

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

INFLUÊNCIA DO ANEL B NA ESTABILIDADE
DAS ANTOCIANIDINAS E ANTOCIANINAS

MARIA DO CARMO GUEDES
Química

Orientador: Prof. Dr. PAULO ANNA BOBBIO

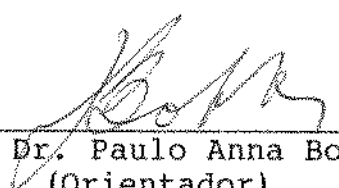
Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas para obtenção do grau de
Doutor em Ciência de Alimentos.

Parar

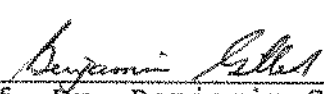
te exemplar como - Campinas - 1993
e a redação final da tese defendida
por Maria do Carmo Guedes Navita e aprovada
pela Comissão Julgadora em 11.01.94.

Bobbio

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Paulo Anna Bobbio
(Orientador)



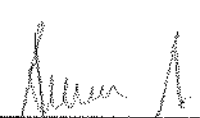
Prof. Dr. Benjamin Gilbert
(Membro)

Suplente

Profa. Dra. Eva Gonçalves Magalhães
(Membro)



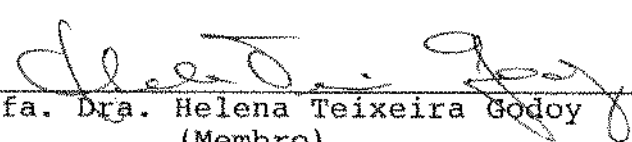
Prof. Dra. Florinda Orsatti Bobbio
(Membro)



Prof. Dr. Paulo Stringheta
(Membro)

Suplente

Profa. Dra. Adilma Regina Pippa Scamparini
(Membro)



Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy
(Membro)

Campinas, 01/01/94

Ao Prof. Bobbio, pelo exemplo de pro-
fissional, dedico

AGRADECIMENTOS

Expresso meu sincero reconhecimento e gratidão ao meu orientador, Prof. Paulo Anna Bobbio, não só pela oportunidade que me deu de continuar meu crescimento acadêmico, como por sua segura orientação.

A todos os membros da banca examinadora pelas correções e sugestões apresentadas à redação final da tese.

Aos amigos do Laboratório de Química e da Secretaria do Departamento de Ciência da FEA pelo carinho e auxílio, em especial aos professores e funcionários.

A ABIA (Associação Brasileira das Indústrias de Alimentos) pela doação das cópias.

A Norma de Vasconcellos, exemplo de competência no que faz, meu agradecimento pelo trabalho de digitação da tese.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo auxílio financeiro através do processo 91/2498-5.

ÍNDICE

ÍNDICE DE QUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE ESQUEMAS	xii
RESUMO	xv
SUMMARY	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Estrutura Química das Antocianidinas e Antocianinas ..	3
2.2 Extração	6
2.3 Purificação de Antocianinas	7
2.4 Concentração de Antocianinas por Ultrafiltração e Osmose Reversa	9
2.5 Métodos Analíticos Cromatográficos	10
2.5.1 Antocianinas	10
2.5.2 Antocianidinas	12
2.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	13
2.6.1 Antocianinas	13
2.6.2 Antocianidinas	15
2.7 Métodos Espectrofotométricos	16
2.8 Estabilidade da Cor - Fatores Envolvidos na Estabili- dade	17
2.8.1 Estrutura Química	17
2.8.2 Autoassociação	20
2.8.3 pH	21
2.8.4 Oxigênio	24
2.8.5 Luz	25
2.8.6 Copigmentação	27
2.8.6.1 Estrutura química do complexo anto- cianina-copigmento	27
2.8.6.2 pH do meio	28
2.8.6.3 Efeito da concentração do pigmento e do copigmento	29

2.8.6.4	Efeito da estrutura química da antocianina	32
2.8.6.5	Efeito do tipo do copigmento	33
3.	MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1	Preparação dos Extratos de Antocianinas	39
3.1.1	Berinjela (<i>Solanum melongena</i>)	39
3.1.2	Amora (<i>Morus nigra</i>)	40
3.1.3	Morango (<i>Fragaria ananassa</i>)	40
3.2	Purificação do Extrato	40
3.2.1	Extrato de Berinjela	40
3.2.2	Morango	41
3.2.3	Amora	41
3.3	Hidrólise Ácida das Frações Purificadas	42
3.3.1	Identificação dos Açúcares	42
3.3.2	Identificação da Antocianidina	42
3.4	Hidrólise Controlada	43
3.5	Hidrólise Alcalina das Frações Purificadas	43
3.5.1	Identificação da ácidos	43
3.6	Reações Específicas de Antocianinas	44
3.7	Preparação das Antocianidinas	44
3.8	Reação de Copigmentação	44
3.8.1	Formação do complexo	44
3.8.2	Cromatografia em Camada Delgada dos Complexos das Antocianidina	45
3.9	Estudo da Estabilização das Antocianidinas e Antocianinas	45
3.9.1	Experimento de Estabilidade	45
3.9.2	Cálculo da Constante de Velocidade de Reação (k) e Tempo de Meia-vida ($t_{1/2}$)	47
3.10	CLAE das Antocianidinas e Antocianinas e respectivos complexos	47

3.10.1	Preparação das amostras e reagente	47
3.10.2	Análise por CLAE	48
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1	Extração	50
4.2	Purificação do extrato concentrado	51
4.2.1	Berinjela	51
4.2.1.1	Identificação da estrutura da fração F-BER	55
4.2.2	Amora	57
4.2.2.1	Identificação da estrutura da fração F-AMORA	60
4.2.3	Morango	62
4.2.3.1	Identificação da estrutura da fração F-MOR	65
4.3	Experimentos de estabilidade	67
5.	CONCLUSÕES	91
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113

ÍNDICE DE QUADROS

1.	Agliconas encontradas atualmente em Antocianinas	5
2.	Valores de absorbância no tempo inicial e após 144 hs de soluções de antocianinas, submetidas à ação da luz e ao escuro	26
3.	Efeito do pH, concentração de antocianina e ácido clorogênico e tipo de antocianina no λ_{max} e absorbância no λ_{max} visível e a 525 nm das soluções antocianinas-ácido clorogênico	31
4.	Formação de complexo de compostos flavonóides e derivados do floroglucinol (4×10^{-3} M) com malvidina 3,5-diglicosídeo (1×10^{-3} M)	36
5.	Efeitos batocrômicos e hiperocrômicos na copigmentação da cianina (11×10^{-3} M) com as chalconas 1a-1k (em ordem crescente da capacidade de complexação) em comparação com a rutina	38
6.	Condições de reação para as antocianinas e antocianidinas e seus complexos	46
7.	Características Espectrais e Cromatográficas do Extrato Bruto, Antocianina e Aglicona da Fração F-BER	54
8.	Tempos de retenção obtidos da CLAE do extrato bruto da berinjela e zonas principais obtidas em cada solvente	55
9.	Valores de Rf em AWH dos produtos obtidos da hidrólise ácida controlada da fração F-BER	57
10.	Tempos de retenção obtidos da CLAE do extrato bruto e e das zonas separadas 1, 1.1 e fração F-AMORA	60
11.	Características Espectrais e Cromatográficas do Extrato Bruto, Antocianina e Aglicona da Fração F-AMORA	61
12.	Valores de Rf em AWH dos produtos obtidos da hidrólise ácida controlada da fração F-AMORA	62

13.	Características Espectrais e Cromatográficas do Extrato Bruto, Antocianina e Aglicona da Fração F-MOR	65
14.	Tempos de retenção do extrato bruto e das zonas separadas 1, 1.1 e fração F-MOR, obtidos por CLAE	66
15.	Valores de Rf em AWH dos produtos obtidos da hidrólise ácida controlada da fração F-MOR	67
16.	Valores de Rf das antocianidinas e seus complexos após reação com ácido tânico	71
17.	Deslocamentos batocrômicos ($\Delta\lambda_{max}$) apresentados após reação de copigmentação com ácido tânico	72
18.	Porcentagem de Perda de Absorção no λ_{max} para a delphinidina 3-rutinosídeo, cianidina 3-glicosídeo, pelargonidina 3-glicosídeo (antocianinas) e suas respectivas agliconas (antocianidinas), na luz e na ausência de luz, com e sem adição de ácido tânico	75
19.	Valores das Constantes de Velocidade de reação (k) e de tempo de meia-vida ($t_{1/2}$), para as antocianinas, suas respectivas agliconas, com e sem presença de luz, com e sem ácido tânico, nas razões molares de 1:2 e 1:3 (antocianina/copigmento), com ácido gálico na razão molar 1:2	76
20.	Relações $k_{luz}/k_{ausência\ de\ luz}$, a pH 2,0 e a pH 1,5, para a pelargonidina 3-glicosídeo, cianidina 3-glicosídeo, delphinidina 3-rutinosídeo, suas agliconas e seus respectivos complexos	78
21.	Relações $t_{1/2}$ (pH 1,5)/ $t_{1/2}$ (pH 2,0), na presença e na ausência de luz, com e sem ácido tânico para a pelargonidina 3-glicosídeo, cianidina 3-glicosídeo, delphinidina 3-rutinosídeo, suas agliconas e seus respectivos complexos	79
22.	Porcentagem de aumento do tempo de meia-vida $t_{1/2}$ após complexação com ácido tânico	81

23. Ordem decrescente e valores das constantes de velocidade de reação (k) para as antocianinas e antocianidinas, com e sem adição de ácido tânico	90
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

1.	Estrutura básica das antocianidinas e antocianinas	3
2.	Estrutura básica das antocianidinas	4
3.	Estruturas de ressonância para o cátion 5,7,4'-trihidroxi- flavilium	18
4.	Possível estrutura para a auto-associação das cianinas	20
5.	As quatro estruturas das antocianinas existentes em equilíbrio em soluções aquosas	22
6.	Distribuição do equilíbrio estabelecido entre AH^+ , B, A e C com o pH, a 25°C, para a cianidina 3-glicosí- deo	24
7.	Modelo de copigmentação do tipo empilhamento horizon- tal	28
8.	Modelo de copigmentação do tipo empilhamento hidrofó- bico	28
9.	Estruturas de flavonas, flavonóis, chalconas, deriva- dos de floroglucinol e seus glicosídeos	34
10.	Estruturas das chalconas estudadas	38
11.	Cromatograma do extrato bruto da berinjela, desenvol- vido em HCl 1%	52
12.	Cromatograma da zona 1 da berinjela desenvolvido em BAW	52
13.	Cromatograma da zona 1.3 da berinjela desenvolvido em HAc 10%	52
14.	Espectro de absorção UV-visível do extrato bruto da berinjela, em MeOH-HCl 0,01%	94
15.	Espectro de absorção UV-visível da zona F-BER da be- rinjela, em MeOH-HCl 0,01%	94
16.	Cromatogramas obtidos por CLAE do extrato bruto (a) e da zona 1 (b) da berinjela	95

17.	Cromatogramas obtidos por CLAE da zona 1.3 (a) e da zona 1.3.2 (F-BER) da berinjela	96
18.	Cromatograma do extrato bruto da amora, desenvolvido em HCl 1%	59
19.	Cromatograma da zona 1 da amora desenvolvido em BAW ...	59
20.	Cromatograma da zona 1.1 da amora desenvolvido em AWH	59
21.	Espectro de absorção UV-visível do extrato bruto da amora, em MeOH-HCl 0,01%	97
22.	Espectro de absorção UV-visível da zona 1.1.1 (F-AMORA) em MeOH-HCl 0,01%	97
23.	Cromatogramas obtidos por CLAE da zona 1 (a), 1.1 (b) e 1.1.1 (F-AMORA) da amora	98
24.	Cromatograma do extrato bruto do morango desenvolvido em HCl 1%	64
25.	Cromatograma da zona 1 da morango desenvolvido em BAW .	64
26.	Cromatograma da zona 1.1 da morango desenvolvido em HAc 10%	64
27.	Espectros de absorção UV-visível do extrato bruto do morango (a) e da zona 1 (b), em MeOH-HCl 0,01%	99
28.	Espectros de absorção UV-visível da zona 1.1 (a) e da zona 1.1.1 (F-MOR) (b)	100
29.	Cromatogramas obtidos por CLAE do extrato bruto (a) e da zona 1 (b) do morango	101
30.	Cromatogramas obtidos por CLAE da zona 1.1 (a) e zona 1.1.1 (F-MOR) (b) do morango	102
31.	Espectro de absorção UV-visível da solução de pelargonidina, a pH 2,0, em ausência de luz e sem adição de ácido tânico	103
32.	Espectro de absorção UV-visível da solução de pelargonidina, a pH 1,5, em ausência de luz e sem adição de ácido tânico	103

33.	Espectro de absorção UV-visível da solução de pelar- gonidina, a pH 2,0, em ausência de luz e com adição de ácido tânico	104
34.	Espectro de absorção UV-visível da solução de pelar- gonidina, a pH 1,5, em ausência de luz e com adição de ácido tânico	104
35.	Espectro de absorção UV-visível da solução de pelar- gonidina, a pH 1,5, sob ação da luz e com adição de ácido tânico	105
36.	Espectro de absorção UV-visível da solução de pelar- gonidina, a pH 2,0, sob ação da luz e sem adição de ácido tânico	105
37.	Espectro de absorção UV-visível da solução de ciani- dina, a pH 2,0, sob ação da luz e sem adição de áci- do tânico	106
38.	Espectro de absorção UV-visível da solução de ciani- dina, a pH 2,0, em ausência de luz e sem adição de ácido tânico	106
39.	Espectro de absorção UV-visível da solução de ciani- dina, a pH 1,5, sob ação da luz e sem adição de áci- do tânico	107
40.	Espectro de absorção UV-visível da solução de ciani- dina, a pH 1,5, em ausência de luz e sem adição de ácido tânico	107
41.	Espectro de absorção UV-visível da solução de delfi- nidina, a pH 2,0, sob ação da luz e sem adição de ácido tânico	108
42.	Espectro de absorção UV-visível da solução de delfi- nidina, a pH 1,5, sob ação da luz e sem adição de ácido tânico	108
43.	Espectro de absorção UV-visível da solução de pelar- gonidina 3-glicosídeo, a pH 2,0, sob ação da luz e sem adição de ácido tânico	109

44.	Espectro de absorção UV-visível da solução de pelargonidina 3-glicosídeo, a pH 1,5, sob ação da luz e sem adição de ácido tânico	109
45.	Espectro de absorção UV-visível da solução de cianidina 3-glicosídeo, a pH 2,0, sob ação da luz e sem adição de ácido tânico	110
46.	Espectro de absorção UV-visível da solução de cianidina 3-glicosídeo, a pH 1,5, sob ação da luz e sem adição de ácido tânico	110
47.	Curva de absorbância versus tempo (horas) da pelargonidina, a pH 2,0, sob ação da luz e sem adição de ácido tânico	111
48.	Curva de absorbância versus tempo (horas) da pelargonidina, a pH 2,0, em ausência de luz e sem adição de ácido tânico	111
49.	Cromatogramas obtidos por CLAE da pelargonidina (a) e pelargonidina, a pH 1,5 e com adição de ácido tânico (b)	112
50.	Modelo de estrutura "sanduiche" para a formação de um complexo 1:1 entre a antocianina e o éster β -1,2,3,4,6-pentagalato de D-glicose	83
51.	Estruturas dos ácidos gálico (a) e tânico (b)	84
52.	Modelo molecular proposto para a complexação entre antocianidinas, antocianinas e ácido tânico	86
53.	Equilíbrio isomérico anel-cadeia das formas pseudobase (B) e chalcona (C) das antocianidinas	88
54.	Equilíbrio das formas pseudobase (B) e chalcona (C) das antocianinas	89

ÍNDICE DE ESQUEMAS

1.	Espécies envolvidas no equilíbrio	21
2.	Operações cromatográficas para separação das antocia- ninas do extrato de berinjela	53
3.	Separação e purificação das antocianinas da amora	58
4.	Separação e purificação das antocianinas da morango ...	63

RESUMO

Os extratos metanólicos da berinjela, amora e morango foram fracionados e as principais antocianinas das frações foram identificadas e usadas para estudar sua estabilidade.

Cada antocianina foi identificada por cromatografia em papel, características espectrocópicas e reações químicas específicas. A estabilidade de cada antocianina e sua aglicona, assim como seus complexos com ácido tânico e ácido gálico, foi estimada determinando-se a perda de absorbância no λ_{max} em função do tempo sob irradiação à luz e no escuro, a diferentes pHs. A partir dos valores de absorbância foram calculadas as constantes de velocidade de reação de pseudo primeira ordem assim como o tempo de meia-vida para cada sistema.

As seguintes antocianinas foram identificadas a partir da berinjela, amora e morango: delphinidina 3-rutinosídeo, cianidina 3-glicosídeo e pelargonidina 3-glicosídeo, respectivamente.

Enquanto a complexação de cada antocianina e a aglicona com ácido tânico (1:2 mols) produziu um considerável aumento nos valores do tempo de meia-vida dos pigmentos, a complexação com ácido gálico não aumentou a resistência da delphinidina 3-rutinosídeo à luz e ao aumento de pH de 1,5 para 2,0.

Luz foi o efeito mais destrutivo para a cor dos pigmentos, especialmente a pH 2,0.

A maior estabilidade conferida pelo ácido tânico às antocianinas e suas agliconas foi atribuída à formação de um complexo, onde dois dos anéis aromáticos da molécula do ácido tânico incorporaria o anel A e o anel de pirilium, e uma segunda molécula de ácido tânico protegeria o anel B, formando um complexo molecular do tipo empilhamento hidrofóbico, estabilizado por interações π - π entre os vários anéis aromáticos e também por pontes de hidrogênio entre os grupos hidroxilas do ácido tânico e as hidroxilas do açúcar do anel B, assim como com as do açúcar ligado à aglicona.

SUMMARY

The MeOH extracts from egg plant, blackberry and strawberry were fractionated and the main anthocyanins from the fractions were identified and used to study their stability.

The structure of each anthocyanin was determined by paper chromatography, spectroscopic characteristics and specific chemical reactions. The stability of each anthocyanin and its aglycone as well as their complex with tannic and gallic acid was estimated by determining the loss of absorbance at each λ_{max} as a function of time under "daylight" lamp irradiation and in the dark at different pHs. From the absorbance values the specific pseudo first order reaction constants were calculated as well as the period of half-life for each system.

The following anthocyanins were identified from egg plant: delphinidin 3-rutinoside, from mulberry: cyanidin 3-glucoside, and from strawberry: pelargonidin 3-glucoside.

While complexation of each anthocyanin and aglycone with tannic acid (1:2 mols) produced a considerable increase in the values of $t_{1/2}$ of the pigments, gallic acid did not increase the resistance of the delphinidin 3-rutinoside to light and pH increase from 1.5 to 2.0.

Light was the most destructive effect for pigments colors especially at pH 2.0.

The greater stability conferred by tannic acid to anthocyanins and their aglycones was attributed to the formation of a complex with a structure where two aromatic rings from the tannic acid molecule would encompass ring A and the pyrilium ring protecting B and forming a hydrophobic stacked molecular complex stabilized by π - π ring interaction and H bonding between OH groups of tannic acid and the OH groups of both sugar moiety and B ring.

1. INTRODUÇÃO

O tipo de alimento que as pessoas escolhem e as quantidades que elas ingerem dependem largamente das preferências individuais, estando a aceitação do alimento condicionado à sua cor, aroma, textura e, naturalmente, a considerações econômicas.

A cor é um fator de escolha por seu intrínseco valor estético e, muitas vezes, erroneamente utilizada pelos consumidores como base para identificação e julgamento da qualidade do alimento.

Os corantes artificiais, frequentemente usados em substituição ou reforço dos corantes naturais, tem tido seu uso questionado por técnicos e pelos consumidores que desejam maior segurança no consumo de alimentos. Conseqüentemente, cresceu o interesse no uso de corantes naturais, entre os quais as antocianinas, também como resultado da retirada da maioria dos corantes vermelhos, tipo azo da lista de corantes artificiais permitidos. As antocianinas tem diversas vantagens que justificam seu estudo para substituir os corantes artificiais:

1. Tem sido consumidas por homens e animais por incontáveis gerações sem apresentar efeitos nocivos à saúde.
2. São intensamente coloridas.
3. São aquossolúveis, o que simplifica sua incorporação aos sistemas aquosos dos alimentos.

Entretanto, as antocianinas apresentam algumas desvantagens, como a dificuldade de encontrar fontes economicamente viáveis e sua instabilidade. Conseqüentemente, a procura de fontes e o estudo da estabilização das antocianinas constituem campos que devem ser pesquisados para que o emprego extensivo e intensivo de antocianinas em alimentos permita a eliminação ou diminuição do uso dos corantes artificiais, atualmente preferidos pelo preço e por suas características físico-químicas que facilitam seu uso.

Na literatura não existe nenhuma informação sobre o comportamento das antocianidinas, possivelmente por se considerar que os dados seriam os mesmos ou próximos das antocianinas para as respectivas antocianidinas, sem levar em conta porém a extrema instabilidade das antocianidinas, onde a falta de uma ligação hemiacetalica no C-3 facilita a formação de estruturas químicas. O presente trabalho tem por objetivo estabelecer dados sobre a estabilidade das antocianidinas comparativamente à das antocianinas, além de avaliar o efeito dos substituintes no anel B e seu efeito sobre a copigmentação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Estrutura Química das Antocianidinas e Antocianinas

Todas as antocianidinas e antocianinas tem a estrutura básica do íon 4'-hidroxiflavílium (Figura 1). As antocianinas são os glicosídeos poliidroxi ou polimetoxi derivados do íon flavílium e as antocianidinas são as agliconas correspondentes.

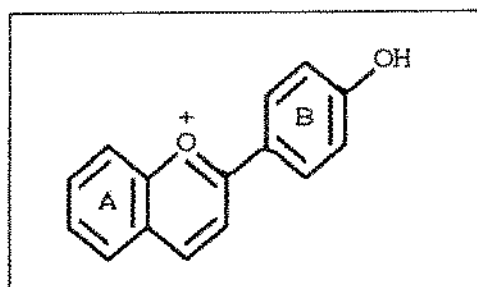


Figura 1: 4-hidroxiflavílium, núcleo básico das antocianidinas e antocianinas (Harborne, 1967)

As antocianidinas diferem entre si pelo número de grupos hidroxilas presentes na molécula e no grau de metilação desses grupos. Nas antocianinas a natureza e o número de açúcares, bem como de ácidos ligados na posição 3 e 6 dos açúcares, constituem as diferenças individuais.

Com poucas exceções (3-desoxiantocianidinas) a estrutura básica das antocianidinas é a do cation 3,5,7,4'-tetraidroxiflavílium (Figura 2).

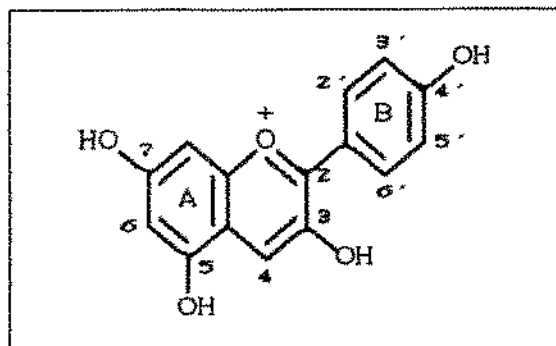


Figura 2: Estrutura básica das antociadinidas (Harborne, 1967)

Existem hoje dezessete antocianidinas (Quadro 1), com seis delas (pelargonidina, cianidina, delphinidina, petunidina, malvidina e peonidina) ocorrendo com maior frequência como agliconas de várias antocianinas entre as quais estão algumas das mais importantes usadas como corante para alimentos (Francis, 1989).

A glicosidação das antocianidinas pode ocorrer nas posições 3, 5, 7, 3', 4' e 5'. Se um só açúcar estiver presente ele estará sempre na posição 3. Se uma segunda posição estiver glicosidada, ela é frequentemente localizada na posição 5, e raramente na posição 7 (Harborne, 1958a).

Quadro 1: Agliconas encontradas atualmente em Antocianinas

Nome	Modelo de Substituição							Cor
	3	5	6	7	3'	4'	5	
Apigenina	H	OH	H	OH	H	OH	H	laranja
Luteolidina	H	OH	H	OH	OH	OH	H	laranja
Triacetidina	H	OH	H	OH	OH	OH	OH	vermelha
Pelargonidina	OH	OH	H	OH	H	OH	H	laranja
Anrantidina	OH	OH	OH	OH	H	OH	H	laranja
Cianidina	OH	OH	H	OH	OH	OH	H	laranja-averm.
5-metilcianidina	OH	OMe	H	OH	OH	OH	H	laranja-averm.
Peonidina	OH	OH	H	OH	OMe	OH	H	vermelha
6-hidroxicianidina	OH	OH	OH	OH	OH	OH	H	vermelha
Delfinidina	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH	vermelha azulada
Petunidina	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OH	vermelha azulada
Malvidina	OH	OH	H	OH	OMe	OMe	OH	vermelha azulada
Pulchelidina	OH	OMe	H	OH	OH	OH	OH	vermelha azulada
Enopidina	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OH	vermelha azulada
Capensinidina	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OMe	vermelha azulada
Hirsutidina	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	OMe	vermelha azulada

(Francis, 1989)

Os açúcares encontrados com maior frequência na natureza ligados às agliconas são: glicose, ramnose, xilose, galactose, arabinose e frutose, que podem estar presentes na forma de monoglicosídeos, diglicosídeos e triglicosídeos. Os diglicosídeos podem ser formados pelos mesmos açúcares como sofrorose (ligação β 1 $\rightarrow$ 2 glicose-glicose) e gentiobiose (ligação β 1 $\rightarrow$ 6 glicose-glicose) ou combinações de diferentes açúcares, como glicose e ramnose na rutinose. As antocianidinas sendo instáveis e muito menos solúveis que as antocianinas, não se acumulam na planta (Harborne 1967) e os pigmentos que ocorrem nas flores, frutas e flôres estão na forma glicosídica, com os açúcares conferindo solubilidade e estabilidade às antocianidinas (Timberlake et al, 1966).

Os ácidos mais comumente encontrados nas antocianinas são, por ordem de ocorrência, cumárico, caféico, ferúlico, p-hidroxibenzóico, siná-pico, malônico, acético, succínico, oxálico e málico

2.2 Extração

Muitos dos processos de extração para antocianinas foram desenvolvidos para a extração dos pigmentos de cascas de uvas como subproduto da fabricação de vinhos.

Diversos processos foram descritos, em sua maioria patenteados, empregando soluções aquosas de SO_2 como extratante das cascas, com variações modernizadas da mesma técnica, utilizando enzimas, ácido sulfúrico, resinas, extração dos tartaratos precipitados por refrigeração, entre outros, preconizados por diversos autores, inter alia; Shrikhande (1984), Andreev e Shprizman, Yokoyama e Ono, Tsaskov e Kontarev (citados por Francis, 1989).

Outros autores utilizaram outros solventes para extrair antocianinas de cascas de uvas: Clydesdale et al (1978) e Calvi e Francis (1984) usaram ácido cítrico 0,01% em metanol para obter um corante em pó para estudos de estabilidade destes pigmentos em bebidas e misturas para sobremesas.

A eficiência de vários ácidos na extração de antocianinas com grupos ácidos, alifáticos ou aromáticos, foi estudada por Chiriboga e

Francis (1970). De acordo com os autores, metanol sem ácido extraiu somente 5% das antocianinas em 30 minutos, mas com a adição de 0,03% de ácido clorídrico, a extração elevou-se a 19% em 30 minutos. Chiriboga e Francis também concluíram que concentrações acima de 6% de ácido acético em metanol resultaram em extrações pobres. Entretanto, Metivier e Francis (citado por Francis, 1989) verificaram que quando o solvente utilizado foi água, ácido acético foi o mais efetivo na extração de antocianinas aciladas. Os referidos autores consideraram como solvente mais eficiente soluções de metanol contendo HCl 0,01%. Metanol foi 20% mais efetivo que etanol e 73% mais efetivo que água. Ácido cítrico em metanol foi o ácido orgânico mais efetivo na extração das antocianinas, seguido dos ácidos tartárico, fórmico, acético e propiônico.

2.3 Purificação de Antocianinas

Wrolstad e Putnam (1969) usando resinas de troca iônica para purificar antocianinas encontraram dificuldade na eluição dos pigmentos da resina usando soluções 0,1 até 1,0% de HCl em metanol. De acordo com os autores, o aumento da concentração para 5% apresentou uma melhora na recuperação dos pigmentos, porém, acompanhada de hidrólise dos mesmos. Melhor eficiência na purificação encontrada pelos autores, foi em coluna cromatográfica de PVP (polivinilpirrolidona), em pó ou em suspensão aquosa ou misturado ao extrato. De acordo com os referidos autores, o mecanismo de adsorção seria dependente da formação de

fortes pontes de hidrogênio entre o oxigênio da ligação peptídica do PVP e os prótons dos grupos hidroxilas fenólicos da antocianina.

Várias resinas foram testadas na purificação de antocianinas. Entre elas, Amberlite CG-50 e IRC-50, se mostraram as mais eficientes de acordo com Chiriboga e Francis (1970), que consideraram a IRC-50 levemente inferior a CG-50 por causa da incompleta eluição do pigmento.

Hrazdina (1970) empregou PVP como adsorvente para coluna cromatográfica para separar 3,5-diglicosídeos de malvidina, peonidina, petunidina, cianidina e delfinidina, enquanto Van Teeling et al (1971) separaram antocianinas de impurezas como açúcares, ácidos cinâmicos, antocianidinas e flavonóides.

Pifferi e Vaccari (1981) estudaram alguns parâmetros (pH, tipo de solvente, tempo de adsorção, etc) com o objetivo de alcançar a mais eficiente separação de antocianinas poliidroxiladas, independente do tipo de glicosidação, usando colunas de alumina.

Usando colunas de PVP comercial purificado, Stringheta et al (1992) conseguiram a eliminação de flavonóides não antociânicos em extratos de *Panicum melinus*, em processo que visava a purificação primária do extrato. Entretanto os referidos autores verificaram que algumas das zonas contendo antocianinas não puderam ser eluídas da coluna de PVP.

2.4 Concentrações de Antocianinas por Ultrafiltração e Osmose Reversa

Combe e Ladet, citados por Francis (1989), patentearam um processo em que o extrato aquoso, obtido da extração em presença de SO_2 , era ultrafiltrado usando uma membrana de separação de aproximadamente 20.000 CPMD e pressão de 10 Kg/m^2 .

Macromoléculas, tais como produtos poliméricos resultantes da degradação das antocianinas, pectinas e taninos, foram removidas por ultrafiltração de um resíduo gerado no processamento do suco de "cranberry", empregando membranas com "cut off" de 20.000 e 50.000. De acordo com Woo et al (1980), o extrato obtido contendo 0,25% de sólidos, constituído principalmente (97%) de ácidos e açúcares, foi purificado e concentrado por osmose reversa.

Philip (1984) purificou e concentrou extratos aquosos de cascas de uvas por ultrafiltração, empregando membrana de acetato de celulose com "cut off" 1000, que retém pectinas e permitiu a passagem de ácidos orgânicos como ácido tartárico e sais.

Os referidos autores não conseguiram a separação dos taninos, já que eles têm peso molecular na mesma faixa das antocianinas e nem dos antranilatos (antranilato de metila) que apesar do baixo PM (151), ficaram retidos por causa de sua baixa solubilidade em água.

A alta porcentagem de ácido cítrico (10%) empregado para extração de antocianinas aciladas limitou a concentração do extrato por evaporação e também resultou numa baixa velocidade de permeação na concentração em osmose reversa usando membranas com "cut off" 500, possivelmente devido à alta pressão osmótica do ácido cítrico na solução aquosa. A solução encontrada por Chung et al (1986) foi utilizar membranas com maior grau de porosidade, de "cut off" 6.000. Os referidos autores observaram uma significativa diferença na retenção entre as antocianinas e outros solutos. As antocianinas ficaram retidas na membrana possivelmente, segundo os autores, devido à formação de complexos copigmentados, de alto PM, com flavonas e glicosídeos de flavonas presentes no extrato, enquanto ácido cítrico podia passar através da membrana.

2.5 Métodos Analíticos Cromatográficos

2.5.1 Antocianinas

As relações entre estrutura e mobilidade cromatográfica, em cromatografia em papel, de várias antocianinas, indicavam que quanto maior o número de grupos hidroxilas presentes na molécula da antocianina, menor o valor do R_f , tanto em solventes alcoólicos como aquosos, enquanto o efeito inverso era produzido pela metilação, em ambos os solventes. (Harborne, 1967)

A identificação das antocianinas de quatro novas espécies *Rubus* foi obtida por Barrit e Torre (1973), ao empregarem cromatografia em ca-

camada delgada em placas de celulose desenvolvidas em BAW (butanol-ácido-água, 6:1:2, v/v/v) e WHF (água-ácido clorídrico concentrado-ácido 8:4:1, v/v/v).

Wrolstad e Heatherbell (1974) isolaram seis antocianinas da *Cyphomandra betacea* empregando cromatografia descendente em papel com os solventes PAW (n-pentanol-ácido acético-água 2:1:1, v/v/v) e AWH (ácido acético-água-ácido clorídrico, 15:82:3, v/v/v).

A possibilidade de distinguir antocianinas glicosiladas na posição 3' (anel B), de rara ocorrência, de outros glicosídeos em outras posições pelo uso de solventes "butanólicos" foi discutida por Yoshitame e Abe (1976), usando cromatografia em papel e em camada delgada. Os referidos autores observaram que enquanto 3,3'-diglicosídeos de cianidina tinham Rf similares aos correspondentes 3,7-diglicosídeos em solventes aquosos, diferentes Rf foram obtidos, usando solventes como BAW (n-butanol-ácido acético-água, 4:1:5, v/v/v) e BuN (n-butanol-ácido clorídrico 2N, 1:1, v/v).

Na purificação dos pigmentos antociânicos presentes nas sementes e na pele de frutos da *Cyphomandra betacea*, crescida no Brasil, Bobbio et al (1983) utilizaram cromatografia em camada delgada em placas de celulose com os seguintes solventes: BAW, HCl 1%, Forestal (ácido acético-ácido clorídrico concentrado-água, 30:3:10, v/v/v) e AWH. As agliconas foram identificadas pelos referidos autores empregando, além dos dados espectrais, cromatografia em papel com Forestal e BAW

como solventes. Placas de celulose, com BAW e HCl 1%, foram também empregadas por Bobbio et al (1987) para separar as antocianinas da *Solanum americanum*.

2.5.2 Antocianidinas

As dificuldades encontradas em separar antocianidinas e em evitar sua gradual diminuição da cor, quando do uso dos solventes mais comumente usados em cromatografia em papel ou quando do emprego de placas de celulose MN300, levaram Mullick (1969) a desenvolver um método de separação empregando celulose Avicel SF e várias combinações de solventes para cromatografia bidimensional. O referido autor estabeleceu uma relação entre os valores de Rf nos diferentes solventes e o número de substituintes no anel B de antocianidinas, baseando-se em que o solvente MHW (metanol ácido clorídrico concentrado-água, 190:1:10, v/v/v) resolveu as seis antocianidinas mais comuns diferenciadas pelo número de hidroxilas no anel B sem diferenciar se estas estavam ou não metiladas. Desta forma, delphinidina (três grupos -OH), petunidina (dois grupos -OH e um grupo -OCH₃) e malvidina (um grupo -OH e dois grupos -OCH₃) apresentaram os mesmos valores de Rf em MHW. Finalmente, de todas as combinações feitas por Mullick, a que consistiu de MHW, na 1^a direção, e AAW (1-pentanol-ácido acético-água, 2:1:1, v/v/v), na 2^a direção, proporcionou a melhor resolução das misturas de antocianidinas.

