

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**“ESTUDO DA ESTABILIDADE E ESTABILIZAÇÃO DAS
ANTOCIANINAS DO BAGAÇO DE UVA SEIBEL 2”**

Patrícia Abrão de Oliveira

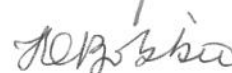
Prof.^a. Dr.^a. Florinda Orsatti Bobbio

Orientadora

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Patrícia Abrão de Oliveira**, aprovada pela Comissão Julgadora em 20 de fevereiro de 2002.

Campinas, 20 de fevereiro de 2002



Profa. Dra. Florinda Orsatti Bobbio
Presidente da Banca

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos, Campinas-SP, 2001.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE	FC
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	OL4e
V	
TOMBO	48235
PROC.	16-837/02
C	H
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	16/04/02
Nº CPD	

CM00166087-8

BIB ID 236382

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

OL4e Oliveira, Patrícia Abrão de
Estudo da estabilidade e estabilização das antocianinas do
bagaço de uva seibel 2 / Patrícia Abrão de Oliveira. – Campinas,
SP: [s.n.], 2001.

Orientador: Florinda Orsatti Bobbio
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Antocianinas. 2.Estabilidade. 3.Uva. 4.Ácido tânico.
5.Copigmentação. I.Bobbio, Florinda Orsatti. II.Universidade
Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.
III.Título.

BANCA EXAMINADORA



PROF.^a DR.^a Florinda Orsatti Bobbio

(orientadora)



Hilary Castle de Menezes

(membro)



Prof.^a Dr.^a Neura Bragagnolo

(membro)

Prof.^a Dr.^a Adriana Zerlotti Mercadante

(membro)

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Prof. Dr. Paulo Anna Bobbio

(in memoriam)

Por ter sido um incansável professor, aquele sempre disposto a ensinar.

Por ter sido um orientador muito determinado, aquele que indica o caminho certo.

Por ter sido meu mestre, aquele que vou seguir os passos.

Aqui fica a minha eterna gratidão por ter tido a oportunidade de trabalhar e aprender com um pesquisador altruísta que muito contribuiu para o desenvolvimento deste país com extenso conhecimento e sem nunca apresentar desânimo ou falta de interesse até o final de sua vida.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo auxílio financeiro processo 99/002216-1.

À Prof.^a Dr.^a Florinda Orsatti Bobbio pelos ensinamentos, dedicação, paciência, amizade e por ter sido sempre um exemplo de pesquisadora.

À Prof.^a Dr.^a Adriana Z. Mercadante pelos ensinamentos e por ter sido sempre prestativa e atenciosa.

À Prof.^a Dr.^a Neura Bragagnollo e à Prof.^a Dr.^a Hillary pela atenção dispensada a correção da dissertação.

À Prof.^a Dr.^a Flávia Maria Neto pelos ensinamentos e pela disponibilização de equipamento e ao técnico Francisco pela ajuda.

À Vanessa Martins da Silva pela valiosa ajuda no laboratório.

Ao pessoal da secretaria do Departamento de Ciência de Alimentos pelas inúmeras vezes que sempre estiveram dispostos a colaborar.

À amiga Sandra Fadelli pela ajuda e companheirismo.

Ao meu marido Fabio pelo apoio e pela interminável paciência.

Aos meus pais, Arlene e Oliveira, pelo constante apoio e carinho em todas as etapas da minha vida.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para que este trabalho fosse realizado.

SUMÁRIO

RESUMO.....	xi
SUMMARY.....	xii
1.INTRODUÇÃO.....	1
2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1.Estrutura química das antocianinas.....	3
2.2. Estabilidade das antocianinas.....	6
2.2.1. Estrutura química.....	6
2.2.2. pH.....	9
2.2.3. Copigmentação.....	14
2.2.4. Auto-associação.....	21
2.2.5. Temperatura.....	21
3.MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1. Amostra.....	23
3.2. Análise quantitativa das antocianinas do bagaço.....	23
3.3. Análise quantitativa das antocianinas da uva Seibel 2.....	24
3.4. Identificação das antocianinas do bagaço de uva Seibel 2.....	24
3.4.1. Extração das antocianinas.....	24
3.4.2. Separação e purificação das antocianinas.....	24

3.4.3. Análise por cromatografia líquida de alta eficiência	25
3.4.4. Análise espectrofotométrica.....	25
3.4.5. Análise química.....	25
3.4.5.1. Hidrólise ácida total.....	25
3.4.5.2. Hidrólise ácida controlada.....	26
3.4.5.3. Hidrólise alcalina.....	26
3.4.5.4. Hidrólise com peróxido.....	27
3.5. Avaliação da eficiência dos diferentes solventes.....	27
3.6. Extração das antocianinas do bagaço.....	28
3.7. Concentração do extrato por osmose reversa.....	29
3.8. Preparação do extrato parcialmente purificado de bagaço de uva Seibel2.....	30
3.9. Estabilidade de extrato bruto e parcialmente purificado à luz a 23°C em pH 2,2, 3,0 e 4,0.....	30
3.10. Estabilização do extrato bruto com diferentes concentrações de ácido tânico em pH 2,2; 3,0 e 4,0.....	31
3.11. Efeito do pH do solvente A (ácido fórmico 5%).....	32
3.12. Estabilização com ácido tânico de extrato bruto e parcialmente purificado em pH 2,2, 3,0 e 4,0 na presença de luz a 23°C.....	32
3.13. Estabilidade de extrato bruto e parcialmente purificado em pH 2,2, 3,0 e 4,0 à temperatura de 50°C em ausência de luz.....	33

3.14. Estabilização com ácido tânico de extrato bruto e parcialmente purificado em pH 2,2, 3,0 e 4,0 à temperatura de 50°C em ausência de luz.....	33
3.15. Estabilidade de extrato bruto e parcialmente purificado em iogurte à temperatura de 8°C em ausência de luz.....	33
3.16. Estabilização com ácido tânico de extrato bruto e parcialmente purificado em iogurte à temperatura de 8°C em ausência de luz.....	34
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.1.Amostra.....	35
4.2.Análise quantitativa.....	37
4.3. Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	37
4.4.Identificação das antocianinas do bagaço de uva Seibel 2.....	38
4.4.1. Identificação das antocianinas Z 1.3 e Z 1.4.....	40
4.5.Avaliação da eficiência dos diferentes solventes.....	42
4.6.Concentração do extrato por osmose reversa.....	43
4.7. Preparação do extrato parcialmente purificado (EPP) de bagaço de uva Seibel 2.....	44
4.8. Estabilidade de extrato bruto e parcialmente purificado à luz a 23°C em pH 2,2, 3,0 e 4,0.....	45
4.9. Estabilização com diferentes concentrações de ácido tânico em soluções de EB em pH 2,2, 3,0 e 4,0 em presença de luz a 23°C.....	51
4.10. Efeito da acidez do solvente A na análise por CLAE.....	55

4.11. Estabilização com ácido tânico de extrato bruto e parcialmente purificado em pH 2,2, 3,0 e 4,0 na presença de luz a 23 ^o C.....	56
4.12. Estabilidade de extrato bruto e parcialmente purificado em pH 2,2, 3,0 e 4,0 à temperatura de 50 ^o C em ausência de luz.....	63
4.13. Estabilização de extrato bruto e parcialmente purificado com ácido tânico em pH 2,2, 3,0 e 4,0 à temperatura de 50 ^o C em ausência de luz	69
4.14. Estabilidade e estabilização com ácido tânico de extrato bruto e parcialmente purificado em iogurte à temperatura de 8 ^o C em ausência de luz.....	76
5. CONCLUSÕES.....	84
6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86
ANEXOS.....	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Antocianidinas que ocorrem na natureza.....	4
Tabela 2: Efeito da estrutura na estabilidade de pigmentos a 25°C em ácido cítrico 0,01M, pH 2,8.....	9
Tabela 3: Condições referentes ao processo de concentração do extrato antociânico por filtração por osmose reversa.....	29
Tabela 4: Efeito de luz, pH e 23°C sobre os valores de $\lambda_{\text{max vis}}$ inicial e final, constante de velocidade de reação (k) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) para as soluções de EB e EPP.....	46
Tabela 5: Efeito da luz, pH a 23°C sobre os valores de constante de velocidade de reação (k) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) obtidos por CLAE para a malvidina 3-arabinosídeo.....	49
Tabela 6: Efeito da luz, pH a 23°C sobre os valores de constante de velocidade de reação (k) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) obtidos por CLAE para a petunidina 3-arabinosídeo.....	50
Tabela 7: Efeito de concentração de ácido tânico sobre valores de absorvância inicial, $\lambda_{\text{max vis}}$, constante de velocidade de reação (k) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) para as soluções de EB em pH 2,2 expostas à luz.....	52
Tabela 8: Efeito de concentrações de ácido tânico sobre valores de absorvância inicial, $\lambda_{\text{max vis}}$, constante de velocidade de reação (k) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) para as soluções de EB em pH 3,0 expostas à luz.....	53

Tabela 9: Efeito de concentrações de ácido tânico sobre valores de absorvância inicial, $\lambda_{\text{max vis}}$, constante de velocidade de reação (k) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) para as soluções de EB em pH 4,0 expostas à luz.....	53
Tabela 10: Efeito da acidez de ácido fórmico 5% sobre as absorvâncias e $\lambda_{\text{max vis}}$ das soluções de EB e EP a pH 2,2, 3,0 e 4,0.....	56
Tabela 11: Efeito de luz, pH e adição de ácido tânico a 23°C sobre os valores de $\lambda_{\text{max vis}}$ inicial e final, constante de velocidade de reação (k) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) para as soluções de EB e EPP.....	59
Tabela 12: Efeito de luz, pH e adição de ácido tânico a 23°C sobre os valores de constante de velocidade de reação (k) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) obtidos por CLAE para a malvidina 3-arabinosídeo.....	61
Tabela 13: Efeito de luz, pH e adição de ácido tânico sobre os valores de constante de velocidade de reação (k) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) obtidos por CLAE para a petunidina 3-arabinosídeo.....	62
Tabela 14: Efeito de temperatura e pH em ausência de luz sobre os valores de $\lambda_{\text{max vis}}$ inicial e final, constante de velocidade de reação (k) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) para as soluções de EB e EPP.....	65
Tabela 15: Efeito de temperatura e pH em ausência de luz sobre valores de constante de velocidade de reação (k) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) obtidos por CLAE para malvidina 3-arabinosídeo.....	67
Tabela 16: Efeito de temperatura e pH em ausência de luz sobre valores de constante de velocidade de reação (k) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) obtidos por CLAE para a petunidina 3-arabinosídeo.....	68

Tabela 17 Efeito de temperatura, pH e adição de ácido tânico em ausência de luz sobre os valores de $\lambda_{\text{max vis}}$ inicial e final, constante de velocidade de reação (k) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) para as soluções de EB e EPP	73
Tabela 18 Efeito de temperatura, pH e adição de ácido tânico em ausência de luz sobre valores de constante de velocidade de reação (k) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) obtidos por CLAE para a malvidina 3-arabinosídeo.....	74
Tabela 19: Efeito de temperatura, pH e adição de ácido tânico em ausência de luz sobre valores de constante de velocidade de reação (k) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) obtidos por CLAE a petunidina 3-arabinosídeo.....	75
Tabela 20: Coordenadas de cor em escala CIELAB e CIELCH (D65/ 10 ⁰)para iogurtes coloridos com EB e EPP armazenados a 8 ⁰ C com e sem adição de ácido tânico.....	78
Tabela 21: Diferenças de cor em escala CIELAB e CIELCH (D65/10 ⁰) entre iogurtes coloridos com EB e EPP com e sem ácido tânico.....	79

Figura 15: Efeito de temperatura (50°C) e pH na estabilidade das antocianinas dos extratos bruto e parcialmente purificado em pH 2,2, 3,0 e 4,0.....	66
Figura 16: Efeito de temperatura (50°C), pH e adição de ácido tânico na estabilidade das antocianinas dos extratos bruto e parcialmente purificado em pH 2,2, 3,0 e 4,0.....	70

RESUMO

As antocianinas do bagaço e de uvas frescas Seibel 2 foram quantificadas por método espectrofotométrico encontrando-se concentrações de 112,72 mg/100 g de bagaço sem sementes e 500,50 mg/100 g de cascas, respectivamente.

