais para extrações em ELP em diferentes condições.	33
Tabela 3 - Resultados das análises realizadas para comparação de extração por líquido pressurizado, maceração e assistida por ultrassom quanto ao teor de compostos fenólicos totais (CFT).	35
Tabela 4 - Resultados das análises realizadas para comparação de extração por líquido pressurizado, maceração e assistida por ultrassom quanto ao teor de antocianinas monoméricas totais (AMT) e potencial antioxidante (DPPH).	36

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
1.1	OBJETIVOS.....	10
1.1.1	Objetivo Geral	10
1.1.2	Objetivos Específicos	10
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1	FEIJÃO.....	11
2.1.1	Aspectos socioeconômicos	12
2.1.2	Composição química	13
2.2	ANTIOXIDANTES.....	14
2.2.1	Compostos fenólicos	15
2.2.2	Antocianinas	16
2.2.2.1	Estrutura química	18
2.3	OBTENÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS	19
2.3.1	Métodos de extração	20
2.3.1.1	Extração por líquido pressurizado - ELP	21
2.3.1.2	Extração por maceração	22
2.3.1.3	Extração assistida por ultrassom	22
2.4	CONSIDERAÇÕES A RESPEITO DO ESTADO DA ARTE	23
3	MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1	EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS	24
3.1.1	Preparo da matéria-prima	24
3.1.2	Extração líquida pressurizada- ELP	25
3.1.3	Cinética de extração	27
3.1.4	Extração por maceração	27
3.1.5	Extração assistida por ultrassom	28
3.2	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS COMPOSTOS BIOATIVOS.....	29

3.2.1	Compostos fenólicos totais.....	29
3.2.2	Antocianinas totais	29
3.2.3	Avaliação do potencial antioxidante	31
3.2.4	Análise dos dados.....	31
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1	CINÉTICA DE EXTRAÇÃO	32
4.2	OTIMIZAÇÃO ELP.....	33
4.3	COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS.....	35
4.4	ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS TOTAIS.....	36
4.5	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE	37
5	CONCLUSÃO	38
6	REFERÊNCIAS	39

1 INTRODUÇÃO

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma leguminosa amplamente consumida mundialmente, sendo um alimento proteico presente na dieta diária do brasileiro (SILVA; COSTA, 2003). No Brasil, a média de consumo anual desta fonte importante de proteínas, carboidratos e fibras é de 12,7 kg per capita (CHÁVEZ-MENDOZA et al., 2017; EMBRAPA, 2012).

Parte da rica composição dos feijões são os compostos fenólicos, como as antocianinas (LOS et al., 2018). Estes estão presentes principalmente nas cascas e possuem propriedades funcionais relacionadas à presença de cor e atividade antioxidante. Desta forma, estes são compostos de interesse da indústria de alimentos visando o aumento da vida útil dos produtos, por meio da redução da oxidação lipídica, e atribuindo cor, deixando os alimentos mais atrativos ao consumidor (DE SOUZA; WILLEMS; LOW, 2019).

Outro aspecto que desperta o interesse na obtenção de antocianinas a partir de cascas de feijões é o fato de que esta matéria-prima pode ser obtida como um coproduto do beneficiamento do feijão, sendo um produto de baixo interesse comercial.

Aliado aos aspectos econômicos, diversos métodos de obtenção de compostos bioativos são estudados visando à eficiência do processo. Deste modo, o presente trabalho tem como objetivo propor a comparação entre métodos de extração convencionais e a alta pressão, de forma a identificar o mais eficiente na recuperação de compostos fenólicos como as antocianinas. Além disso, também é avaliada a otimização da extração através da análise da influência das variáveis: temperatura, concentração e vazão do solvente.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar os compostos bioativos extraídos das cascas de “bandinhas” de feijão preto (*Phaseolus vulgaris* L.) e comparar os métodos de extração.

1.1.2 Objetivos Específicos

Para que o objetivo geral fosse alcançado, os seguintes objetivos específicos foram definidos:

- Estabelecer as condições do processo de extração das antocianinas da casca do feijão;
- realizar a extração dos compostos bioativos através de métodos convencionais e de alta pressão;
- avaliar o teor de antocianinas monoméricas totais do extrato;
- avaliar a capacidade antioxidante das antocianinas;
- avaliar o teor de compostos fenólicos totais do extrato.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 FEIJÃO

O feijão da espécie *Phaseolus vulgaris* L. é o mais cultivado entre as demais do gênero *Phaseolus*, o qual inclui todas as espécies de sementes de leguminosas normalmente conhecidas como feijões comuns. Originário do continente americano, especificamente do sul dos Estados Unidos, México, América Central e da parte norte da América do Sul, foi introduzido na Europa no século XVI e, desde então, tornou-se uma cultura muito importante em várias regiões do mundo (SGARBIERI; WHITAKER, 1982).

Figura 1 - Fotografia de planta madura de *Phaseolus vulgaris* L. com seus frutos completamente desenvolvidos.



Fonte: Nassar; Ahmed; Boghdady (2010).

A espécie *Phaseolus vulgaris* L. (Figura 1) é caracterizada morfológicamente como um sistema radicular formado por uma raiz principal, com desenvolvimento lateral de raízes secundárias, terciárias, etc., concentrada na base do caule. Em seu caule estão inseridos os cotilédones e folhas. Possuem flores que podem apresentar cor branca, rósea ou violeta. Seu fruto é um legume com duas valvas unidas por duas suturas, uma dorsal e outra ventral. Nele se encontram suas sementes constituídas de um tegumento, hilo, micrópila e rafe e, internamente, de um embrião formado pela plúmula, duas folhas primárias, hipocótilo, dois cotilédones e radícula. As sementes de feijão apresentam coloração variada, com cores

variando do preto, bege, roxo, róseo, vermelho, marrom, amarelo, até o branco (SILVA; COSTA, 2003).

2.1.1 Aspectos socioeconômicos

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é a leguminosa mais consumida mundialmente e cultivada em mais de 100 países, sendo o Brasil um dos maiores produtores e consumidores, com uma média de consumo de 12,7 kg per capita/ano (EMBRAPA, 2012).

Além de sua importância econômica, sua cultura possui relevância como fator de segurança alimentar e nutricional e se faz presente na cultura culinária de diversos países. Historicamente, o feijão é um dos principais alimentos consumidos no Brasil e no mundo, em especial em países em desenvolvimento. Os países em desenvolvimento são responsáveis por 87,1% do consumo mundial e por 89,8% da produção (POSSE et al., 2010).

Quanto ao volume de produção, Myanmar é maior produtor mundial de feijão, seguido por Índia, Brasil, Estados Unidos, México e Tanzânia. Estes países são responsáveis por 56,99% dos feijões produzidos no mundo, ou 15,3 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2018).

Sua cultura é influenciada por fatores climáticos, principalmente temperatura, radiação solar e precipitação pluvial (DIDONET, A. D.; SILVA, 2004). Apesar de uma redução em torno de 30% de área de plantio de feijão no Brasil, a produção aumentou em 33,5%, graças ao expressivo aumento da produtividade média (94,6%). Ainda com o aumento da produção, a quantidade de feijão cultivada no Brasil é insuficiente para atender ao mercado interno, cujo consumo aumentou em 10,94% entre os anos de 2004 a 2010 (POSSE et al., 2010).

Para seu beneficiamento, os grãos passam por dois processos principais, a máquina de ar e peneira, onde os grãos quebrados e outras impurezas do tamanho e densidades próximas do feijão são separados; e a mesa densimétrica que classifica por peso específico, separando os grãos leves, atacados por insetos, dos grãos inteiros e bem formados (FERRO, 2014).

Os coprodutos do feijão separados no processo de beneficiamento, composto por grãos avariados (amassados, enrugados, manchados, despeliculados, partidos ou quebrados) apresentam-se como alternativa promissora à redução dos custos com alimentação do rebanho leiteiro. (MAGALHÃES et al., 2008). Entretanto, os grãos avariados não são aceitos ao serem destinados ao consumo humano, perdendo seu valor econômico. Baseado no pressuposto, a

matéria-prima de baixo valor comercial passa a ser uma alternativa de aproveitamento para recuperação de compostos bioativos, como os compostos fenólicos presentes nas cascas.

2.1.2 Composição química

Os feijões pretos comuns possuem uma composição química rica, com compostos associados a diversos benefícios à saúde como redução do risco de doenças metabólicas e cardiovasculares, diminuição do nível sérico de colesterol e hiperglicemia e prevenção de câncer de cólon, mama e próstata (LOS et al., 2018b).

Em sua composição, os carboidratos estão presentes de forma majoritária em feijões comuns com quantidades entre 55 e 65% (base seca), que são predominantemente amido, mas também fibras e oligossacarídeos da dieta (SUÁREZ-MARTÍNEZ et al., 2016). Quanto ao seu conteúdo de fibras, os feijões apresentam de duas a três vezes mais fibra por 100 g de porção do que outros alimentos presentes em uma dieta básica, sendo considerada uma importante fonte de fibras (CHEN et al., 2016). Além disso, os feijões apresentam amido do tipo-C e mais amilose quando comparado a maioria das fontes de amido disponíveis na indústria (SANTIAGO-RAMOS et al., 2018).

Os feijões apresentam ainda em sua composição peptídeos, moléculas formadas pela ligação de dois ou mais aminoácidos através de ligações peptídicas. Estudos demonstraram que os peptídeos de feijão podem fornecer funções antimicrobianas, antioxidantes, antitrombóticas, anti-hipertensivas e que podem inibir algumas enzimas relacionadas a doenças crônicas (SANTIAGO-RAMOS et al., 2018).

Ainda que não sejam consideradas sementes oleaginosas, os feijões apresentaram teores de óleo variando de 1,73 a 1,98%. Na composição de sua fração oleosa, apresentam alta proporção de ácidos graxos insaturados, sendo os ácidos linolênico e linoleico os principais ácidos graxos (62-83% do total de ácidos graxos), seguidos por ácidos palmítico e oleico (CHEN et al., 2015).

Além de ser uma fonte importante de proteínas, carboidratos, fibras e apresentar uma fração oleosa, o feijão é reportado como um alimento rico em compostos fitoquímicos, proporcionando importantes benefícios à saúde. Exemplos de tais compostos são os compostos fenólicos (CHÁVEZ-MENDOZA; SÁNCHEZ, 2017).