A escolha da aplicação da cromatografia bidimensional em papel para separação de antocianidinas por Sakellariades e Luh (1974) foi basea-

da no fato de que o solvente Forestal sozinho falhou em separar a cianidina (Rf 49) de petunidina (Rf 46) e, peonidina (Rf 63) de malvidina (Rf 60). De acordo com os autores, a máxima resolução foi conseguida empregando Forestal na 1^a direção e BuHCl (n-butanol-ácido clorídrico 2N, 1:1, v/v), na 2^a direção.

A separação simultânea de mono-, di- e triglicosídeos de antocianidinas usando cromatografia em placa de celulose e uma única mistura de solventes constituída por ácido clorídrico-ácido fórmico-água, na proporção 24,5: 23,7: 51,4, mostrou-se eficiente de acordo com Andersen e Francis (1985).

2.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

2.6.1 Antocianinas

Completa separação das quatro principais antocianinas do "cranberry" foi alcançada por Camire e Clydesdale (1979) após 1 h e 40 min de análise usando CLAE, fase reversa, em uma coluna de octadecilsilil (ODS), empregando como fase móvel uma mistura de metanol-ácido acético-água (37:10:53, v/v/v).

A técnica de CLAE com coluna de fase reversa (Nucleosil 5 C18) desenvolvida por Hansen e Hansen (1983), tornou possível a resolução de uma mistura de quatro antocianinas, suas chalconas e suas agliconas. De acordo com os autores, a fase móvel constituída de ácido fosfórico 0,05 M em tetraidrofurano (THF) (pH 1,8) mostrou-se superior tanto a metanol como a acetonitrila comumente usados como modificadores da

fase aquosa. Os referidos autores ressaltaram a importância de aplicar essa técnica para as chalconas e agliconas tendo em vista que ambas são intermediários da degradação de antocianinas e, portanto, de interesse no estudo da estabilidade e metabolismo das antocianinas.

Em virtude da complexidade da composição dos extratos de *Vaccinium myrtillus*, Baj et al (1983) empregaram CLAE para a caracterização das antocianinas de um extrato comercial purificado de *V. myrtillus*, presente numa preparação farmacêutica. De acordo com os autores, o método que utiliza coluna de fase reversa, gradiente de eluição com dois sistemas de solventes: A) água-ácido fórmico (90:10, v/v) e B) metanol-acetonitrila-ácido fórmico (22,5:22,5: 45:10, v/v/v), pode ser utilizado para análise de rotina de todos os tipos de extratos de *V. myrtillus*.

Os tempos de retenção obtidos por Pouget et al (1990) evidenciaram a eficácia da CLAE na identificação simultânea de uma mistura de antocianinas extraídas dos cálices da *Hibiscus sabdarifa* e suas respectivas agliconas. Empregando coluna RP-18, os referidos autores encontraram para as antocianinas, delfinidina 3-sambubiosídeo e cianidina 3-sambubiosídeo os seguintes tempos de retenção: 14'55" e 15'17", respectivamente, e 18'44" e 19'16" para suas respectivas agliconas.

Cromatografia líquida de alta eficiência tem também sido usada para comparar a composição das frações antociânicas no curso do processamento de sucos e avaliar a estabilidade dos pigmentos após a fermentação, pasteurização e concentração de sucos (Drdak e Daucik, 1990). Especificamente em vinho de framboesa, foi observado que a principal

degradação de antocianinas ocorreu durante a fermentação com perda após armazenamento de 50%, com a cianidina 3-glicosídeo sendo mais instável que a cianidina 3-soforosídeo (Rommel et al, 1990). A autenticidade dos produtos contendo antocianinas e as possíveis adulterações dos mesmos, principalmente em geléias de frutas, pode ser detectada com o uso de CLAE. (Garcia-Viguera et al, 1992).

2.6.2 Antocianidinas

Delfinidina, cianidina e pelargonidina foram separadas em coluna de μ Bondapak, C₁₈/Corasil, eluídas com MeOH-HAc-H₂O (metanol-ácido acético-água, 20:5:75, v/v/v) e detectadas a 280 nm (Adamovics e Stermitz, 1976). Uma mistura das três antocianidinas acima e mais malvidina, petunidina e peonidina foi separada empregando as mesmas condições acima mas com detecção a 530 nm (Wilkinson et al, 1977). Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa foi empregada por Castele et al (1983) para separação de antocianidina, antocianinas, proantocianidinas e substâncias relacionadas, utilizando uma combinação de eluição isocrática e gradiente linear, com detecção a 280 nm. De acordo com os referidos autores, os fatores determinantes envolvidos na separação da mistura desses pigmentos eram a polaridade total da molécula, a substituição no anel B e, para os glicosídeos, a natureza dos açúcares ligados. A importância do tipo de substituição no anel B foi evidenciada pelo fato de que delfinidina foi mais rapidamente eluída que cianidina, a qual precedeu pelargonidina e por último, os compostos metoxilados, peonidina (um -OCH₃) e malvidina (dois -OCH₃).

A análise por CLAE de adulterações em sucos, contendo outras antocianinas originalmente presentes na fruta, foi preconizada por Spanos et al. (1987) que utilizaram coluna C₁₈ e ácido acético 15% para se quantificação das antocianidinas presentes no suco de framboesa.

2.7 Métodos Espectrofotométricos

As diferenças espectrais produzidas quando a molécula da antocianina está ligada a moléculas de açúcar foi discutida por Harborne (1967). De acordo com o referido autor, a substituição na posição 5 produz um ombro na curva a 440 nm, usando como solvente MeOH-HCl 0,01%, sendo o valor da razão da absorbância a 440 nm e no máximo de absorção no visível ($A_{440}/A_{\max \text{ vis}}$) indicativo da existência de açúcares na posição 3 ou 5.

Yoshitama e Abe (1976) foram os primeiros autores a encontrar um pigmento substituído com um açúcar na posição 3' (éster cafeil da cianidina 3,7,3'-triglicosídeo das flores azuis da cineraria). Os resultados obtidos com este pigmento mostraram que antocianinas tendo um açúcar na posição 3' (ou 5') são caracterizados por apresentarem o máximo de absorção em comprimentos menores de onda, exibindo um efeito hipsocrômico de 5-9 nm, quando comparado com os 3-, 3,5- e 3,7-diglicosídeos. Além disso, os referidos autores também observaram que a razão $A_{440}/A_{\max \text{ vis}}$ em 3'-glicosídeos era muito maior que em 3-, 5- ou 7-glicosídeos.

As seguintes relações espectrofotométricas foram estabelecidas por Diaz e Olave (1979) para determinação da posição do açúcar no pigmento:

$$(1) \Delta\lambda = \lambda_{\max} \text{ da antocianina} - \lambda_{\max} \text{ da antocianidina}$$

$$(2) \Delta A/A = (A_{440}/A_{\max})_{\text{antocianina}} - (A_{440}/A_{\max})_{\text{antocianidina}}$$

De acordo com os referidos autores, a diferença algébrica obtida da 1ª equação permitiu distinguir a substituição por açúcares na posição 3-, 3,7- de 7-; e na posição 5- de 3,5-. Já a relação fornecida pela 2ª equação permitiu diferenciar a substituição por açúcares na posição 3-, 3,7- da posição 3,5; e na posição 5- da posição 7.

2.8 Estabilidade da Cor - Fatores Envolvidos na Estabilidade

2.8.1 Estrutura química

Nas antocianidinas o núcleo flavilium, por suas seis estruturas de ressonância (Figura 3), mostra alta reatividade nas posições 2 e 4. Reações de ataque nucleofílico com água ocorreram, principalmente, na posição 2, enquanto que com sulfito na posição 4 (Brouillard, 1982).

Sendo as antocianidinas muito menos estáveis que seus derivados glicosídeos (Harborne, 1967) foi verificado por Sweeny e Iacobucci (1983) que, enquanto a cianidina 3-rutinosídeo apresentava tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) de 65 horas, a temperatura ambiente e o pH 2,8, a cianidina apresentou $t_{1/2}$ de 12 horas, o que foi atribuído à lenta reação de hidrólise da ligação glicosídica.

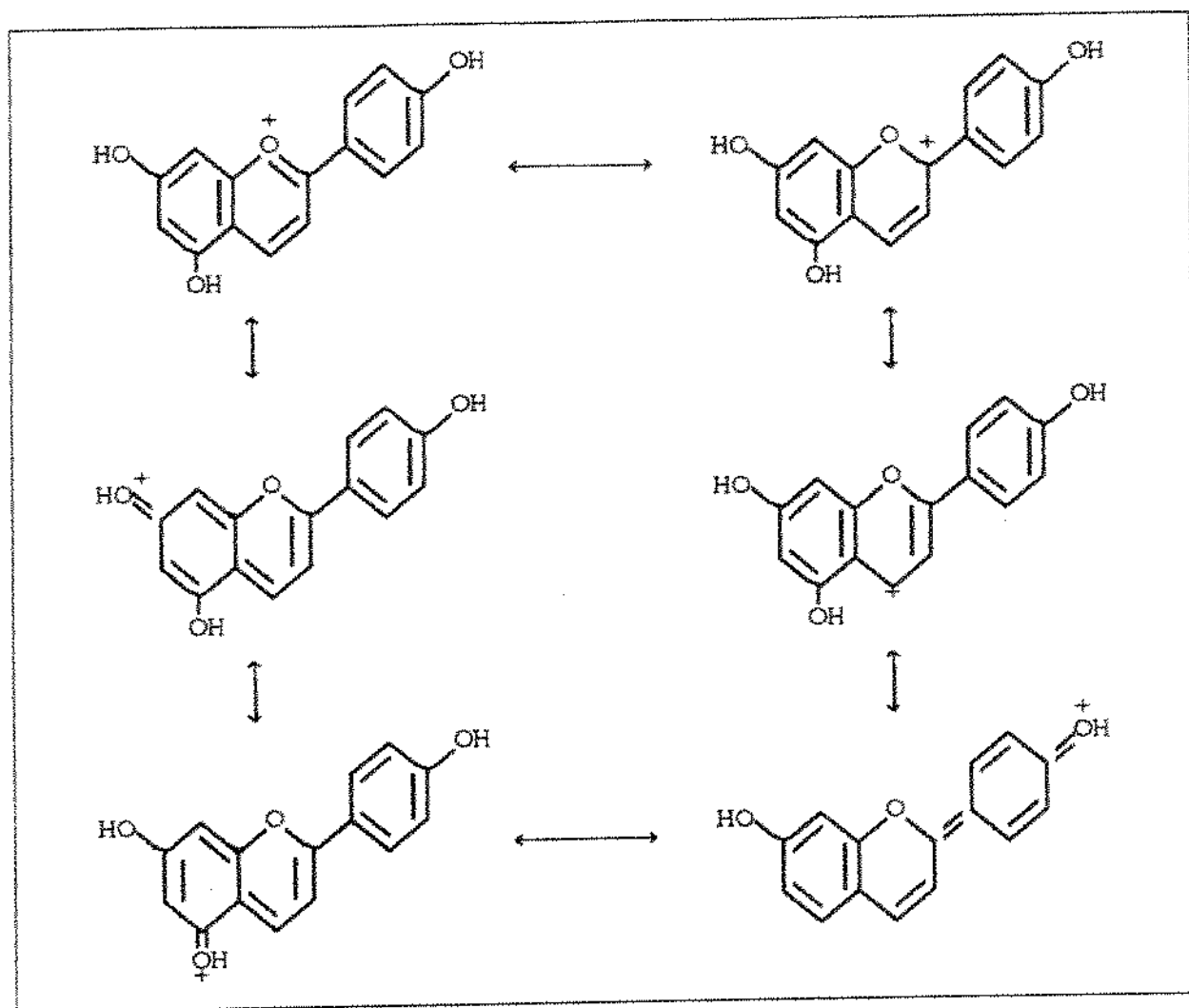


Figura 3: Estruturas de ressonância para o cátion 5,7,4'-trihidroxi-flavilium (Brouillard, 1982)

Os resultados dos estudos feitos por Ohta et al (1980) sobre os efeitos da hidroxilação ou metilação na estabilidade de quatro antocianinas e treze compostos flavilium sintéticos mostraram que a hidroxilação nas posições 5 e 7 do anel A estabilizou os pigmentos, em tampão a pH 2,5 e 4,5, mas a hidroxilação na posição 3 labilizou os pigmen-

tos. De acordo com os referidos autores a estabilidade dos pigmentos diminuiu com o aumento da hidroxilação no anel B (posições 3', 4' e 5') e aumentou com o aumento da metoxilação no anel B.

O aumento do número de grupos metoxila no anel B da antocianina acarretou um aumento do tempo de meia-vida dos glicosídeos da malvidina (dois -OCH₃, um -OH) em relação aos dos glicosídeos da delphinidina (três -OH) (Hrazdina, 1970). O número de grupos substituintes no anel B parece ser importante desde que Kallio et al (1986) verificaram uma menor estabilidade para os arabinosídeos de antocianinas com somente dois substituintes no anel B, como a cianidina (dois -OH), peonidina (um -OCH₃ e um -OH) comparativamente aos arabinosídeos de antocianinas com três grupos funcionais no anel. Entretanto, independentemente do grau crescente de metoxilação, os referidos autores encontraram para os arabinosídeos das antocianinas metoxiladas praticamente o mesmo grau de estabilidade.

A estabilização da cor das antocianinas é também influenciada pela natureza dos açúcares ligados às antocianinas, assim, os galactosídeos de cianidina e peonidina são mais estáveis que os respectivos arabinosídeos (Starr e Francis, 1986). Há também um efeito estabilizante pela presença de grupos ácidos ligados a esses glicosídeos. O tricafeil cianidina 3,7,3'-triglicosídeo e a cafeilferuloilcianidina 3,7,3'-triglicosídeo apresentaram excepcional estabilidade a mudanças de pH, provavelmente devido à existência de interações hidrofóbicas entre o anel pirilium e a porção aromática dos grupos ácidos protegendo o anel do ataque nucleofílico da água no carbono 2 (Brouillard,

1981); a proteção e a maior estabilidade das antocianinas contendo mais do que um grupo ácido, sugeriram a necessidade de existir no mínimo dois ácidos ligados à antocianina para a retenção de cor em meio aquoso. Brouillard (1982) propôs um mecanismo de proteção onde um dos grupos ácidos se situaria acima do anel e outro por debaixo dele. Maior estabilidade foi observada para a dicafeilpeonidina 3-soforosídeo-5-glicosídeo, o pigmento da batata roxa, em comparação com a antocianina não acilada, em condições simulando armazenamento, a pH 2,8, em tampão citrato fosfato e à temperatura ambiente (Bassa e Francis, 1987).

2.8.2 Auto-associação

A autoassociação de moléculas de antocianinas não aciladas, possivelmente se dá através de pontes de hidrogênio com os grupos hidroxilas vicinais do anel B formando uma estrutura como na Figura 4 (Williams e Hrazdina, 1979), havendo de acordo com Brouillard (1982), a neces-

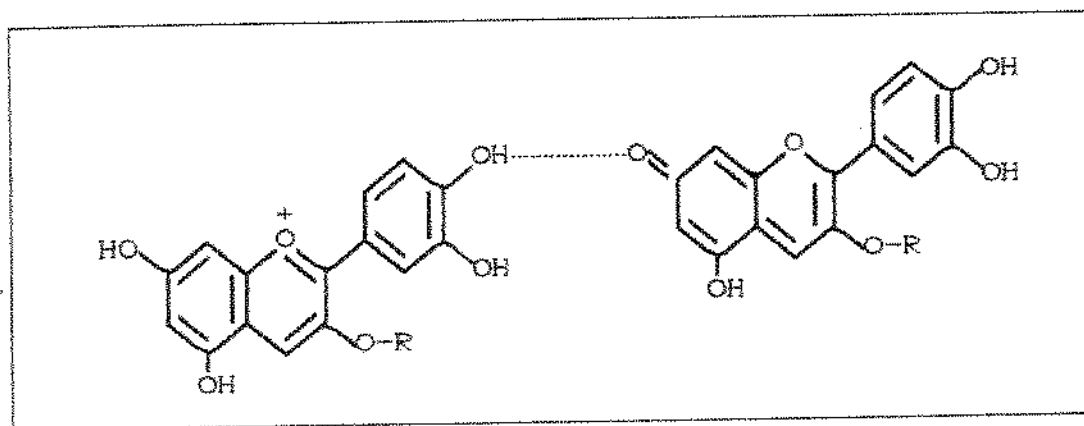
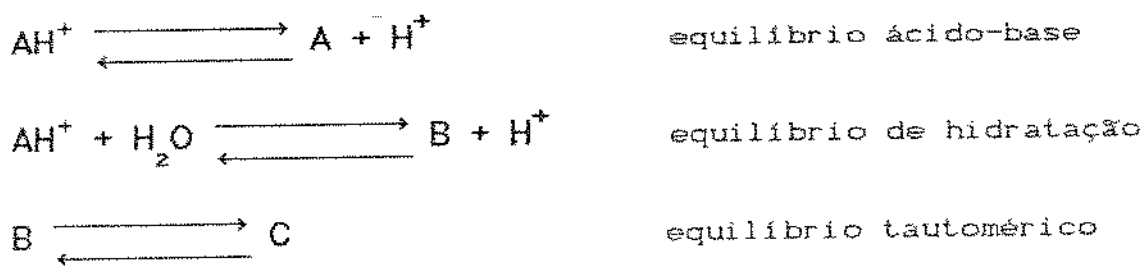


Figura 4: Possível estrutura para a auto-associação das cianinas (Williams e Hrazdina, 1979)

sidade de existência de grupos -OH na posição 4' (anel B) e de açúca-
 res na posição 5, além desses elementos estruturais essenciais para
 sua ocorrência, a auto-associação de antocianinas aumenta com o au-
 mento da concentração de pigmentos, aparentemente envolvendo a esta-
 bilização do sal de flavilium, e, na presença de copigmentos, como
 rutina, a forma auto-associada das antocianinas não forma complexos,
 diminuindo o efeito estabilizante do copigmento (Scheffeldt e
 Hrazdina, 1978). Estudando a estabilidade relativa de cianidina 3-
 glicosídeo e da cianidina 3-cafeil arabinosídeo, a pH 2,0 sob ação da
 luz, Bobbio et al (1991) verificaram que a antocianina não acilada
 era mais estável, possivelmente pela possibilidade de auto-associação
 das moléculas da cianidina não acilada pelo anel B.

2.8.3 pH

Em soluções aquosas ácidas quatro espécies existem em equilíbrio: o
 cation flavilium (AH⁺), a base quinoidal (A), a pseudobase ou carbi-
 nol (B) e a chalcona (C), de acordo com o esquema 1 e Figura 5, pro-
 postas por Brouillard (1982).



Esquema 1: Espécies envolvidas no equilíbrio

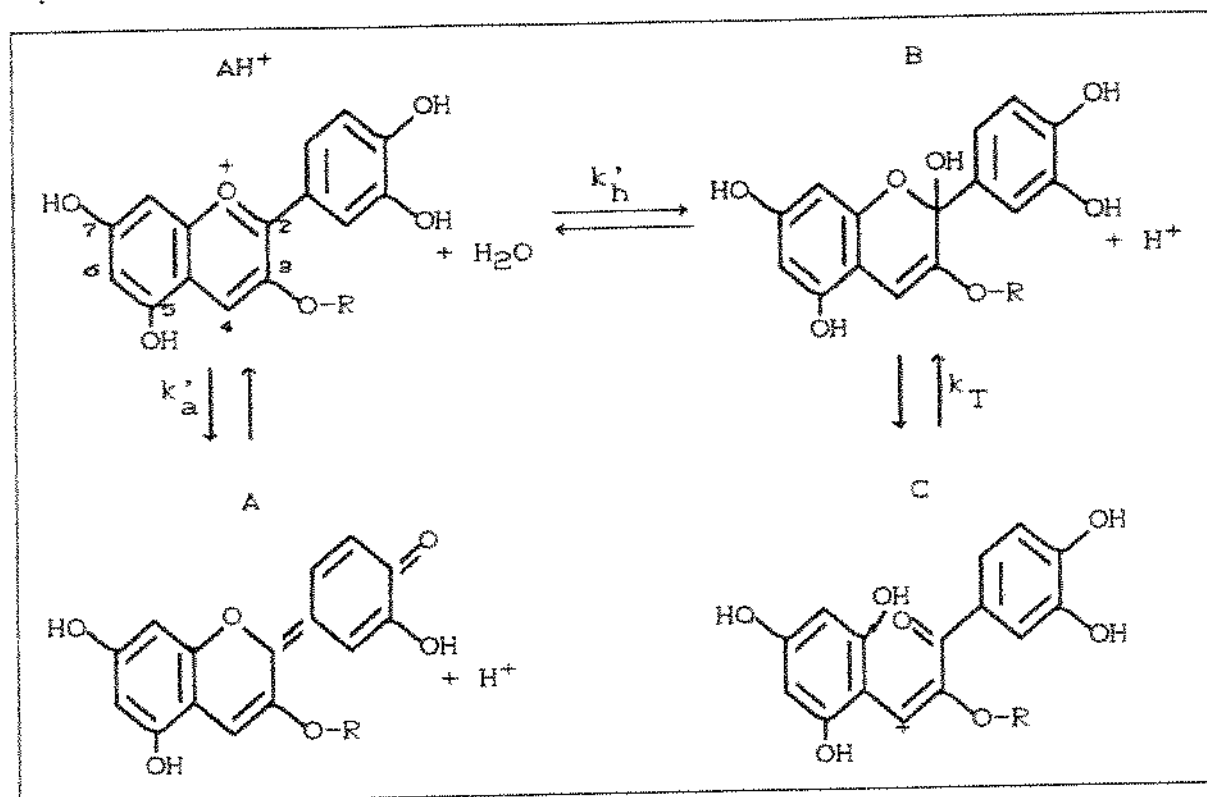


Figura 5: As quatro estruturas das antocianinas existentes em equilíbrio em soluções aquosas (Brouillard, 1982)

A pH abaixo de 2,0, as antocianinas glicosiladas na posição 3 existem na forma do cátion AH^+ . Quando o pH aumenta, variando entre 3 e 6, o cátion AH^+ é rápida e completamente hidratado à pseudobase carbinol (B) com a adição de água acontecendo essencialmente na posição 2, tendo sido demonstrado por Brouillard (1982) que não há adição na posição 4, onde a adição é cinética e termodinamicamente desfavorável.

No caso das 3-desoxiantocianidinas, o processo de hidratação é menos eficiente, com a forma carbinol (B) somente se formando a pH acima de 4 (Brouillard et al, 1983).

Uma vez estabelecida a hidratação, ela pode, até mesmo à velocidade muito baixa, promover a formação de estrutura aberta da chalcona (C), também incolor como a pseudobase (B).

A variação das estruturas em equilíbrio de acordo com o pH e as quantidades relativas do cátion (AH^+), base quinoidal (A), pseudobase ou forma hemiacetálica (B) e chalcona (C) foram estabelecidas por Mazza e Brouillard (1987), representadas na Figura 6 para a cianidina 3-glicosídeo, onde a pH 0,5 somente o cátion vermelho (AH^+) é a espécie presente.

Com o aumento do pH, a concentração de AH^+ diminui conforme ocorre a hidratação, produzindo a espécie pseudobase incolor (B), sendo este equilíbrio caracterizado por um valor de pK_h (pH da hidratação) de 2,23, quando então ambas as formas coexistem. Neste pH contudo, pequenas quantidades da chalcona incolor (C) e base quinoidal azul (A) também estão presentes, e as proporções destes últimos e da espécie (B) aumentam com o aumento do pH (pH > 4,5) às expensas do cátion (AH^+). Entre pH 4 e 5,0 muito pouca cor permanece nas antocianinas já que as quantidades das duas espécies coloridas (AH^+ e A) são muito pequenas (Mazza e Brouillard, 1987).

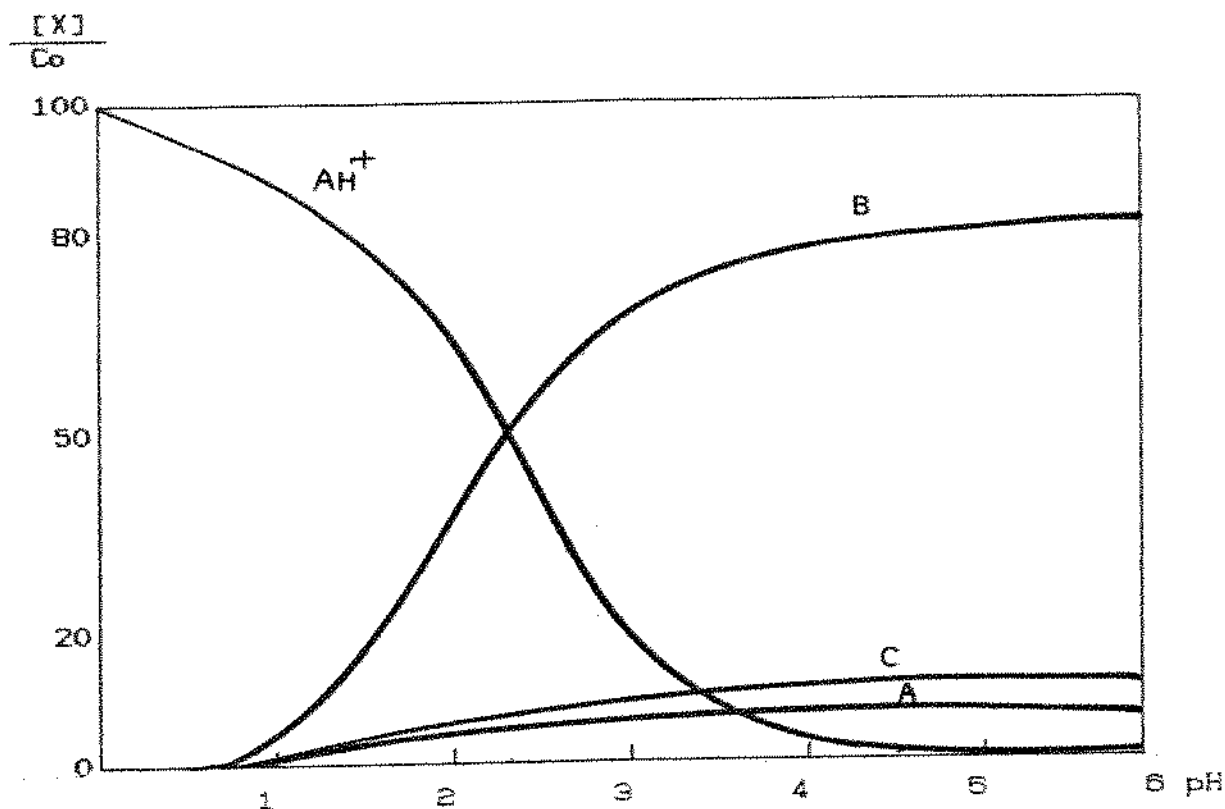


Figura 6: Distribuição do equilíbrio estabelecido entre AH^+ , B, A e C com o pH, a $25^\circ C$, para a cianidina 3-glicosídeo (Mazza & Brouillard, 1987)

2.8.4 Oxigênio

O oxigênio provavelmente tem efeitos nocivos sobre as antocianinas através de um mecanismo oxidativo direto e/ou através de oxidação indireta por onde constituintes oxidados do meio são capazes de reagir com as antocianinas formando produtos incolores ou marrom, como observado por Starr e Francis (1968) ao estudarem o efeito da presença

de ácido ascórbico e oxigênio na velocidade de degradação das antocianinas, atribuindo a ambos uma ação sinérgica que acelerava a degradação.

Suyama et al (1983) constataram a diminuição do tempo de meia-vida, de 4,1 horas para 2,5 horas quando da presença de oxigênio no "head-space" dos tubos das amostras analisadas contendo soluções de cianidina 3-(p-cumaroil-glicosídeo)-5-glicosídeo. Quando 90% do oxigênio foi removido, Kallio et al (1986) verificaram um aumento da estabilidade das antocianinas contidas no suco dos frutos do *Empetrum nigrum* por um fator de 3-4; entretanto, com a adição de ácido ascórbico ao suco a estabilidade aumentou levemente para sete das dez antocianinas quando o oxigênio não foi removido, enquanto nas amostras sob nitrogênio a suplementação provocou a diminuição dos tempos de meia-vida de nove das antocianinas.

2.8.5 Luz

Experimentos de estabilidade de cor empregando soluções aquosas de antocianina comercial (400mg/100ml), acondicionadas em ampolas seladas, a pH 2,3 e a 25°C, foram realizados por Kearsley e Rodriguez (1981), com metade das ampolas expostas à luz e metade permanecendo no escuro. Os resultados, apresentados no Quadro 2, a partir de leituras de absorbância no λ_{max} no tempo inicial e depois de 144 horas

de exposição revelaram o efeito destrutivo da luz sobre as antocianinas, com 75% de perda de absorção.

Quadro 2: Valores de absorbância no tempo inicial e após 144 hs de soluções aquosas de antocianinas, submetidas à ação da luz e ao escuro (Kearsley & Rodriguez, 1981).

Tempo (hs)	Absorbância	
	Luz	Escuro
0	1,6	1,6
144	0,4	1,2

Uma degradação da absorção de cor de 28% e 51%, foi verificada por Suyama et al (1983) ao exporem soluções aquosas da cianidina 3-(p-cumaroil-glicosídeo)-5-glicosídeo, a pH 3, sob nitrogênio, à ação da luz, após 5 e 10 horas, respectivamente.

As variações de pH e a incidência de luz são os fatores que mais contribuem para a degradação da cor das antocianinas, principalmente quando existe uma associação luz-oxigênio (Stringeta et al, 1991). Em diferentes valores de pH, soluções aquosas ácidas de malvidina 3,5-diglicosídeo, mostraram não sofrer degradação fotoquímica quando irradiada a 546 nm, contudo, a irradiação a 313 nm e 366 nm, numa faixa de pH de 0,6 a 3,5 resultou em mudanças irreversíveis no pigmento com perda da absorção do cátion flavilium (Figueiredo et al, 1992). O acompanhamento dessa reação por CLAE, na faixa de pH entre 1 e 3, forneceu dados cinéticos sugerindo, de acordo com Pina et al (1992),

como primeiro passo a hidrólise do glicosídeo na posição 5 com formação da malvidina 3-glicosídeo, espécie intermediária da qual resultaram produtos de degradação, através da cisão do cátion flavilium, que foram identificados como ácido 3',5'-dimetoxi-4'-hidroxibenzóico e 2,4,5-triidroxibenzaldeído.

2.8.6 Copigmentação

2.8.6.1 Estrutura química do complexo antocianina-copigmento

Pontes de hidrogênio foram inicialmente sugeridas para explicar a formação do complexo a partir do fato que a copigmentação era dependente da concentração, e que o complexo formado poderia ser dissociado por aquecimento, ou ainda, por adição de álcool ou dimetilformamida (Asen et al, 1972). O complexo se formaria entre a base quinoi-dal (A), através de pontes de hidrogênio entre seu grupo ceto e as hidroxilas do glicosídeo do flavonóide usado como copigmento, produzindo um empilhamento horizontal (tipo "end to end") como ilustrado na Figura 7, com o grau de formação do complexo dependendo principalmente do número de grupos -OH aromáticos livres do flavonóide (Scheffedelt e Hrazdina, 1978; Williams e Hrazdina, 1979).

Um novo modelo de estrutura foi proposto por Goto (1988) baseando-se no empilhamento vertical, através de forças hidrofóbicas entre os núcleos aromáticos da antocianina e o da flavona usada como copigmento,

mostrado na Figura 8, sendo adicionalmente estabilizada pelas moléculas hidrofílicas do açúcar.

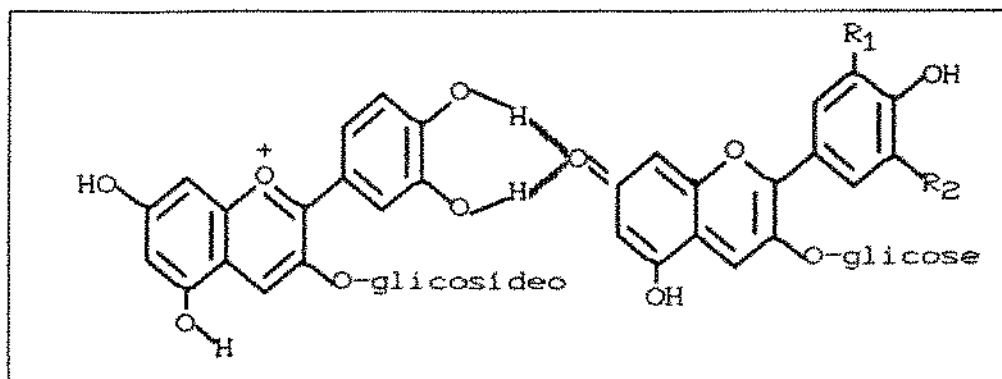


Figura 7: Modelo de copigmentação do tipo empilhamento horizontal ("end to end", proposto por Williams e Hrazdina, 1979)

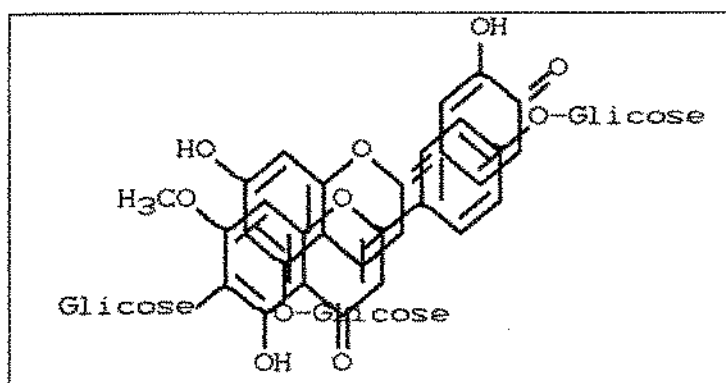


Figura 8: Modelo de copigmentação do tipo empilhamento hidrofóbico (Goto, T., Hoshino, T. e Takase, S., 1988, citado em Goto, 1988)

2.8.6.2 pH do Meio

Mudanças na intensidade de cor, na faixa de pH de 1 a 7, para antocianinas, após complexação com rutina, não foram uniformes, mas in-

fluenciadas pelo modelo de substituição do anel B da antocianina e pela natureza do substituinte nas posições 3 e 5, com a máxima formação do complexo antocianina - rutina ocorrendo com os 3-glicosídeos a pH próximo de 4,2, com os 3,5-diglicosídeos e 3-acilglicosídeo-5-glicosídeos a pH em torno de 3,1 e com os 3-acilglicosídeos a pH entre 4-4,5 (Williams e Hrazdina, 1979). A valores de pH entre 2,7-5,7, soluções aquosas de cianina e malvina tiveram suas cores intensificadas após adição de ácido clorogênico, com a máxima complexação ocorrendo a pH 3,6, na qual ambas as antocianinas livres existiam essencialmente nas estruturas incolores pseudobase (B) e cis chalcona (C) num equilíbrio rápido entre elas.