As análises por métodos espectrofotométricos, químicos e cromatográficos, incluindo cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) mostraram a presença de pelo menos treze antocianinas, das quais as principais foram identificadas como malvidina 3-arabinosídeo, em maior quantidade, seguida de petunidina 3-arabinosídeo.

Foi avaliada a eficiência de quatro solventes extratores livres de metanol para a extração da antocianinas do bagaço de uva Seibel 2. Com o melhor solvente extrator, etanol 50% acidificado com ácido cítrico, foi feita uma extração em escala maior resultando em uma solução que foi concentrada por filtração por osmose reversa (OR) e a vácuo. O extrato obtido teve seu perfil antociânico determinado por CLAE antes e depois do processo de OR.

O extrato bruto do bagaço concentrado por OR foi purificado por cromatografia em papel Whatmann 3 mm Chr com HCl 1%, obtendo-se o extrato parcialmente purificado livre de flavonóides não antociânicos, como verificado por CLAE.

Com o extrato bruto (EB) e parcialmente purificado (EPP) de bagaço da uva Seibel 2 foi realizado o estudo de estabilidade das antocianinas em tampão citrato-fosfato a pH 2,2, 3,0 e 4,0 à luz a 23°C e à temperatura de 50°C em ausência de luz. A degradação dos pigmentos foi acompanhada por espectrofotometria e por CLAE. Foi também realizado o estudo de copigmentação com ácido tânico na concentração de 600 mg/100 mL em pH 2,2, 3,0 e 4,0 nas mesmas condições que os experimentos de estabilidade.

A análise por CLAE mostrou-se mais adequada para o estudo de estabilidade e estabilização, permitindo o acompanhamento da decomposição das principais

antocianinas sem a interferência de compostos de degradação. Os resultados obtidos por CLAE mostraram que os extratos bruto e parcialmente purificado de bagaço de uva Seibel 2 possuem maior estabilidade em pH 2,2, seguido do 3,0, sendo o pH 4,0 o mais desfavorável. Os flavonóides não antociânicos presentes no EB o deixou mais estável que o EPP nos experimentos de exposição à luz em temperatura ambiente e também à temperatura de 50°C em ausência de luz.

Verificou-se que o ácido tânico na concentração de 600 mg/100 mL produz aumento na absorção de cor e deslocamento batocrômico das soluções de EB e EPP, sendo estes efeitos mais intensos em pH 4,0. A adição de ácido tânico melhorou a estabilidade das antocianinas em pH 2,2 após exposição à luz a 23°C e à temperatura de 50°C em ausência de luz provocando aumento no tempo de meia-vida das soluções de EB e EPP; este efeito não foi observado em pH 4,0.

O estudo de estabilidade e estabilização com ácido tânico dos extratos bruto e parcialmente purificado em iogurte à temperatura de 8°C através de medidas em escala colorimétrica (CIELAB e CIELCH) indicaram uma diminuição da luminosidade e da cor vermelha e também aumento da cor amarela após período de 21 dias devido a degradação das antocianinas e formação de outros compostos. A adição de ácido tânico provocou a diminuição nas diferenças de cor dos iogurtes com EB e EPP após 21 dias a 8°C. O extrato bruto se mostrou um corante em potencial por não provocar perda de coloração perceptível visualmente e não alterar a aparência do iogurte após o período de exposição, como aconteceu com a adição de EPP.

SUMMARY

Pomace from grape variety Seibel 2 was used in this work, pomace being a primary by-product of wine production. The anthocyanin concentration in the grape pomace and in the fresh fruit was determined by a spectrophotometric method, resulting in 112.72 mg/100 g in the pomace, free of seeds and 500.50 mg/100 g in the skins, respectively.

Chemical, spectrophotometric and chromatographic analyses, including high performance liquid chromatography (HPLC), showed thirteen anthocyanins: the major pigment was identified as malvidin-3-arabinoside, and the second major, as petunidin-3-arabinoside.

The efficiency of the solvents, none of them methanolic, was studied in the extraction of anthocyanins from Seibel 2 grape pomace. 50% ethanol, acidified with citric acid, the best extractive solution, was used to extract the pomace anthocyanins on a large scale. This extract was concentrated by reverse osmosis (RO) and analyzed by HPLC before and after the concentration process.

The crude pomace extract was purified by paper chromatography with 1% HCl, resulting in a partially purified extract that did not contain non-anthocyanic flavonoids, as determined by HPLC.

The stability of the crude (CE) and partially purified (PPC) pomace extracts in citrate-phosphate buffer at pH 2.2, 3.0, and 4.0 was studied under exposure to light at 23°C and at 50°C in the dark. Anthocyanin degradation was measured by spectrophotometry and HPLC. The copigmentation study was performed with tannic acid at concentration of 600mg/100mL under the same experimental conditions.

HPLC analyses were more adequate to study anthocyanin stability and stabilization, permitting one to measure the decomposition of each identified pigment, without interference by the degradation products. The HPLC results indicated that CE

and PPE were more stable at pH 2.2 than at 3.0 and the most unfavorable pH being 4.0. Non-anthocyanic flavonoids promoted stability to CE in the light and temperature exposure experiments.

It was shown that 600 mg/100 mL tannic acid in the presence of light at 23⁰ C and in the dark at 50⁰ C promoted hyperchromic and bathochromic effects in the CE and PPE solutions, the effect being more intense at pH 4.0. Copigment addition enhanced the light and temperature stability at pH 2.2, increasing the half-life of the CE and PPE solutions. This effect was not observed at pH 4.0.

The stability and stabilization study of CE and PPE in yogurt was performed using CIELAB and CIELCH color scale measurements, showing decreases in lightness and redness and increase in yellowness after 21 days at 8⁰C. Copigment addition decreased the color differences in CE and PPE yogurts after 21 days at 8⁰C. On the basis of the colorimetric study, CE can be considered as a potential colorant, because it did not promote a visually observable color loss or changes in the yogurt appearance after the exposure period, changes which were observed when PPE was added.

1.INTRODUÇÃO

Corantes artificiais e extratos de plantas têm sido usados há séculos para melhorar a aparência ou mesmo para permitir a falsificação de alimentos e bebidas, especialmente vinhos.

Essa prática foi em muitos casos extremamente perigosa a saúde, pois eram empregados compostos de chumbo, arsênico, mercúrio ou cobre como corantes (WALFORD, 1980). A partir do desenvolvimento de métodos de síntese para corantes no século XIX, especialmente na Inglaterra e Alemanha, os produtos altamente tóxicos antes usados foram sendo substituídos pelos corantes sintéticos em número elevado e sem restrições imediatas.

Gradativamente, com o avanço das técnicas analíticas, da toxicologia e das pesquisas farmacológicas, foram constatadas as propriedades tóxicas desses compostos e das impurezas residuais que acompanhavam os mesmos. Desta forma, um número elevado desses corantes foi proibido (WALFORD, 1980).

Atualmente, no Brasil, apenas oito corantes sintéticos são ainda permitidos (Resolução 04/88 CNS/MS, 1988), mas com o avanço dos métodos de controle, possivelmente esse número deverá diminuir, especialmente entre os corantes vermelhos. Deve ser lembrado que em alguns países europeus, os corantes sintéticos não podem mais ser usados.

Existe, atualmente, intensa procura por parte de indústrias de alimentos e farmacêutica de substitutos naturais para os pigmentos sintéticos, tanto os hidrossolúveis como os lipossolúveis. Além dos possíveis problemas toxicológicos relacionados aos corantes sintéticos, há uma grande demanda por produtos considerados "naturais" por parte dos consumidores. Entre os hidrossolúveis, as antocianinas seriam os pigmentos naturais de escolha (FRANCIS, 1982), especialmente entre os corantes vermelhos, para uso em alimentos como também em produtos farmacêuticos, já que não se conhecem efeitos tóxicos causados por sua ingestão. As

antocianinas apresentam dois problemas importantes e que necessitam de melhor estudo: a falta de fontes economicamente viáveis e baixa estabilidade a luz e pH (MOK e HETTIARCHACHI, 1991, SHI *et al.*, 1992).

Das antocianinas, alguns extratos de plantas têm sido usados, mas o uso é limitado tanto pela sua instabilidade como pelo seu preço (FRANCIS, 1982). O corante antociânico de maior uso é a enocianina, corante obtido da uva, empregado com certa frequência devido à sua cor vermelha-púrpura, pois oferece como vantagem o seu baixo custo pelo fato de sua matéria-prima ser constituída de subprodutos industriais.

Mesmo ainda não sendo disponível um corante natural com as mesmas vantagens tecnológicas e econômicas dos sintéticos (ASKAR, 1999), há uma crescente preferência pelos corantes obtidos de fontes naturais devido aos seus valores nutritivos e benéficos para a saúde que, de acordo com FRANCIS (1989) se reflete no crescente número de patentes de processos de produção de corantes naturais requeridas nos últimos anos.

No caso das antocianinas e outros polifenóis, eles têm sido procurados em alimentos e bebidas devido à comprovada atividade antioxidante (PALOMINO *et al.*, 2000; TEISSEDRE *et al.*, 1996; MEYER *et al.*, 1997). De acordo com STANTON (1999), há uma tendência mundial em incluir vinhos na dieta, especialmente os tintos, bem como outras bebidas não alcoólicas com conotação saudável, portanto a procura por alimentos e bebidas coloridas com antocianinas certamente acompanhará essa tendência.

O presente trabalho têm como objetivos a obtenção de extrato antociânico de fonte economicamente viável e o estudo de sua estabilidade e estabilização em diferentes pH e temperaturas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Estrutura química das antocianinas

As antocianinas são corantes naturais pertencentes ao grupo dos flavonóides, fenilpropanóides amplamente disseminados na natureza. Como todos os outros flavonóides, as antocianinas possuem um esqueleto básico do tipo $C_3C_6C_3$ e a mesma origem biossintética, mas diferem dos demais por apresentarem coloração intensa, um maior grau de oxidação (HARBONE, 1967) e por serem glicosiladas. As antocianidinas livres são raramente encontradas na natureza devido à sua grande instabilidade.

A molécula de antocianina contém o íon flavílium ou 2-fenilbenzopirílium (Figura 1) e um açúcar e pode conter um ácido alifático ou aromático. A antocianina, após perda de um açúcar por hidrólise ácida, é chamada de antocianidina ou aglicona.