Os compostos fenólicos comumente encontrados nos feijões incluem os flavonóides, antocianinas, flavonóis, flavanóis, isoflavonas, flavanonas, proantocianidinas e taninos, além de uma ampla gama de ácidos fenólicos (LOS et al., 2018b). Estes compostos estão presentes

nos grãos comestíveis em forma livre, extraídos principalmente por misturas de água com solvente hidrofílico (por exemplo, 80% de metanol) (CHEN et al., 2015). Avaliando a presença de compostos fenólicos em feijões, Giusti et al. (2017) encontraram antocianinas na composição apenas de feijões pretos (delfinidina-3-O- glucosídeo e cianidina-3- glucosídeo), totalizando 649,5 mg/kg. Já nos estudos de Jun et al. (2016) e Takeoka et al. (1997) foram encontrados três tipos de antocianinas no feijão preto: delfinidina-3-O-glucosídeo (56%), petunidin-3-O-glucosídeo (26%) e malvidina-3-O-glucosídeo (18%) Entretanto, ao serem submetidos a processamentos térmicos, os feijões tem sua composição fenólica modificada (LOS et al., 2018b).

Segundo Gan et al. (2016) flavonóides e proantocianidinas de extratos de cascas de feijão apresentaram alta atividade antioxidante e antibacteriana, que podem ser candidatos potenciais aditivos na indústria de alimentos.

2.2 ANTIOXIDANTES

Processos naturais do organismo como a respiração e reações oxidativas provocam a formação de radicais livres, que podem ser descritos como moléculas orgânicas e inorgânicas e átomos que contêm um ou mais elétrons não pareados, com existência independente (HALLIWELL, 2012; SILVA et al., 2010).

Estudos relacionam a presença de radicais livres com danos ao organismo e doenças como inflamações, tumores malignos, mal de Alzheimer e doenças cardiovasculares, além de acelerarem o processo de envelhecimento (SIKORA et al., 2008). Por outro lado, a alta ingestão de produtos vegetais está relacionada com a redução no risco de doenças crônicas como aterosclerose e câncer, efeitos que têm atribuídos aos compostos que possuem atividade antioxidante (SILVA et al., 2010).

Krinsky (1994) define antioxidante como um composto que protege o sistema biológico contra o efeito nocivo de processos ou reações que podem causar oxidação excessiva. Os principais antioxidantes encontrados em vegetais são os compostos fenólicos. Estes compostos possuem propriedades benéficas que podem ser atribuídas à sua capacidade de sequestrar os radicais livres. Entre os compostos fenólicos, os mais estudados são o ácido cafeico, o ácido gálico e o ácido elágico (ANTUNES, 1999).

Os compostos antioxidantes são utilizados como parte da dieta ou em sua forma sintética como um dos mecanismos de defesa contra os radicais livres. Estes podem ser empregados nas indústrias de alimentos, cosméticos, bebidas e na medicina (ANTUNES, 1999).

No setor de alimentos, a utilização de compostos antioxidantes em produtos tem sido cada vez mais estudada. Neste setor, há um grande interesse pelo estudo da oxidação lipídica, uma vez que promove danos como a rancificação, perda de aromas, formação de off-flavors e rejeição do consumidor. Em produtos contendo lipídios, uma das principais formas de se minimizar a rancificação é através do uso de antioxidantes. Sua ação é capaz de retardar a formação de produtos tóxicos, manter a qualidade sensorial e nutricional e aumentar a vida útil de alimentos (SILVA et al., 2010).

Com uma busca do consumidor por uma alimentação mais natural e o aumento da rejeição do uso de aditivos sintéticos, tem aumentado o interesse no desenvolvimento de técnicas para obtenção e aplicação de antioxidantes provenientes de fontes vegetais. Além disso, alguns estudos mostram que produtos naturais apresentam, *in vitro*, maior atividade antioxidante que os produtos sintéticos (SILVA et al., 2010).

2.2.1 Compostos fenólicos

Entre os antioxidantes presentes nos vegetais, os mais ativos e encontrados com maior frequência são os compostos fenólicos (ANTUNES, 1999). A estrutura química dos compostos fenólicos compreende um anel aromático, contendo um ou mais substituintes hidroxila, variando de simples moléculas fenólicas a compostos altamente polimerizados. A sua atividade antioxidante é devida à sua capacidade de eliminar os radicais livres, doar átomos de hidrogênio ou elétrons ou quelar cátions metálicos. (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006; BRAVO, 2009).

A maioria dos compostos fenólicos naturais é encontrada como conjugados com mono e polissacarídeos, ligados a um ou mais dos grupos fenólicos. Os compostos fenólicos também podem ser encontrados como derivados funcionais, como ésteres e ésteres metílicos. Destes, ácidos fenólicos, flavonóides e taninos são considerados os principais compostos fenólicos da dieta (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

Os ácidos fenólicos consistem em dois subgrupos, os ácidos hidroxibenzóico e hidroxicinâmico. Os ácidos hidroxibenzóicos incluem os ácidos gálico, p-hidroxibenzóico, protocatecúico, vanílico e seringa. Os ácidos hidroxicinâmicos, por outro lado, são compostos aromáticos, sendo os ácidos cafeico, ferúlico, p-cumarico e sinápico os mais comuns. Possuem atividade que é aumentada com o aumento do grau de hidroxilação das moléculas (BRAVO, 2009).

Os flavonóides constituem o maior grupo de fenólicos vegetais, sendo responsáveis por mais da metade dos oito mil compostos fenólicos naturais. Estes são compostos de baixo peso molecular que atuam como antioxidantes na inativação dos radicais livres, com a capacidade de doar átomos de hidrogênio e inibir as reações em cadeia provocadas pelos radicais livres. Substituições em seus anéis via oxigenação, alquilação, glicosilação, acilação e sulfatação resultam em inúmeras variações de moléculas na classe dos flavonoides. (ANTUNES, 1999; BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006). Exemplos de variações do grupo dos flavonoides são: flavonóis, flavonas, flavanonas, antocianinas, isoflavonas e chalconas (SILVA et al., 2010).

O terceiro grupo importante entre os compostos fenólicos são os taninos. Os taninos são compostos de peso molecular alto e podem ser subdivididos em taninos hidrolisáveis e condensados e clorotaninos. Os hidrolisáveis são ésteres de ácido gálico enquanto os condensáveis são polímeros de monômeros de poli-hidroxi-flavan-3-ol. Já os clorotaninos consistem inteiramente de cloroglucinol, mas estes não são significativos na dieta humana (BRAVO, 2009).

Quanto às suas propriedades funcionais, os compostos fenólicos estão relacionados à presença de cor em alguns vegetais, principalmente antocianinas. Eles também podem servir a uma variedade de propósitos para plantas, como dar cor, atrair ou repelir insetos e fornecer proteção antimicrobiana, antiviral e UV (MANACH et al., 2004). São reportados diversos benefícios para a saúde humana relacionados às antocianinas, como retardar as doenças relacionadas ao estresse por oxidação, incluindo a aterosclerose, diabetes e câncer. Além disso, devido à sua capacidade de eliminação de radicais, os fenólicos têm o potencial de prolongar a vida útil dos produtos alimentícios, reduzindo os impactos negativos da oxidação lipídica na qualidade nutricional, sabor, cor, odor, textura e aparência dos alimentos (DE SOUZA; WILLEMS; LOW, 2019).

2.2.2 Antocianinas

As antocianinas (do grego *anthos*, uma flor, e *kyanos*, azul escuro) são pigmentos presentes no feijão preto (*Phaseolus vulgaris* L.) que fazem parte do grupo dos flavonoides. Dependendo do cultivar os feijões podem apresentar uma grande variação no conteúdo de flavonoides e na cor da casca (MAZZA, 1993).

As antocianinas podem ser produzidas nas folhas do feijão pela ação do ozônio presente na atmosfera. O genótipo determina a presença do pigmento e em alguns casos são

necessários genes mais complementares, enquanto em outros um único gene dominante é suficiente para permitir a formação dos pigmentos de antocianina (MAZZA, 1993).

Após a clorofila, as antocianinas são o mais importante grupo de pigmentos de origem vegetal, compondo o maior grupo de pigmentos solúveis em água do reino vegetal (LOPES et al., 2007). Em suas estruturas possuem ligações conjugadas que absorvem a luz a cerca de 500 nm e são a base para as cores vermelha, azul e roxa das frutas, vegetais e seus produtos.

Em plantas, as antocianinas desempenham diversas funções, como atividade antioxidante, proteção à ação da luz, mecanismo de defesa e função biológica. As cores vivas e intensas que elas produzem presentes nas flores, pétalas, folhas, frutas e legumes, têm um papel importante em vários mecanismos reprodutores das plantas, tais como a polinização e a dispersão de sementes (LOPES et al., 2007; PATRAS et al., 2010).

Em alimentos e bebidas a cor é um dos atributos mais importantes quando se trata da percepção do consumidor ao produto. Assim, o uso de corantes na indústria de alimentos é uma prática comum (LOPES et al., 2007; MAZZA, 1993).

No Brasil, é proibida a utilização de diversos corantes sintéticos. Assim, a indústria de alimentos recorreu a uma série de pigmentos naturais de origem vegetal e animal que pudessem substituir os corantes proibidos pela legislação e outros que possam ser prejudiciais à saúde humana (LOPES et al., 2007).

Utilizados como corante natural em alimentos, as antocianinas são responsáveis pelos tons compreendidos desde a coloração vermelha até a coloração azul (LOPES et al., 2007). A cor dos alimentos pigmentados com antocianina depende da estrutura e concentração do pigmento, pH, temperatura, presença de copigmentos, íons metálicos, enzimas, oxigênio, ácido ascórbico, açúcares e seus produtos de degradação, dióxido de enxofre e outros fatores (MAZZA, 1993).

Em solução aquosa, as antocianinas são frequentemente encontradas na forma de uma mistura de diferentes estruturas químicas em equilíbrio: cátion flavilium (vermelho), base anidra quinoidal (azul), pseudo-base carbitol (incolor), e chalcona (incolor ou levemente amarela). (LOPES et al., 2007; MAZZA, 1993).

Entretanto, a exposição de soluções de antocianinas a temperatura superior à ambiente (25°C) promovem sua degradação e esta degradação é ainda mais intensificada quando o meio possui pH elevado (LOPES et al., 2007).