2.8.6.3 Efeito da Concentração do pigmento e do copigmento

Além da intensificação da cor das soluções de antocianina na presença de rutina, Scheffeldt e Hrazdina (1978) observaram um deslocamento batocrômico de + 44 nm (em direção à região do azul) quando a concentração de antocianina era baixa ($4 \cdot 10^{-6}$ - 10^{-4} M), diminuindo para + 20 nm quando a concentração da solução foi posteriormente aumentada. Os dados apresentados por Mazza e Brouillard (1990), resumidos no Quadro 3, indicaram entretanto, que a extensão dos efeitos batocrômico e hiperocrômico variava com a estrutura e, principalmente, com a razão molar copigmento/pigmento.

A pH 3,65 e a 20°C, ocorreu um aumento de 5,4 vezes da absorbância no λ_{max} da malvina após ter-se aumentado 3 vezes sua concentração, para

a razão molar copigmento/pigmento de 5, e um aumento de 8 vezes para a razão molar de 20. Para a cianina, um aumento de 3 vezes em sua concentração inicial resultou num aumento de 3,7 vezes na absorbância, na razão molar copigmento/pigmento de 5, e um aumento de 4,9 vezes na razão molar de 20. De acordo com os referidos autores, a eficiência do processo de copigmentação foi maior para a malvina do que para a cianina, aumentando com o aumento da concentração da antocianina, observando-se ainda, na presença de ácido clorogênico, um deslocamento batocrômico no máximo de absorção, que aumentava com o aumento da concentração de antocianina.

Quadro 3: Efeito do pH, concentração de antocianina e ácido clorogênico e tipo de antocianina no λ_{max} e absorbância no λ_{max} visível e a 525 nm das soluções antocianinas-ácido clorogênico (Solvente: tampão ácido fosfórico-acetato de sódio, T = 20°C) (Mazza & Brouillard, 1990).

Pigmento	Pigmento Conc. (M) (x 10 ⁻⁴)	Copigmento/ Pigmento razão molar	pH	λ_{max}	Absorbância		(A-A ₀)*
					λ_{max}	λ_{525}	
cianidina 3,5-diglicósido	2,58	0	2.74	509.2	1.625	1.403	0.0
		5	2.74	512.0	1.858	1.677	0.20
		10	2.73	513.6	1.987	1.849	0.32
		20	2.73	516.8	2.287	2.201	0.57
		40	2.75	521.2	2.736	2.700	0.92
cianidina 3,5-diglicósido	2,58	0	3.64	510.8	0.329	0.284	0.0
		1	3.62	512.8	0.347	0.300	0.05
		5	3.62	514.4	0.370	0.338	0.19
		10	3.62	515.2	0.449	0.420	0.47
		20	3.61	518.8	0.580	0.570	1.00
		40	3.62	523.2	0.847	0.844	1.96
		80	3.62	528.0	1.365	1.365	3.79
cianidina 3,5-diglicósido	2,58	150	3.64	531.6	2.069	2.023	6.10
		0	4.72	521.6	0.110	0.098	0.0
		5	4.70	526.0	0.126	0.119	0.21
		10	4.71	526.4	0.138	0.127	0.30
		20	4.73	528.8	0.160	0.155	0.58
		40	4.71	530.0	0.229	0.225	1.30
		80	4.72	532.4	0.338	0.330	2.37
cianidina 3,5-diglicósido	2,58	150	4.69	535.2	0.603	0.578	4.89
		200	4.72	537.2	0.710	0.675	5.89
		0	5.74	528.8	0.097	0.090	0.0
		5	5.77	530.4	0.103	0.097	0.08
		10	5.72	531.6	0.111	0.105	0.17
		20	5.76	532.4	0.136	0.135	0.50
		40	5.73	538.4	0.174	0.176	0.80
cianidina 3,5-diglicósido	2,58	80	5.72	539.2	0.261	0.244	1.71
		150	5.75	542.8	0.420	0.375	3.17
		200	5.74	544.4	0.514	0.458	4.09
cianidina 3,5-diglicósido	7,73	0	3.70	511.2	0.090	0.077	0.0
		1	3.70	511.2	0.097	0.085	0.10
		5	3.70	515.6	0.102	0.093	0.20
		10	3.65	515.6	0.117	0.108	0.50
		20	3.67	517.6	0.140	0.135	0.75

Pigmento	Pigmento Conc. (M) (x 10 ⁻⁴)	Copigmento/ Pigmento razão molar	pH	$\lambda_{\text{máx}}$	Absorbância		(A-A _o)*
					$\lambda_{\text{máx}}$	λ_{525}	
cianidina 3,5-diglicósido	0,86	0	3.66	511.2	0.090	0.077	0.0
		5	3.65	511.2	0.097	0.085	0.10
		10	3.66	515.6	0.102	0.093	0.20
		20	3.65	515.6	0.117	0.108	0.50
		40	3.67	517.6	0.140	0.135	0.75
		80	3.66	521.0	0.203	0.203	1.60
		150	3.64	524.0	0.320	0.320	3.16
		200	3.66	526.0	0.387	0.387	4.03
malvidina 3,5-diglicósido	2,58	0	3.66	523.6	0.155	0.139	0.0
		5	3.65	525.6	0.196	0.180	0.29
		10	3.68	528.0	0.246	0.229	0.65
		20	3.67	532.4	0.360	0.345	1.48
		40	3.66	536.4	0.637	0.593	3.27
		80	3.66	542.6	1.195	1.069	6.69
		150	3.66	546.4	2.049	1.759	11.65
malvidina 3,5-diglicósido	7,73	0	3.66	524.0	0.550	0.548	0.0
		1	3.65	526.4	0.686	0.653	0.19
		5	3.65	529.6	1.064	1.043	0.90
		10	3.67	535.2	1.650	1.583	1.89
		20	3.66	541.2	2.884	2.685	3.90
cianidina 3-glicosídeo	2,58	0	3.61	510.0	1.445	1.301	0.0
		4	3.59	513.2	1.621	1.538	0.18
		10	3.62	515.2	1.758	1.680	0.29
		20	3.62	519.2	2.090	2.055	0.58
		40	3.64	525.2	2.480	2.468	0.90
malvidina 3-glicosídeo	2,58	0	3.66	520.8	0.937	0.915	0.0
		1	3.64	522.4	1.023	1.009	0.10
		5	3.65	525.6	1.180	1.176	0.28
		10	3.63	572.2	1.496	1.485	0.62
		20	3.65	531.2	1.816	1.775	0.94
		40	3.65	537.6	2.347	2.235	1.44

* A e A_o são absorbância das soluções de antocianina a 525 nm na presença e ausência de ácido clorogênico, respectivamente.

2.8.6.4 Efeito da estrutura química da antocianina

O maior aumento percentual na intensificação da cor, através do efeito hipercrômico, após complexação com rutina foi observado para a malvidina 3,5-diglicosídeo (1000%), seguida por malvidina 3 p-cumarilglicosídeo-5-glicosídeo (500%) e malvidina 3-glicosídeo (140%), esta última apresentando um aumento menor na absorção em relação à

primeira, provavelmente pelo fato de seu cátion flavilium ser mais estável, a pHs relativamente altos, do que o do diglicosídeo (Scheffeldt e Hrazdina, 1978). Mazza e Brouillard (1990) relataram que o aumento do grau de metoxilação de glicosidação produziu um aumento na absorção. Usando ácido clorogénico como copigmento, os referidos autores observaram que, para uma razão molar copigmento/pigmento de 40 (concentração de pigmento $2,58 \times 10^{-4} \text{M}$, a pH 3,65, e temperatura de 20°C) os aumentos observados foram na seguinte ordem: malvidina 3,5-diglicosídeo (dois $\text{O}-\text{CH}_3$; um $-\text{OH}$), 4,2 vezes; cianidina 3,5-diglicosídeo (dois $-\text{OH}$), 2,6 vezes; malvidina 3-glicosídeo, 2,5 vezes e 1,7 vezes para a cianidina 3-glicosídeo, com os seguintes deslocamentos batocrômicos: 12,8; 12,4; 16,8 e 15,2 nm, respectivamente.

2.8.6.5 Efeito do tipo do copigmento

Dentre os produtos naturais investigados como copigmentos por Asen et al (1971, 1972, 1975), como auronas, alcalóides, aminoácidos, ácidos benzóicos, cumarinas, ácidos cinâmicos e flavonóides, os últimos formaram complexos mais fortes com as antocianinas. A eficiência da complexação em função da estrutura do flavonóide (Figura 9), expressa como $\Delta A/\text{nm}$ (aumento na absorbância) e $\Delta \lambda_{\text{max}}$ (nm) (acréscimo no comprimento de onda de absorção máxima), estudada por Chen & Hrazdina (1981), está resumida no Quadro 4. De acordo com os referidos autores, o que mais favoreceu na formação do complexo a pH 3,2 foram as pontes de hidrogénio formadas entre o grupo carbonila da base quinoi-

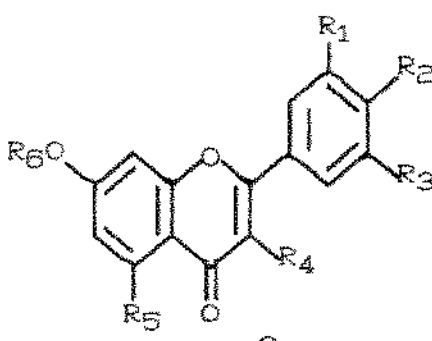
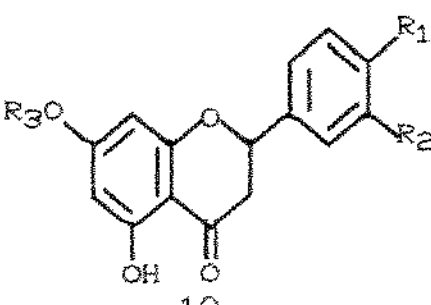
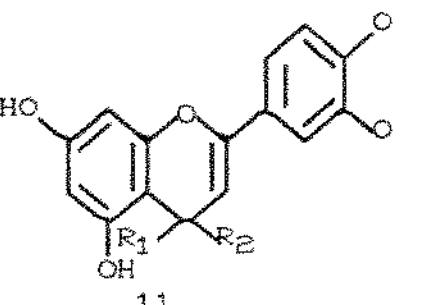
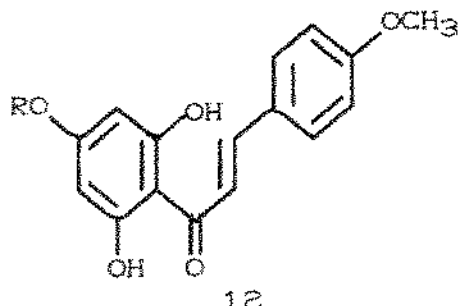
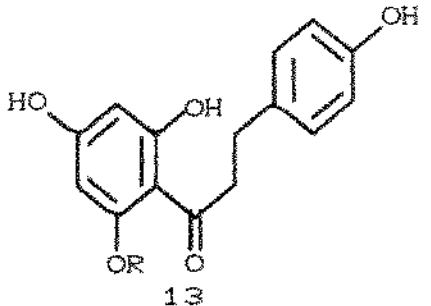
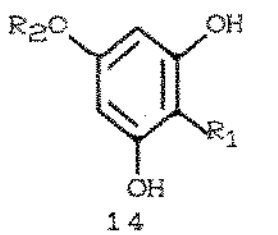
					
					
					
					
					
					
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
icosídeos de Flavonas					
A Apigenina 7-glicosídeo	H	OH	H	H OH	H
B Apigenina 7-neohesperidosídeo	H	OH	H	H	OH
C Diosmelina 7-rutinosídeo	OH	OMe	H	H	OH
icosídeos de Flavonol e Flavonóis					
D Kaempferol 7-neohesperidosídeo	H	OH	H	OH	OH
E Kaempferol 3-robinobiosídeo 7-raminosídeo	H	OH	H	O-Gli-Ram	OH
F Quercetina 3-glicosídeo	OH	OH	H	O-Gli	OH
G Quercetina 3-ramnosídeo	OH	OH	H	O-Ram	OH
I Quercetina 7-neohesperidosídeo	OH	OH	H	OH	OH
J Isoramnetina 3-glicosídeo	OMe	OH	H	O-Gli	OH
K Tamarixetina 7-rutinosídeo	OH	OMe	H	OH	OH
L Quercetina	OH	OH	H	OH	OH
M Fisetina	OH	OH	H	OH	H
N Miricetina	OH	OH	OH	OH	OH
H Quercetina 3-rutinosídeo	OH	OH	H	O-Gli-Ram	OH
icosídeos de Flavanonas					
A Pinocembrina 7-neohesperidosídeo	H	H	Gli-Ram		
B Naringenina 7-neohesperidosídeo	H	OH	Gli-Ram		
C Isosakurenina 7-neohesperidosídeo	OH	OMe	Gli-Ram		
D Eriodictiol 7-neohesperidosídeo	OH	OH	Gli-Ram		
E Hesperetina 7-rutinosídeo	OH	OMe	Gli-Ram		
avanonóis e Flavonóis					
A Toxifolina	R ₁ =R ₂ =O				
B (+) Catequina	R ₁ =R ₂ =H				
alcona e Glicosídeo de Diidrochalcona					
A Porcirina	R=Gli-Ram				
B Floridzina					
derivados de Floroglucinol					
A Floroacetoferrona 4-neohesperidosídeo	Ac	Gli-Ram			
B Fluroglucinol	H	H			

Figura 9: Estruturas de flavononas, flavonóis, chalconas, derivados de floroglucinol e seus glicosídeos (Chen & Hrazdina, 1981)

Quadro 4: Formação de complexo de compostos flavonóides e derivados do floroglucinol (4×10^{-3} M) com malvidina 3,5-diglicosídeo (1×10^{-3} M) (Chen & Hrazdina, 1981)

Flavonóides		$\Delta\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	$\Delta A/\text{mm}$ no $\lambda_{\text{máx}}$
9A	Apigenina 7-glicosídeo	31	1,29
9B	Apigenina 7-neohesperidosídeo	32	1,31
9D	Kamferol 7-neohesperidosídeo	29	1,22
9E	Kamferol 3-robinobiosídeo-7-ramnosídeo	27	1,17
9F	Quercetina 3-glicosídeo	30	1,48
9G	Quercetina 7-ramnosídeo	29	1,49
9H	Quercetina 7-rutinosídeo	30	1,52
9I	Quercetina 7-neohesperidosídeo	27	1,35
9J	Isoramnetina 3-glicosídeo	30	1,20
9K	Tamarixetina 7-rutinosídeo	30	1,61
9L	Quercetina	28	1,67
9M	Fisetina	29	1,72
9N	Minicetina	34	2,07
10A	Pinocembrina 7-neohesperidosídeo	4	0,27
10B	Narigenina 7-neohesperidosídeo	6	0,46
10C	Isosakuranetina 7-neohesperidosídeo	7	0,28
10D	Eriodictiol 7-neohesperidosídeo	12	0,52
11A	Taxifolina	9	0,42
11B	Catequina	6	0,35
12	Chalcona Poncirina	29	0,65
13	Floridzina	7	0,27
14A	Floroacetofenona 7-neohesperidosídeo	5	0,18
14B	Fluroglucinol	0	0

dal (A) e os grupos hidroxila dos flavonóides; assim, miricetina, com 6 grupos hidroxilas forma um complexo mais forte que a quercetina, uma pentaidroxiflavona. A hidroxila no carbono 3 dos flavonóides parece não estar envolvida na formação do complexo, conforme se verifica após comparar os valores de ΔA dos compostos 9B e 9D. Também a natureza do açúcar substituído aparentemente não exerce influência na complexação (9A e 9B), mas houve uma diminuição na capacidade de com-

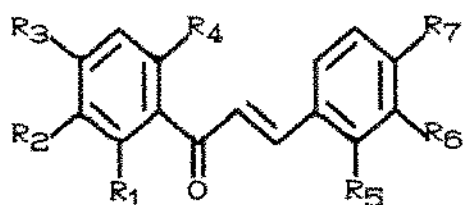
Quadro 4: Formação de complexo de compostos flavonóides e derivados do floroglucinol (4×10^{-3} M) com malvidina 3,5-diglicosídeo (1×10^{-3} M) (Chen & Hrazdina, 1981)

Flavonóides		$\Delta\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	$\Delta A/\text{mm}$ no $\lambda_{\text{máx}}$
9A	Apigenina 7-glicosídeo	31	1,29
9B	Apigenina 7-neohesperidosídeo	32	1,31
9D	Kamferol 7-neohesperidosídeo	29	1,22
9E	Kamferol 3-robinobiosídeo-7-ramnosídeo	27	1,17
9F	Quercetina 3-glicosídeo	30	1,48
9G	Quercetina 7-ramnosídeo	29	1,49
9H	Quercetina 7-rutinosídeo	30	1,52
9I	Quercetina 7-neohesperidosídeo	27	1,35
9J	Isoramnetina 3-glicosídeo	30	1,20
9K	Tamarixetina 7-rutinosídeo	30	1,61
9L	Quercetina	28	1,67
9M	Fisetina	29	1,72
9N	Minicetina	34	2,07
10A	Pinocembrina 7-neohesperidosídeo	4	0,27
10B	Narigenina 7-neohesperidosídeo	6	0,46
10C	Isosakuranetina 7-neoheperidosídeo	7	0,28
10D	Eriodictiol 7-neohesperidosídeo	12	0,52
11A	Taxifolina	9	0,42
11B	Catequina	6	0,35
12	Chalcona Poncirina	29	0,65
13	Floridzina	7	0,27
14A	Floroacetofenona 7-neohesperidosídeo	5	0,18
14B	Fluroglucinol	0	0

dal (A) e os grupos hidroxila dos flavonóides; assim, miricetina, com 6 grupos hidroxilas forma um complexo mais forte que a quercetina, uma pentaidroxi flavona. A hidroxila no carbono 3 dos flavonóides parece não estar envolvida na formação do complexo, conforme se verifica após comparar os valores de ΔA dos compostos 9B e 9D. Também a natureza do açúcar substituído aparentemente não exerce influência na complexação (9A e 9B), mas houve uma diminuição na capacidade de com-

plexação quando o flavonóide apresentava saturação na ligação C-2 - C-3; enquanto fenóis simples como floroglucinol não foram eficientes como copigmentos.

Efeitos hiperocrômico e batocrômico foram observados após copigmentação da cianina com diversas chalconas, cujas estruturas estão representadas na Figura 10. Os resultados obtidos, resumidos no Quadro 5, mostraram que as chalconas exibiram uma relação molar estequiométrica relação molar estequiométrica linear entre o copigmento e a cianina, sugerindo a formação de um complexo de estequiometria 1:1. Entretanto, uma detalhada relação "estrutura-atividade" não pode ser estabelecida (Rüedi & Hutter-Beda, 1990). Ácido tânico, um composto altamente hidroxilado, empregado inicialmente por Maccarone et al (1987) mostrou-se bastante efetivo ao proteger cianidina 3-cafeil-arabinosilglucosídeo, peonidina 3-arabinosilglucosídeo acilada e cianidina 3-glicosídeo, de condições adversas como luz e ar a pH 2,0 e a temperatura ambiente, aumentando seus tempos de meia-vida em 246%, 191% e 58%, respectivamente (Bobbio et al, 1990).



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇
1a	O-Gli	H	H	H	H	H	H
1b	H	H	O-Gli	H	H	H	H
1c	H	H	H	H	O-Gli	H	H
1d	H	H	H	H	H	H	O-Gli
1e	H	H	O-Gli	H	H	H	OH
1f	H	H	OH	H	H	H	O-Gli
1g	H	H	OH	H	H	H	OH
1h	H	H	O-Gli	H	H	H	O-Gli
1i	H	OH	OH	H	H	H	OH
1j	OH	H	O-Gli-Ram	OH	OH	H	O-CH ₃
1k	OH	OH	O-Gli	H	H	OH	OH

Figura 10: Estruturas das chalconas estudadas (por Rüedi e Hutter-Beda, 1990)

Quadro 5: Efeitos batocrômicos e hiperocrômicos na copigmentação da cianina (1×10^{-3} M) com as chalconas 1a-1K (em ordem crescente da capacidade de complexação) em comparação com a rutina (n.s. = não solúvel nas condições experimentais, T= 22°C, citrato de sódio 0,05M/HCl, a pH 4,0).

Chalcolna	Razão molar 1:1		Razão molar 1:2	
	$\Delta\lambda$ (nm)	ΔA (%)	$\Delta\lambda$ (nm)	ΔA (%)
1a	1	13	1	11
1j	2	15	3	29
1c	2	26	3	29
1f	3	17	4	27
1b	4	19	5	34
1d	4	16	7	32
1h	4	16	7	32
1e	4	23	8	44
1g	7	38	n.s.	n.s.
1i	8	54	14	90
1k	13	83	20	16,7
Rutina	10	85	13	160

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Preparação dos Extratos de Antocianinas

3.1.1 Berinjela (*Solanum melongena*)

Quatrocentos gramas de cascas de berinjela foram trituradas com suficiente volume de metanol acidulado com ácido cítrico 0,5%, para cobrir todo o material sólido.

O material triturado foi deixado por 24 horas a 5°C, ao abrigo da luz, seguido de filtração em pano fino e uma prensagem do resíduo, que foi submetido a uma nova extração. O extrato total assim obtido, foi filtrado em funil de Buchner, diluído com água destilada para sete (7) litros (°Brix 3) e, a seguir, concentrado por osmose reversa, em aparelho Millipore, com cartucho de "cut off" 400, pressão 180 psi; o volume final do extrato recolhido a 32°C, foi de 500ml com °Brix 8.

O extrato assim obtido foi em seguida novamente concentrado sob pressão reduzida a uma temperatura inferior a 35°C até alcançar um teor de sólidos de aproximadamente 50%. O extrato assim preparado foi armazenado sob nitrogênio ao abrigo da luz a -18°C para posterior uso durante a execução das etapas posteriores de trabalho.

3.1.2 Amora (*Morus nigra*)

As amoras (1kg) foram colhidas na região de Viçosa, Minas Gerais, e extraídas e concentradas como em 3.1.1.

3.1.3 Morango (*Fragaria ananassa*)

Dois quilogramas de morangos foram extraídos e concentrados como em 3.1.1.

3.2. Purificação do Extrato

3.2.1 Extrato de Berinjela

O extrato obtido em 3.1.1 foi purificado por cromatografia em papel de filtro grosso, tipo mata-borrão e os cromatogramas foram desenvolvidos em HCl 1%, por 12 horas.

A zona principal foi recolhida e eluída em metanol e recromatografada em papel Whatman n° 3. O cromatograma foi desenvolvido em BAW (n-butanol-ácido acético-água, 6:1:2, v/v/v) por 72 horas. A ausência de glicosídeos de flavonas e de flavonóis foi verificada por exposição dos cromatogramas aos vapores de amoníaco. A zona de coloração mais intensa foi separadamente eluída com metanol e recromatografada em papel Whatman n° 3 e os cromatogramas foram desenvolvidos em ácido acético 10% , por 12 horas.

A zona principal obtida do último solvente, eluída com metanol e concentrada sob pressão reduzida denominada de Zona F-(BER), foi empregada para os estudos da estabilidade.

A pureza da zona principal (HAC 10%) foi comprovada por cromatografia em papel Whatman nº 1, com os seguintes solventes: BFW (n-butanol-ácido fórmico-água, 15:2,5:2,4, v/v/v) e AWH (ácido acético-água-ácido clorídrico, 15:82:3, v/v/v) e por CLAE em fase reversa (descrita posteriormente nos itens 3.10.1 e 3.10.2).

3.2.2 Morango

As mesmas operações cromatográficas e os mesmos solventes foram empregados na purificação do extrato de morango. A fração principal final (obtida do ácido acético 10%) foi denominada de F-MOR, após verificação de sua pureza como no item 3.2.1.

3.2.3 Amora

As mesmas operações cromatográficas e os mesmos solventes foram empregados na purificação do extrato de amora. A fração principal final (obtida do AWH) foi denominada de F-AMORA. A verificação de sua pureza foi procedida como no item 3.2.1.

3.3 Hidrólise Ácida das Frações Purificadas

Soluções das antocianinas das frações purificadas F-BER, F-MOR e F-AMORA foram dissolvidas em 2 ml de metanol e transferidas para um tubo de ensaio. Dois ml de HCl 2 N foram adicionados e a soluções colocadas em banho-maria à temperatura de ebulição por 75 min. Após resfriar, as agliconas foram extraídas pela adição de 1 ml de álcool amílico (Du e Francis, 1973).

3.3.1 Identificação dos Açúcares

Os açúcares livres, resultantes da hidrólise ácida, foram identificadas por cromatografia em papel Whatman n° 1, empregando como padrões, soluções de glicose, ramnose, galactose, xilose, manose e arabinose. Os cromatogramas foram desenvolvidos com acetato de etila-piridina-água (8:2:1, v/v/v), e a revelação realizada com solução de nitrato de prata-hidróxido de sódio etanólico, preparados conforme descrito por Zweig e Sherma (1986).

3.2.2 Identificação das Antocianidinas

A solução contendo a antocianidina separada dos açúcares foi concentrada sob pressão reduzida a temperatura não superior a 40°C, para eliminar parcialmente o resíduo de álcool n-amílico e posteriormente ressolubilizada em metanol. A solução contendo a antocianidina foi cromatografada em papel Whatman n° 1 com os solventes BAW e Forestal

(ácido acético-água-ácido clorídrico, 3:1:0,3, v/v/v), para comparação dos valores dos R_f obtidos experimentalmente com os valores citados na literatura.

3.4 Hidrólise Controlada

A hidrólise controlada das soluções metanólicas das frações F-BER, F-MOR e F-AMORA foi feita de acordo com o método descrito por Francis e Harborne (1966). Amostras das soluções hidrolisadas foram retiradas com 0, 4, 6, 8, 12, 15, 20, 30, 40, 50, 60 e 75 minutos de reação e cromatografadas em papel Whatman n° 1 desenvolvidos em BAW e AWH.

3.5 Hidrólise Alcalina das Frações Purificadas

Soluções metanólicas das frações purificadas foram acondicionadas em tubo em ensaio e submetidas a um fluxo de nitrogênio e 1 ml de NaOH 2 N foi adicionado. Após submetê-las a um novo fluxo de nitrogênio, as soluções permaneceram à temperatura ambiente por 2 horas; em seguida, acidificadas com HCl 2 N (Francis, 1982).

3.5.1 Identificação dos ácidos

Os extratos etéreos da hidrólise alcalina foram submetidos à cromatografia em placa fina de sílica, juntamente com amostras padrão dos ácidos cinâmico, cumárico, ferúlico, sinápico e málico.

As placas foram desenvolvidas respectivamente em TAE (tolueno-ácido acético-etanol; 15:3:1) e em BAW, conforme descrito por Bobbio et al (1982).

3.6 Reações Específicas de Antocianinas

A reação das antocianinas com o cloreto de alumínio(AlCl_3) foi feita conforme método descrito por Geissmam et al (1953), para verificação da existência de hidroxilas vicinais.

3.7 Preparação das Antocianidinas

As antocianidinas foram obtidas após hidrólise ácida com ácido clorídrico 2N durante 75 minutos à temperatura de 98°C , e a solução resultante, livre de antocianinas, foi usada para os estudos de estabilidade.

3.8 Reação de Copigmentação

3.8.1 Formação do complexo

Os agentes de copigmentação, ácido tânico e ácido gálico, foram dissolvidos nas soluções de antocianidinas e antocianinas, nas razões molares de 1:2 e 1:3 de pigmento/copigmento, e às soluções deixadas na ausência de luz por duas horas antes de se iniciar o experimento de estabilidade.

3.8.2 Cromatografia em Camada Delgada dos Complexos das Antocianidinas

Antocianidinas e seus complexos com ácido tânico foram cromatografados em placa de celulose Avicel e desenvolvidos na 1ª direção com FA-HCl 4N (ácido fórmico-ácido clorídrico 4N, 2:1.v/v) e na 2ª direção com MHW (metanol-água-ácido clorídrico, 190:10:1, v/v/v).

3.9 Estudo da Estabilização das Antocianidinas e Antocianinas

3.9.1 Experimento de Estabilidade

A estabilidade das antocianidinas, antocianinas e seus respectivos complexos com os ácidos tânico e gálico foi estudada frente aos fatores, pH 1,5 e 2,0, luz, ausência de luz e atmosfera inerte.

Um volume de cinco (5) ml das soluções tamponadas (tampão citrato/fosfato) de antocianinas e de antocianidinas em MeOH-tampão citrato/fosfato 1:1, e seus complexos com os copigmentos, foram acondicionados em tubo de ensaio de 15 ml com tampa rosqueável, submetidos a um fluxo de nitrogênio por 10 segundos e fechados, sendo metade submetida à ação da luz de lâmpada fluorescente de 40 W, 2500 lux, tipo "daylight" e a outra metade deixada no escuro.

Todos os tubos permaneceram em ambiente com temperatura controlada de $20^{\circ}\text{C} \pm 1$. A cada 24 horas, para as antocianinas e, a cada 1 hora para

as antocianidinas, foram retiradas amostras e as absorbâncias lidas em duplicata, no comprimento de onda de máxima absorção. De cada amostra foram feitos os espectros de absorção. Cada experimento foi repetido pelo menos três (3) vezes e os resultados representam a média aritmética de pelo menos dois valores.

O Quadro 6 resume as condições utilizadas para o estudo das estabilidade das principais frações obtidas das três diferentes fontes.

Quadro 6: Condições de reação para as antocianinas e antocianidinas e seus complexos

Amostra	pH	Atmosfera	Condição	Adição de Copigmento	Razão Molar Pigmento/Copigmento
1	2,0	atm. inerte	luz	-	-
2	2,0	atm. inerte	escuro	-	-
3	2,0	atm. inerte	luz	ácido tânico	1:2
4	2,0	atm. inerte	escuro	ácido tânico	1:2
5	1,5	atm. inerte	luz	-	-
6	1,5	atm. inerte	escuro	-	-
7	1,5	atm. inerte	luz	ácido tânico	1:2
8	1,5	atm. inerte	escuro	ácido tânico	1:2
9	2,0	atm. inerte	luz	ácido gálico	1:2
10	2,0	atm. inerte	escuro	ácido gálico	1:2
11	1,5	atm. inerte	luz	ácido gálico	1:2
12	1,5	atm. inerte	escuro	ácido gálico	1:2
13	2,0	atm. inerte	luz	ácido tânico	1:3
14	2,0	atm. inerte	escuro	ácido tânico	1:3
15	1,5	atm. inerte	luz	ácido tânico	1:3
16	1,5	atm. inerte	escuro	ácido tânico	1:3

3.9.2 Cálculo da Constante de Velocidade de Reação (k) e Tempo de Meia-Vida ($t_{1/2}$)

Curvas de absorbância versus tempo foram construídas para o cálculo da constante e tempo de meia-vida, usando as equações de Arrhenius para a reação de 1ª ordem, equação (1) e (2) respectivamente.

$$\text{equação (1)} \quad -2,303 \log \frac{\text{Absorbância (t)}}{\text{Absorbância (t}_0\text{)}} = kt$$

$$\text{equação (2)} \quad \frac{0,693}{k} = t_{1/2}$$

3.10 CLAE das Antocianidinas e Antocianinas e respectivos complexos

3.10.1 Preparação das amostras e reagente

As soluções metanólicas das frações purificadas F-BER, F-MOR, F-AMORA, suas respectivas agliconas e os complexos foram evaporadas até secar em evaporador rotatório, à temperatura inferior a 35°C, ao abrigo da luz, redissolvidas em metanol-água-ácido clorídrico concentrado, 50:50:1 (v/v/v) (fase móvel).

As soluções obtidas foram filtradas através de membranas Millipore de 0,45 µm (tipo HA em ester de celulose) e imediatamente injetadas no sistema CLAE.

Todos os reagentes empregados na fase móvel foram filtrados através de membrana Millipore de 0,5 µm (tipo FH fluoropore) e desgaseificado.

3.10.2 Análise por CLAE

As zonas purificadas foram submetidas à análise por CLAE usando um cromatógrafo CG-480C/1 acoplado a um detector visível-UV, Spectromonitor II, LDC, U.S.A. As condições de operação estabelecidas para a análise foram: coluna RP-18 Bondapack, detector a 530 nm, isocrático, fluxo da fase móvel (MeOH-H₂O-HCl, 50:50:1, v/v/v), 0,5 ml/min, com as amostras pré-filtradas em membrana de teflon 0,5 mm, volume de injeção da seringa de 20 µl.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos trabalhos sobre estabilidade de antocianinas e antocianidinas em relação às suas estruturas, não é levado em conta o efeito do anel B, especialmente de seus substituintes. Entretanto, dados da literatura (ainda que escassos) e deste trabalho, mostram que há uma correlação entre a presença de substituintes no anel B e a estabilidade das antocianinas independentemente de copigmentos.

Tendo essa diferença de comportamento baseada aparentemente nos substituintes do anel C e no anel de pirilium, foi que procurou-se estudar a copigmentação de antocianinas e antocianidinas com diferentes grupos -OH no anel B. Acresce que o estudo do efeito do anel B e seus substituintes sobre a complexação e estabilização das antocianinas deverá também levar em conta a presença de diferentes tipos e número de açúcares no C-3 (Starr & Francis, 1986). Assim sendo, o uso de antocianidinas para estudar a complexação sob efeitos estabilizantes independe da estabilização de açúcares no C-3. Para isso, foi necessário, em primeiro lugar, a obtenção de antocianinas com um, dois e três grupos -OH, que são os glicosídeos de pelargonidina, cianidina e delphinidina, obtidos a partir de fontes que tradicionalmente contém tais compostos, como morango, amora e berinjela, respectivamente, para os quais as estruturas de suas principais antocianinas já foram claramente estabelecidas. Entretanto, a dificuldade em estabelecer a variedade produzida no Brasil de tais frutas, aliada à possibilidade

de que práticas culturais e cruzamentos pudessem dar origem a glicosídeos diferentes daqueles descritos na literatura, obrigou-nos a um longo trabalho de extração, purificação e identificação das estruturas dos glicosídeos de pelargonidina, cianidina e delfinidina, extraídos das referidas frutas. Convém enfatizar que no caso do morango foram extraídas duas variedades, sendo que a mais rica em pigmento, ou seja, com polpa colorida, mostrou-se mais rica em cianidina 3-glicosídeo e pobre em pelargonidina 3-glicosídeo, invertendo-se essa proporção na variedade que, infelizmente, apresentava coloração apenas exterior, com polpa praticamente branca.

Para efeito de discussão, todos os cromatogramas e espectros encontram-se no Apêndice.