As diferenças entre as antocianinas são: o número de hidroxilas na molécula; o grau de metilação destes grupos; a natureza, a posição e o número de açúcares ligados na molécula e a natureza e o número de ácidos alifáticos ou aromáticos ligados no açúcar.

As antocianidinas estão apresentadas na Tabela 1, sendo que as mais freqüentes na natureza são perlagonidina, cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina e malvidina.

Os açúcares mais encontrados nas antocianinas são glucose, ramnose, galactose e arabinose (MAZZA & MINIATI, 1993). Estes açúcares ocorrem como monoglicosídeos, diglicosídeos e triglicosídeos substituídos diretamente na aglicona nas posições 3, 5 e 7. Se apenas um açúcar está presente na molécula, ele está sempre ligado na posição 3 e se um segundo açúcar estiver presente, sua posição pode ser 5 ou 7. Já foram descritas antocianinas com açúcares nas raras posições 3', 4' e 5' do anel B (HARBONE & WILLIAMS, 1995, 1998).

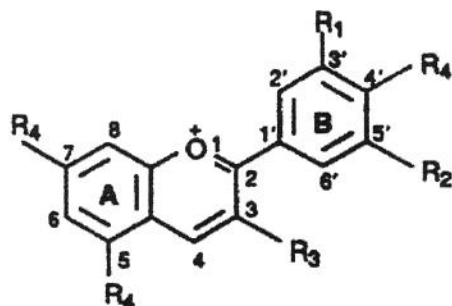


Figura 1: Cátion flavílium ou 2-fenil benzopirílium, onde R₁ e R₂ são H, OH ou OCH₃; R₃ é um glicosil ou H e R₄ é OH ou glicosil.

Tabela 1: Antocianidinas que ocorrem na natureza (MAZZA & MINIATI, 1993).

Nome	C-3	C-5	C-6	C-7	C-3'	C-4'	C-5'	Cor ^a
Apigenidina	H	OH	H	OH	H	OH	H	L
Aurantidinina	OH	OH	OH	OH	H	OH	H	L
Capensinidina	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OMe	VA
Cianidina ^b	OH	OH	H	OH	OH	OH	H	VL
Delfinidina ^b	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH	VA
Europinidina	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OH	VA
Hirsutidina	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	OMe	VA
6-hidroxicianidina	OH	OH	OH	OH	OH	H		V
Luteolinidina	H	OH	H	OH	OH	OH	H	L
Malvidina ^b	OH	OH	H	OH	OMe	OMe	OMe	VA
5-metilcianidina	OH	OMe	H	OH	OH	H		VL
Pelargonidinina ^b	OH	OH	H	OH	H	OH	H	L
Peonidina ^b	OH	OH	H	OH	OMe	OH	H	VL
Petunidina ^b	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OH	VA
Pulchelinidina	OH	OMe	H	OH	OH	OH	OH	VA
Rosinidina	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	H	V
Tricetinidina	H	OH	H	OH	OH	OH	OH	V

^a, L, laranja; V, vermelho; VL, vermelho alaranjado e VA, vermelho azulado; ^b, agliconas das antocianinas encontradas em alimentos.

Já foram relatados pigmentos com mais de três unidades de açúcares, como a antocianina conhecida como “*heavenly blue*” presente nas pétalas de *Ipomea tricolor* (GOTO, 1987). Quando o número de açúcares é maior que três, eles podem estar ligados na antocianidina através de ligações alternadas entre o açúcar e o ácido orgânico (FRANCIS, 1989).

Os ácidos aromáticos mais encontrados nas antocianinas são o cumárico, caféico, ferúlico e p-hidroxibenzóico e os alifáticos são sinápico, malônico, acético, succínico, oxálico, e málico. Os ácidos aromáticos sempre foram descritos na literatura por serem facilmente detectados espectroscopicamente e por possuírem uma ligação relativamente estável à extração com metanol acidificado com ácido clorídrico, portanto eles não são hidrolisados durante a extração. Já os ácidos alifáticos são mais disseminados do que inicialmente descrito pelo fato de possuírem ligações mais lábeis ao ácido clorídrico diluído (FRANCIS, 1989).

Os grupos metoxilas podem estar presentes nas posições 3' e 5' e, com menor frequência, nas posições 7 e 5. Nenhuma antocianina natural foi encontrada em que as três hidroxilas das posições 5, 7 e 4' fossem substituídas ao mesmo tempo, seja por metilas ou açúcares, pois um destes grupos hidroxilas livre é essencial para a formação da base quinoidal (BAYER *et al.*, 1970; SCHEFFELDT & HRAZDINA, 1978). Essa forma colorida é responsável pela pigmentação de muitas flores e frutos e na sua formação, há a perda de um hidrogênio de uma hidroxila acídica que é facilmente retirado, mesmo por bases fracas (BROUILLARD, 1982).

2.2. Estabilidade das antocianinas

A cor de uma solução antociânica, bem como sua estabilidade dependem principalmente de fatores como estrutura e concentração da antocianina, pH, presença de copigmentos, íons metálicos, temperatura, enzimas, oxigênio, ácido ascórbico, açúcares e seus produtos de degradação e SO₂.

2.2.1. Estrutura química

Todas as substituições presentes no íon flavílium, grupos hidroxila, metoxila, açúcares e açúcares acilados, têm efeito marcante na intensidade da cor e na estabilidade destes pigmentos (HARBONE, 1967).

As antocianidinas são mais instáveis e menos solúveis em solução aquosa que as antocianinas e por esse motivo foi sugerido que a glicosilação confere solubilidade e estabilidade ao pigmento (TIMBERLAKE & BRIDLE, 1966; HARBONE, 1979). Enquanto o tempo de meia vida da cianidina-3-rutinosídeo em pH 2,8 à temperatura ambiente é de 65 dias, o da aglicona cianidina é de apenas 12 h nas mesmas condições (IACOBucci & SWEENEY, 1983). A malvidina-3,5-diglucosídeo e a peonidina-3,5-diglucosídeo são relativamente mais estáveis do que seus correspondentes 3-glucosídeos (MAZZA & MINIATI, 1993). BRONNUM-HANSEN & FLINK (1985) verificaram que os diglicosídeos presentes em corante liofilizado obtido de "elderberry" apresentaram maior estabilidade durante o armazenamento em diferentes condições de temperatura e atividade de água.

A glicosilação não só aumenta a estabilidade do pigmento, como também influencia na intensidade da cor. Para um mesmo pH, as antocianidinas 3-glucosídeos são mais coloridas e possuem comprimento de onda de absorção máxima no visível aproximadamente 5 nm maior em comparação com as 3,5-diglucosídeos e 5-glucosídeos, dependendo do solvente (MAZZA & MINIATI, 1993). Foi verificado que as 3,5-(di) e 5- glucosídeos possuem 50% de absorção a menos que as 3-glucosídeos a 440 nm (comparando-se no comprimento de onda máximo) (HARBONE, 1958;

TIMBERLAKE & BRIDLE, 1977). Essas características são utilizadas para a identificação dos pigmentos por métodos espectrofotométricos (HARBONE, 1958).

Com o aumento do número de hidroxilas no anel B, a absorção máxima de luz no visível é deslocada para comprimentos de onda com cerca de 10 nm maiores e a cor muda do vermelho para o azul. A presença de grupos metoxilas no lugar destas hidroxilas reverte esta tendência (MAZZA & MINIATI, 1993). De acordo com IACOBUCCI & SWEENEY, (1983), a presença de hidroxilas na posição 4' ou 7 tende a estabilizar a antocianina, enquanto a metilação destes grupos -OH a desestabiliza (Tabela 2). Contrariamente, FURTADO *et al.* (1993) verificaram que a presença de metoxilas aumenta a estabilidade da antocianina à luz e à temperatura.

Antocianinas com dois ou mais ácidos aromáticos possuem uma grande estabilidade em uma ampla faixa de pHs, de ácidos a neutros. Os ácidos aromáticos possivelmente interagem com o sistema de ligações π do anel pirílium da antocianina, protegendo a molécula de ataques nucleofílicos da água (FIGUEIREDO *et al.*, 1999). A platiconina (Figura 2a) é uma antocianina extraída da flor de *Platicondo grandiflorum* e possui uma longa cadeia glucosilcafeilglucosilcafeilglucosídeo na posição 7 e possui uma notável estabilidade em vários pH (GOTO *et al.*, 1983). HOSHINO *et al.* (1980) afirmou que as antocianinas monoaciladas não mostram grande estabilidade, pois apenas um lado do anel flavílium estaria protegido e o outro ficaria suscetível ao ataque da água. FOSSEN *et al.* (1998) mostrou que a petanina (Figura 2b) extraída de *Solanum tuberosum* var. *Congo*, com apenas um ácido aromático, se mostrou mais estável que cianidina-3-glucosídeo nas mesmas condições, de pH 1,0 a 9,0.

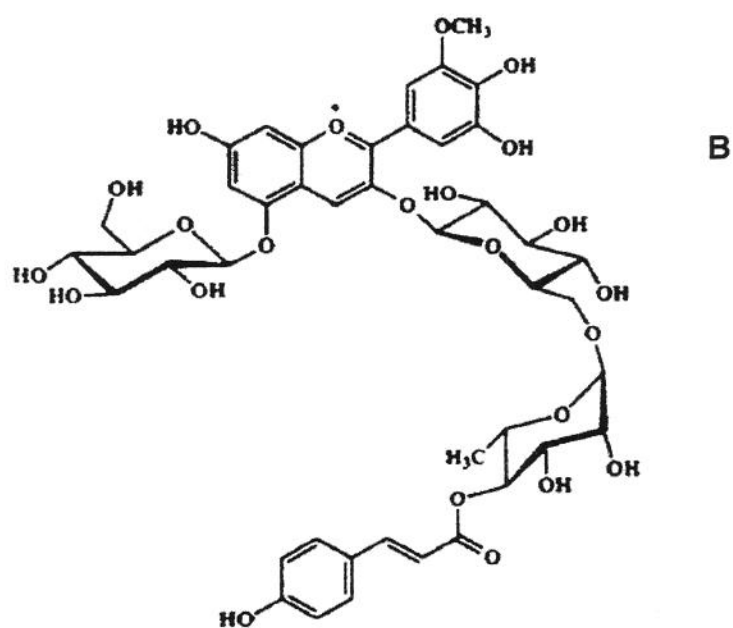
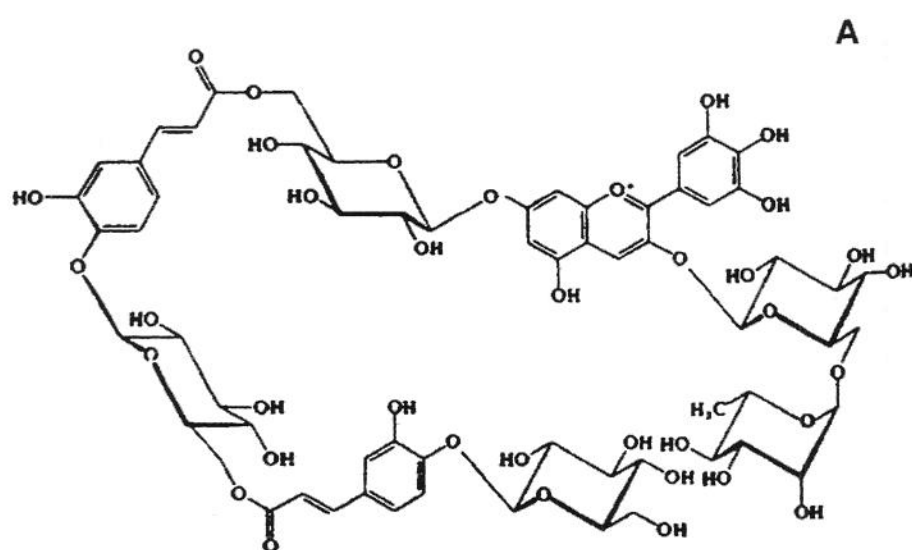


Figura 2: Estrutura da platiconina (**A**) (FOSSEN *et al.* 1998) e petanina (**B**) (GOTO, 1987).