Outra aplicação das antocianinas devido a sua pigmentação é o desenvolvimento de filmes indicadores de pH. Em seu estudo, Choi et al. (2017) relata que o filme desenvolvido não é tóxico e produz respostas confiáveis às variações de pH, possuindo potencial para aplicações em materiais inteligentes para embalagens de alimentos.

As antocianinas também foram associadas à resistência a patógenos em plantas como girassol, mudas de ervilha e milho. Além disso, também têm sido indicadas como potencializadoras da fotossíntese nas folhas das plantas de floresta tropical e como reguladores da fotossíntese em algumas espécies lenhosas (LEE; LOWRY; STONE, 1979; MAZZA, 1993).

Na área farmacêutica, estudos também relatam que as antocianinas possuem atividade antiulcerosa e fornecem proteção contra a radiação UV (CRISTONI; MAGISTRETTI, 1987; MAZZA, 1993).

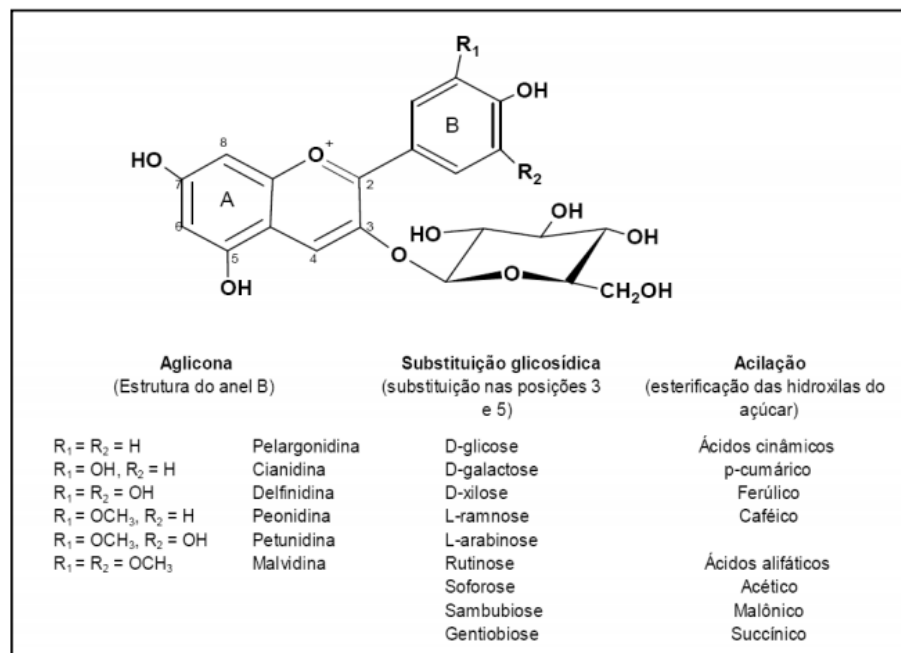
2.2.2.1 Estrutura química

As antocianinas, compostos fenólicos do grupo dos flavonóides, são caracterizadas pela estrutura constituída por duas ou três porções, uma aglicona (antocianidina), um grupo de açúcares e, frequentemente, um grupo de ácidos orgânicos (MALACRIDA; DA MOTTA, 2006).

As diferenças entre as antocianinas individuais são o número de grupos hidroxila na molécula, o grau de metilação desses grupos hidroxila, a natureza e o número de açúcares ligados à molécula e a posição da ligação, bem como a natureza e o número de ácidos alifáticos ou aromáticos ligados aos açúcares na molécula. Entre as antocianidinas ou agliconas de ocorrência natural conhecidas, seis ocorrem com mais frequência em plantas. São elas: pelargonidina, cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina e malvidina (MAZZA, 1993).

A estrutura química básica das antocianinas é baseada em uma estrutura policíclica de quinze carbonos, mostrada na Figura 2:

Figura 2 - Estrutura química das antocianinas.



Fonte: Malacrida; Da Motta (2006).

Uma vez que cada antocianidina pode ser glicosilada e acilada por diferentes açúcares e ácidos, em posições diferentes, o número de antocianinas é 15 a 20 vezes maior que o número de antocianidinas. Os açúcares mais comumente ligados a antocianidinas são glicose, galactose, ramnose e arabinose. Os di- e trissacarídeos, formados por combinações desses quatro monossacarídeos, também podem glicosilar algumas antocianidinas (MAZZA, 1993).

As antocianinas presentes em feijões comuns são a delphinidina-3-O-glucosídeo, malvidina-3-O-glucosídeo e petunidin-3-O-glucosídeo (LOS et al., 2018b). Estas possuem em sua molécula a substituição dos radicais nas posições 3 e 5 do anel B pelo radical OH no caso da delphinidina-3-O-glucosídeo e OCH₃ na malvidina-3-O-glucosídeo. Na molécula da petunidin-3-O-glucosídeo os radicais das posições 3 e 5 do anel B são substituídos pelos radicais OCH₃ e OH, respectivamente (MALACRIDA; DA MOTTA, 2006).

2.3 OBTENÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS

Compostos bioativos como antioxidantes, vitamina C e seus homólogos são considerados importantes agentes promotores de saúde. Fortemente presentes em vegetais, os compostos que apresentam maior destaque com bioatividade são os fenólicos. Estes podem se

dividir em duas classes: os não flavonoides e os flavonoides. Entre não flavonoides estão os derivados de ácido hidroxicinâmico e odifenóis assim como o hidroxitirosol, ácidos gálico e protocatecúico. (CARVALHO; BERMAMASCO; GOMES, 2018).

Para a obtenção dos compostos bioativos presentes em matérias-primas vegetais, inclusive no feijão, faz-se necessária a utilização de métodos de extração. A primeira etapa do processo de obtenção destes compostos consiste na padronização do material, em termos de granulometria e teor de umidade (FERRO, 2019).

No meio industrial, a extração convencional com solventes é a técnica mais comum. Esta técnica pode ser aplicada para diferentes matrizes, onde a transferência de massa é facilitada pela combinação entre solvente com o processo de aquecimento. Entretanto, a técnica apresenta desvantagens quando os compostos de interesse são termolábeis, devido ao risco de degradação, além do alto consumo energético (BARBA et al., 2016).

O processo de extração também pode ser realizado através de métodos não convencionais, entre eles a extração com solventes não convencionais, extração supercrítica com dióxido de carbono (ESC), extração líquida pressurizada (ELP) e extração assistida por ultrassom (CARVALHO; BERMAMASCO; GOMES, 2018). Com o desenvolvimento destes métodos de extração e com o aumento da aplicação da química verde, mais estudos tem se voltado para métodos denominados de ecologicamente corretas (JIN et al., 2017). Neste cenário, os métodos não convencionais conseguem atender aos conceitos da química verde com baixo consumo de energia, reduzidas operações unitárias, uso de solventes alternativos e biodegradáveis. Os custos para a aplicação da tecnologia para os métodos não convencionais podem ser mais elevados em comparação aos convencionais, entretanto observa-se o aumento nos teores de compostos obtidos e maior seletividade na extração, mostrando-se uma alternativa viável (CARVALHO; BERMAMASCO; GOMES, 2018).

2.3.1 Métodos de extração

Extração é uma das operações unitárias mais utilizadas na indústria de alimentos, sendo empregada principalmente na obtenção de compostos retidos na matriz do alimento. A técnica de extração utilizada na obtenção de extratos de produtos naturais influencia diretamente sua qualidade e sua composição final (DE OLIVEIRA, 2015).

A estabilidade das antocianinas é sensível a diversos fatores, e são encontrados vários exemplos de estudos a respeito na literatura. Assim, definir as condições de extração do pigmento é um passo primordial, a fim de minimizar as alterações em suas características

(LOPES et al., 2007). Além disso, é importante considerar a eficiência, sustentabilidade e viabilidade econômica ao definir o método de obtenção destes compostos bioativos.

2.3.1.1 Extração por líquido pressurizado - ELP

A extração com líquido pressurizado (ELP) consiste na aplicação de temperatura e pressões elevadas em intervalos de tempo reduzidos (CARVALHO; BERMAMASCO; GOMES, 2018). Atualmente, este método de extração tem sido amplamente explorado para a obtenção de compostos fenólicos, comparado com métodos tradicionais. A conclusão comum nesses estudos é que os métodos de ELP foram preferidos, fornecendo resultados comparáveis ou melhores que métodos tradicionais na recuperação destes compostos (MUSTAFA; TURNER, 2011).

O uso de altas temperaturas melhora a eficiência da extração, uma vez que ajuda a interromper as interações da matriz analito-amostra causadas pelas forças de van der Waals, ligação de hidrogênio e atração de dipolo (RICHTER et al., 1996). Além disso, a temperatura elevada diminui a tensão superficial do solvente, solutos e matriz. Uma diminuição na tensão superficial do solvente permite que as cavidades deste sejam formadas mais facilmente e que os analitos se dissolvam mais rapidamente (MÖCKEL; HÖFLER; MELZER, 1987).

Outra vantagem da utilização de temperaturas mais altas no processo é o aumento da taxa de difusão, isto é, a transferência de massa da molécula no solvente, o que permite extrações mais rápidas, especialmente em amostras controladas por difusão. Por outro lado, em temperaturas mais altas a seletividade de extração é menor. Além disso, altas temperaturas podem afetar compostos termolábeis sujeitos a desintegração e degradação hidrolítica (MUSTAFA; TURNER, 2011).

Quanto ao uso de alta pressão no processo de extração, sua principal vantagem é que uma temperatura acima do ponto de ebulição pode ser usada enquanto o solvente mantém seu estado líquido. O uso de pressão elevada em alta temperatura e tensão superficial reduzida do solvente ajuda a forçar o solvente dentro do poro da matriz a entrar em contato com o analito e extraí-lo (MUSTAFA; TURNER, 2011).

O uso de pressão durante a extração pode resultar em perturbações na matriz, o que pode melhorar a transferência de massa do analito da amostra para o solvente. A alta pressão durante a extração controla os problemas relacionados às bolhas de ar encontradas na matriz que impedem o solvente de atingir o analito. Essas condições aumentam a cinética de

solubilidade e dessorção do analito da matriz da amostra (RICHTER et al., 1996; ROSTAGNO et al., 2009).