4.1 Extração

Ácido cítrico a 0,5% em metanol mostrou-se um solvente muito eficiente para a extração, com a vantagem adicional de não ter hidrolisado as ligações glicosídicas o que pode ocorrer com o uso de ácido clorídrico (Harborne, 1967), principalmente quando o extrato é concentrado. O uso de osmose reversa foi considerado essencial para o processo, visto que, além da concentração do extrato a volume pequeno e teor de sólidos desejável, a filtração por osmose proporcionou uma purificação preliminar, a baixa temperatura e ao abrigo da luz e em tempos relativamente curtos, onde os compostos interferentes com peso

molecular menor que 400, como alguns açúcares livres, vitaminas, ácidos orgânicos e alguns flavonóides, foram total ou parcialmente retirados. A concentração final do retentado da osmose reversa, devido ao seu volume reduzido, pode ser feita em tempo relativamente curto por evaporação a vácuo e baixa temperatura a até 1/4 do volume inicial.

4.2 Purificação do extrato concentrado

4.2.1 Berinjela

Do extrato de berinjela foi selecionada inicialmente somente a zona 1, mais intensamente colorida, obtida quando o extrato bruto foi cromatografado em HCl 1% como solvente, tendo sido descartada a zona 2 por apresentar coloração menos intensa. A exposição do cromatograma (Figura 11) aos vapores de amoníaco não indicou a presença de flavonóides. A zona 1 recromatografada com BAW separou-se em quatro zonas distintas (1.1, 1.2, 1.3 e 1.4) (Figura 12). A zona 1.3, com maior teor de pigmentos por exame visual foi recromatografada em HAc 10%, obtendo-se duas zonas 1.3.1 e 1.3.2 (Figura 13). Não foi detectada a presença de flavonóides no cromatograma. A zona 1.3.2, com maior intensidade de cor foi separada e eluída e denominada F-BER. Todas as operações cromatográficas de separação estão resumidas no esquema 2.

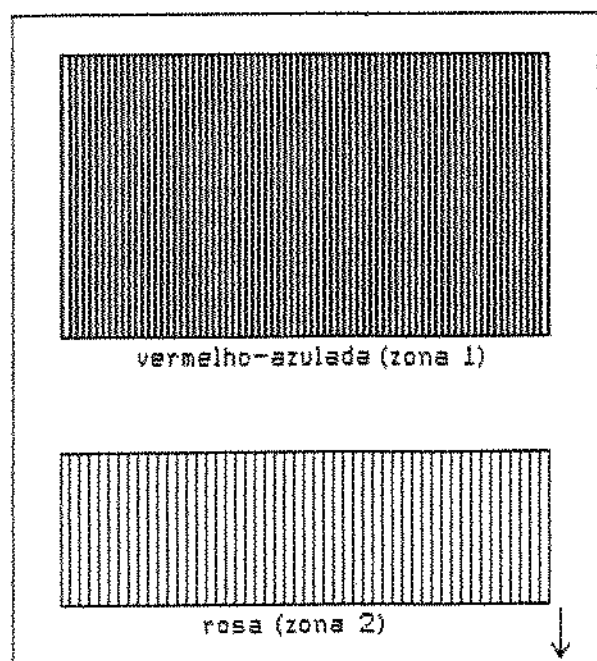


Figura 11: Cromatograma do extra-
to bruto da berinjela
desenvolvido em HCl 1%

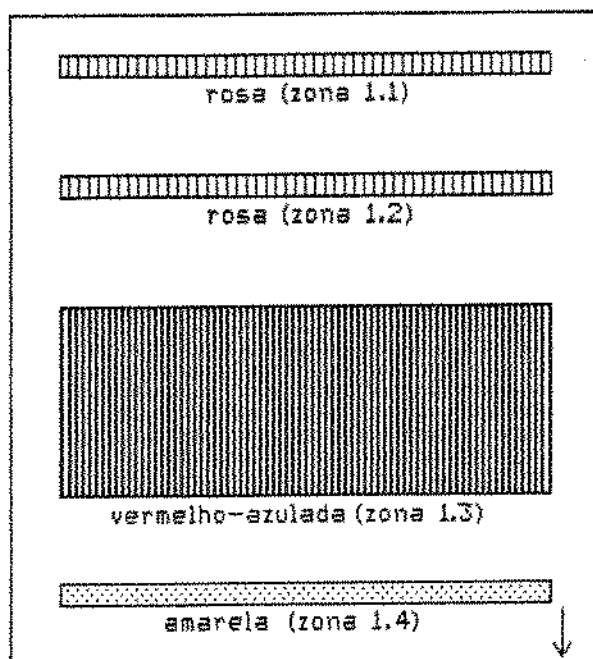


Figura 12: Cromatograma da zona
1 da berinjela de-
senvolvido em BAW

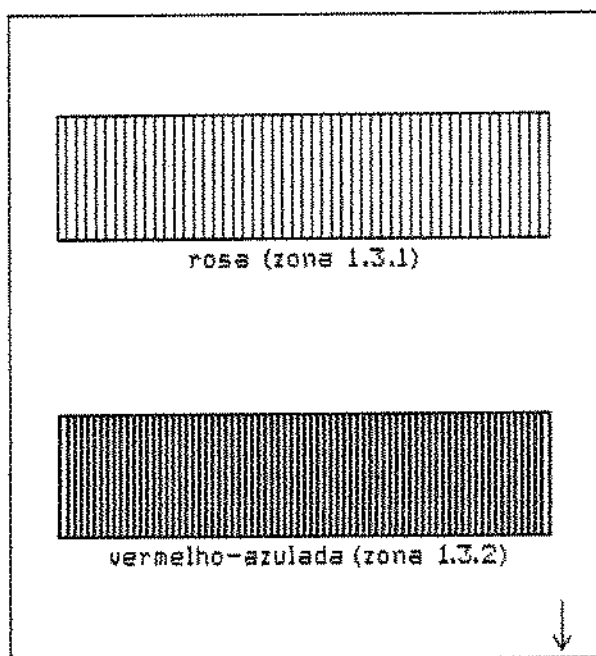


Figura 13: Cromatograma da zona 1.3 da
berinjela desenvolvido em
HAc 10%



Esquema 2: Operações cromatográficas para separação das antocianinas do extrato de berinjela

Do extrato bruto, assim como da zona purificada 1.3.2 (fração F-BER), foram obtidos os espectros de absorção UV-visível, em metanol-HCl 0,01% e o valor do deslocamento do $\lambda_{\max}$ após reação com $AlCl_3$ (Figuras 14 e 15, respectivamente). Os máximos de absorção no UV e no visível, da antocianina da fração F-BER e do extrato bruto e os valores de R_f da antocianina da fração F-BER e de sua aglicona em BAW e AWH e Forestal estão relacionados no Quadro 7.

O espectro UV-visível da fração F-BER (Figura 15) não mostrou a existência de picos ou "ombros" na região compreendida entre 300-330 nm, indicativos da presença de ácidos na molécula da antocianina, portanto o pico a 326 nm que o extrato bruto apresenta (Figura 14) indica a presença de ácidos livres, o que é comum em vegetais (Harborne, 1967). A cromatografia em placa do extrato etéreo obtido após hidrólise alcalina da fração F-BER confirmou a ausência de quaisquer ácidos ligados à molécula da antocianina.

O valor da relação $A_{440}/A_{\max \text{ vis}}$, de 16, indicou que os açúcares estão ligados ao C-3 do íon flavilium, não havendo açúcares na posição 5 (Harborne, 1967).

Quadro 7: Características Espectrais e Cromatográficas do Extrato Bruto ,Antocianina e Aglicona da Fração F-BER

Características	Extrato Bruto	Zona F-BER	Aglicona F-BER	Literatura* Delfinidina
$\lambda_{m\acute{o}x}$ (nm)	542, 326,286	542, 360,276	548, 276	546, 277
$\Delta\lambda AlCl_3$	-	+45	+22	+23
$\frac{A_{m\acute{o}x\ UV}}{A_{m\acute{o}x\ vis}}$	219	78	80	-
$\frac{A_{440}}{A_{m\acute{o}x\ vis}}$	22	16	19	-
$\frac{A_{pico\ \acute{a}cido}}{A_{m\acute{o}x\ vis}}$	207	-	-	-
Rf	BAW	30	39	42
	AWH	17.7	6.3	7
	Forestal	-	26,6	32

*Harborne (1967)

A eficiência da separação e purificação das zonas por cromatografia em papel pode ser constatada pela diminuição da razão $\frac{A_{max\ UV}}{A_{max\ vis}}$ do extrato bruto em relação à da zona purificada, evidenciando a retirada de flavonóides e ácidos livres que absorvem na região do ultra-violeta.

A pureza de cada uma das zonas principais (1.3 e 1.3.2) obtidas após separação em cada um dos solventes, assim como o extrato bruto, foi investigada através de cromatografia líquida de alta eficiência, e os cromatogramas individuais obtidos estão representados nas Figuras 16 e 17, respectivamente.

Os resultados resumidos no Quadro 8 mostram que, a partir do extrato bruto, contendo dois componentes e apresentando dois picos no cromatograma obtido por CLAE (Figura 15) obteve-se apenas um ao final da separação, enquanto que na separação por cromatografia em papel foram obtidos dois compostos. Os resultados da CLAE mostram que, para o caso das antocianinas da berinjela a cromatografia em papel é a técnica de separação indicada nas condições experimentais usadas.

Quadro 8: Tempos de retenção obtidos da CLAE do extrato bruto da berinjela e zonas principais obtidas em cada solvente. Fase móvel: MeOH-H₂O-HCl conc., 50:50:1 (v/v/v), λ_{max} 530 nm

	Extrato Bruto	Zonas		
		1	1.3	1.3.1
Tempo de retenção (tr) (min)	8,25 9,06	6,13	5,90	6,15

4.2.1.1 Identificação da estrutura da fração F-BER

A solução, obtida da hidrólise ácida da fração F-BER, continha os açúcares glicose e ramnose, cujas presenças foram confirmadas por co-cromatografia e pelos seus R_f comparados com os R_f de amostras padrão de glicose e ramnose.

As antocianinas que apresentam reação positiva com cloreto de alumínio com deslocamento batocrômico de 13 a 25 nm a pH próximo de 3.0, possuem em sua estrutura grupos orto-diidroxílicos no anel B, como é o caso das delfinidinas e cianidinas (Harborne, 1967).

Os máximos de absorção no UV-visível e deslocamento batocrômico após reação com $AlCl_3$, indicam que a aglicona da fração F-BER é a delfinidina. Os valores de R_f da delfinidina 3-rutinosídeo e de sua aglicona, nos solventes BAW, AWH e Forestal, estão de acordo com os valores da literatura.

Da hidrólise controlada da fração F-BER resultaram três (3) produtos cujos valores de R_f em AWH, comparados com os da literatura, e resumidos no Quadro 9, indicaram que o composto a ser hidrolisado seria a delfinidina 3-rutinosídeo (3-(6-O- α ramnosil-D-glicosídeo)), o 1º produto da hidrólise seria a delfinidina 3-glicosídeo e o 2º, a aglicona, delfinidina.

A fração F-BER é, portanto, a delfinidina 3-rutinosídeo, e não delfinidina 3-rutinose-5-glicose acilada com ácido p-cumárico como foi encontrado por Sakamura et al. (citado por Tanchev et al., 1970).

Quadro 9: Valores de Rf em AWH dos produtos obtidos da hidrólise ácida controlada da fração F-BER

Tempo de hidrólise (min)	Rf x 100 em AWH		
	Produtos		
	1	2	3
0	35,8	-	-
2	35,0	16,0	-
4	34,7	16,0	-
8	34,0	17,0	-
15	33,6	17,5	-
20	33,0	17,7	-
30	32,3	17,4	-
40	-	16,7	6,4
50	-	16,7	8,7
60	-	-	7,0
75	-	-	6,3

Literatura*		
delfinidina		7
delfinidina 3-glicosídeo		18
delfinidina 3-galactosídeo		18
delfinidina 3-ramniosídeo		34
delfinidina 3-rutinosídeo		37

* Harborne (1967)

4.2.2 Amora

Do extrato de amora foi selecionada a zona 1 obtida quando o extrato bruto foi cromatografado em HCl 1% como solvente, tendo sido descartadas as zonas 2 e 3 por apresentarem coloração menos intensa. A exposição do cromatograma (Figura 18) aos vapores de amoníaco não indicou a presença de flavonóides. A zona 1 recromatografada com BAW (Fi-

gura 19) separou-se em três zonas, das quais duas eram compostas por uma zona amarela forte contígua a uma zona rosa, de fraca intensidade. A primeira zona, 1.1, apresenta alta concentração visual de pigmentos e foi recromatografada em AWH (cromatograma Figura 20), onde separou-se em duas outras zonas, 1.1.1 e 1.1.2 onde somente a primeira apresentava forte cor vermelha. Esta zona foi considerada como a zona principal final e foi denominada F-AMORA.

Todas as separações cromatográficas de separação estão resumidas no esquema 3.



Esquema 3: Operações cromatográficas para separação e purificação das antocianinas do extrato de amora

O exame do espectro do extrato bruto (Figura 21) mostrou a existência de um pico atribuível a ácidos (324 nm). Entretanto, durante a separação das zonas, esse pico desaparece, indicando, possivelmente, pertencer a ácidos livres, presentes no extrato. A ausência de ácidos ligados a antocianinas foi confirmada pela cromatografia em camada delgada do extrato etéreo obtido após hidrólise alcalina da fração F-AMORA. O valor de 23,0 para a relação percentual A_{440}/A_{max} vis da fração F-AMORA indica que o(s) açúcar(es) está ligado ao C-3 da antocianina, não havendo açúcares no C-5.

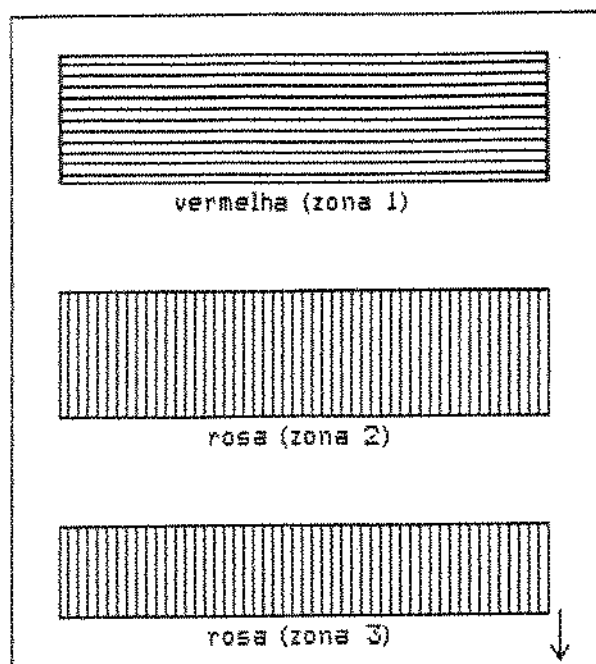


Figura 18: Cromatograma do extrato bruto da amora desenvolvido em HCl 1%

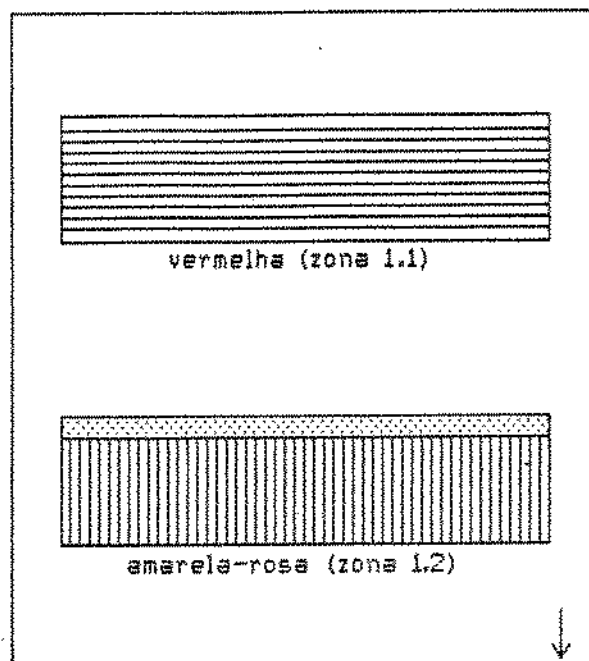


Figura 19: Cromatograma da zona 1 da amora desenvolvido em BAW

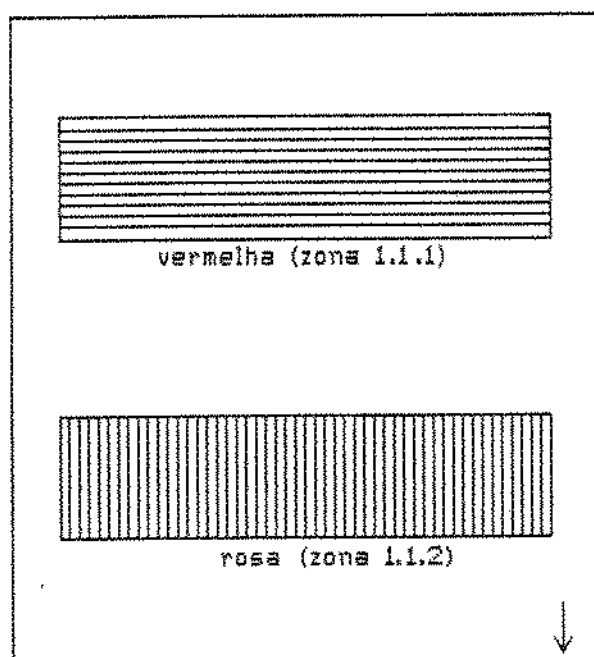


Figura 20: Cromatograma da zona 1.1 da amora desenvolvido em AWH

A separação através da cromatografia em papel do extrato da amora mostrou-se satisfatória. A pureza de cada zona principal separada (zonas 1, 1.1 e 1.1.1 (F-AMORA)) em cada um dos solventes usados foi verificada pela CLAE, mostrando em cada cromatograma (Figura 23) a existência de apenas um pico em cada um deles. Os tempos de retenção para o extrato bruto e as zonas 1 (HCl 1%), 1.1 (BAW) e 1.1.1 (F-AMORA) (HAc 10%), estão incluídos no Quadro 10.

Quadro 10: Tempos de retenção obtidos da CLAE do extrato bruto e das zonas separadas 1, 1.1 e fração F-AMORA

Tempo de retenção (tr) (min.)	Zonas		
	1	1.1	F-AMORA
	18,09	15,88	17,13

4.2.2.1 Identificação da estrutura da fração F-AMORA

A solução contendo o(s) açúcar(es) da fração purificada F-AMORA hidrolisada em meio ácido, cromatografada em papel, continha somente glicose, identificada por seu Rf comparado com o Rf da amostra padrão de glicose e por co-cromatografia.

Da fração F-AMORA, e após sua reação com AlCl₃, assim como do extrato bruto, foram obtidos os espectros de absorção UV-visível, em metanol-HCl 0,01% (Figuras 22 e 21). Os máximos de absorção no UV e visível, e deslocamento do λ_{max} após reação com AlCl₃, da antocianina da

fração F-AMORA e do extrato bruto, assim como seus valores de Rf nos solventes BAW, AWH e Forestal, estão relacionados no Quadro 11.

Quadro 11: Características espectrais e cromatográficas do extrato bruto e da fração F-AMORA

Características	Extrato Bruto	Zona F-AMORA
$\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm)	528, 326,282	528, 281
$\Delta\lambda AlCl_3$	-	+23
$\frac{A_{m\acute{a}x\ uv}}{A_{m\acute{a}x\ vis}}$	97	-
$\frac{A_{440}}{A_{m\acute{a}x\ vis}}$	25,5	-
$\frac{A_{pico\ \acute{a}cido}}{A_{m\acute{a}x\ vis}}$	53	-
Rf [BAW AWH	-	40
	-	27

Da hidrólise controlada da fração F-AMORA foram obtidos dois produtos, cujos valores de Rf em AWH, comparados com os da literatura e resumidos no Quadro 12, indicaram que o composto inicial seria a cianidina 3-glicosídeo e produto final a aglicona cianidina.

Quadro 12: Valores de Rf em AWH dos produtos da hidrólise ácida controlada da fração F-AMORA

Tempo de hidrólise (min)	Rf x 100 em AWH	
	Produtos	
	1	2
0	26	—
2	25	—
4	24	—
8	24	10
15	23	12
20	25	11
30	—	13
40	—	10
50	—	12
60	—	14
75	—	13

Literatura*		
cianidina 3-glicosídeo		27
cianidina		12

* Harborne (1967)

A fração F-AMORA é, portanto, a cianidina 3-glicosídeo.

4.2.3 Morango

Do extrato bruto de morango, cromatografado em papel e desenvolvido em HCl 1% (Figura 24), foram obtidos duas zonas. A zona de coloração laranja (zona 1), apresentando maior intensidade de cor, foi cromatografada em BAW. O cromatograma (Figura 25), exposto aos vapores de

amoniaco mostrou a existência de uma única zona amarela de flavonóide, contígua a uma zona laranja, de fraca intensidade. O cromatograma apresentava ainda uma zona laranja (zona 1.1) com forte intensidade de cor que, recromatografada em HAC 10% (Figura 26), não se separou em outras, nem detectou-se a presença de flavonóides após tratamento com vapores de amoniaco. A zona 1.1.1 obtida, foi denominada, para efeito de discussão no trabalho, de F-MOR. Todas as operações cromatográficas de separação estão resumidas no esquema 4.



Esquema 4: Operações cromatográficas para separação e purificação das antocianinas do extrato de morango

Do extrato bruto e de cada uma das zonas separadas (zonas 1, 1.1 e F-MOR) foram obtidos os espectros de absorção UV-visível, em MeOH-HCl 0,01% (Figuras 27 e 28), cujos máximos de absorção, relações $A_{440}/A_{\max \text{ vis}}$, $A_{\max \text{ UV}}/A_{\max \text{ vis}}$, $A_{\text{pico ácido}}/A_{\max \text{ vis}}$, além do deslocamento do $\lambda_{\max}$ após reação com AlCl_3 da fração F-MOR, estão relacionados no Quadro 13.

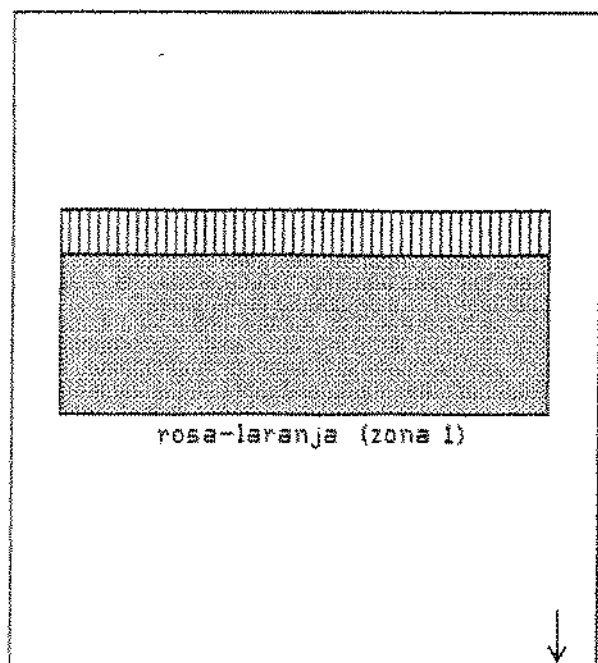


Figura 24: Cromatograma do extra-
to bruto do morango
desenvolvido em HCl 1%

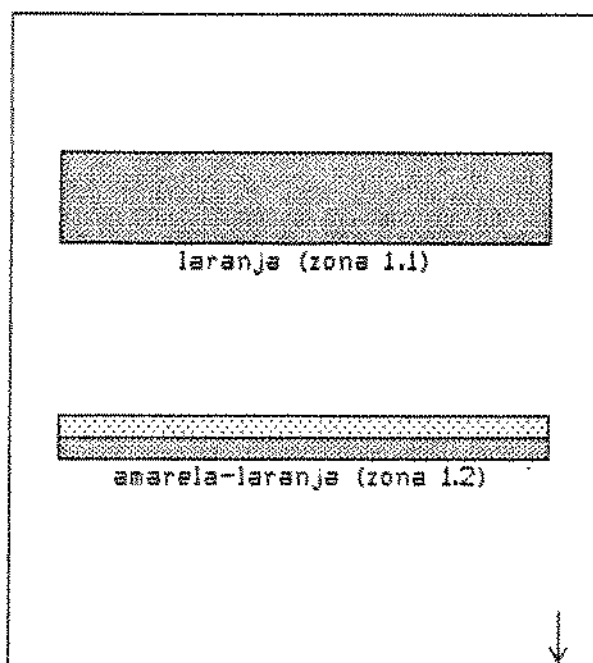


Figura 25: Cromatograma da zona
1 do morango desen-
volvido em BAW

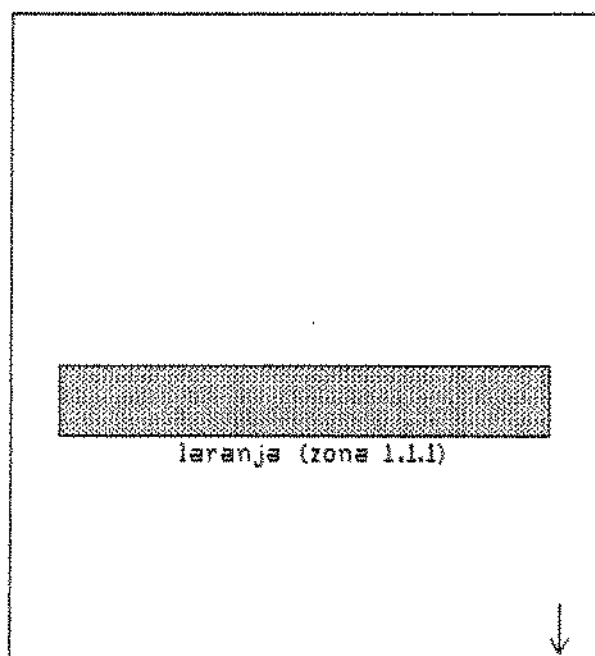


Figura 26: Cromatograma da zona 1.1
do morango desenvolvido em
HAc 10%

Quadro 13: Características espectrais do extrato bruto e zonas separadas 1, 1.1 e F-MOR

Características	Extrato Bruto	1	1.1	F-MOR
$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	510, 272, 256	506	510, 430, 333, 254	510, 430, 364, 266, 255
$\Delta\lambda\text{AlCl}_3$	-	-	0	0
$\frac{A_{\text{máx uv}}}{A_{\text{máx vis}}}$	470	-	319	131
$\frac{A_{440}}{A_{\text{máx vis}}}$	52	42	30,5	34
$\frac{A_{\text{pico ácido}}}{A_{\text{máx vis}}}$	-	60	34	29,7

4.2.3.1 Identificação da estrutura da fração F-MOR

Os espectros mostram a presença de um "ombro" ao redor de 330 nm, o que poderia indicar a presença de ácidos na molécula da antocianina. Entretanto, a razão $A_{\text{pico ácido}}/A_{\text{máx vis}}$, foi diminuindo à medida que progrediam as etapas de separação e purificação, sugerindo que os ácidos presentes poderiam ser ácidos livres. De fato, Francis (1982) e Harborne (1967) verificaram que, para a maioria das antocianinas aciladas encontradas na natureza, a razão $A_{\text{pico ácido}}/A_{\text{máx vis}}$ é sempre superior a 60. A cromatografia em camada delgada do extrato etéreo obtido após hidrólise alcalina da antocianina confirmou a ausência de ácidos na fração purificada F-MOR.

A relação percentual A_{440}/A_{max} vis de 34,0 para a fração F-MOR indica que o(s) açúcar(es) presente(s) na molécula estão ligados ao C-3.

A solução contendo o(s) açúcar(es) da fração F-MOR obtida após hidrólise continha apenas glicose, identificado pelo seu R_f comparado com amostra padrão de glicose.

A obtenção da fração F-MOR a partir do extrato bruto durante as três etapas de separação em papel nos três solventes, mostrou-se consideravelmente eficiente, conforme se constata pelos picos obtidos dos cromatogramas da CLAE (Figuras 29 e 30). O extrato bruto separou-se em cinco frações, cujos tempos de retenção estão relacionados no Quadro 14, com apenas um deles apresentando alta concentração relativa.

Quadro 14: Tempos de retenção do extrato bruto e das zonas separadas 1, 1.1 e F-MOR obtidos por CLAE

Tempo de retenção (tr) (min.)	Zonas			
	extrato bruto	1	1.1	F-MOR
	5,16 6,13 6,79 9,23	5,97 7,58 10,03	6,92	- 6,76

Da hidrólise controlada da fração F-MOR foram obtidos dois produtos, cujos valores de R_f em AWH, comparados com os da literatura, e resumidos no Quadro 15, indicaram que o composto inicial seria a pelargo-

nidina 3-glicosídeo e o produto final, a aglicona pelargonidina, como encontrado por Wrolstad e Putnam (1969).

Quadro 15: Valores de Rf em AWH dos produtos da hidrólise ácida controlada da fração F-MOR

Tempo de hidrólise (min)	Rf x 100 em AWH	
	Produtos	
	1	2
0	36	—
2	32	—
4	34	—
8	35	15
15	34	13
20	36	12
30	—	14
40	—	13
50	—	12
60	—	14

Literatura*		
pelargonidina 3-glicosídeo		35
pelargonidina		13

* Harborne (1967)

4.3 Experimentos de estabilidade

Estabelecida a identidade das antocianinas e suas características espectroscópicas e analíticas, as mesmas, bem como as suas agliconas, foram usadas para os estudos de estabilidade. Para as agliconas foram usadas concentrações elevadas nos ensaios de estabilidade, sob efeito

do pH e da luz. Valores de absorbância iniciais próximos de 2,000 nos experimentos de estabilidade foram usados (apesar de possíveis desvios da Lei de Beer), devido à rapidez com que a absorbância caiu nas soluções de antocianidinas. Os valores das constantes de velocidade de reação (k) e dos tempos de meia-vida ($t_{1/2}$) calculados para as antocianinas, a partir das perdas de absorbância, apresentam maior confiabilidade do que para as correspondentes antocianidinas, pelo tempo relativamente mais longo para chegar às perdas próximas de 50% da absorbância inicial, valor esse que para as antocianidinas, pela sua extrema instabilidade, foi atingido em alguns casos em menos de 30 minutos, não permitindo, assim, a determinação da absorbância por tempo suficiente para obtenção de um maior número de medidas, especialmente no caso das soluções de pelargonidina, onde os valores obtidos a pH 2,0 não puderam ser usados para o cálculo da constante aparente de velocidade de reação sob efeito da luz e conseqüentemente dos tempos de meia-vida, já que as soluções desta antocianidina nem sequer puderam chegar a ser expostas à luz.

Quando as soluções de antocianidinas (em MeOH-tampão citrato-fosfato, 1:1) foram colocadas em ausência de luz, tomou-se para o cálculo da porcentagem de perda da constante de velocidade k e tempo de meia-vida $t_{1/2}$, as medidas de absorbância feitas imediatamente após o preparo das soluções. Para os sistemas expostos à luz e/ou quando adicionados de ácido tânico ou ácido gálico, usou-se para os cálculos os valores de absorbância tomados após duas horas do preparo das solu-

ções. O tempo total de reação, em horas, foi variável para as diferentes antocianinas, antocianidinas e seus respectivos complexos, sempre levando em conta a perda máxima de absorção próxima de 50%.

As condições que foram usadas para o estudo da estabilidade levaram em conta a instabilidade das antocianinas e antocianidinas frente a diferentes pHs e a luz, devendo-se enfatizar a inexistência, até então, de dados sobre a estabilidade das antocianidinas, possivelmente por se considerar que os dados seriam os mesmos ou próximos das antocianinas para as respectivas antocianidinas, sem levar em conta porém a extrema instabilidade das antocianidinas onde a falta de uma ligação hemiacetálica no C-3 facilita a formação de estruturas quínicas.

Os pHs escolhidos para os experimentos foram inferiores a pH 3,0, já que as antocianinas e especialmente as antocianidinas apresentam instabilidade crescente com o aumento do pH, e considerando também que em pHs inferiores a 3,0 há um aumento da espécie AH^+ fortemente colorida.

A escolha do ácido tânico como copigmento baseia-se em estudos anteriores (Maccarone et al, 1987) que mostraram seu efeito protetor em antocianinas como a cianidina 3-glicosídeo. Por outro lado, a estrutura do ácido tânico, formada por moléculas de ácido gálico ligadas a um açúcar, apresentando portanto considerável possibilidade de formar

pontes de hidrogênio, seria relevante no estudo da formação do complexo, levando em conta o efeito sobre os grupos substituintes no anel B das antocianinas. Assim, também procurou-se estudar o efeito do ácido gálico, cujas possibilidades de ligações hidrofóbicas seriam maiores em detrimento das possíveis ligações de hidrogênio.

As proporções molares entre as antocianinas, antocianidinas e o copigmento foram baseadas em trabalhos anteriores (Bobbio et al, 1990; Stringheta, 1991) e levaram em conta a possibilidade de estruturas tipo sanduiche do pigmento copigmentado com duas moléculas de copigmento (tanto para o ácido tânico como para o ácido gálico).

De acordo com Stringheta (1991), a complexação pode levar até duas horas, na ausência de luz, para se completar e pode ser evidenciada por um aumento na absorbância (efeito hipercrômico) e/ou um deslocamento no λ_{max} (efeito batocrômico).

Entretanto, no caso da pelargonidina, devido à sua grande instabilidade, foi necessário confirmar a formação do complexo com ácido tânico imediatamente após a mistura dos reagentes. Soluções de delfinidina, pelargonidina, cianidina e seus complexos foram cromatografadas em placa de celulose Avicel, numa adaptação para os complexos do método sugerido por Mullick (1969) para cromatografia simultânea de antocianidinas e antocianinas, usando um dos vários sistemas de solven-

tes sugeridos pelo autor. Os valores de Rf obtidos, resumidos no Quadro 16, mostram que o método de Mullick funcionou de maneira satisfatória também para evidenciar a formação dos complexos das antocianidinas, visto que os valores de Rf para os três complexos foram substancialmente diferentes das antocianidinas livres, evidenciando a formação de novos produtos.

Quadro 16: Valores de Rf das antocianidinas e seus complexos após reação com ácido tânico

Pigmentos	Rf	
	1ª Direção*	2ª Direção**
Delfinidina	18,3	29,4
Complexo delfinidina-ácido tânico	18,0	22,1
Cianidina	38,0	50,0
Complexo cianidina-ácido tânico	41,0	36,0
Pelargonidina	74,0	21,0
Complexo pelargonidina-ácido tânico	71,0	50,0

- * Solvente: FA-HCl 4N (ác. fórmico-ácido clorídrico 4N, 1:1, v/v)
- ** Solvente: MHW (metanol-água-ác. clorídrico conc., 190:10:1, v/v/v)
- * Solvente: FA-HCl 4N (ácido fórmico-ác. clorídrico 4N, 1:1, v/v)
- ** Solvente: MHW (metanol-água-ác. clorídrico conc., 190:10:1, v/v/v)

A adição de ácido tânico às soluções de antocianinas e antocianidinas provocou um efeito batocrômico, o que também indica a formação do complexo. Os deslocamentos do λ_{max} original a pH 1,5 e pH 2,0 para os

complexos de delfinidina, delfinidina 3-rutinosídeo, cianidina, cianidina 3-glicosídeo, pelargonidina e pelargonidina 3-glicosídeo, estão resumidos no Quadro 17. As diferenças ($\Delta\lambda_{max}$) nos valores apresentados a pH 1,5 são maiores do que a pH 2,0 com exceção da delfinidina 3-rutinosídeo. É interessante notar que a pH 1,5 o valor do $\Delta\lambda_{max}$ é decrescente da delfinidina para pelargonidina e crescente para as correspondentes antocianinas, mas a pH 2,0 essa regularidade na variação do $\Delta\lambda_{max}$ não se repete. Aparentemente, a pH 1,5 a complexação das antocianinas é afetada pela presença de substituintes no C-3, além dos grupos -OH do anel B.