Tabela 2: Efeito da estrutura na estabilidade de pigmentos a 25° C em ácido cítrico 0,01M, pH 2,8.

Compostos	$\lambda_{\text{max vis}}$ (nm)	$t_{1/2}^a$ (dias)
3-hidroxi-4'-5,5',7'-tetrametometoxiflavílium	512	0,04
3,4',5,5',7-pentahidroxiflavílium	512	0,5
3,4',5,5',7-pentametoxiflavílium	512	6
3-rutinese-4',5,5',7-tetrametoxiflavílium	512	13
3-rutinese-4',5,5',7-tetrahidroxiflavílium	512	65
4',5,5',7-tetrametoxiflavílium	488	170
4',5,7-trihidroxiflavílium	547	400
4',7-dihidroxiflavílium	458	400
4'-hidroxiflavílium	436	400
4'-metoxiflavílium	437	35
7-hidroxiflavílium	428	300
7-metoxiflavílium	427	8

^a, tempo de meia-vida. (IACOBUCCHI & SWEENEY, 1983)

2.2.2. pH

Soluções de antocianinas apresentam coloração vermelha intensa em valores de pH abaixo de 3,0 que tende a desaparecer entre pH 4,0 e 5,0. Próximo de pH neutro ou alcalino, as antocianinas apresentam coloração azulada e com o tempo, tornam-se amareladas.

Em soluções ácidas ou neutras, quatro espécies de antocianinas existem em equilíbrio: base quinoidal ou anidrobases (A e A^-); cátion flavílium (AH^+); pseudobase, carbinol ou hemiacetal B e chalcona C (Figura 3), sendo as duas primeiras formas coloridas e as outras duas, incolores (BROUILLARD, 1982).

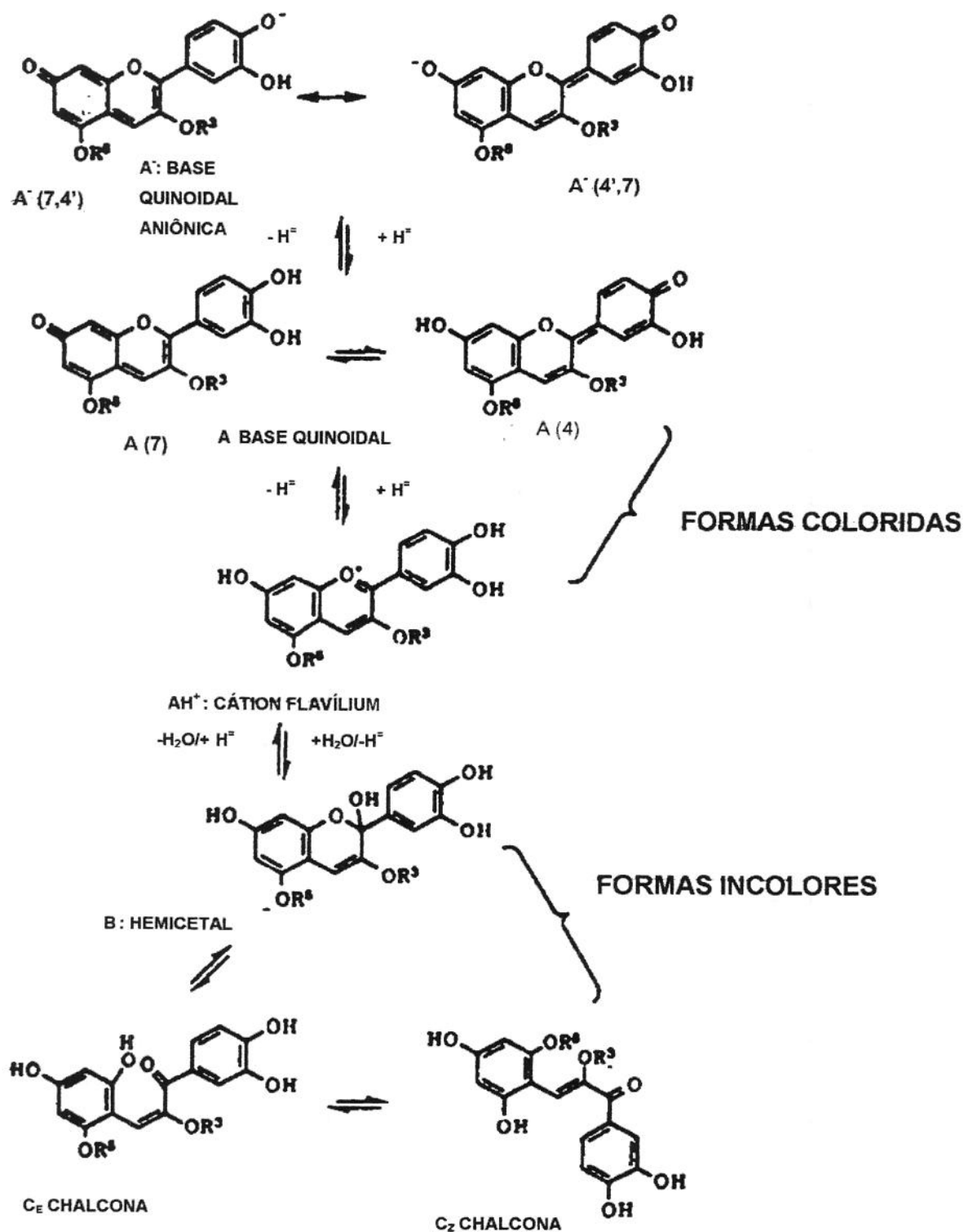
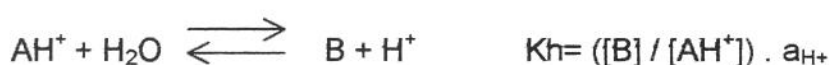


Figura 3: Transformações estruturais de antocianinas em meio aquoso.

A interconversão entre as quatro formas antociânicas está representada no Esquema 1, onde K_a , K_h e K_t são constantes de equilíbrio ácido-base, de hidratação e de tautomerismo cadeia-anel, respectivamente, e a_{H^+} é a atividade do íon hidrônio ($pH = -\log a_{H^+}$).

Esquema 1



Em pH menores ou próximos a 2,0, a antocianina existe na forma de cátion flavílium AH^+ vermelho. O cátion flavílium possui a carga positiva deslocalizada por todo o sistema heteroaromático, sendo que a maior carga parcial positiva se encontra nos carbonos 2 e 4 e são nestas posições que ocorrem preferencialmente os ataques nucleofílicos. Com o aumento do pH, há uma rápida perda de um próton formando base quinoidal A azul, que pode perder um segundo próton formando A^- e simultaneamente, ocorre a reação de hidratação do cátion flavílium, resultando no hemiacetal B sem cor. Esta forma está em equilíbrio com a E-chalcona (C_E) que é incolor ou amarelada (BROUILLARD & LANG, 1990).

As quantidades relativas das quatro formas em equilíbrio variam com o pH e com a estrutura das antocianinas (Figuras 4 e 5). Para a malvidina 3-glucosídeo e cianidina 3,5-diglucosídeo, em pH menor que 0,5, o cátion AH^+ é a única estrutura presente na solução. Com o aumento do pH, sua concentração diminui a medida que a pseudobase B é formada através de reação de hidratação de AH^+ ; neste ponto, o equilíbrio é caracterizado por pK_h 2,6 para a malvidina 3-glucosídeo e 2,23 para a cianidina-3,5-diglucosídeo, onde as formas AH^+ e B existem na mesma concentração. Nestes pH, há

pequenas quantidades de base quinoidal (A) e chalconas (C) e as proporções destas e do hemiacetal aumentam com o aumento do pH. Entre pH 4,0 e 5,5, a solução tem coloração fraca devido à baixa quantidade de formas AH^+ e A presentes na solução. Acima de pH 5,5, a única forma colorida presente é a base quinoidal presente em baixa concentração, portanto, a malvidina-3-glucosídeo e a cianidina-3,5-diglucosídeo não conferem muita cor entre pH 4 e 6 (BROUILLARD, 1982; MAZZA & BROUILLARD, 1987).

CHEMINAT & BROUILLARD (1986) verificaram por ressonância magnética de hidrogênio a presença de sete estruturas diferentes para a malvidina 3-o-(β -D-glucosídeo), antocianina comumente encontrada na uva, em soluções levemente ácidas: cátion flavílium (AH^+), três tautômeros prototrópicos da base quinoidal A (A_5 , A_7 e A_4) em equilíbrio, dois epímeros da pseudobase B_2 (não houve evidência de B_4) e as chalconas Z e E.

BROUILLARD (1982) demonstrou que com o aquecimento da solução de antocianina, o equilíbrio do sistema é direcionado para a formação de chalcona, resultando no decréscimo de formas coloridas. Com o resfriamento e acidificação, a base quinoidal e carbinol são rapidamente transformados em cátion flavílium, mas a volta da chalcona para estas formas é relativamente lenta.

O pH é um fator que pode influenciar na estabilidade das antocianinas. WESCHE-EBELING *et al.* (1996) estudaram a influência do pH na estabilidade das antocianinas de ameixa e verificaram, após 90 dias de armazenamento, que estas eram mais estáveis na geléia preparadas com pH 2,95 (retenção de 77% das antocianinas) do que em pH 3,45 e 3,95 (retenção de 29 e 8%, respectivamente).

Apesar dos mecanismos de degradação não estarem completamente elucidados, sabe-se que o pH tem efeito importante e que com o seu aumento, a estabilidade das antocianinas é diminuída. Aumentando-se o pH, o equilíbrio é deslocado no sentido de formação de chalcona, que é o produto intermediário na degradação térmica e fotoquímica das antocianinas; por exemplo, a chalcona da malvidina 3-glucosídeo é

clivada formando ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzóico, 2,4,6-trihidroxibenzaldeído e ácido 2,4,6-trihidroxibenzóico (FURTADO *et al.*, 1993).

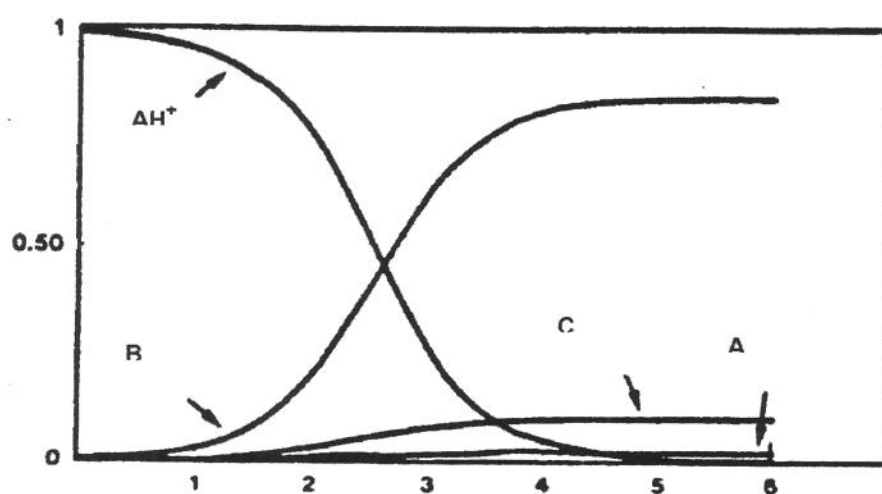


Figura 4: Distribuição do equilíbrio de AH⁺, A, B e C em função do pH a 25^o C para a malvidina 3-glicosídeo (MAZZA & BROUILLARD, 1987).