2.3.1.2 Extração por maceração

A maceração é um processo estático em que a matéria-prima permanece em contato com um solvente orgânico por um determinado tempo com ou sem agitação e sem renovação do líquido do solvente (COELHO, 2015; DE OLIVEIRA, 2015). Devido à sua simplicidade e baixo custo, a maceração é uma das técnicas extrativas mais usuais (VINATORU, 2001). Além disso, na maceração a polaridade do líquido extrator e a natureza da matéria-prima (solubilidade dos compostos presentes na matriz, tamanho de fragmentos do material sólido, entre outros) tem grande impacto na eficiência da obtenção dos compostos desejados (DE OLIVEIRA, 2015).

Apesar do baixo custo do processo de extração e de poder ser repetido várias vezes utilizando diferentes solventes (maceração múltipla ou sequencial), a maceração possui desvantagens como a lentidão e a impossibilidade de extrair totalmente os princípios ativos da matéria-prima (MELECHI, 2005).

2.3.1.3 Extração assistida por ultrassom

A extração assistida por ultrassom é uma técnica que se baseia na utilização de energia das ondas sonoras (vibrações mecânicas) transmitidas em frequência de 20 a 20.000 kHz (DE OLIVEIRA, 2015). Esse método proporciona maiores rendimentos de extração, utilizando menos solvente e de forma mais rápida do que extração com solventes orgânicos por meio de maceração. Além disso, pode ser empregado numa ampla variedade de produtos, devido à simplicidade da técnica e do equipamento. Entre suas aplicações, se destacam a obtenção de compostos de produtos naturais, como proteínas, açúcares, complexos polissacarídeos, proteínas, óleos, antioxidantes, entre outros (DE OLIVEIRA, 2015; MAZZUTTI, 2016).

A maior eficiência de extração desse método em relação à maceração, por exemplo, está relacionada com o fenômeno chamado de cavitação acústica. Nesse processo os ciclos de expansão podem criar cavidades ou microbolhas no líquido que quando formadas absorvem a energia das ondas sonoras e expandem durante os ciclos de expansão e comprimem durante o ciclo de compressão (MAZZUTTI, 2016). Essa variação na pressão do líquido utilizado no processo causa mudanças físicas e químicas permanentes, como ruptura dos sólidos e instabilidade na interface de sistemas líquido-líquido e líquido-gás. Além disso, a agitação das

moléculas provoca um aumento de temperatura que favorece a solubilidade e difusividade de compostos no meio (DE OLIVEIRA, 2015).

As desvantagens na aplicação da extração assistida por ultrassom são associadas à necessidade de etapas posteriores de recuperação do extrato, como filtração ou centrifugação e eliminação do solvente. Além disso, a otimização das variáveis de processo tempo, temperatura e frequência é necessária para manter a estabilidade dos compostos, evitando degradações e perdas de atividade (JOANA GIL-CHÁVEZ et al., 2013).

2.4 CONSIDERAÇÕES A RESPEITO DO ESTADO DA ARTE

Diante do surgimento da demanda de substituição de aditivos alimentares sintéticos e do interesse econômico no aproveitamento de resíduos da indústria, começam a ser desenvolvidos estudos acerca da obtenção de compostos bioativos obtidos a partir de matérias-primas vegetais.

Sendo um dos maiores produtores mundiais de feijão, o Brasil é colocado como um dos maiores geradores de coprodutos do beneficiamento dos grãos. Partindo do pressuposto, o conhecimento da composição química do feijão, assim como o desenvolvimento de métodos eficientes para recuperação de seus compostos de interesse são necessários para que o resíduo possa se tornar uma potencial matéria-prima de interesse econômico.

Uma vez que a obtenção de compostos bioativos como as antocianinas visam agregar valor a produtos destinados ao consumo humano, deve-se considerar o uso de solventes atóxicos e seguros nos métodos de extração. Aliado a isso, busca-se uma maior eficiência no estudo de métodos de extração, onde temperatura, vazão, pressão e composição do solvente são parâmetros importantes a serem avaliados.

Diante deste cenário, o presente trabalho busca comparar os métodos de extração convencionais (maceração e extração assistida por ultrassom) e à alta pressão (extração com líquido pressurizado) de forma a propor as melhores condições para obtenção de antocianinas das cascas de feijões.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS

3.1.1 Preparo da matéria-prima

Para a realização dos experimentos, foram usadas “bandinhas” de feijão preto (grãos quebrados com cotilédones separados) cedidas por processadores de feijão da região. Estas passaram por uma seleção em laboratório, onde feijões deteriorados por insetos ou microrganismos foram descartados. Para a remoção das cascas (Figura 3) dos feijões quebrados, as amostras foram previamente hidratadas em um béquer com água destilada a uma razão de 1:100 (m/v), mantido à temperatura ambiente por 2h. Então, o excesso de água foi removido e os cotilédones (Figura 4) quebrados foram secos em estufa de circulação de ar forçada (De Leo, Porto Alegre, Brasil) a 60°C por 6h. Na sequência, as cascas foram removidas por processo de abrasão, sendo as amostras separadas em cascas e cotilédones sem casca. Por fim, as cascas foram processadas em um moinho de facas e peneiradas, obtendo-se partículas de 0,30 mm. Depois disto, as cascas foram usadas para os experimentos de extração dos compostos bioativos.

Figura 3 - Cascas de "bandinhas" de feijão.



Fonte: a autora.

Figura 4 - "Bandinhas" de feijão descascado (cotilédones).



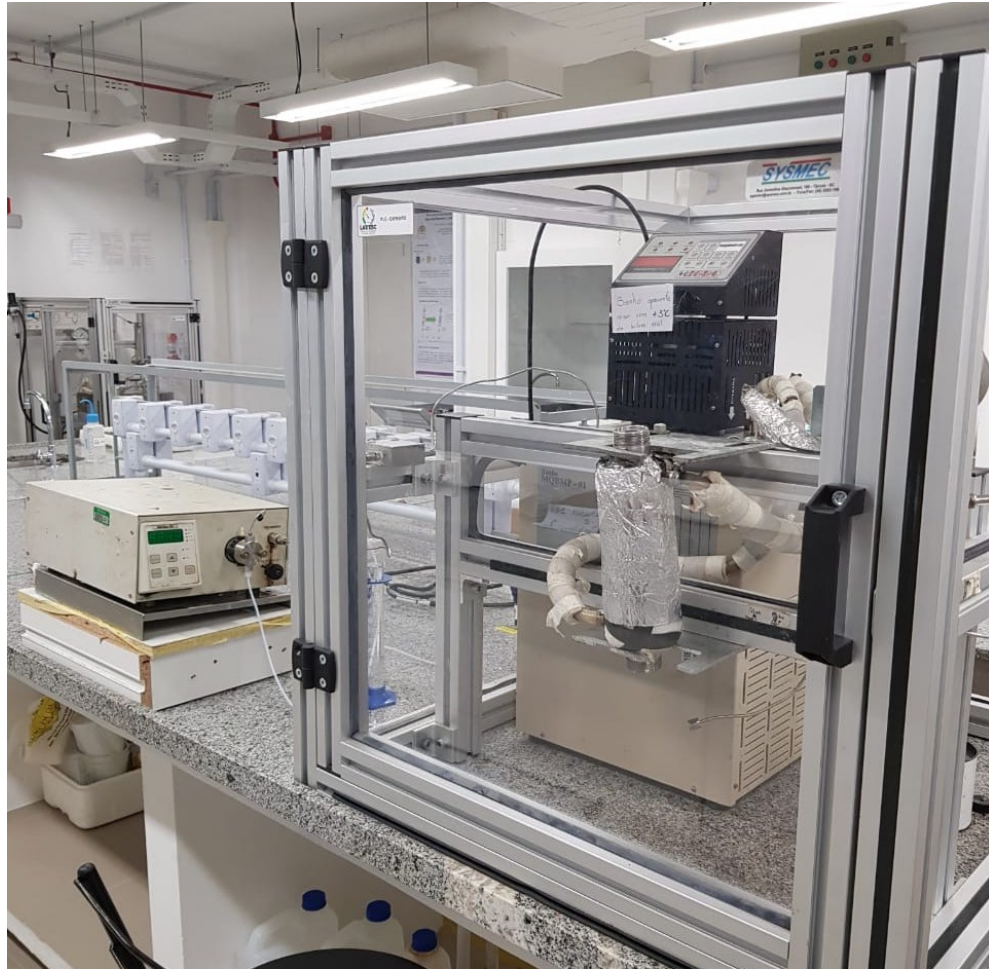
Fonte: a autora.

3.1.2 Extração líquida pressurizada- ELP

A extração dos compostos bioativos das cascas de feijão pelo método ELP foi feita em processo dinâmico. Ou seja, o leito de extração é formado pelo empacotamento da amostra no extrator de aço inoxidável (Figura 5), o qual possui uma camisa externa que permite que a temperatura do processo seja mantida constante. Na sequência o sistema é preenchido com o solvente, continuamente bombeado através da amostra.

Foram adicionadas ao leito de extração 3,0 g da amostra triturada. A fim de otimizar as condições de extração das antocianinas da casca do feijão, foi utilizado um planejamento Box-Behnken (Tabela 1) (BOX; BEHNKEN, 1960). Foram realizadas quinze extrações nas temperaturas de 30, 50 e 70 °C, nas vazões de 3, 4 e 5 mL/min com soluções de etanol e ácido cítrico nas concentrações de 30, 50 e 70% de etanol. O tempo de extração foi definido pela curva da cinética de extração e a pressão utilizada foi de 100 bar. Os extratos obtidos foram armazenados em frascos âmbar em freezer doméstico.

Figura 5 - Sistema utilizado para a extração líquida pressurizada.



Sistema composto por um reservatório de solvente, bomba de solvente, válvula de bloqueio, válvula de contrapressão, leito de extração e banho termostático.

Fonte: a autora.

Tabela 1 - Planejamento Box-Behnken

Amostra	T (°C)	[] etOH (%)	Vazão (mL/min)
1	30	30	4
2	50	30	5
3	50	30	3
4	70	30	4
5	70	50	3
6	50	50	4
7	50	50	4
8	50	50	4
9	70	50	5
10	30	50	3
11	30	50	5
12	30	70	4
13	50	70	5
14	50	70	3
15	70	70	4

Fonte: a autora.