Quadro 17: Deslocamentos batocrômicos ($\Delta\lambda_{max}$) apresentados após reação de copigmentação com ácido tânico, a pH 1,5 e a pH 2,0, à temperatura de $20\pm1^{\circ}\text{C}$

Pigmentos complexados	$\Delta\lambda_{max}$	
	pH 1,5	pH 2,0
Delfinidina	10	5
Delfinidina 3-rutinosídeo	5	5
Cianidina	9	7
Cianidina 3-glicosídeo	8	5
Pelargonidina	6	4
Pelargonidina 3-glicosídeo	14	12

Os resultados resumidos no Quadro 18 mostram a grande instabilidade da pelargonidina, a antocianidina monoidroxilada no anel B, em comparação com a cianidina e delfinidina, respectivamente, di- e triidroxilada no anel B, com perda da absorção de aproximadamente 50% após 1

hora de início do experimento, ainda no escuro, a pH 2,0, e apresentando perda total da cor vermelha e da absorção no $\lambda_{\text{máx}}$ após 2 horas, como mostra o exame do seu espectro (Figura 31). Há uma relativa maior estabilidade da pelargonidina a pH 1,5, em relação a pH 2,0, ainda na ausência de luz, perdendo cerca de 20% da absorção inicial após 1 hora, apresentando entretanto ainda alguma cor e absorção após 2 horas como podemos observar na Figura 32.

A copigmentação de pelargonidina com ácido tânico resultou, para os sistemas colocados em ausência de luz, num aumento da meia-vida de 24% e 266%, respectivamente a pH 2,0 e a pH 1,5, sendo possível observar a diminuição dos valores da absorção inicial através dos respectivos espectros nas Figuras 33 e 34 de cerca de 50%, após 2 e 5 horas, respectivamente.

Para o sistema pelargonidina a pH 1,5, sob ação da luz, o ácido tânico mostrou-se eficaz em relação ao sistema sem o copigmento, aumentando a estabilidade de 2 para 5 horas (das quais 3 com luz) (Figuras 35 e 36, respectivamente).

Os dados do Quadro 18 para a cianidina, associados aos espectros cianidina-pH 2,0/luz (Figura 37) e cianidina-pH 2,0/ausência de luz (Figura 38) e curvas de Absorbância versus tempo (Figuras 47 e 48) indicam que embora cianidina tenha resistido mais tempo à luz que a pelargonidina, as perdas na ausência de luz são praticamente iguais às

ocorridas sob ação da luz, sugerindo que ocorra uma degradação ainda na ausência de luz com velocidade maior para a pelargonidina do que a cianidina. Esta última, tanto na luz como a sua ausência, mostrou maior estabilidade a pH 1,5 do que 2,0 como se observa nos espectros cianidina pH 1,5/luz (Figura 39) e cianidina-pH 1,5/ausência de luz (Figura 40). A pH 2,0, na luz e na sua ausência, a mesma absorbância se observa já após 5 horas em comparação às 7 horas do sistema a pH 1,5 como mostram os espectros da cianidina-pH 2,0/luz e cianidina-pH 2,0/ausência de luz (Figuras 37 e 38, respectivamente).

As medidas da absorbância dos sistemas de soluções tamponadas das antocianinas purificadas, suas correspondentes agliconas e seus complexos com ácido tânico foram usadas para construir um gráfico da absorbância versus tempo, calculando-se a constante de velocidade de reação de pseudo 1^ª ordem, e período de meia-vida, resumidos no Quadro 19, e usados como parâmetros para estimar a estabilidade frente à ação da luz, através das relações $k_{\text{luz}}/k_{\text{ausência de luz}}$; do efeito do pH, através das quociente $k_{\text{(pH 1,5)}}/k_{\text{(pH 2,0)}}$; após copigmentação, através da porcentagem de aumento do tempo de meia-vida das antocianinas e antocianidinas complexadas em relação às não complexadas; e da influência do aumento do número de hidroxilas no anel das antocianidinas, pela ordenação decrescente dos seus valores de k .

Quadro 18: Porcentagem de Perda de Absorção no λ_{max} para a delfinidina 3-rutinosídeo, cianidina 3-glicosídeo, pelargonidina 3-glicosídeo (antocianinas) e suas respectivas agliconas (antocianidinas), na luz e em ausência de luz, com e sem adição de ácido tânico (complexo e branco, respectivamente).

Condições de reação	% Perda - Antocianidinas					
	Pelargonidina		Cianidina		Delfinidina	
	Branco	Complexo	Branco	Complexo	Branco	Complexo
pH 2,0/luz	-	-	32,8 ^e	29,8 ^e	44,6 ^j	38,0 ^j
pH 2,0/ausência de luz	43,0 ^a	36,8 ^a	47,6 ^f	34,0 ^f	51,0 ^k	47,4 ^k
pH 1,5/luz	-	28,0 ^d	40,0 ^d	26,0 ^d	54,0 ^l	51,4 ^l
pH 1,5/ausência de luz	19,2 ^a	8,4 ^a	50,6 ^g	33,3 ^g	42,0 ^m	39,3 ^m

Condições de reação	% Perda - Antocianinas					
	Pelargonidina 3-glicosídeo		Cianidina 3-glicosídeo		Delfinidina 3-rutinosídeo	
	Branco	Complexo	Branco	Complexo	Branco	Complexo
pH 2,0/luz	52,0 ^b	17,0 ^b	58,5 ^h	36,0 ^h	39,2 ⁿ	22,5 ⁿ
pH 2,0/ausência de luz	2,9 ^c	2,7 ^c	10,5 ⁱ	4,5 ⁱ	11,3 ^o	1,64 ^o
pH 1,5/luz	19,5 ^b	4,1 ^b	31,5 ^h	9,9 ^h	20,4 ⁿ	13,6 ⁿ
pH 1,5/ausência de luz	3,4 ^c	3,3 ^c	3,4 ⁱ	2,4 ⁱ	3,3 ^m	2,2 ^m

Abreviações:

a) após 1 hora em ausência de luz; b) após 146 horas de exposição à luz; c) após 148 horas de exposição à luz; d) após 3 horas de exposição à luz; e) após 1 hora de exposição à luz; f) após 2 horas em ausência de luz; g) após 5 horas em ausência de luz; h) após 285 horas em ausência de luz; i) após 283 horas de exposição à luz; j) após 17 horas de exposição à luz; k) após 19 horas em ausência de luz; l) após 7 horas de exposição à luz; m) após 7 horas em ausência de luz; n) após 666 horas de exposição à luz; o) após 668 horas em ausência de luz

Quadro 19: Valores das Constantes de Velocidade de reação (k) e de tempo de meia-vida ($t_{1/2}$), para as antocianinas, suas respectivas agliconas, com e sem a presença de luz, com e sem ácido tânico, nas razões molares de 1:2 e 1:3 (antocianina/copigmento), com ácido gálico na razão molar 1:2, a pH 2,0 e a pH 1,5, e em atmosfera inerte

Condições de reação	Antocianidinas						
	$k \times 10^{-4} (hs^{-1})$ e $t_{1/2} \times 10 (hs)$						
	Pelargonidina		Cianidina		Delfinidina		
	Branco	Ácido Tânico razão 1:2	Branco	Ácido Tânico razão 1:2	Branco	Ácido Tânico razão 1:2	Ácido Tânico razão 1:3
pH 2,0/luz	-	-	3975,0	3400,0	490,0	478,0	453,0
pH 2,0/ausência de	-	-	0,17	0,21	1,4	1,45	1,53
	-	-	2900,0	2700,0	477,0	396,0	360,0
	-	-	0,24	0,26	1,45	1,75	1,93
pH 1,5/luz	-	1100,0	1700,0	1000,0	780,0	766,0	679,0
pH 1,5/ausência de	-	0,63	0,41	0,69	0,89	0,9	1,0
	1940,0	1020,0	1160,0	910,0	670,0	620,0	626,0
	0,36	0,68	0,6	0,76	1,03	1,1	1,1

Condições de reação	Antocianinas							
	$k \times 10^{-4} (hs^{-1})$ e $t_{1/2} \times 10 (hs)$							
	Pelargonidina 3-glicosídeo		Cianidina 3-glicosídeo		Delfinidina 3-rutinosídeo			
	Branco	Ácido Tânico razão 1:2	Branco	Ácido Tânico razão 1:2	Branco	Ácido Tânico razão		Ácido Gálico razão 1:2
						1:2	1:3	
pH 2,0/luz	50,0	13,0	30,0	10,0	7,5	4,0	8,2	14,0
pH 2,0/ausência de luz	13,9	53,3	23,1	69,3	92,4	177,7	84,5	49,5
	30,0	2,0	2,0	1,0	1,8	0,3	3,1	7,0
	231,0	345,6	345,6	693,0	385,0	2310,0	228,0	99,0
pH 1,5/luz	20,0	5,0	14,0	4,5	3,4	2,2	4,0	9,6
pH 1,5/ausência de luz	34,6	138,6	49,5	154,0	204,0	315,0	173,2	72,2
	1,7	1,4	1,0	0,6	0,5	0,25	0,68	3,3
	407,0	495,0	693,0	1155,0	1386,0	2772,0	1019,1	210,0

As relações $k_{\text{luz}}/k_{\text{ausência de luz}}$, resumidos no Quadro 20, com quocientes sempre maiores que 1 para todos os sistemas, evidenciam o

forte efeito da luz sobre todos os sistemas estudados com a reação sendo mais veloz a pH 2,0 que a pH 1,5 para as antocianidinas e antocianinas não complexadas, na ordem cianidina > delphinidina; pelargonidinas 3-glicosídeo > cianidina 3-glicosídeo > delphinidina 3-rutinosídeo. Pina et al (1992) acompanharam através de absorção no UV-visível e CLAE, a fotodegradação de soluções de malvidina 3,5-diglicosídeo em soluções aquosas, registrando a formação de produtos de degradação identificados como ácido 3',5'-dimetoxi-4'-hidroxibenzóico e 2,4,6-triidroxibenzaldeído, numa faixa de pH de 1 a 3. Os referidos autores sugeriram que a reação fotoquímica procede através da cisão do cátion flavilium e não através da formação da chalcona obtida nas degradações térmicas. A exposição prolongada e contínua das soluções de cianidina e delphinidina, de pelargonidina 3-glicosídeo, cianidina 3-glicosídeo e delphinidina 3-rutinosídeo resultou ao final de cada experimento, ou seja, após 5, 40, 300, 448 e 668 horas respectivamente, em soluções fracamente coloridas de rosa e vermelho. O exame dos espectros de cianidina-pH 2,0/luz, cianidina-pH 1,5/luz (Figura 37 e 39) de delphinidina-pH 2,0/luz e a pH 1,5/luz (Figuras 41 e 42), de pelargonidina 3-glicosídeo-pH 2,0/luz e a pH 1,5/luz (Figuras 43 e 44), de cianidina 3-glicosídeo-pH 2,0/luz e a pH 1,5/luz (Figuras 45 e 46), revela que de fato não houve o aparecimento de bandas de absorção na região pertencente às chalconas (300-400 nm, segundo Harborne, 1967), as apenas um alargamento da banda a 275 nm no espectro da cianidina, um aumento na absorção e pequeno deslocamento da banda a 275 nm para próximo de 290 nm para a delphinidina, uma dimi-

nuição da absorção no λ_{max} UV (275 nm) para a pelargonidina 3-glicosídeo, alteração essa também encontrada nos espectros da cianidina 3-glicosídeo e delphinidina 3-rutinosídeo. Esses resultados confirmaram os resultados de Pina et al (1992).

Quadro 20: Relações $k_{\text{luz}}/k_{\text{ausência de luz}}$, a pH 2,0 e a pH 1,5, para a pelargonidina 3-glicosídeo, cianidina 3-glicosídeo, delphinidina 3-rutinosídeo, suas agliconas e seus respectivos complexos.

Pigmentos	$k_{\text{luz}}/k_{\text{ausência de luz}}$			
	Branco		Complexo	
	pH 2,0	pH 1,5	pH 2,0	pH 1,5
Pelargonidina	-	-	-	1,08
Cianidina	1,37	1,46	12,6	1,1
Delphinidina	1,1	1,2	1,2	1,3
Pelargonidina 3-glicosídeo	16,6	11,8	6,5	3,6
Cianidina 3-glicosídeo	15,0	14,0	10,0	7,5
Delphinidina 3-rutinosídeo	4,2	6,8	13,3	8,8

Para os complexos, a reação de fotólise foi também favorecida a pH 2,0; com valores de k próximos aos das antocianidinas não complexadas, evidenciando sua instabilidade à luz mesmo após complexação. Para as antocianinas o efeito da complexação resulta em valores de k que são praticamente a metade daqueles obtidos para o sistema sem copigmento, mas aqui a ordem de proteção à luz imposta pelo copigmento se inverte, com a pelargonidina 3-glicosídeo sendo a mais protegida. Nas antocianidinas, ocorre uma rápida e extrema diminuição da absorção inicial da pelargonidina. Note-se que as inclinações obtidas nas

curvas de absorvância versus tempo para os sistemas de pelargonidina com e sem luz (Figuras 47 e 48, respectivamente) são bastante acen- tuadas indicando um valor esperado de k muito alto. Tais valores de k altos não foram encontrados em nenhum dos demais sistemas eviden- ciando a extrema instabilidade da pelargonidina (1 só grupo -OH no anel B).

O Quadro 21 resume as relações $t_{1/2}$ (pH 1,5)/ $t_{1/2}$ (pH 2,0), que per- mitem avaliar os efeitos do pH, na presença e em ausência de luz, com e sem ácido tânico.

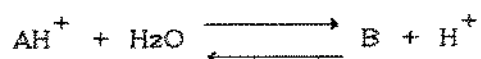
Quadro 21: Relações $t_{1/2}$ (pH 1,5)/ $t_{1/2}$ (pH 2,0), na presença e na au- sência de luz, com e sem ácido tânico para a pelargonidina 3-glicosídeo, cianidina 3-glicosídeo, delfinidina 3-ruti- nosídeo, suas agliconas e seus respectivos complexos.

Pigmentos	$t_{1/2}$ (pH 1,5)/ $t_{1/2}$ (pH 2,0)			
	Branco		Complexo	
	Luz	Ausência de luz	Luz	Ausência de luz
Pelargonidina	-	-	-	-
Cianidina	2,3	2,5	3,4	2,9
Delfinidina	0,63	0,7	0,6	0,6
Pelargonidina 3-glico- sideo	2,1	1,7	2,6	1,4
Cianidina 3-glicosídeo	2,1	2,0	2,2	1,7
Delfinidina 3-rutinosí- deo	2,2	3,6	1,8	1,2

Para as antocianinas todos os quocientes foram maiores que 1, incando que o aumento do pH de 1,5 para 2,0 favoreceu as reações de degrada- ção ocorridas para os sistemas expostos às várias condições.

No nossos experimentos a concentração usada foi em torno de 10^{-3} M, tanto para as antocianinas como para as agliconas. Asen et al (1972), usando concentrações de 5×10^{-5} , 5×10^{-4} e 5×10^{-3} M, encontraram deslocamentos batocrômicos de 0, 6 e 14 nm, respectivamente, sugerindo os referidos autores que o deslocamento batocrômico era influenciado não só pelo pH mas também pela concentração. Os deslocamentos batocrômicos verificados nos experimentos e resumidos no Quadro 17, estão na faixa daqueles encontrados por Asen et al (1972), com o pH 1,5 que pareceu ser, em face dos resultados obtidos, o pH mais favorável para a complexação das antocianinas e antocianidinas mono e di-hidroxiladas.

A pelargonidina, como já discutido anteriormente, apresentava a pH 2,0 uma grande perda de cor possivelmente devido à rápida formação da pseudobase incolor favorecida nesse pH. Entretanto, os dados de porcentagem de aumento do tempo de meia-vida, resumidos no Quadro 22, mostram que não só o pH 1,5 lhe foi mais favorável como a complexação com o ácido tânico causou o maior aumento observado para o tempo de meia-vida relativamente ao da cianidina e delphinidina, indicando que houve uma possível reversão no equilíbrio abaixo



na direção do cátion flavilium, com uma menor formação da pseudobase hemiacetálica incolor. O cromatograma obtido pela CLAE para o sistema pelargonidina-pH 1,5-ácido tânico (Figura 49) confirma a formação do

complexo, com tempo de retenção diferente do tempo de retenção obtido para o sistema pelargonidina não complexada (Figura 49).

Quadro 22: Porcentagem de aumento do tempo de meia-vida $t_{1/2}$ após complexação com ácido tânico

Pigmentos	% de aumento de $t_{1/2}$			
	pH 2,0/ luz	pH 2,0/ ausência de luz	pH 1,5/ luz	pH 1,5/ ausência de luz
Pelargonidina	-	-	-	88,9
Cianidina	17,0	8,3	68,3	26,7
Delfinidina	3,6	20,7	1,6	6,8
Pelargonidina 3-glicosídeo	283,0	49,6	299,0	21,6
Cianidina 3-glicosídeo	200,0	100,0	211,0	66,7
Delfinidina 3-rutinosídeo	92,3	500,0	54,4	100,0

Os tempos de meia-vida para cada sistema, resumidos no Quadro 19, indicaram que a delfinidina 3-rutinosídeo e sua aglicona são a antocianina e antocianidina mais estáveis em relação aos compostos mono e dihidroxilados no anel B. De fato, de acordo com Asen et al (1972), soluções aquosas de delfinidina 3-glicosídeo em pH 3,32 ainda apresentavam apreciável absorbância, provavelmente devido à maior estabilidade de sua espécie quinônica ou anidrobases (A). Poderíamos esperar então que os benefícios decorrentes da reação de copigmentação para os sistemas delfinidina 3-rutinosídeo e delfinidina expostos à luz deveriam ser menores relativamente aos observados para os sistemas pelargonidina 3-glicosídeo, pelargonidina, cianidina 3-glicosídeo e

cianidina, o que está de acordo com o encontrado em nossos experimentos.

Embora tenha sido considerado que a copigmentação poderia ser facilitada pela formação de pontes de hidrogênio (Asen et al, 1972; Williams e Hrazdina, 1979), Goto (1979) propôs que o fenômeno seria devido à formação de uma estrutura intermolecular do tipo empilhamento hidrofóbico dos núcleos aromáticos da antocianina e do copigmento. Esta estrutura seria mantida e estabilizada através de interações dos elétrons π dos anéis aromáticos, e o complexo resultante não se hidrataria; conseqüentemente, a um dado pH, mais íons flavilium estariam presentes. A intensificada eficiência de muitos ésteres do ácido gálico e D-glicose, usados como copigmentos de antocianinas (Mistry et al, 1991; Martin et al, 1992) possivelmente se baseia na sua habilidade de formar uma estrutura em que, entre os C-1 e C-6 da glicose substituída com ácido gálico resultaria uma "abertura" onde a antocianina pode se encaixar (Mistry et al, 1991). As conclusões dos referidos autores baseiam-se no exame dos espectros de RMN do complexo malvidina 3,5-diglicosídeo com β -1,2,3,4,6-pentagalato de D-glicose através dos deslocamentos químicos apresentados, onde verificaram que as mais significativas mudanças no espectro ocorreram para os prótons dos ácidos gálico esterificados na posição 1 e 6 da D-glicose, indicando uma preferência para a complexação da antocianina próxima ou entre esses grupos. Baseados nessas observações, Mistry et al. (1991) sugeriram um modelo de estrutura, com formação

de um complexo antocianina-copigmento 1:1, onde os dois grupos ésteres do ácido gálico situados no C-1 e C-6 da glicose seriam mantidos a uma distância ótima para, através da entrada da antocianina na abertura formada, chegar a uma estrutura do tipo "sanduiche", resultando num empilhamento hidrofóbico das estruturas do pigmento e do copigmento, como ilustrado na Figura 50.

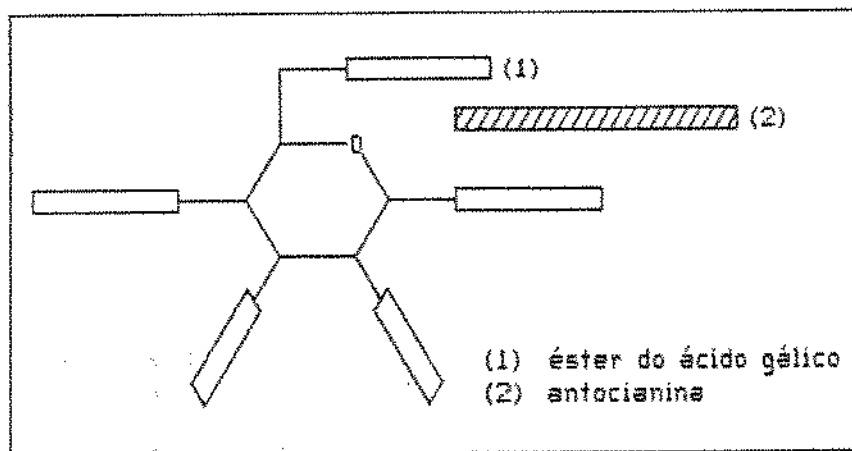


Figura 50: Modelo de estrutura "sanduiche" para a formação de um complexo 1:1 entre a antocianina e o éster β -1,2,3,4,6-pentagalato de D-glicose (Mistry et al, 1991)

A eficiência da copigmentação das antocianinas pelo ácido tânico (um tri-éster do ácido gálico e da D-glicose, Figura 51) poderia ser devida ao fato de sua molécula possuir uma estrutura semelhante àquela proposta por Mistry et al (1991) para o β -1,2,3,4,6-pentagalato de D-glicose e, assim, poderia acomodar entre as moléculas do ácido gálico esterificado, o anel A e/ou B das antocianinas. Em apoio a esta pos-

sibilidade deve ser ressaltado que o ácido gálico (de estrutura apresentada na Figura 51) não ofereceu, nos experimentos de estabilidade estudados, proteção à delfinidina 3-rutinosídeo, como indicam os valores constantes de velocidade de reação (k) e dos tempos de meia-vida, resumidos no Quadro 19 para os sistemas com e sem luz, e a pH 1,5 e pH 2,0. Conclui-se, portanto, que a existência de diversos grupos ésteres de ácido gálico ligados ao açúcar parece ser característica fundamental no tipo de complexação imposto pelo ácido tânico.

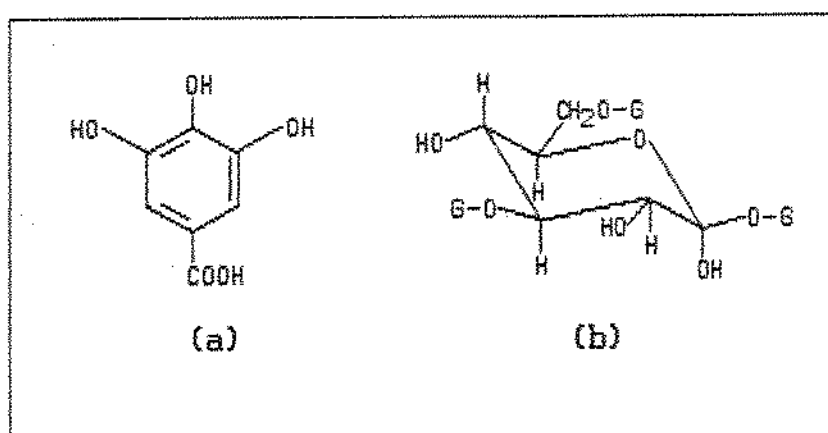


Figura 51: Estruturas dos ácidos gálico (a) e tânico (b)

Os resultados encontrados por diversos autores, indicam que para muitas antocianinas e copigmentos existe uma razão molar ótima entre antocianina/copigmento, na qual interação e estabilidade são maximizadas. Os melhores resultados da complexação foram obtidos entre cianidina 3,5-diglicosídeo e quercitina na razão 1:3 (Asen et al (1972), entre antocianina e glicosídeos de flavonóides na razão 1:6 (Hrazdina, 1981), entre antocianina e ácido clorogénico na razão 1:1

(Mazza e Brouillard, 1990) e entre malvidina 3,5-diglicosídeos e os copigmentos quercitina 3- β -D-galactosídeo, β -1,2,3,4,6-pentagalato de D-glicose e cafeína, nas razões 1:15, 1:25 e 1:240, respectivamente (Mistry et al, 1990). Nos nossos experimentos com ácido tânico foram experimentadas duas razões molares entre antocianina, as respectivas antocianidinas e copigmento: 1:2 e 1:3. Os tempos de meia-vida ($t_{1/2}$) obtidos para a delfinidina complexada com ácido tânico na razão 1:3, resumidos no Quadro 19, mostram um pequeno aumento cerca de 10% em relação aos tempos dos sistemas delfinidina complexada com ácido tânico na razão 1:2 enquanto a delfinidina 3-rutinosídeo apresentou uma diminuição dos tempos de meia-vida, resumidos no Quadro 19, em todos os sistemas estudados, de cerca de 50%, sugerindo que o excesso de ácido foi prejudicial à antocianina.

Tendo em vista os resultados experimentais discutidos, é possível propor um modelo molecular para a estrutura do complexo com ácido tânico considerando a formação do complexo com duas moléculas do ácido. O modelo está representado na Figura 52, onde o anel B da antocianidina ou antocianina se encaixaria entre dois grupos ésteres do ácido gálico da primeira molécula do ácido tânico, localizados no C-1 e C-6 da glicose e, uma segunda molécula do ácido tânico disporia seus grupos ésteres para o encaixe dos anéis A e de pirilium. A literatura não esclarece em qual dos anéis se daria a copigmentação, entretanto, nossos resultados mostram que não só o anel A e o anel de pirilium estariam complexados mas é importante a interação entre os elétrons π

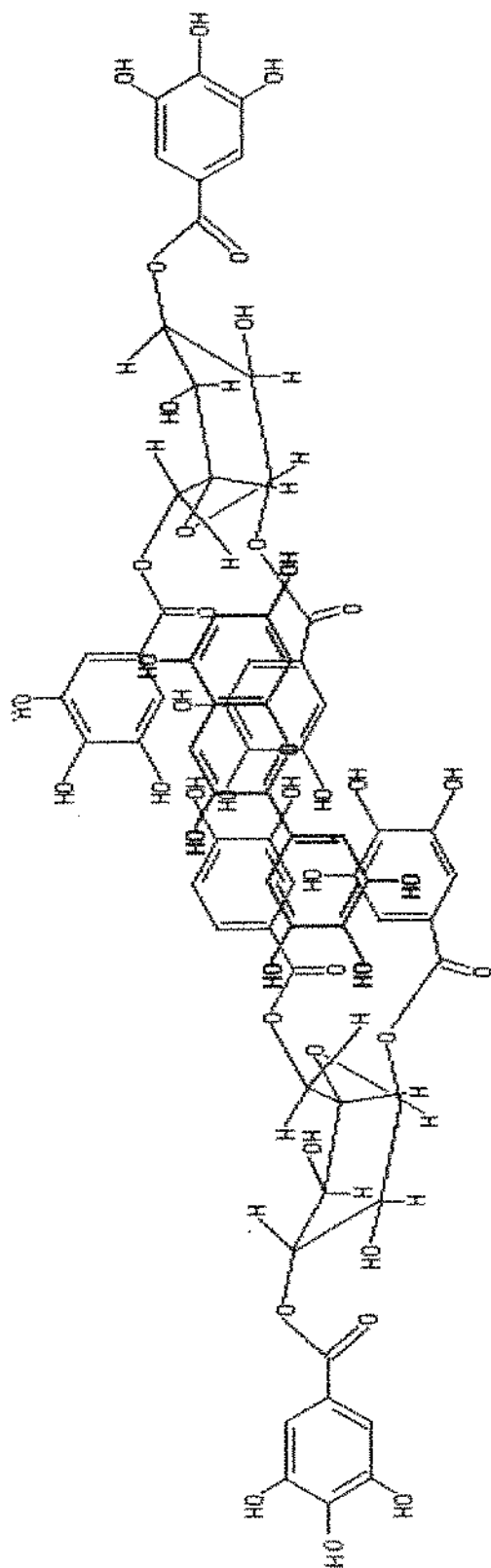


Figura 52: Modelo molecular proposto para a complexação entre antocianidinas, antocianinas e o ácido tânico

do anel B e dos anéis aromáticos do ácido tânico, bem como o número crescente de hidroxilas do anel B, possibilitando a formação de mais pontes de hidrogênio com as hidroxilas do ácido tânico, cujos efeitos adicionados efetivamente protegeriam a posição 2 do anel de pirilium do ataque da água, já que todos os lados passíveis do ataque estariam bloqueados, impedindo ou retardando a adição de H₂O no C-2 com formação da espécie pseudobase incolor (B) e posterior abertura do anel de pirilium com formação da espécie chalcona (C) levando ao esmaecimento da cor.

Pontes de hidrogênio participam da formação do complexo não somente através dos grupos hidroxilas dos vários anéis aromáticos mas também através das hidroxilas do(s) açúcar(es) ligado(s) ao C-3 da aglicona, aumentando ainda mais o grau de complexação. A presença desse(s) açúcar(es) confere às antocianinas tempos de meia-vida substancialmente mais elevados que para as correspondentes antocianidinas. Comparando-se, por exemplo, o tempo de meia-vida da mais instável das antocianidinas, a pelargonidina com o de sua correspondente antocianina, a pelargonidina 3-glicosídeo, ambas não complexadas, o $t_{1/2}$ da primeira não é mensurável a pH 2,0 enquanto que para a última é de 139 e 2310 horas, na presença e em ausência de luz, respectivamente, ou para a cianidina e a correspondente antocianina, cianidina 3-glicosídeo, ambas não complexadas, $t_{1/2}$, a pH 2,0, na presença e em ausência de luz, respectivamente de 1,74 e 2,4 horas para a primeira e 231 e 3456 horas para a última, ou seja, 133 vezes maior na presença de luz e

1440 vezes maior em ausência de luz, confirmando as observações anteriores de Ohta et al (1980) e Iacobucci e Sweeny (1983). Essa considerável diferença na estabilidade das antocianinas em relação à das antocianidinas estaria baseada no efeito protetor conferido pelo reco-brimento da molécula aglicona pela molécula do(s) açúcar(es) (Goto, 1988), o que no entanto não impediria o ataque da água pelo outro lado da molécula. A existência das agliconas como chalconas ou como α -dicetonas no equilíbrio estabelecido após sua hidratação parece uma explicação mais satisfatória, como ilustrado na Figura 53.

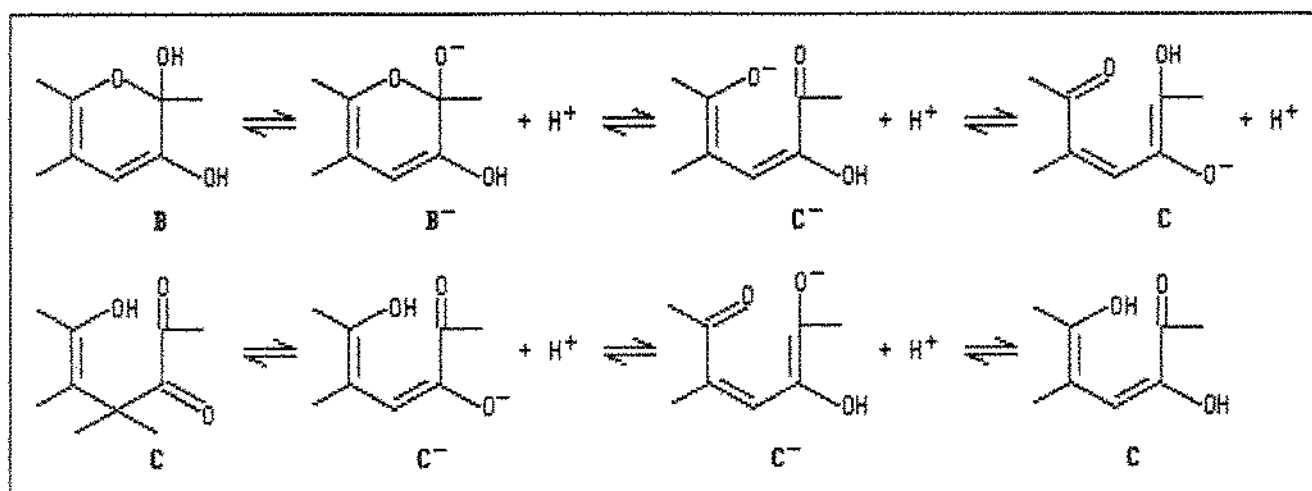


Figura 53: Equilíbrio isomérico anel-cadeia das formas pseudobase (B) e chalcona (C) das antocianidinas

A introdução de um açúcar no C-3 das antocianidinas impossibilita a interconversão da pseudobase (B) em todas as formas chalconas (C) encontradas no equilíbrio das antocianidinas, como na Figura 54. De fato, foi encontrado por Adams (1973) que o equilíbrio, à temperatura ambiente, foi muito mais favorecido para as pseudobases (em contraste

com o equilíbrio das antocianidinas), o que implicaria uma perda de cor para as antocianinas mais lenta do que para as antocianidinas.

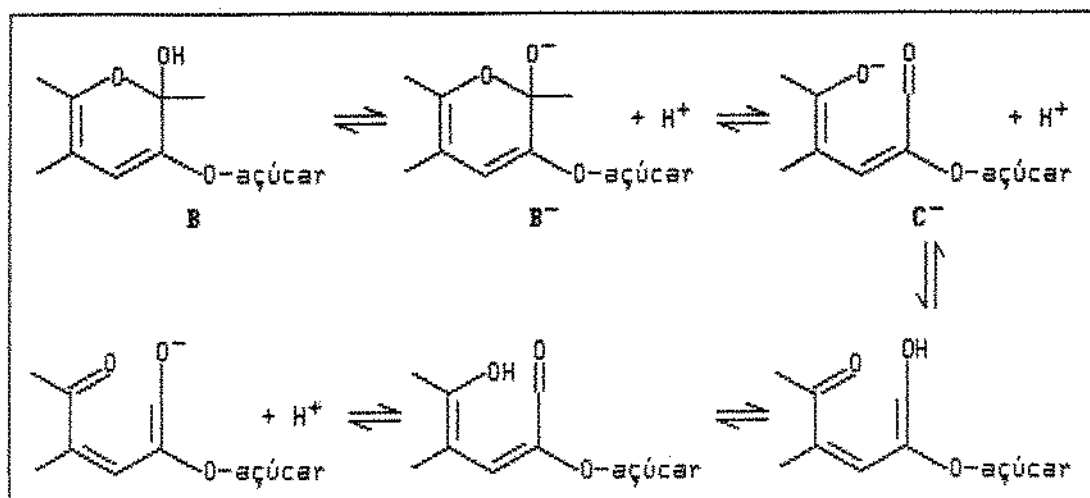


Figura 54: Equilíbrio das formas pseudobase (B) e chalcona (C) das antocianinas

Os valores das constantes de velocidade de reação para as antocianidinas e antocianinas, livres e complexadas, resumidos no Quadro 19, foram colocados em ordem decrescente e as seqüências obtidas resumidas no Quadro 23, mostrando que, em todas as condições de reação que foram expostas as soluções dos pigmentos a estabilidade (em termos de $t_{1/2}$ maiores) aumenta na ordem: pelargonidina, cianidina e delphinidina. Esta ordem contraria as conclusões apresentadas por Ohta e Osajima (1982), que verificaram, a partir de índices de reatividade calculados pelo método dos orbitais moleculares de Hückel (HMO) que a instabilidade de compostos flavilium aumentava com o aumento da hidroxilação no anel B. Entretanto, resultados envolvendo estabilidade frente à luz e/ou a diferentes pHs não são encontrados na literatura para antocianidinas.