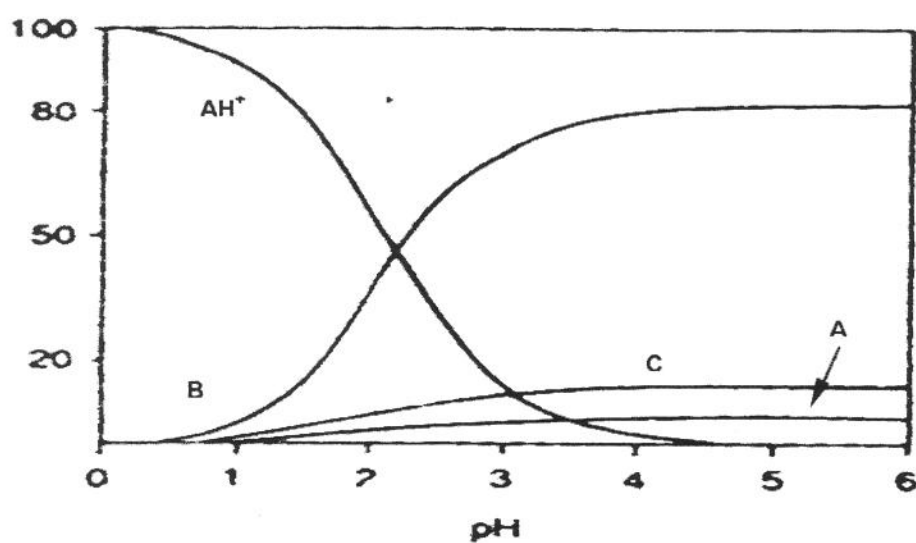


Figura 5: Distribuição do equilíbrio de AH⁺, A, B e C em função do pH para a cianidina 3,5-diglicosídeo (MAZZA & BROUILLARD, 1987).

2.2.3. Copigmentação

De acordo com OSAWA (1982), considerando-se as colorações das antocianinas puras em função do pH, percebe-se que somente as diferenças entre os substituintes na molécula não explicam satisfatoriamente a enorme variedade de cores associadas à presença destes pigmentos em tecidos vegetais. Estes fatores também não explicam como a mesma antocianina pode resultar em cores diferentes na natureza (SAITO, 1967); que antocianinas distintas podem manifestar a mesma coloração nas diferentes plantas e a perda de sua coloração intensa no tecido vegetal quando a antocianina é colocada em solução com o mesmo pH do vacúolo celular (ASEN, 1976; TIMBERLAKE & BRIDLE, 1975).

Um dos efeitos que explica a grande variedade de cores das antocianinas é a copigmentação, fenômeno no qual a presença de outros compostos provoca deslocamento batocrômico e aumento da absorção da luz no visível sob condições específicas (ASEN *et al.*, 1972).

Quando a intensificação da cor ocorre devido a presença de copigmentos como flavonóides, polifenóis, alcalóides, aminoácidos e ácidos orgânicos, o fenômeno é conhecido como copigmentação intermolecular. Pode ocorrer um outro tipo conhecido como copigmentação intramolecular, onde a cor é estabilizada pela presença de dois ou mais grupos acil aromáticos ligados à molécula de antocianina (MAZZA & MINIATI, 1993).

O processo de copigmentação, por muito tempo, tem sido entendido como formação de um complexo por pontes de hidrogênio entre as antocianinas e o copigmento, ocorrendo um empilhamento horizontal (BAYER *et al.*, 1966; TIMBERLAKE & BRIDLE, 1975). Atualmente, a teoria mais aceita é a proposta por GOTO *et al.* (1979), a qual diz que ocorre empilhamento vertical das moléculas de pigmento e copigmento através de interações hidrofóbicas entre os núcleos aromáticos (SWEENEY *et al.*, 1981; BROUILLARD, 1983; GOTO, 1987; GOTO & KONDO, 1991) (Figura 6).

Essa interação hidrofóbica ocorre entre as formas antociânicas coloridas (íon flavílium e base quinoidal) e o copigmento (BROUILLARD et al., 1989). Quando o copigmento não está presente, o cátion flavílium é fortemente solvatado e o ataque nucleofílico no carbono 2 leva à reação de hidratação com a formação da pseudobase (incolor). O empilhamento vertical do copigmento com o cátion flavílium produz uma dessolvatação, deixando o cátion menos vulnerável ao ataque nucleofílico das moléculas de água. (DANGLES & BROUILLARD, 1992a).

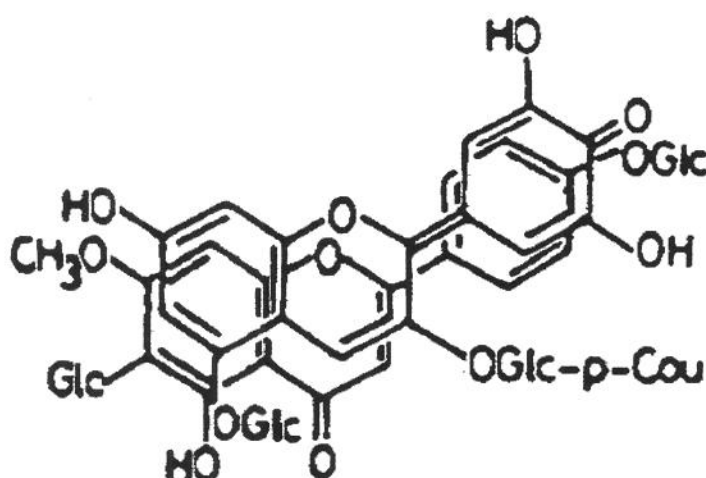


Figura 6: Modelo de copigmentação por interação hidrofóbica (GOTO, 1987).

A copigmentação pode ser influenciada pelo pH, tipo e concentração da antocianina, tipo e concentração do copigmento, temperatura e solvente (OSAWA, 1982; MAZZA & MINIATI, 1993; GOTO, 1987).

O pH é um dos fatores mais importantes na copigmentação, sendo que esta pode ocorrer de pH 1,0 até próximo de neutro (ASEN et al., 1970; WILLIAMS & HRAZDINA, 1979).

STEWART et al. (1975) estabeleceram que a pH maior que 3,0, as formas mais abundantes de antocianinas são as incolores com resquícios de formas coloridas,

semelhante ao que ocorre nos vacúolos celulares das pétalas de flores, onde o pH pode variar entre 2,5 e 7,0. A presença do complexo antocianina/copigmento desloca o equilíbrio no sentido de formação de formas coloridas (BROUILLARD *et al.*, 1990). Em 1989, BROUILLARD *et al.* constataram que é uma vantagem, em relação à coloração, a presença de formas incolores de malvidina 3,5-diglucosídeo (malvina), pois o copigmento promove a recuperação inteira ou de parte da cor e a obtenção de novas tonalidades.

DANGLES & BROUILLARD (1992a) verificaram que em soluções com pH menor que 1,0, na ausência de ácido clorogênico, o cátion flavílium da malvina é a única forma presente em quantidades mensuráveis. Adicionando-se ácido clorogênico, um copigmento, a estas soluções, ocorre deslocamento batocrômico e um pequeno efeito hipocrômico na região do visível provavelmente pelo fato do coeficiente de absorção molar do complexo antocianina/copigmento ser um pouco menor que o do cátion flavílium livre. Em pH 3,5, a reação de hidratação prevalece e as formas incolores são abundantes, portanto, sem o copigmento, estas soluções são fracamente coloridas. Neste pH, a formação do complexo entre o ácido clorogênico e as formas coloridas AH^+ e A, desloca o equilíbrio da reação de hidratação em direção ao cátion flavílium. Esse deslocamento a favor das formas coloridas leva a um pronunciado efeito hiperocrômico.

MAZZA & BROUILLARD (1990) demonstraram ser o pH 3,6 o mais efetivo para a copigmentação de cianina (cianidina 3,5-diglucosídeo) e malvina (malvidina 3,5-diglucosídeo) com ácido clorogênico. Neste pH, malvina e cianina existem essencialmente nas formas incolores carbinol e *E*-chalcona C_E , há ainda uma pequena quantidade de base quinoidal e traços de *Z*-chalcona. Esses autores verificaram que a copigmentação é observada de pH 2,0 a neutro, o que indica que o ácido clorogênico estabiliza AH^+ e A, dependendo do pH.

Os mesmos autores observaram que sob as mesmas condições de pH, concentração de pigmento e copigmento, temperatura, força iônica e solvente, o efeito de copigmentação aumenta com o grau de metoxilação e glicosilação da antocianina.

MAZZA & BROUILLARD (1990) obtiveram um aumento da absorvância no visível de 4,2 vezes para a malvina, 2,6 vezes para a cianina, 2,5 vezes para a malvidina 3-glucosídeo e um deslocamento batocrômico de 12,8, 16,8 e 15,2 nm, respectivamente, nas mesmas condições (razão molar copigmento/pigmento igual a 40, concentração do pigmento de $2,58 \times 10^{-4}$ M, pH 3,65, temperatura a 20°C). Esses resultados estão de acordo com os obtidos por SCHEFFELDT & HRAZDINA (1978) que demonstraram que a coloração da malvina é aumentada 10 vezes e que a da malvidina 3-glucosídeo, apenas 1,5 vezes com a adição de rutina nas mesmas condições.

MAZZA & BROUILLARD (1990) sugeriram que o efeito da copigmentação ocorre em paralelo à reação de hidratação; quanto maior a extensão da reação de hidratação, maior a possibilidade de recuperação da cor por copigmentação.

MINIATTI *et al.* (1992) encontraram que a ordem crescente do aumento do efeito de copigmentação foi, de maneira geral, pelargonina, malvina e por último, cianina. A pelargonina é menos metoxilada, mas, nas mesmas concentrações e pH, ela tem absorvância menor que a malvina e cianina, o que indica a existência de mais formas incolores.

A concentração de antocianinas é um fator limitante na copigmentação. Foi encontrado que a cianidina 3-glucosídeo não copigmenta em concentração menor que $3,5 \times 10^{-3}$ M. Para flores muito coloridas, a concentração de antocianinas nas células epidérmicas deve ser 10^{-2} ou maior ainda (ASEN *et al.*, 1971, 1972; ASEN, 1976).

O aumento da concentração de antocianina provoca um aumento na intensidade da cor em pH, temperatura e concentração de copigmento constantes, mas a extensão do aumento de cor varia com a estrutura da antocianina e com a razão molar copigmento/ pigmento (MAZZA & BROUILLARD, 1990). Para a maioria das antocianinas e copigmentos, há uma razão molar ótima de pigmento/copigmento na qual a intensidade e estabilidade da cor são maximizadas (MAZZA & BROUILLARD, 1987).