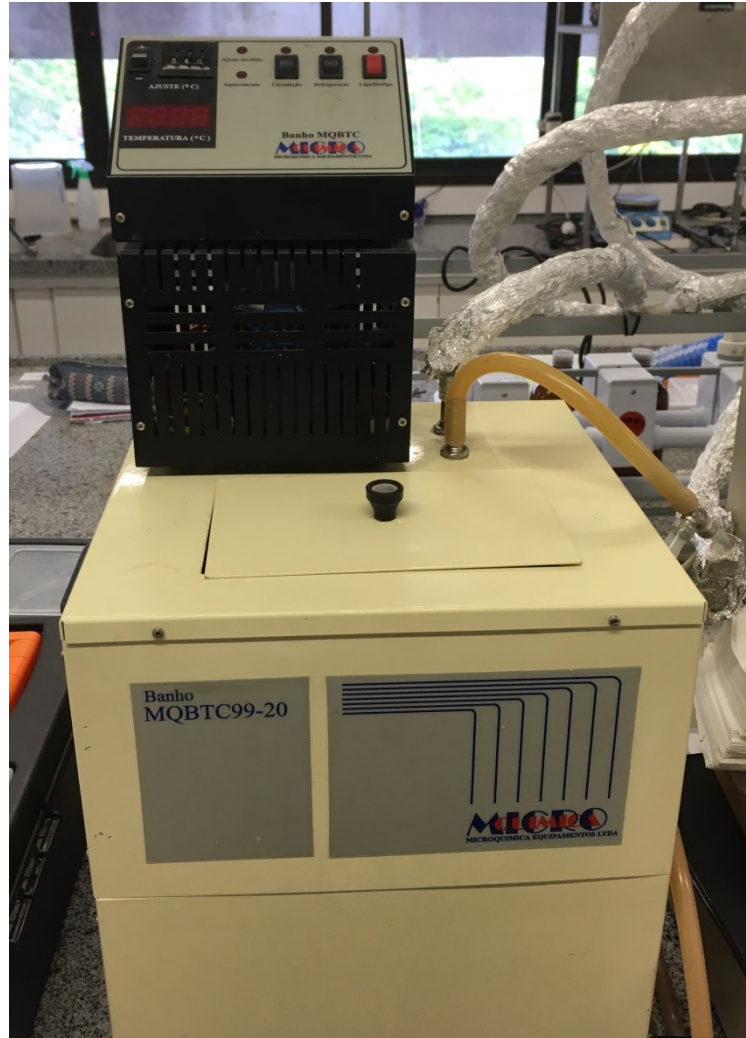
3.1.3 Cinética de extração

Para determinação da cinética de extração dos compostos bioativos foi realizada a extração em ELP com uma solução de etanol e ácido cítrico na proporção 1:1 a 50 °C, vazão de 4 mL/min pressão de 100 bar. A extração foi feita por 51 minutos com amostras de extrato retiradas a cada 3 minutos, com seu teor de AMT avaliado pelo método de diferença de pH (GIUSTI; WROLSTAD, 2001). A partir da curva obtida e com base na literatura, foi determinado o tempo para as extrações do planejamento.

3.1.4 Extração por maceração

A extração das antocianinas por maceração foi realizada em duplicata com 3,0 g da amostra triturada, 60 mL solvente 30% etanol e 70% ácido cítrico (definido a partir da otimização do planejamento ELP), tempo de 26 minutos definido na cinética de extração por ELP. A amostra e o solvente foram homogeneizados em um béquer que posteriormente foi mergulhado em um banho termostático (Figura 6) à temperatura de 60 °C (definida na otimização do planejamento ELP) por 26 minutos. A amostra e o extrato foram separados através de filtração em funil de vidro com papel-filtro e o filtrado recolhido em um béquer. Os extratos obtidos foram armazenados em frascos âmbar em freezer doméstico.

Figura 6 - Banho termostático utilizado para o controle de temperatura da extração por maceração.



Fonte: a autora.

3.1.5 Extração assistida por ultrassom

A extração assistida por ultrassom para recuperação das antocianinas foi realizada em duplicata com 3g de amostra das cascas de feijão, 60 mL de solvente 30% etanol e 70% ácido cítrico. A amostra e o solvente foram colocados em um béquer e homogeneizados, então o béquer foi mergulhado em um banho e submetido ao tratamento indireto em ultrassom com o uso de uma lavadora ultrassônica (USC-700/55 kHz, Unique Ind. e Com. de Produtos Eletrônicos Ltda., Indaiatuba/SP, Brasil, Figura 7) pelo tempo de 26 minutos. Após a extração, solução de extrato foi separada da matriz através de filtração em funil de vidro com papel-filtro, sendo o filtrado recolhido em um béquer. Os extratos obtidos foram armazenados em frascos âmbar em freezer doméstico.

Figura 7 - Lavadora ultrassônica utilizada no processo de extração assistida por ultrassom.



Fonte: a autora.

3.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS COMPOSTOS BIOATIVOS

3.2.1 Compostos fenólicos totais

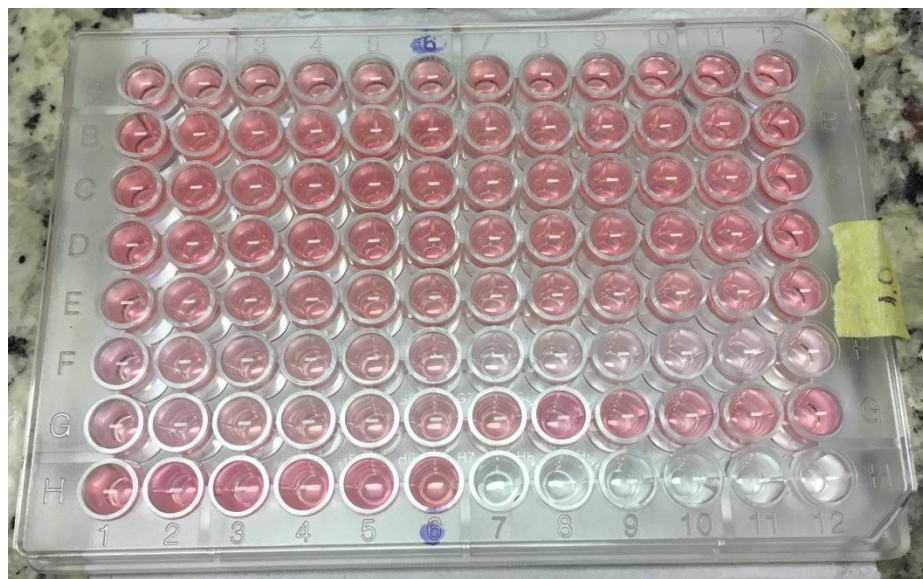
O teor de compostos fenólicos totais foi determinado por análise colorimétrica utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu, como descrito por Singleton e Rossi (1965). Em uma microplaca foram transferidas alíquotas de 240 μL de água destilada, 15 μL de amostra e 15 μL de reagente de Folin-Ciocalteu. Após três minutos, 30 μL de carbonato de sódio (20 %) foram adicionados. Após uma hora, a absorbância (765 nm) foi medida por espectrofotometria em uma multileitora TECAN Infinite M200. A leitura foi comparada com uma curva de calibração de ácido gálico ($y = 0,0037x + 0,0052$) e os resultados expressos como miligramas de equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama de amostra (mg EAG/g).

3.2.2 Antocianinas totais

As antocianinas totais foram determinadas pelo método de diferença de pH (GIUSTI et al., 2017). Primeiramente, duas soluções foram preparadas: uma solução tampão a pH 1,0

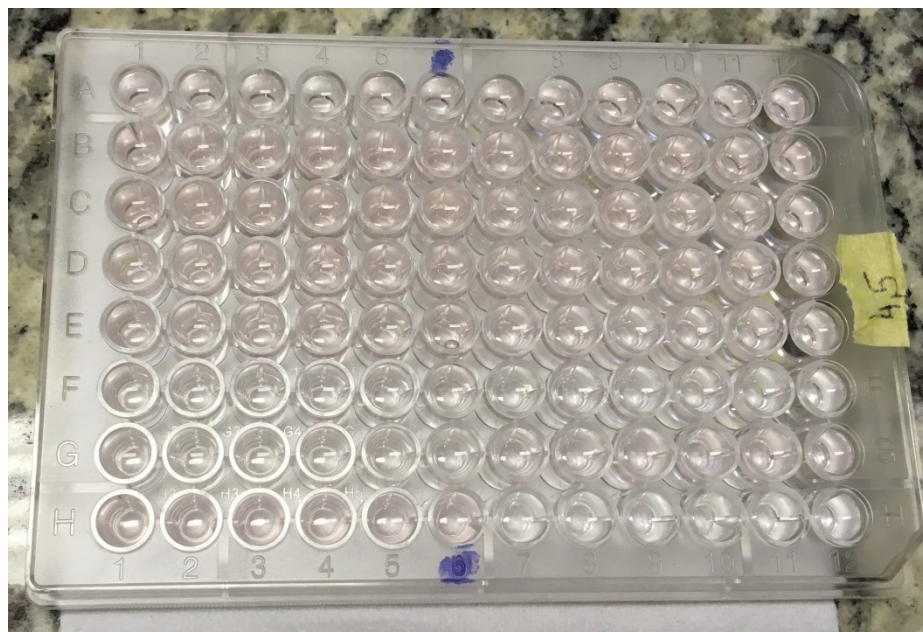
(0,025 mol/L de tampão cloreto de potássio, acidificado com HCl) e outro tampão pH 4,5 (0,4 mol/L de tampão acetato de sódio, acidificado com HCl). Então, alíquotas de 10 μ L do extrato foram transferidos para microplacas e 290 μ L do tampão correspondente (pH 1,0 e pH 4,5) foi adicionado. Após o período de 30 min de equilíbrio, a absorbância foi medida a 520 e 700 nm, usando uma multileitora TECAN Infinite M200. As figuras 8 e 9 mostram as microplacas com soluções de pH 1,0 e 4,5, respectivamente, antes da leitura de absorbância dos extratos resultantes do planejamento de otimização em ELP.

Figura 8 - Ensaio para determinação de antocianinas monoméricas totais em pH 1,0



Fonte: a autora.