Quadro 23: Ordem decrescente e valores das constantes de velocidade de reação (k) para as antocianinas e antocianidinas, com e sem adição de ácido tânico

Condições de Reação	Ordens e Valores de k	
	Antocianina	Antocianina + Ác. Tânico
pH 2,0/ luz	pel. 3-gli (k=50,0) > cian. 3-gli. (k=30,0) > delf. 3-rut. (k=7,5)	pel.3-gli (k=13,0) > cian. 3-gli. (k=10,0) > delf. 3-rut. (k=4,0)
pH 2,0/ ausência de luz	pel. 3-gli (k=3,0) > cian. 3-gli. (k=2,0) > delf. 3-rut. (k=1,8)	pel. 3-gli (k=2,0) > cian. 3-gli. (k=1,0) > delf. 3-rut. (k=0,3)
pH 1,5/ luz	pel. 3-gli (k=20,0) > cian. 3-gli. (k=14,0) > delf. 3-rut. (k=3,4)	pel.3-gli (k=5,0) > cian. 3-gli. (k=4,5) > delf. 3-rut. (k=2,2)
pH 1,5/ ausência de luz	pel. 3-gli (k=1,7) > cian. 3-gli. (k=1,0) > delf. 3-rut. (k=0,5)	pel. 3-gli (k=1,4) > cian. 3-gli. (k=0,6) > delf. 3-rut. (k=0,25)

Condições de Reação	Ordens e Valores de k	
	Antocianidina	Antocianidina + Ác. Tânico
pH 2,0/ luz	cian. (k=3975,0) > delf. (k=490,0)	cian. (k=3400,0) > delf. (k=478,0)
pH 2,0/ ausência de luz	cian. (k=2900,0) > delf. (k=477,0)	cian. (k=2700,0) > delf. (k=396,0)
pH 1,5/ luz	cian. (k=1700,0) > delf. (k=780,0)	pel. (k=1100,0) > cian. (k=1000,0) > delf. (k=766,0)
pH 1,5/ ausência de luz	pel. (k=1940,0) > cian. (k=1160,0) > delf. (k=670,0)	pel. (k=1020,0) > cian. (k=910,0) > delf. (k=620,0)

pel. = pelargonidina; pel. 3-gli. = pelargonidina 3-glicosídeo;
cian. = cianidina; cian. 3-gli. = cianidina 3-glicosídeo;
delf. = delfinidina; delf. 3-rut. = delfinidina 3-rutinosídeo.

5. CONCLUSÕES

A extração com metanol e ácido cítrico em lugar de ácido clorídrico juntamente com a concentração por osmose reversa a baixas temperaturas permitiram a obtenção das antocianinas, evitando a possibilidade da degradação de possíveis ácidos presentes na molécula.

A cromatografia em papel mostrou-se mais eficiente do que a cromatografia líquida de alta eficiência no caso das antocianinas da berinjela e amora. No caso do morango, a CLAE permitiu uma melhor separação das antocianinas dessa fruta.

As frações principais purificadas dos extratos de berinjela, amora e morango de polpa branca foram identificadas como delphinidina 3-rutinosídeo, cianidina 3-glicosídeo e pelargonidina 3-glicosídeo, respectivamente. Em morangos de polpa colorida a principal antocianina é uma cianidina 3-glicosídeo.

Ácido tânico forma complexos com as antocianinas e antocianidinas, tanto a pH 2,0 como a pH 1,5, apresentando maiores deslocamentos a pH 1,5. Pela cromatografia em placa de celulose foi possível confirmar a formação dos complexos das antocianidinas.

O fator mais destrutivo, tanto para antocianinas como para antocianidinas, foi a luz, principalmente quando a pH 2,0.

A pelargonidina foi a antocianidina mais instável, mesmo em ausência de luz, enquanto a delphinidina foi a mais estável, de acordo com seus respectivos tempos de meia-vida.

Maior estabilidade, tanto para a pelargonidina quanto para a cianidina, foi alcançada quando de suas complexações com ácido tânico a pH 1,5 e em ausência de luz.

Mesmo na ausência de luz e nos dois pHs usados houve perda da absorção para as três antocianinas por um mecanismo não esclarecido.

A estabilidade, em termos decrescentes de tempo de meia-vida, das antocianidinas e antocianinas está diretamente relacionada ao número decrescente de grupos -OH substituídos no anel B. A ordem estabelecida foi: delphinidina > cianidina > pelargonidina, para as antocianidinas, e delphinidina 3-rutinosídeo > cianidina 3-glicosídeo > pelargonidina 3-glicosídeo, para as antocianinas.

Máximos tempos de meia-vida foram observados quando a concentração de ácido tânico foi de 2 mols. O aumento da concentração de 2 para 3 mols de ácido tânico, assim como a complexação com ácido gálico na concentração de 2 mols, não resultaram em maior estabilidade da delphinidina 3-rutinosídeo.

A adição de ácido gálico não resultou num efeito protetor enquanto

ácido tânico resultou numa considerável estabilidade, já que a sua estrutura favorece o modelo de estrutura tipo empilhamento vertical favorecido pelo maior número de interações hidrofóbicas entre os seus vários anéis aromáticos e os do pigmento.

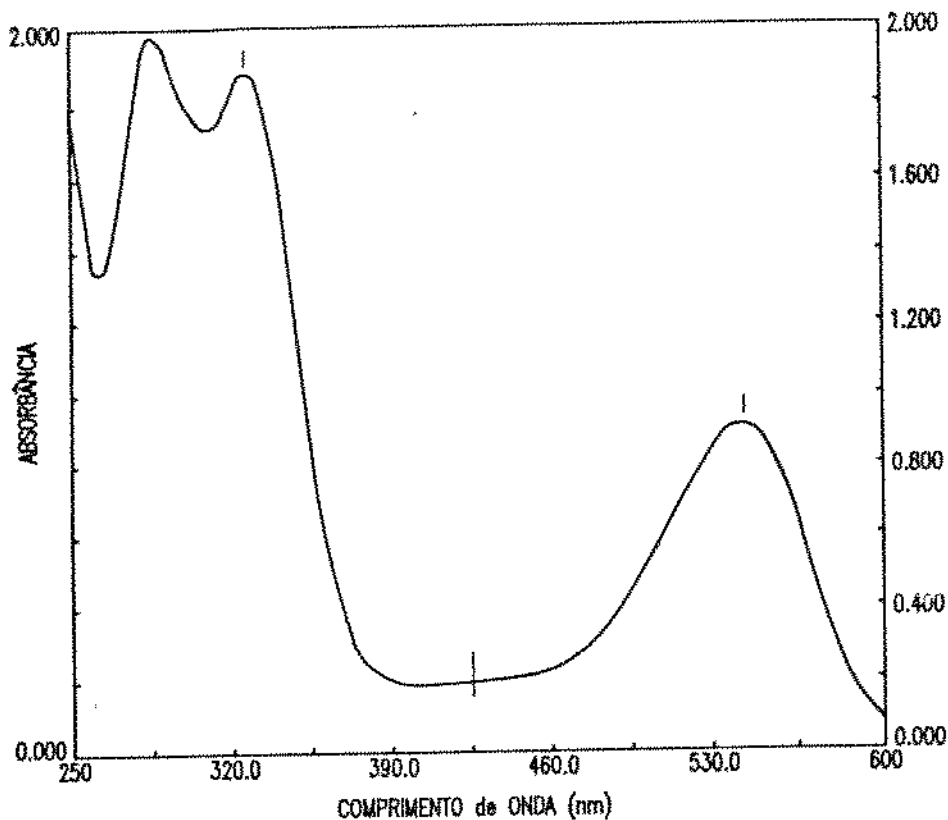


Figura 14: Espectro de absorção UV-visível do extrato bruto da berinjela, em MeOH-HCl 0,01%

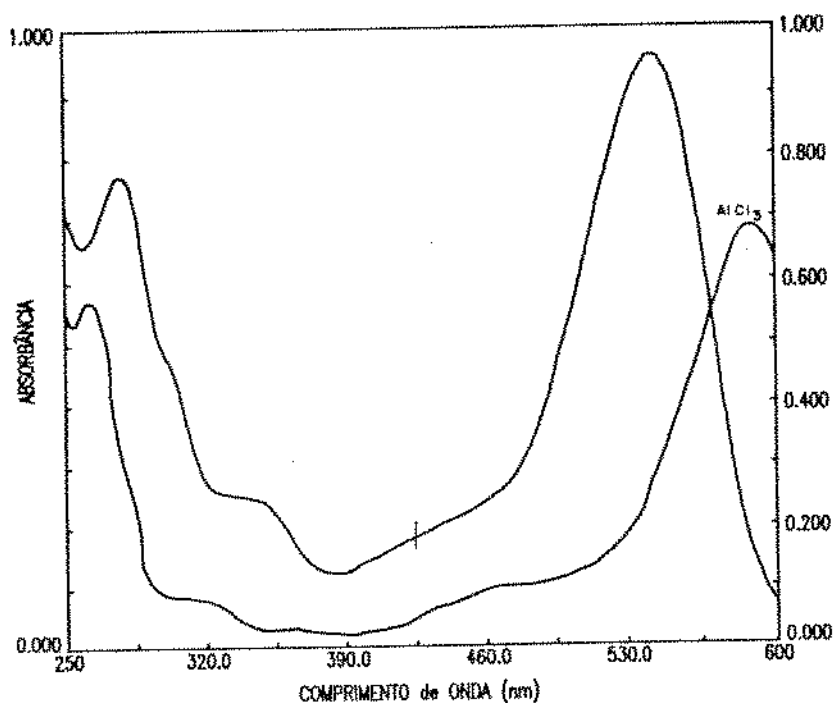


Figura 15: Espectro de absorção UV-visível da zona F-BER, e após reação com AlCl_3 , em MeOH-HCl 0,01%

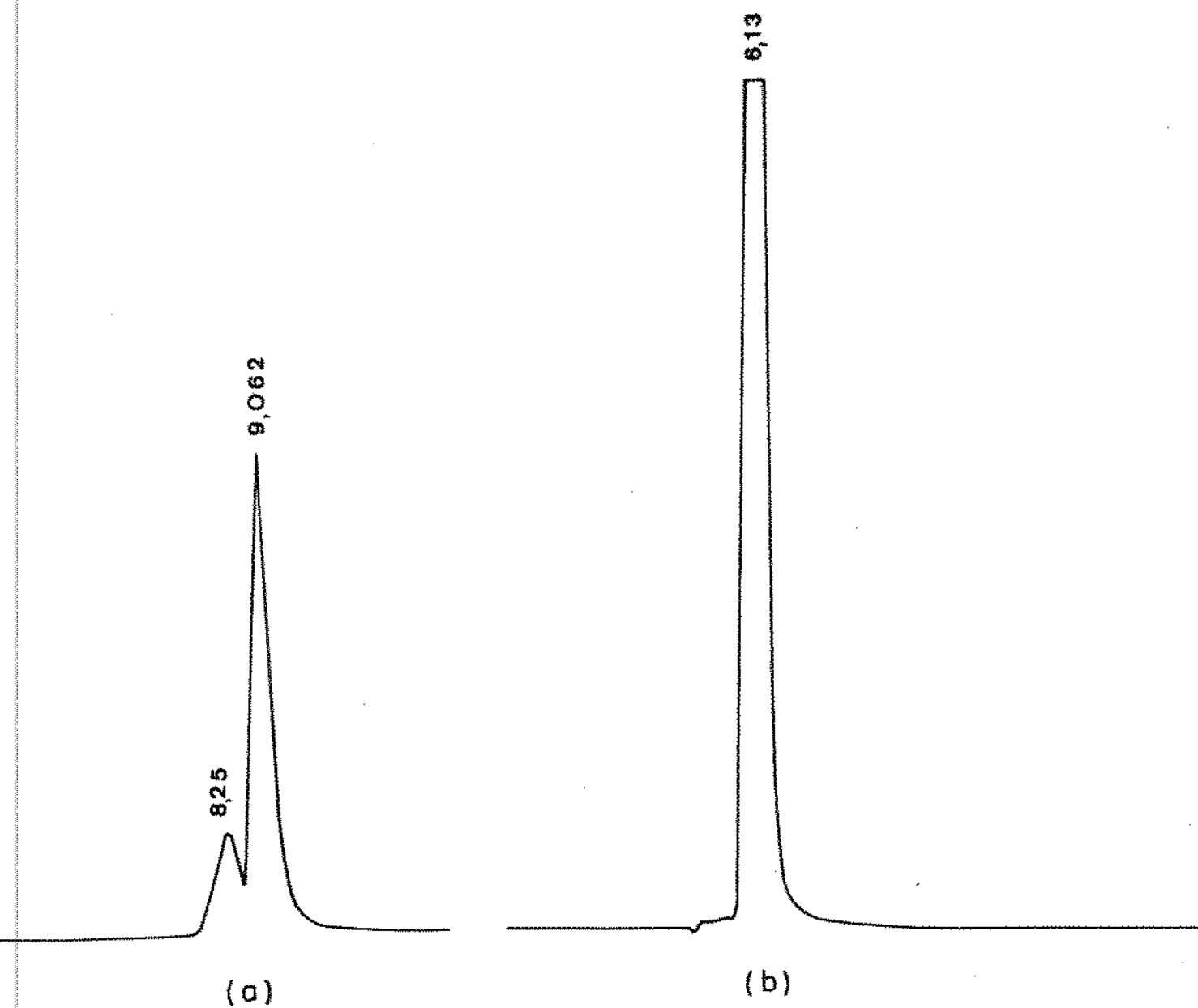


Figura 16: Cromatogramas obtidos por CLAE do extrato bruto (a) e da zona 1 (b) da berinjela

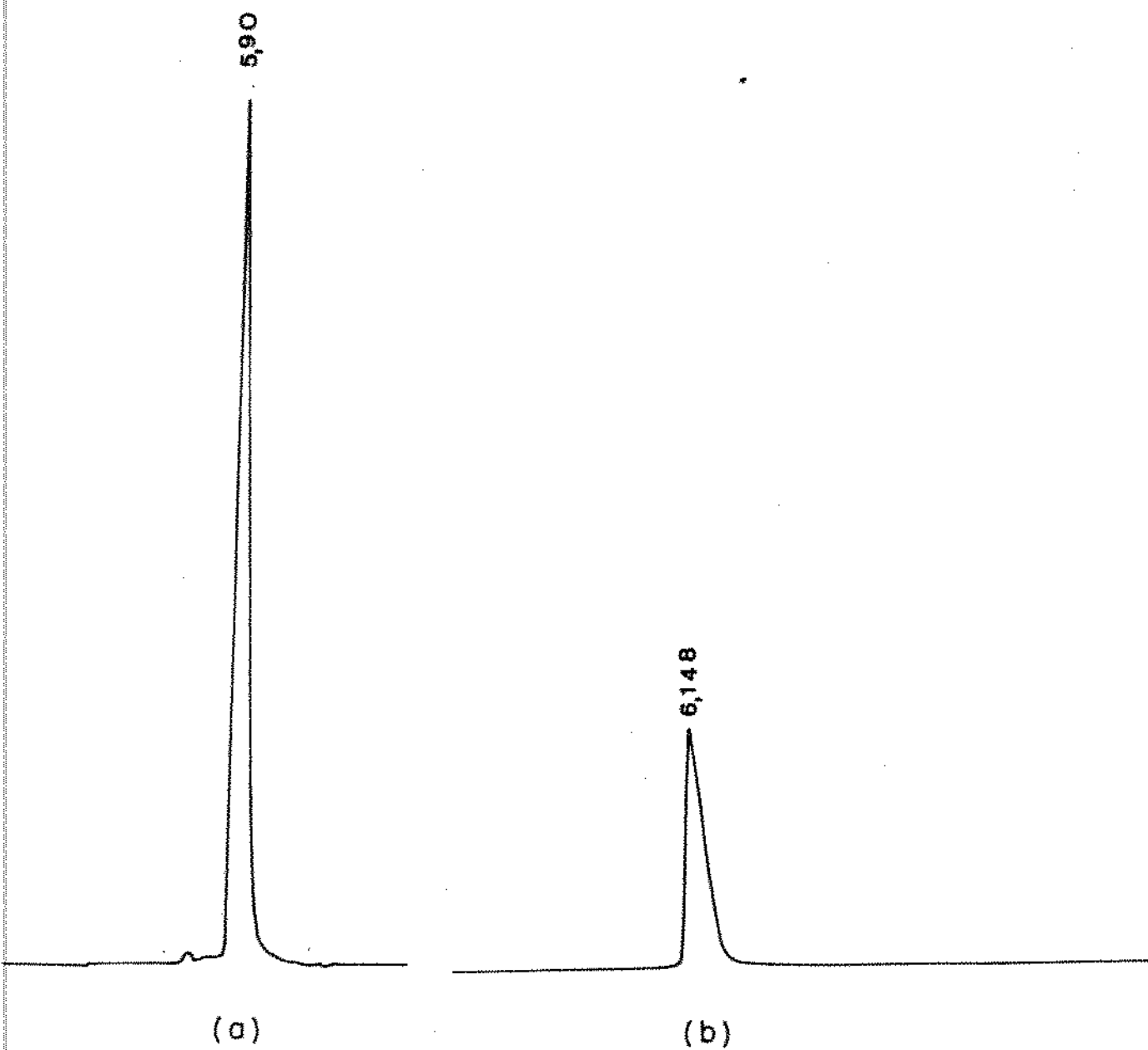


Figura 17: Cromatogramas obtidos por CLAE da zona 1.3 (a) e da zona 1.3.2 (F-BER) da berinjela

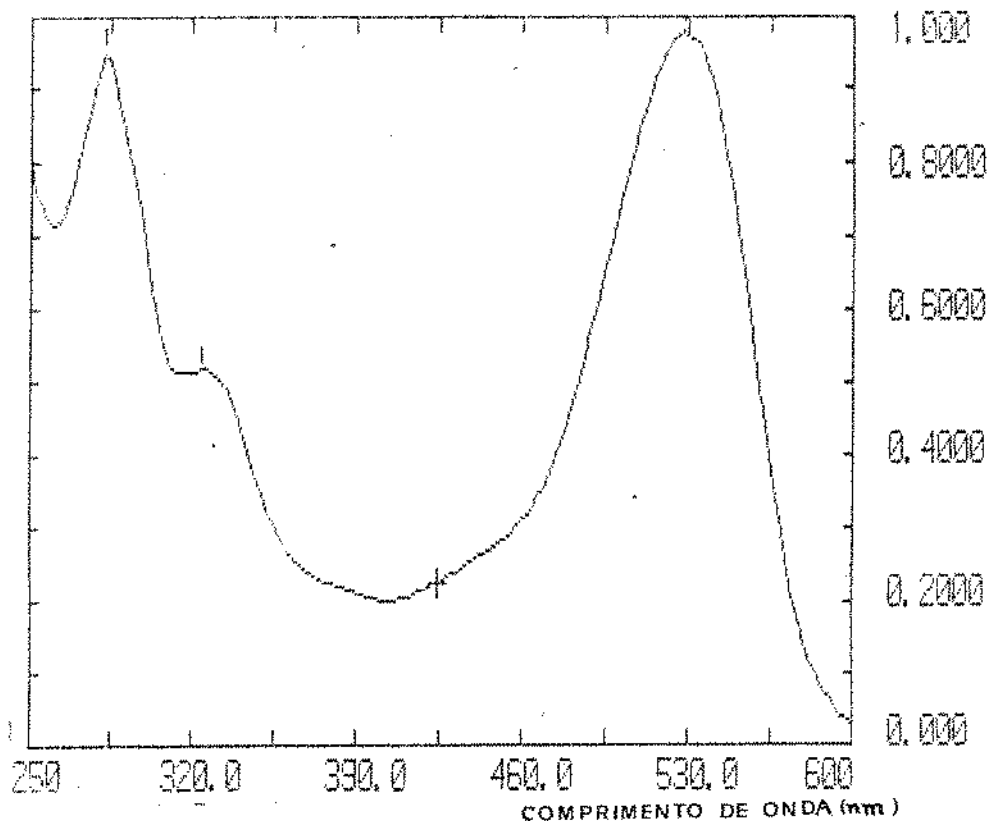


Figura 21: Espectro de absorção UV-visível do extrato bruto da amora, em MeOH-HCl 0,01%

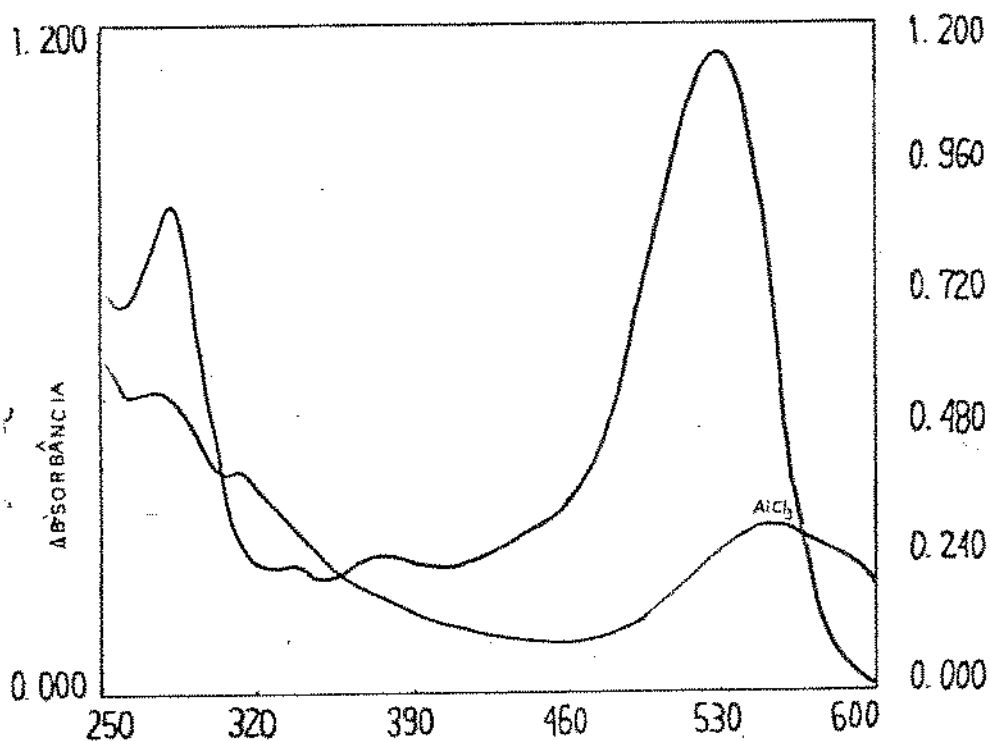


Figura 22: Espectro de absorção UV-visível da zona 1.1.1 (F-AMORA) e após reação com $AlCl_3$, em MeOH-HCl 0,01%

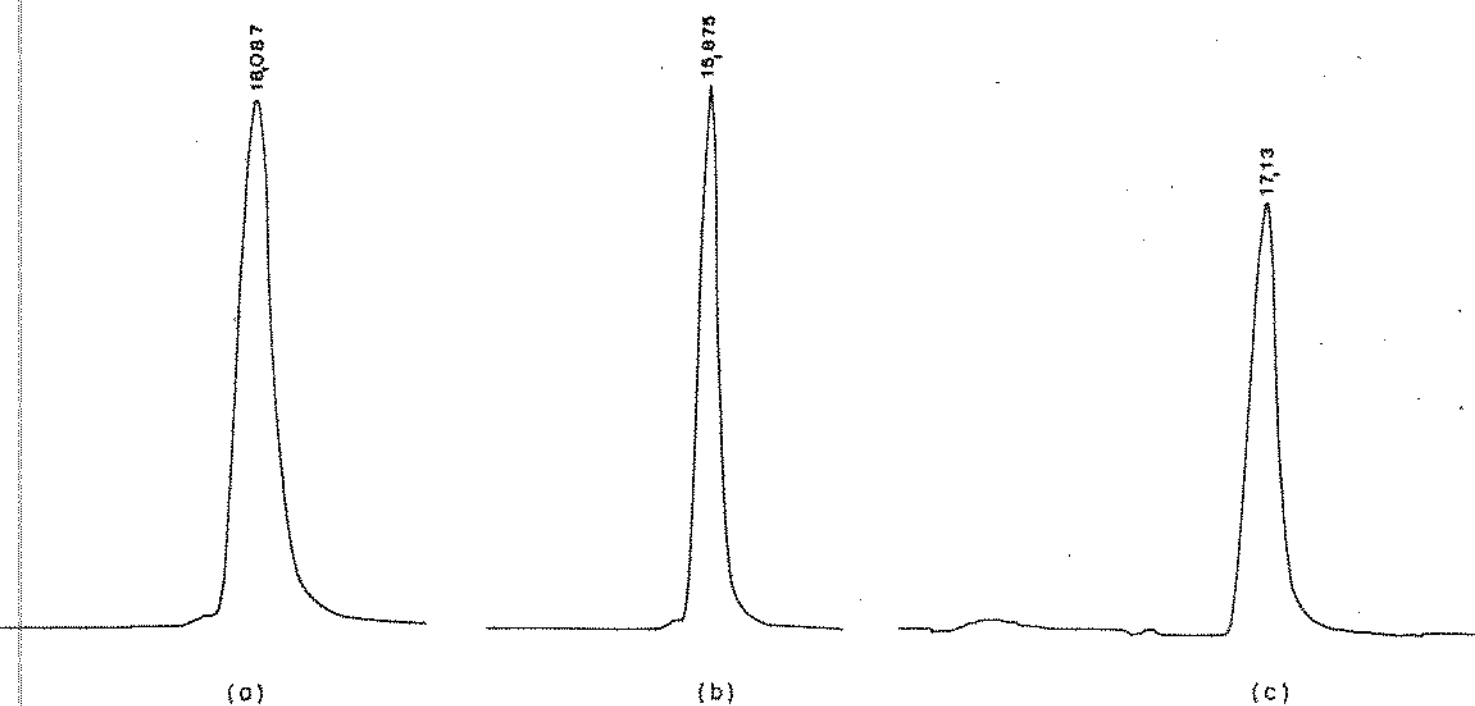


Figura 23: Cromatogramas obtidos por CLAE das zonas 1 (a), 1.1 (b) e 1.1.1 (F-AMORA) da amora (c)

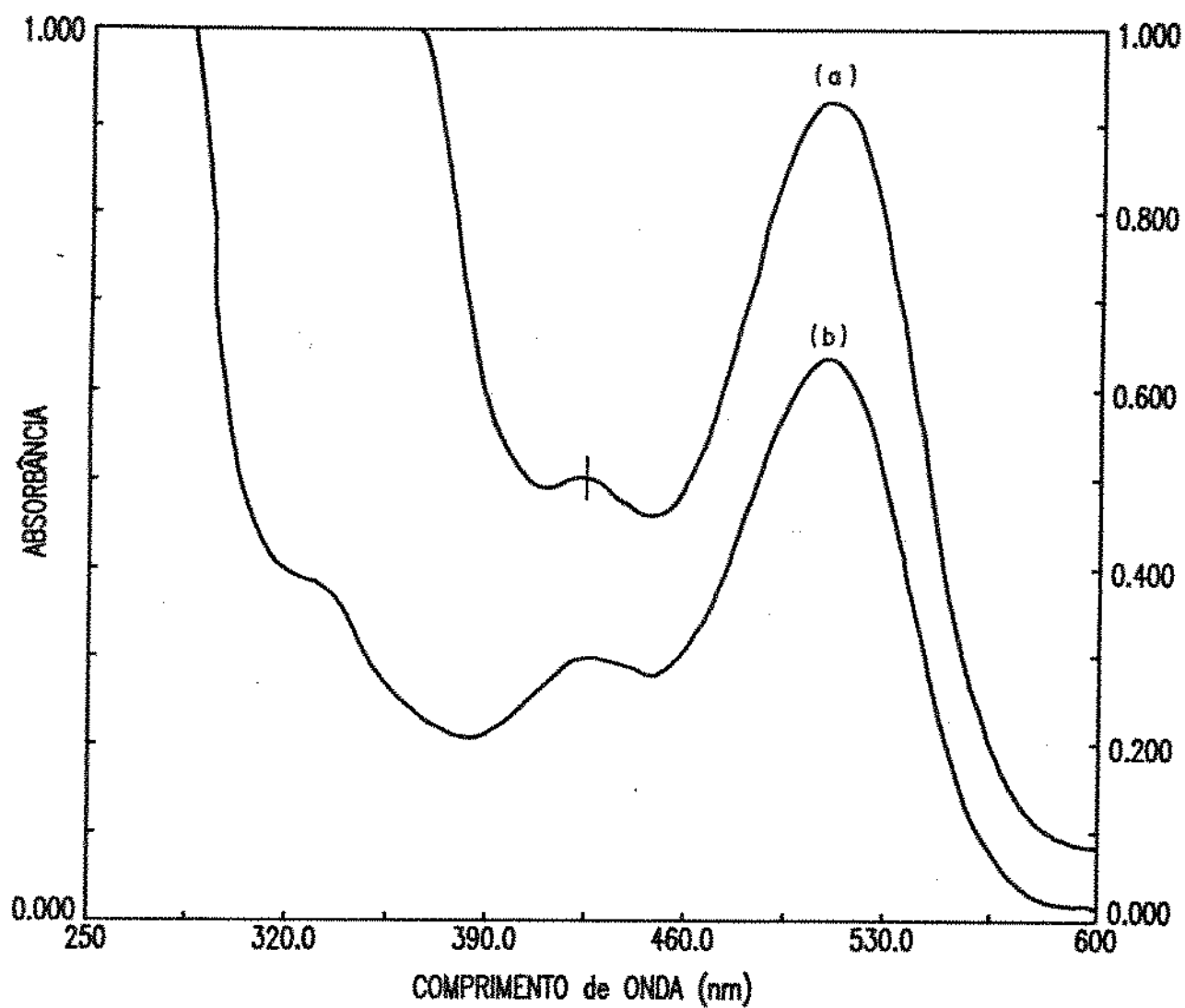


Figura 27: Espectros de absorção UV-visível do extrato bruto do morango (a) e da zona 1(b), em MeOH-HCl 0,01%

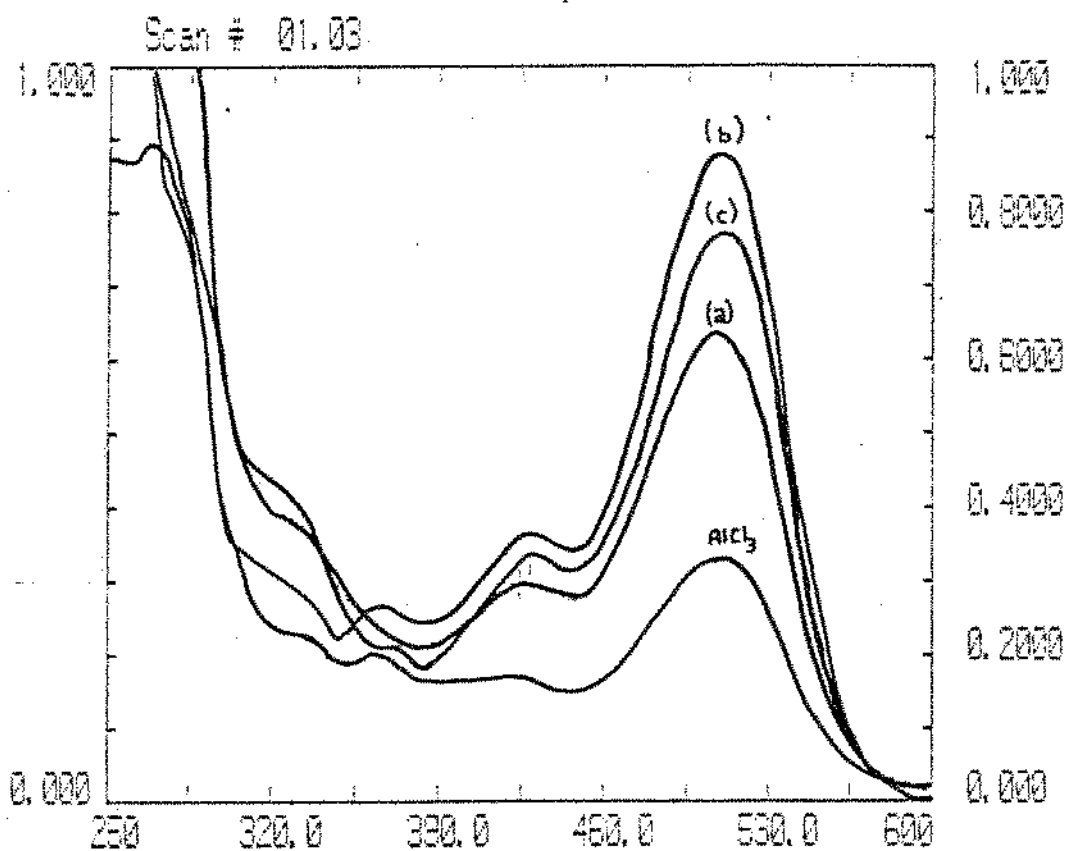


Figura 28: Espectros de absorção UV-visível da zona 1.1 (a) e da zona 1.1.1 (F-MOR) (b), e após reação com AlCl_3 (c), em MeOH-HCl 0,01%