HOSHINO *et al.* (1980) encontraram que antocianinas que contêm um grupo acil aromático formam complexos muito mais estáveis com glucosilflavona que antocianinas não aciladas.

BARANAC *et al.* (1996, 1997a, 1997b, 1997c) demonstraram que mudanças na estrutura do copigmento podem alterar a intensidade da cor da solução antociânica. Nas mesmas condições (razão molar 1:2 de malvina e copigmento, pH 3,65), a rutina provocou um deslocamento de 24 nm e um acréscimo de 0,93 na absorvância; morina hidratada, 7 nm e 0,2 e a apigenidina-7-glucosídeo, 24 nm e 0,34. A quercetina provocou um deslocamento batocrômico de 12 nm e aumento na absorvância de 0,2, mas com razão molar de 1:1 e pH 3,65, pois aumentando-se a razão molar, ocorre a precipitação deste copigmento. A rutina e a apigenina, que se mostraram copigmentos mais eficazes, possuem estruturas glicosiladas. A rutina possui glucose e ramnose no carbono 3 e a apigenina possui glucose no carbono 7 e uma hidroxila a menos que a rutina. Os autores sugeriram que a existência de açúcar na estrutura causa melhor deslocalização dos elétrons π , diminuindo a energia no estado de transição e portanto, aumentando o deslocamento batocrômico.

A insaturação no carbono 2 e 3 no anel heterocíclico do copigmento é importante para a formação do complexo, mas ela não é imprescindível, pois as flavanonas não possuem insaturações nestas posições e formam complexos estáveis, sugerindo que forças eletrostáticas e efeitos estéricos estão adicionalmente envolvidos na copigmentação (CHEN & HRAZDINA, 1981).

O aumento da temperatura em soluções levemente ácidas de antocianinas na presença de copigmento leva a um efeito hipocrômico e hipsocrômico (BARANAC *et al.*, 1996, 1997a, 1997c), pois a interação pigmento-copigmento é exotérmica e o aumento da temperatura tende a dissociar o complexo e, portanto, há a produção de mais formas coloridas que são convertidas em espécies incolores (DANGLES & BROUILLARD, 1992b).

O efeito do copigmento diminui com o aumento da concentração de metanol ou etanol nas mesmas condições (MAZZA & BROUILLARD, 1990). O fenômeno de copigmentação está muito relacionado às transformações químicas em função do pH em meio aquoso (transferência de próton e formação de hemiacetal). Adicionando-se solventes como metanol ou etanol em solução antociânica, o espectro do pigmento não é muito alterado, mas na presença de copigmento, seu efeito hipercrômico é diminuído (MAZZA & BROUILLARD, 1990; DANGLES & BROUILLARD, 1992b). Na ausência de água, a copigmentação provavelmente não existiria. Uma propriedade físico-química muito importante da água é a constante dielétrica (ϵ), cujo valor alto se deve à sua estrutura. Diminuindo-se ϵ com a adição de metanol, etanol, sal iônico ou aumento da temperatura, o efeito da copigmentação diminui. Foi proposto que o fator que governa a associação molecular entre cátion e copigmento é a estrutura única da água no estado líquido (DANGLES & BROUILLARD, 1992b).

A copigmentação intramolecular é responsável pela estabilidade das antocianinas com dois ou mais grupos acil aromáticos. Essa estabilidade em soluções levemente ácidas a neutras é atribuída a interações hidrofóbicas entre o anel da antocianidina e os dois ácidos aromáticos. (BROUILLARD, 1981, 1983; GOTO *et al.* 1982, 1983). Esse possível empilhamento “tipo sanduíche” (Figura 7) protegeria o núcleo flavílium da reação de hidratação no carbono 2, prevenindo o deslocamento do equilíbrio no sentido de formação de formas incolores (BROUILLARD, 1981; DAVIES & MAZZA, 1993; FIGUEIREDO *et al.*, 1999).

Algumas antocianinas que possuem essa característica de copigmentação intramolecular são a gentiodelfina obtida da *Gentiana makinoi* (2 grupos cafeilglucose, um em C-5 e outro em C-3'), platiconina isolada da *Platycodon grandiflorum* (longa cadeia glucosil-cafeil-glucosil-cafeil-glucose em C-7) e a antocianina “heavenly blue” (HBA) isolada das flores de *Ipomea tricolor* (cadeia ramificada na posição C-3 com 3 moléculas de ácido glucosilcaféico e 2 unidades de glucose, uma na posição “para” do ácido caféico e outro na posição “meta” do outro ácido caféico).

Essas antocianinas possuem coloração intensa produzida pelo pigmento em si, sem a influência de íons metálicos e copigmentos (DANGLES & BROUILLARD, 1993). BAUBLIS *et al.* (1994), em estudo de estabilidade de extrato de folhas de *Tradescantia pallida* e de uvas, verificaram que o primeiro apresentava uma estabilidade maior devido a presença de antocianinas altamente aciladas sugerindo que a copigmentação intramolecular diminui a hidratação do flavílium formando pseudobase.

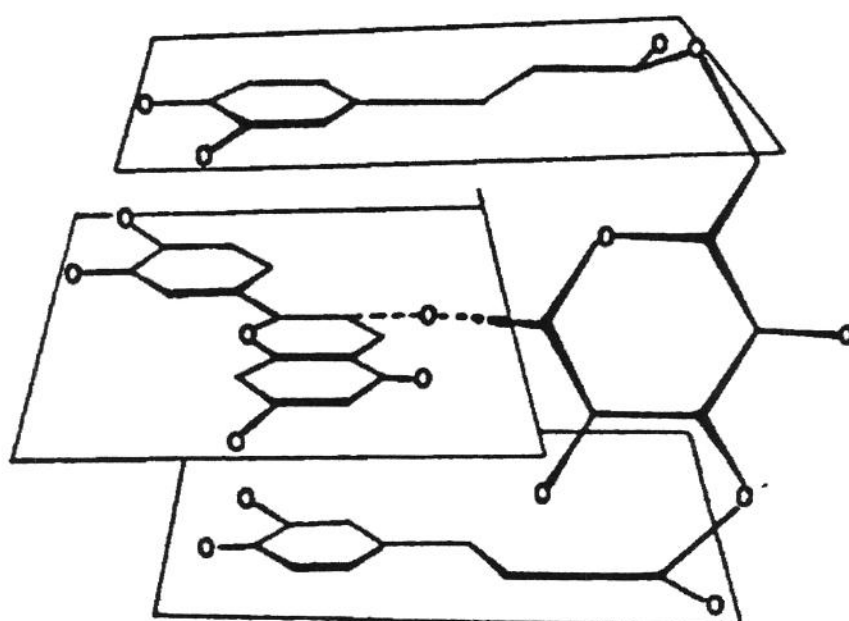


Figura 7: Copigmentação intramolecular

2.2.4. Auto-associação

Auto-associação é um fenômeno onde a intensidade da cor da antocianina aumenta mais que linearmente com o aumento da concentração deste pigmento (MAZZA & MINIATI, 1993). ASEN *et al.* (1972) observaram que em pH 3,16 a absorvância da cianina aumentou 300 vezes quando sua concentração foi aumentada apenas 100 vezes.

SCHEFFELDT & HRAZDINA (1978) verificaram uma intensificação da cor de soluções muito diluídas com a adição de rutina, mas essa intensificação era reduzida gradualmente com o aumento da concentração de antocianina, o que indica que houve auto-associação levando à estabilização do cátion flavílium e indisponibilidade para a copigmentação.

HOSHINO & GOTO (1990, 1991) através de dicroísmo circular e ressonância magnética nuclear, sugeriram que em pH entre 6 e 9, ocorre a associação das formas neutras e negativas da base quinoidal. Mais recentemente, foi observada por HOUBIERS *et al.* (1998), através de RMN, uma provável associação entre o cátion flavílium da malvidina-3-glucosídeo e a Z-chalcona.

2.2.5. Temperatura

De acordo com BROUILLARD (1982), as transformações de base quinoidal para cátion flavílium, de cátion flavílium para hemiacetal e de hemiacetal para chalcona são reações endotérmicas e qualquer aumento na temperatura favorece a formação de chalcona incolor com a diminuição das outras formas. Assim, o conteúdo de chalcona deve ser maior em temperaturas entre 60 e 80^o C do que à temperatura ambiente. Diminuindo-se a temperatura, ocorre um efeito oposto que favorece a formação de base quinoidal (AH e A), mas essa diminuição da temperatura não é suficientemente boa para estabilizar a base quinoidal, pois sua concentração de equilíbrio é muito pequena para as antocianinas mais comuns a 25^oC.

Vários estudos reportam a degradação acelerada de antocianinas em sistemas modelos e naturais pela temperatura de processamento e de estocagem (DARAVINGAS & CAIN, 1965; HRAZDINA, 1970, 1974; ADAMS *et al.*, 1973). MARKAKIS *et al.* (1957) reportou essencialmente os mesmo resultados e sugeriu o uso de processo HTST ("high temperature short time") para uma melhor retenção de pigmentos.

DURARD *et al.* (1997), em estudo de estabilidade com soluções de corantes obtidos de fonte natural, verificou que soluções em pH 3,0 e 4,0 expostas a 80° C, produziam coloração marrom relacionada aos compostos de degradação formados durante a exposição. As reações de degradação das antocianinas não são totalmente elucidadas, mas de acordo com FURTADO *et al.* (1993), com o aumento da temperatura ou presença de luz, a chalcona é clivada à diferentes compostos derivados do ácido benzóico, dependendo da antocianidina, e esses derivados dão origem a outros compostos de coloração marrom.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostra

A matéria-prima utilizada para a extração das antocianinas foi o resíduo de produção de vinhos, conhecido como bagaço, proveniente de Valinhos-SP, o qual é composto essencialmente de cascas de uva Seibel 2 e sementes.

3.2. Análise quantitativa das antocianinas do bagaço

A análise quantitativa das antocianinas do bagaço de uva Seibel 2 foi realizada de acordo com o método de FULEKI & FRANCIS (1968). Macerou-se 100,0 g de resíduo com aproximadamente 200 mL de uma mistura de etanol 95% e HCl 1,5 N (85:15, v/v) por um período de 16 h, a 5°C, em ausência de luz. Essa mistura foi filtrada em funil de vidro sinterizado nº 2 e o resíduo foi lavado repetidamente com o etanol acidificado até extração completa das antocianinas e, as sementes nele presentes, foram separadas e pesadas. A solução resultante foi elevada a um volume final de 1L e diluída na proporção 1:25 para se proceder à leitura da absorvância máxima na região visível em espectrofotômetro Beckman DU-70.

Essa análise foi feita em triplicata e para cálculo de concentração utilizou-se a equação de FULEKI & FRANCIS (1968):

$$\text{Ant. total (mg/100g de amostra)} = \frac{\text{fator de diluição} \times \text{Abs. } \lambda_{\text{máx}}}{E_{1\%}^{1\text{cm}}}$$

3.3. Análise quantitativa das antocianinas da uva Seibel 2

Uvas Seibel 2 frescas foram lavadas com água e secas com papel absorvente. As cascas foram separadas e 50 g foram tomados para a análise quantitativa realizada em triplicata segundo o método de FRANCIS (1982) já descrito em 3.2.