Figura 9 - Ensaio para determinação de antocianinas monoméricas totais em pH 4,5.



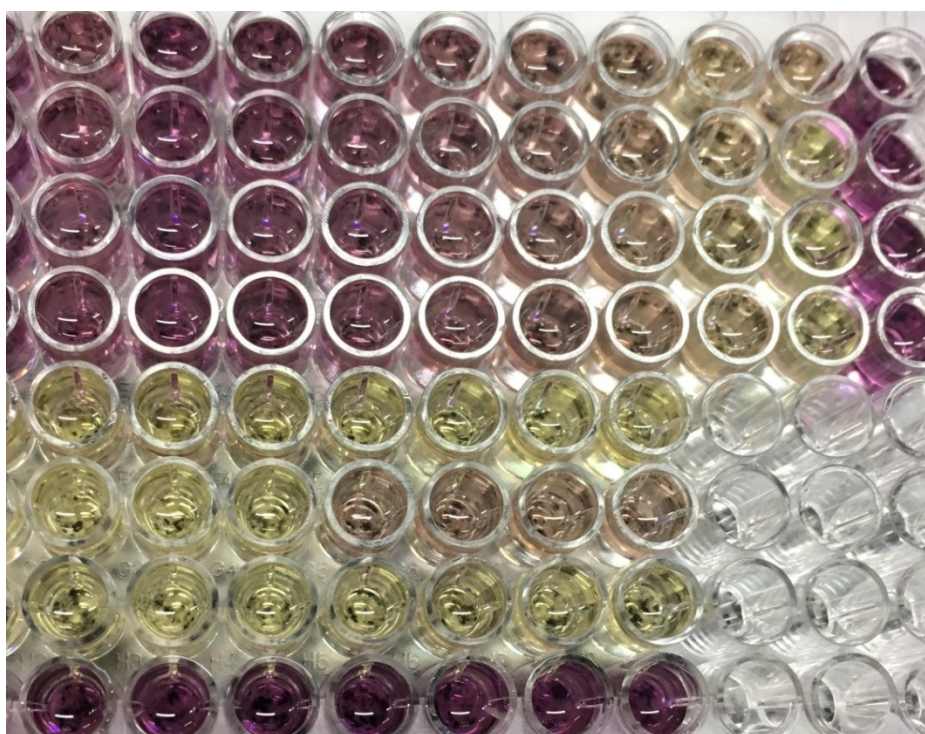
Fonte: a autora.

3.2.3 Avaliação do potencial antioxidante

A habilidade dos extratos na eliminação de radicais livres foi determinada com o ensaio de DPPH de acordo com o método de (Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), com pequenas adaptações. As amostras diluídas (50 μ L) foram misturadas com 250 μ L de uma solução metanólica de DPPH (60 μ mol/L) em microplacas (Figura 10). A absorbância foi medida em 517 nm usando um leitor de microplacas após a solução ser deixada em repouso no escuro por 30 min.

Para a quantificação da capacidade antioxidante foi construída uma curva padrão de Trolox ($y = 0,3565x + 2,814$). A capacidade antioxidante dos extratos foi expressa em μ mol equivalente de Trolox (ET)/g de material seco.

Figura 10 - Foto aproximada de microplaca utilizada em análise DPPH.



Fonte: a autora.

3.2.4 Análise dos dados

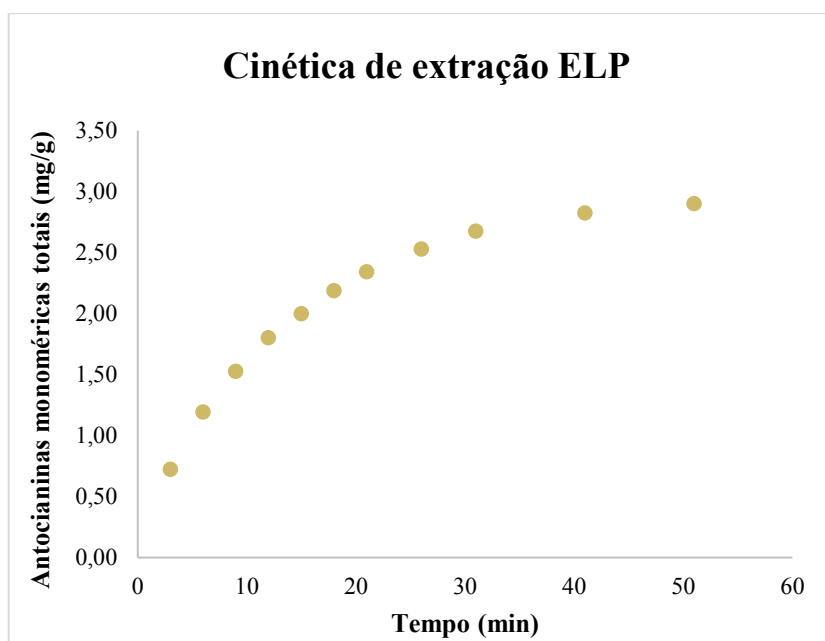
Os resultados obtidos foram expressos em média \pm desvio padrão. Para tratamento dos dados foi utilizada a análise de variância (ANOVA fator único) e aplicado o teste de médias de Tukey. As análises foram realizadas no software STATISTICA v. 13.3 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CINÉTICA DE EXTRAÇÃO

A partir das extrações realizadas em ELP conforme as seções 3.1.2 e 3.1.3 e análise das antocianinas monoméricas totais, foi obtida a curva cinética da extração (Figura 11). Observando a cinética de extração nota-se que a partir de 26 minutos de processo o teor de AMT aumenta lentamente. Segundo os dados experimentais, a quantidade de AMT no extrato em 26 minutos de processo é de 2,52 mg/g, enquanto em 51 minutos de extração o valor obtido é de 2,90 mg/g, uma diferença de apenas 0,38 mg/g em 34 minutos.

Figura 11 - Curva cinética de extração pelo método ELP.



Fonte: a autora

Em comparação a modelos de cinética de extração, onde as fases do processo são divididas em zona de extração controlada pela solubilidade (convecção) e zona de extração controlada por difusão, observa-se que até 26 minutos o fenômeno convectivo é dominante no processo e após esse tempo a extração é controlada pelo efeito difusivo, diminuindo sua velocidade. Desta forma, concluiu-se que a continuidade da extração a partir deste ponto resulta em uma pequena quantidade de AMT. A partir deste resultado foi determinado o tempo de extração de 26 minutos para a otimização da extração líquido pressurizada e demais métodos utilizados para comparação.

4.2 OTIMIZAÇÃO ELP

As quinze amostras extraídas pelo método ELP em diferentes condições tiveram seu conteúdo de antocianinas monoméricas totais (AMT), potencial antioxidante e compostos fenólicos totais (CFT) avaliados. Os resultados representados pela média em base seca \pm desvio padrão são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Resultados das análises de atividade antioxidante, teor de antocianinas monoméricas totais e compostos fenólicos totais para extrações em ELP em diferentes condições.

Extrato	T (°C)	[] EtOH (%)	Vazão (mL/min)	AMT (mg/g)	CFT (mg EAG/g)	DPPH (μ mol ET/g)
1	30	30	4	2,76 ^e \pm 0,07	16,38 ^{c,d} \pm 0,10	164,75 ^d \pm 10,39
2	50	30	5	4,78 ^a \pm 0,07	17,10 ^{b,c} \pm 0,27	222,78 ^{b,c} \pm 5,99
3	50	30	3	4,38 ^b \pm 0,04	18,11 ^{a,b} \pm 0,24	219,95 ^{b,c} \pm 5,66
4	70	30	4	3,81 ^c \pm 0,03	17,54 ^{b,c} \pm 0,29	214,04 ^c \pm 3,62
5	70	50	3	3,60 ^c \pm 0,10	18,10 ^{a,b} \pm 0,26	235,97 ^{a,b} \pm 2,86
6	50	50	4	3,71 ^c \pm 0,12	17,51 ^{a,b} \pm 0,27	202,57 ^c \pm 1,18
7	50	50	4	4,49 ^a \pm 0,13	17,84 ^{a,b} \pm 0,19	230,06 ^b \pm 2,10
8	50	50	4	4,27 ^b \pm 0,06	17,40 ^{b,c} \pm 0,33	214,59 ^{b,c} \pm 8,40
9	70	50	5	3,04 ^d \pm 0,13	18,39 ^a \pm 0,59	258,84 ^a \pm 2,19
10	30	50	3	1,89 ^g \pm 0,10	17,25 ^{b,c} \pm 0,63	144,87 ^d \pm 4,92
11	30	50	5	2,67 ^e \pm 0,06	15,54 ^d \pm 0,24	132,52 ^d \pm 11,28
12	30	70	4	1,23 ^h \pm 0,05	10,38 ^f \pm 0,39	108,37 ^e \pm 3,62
13	50	70	5	2,67 ^e \pm 0,08	13,07 ^e \pm 0,05	105,49 ^e \pm 13,23
14	50	70	3	2,16 ^f \pm 0,06	15,88 ^d \pm 0,30	110,30 ^e \pm 9,22
15	70	70	4	3,48 ^c \pm 0,04	17,90 ^{a,b} \pm 0,23	141,16 ^d \pm 5,79

Médias, seguidas de mesma letra na coluna, dentro de cada variável comportamental, não diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste Tukey.

Fonte: a autora.

De acordo com as análises do teor de antocianinas monoméricas totais realizadas, o extrato 2, na condição de extração a 50 °C, 30% de etanol e a uma vazão de 5 mL/min, foi o que apresentou maior conteúdo de AMT com 4,78 mg/g. Já o extrato 9, extraído a 70 °C, 50% de etanol e uma vazão 5 mL/min, foi o que apresentou os maiores valores no ensaio DPPH e análise de CFT, com resultados de 258,84 μ mol ET/g e 18,38 mg EAG/g, respectivamente.

Foi observado que o aumento de temperatura de forma isolada (vazão e concentração de etanol constante) tem efeito positivo na recuperação de AMT, CFT e na capacidade antioxidante dos extratos. Tal fato pode ser explicado pelo aumento da transferência de massa entre a matriz do soluto e o solvente e aumento da solubilidade do soluto causado pelo aumento da temperatura, resultando em uma maior recuperação dos compostos bioativos (RUDKE et al., 2019). Entretanto, a exposição do extrato a altas temperaturas pode promover a degradação das antocianinas (LOPES et al., 2007).