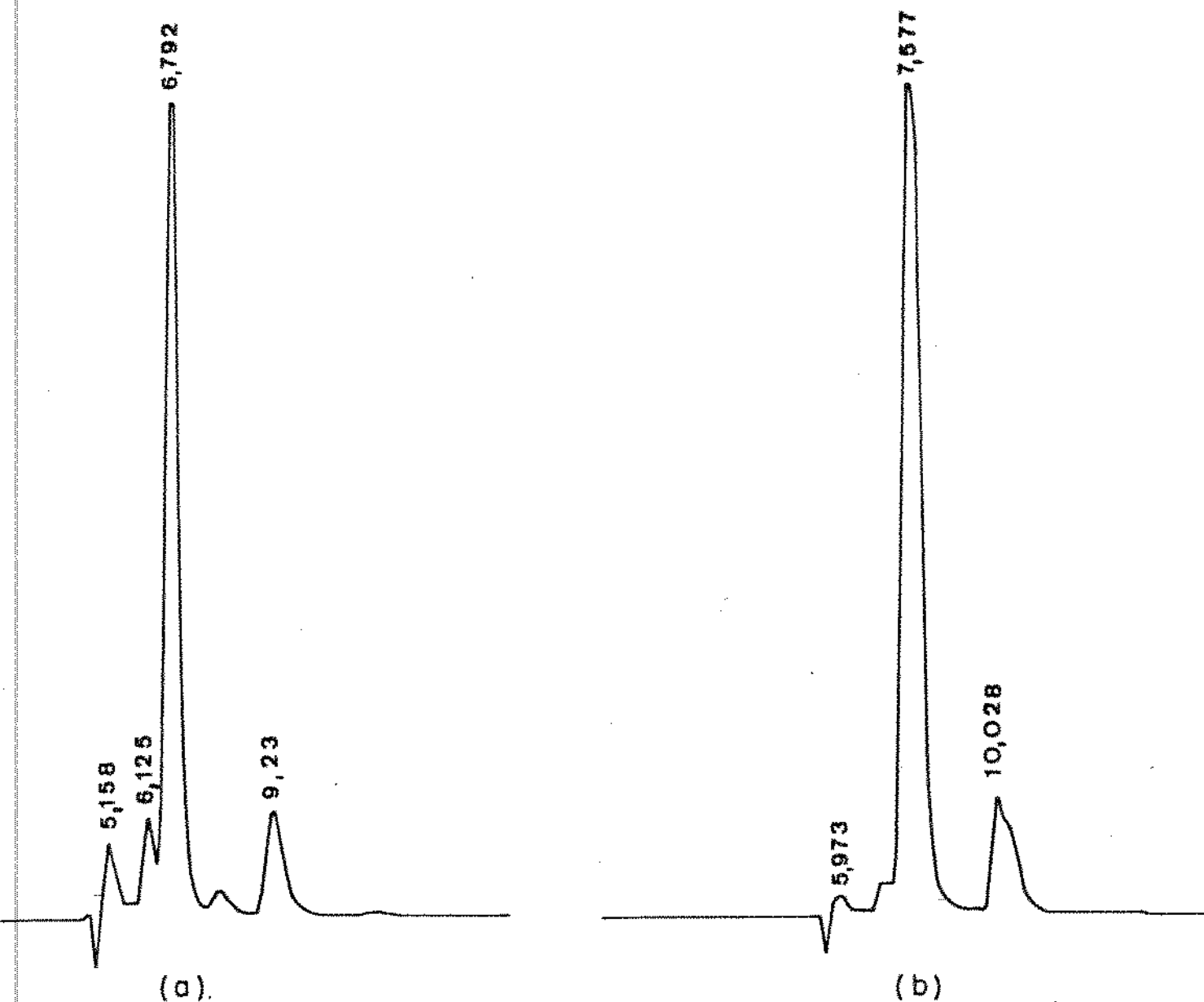


Figura 29: Cromatogramas obtidos por CLAE do extrato bruto (a) e da zona 1 (b) do morango

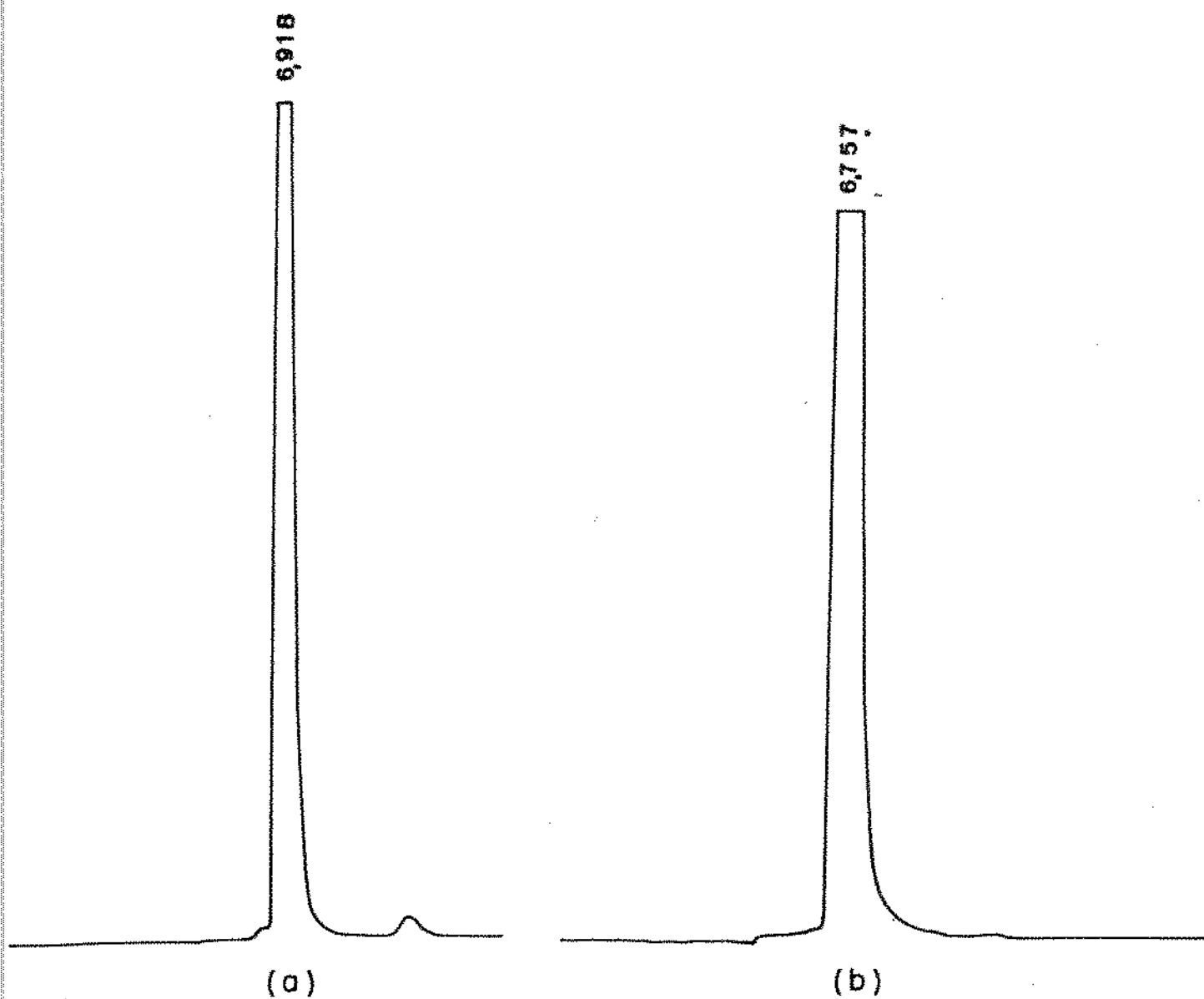


Figura 30: Cromatogramas obtidos por CLAE da zona 1.1 (a) e zona 1.1.1 (F-MOR) (b) do morango

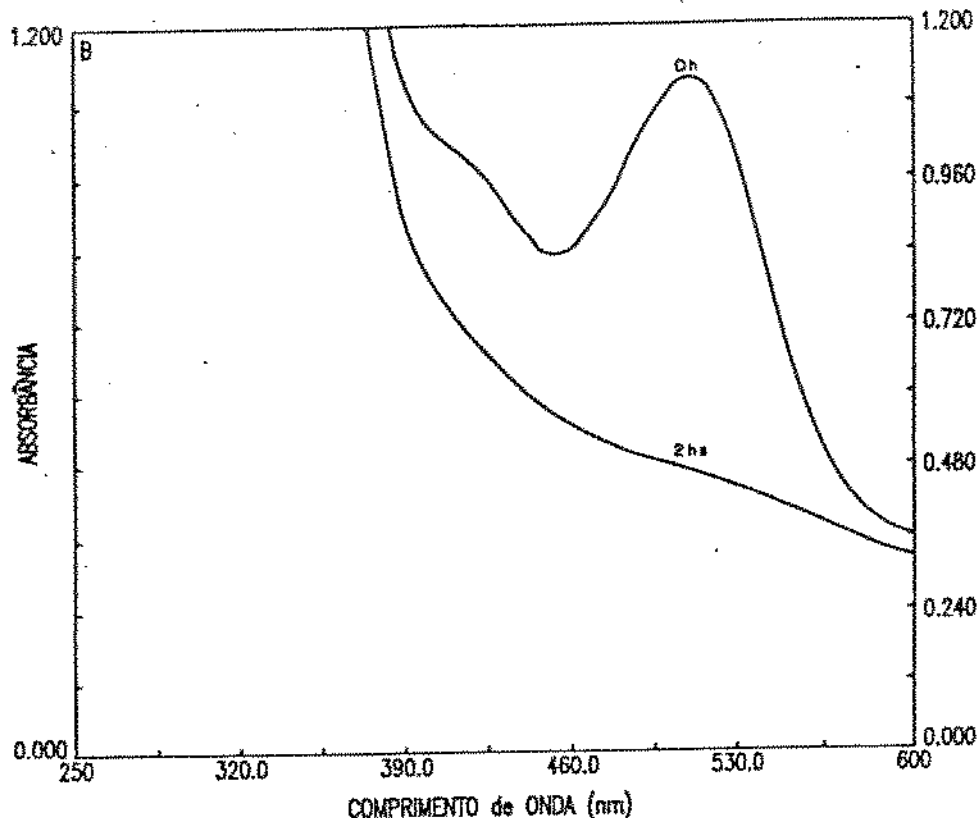


Figura 31: Espectro de absorção UV-visível da solução de pelargonidina, a pH 2,0, em ausência de luz e sem adição de ácido tânico

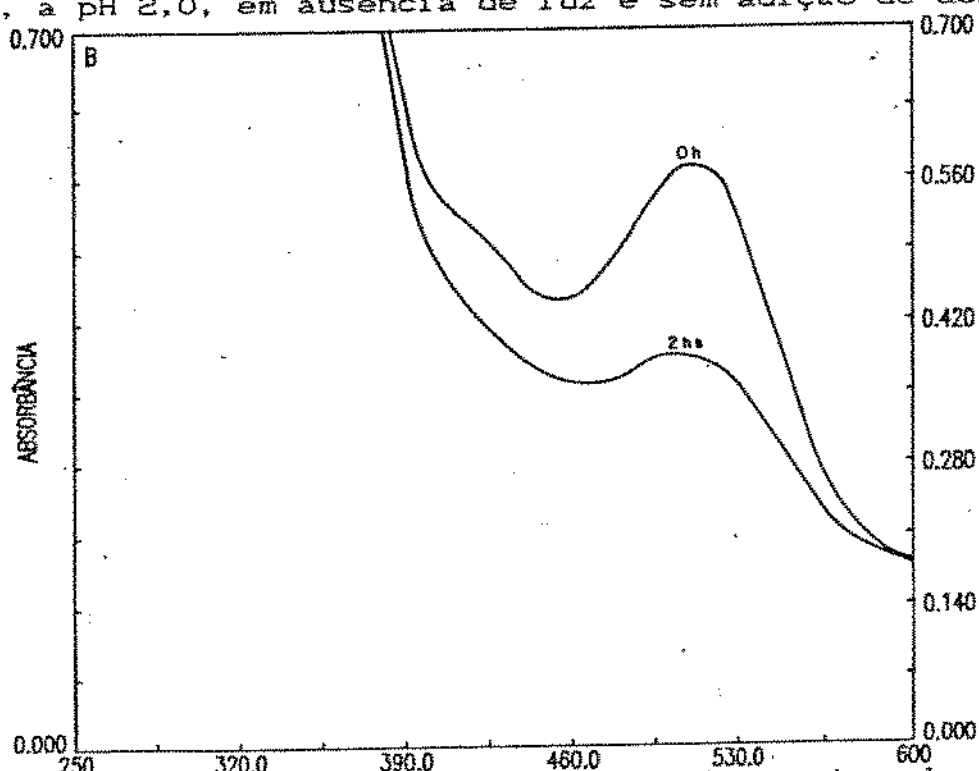


Figura 32: Espectro de absorção UV-visível da solução de pelargonidina, a pH 1,5, em ausência de luz e sem adição de ácido tânico

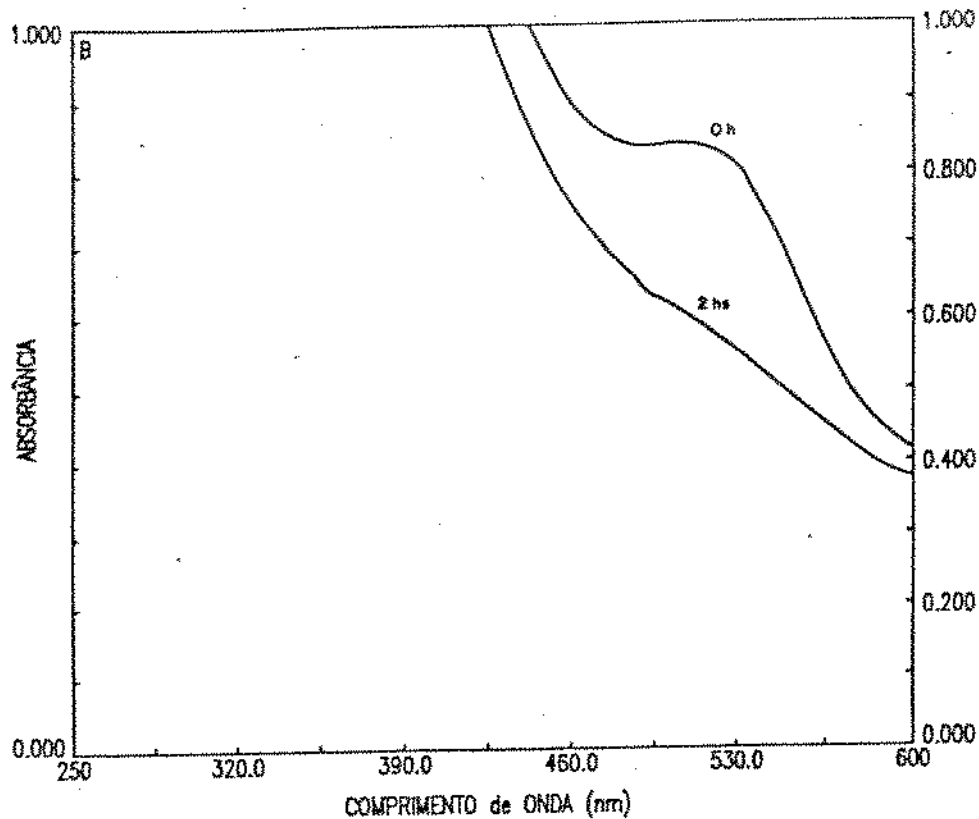


Figura 33: Espectro de absorção UV-visível da solução de pelargonidinidina, a pH 2,0, em ausência de luz e com adição de ácido tânico

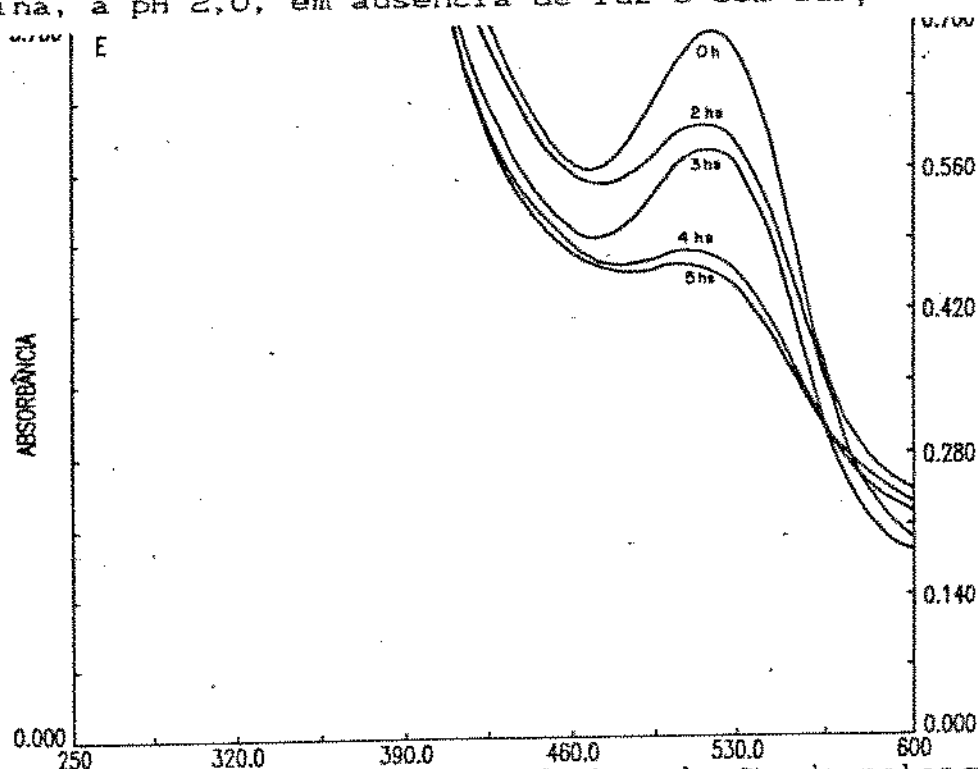


Figura 34: Espectro de absorção UV-visível da solução de pelargonidinidina, a pH 1,5, em ausência de luz e com adição de ácido tânico

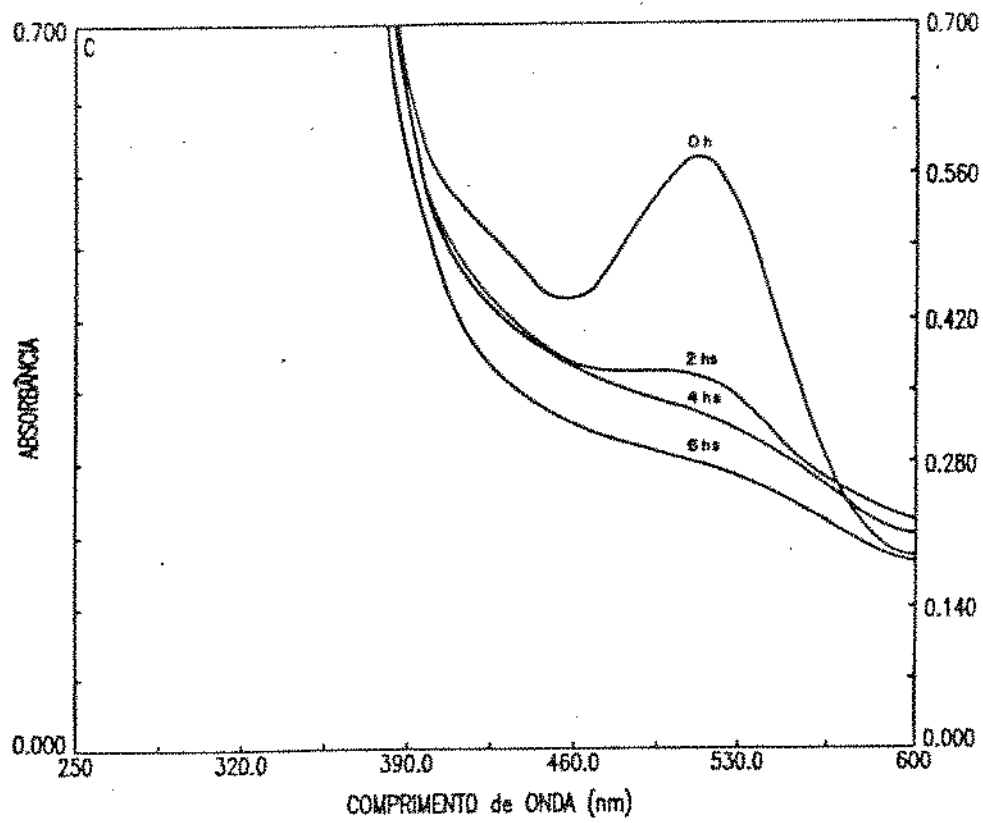


Figura 35: Espectro de absorção UV-visível da solução de pelargonidinidina, a pH 1,5, sob ação da luz e com adição de ácido tânico

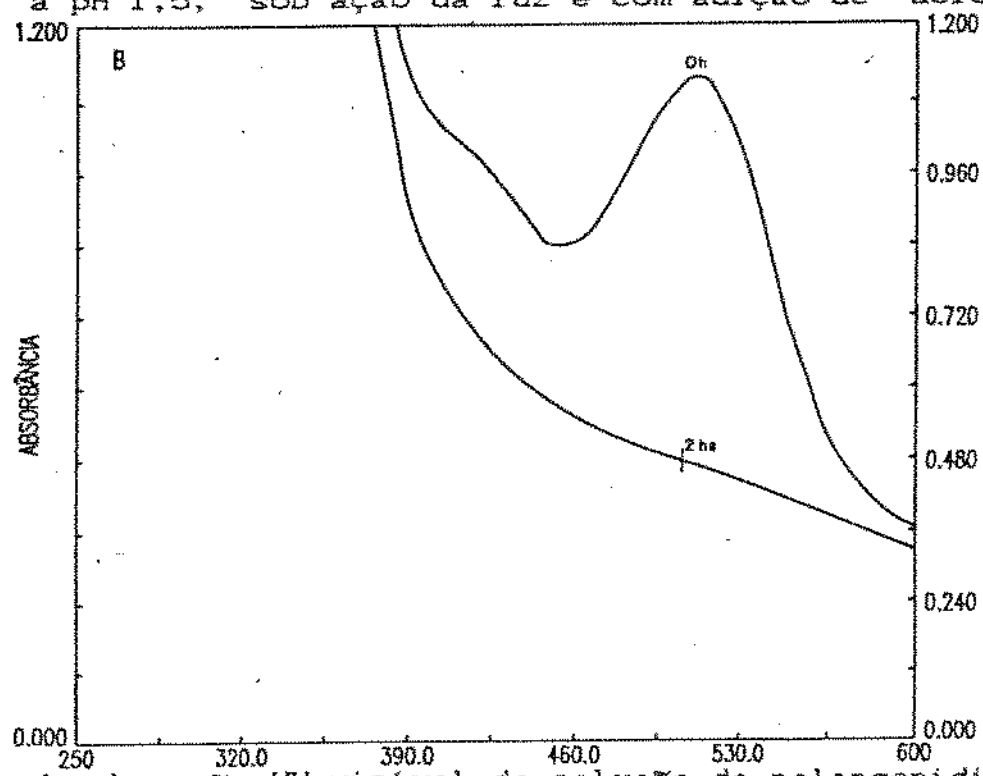


Figura 36: Espectro de absorção UV-visível de solução de pelargonididina, a pH 2,0, sob ação da luz e sem adição de ácido tânico

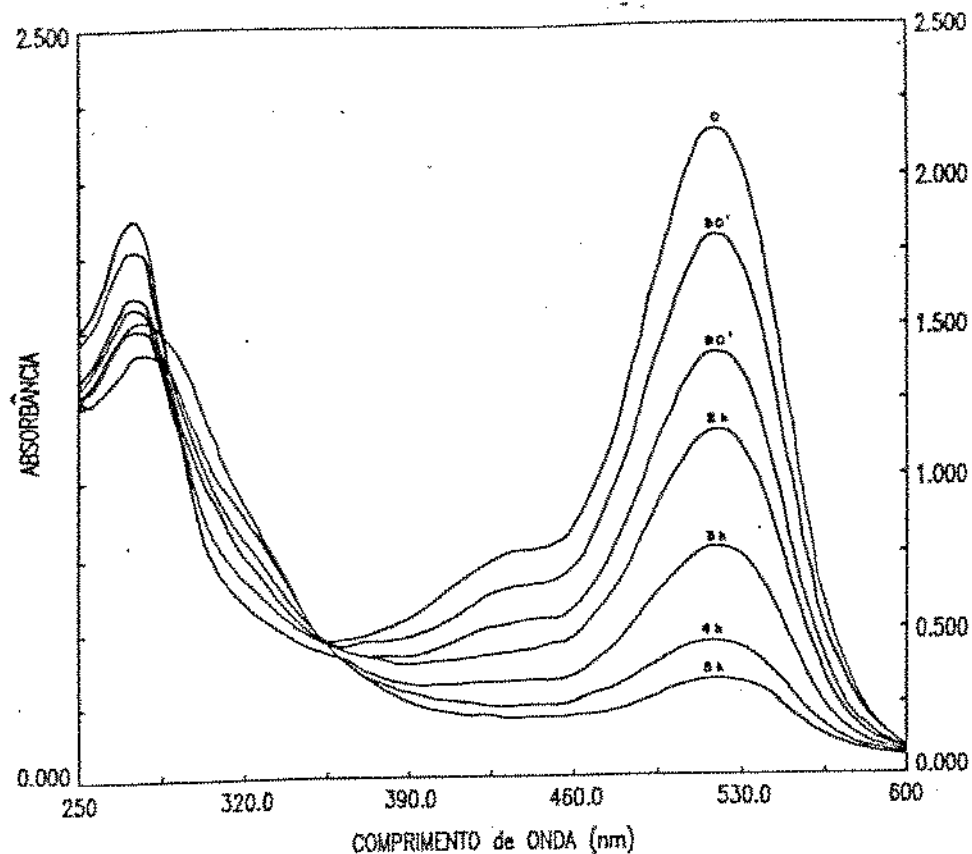


Figura 37: Espectro de absorção UV-visível da solução de cianidina, a pH 2,0, sob ação da luz e sem adição de ácido tânico

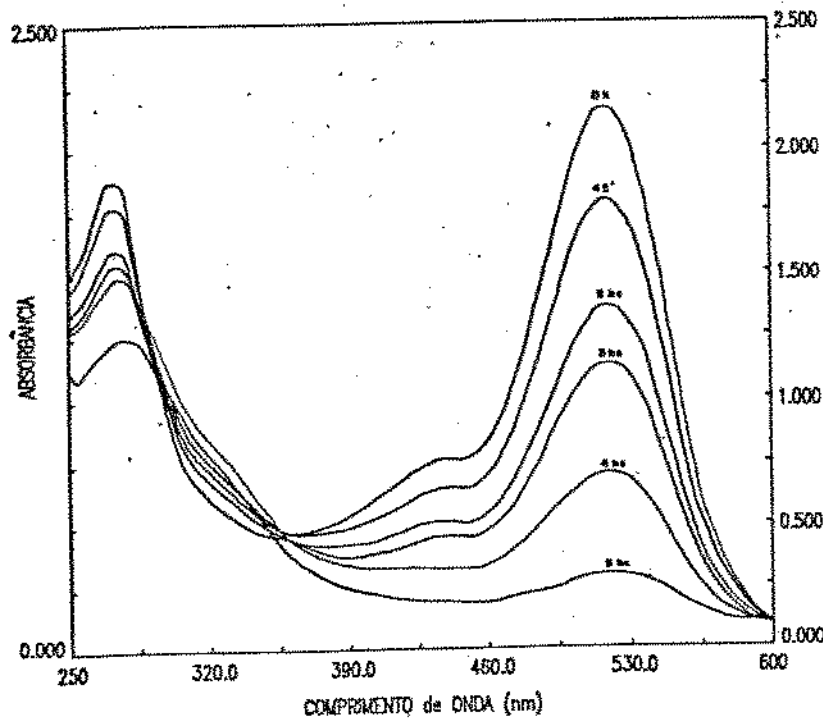


Figura 38: Espectro de absorção UV-visível da solução de cianidina, a pH 2,0, em ausência de luz e sem adição de ácido tânico

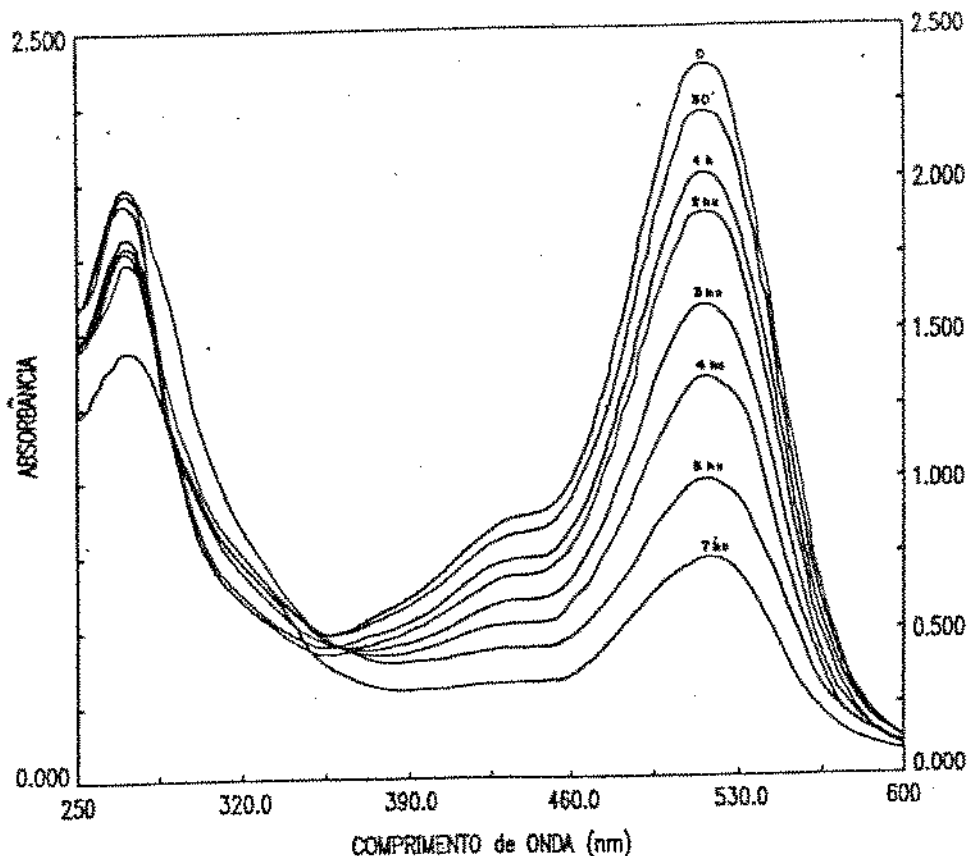


Figura 39: Espectro de absorção UV-visível da solução de cianidina, a pH 1,5, sob ação da luz e sem adição de ácido tânico

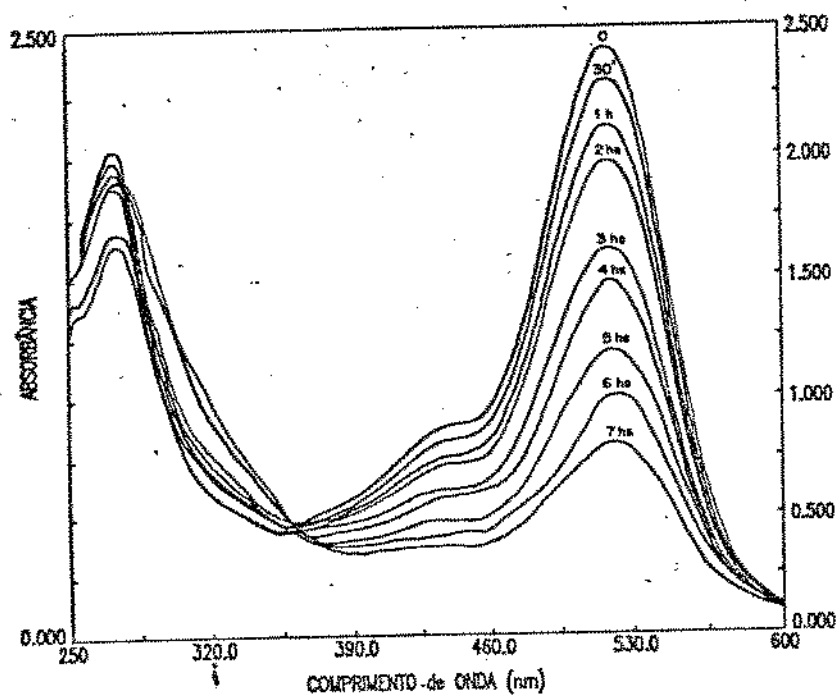


Figura 40: Espectro de absorção UV-visível da solução de cianidina, a pH 1,5, em ausência de luz e sem adição de ácido tânico

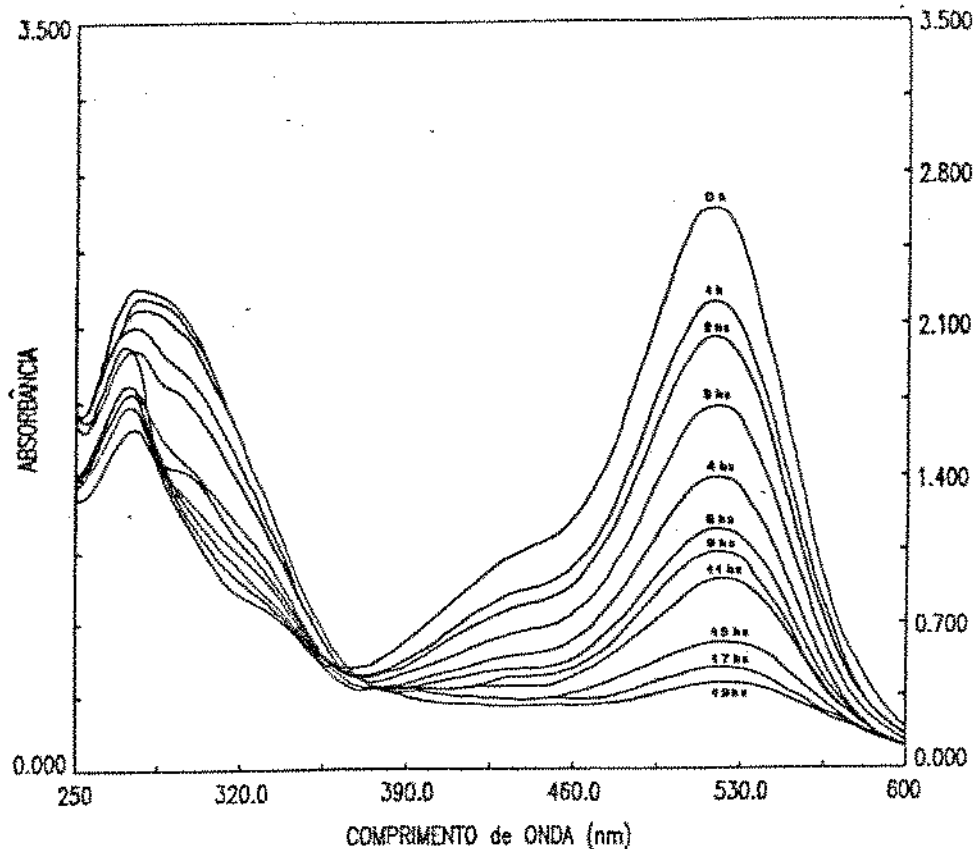


Figura 41: Espectro de absorção UV-visível da solução de delphinidina, a pH 2,0, sob ação da luz e sem adição de ácido tânico