A solução resultante, após maceração com solução de etanol 95% e HCl 1,5 N (85:15, v/v) e filtração nas condições descritas em 3.2, foi elevada a volume final de 2 L e, para leitura da absorvância máxima, fez-se uma nova diluição na proporção 1:25. Os cálculos da concentração foram realizados de acordo com a equação citada em 3.2.

3.4. Identificação das antocianinas do bagaço de uva Seibel 2

3.4.1. Extração das antocianinas

O bagaço de uva Seibel 2 foi submetido a extração com solução metanólica de ácido cítrico 0,3% (pH 3,0) por 16 h a 5°C em ausência de luz. A mistura foi filtrada e o resíduo foi novamente submetido a mais uma extração com metanol acidificado e filtrado da forma já descrita. Os extratos foram combinados e concentrados a vácuo, à temperatura de $38 \pm 2^\circ\text{C}$ até evaporação total do metanol e teve seu perfil antociânico determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Da mesma forma, foi feita uma extração com as cascas de uvas Seibel 2 frescas e o extrato obtido foi concentrado a vácuo e analisado por CLAE.

3.4.2. Separação e purificação das antocianinas

O extrato bruto do bagaço concentrado foi cromatografado em papel Whatman Chr 3 mm usando-se HCl 1% como fase móvel. Foram obtidas duas zonas (bandas) denominadas Z1 e Z2 que foram eluídas separadamente com metanol e concentradas a vácuo a $38 \pm 2^\circ\text{C}$.

Z1 e Z2 foram recromatografadas em papel Whatman Chr 3 mm usando butanol, ácido acético glacial e água, 6:1:2 (BAW) como sistema de solventes. Foram obtidos

cinco zonas a partir de Z₁ (Z_{1.1}, Z_{1.2}, Z_{1.3}, Z_{1.4} e Z_{1.5}) e duas a partir de Z₂ (Z_{2.1} e Z_{2.2}) que foram eluídas separadamente com metanol e concentradas a vácuo a 38±2°C.

3.4.3. Análise por cromatografia líquida de alta eficiência

As antocianinas purificadas foram filtradas em membranas Shimadzu 0,45 µm x 4 mm e analisadas em cromatógrafo Shimadzu com detector UV-VIS e coluna de fase reversa C-18 (Shimadzu CLC-ODS (M), 250 x 4,6 mm com partículas de 5µm) precedida por coluna de guarda Shimadzu CLC-ODS.

A metodologia utilizada foi desenvolvida por GARCÍA-VIGUERA *et al.* (1998) com modificações. A fase móvel utilizada foi solução aquosa de ácido fórmico 5% (solvente A) e metanol (solvente B), previamente filtrados em membrana de nylon Supelco 0,45 µm x 47 mm. O gradiente de eluição se iniciou com 15% chegando a 80% de solvente B no tempo de 25 minutos, atingindo 100% de solvente B no intervalo de 25 a 30 minutos. A partir deste ponto, a eluição foi isocrática por 5 minutos. O fluxo da fase móvel foi 1mL/min, a temperatura da coluna foi mantida a 25°C e a detecção foi realizada no comprimento de onda de absorção máxima no visível de cada antocianina.

3.4.4. Análise espectrofotométrica

Com os pigmentos puros Z 1.4 e Z 1.3, obtidos em maior quantidade por cromatografia em papel com BAW, foi feita a medida do espectro de absorção de 200 a 700 nm em solução de HCl 0,1% em metanol em espectrofotômetro Beckman DU-70 e os dados espectrais obtidos foram usados para calcular a relação $A_{440}/A_{\text{máx vis}}$ da mesma forma, foi feito um espectro de absorção dos mesmos pigmentos após adição de solução metanólica de cloreto de alumínio 1%.

3.4.5. Análise química

3.4.5.1. Hidrólise ácida total

Em um tubo de ensaio, foi colocado 1mL do pigmento Z1.3 e foram 2 mL de metanol e 2 mL de HCl 1,5 N. Essa solução foi deixada por 30 minutos em banho-maria em ebulição. Decorrido o tempo de hidrólise, o tubo foi resfriado e nele foi adicionado álcool amílico suficiente para a retirada da aglicona (FRANCIS, 1982). O mesmo procedimento foi realizado com o pigmento Z1.4.

Com a fase aquosa concentrada proveniente de cada antocianina procedeu-se à cromatografia em papel Whatman Chr 1 mm juntamente com soluções padrões de glucose, arabinose, xilose, galactose e manose. A fase móvel usada foi acetato de etila - piridina - água (8:2:1) e a revelação do cromatograma foi feita com solução etanólica de ftalato de p-anisidina 0,1M seguida de aquecimento (ZWEIG & SHERMA, 1986).

Com o pigmento Z1.3, foi feita análise da aglicona por cromatografia em papel Whatman Chr 1 mm utilizando-se fórmico (ácido fórmico- ácido clorídrico concentrado- água, 5:2:3) e forestal (ácido acético glacial- ácido clorídrico concentrado- água, 30:3:10) como sistemas de solventes (FRANCIS, 1982) juntamente com padrões de petunidina (obtido de *Petunia hybrida*) e de delphinidina (obtido de *Solanun melongena* L., berinjela).

3.4.5.2. Hidrólise ácida controlada

Em um tubo de ensaio, dissolveu-se 2 mL do pigmento Z1.3 em 2 mL de metanol e adicionou-se 2 mL de HCl 2N e essa solução foi aquecida em banho-maria em ebulição. Foram retiradas alíquotas nos tempos 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20, 32 e 60 minutos de reação. Estas alíquotas foram aplicadas em papéis Whatman Chr 1mm e os cromatogramas foram desenvolvidos com BAW, AWH (ácido acético glacial- água- ácido clorídrico concentrado, 15:82:3) e HCl 1% (FRANCIS, 1982). O mesmo foi feito com o pigmento Z1.4

3.4.5.3. Hidrólise alcalina

Para a hidrólise alcalina, dissolveu-se 2 mL de cada pigmento em 2 mL de metanol em tubo de ensaio com tampa rosqueável, o tubo foi saturado com nitrogênio,

foi adicionado 1 mL de NaOH 2N e o tubo foi novamente saturado com nitrogênio; o tubo tampado e lacrado com parafilme foi deixado em temperatura ambiente por 2 h em ausência de luz. Após esse período, as soluções foram acidificadas com 1 mL de HCl 2 N, filtradas e analisadas por CLAE de acordo com 3.4.3 para comparação do tempo de retenção (FRANCIS, 1982).

3.4.5.4. Hidrólise com peróxido

Para a hidrólise com peróxido, aproximadamente 1 mL de cada pigmento em metanol em um tubo de ensaio foi adicionado de solução de peróxido a 3% até perda da cor. Adicionou-se 1 mL de solução de amônia, a mistura foi concentrada, aplicada em papel Whatman 1 mm juntamente com os padrões de açúcares segundo metodologia descrita em 3.4.5.1 (FRANCIS, 1982).

3.5. Avaliação da eficiência dos diferentes solventes

O bagaço da uva foi submetido a extração com quatro solventes diferentes livres de metanol: (1) água pH 3,0; (2) etanol 50% pH 3,0, (3) etanol 96^o GL pH 3,0 e (4) solução de bissulfito de sódio (1200 ppm de SO₂) em etanol 96^o GL.

A concentração de 1200 ppm de SO₂ na solução de bissulfito de sódio em etanol foi determinada experimentalmente. Para isso, foram preparadas soluções de bissulfito de sódio com 400, 800, 1200, 1600 e 2000 ppm de SO₂. Foram adicionados 25 mL de cada solução a béqueres contendo 10 g de bagaço de uva. Foi escolhido para solvente extrator a solução de menor concentração de SO₂ capaz de levar a perda total de cor do resíduo.

Com aproximadamente 400 mL de solvente extrator, 200 g de resíduo foram macerados por 16 h a 5^oC em ausência de luz e atmosfera de nitrogênio. Após esse período, a mistura foi centrifugada por 15 minutos a 3000 g, sendo que o precipitado foi submetido à nova extração com 400 mL de solvente extrator e o sobrenadante da centrifugação foi armazenado a 5^oC em ausência de luz.

Com a segunda extração procedeu-se da mesma forma que a primeira. O precipitado foi reservado para separação das sementes, o sobrenadante, juntamente com o proveniente da primeira extração foi filtrado a vácuo em funil de Büchner. A solução filtrada foi elevada a volume final de 2 L com o próprio solvente extrator.

Cinco mililitros de cada extrato foram evaporados a vácuo a $38\pm 2^{\circ}\text{C}$ até eliminação do solvente extrator e ressuspensos em etanol 95% acidificado com HCl 1,5 N (85:15, v/v) em balão volumétrico de 25 mL (diluição 1:5). Os cálculos de concentração foram feitos de acordo com FULEKI & FRANCIS (1968) com o fim de se comparar o poder extrator de cada solvente.

Cada extrato teve seu perfil de antocianinas determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de acordo com metodologia descrita no item 3.4.3. Antes de serem injetados no cromatógrafo, os extratos foram concentrados a vácuo a $38\pm 2^{\circ}\text{C}$ para evaporação do álcool etílico e os resíduos, ressuspensos em água.

3.6.Extração das antocianinas do bagaço

A extração das antocianinas do bagaço de uva, utilizando-se etanol 50% a pH 3,0 (acidificado com ácido cítrico), o melhor solvente extrator, foi feita com três lotes (1, 2 e 3) de 300 g de amostra. Cada lote de 300 g foi submetido a três extrações consecutivas com aproximadamente 350 mL de etanol 50% pH 3,0 em cada uma delas, por um período de 16 h a 5°C , em ausência de luz.

A primeira extração do lote 2 foi feita com o extrato obtido da última extração do lote 1 e a primeira do lote 3 foi feita com o extrato obtido na última extração do lote 2, substituindo-se os 350 mL de solvente utilizados nas demais extrações.

Cada extração foi seguida de filtração a vácuo em funil de Büchner e os filtrados foram armazenados em vidro âmbar em atmosfera de nitrogênio a -10°C em ausência de luz. Ao final das três etapas de extração, a solução final foi analisada por CLAE.

3.7. Concentração do extrato por osmose reversa

O extrato obtido no item 3.6, de volume final 4,0 L, foi concentrado por osmose reversa (OR) precedido de pré-filtragem.

1ª etapa: pré-filtragem

A pré-filtragem foi feita utilizando-se um sistema de dois cartuchos Polygard™ Millipore conectados em sequência.

2ª etapa: osmose reversa

O processo de filtração por OR foi realizado com membrana Nanomax-50® Millipore sob condições expostas na Tabela 3.

O extrato obtido foi submetido a leitura da absorvância máxima em espectrofotômetro e possíveis alterações foram determinadas por CLAE.

Tabela 3: Condições referentes ao processo de concentração do extrato antociânico por filtração por osmose reversa.

Pressão de entrada	10 Kg/cm ²
Pressão de saída	8 Kg/cm ²
Fluxo inicial	61 mL/min
Fluxo final	36 mL/min
Temperatura inicial	28°C
Temperatura final	30°C

3ª etapa: evaporação a vácuo

O extrato concentrado por OR foi evaporado a vácuo a $38 \pm 2^{\circ}\text{C}$ para eliminação do etanol residual. Foi feita análise por CLAE do extrato final concentrado para monitoramento de possível alteração na proporção de pigmentos após o processo de concentração por OR.