Por outro lado, o aumento da vazão de forma isolada influencia negativamente o teor de compostos fenólicos totais e potencial antioxidante. Como consequência da diminuição da vazão, o tempo de contato entre soluto e solvente é maior, aumentando a transferência de massa e justificando tal resultado (PEREIRA; MEIRELES, 2010; SANTOS et al., 2019). Fato interessante do ponto de vista econômico, uma vez que uma menor vazão resulta em um menor gasto de solvente para obtenção da mesma quantidade de compostos bioativos. Pode-se observar que entre os extratos 2 e 7, os maiores em conteúdo de AMT, não houveram diferenças significativas entre os resultados das análises utilizando diferentes vazões. Neste caso, a menor vazão deste par (4 mL/min) se mostra mais vantajosa economicamente por permitir que uma menor quantidade de solvente seja usada para a obtenção de um alto conteúdo de antocianinas.

De forma geral, o uso de solvente com menor concentração de etanol (30%) mostrou melhores resultados nas análises químicas realizadas. Entretanto, a utilização de etanol facilita a remoção do solvente da amostra por conta de sua volatilidade.

A partir dos dados obtidos nas análises da composição dos compostos bioativos, associando os experimentos que variavam os parâmetros estudados da extração, foram definidas as condições ótimas de extração pelo método ELP. A temperatura de 60 °C foi escolhida visando o equilíbrio entre AMT, CFT e potencial antioxidante, além de diminuir probabilidade de degradação das antocianinas pelo uso de temperaturas muito elevadas. Como discutido anteriormente, optou-se pela vazão de 4 mL/min por se mostrar vantajosa economicamente na recuperação de antocianinas. O solvente com 30% etanol e 70% de solução de ácido cítrico (0,1 mol/L) mostrou-se, de forma geral, mais eficaz quanto aos

resultados observados nas análises químicas. Estas condições foram utilizadas posteriormente nas extrações realizadas para comparação entre os métodos ELP, maceração e assistida por ultrassom.

4.3 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

Os três métodos de extração utilizados neste trabalho foram avaliados quanto ao teor de compostos fenólicos totais (CFT) dos extratos obtidos (Tabela 3). O extrato obtido através da extração por líquido pressurizado apresentou maior valor de CFT, com 19,09 mg EAG/g.

Mojica, Berhow e Gonzalez (2017) quantificaram o conteúdo de CFT em extratos da casca de feijão preto obtidos pelo processo de maceração, utilizando como solventes apenas água acidificada com ácido fórmico a 2% ou duas concentrações diferentes de etanol (0; 12,5 e 25%) por duas horas em diferentes temperaturas (4, 22 e 40 ° C) e diferentes proporções sólido/líquido (1:30, 1:40 e 1:50). Como resultado das análises do teor de compostos fenólicos totais, o extrato obtido com maior valor do parâmetro possuía resultado semelhante ao encontrado para o método de maceração deste trabalho, sendo 17,30 e 17,28 mg GAE/g os valores encontrados por Mojica et al. (2017) e deste trabalho, respectivamente.

Tabela 3 - Resultados das análises realizadas para comparação de extração por líquido pressurizado, maceração e assistida por ultrassom quanto ao teor de compostos fenólicos totais (CFT).

Extrato	Fenólicos totais (mg EAG/g)
ELP	19,09 ± 0,81
Maceração	17,28 ± 0,53
Ultrassom	18,17 ± 0,18

Fonte: a autora.

Observando os resultados de teor de compostos fenólicos totais (Tabela 3) dos extratos obtidos por diferentes métodos, nota-se uma melhor recuperação em CFT pelo processo de extração assistida por ultrassom em relação à maceração, com um aumento de 5%. Corrales et al. (2008) obtiveram resultados ainda melhores comparando estes dois métodos de extração, onde a recuperação de CFT pela extração assistida por ultrassom foi aproximadamente duas vezes maior em comparação ao método de extração convencional para subprodutos de uva.

4.4 ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS TOTAIS

Cada um dos extratos obtidos nos procedimentos realizados em duplicata para comparação dos métodos teve seu teor de antocianinas monoméricas totais avaliados. Como esperado, os extratos obtidos por ELP tiveram o maior valor de AMT (3,98 e 3,78 mg/g), seguidos dos extratos obtidos por extração assistida por ultrassom e maceração.

Tabela 4 - Resultados das análises realizadas para comparação de extração por líquido pressurizado, maceração e assistida por ultrassom quanto ao teor de antocianinas monoméricas totais (AMT) e potencial antioxidante (DPPH).

Extrato	AMT (mg/g)	DPPH ($\mu\text{mol ET/g}$)
ELP 1	3,98 \pm 0,19	249,58 \pm 7,58
ELP 2	3,78 \pm 0,19	237,42 \pm 3,65
Maceração 1	1,57 \pm 0,24	226,61 \pm 11,46
Maceração 2	1,89 \pm 0,05	222,68 \pm 4,26
Ultrassom 1	3,26 \pm 0,26	236,52 \pm 4,55
Ultrassom 2	3,64 \pm 0,18	234,08 \pm 8,60

Fonte: a autora.

No mesmo trabalho citado no item 4.3, Mojica, Berhow e Gonzalez (2017) avaliaram o conteúdo de AMT em extratos da casca de feijão. Em seus experimentos, o extrato com maior conteúdo de antocianinas apresentou um valor para AMT de 1,7 mg/g, que se assemelha aos valores encontrados nos experimentos de maceração deste trabalho (1,57 e 1,89 mg/g). Entretanto, esses valores chegam a ser 2,5 vezes menores aos obtidos por ELP. Tal diferença pode ser atribuída ao efeito do aumento da transferência de massa entre a matriz e o solvente com o uso de alta pressão (RICHTER et al., 1996; ROSTAGNO et al., 2009).

Resultados semelhantes em relação às AMT foram reportados por Santos, Veggi e Meireles (2012) comparando os métodos de extração por maceração e ELP para a obtenção de antocianinas das cascas de jabuticabas. Em seu trabalho o conteúdo de antocianinas monoméricas totais encontrado para a ELP é duas vezes maior do que a encontrada para a maceração.

O método de extração assistida por ultrassom também se mostrou vantajoso na recuperação de AMT em relação à extração por maceração. Tal resultado pode ser relacionado com o fenômeno de cavitação acústica, que promove uma melhoria no rendimento da extração (MAZZUTTI, 2016).

4.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE

Os métodos de extração ELP, maceração e assistida por ultrassom foram comparados quanto ao seu potencial antioxidante pelo método DPPH e tiveram seu resultado expresso em μmol equivalente de Trolox (ET)/g de material seco (Tabela 4). Através das análises foi observado que os extratos obtidos por ELP apresentaram o maior potencial antioxidante, 249,58 e 237,42 μmol ET/g, em relação aos outros métodos. Os extratos que apresentaram menor potencial antioxidante foram os obtidos pelo método de maceração, entretanto com uma diferença aproximada de apenas 12% em relação aos extratos obtidos por ELP.

Além disso, pode-se observar que a extração assistida por ultrassom apresentou resultados semelhantes em relação ao potencial antioxidante quando comparada à extração por líquido pressurizado.

Em estudo da otimização da extração de compostos fenólicos de feijões cariocas, Los et al. (2019) encontraram valores de até 34,40 μmol ET/g pelo método DPPH. Tal diferença em comparação a este trabalho pode ser relacionada ao fato de que no presente estudo foram utilizadas apenas as casca dos feijões para a extração dos compostos bioativos, onde os mesmo são encontrados em maiores concentrações em relação ao restante do grão. Além disso, tal resultado pode ser atribuído às diferenças nas composições entre diferentes espécies de feijão.

Analisando os resultados obtidos para cada extrato nas análises de AMT e potencial antioxidante pelo método DPPH, observa-se uma alta correlação ($r=0,86$) entre o conteúdo de antocianinas monoméricas totais e a atividade antioxidante do extrato. Ou seja, as extrações que resultam na maior obtenção de antocianinas apresentam maior potencial antioxidante. A correlação encontrada valida os resultados esperados pela literatura, uma vez que a atividade antioxidante é descrita por Patras et al. (2010) como uma propriedade significativa das antocianinas. Em feijões a delphinidina-3-O-glucosídeo, malvidina-3-O-glucosídeo e petunidin-3-O-glucosídeo são as antocianinas presentes em maior quantidade. Essas moléculas, assim como outros antioxidantes, possuem a capacidade de doar átomos de hidrogênio e inibindo as reações provocadas pelos radicais livres (LOS et al., 2018b).

5 CONCLUSÃO

As comparações entre os métodos de extração convencionais e a alta pressão demonstraram resultados dentro do esperado para a obtenção dos compostos bioativos das cascas de feijões. A partir deste trabalho foi possível verificar o efeito dos métodos de extração por líquido pressurizado (ELP) em obtenção de extratos com maior conteúdo de antocianinas, compostos fenólicos e maior potencial antioxidante. Além disso, foi possível otimizar as condições de extração do método ELP de forma que a obtenção de antocianinas fosse maximizada. Além da obtenção de compostos com maiores teores de antocianinas, a ELP tem como vantagens a possibilidade do uso de altas temperaturas mantendo o solvente no estado líquido e de se adequar a processos dinâmicos.

Por fim, os extratos obtidos a partir da casca de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), utilizando solventes que tem baixa toxicidade e seguros para o consumo humano, podem ser considerados como potencial fonte para obtenção de antocianinas que podem ser aplicadas no desenvolvimento de produtos alimentícios.