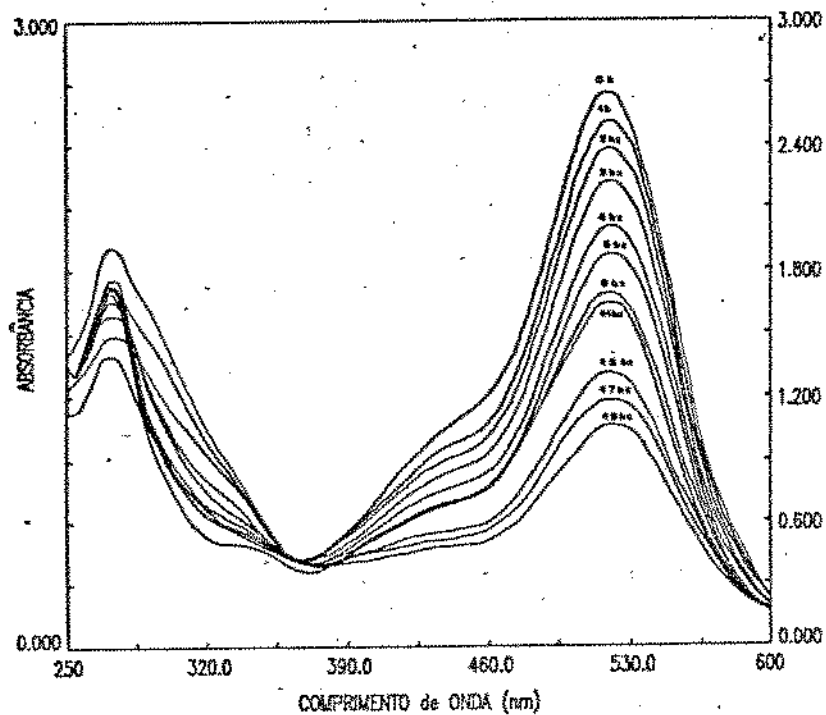


Figura 42: Espectro de absorção UV-visível da solução de delphinidina, a pH 1,5, sob ação da luz e sem adição de ácido tânico

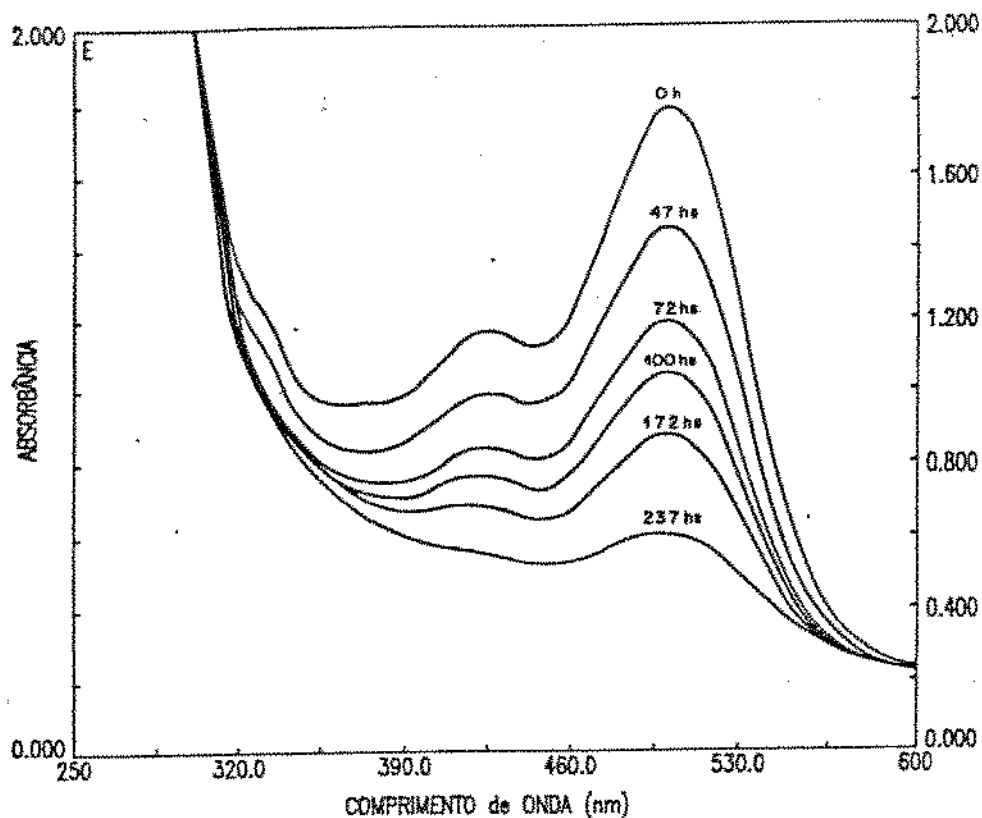


Figura 43: Espectro de absorção UV-visível da solução de pelargonidin-3-glicosídeo, a pH 0,0, sob ação da luz e sem adição de ácido tânico

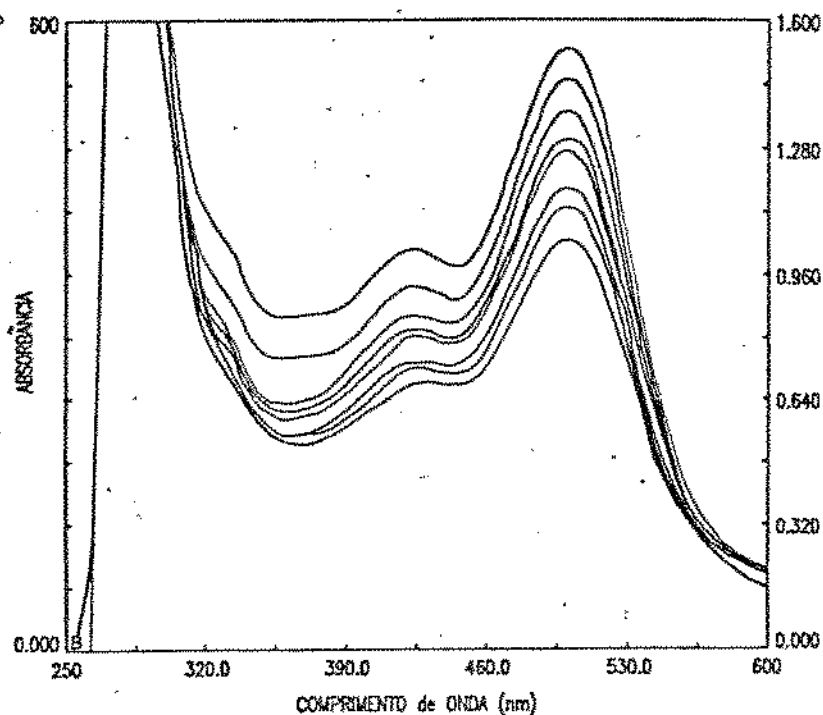


Figura 44: Espectro de absorção UV-visível da solução de pelargonidin-3-glicosídeo, a pH 1,5, sob ação da luz e sem adição de ácido tânico

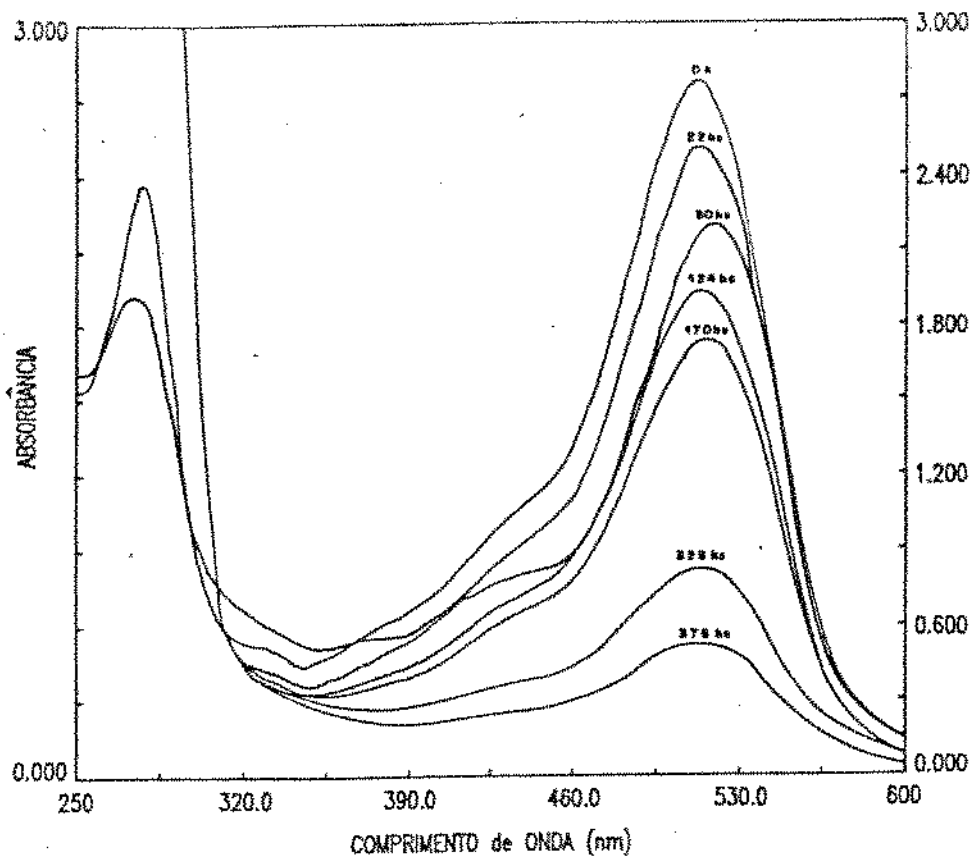


Figura 45: Espectro de absorção UV-visível da solução de cianidina 3-glicosídeo, a pH 2,0, sob ação da luz e sem adição de ácido tânico

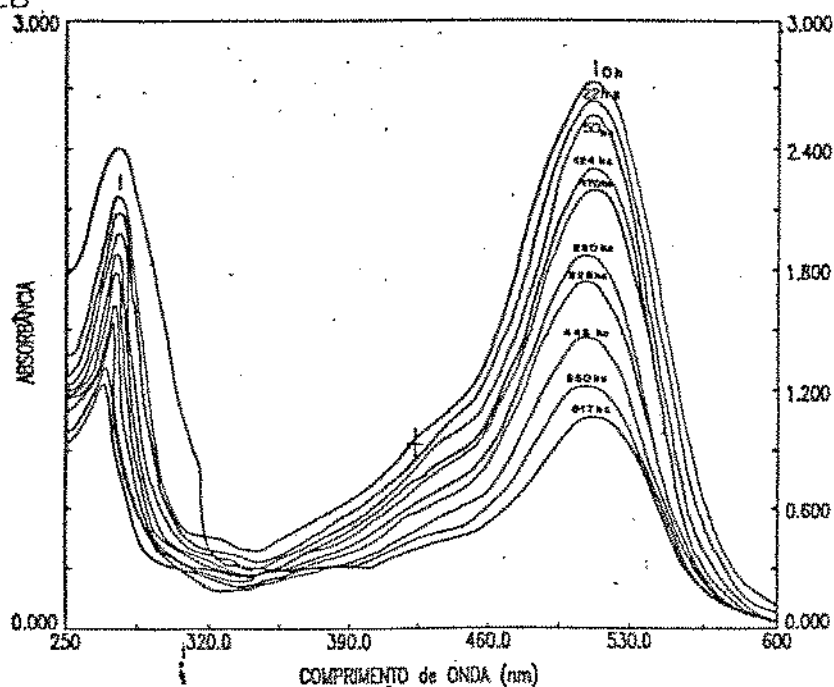


Figura 46: Espectro de absorção UV-visível da solução de cianidina 3-glicosídeo, a pH 1,5, sob ação da luz e sem adição de ácido tânico

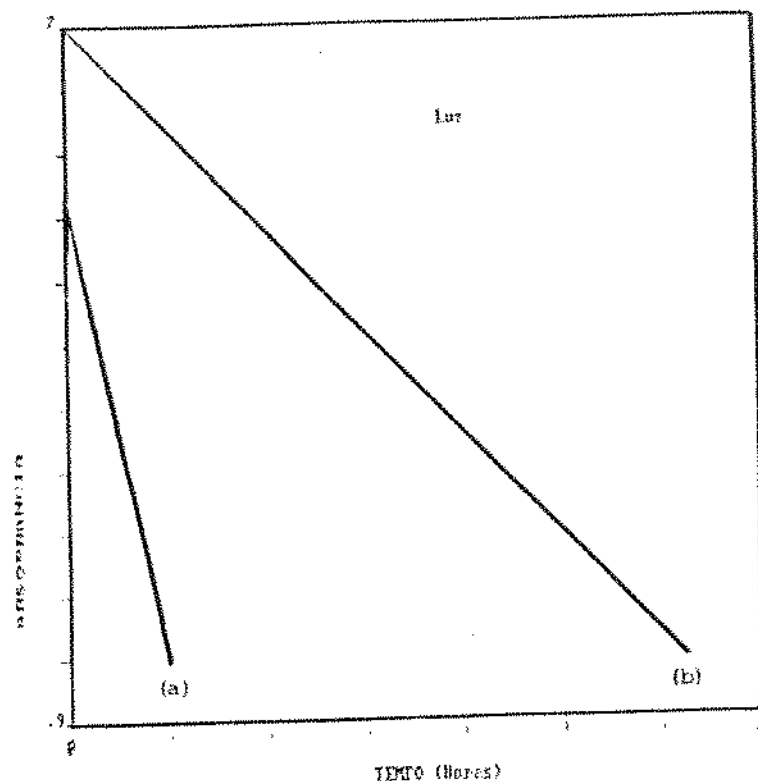


Figura 47: Curva de absorbância versus tempo (horas) da pelargonidina (a) e da cianidina (b), a pH 2,0, sob ação da luz e sem adição de ácido tânico

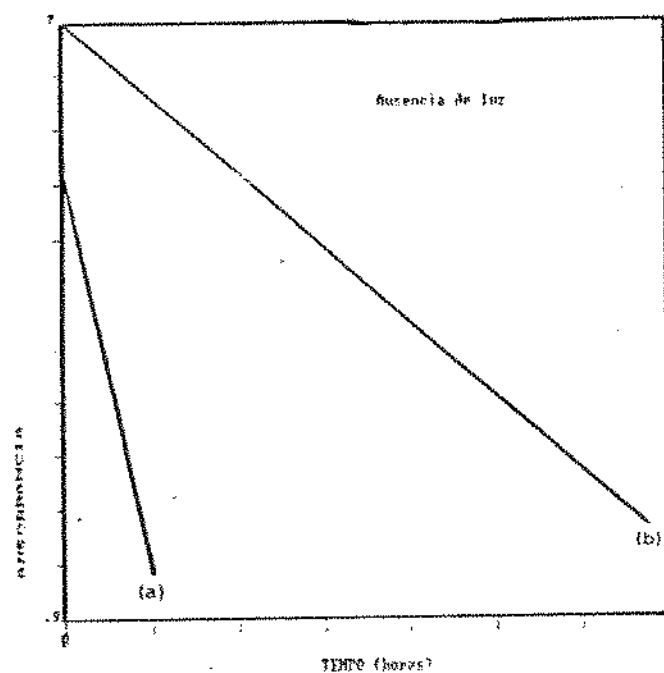


Figura 48: Curva de absorbância versus tempo (horas) da pelargonidina (a) e da cianidina (b), a pH 2,0, em ausência de luz e sem adição de ácido tânico

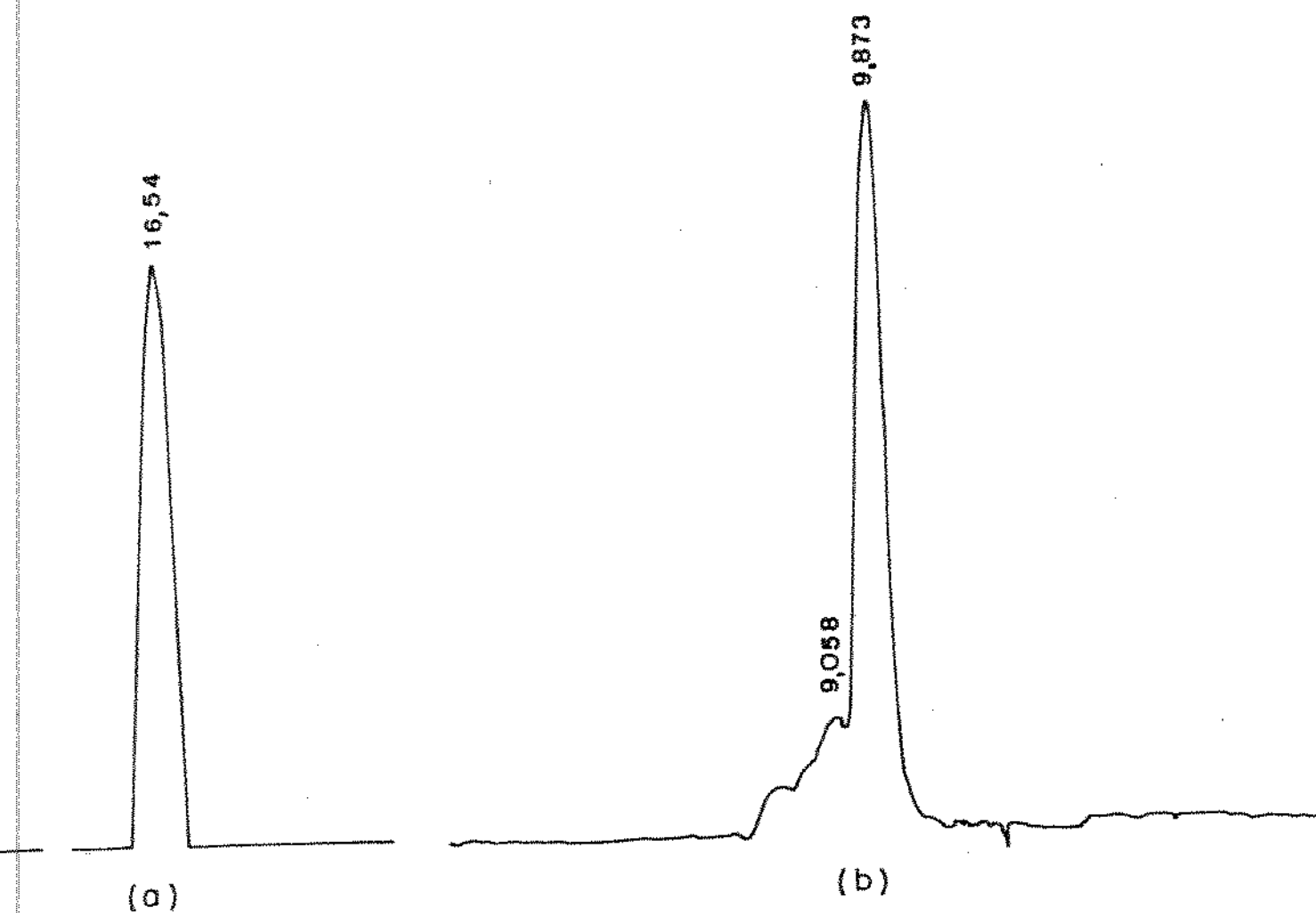


Figura 49: Cromatogramas obtidos por CLAE da pelargonidina (a) e pelargonidina, a pH 1,5 e com adição de ácido tânico (b)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADAMOVICS, J. & STERMITZ, F. R. 1967. High-performance liquid chromatography of some anthocyanidins and flavonoids. *Journal of chromatography*, 129, 464-465
2. ADAMS, J. B. & WOODMAN, J. S. 1973. Thermal degradation of anthocyanins with particular reference to the 3-glucoside of cyanidin. I. In Acidified Aqueous Solution at 100°C. *J. Science Food Agric.* 24, 747-762
3. ANDERSEN, O. M. & FRANCIS, G. W. 1985. Simultaneous analysis of anthocyanins and anthocyanidins on cellulose thin layers. *Journal of Chromatography*, 318, 450-454
4. ANDREEV, V.V. & SHPRIZMAN. 1969. Method of Isolating Colorants for Foods from Fruit and Berry Husks, German Patent N^o 1,296,967. Citado por Francis, F.J. 1989. Food Colorants. Anthocyanins, *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 28 (4), 273-314
5. ASEN, R.N.; STEWART, R.N. and NORRIS, K.H. 1971. Effect of pH and concentration of the Anthocyanin-flavonol co-pigment complex on the color of "Better time" roses. *Journal of American Society of the Horticultural Science*, 96, 770-773

6. ASEN, R. N.; STEWART, R. N. and NORRIS, K. H. 1972. Copigmentation of Anthocyanins in plant tissue and its effect on color. *Phytochemistry*, 11, 1139-1144
7. ASEN, R.N.; STEWART, R.N. and NORRIS, K.H. 1975. Anthocyanin, flavonol copigments, and pH responsible for Larkspur flower color. *Phytochemistry*, 14, 2677-2682
8. BAJ, A.; BOMBARDELLI, E.; GABETTA, B. and MARTINELLI, E. M. 1983. Qualitative and Quantitative evaluation of *Vaccinium myrtillus* Anthocyanins by High-Resolution Gas Chromatography and High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography*, 279, 365-372
9. BARRIT, B.H. & TORRE, L.C. 1973. Cellulose thin-layer chromatographic separation of *Rubus* fruit anthocyanins. *Journal of Chromatography*, 75, 151-155
10. BASSA, I. A. & FRANCIS, F. J. 1987. SDtability of Anthocyanins from Sweet Potatoes in a Model Beverage. *Journal of Food Science*, 52 (6), 1753-1754
11. BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. and SOUZA, S. C. 1982. Separation and Identification of cinnamic acids by TLC, *Journal of Chemical Education*, 2, 182-183

12. BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. and RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. 1983. Anthocyanins of the Brazilian Fruit *Cyphomandra betacea* Food Chemistry, 12, 189-195
13. BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. and SOUZA, S. C. 1987. *Solanum americanum* as a source of Anthocyanins for use in foods. Acta Alimentaria, 16 (2), 155-158
14. BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A.; STRINGHETA, P.C. and CASTRO, J. O. 1990. Effect of different copigments on the Stability of Anthocyanins. In "Proceedings of the XVth International Conference of Groupe Polyphenols"
15. BOUILLARD, R. 1981. Origin of the exceptional color stability of the Zebrina anthocyanin. Phytochemistry, 20, 143-146
16. BOUILLARD, R. 1982. Chemical Structure of Anthocyanins. In Anthocyanins ad Food Colors, (P. Markakis, ed.) pp. 1-40, Academic Press, New York.
17. BOUILLARD, R.; IACOBUCCI, G.A. and SWEENEY, J.G. 1982. Chemistry of anthocyanin pigments. 9. UV-visible spectrophotometric determination of the acidity constants of apigenidin and three related 3-deoxyflavilium salts. Journal of American Chemical Society, 104, 7585-7590

18. CALVI, J.P. & FRANCIS, F.J. 1978. Stability of Concorde grape (*V. labrusca*) Anthocyanins in model systems. *Journal of Food Science*. 43 (5), 1448-1456
19. CAMIRE, A.L. & CLYDESDALE, F.M. 1979. High-Pressure Liquid Chromatography of Cranberry Anthocyanins. *Journal of Food Science*, 44, 926-927
20. CASTEELE, K.V.; GEIGER, H.; LOOSE, R. and Van SUMERE, C.F. 1983. Separation of some Anthocyanidins, Anthocyanins, Proanthocyanidins and Related Substances by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography*, 259, 291-300
21. CHEN, L.J. & HRAZDINA, G. 1981. Structural aspects of Anthocyanin-Flavonoid Complex formation and its role in plant color. *Phytochemistry*, 20, 297-301
22. CHIRIBOGA, C. & FRANCIS, F.J. 1970. An Anthocyanin Recovery System from Cranberry Pomace. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 95 (2), 233-236
23. CHUNG, M.Y.; HWANG, L.S. and CHIANG, B.H. 1986. Concentration of *Perilla* Anthocyanins by Ultrafiltration. *Journal of Food Science* 51 (6), 1494-1513

24. CLYDESDALE, F.M.; FRANCIS, F.J.; MAIN, J.H. and DAMON JR., R. A. 1978. Concord grape pigments as colorants for beverages and gelatin desserts. *Journal of Food Science*, 43, 1687-1692
25. COMBE, P. 7 LADET, J. 1977. Treatment of Anthocyanin Extracts. German Patent N^o 2,533,038. Citado por Francis, F. J. 1989. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 28 (4), 217-314
26. DIAZ, L.S. & OLAVE, R. 1979. Estudio de la posición del grupo azúcar en los pigmentos antociánicos mediante relaciones espectrofotométricas. *Alimentos*, 4 (2), 15-20
27. DRADK, M. & DAUCIK, P. 1990. Changes of Elderberry (*Sambucus nigra*) Pigments during the production of pigment concentrates. *Acta Alimentaria*, 19 (1) 3-7
28. DU, C.T. & FRANCIS, F.J. 1973. Anthocyanins of roselle (*Hibiscus sabdarifa* L.). *Journal of Food Science*, 38, 810-812
29. FIGUEIREDO, P.; MAÇANITA, A. and PINA, F. 1992. Photochemistry of Malvidina 3,5-diglucoside in Aqueous Solution. In "Proceedings of the XVth International Conference of Group Polyphenols"

30. FRANCIS, F.J. 1982. Analysis of anthocyanins. In Anthocyanins As Food Colors (P. Markakis, ed.) pp. 182-208, Academic Press, New York
31. FRANCIS, F.J. 1989. Food Colorants: Anthocyanins, CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 28 (4), 273-314
32. FRANCIS, F.J. & HARBORNE, J.B. 1966. Anthocyanins of the garden huckleberry, *Solanum guineense*, Journal of Food Science, 31, 524-528
33. GARCIA-VIGUERA, C.; FERRERES, F.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; GIL, M. I. and TOMÁS-LORENTE, F. Detection of Adulterations in Fruit Jams by HPLC/Photodiode Array Analysis of Flavonoids. Proceeding of the XVIth International Conference of the Group Polyphenols. 8, 69
34. GEISSMAN, T.A.; JORGENSEN, E.C. and HARBORNE, J.B. 1953. The effect of aluminium chloride on absorption spectra of anthocyanins. Chemical Industry, December, 1389
35. GOTO, T. 1988. Structure, Stability and Color Variation of Natural Anthocyanins. In Progress in the Chemistry of Organic Natural Products, 52, 114-153

36. GOTO, T.; HOSHINO, T. and TAKASE, S. 1979. A Proposed Structure of *commelinin*, a sky-blue Anthocyanin Complex Obtained from the Flower Petals of *Commelina*. *Tetrahedron Letters*, 2905- 2908
37. HANSEN, K. B. & HANSEN, S. H. 1983. High-Performance Liquid Chromatography separation of Anthocyanins of *Sambucus nigra* L. *Journal of Chromatography*, 262, 385-392
38. HARBORNE, J.B. 1958. The Chromatographic Identification of Anthocyanin pigments. *Journal of Chromatography*, 1, 473-488
39. HARBORNE, J. B. 1967. Comparative Biochemistry of the Flavonoids, pp. 1-365, Academic Press, London, England
40. HOSHINO, I.; MATSUMOTO, U.; GOTO, T. and HARADA, N. 1982. Evidence for Self-Association of Anthocyanin IV. PMR Spectroscopic evidence for the Vertical Stacking of Anthocyanin molecules. *Tetrahedron Letters*, 23, 433-437, citado por Iacobucci, G. A. and Sweeny, J. G. 1983. The Chemistry of Anthocyanins, Anthocyanidins and Related Flavilium Salts. *Tetrahedron*, 39 (19), 3005-3038
41. HRAZDINA, G. 1970. Column Chromatographic Isolation of the Anthocyanidin 3,5-Diglucosides from Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 18, 243-245

42. HRAZDINA, G. 1981. Anthocyanins and their role in food products. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 14 (6) 283- 286
43. KALLIO, H.; PALLASAHÖ, S.; KÄRPPÄ, J. and LINKO, R.R. 1986. Comparison of the Half-Lives of the Anthocyanins in the Juice of Crowberry, *Empetrum nigrum*. *Journal of Food Science*, 51 (2), 408-410
44. KEARSLEY, M.W. and RODRIGUEZ, N. 1981. The Stability and use of natural colours in foods. Anthocyanin, β -carotene and Riboflavin. *Journal of Food Technology*, 16, 421-431
45. MACCARRONE, E.; MACCARRONE, A. and RAPISARDA, P. 1987. Technical note: Colour Stabilization of orange fruit juice by Tannic Acid. *International Journal of Food Science and Technology*, 22, 159-162
46. MARTIN, R.; CAI, Y.; SPENCER, C.M.; LILLEY, T.H. and HASLAM, E. 1992. Polyphenol Complexation. In "Proceedings of the XVth International Conference of the Group Polyphenols"
47. MAZZA, G. & BROUILLARD, R. 1987. Color Stability and Structural Transformations of Cyanidin 3,5-Diglucoside and Four 3- Deoxyanthocyanins in Aqueous Solution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35, 422-426

48. MAZZA, G. & BROUILLARD, R. 1990. The Mechanism of Co-pigmentation of Anthocyanin in Aqueous Solution. *Phytochemistry*, 29 (4), 1097-1102
49. METIVIER, R.P.; FRANCIS, F.J. and CLYDESDALE, F.M. 1980. Solvent Extraction of anthocyanins from wine pomace. *Journal of Food Science*, 45, 1099-1102, citado por Francis, F.J. 1989, *Food Colorants: Anthocyanins*, CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 28 (4), 273-314
50. MISTRY, T.V.; CAI, Y.; LELLEY, T.H. and HASLAM, E. 1991. Polyphenol Interactions. Part 5. Anthocyanin Co-pigmentation. *Journal of Chemical Society, Perkin Trans..* 2, 1287-1296
51. MULLICK, B. 1969. Thin Layer Chromatography of Anthocyanidins I. Techniques and Solvents for two-dimensional Chromatography. *Journal of Chromatography*, 39, 291-301
52. OHTA, H.; AKUTA, S. and OSAJIMA, Y. 1980. Stabilization of anthocyanin pigments and their utilization. II. Stability of anthocyanin pigments and related compounds in acidic solutions. *Nippon Shokuhin-Kogyo Gakkaishi*, 27, 81, *Chemical Abstracts*, 93, 24763

53. OHTA, H. & OSAJIMA, Y. 1992. Reactivity and Stability of some Flavilium Compounds. In "Proceedings of the XVith International Conference of the Group Polyphenols
54. PHILIP, T. 1984. Purification and Concentration of Natural Colorants by Membranes. Food Technology, Dec., 107-108
55. PIFFERI, P.G. & VACCARI, A. 1981. Separation of Anthocyanin by Adsorption on acid alumina. Journal of Food Technology, 16, 283-290
56. PINA, F.; FIGUEIREDO, P; SILVA, M. G. and NEVES, H. C. 1992. Photodegradation of Malvidin 3,5-Diglucoside in Aqueous Solutions. In "Proceedings of the XVith International Conference of the Group Polyphenols"
57. POUGET, M. P.; LEJEUNE, B.; VENNAT, B. and POURRAT, A. 1990. Extraction, Analysis and Study of the Stability of *Hibiscus* Anthocyanins. Lebensmittel-Wissenschaft und -Technol., 23, 103-105
58. ROMMEL, A.; HEATHERBELL, D. A. and WROLSTAD, R. E. 1990. Red Raspeberry juice and wine: Effect of Processing and Storage on Anthocyanin Pigment Composition, Color and Appearance. Journal of Food Science, 55 (4), 1011-1017

59. RUEDI, P. & HUTTER-BEDA, B. 1992. An Additional Aspect of Inter-molecular Anthocyanin Co-pigmentation. In "Proceedings of the XVith International Conference of the Group Polyphenols
60. SAKAMURA, S.; WATANABE, S. and OBATA, Y. 1963. Agricultural and Biological Chemistry 27, 663, citado por Tanchev, S.S.; Ruskov, P.J. and Timberlake, C.F. 1970. Phytochemistry, 9, 1681-1682
61. SAKELLARIADES, H. C. & LUH, B. S. 1974. Anthocyanin in Barbera Grapes. Journal of Food Science, 39, 329-333
62. SCHEFFELDT, P. & HRAZDINA, G. 1978. Copigmentation of Anthocyanins under Physiological Conditions. Journal of Food Science, 43, 517-520
63. SPANOS, G.A. & WROLSTAD, R.E. 1987. Anthocyanin Pigment, Non-volatile Acid, and Sugar Composition of Red Raspberry juice. Journal of Association Official of Analytical Chemistry, 70 (6), 1987
64. STARR, M. S. & FRANCIS, F. J. 1968. Oxygen and Ascorbic Acid Effect on the relative Stability of four Anthocyanin pigments in Cranberry juice. Food Technology, 22, 1293-1295

65. STRINGHETTA, P.C. 1991. Identificação da Estrutura e Estudo da Estabilidade das Antocianinas extraídas da Inflorescência do Capim Gordura (*Melinis minutiflora*, Pal de Beav). Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP
66. STRINGHETTA, P.C.; BOBBIO, F.O. and BOBBIO, P.A. 1992. Stability of copigmented Anthocyanins from *Panicum melinis* toward light and oxygen at different pH. Proceedings of the XVIth International Conference of the Group Polyphenols
67. SUYAMA, K.; TAMATE, M. and ADACHI, S. 1983. Colour Stability of Shisonin, Red Pigment of a Perilla (*Perilla ocimoides* L. var. *crispa* Benth), Food Chemistry, 10, 69-77
68. SWEENEY, J.G. & IACOBUCCHI, G.A. 1983. Effect of Substitution on the Stability of 3-Deoxyanthocyanidins in Aqueous Solutions. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 31, 531-533
69. TANCHEV, S.S.; RUSKOV, P.J. and TIMBERLAKE, C.F. 1970. The Anthocyanins of Bulgarian Aubergine (*Solanum melongena*). Phytochemistry, 9, 1681-1682
70. TIMBERLAKE, C.F. & BRIDLE, P. 1966. Spectral studies of Anthocyanin and Anthocyanidin equilibria in aqueous solution. Nature 212, 158-159

71. TSASKOV, B. & KONTAREV, I. 1973. Extraction of colouring matter from grape skins, Nauchni Tr. Vissh. Selkostop. Inst. Vasil Kolarov, 22, 72, citado por Francis, F.J. 1989. Food Colorants. CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 28 (4), 273-314
72. Van TEELING, C.G.; CANSFIELD, P.E.; GALLOP, R.A. 1971. Chromatography of Anthocyanins on Columns of Insoluble Polyvinylpyrrolidone. Journal of Chromatographic Science, 9, 505-509
73. YOSHITAMA, K. & ABE, K. 1976. Chromatographic and Spectral Characterization of 3'-Glycosylation in Anthocyanins. Phytochemistry, 16, 591-593
74. WILKINSON, M.; SWEENEY, J.G. and IACOBUCCI, G.A. 1977. High-Pressure Liquid Chromatography of Anthocyanidins. Journal of Chromatography, 132, 349-351
75. WILLIAMS, M. & HRAZDINA, G. 1979. Anthocyanins as food colorants. Effect of pH on the Formation of Anthocyanin-Rutin Complexes. Journal of Food Science, 44 (1), 66-68
76. WOO, A.H.; Von ELBE, J.H. and AMUNDSON, C.H. 1980. Anthocyanin Recovery from Cranberry pulp wastes by Membrane Technology. Journal of Food Science, 45, 875-879

77. WROLSTAD, R. E. & HEATHERBELL, D. A. 1974. Identification of Anthocyanins and Distribution of Flavonoids in Tamarillo Fruit (*Cyphomandra betacea* (cav.) Sendt.). Journal of Science and Food Agriculture, 25, 1221-1228
78. WROLSTAD, R.E. & PUTNAM, T.B. 1969. Isolation of Strawberry Anthocyanin Pigments by Adsorption on Insoluble Polyvinylpyrrolidone. Journal of Food Science, 34, 154-155