6 REFERÊNCIAS

- ANTUNES, M. DE L. P. B. L. M. G. RADICAIS LIVRES E OS PRINCIPAIS ANTIOXIDANTES DA DIETA. **Revista de Nutrição**, v. 35, n. 1, p. 123–130, 1999.
- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191–203, 2006.
- BARBA, F. J. et al. Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 49, p. 96–109, mar. 2016.
- BOX, G. E. P.; BEHNKEN, D. W. Some New Three Level Designs for the Study of Quantitative Variables. **Technometrics**, v. 2, n. 4, p. 455–475, nov. 1960.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, jan. 1995.
- BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317–333, 27 abr. 2009.
- CARVALHO, M. T.; BERMAMASCO, R.; GOMES, R. G. Métodos de extração de compostos bioativos: aproveitamento de subprodutos na agroindústria. **Revista UNINGÁ Review**, v. 33, n. 1, p. 66–84, 2018.
- CHÁVEZ-MENDOZA, C.; SÁNCHEZ, E. Bioactive compounds from mexican varieties of the common bean (*Phaseolus vulgaris*): Implications for health. **Molecules**, v. 22, n. 8, 2017.
- CHEN, P. X. et al. Characterization of free, conjugated and bound phenolics and lipophilic antioxidants in regular- and non-darkening cranberry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Chemistry**, v. 185, p. 298–308, 2015.
- CHEN, Y. et al. Dietary fiber analysis of four pulses using AOAC 2011.25: Implications for human health. **Nutrients**, v. 8, n. 12, p. 1–10, 2016.
- CHOI, I. et al. Intelligent pH indicator film composed of agar/potato starch and anthocyanin extracts from purple sweet potato. **Food Chemistry**, v. 218, p. 122–128, 2017.
- COELHO, M. I. D. S. **COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DA CASCA DO UMBU (SPONDIAS TUBEROSA ARRUDA) OBTIDOS POR DIFERENTES TÉCNICAS**. 2015. 165 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.
- CORRALES, M. et al. Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: A comparison. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 9, n. 1, p. 85–91, jan. 2008.

CRISTONI, A.; MAGISTRETTI, M. J. Antiulcer and healing activity of *Vaccinium myrtillus* anthocyanosides. **II Farmaco; edizione pratica**, v. 42, n. 2, p. 29–43, fev. 1987.

DE OLIVEIRA, D. A. **APLICAÇÃO DAS TECNOLOGIAS SUPERCRÍTICA E CONVENCIONAIS PARA O REAPROVEITAMENTO DOS RESÍDUOS DO PROCESSAMENTO DE MARACUJÁ (*Passiflora edulis f. flavicarpa*)**. 2015. 205 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

DE SOUZA, D. R.; WILLEMS, J. L.; LOW, N. H. Phenolic composition and antioxidant activities of saskatoon berry fruit and pomace. **Food Chemistry**, v. 290, n. March, p. 168–177, 2019.

DIDONET, A. D.; SILVA, S. C. Feijão de alta produtividade: Elementos climáticos e produtividade do feijoeiro. **Informe Agropecuário**, p. 13–19, 2004.

EMBRAPA. **Embrapa**. Disponível em:

<https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/feijao/arvore/CONTAG01_69_1162003151646.html>. Acesso em: 23 set. 2019.

FERRO, D. M. **GUANXUMA (*Sida rhombifolia* L.): OBTENÇÃO DE EXTRATOS COM POTENCIAL ANTIOXIDANTE POR MÉTODOS A ALTA PRESSÃO E ENCAPSULAÇÃO VIA SPRAY-DRYING**. 2019. 221 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2019.

FERRO, M. M. Resíduo do beneficiamento de feijão em dietas para ovinos confinados. 2014. GAN, R. Y. et al. Pigmented edible bean coats as natural sources of polyphenols with antioxidant and antibacterial effects. **LWT - Food Science and Technology**, v. 73, p. 168–177, 2016.

GIUSTI, F. et al. Determination of fourteen polyphenols in pulses by high performance liquid chromatography-diode array detection (HPLC-DAD) and correlation study with antioxidant activity and colour. **Food Chemistry**, v. 221, p. 689–697, 2017.

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, v. 00, n. 1, p. F1.2.1-F1.2.13, abr. 2001.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: Updating a personal view. **Nutrition Reviews**, v. 70, n. 5, p. 257–265, 2012.

JIN, S. et al. Improvement of resveratrol production from waste residue of grape seed by biotransformation of edible immobilized *Aspergillus oryzae* cells and negative pressure cavitation bioreactor using biphasic ionic liquid aqueous system pretreatment. **Food and Bioproducts Processing**, v. 102, p. 177–185, 2017.

JOANA GIL-CHÁVEZ, G. et al. Technologies for Extraction and Production of Bioactive Compounds to be Used as Nutraceuticals and Food Ingredients: An Overview. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 1, p. 5–23, jan. 2013.

JUN, S.; SHIN, S.; JOUNG, H. Estimation of dietary flavonoid intake and major food sources of Korean adults. **British Journal of Nutrition**, v. 115, n. 3, p. 480–489, 14 fev. 2016.

KRINSKY, N. I. The biological properties of carotenoids. **Pure & Appl. Chem**, v. 66, n. 5, p. 1003–1010, 1994.

LEE, D. W.; LOWRY, J. B.; STONE, B. C. Abaxial Anthocyanin Layer in Leaves of Tropical Rain Forest Plants: Enhancer of Light Capture in Deep Shade. **Biotropica**, v. 11, n. 1, p. 70, mar. 1979.

LOPES, T. J. et al. ANTOCIANINAS: UMA BREVE REVISÃO DAS CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E DA ESTABILIDADE. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 13, n. 3, p. 291–297, 2007.

LOS, F. G. B. et al. **Beans (Phaseolus vulgaris L.): whole seeds with complex chemical composition** *Current Opinion in Food Science*, 2018b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.01.010>>. Acesso em: 2 set. 2019

LOS, F. G. B. et al. Extraction Optimization of Phenolic Extracts from Carioca Bean (Phaseolus vulgaris L.) Using Response Surface Methodology. **Food Analytical Methods**, v. 12, n. 1, p. 148–159, 12 jan. 2019.

MAGALHÃES, A. L. R. et al. Resíduo proveniente do beneficiamento do feijão (Phaseolus vulgaris L.) em rações para vacas em lactação: Consumo, digestibilidade, produção e composição do leite e eficiência de alimentação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 3, p. 529–537, 2008.

MALACRIDA, C. R.; DA MOTTA, S. ANTOCIANINAS EM SUCO DE UVA: COMPOSIÇÃO E ESTABILIDADE. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 24, n. 1, 30 jun. 2006.

MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727–747, 1 maio 2004.

MAZZA, G. **Anthocyanins in Fruits, Vegetables, and Grains**. London: CRC Press, 1993.

MAZZUTTI, S. **EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS COM IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA PROVENIENTES DE Plantago major E Plantago lanceolata ATRAVÉS DE TÉCNICAS AMBIENTALMENTE SEGURAS**. 2016. 168 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

MELECHI, M. I. S. **EXTRATOS DE Hibiscus tiliaceus L: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE ESTUDO COMPARATIVO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO**. 2005. 218 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

MÖCKEL, H. J.; HÖFLER, F.; MELZER, H. Correlation between reversed-phase retention and solute molecular surface type and area. **Journal of Chromatography A**, v. 388, p. 285–293, jan. 1987.

MOJICA, L.; BERHOW, M.; GONZALEZ DE MEJIA, E. Black bean anthocyanin-rich extracts as food colorants: Physicochemical stability and antidiabetes potential. **Food Chemistry**, v. 229, p. 628–639, ago. 2017.

MUSTAFA, A.; TURNER, C. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 703, n. 1, p. 8–18, 2011.

NASSAR, R. M. A.; AHMED, Y. M.; BOGHDADY, M. S. Botanical studies on *Phaseolus vulgaris* L. I-morphology of vegetative and reproductive growth. **International Journal of Botany**, v. 6, n. 3, p. 323–333, 2010.

PATRAS, A. et al. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. **Trends in Food Science and Technology**, v. 21, n. 1, p. 3–11, 2010.

PEREIRA, C. G.; MEIRELES, M. A. A. Supercritical Fluid Extraction of Bioactive Compounds: Fundamentals, Applications and Economic Perspectives. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, n. 3, p. 340–372, 3 jun. 2010.

POSSE, S. C. P. et al. Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na Região Central-Brasileira: 2009-2011. p. 180, 2010.

RICHTER, B. E. et al. Accelerated Solvent Extraction: A Technique for Sample Preparation. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 6, p. 1033–1039, jan. 1996.

ROSTAGNO, M. A. et al. Sample preparation for the analysis of isoflavones from soybeans and soy foods. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 1, p. 2–29, jan. 2009.

RUDKE, A. R. et al. Optimization of green PLE method applied for the recovery of antioxidant compounds from buriti (*Mauritia flexuosa* L.) shell. **Food Chemistry**, 2019.

SANTIAGO-RAMOS, D. et al. Physicochemical properties of nixtamalized black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) flours. **Food Chemistry**, v. 240, n. July 2017, p. 456–462, 2018.

SANTOS, D. T.; VEGGI, P. C.; MEIRELES, M. A. A. Optimization and economic evaluation of pressurized liquid extraction of phenolic compounds from jaboticaba skins. **Journal of Food Engineering**, 2012.

SANTOS, P. H. et al. Extraction of bioactive compounds from feijoa (*Acca sellowiana* (O. Berg) Burret) peel by low and high-pressure techniques. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 145, n. October 2018, p. 219–227, 2019.

SGARBIERI, V. C.; WHITAKER, J. R. Physical, chemical, and nutritional properties of common bean (*phaseolus*) proteins. **Advances in Food Research**, v. 28, n. C, p. 93–166, 1982.

SIKORA, E. et al. The antioxidant activity of selected cruciferous vegetables subjected to aquathermal processing. **Food Chemistry**, v. 107, n. 1, p. 55–59, mar. 2008.

SILVA, H. T. DA; COSTA, A. O. Caracterização botânica de espécies silvestres do gênero

Phaseolus L. (Leguminosae). **Embrapa: Documentos 156**, p. 40, 2003.

SILVA, M. L. et al. Compostos fenólicos , carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais Phenolic compounds , carotenoids and antioxidant activity in plant products.

Semina: Ciências Agrárias, v. 31, n. 3, p. 669–682, 2010.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144 LP – 158, 1 jan. 1965.

SUÁREZ-MARTÍNEZ, S. E. et al. Bean seeds: Leading nutraceutical source for human health. **CYTA - Journal of Food**, v. 14, n. 1, p. 131–137, 2016.

TAKEOKA, G. R. et al. Characterization of Black Bean (Phaseolus vulgaris L.) Anthocyanins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 9, p. 3395–3400, set. 1997.

VINATORU, M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 8, n. 3, p. 303–313, jul. 2001.