3.8. Preparação de extrato parcialmente purificado de bagaço de uva Seibel 2

O extrato bruto de bagaço de uva Seibel 2 concentrado por osmose reversa foi cromatografado em papel Whatman Chr 3 mm utilizando-se HCl 1% como fase móvel e tempo de corrida de 16 horas.

Após secagem dos cromatogramas em ausência de luz, as bandas correspondentes às antocianinas foram eluídas com metanol. Essa solução metanólica foi concentrada a vácuo a temperatura de $38 \pm 2^{\circ}\text{C}$ resultando no extrato parcialmente purificado (EPP) que, assim como o extrato bruto (EB), foi utilizado para os experimentos de estabilidade.

Os extratos bruto e parcialmente purificado foram analisados por CLAE a 278 e 536 nm para verificar a presença de flavonóides não antociânicos. Soluções aquosas de EB e EPP foram homogeneizadas em banho ultra-sônico por 30 s e filtradas em filtros Shimadzu de $0,45 \mu\text{m} \times 4\text{mm}$ e procedeu-se à análise por CLAE de acordo com o item 3.4.3.

3.9. Estabilidade de extrato bruto e parcialmente purificado a luz em pH 2,2, 3,0 e 4,0

Foram preparadas soluções de extrato bruto em tampões citrato-fosfato a pH 2,2, 3,0 e 4,0 com absorvância próxima de 1. Da mesma forma, o extrato parcialmente purificado foi adicionado aos tampões para obtenção de solução antociânica com absorvância próxima a 1 em cada pH. Os tampões foram previamente adicionados de sorbato de potássio na concentração de 0,5% com a finalidade de se evitar crescimento de microrganismos. As soluções, quando necessário, tiveram o pH corrigido pela adição de gotas de NaOH 1 N ou HCl 0,1N, foram filtradas a vácuo em funil de Hirsh e deixadas em repouso por 30 minutos em ausência de luz.

Em seguida, as soluções tiveram a absorvância inicial (A_0) medida no comprimento de onda de absorção máxima na região do visível ($\lambda_{\text{max vis}}$) e foram distribuídas em tubos de 14 x 100 mm com tampa rosqueável e volume nominal de 10

mL. Parte destas soluções de EB nos diferentes pH foi reservada para estabilização com as diferentes concentrações de ácido tânico.

Foram colocados três tubos de cada solução em suporte posicionado a 10 cm de distância entre duas lâmpadas do tipo “luz do dia” de 40 W em sala livre de outra fonte de luz a temperatura de $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Três tubos foram deixados como controle na mesma sala em ausência de luz.

A absorvância de cada solução foi medida no $\lambda_{\text{max vis}}$ em determinados intervalos de tempo em espectrofotômetro Beckman DU-70 até perda de aproximadamente 50% da absorvância inicial.

Alíquotas das soluções de EB e EPP em cada pH foram retiradas nos tempos inicial, intermediário (aproximadamente 25 % de perda de A_0) e final (aproximadamente 50% de perda de A_0) para análise por CLAE de acordo com a metodologia descrita em 3.4.3.

3.10. Estabilização do extrato bruto com diferentes concentrações de ácido tânico em pH 2,2, 3,0 e 4,0

Foram adicionados 10 mL de cada solução de extrato bruto nos pH 2,2, 3,0 e 4,0 (item 3.9) em tubos 14 x 100 mm com tampa rosqueável com ácido tânico Merck previamente pesado de modo a obter seis tubos de cada pH nas concentrações de 100, 200, 300, 400, 600 e 1000 mg de ácido tânico/100 mL de solução.

As soluções foram deixadas em ausência da luz por 2 horas a 23°C . Após esse período, foi feita a leitura da absorvância inicial das diferentes soluções de EB bem como as demais leituras em determinados intervalos de tempo no $\lambda_{\text{max vis}}$ de cada solução.

3.11. Efeito do pH do solvente A (ácido fórmico 5 %) sobre as formas antociânicas

Foram preparadas soluções de EB e EPP em tampão pH 2,2, 3,0 e 4,0 e a cada 2 mL de solução, foram adicionados 2 mL de ácido fórmico 5%. A absorvância e o pH das soluções foram medidos antes e 30 minutos após a adição da solução de ácido fórmico 5%.

3.12. Estabilização com ácido tânico de extrato bruto e parcialmente purificado em pH 2,2, 3,0 e 4,0 na presença de luz

Foram preparadas soluções de EB e de EPP em tampão citrato-fosfato a pH 2,2, 3,0 e 4,0 e absorvância próxima de 1 como no item 3.9. Após filtração, as soluções foram deixadas por 30 minutos no escuro, 30 mL de cada solução foram distribuídos (volume nominal de 10 mL) em tubos de 14 x 100 mm com tampa rosqueável contendo ácido tânico previamente pesado em quantidade suficiente para se obter uma concentração de 600 mg/100 mL de solução. Esses tubos foram deixados por 2 h em ausência de luz, antes de serem expostos a luz como descrito em 3.9.

O restante de cada solução foi distribuído em tubos sem ácido tânico e cada solução foi submetida à leitura da absorvância inicial, sendo que 3 tubos foram expostos à luz e outros três serviram como controle no escuro a mesma temperatura.

A absorvância de cada solução foi medida no $\lambda_{\text{max vis}}$ em determinados intervalos de tempo em espectrofotômetro Beckman DU-70 até perda aproximada de 50% da absorvância inicial. Alíquotas das soluções de EB e EPP em cada pH foram retiradas nos tempos inicial, intermediário e final para análise por CLAE.

3.13. Estabilidade de extrato bruto e parcialmente purificado em pH 2,2, 3,0 e 4,0 à temperatura de 50°C

Foram preparados soluções de EB e EPP da mesma forma descrita em 3.9. Os tubos foram deixados por 30 minutos no escuro e depois foram dispostos em banho-maria com temperatura controlada de 50°C em ausência de luz. Foram deixados três

tubos no escuro em temperatura ambiente de 23°C. A absorvância de cada solução foi medida no $\lambda_{\text{max vis}}$ em determinados intervalos de tempo utilizando-se espectrofotômetro Beckman DU-70 até perda de 50% da absorvância inicial. Alíquotas das soluções de EB e EPP em cada pH foram retiradas nos tempos inicial, intermediário e final para análise por CLAE.

3.14. Estabilização com ácido tânico de extrato bruto e parcialmente purificado em pH 2,2, 3,0 e 4,0 à temperatura de 50°C

As soluções de EB e EPP foram preparadas e distribuídas em tubos de acordo com 3.13. Foram deixados três tubos de cada solução com ácido tânico e também três das mesmas soluções sem ácido tânico em banho-maria com temperatura controlada de 50°C em ausência de luz. Foram deixados três tubos como controle no escuro a temperatura ambiente de 23°C.

A absorvância de cada solução foi medida no $\lambda_{\text{max vis}}$ em intervalos regulares em espectrofotômetro Beckman DU-70 até perda de 50% da absorvância inicial. Alíquotas das soluções de EB e EPP em cada pH foram retiradas nos tempos inicial, intermediário e final para análise por CLAE.

3.15. Estabilidade de extrato bruto e parcialmente purificado em iogurte à temperatura de 8°C

Foram adicionados 6,0 mL de extrato bruto e 12,0 mL de parcialmente purificado em iogurte sem corantes (iogurte natural de consistência cremosa 200 g) utilizando-se a própria embalagem do iogurte. As quantidades de extratos adicionadas foram determinadas previamente com o fim de se obter uma tonalidade semelhante à de iogurte comercial. O pH de cada iogurte, quando necessário, foi corrigido com gotas de NaOH 1 N e HCl 0,1 N. O experimento foi realizado em duplicata e os iogurtes foram mantidos em ausência de luz à temperatura de 8°C. Foram feitas medidas de cor em escala CIELAB utilizando-se colorímetro Hunter com fonte D65 e ângulo de observação

de 10^0 no tempo inicial (0 h), após 9 dias e 21 dias para verificação de possíveis alterações de cor.

3.16. Estabilização de extrato bruto e parcialmente purificado com ácido tânico em iogurte à temperatura de 8^0 C

Para a preparação de iogurtes coloridos com antocianinas copigmentadas com ácido tânico, primeiramente foram preparadas soluções com a mesma quantidade de extrato utilizadas no item 3.16 acrescidas de ácido tânico em quantidade suficiente para se obter a concentração de 600 mg/100 mL de iogurte. Estas misturas de pigmento e copigmento foram deixadas em ausência de luz por 2 h e, após esse período, foram adicionadas aos iogurtes em duplicata, com o cuidado de deixá-los com a cor homogênea. O pH foi corrigido, quando necessário e os iogurtes foram mantidos em ausência de luz a 8^0 C. Foram feitas medidas de cor em escala CIELAB utilizando-se colorímetro Hunter com fonte D65 e ângulo de observação de 10^0 no tempo inicial (0 h), após 9 dias e 21 dias para verificação de possíveis alterações de cor.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Amostra

A matéria prima escolhida para a realização do trabalho foi o resíduo (bagaço) de produção de vinho de uva Seibel 2 ("corbina"). Este é composto por restos de uva, predominantemente cascas e sementes. A uva Seibel 2 (Figura 8) é uma *lincencumii* x *Alicante Bouchet*, com possível concurso de *V. rupestris*. Essa uva é utilizada para a produção de vinho no estado de São Paulo, principalmente nas regiões de Jundiaí e São Roque e foi selecionada devido a sua facilidade de obtenção e sua coloração. Seus cachos são médios com uvas bem pretas que resultam em mosto de cor vermelha intensa (SOUZA, 1995).

A colheita de uva no Brasil ocorre principalmente nos meses de janeiro e fevereiro, portanto neste período os produtores de vinho estão dispensando o bagaço que é obtido no início da produção de vinho, após a moagem das uvas para a formação do mosto de fermentação.

O bagaço de uva é o subproduto primário proveniente da produção de suco de uva e de vinhos, constituído essencialmente de cascas, sementes e engaço, representando aproximadamente 20% do peso úmido da fruta original (HANG, 1988). Há muitos anos, subprodutos de uva têm sido usados tanto para a recuperação de antocianinas do bagaço (CALVI & FRANCIS, 1978; CLYDESDALE *et al.*, 1978; MAIN *et al.*, 1978) quanto para a obtenção de outros produtos presentes nesta fruta, como ácido cítrico e óleo de semente de uva (HANG, 1988).

O bagaço (Figura 9) foi selecionado para o presente trabalho, pois é totalmente descartado; tem alto teor antociânico e os corantes obtidos a partir da uva (enocianina) podem ser utilizados em alimentos (HANG, 1988; WALFORD, 1980). A enocianina é um corante obtido do bagaço da uva muito utilizado na Itália para melhorar a coloração do vinho e já foi utilizado para adulterar bebidas de má qualidade neste mesmo país (RICE, 1968). De acordo com LANCRENON (1978), com o aumento das restrições ao

uso de corantes sintéticos vermelhos, novas tecnologias para produção de corantes de uva estão sendo desenvolvidas com o intuito de substituição dos corantes vermelhos em alimentos e bebidas.



Figura 8: Uva Seibel 2



Figura 9: Resíduo (bagaço) composto de cascas e sementes de uva Seibel 2

4.2. Análise quantitativa

A análise quantitativa da casca da uva Seibel 2 mostrou uma concentração de 500,5 mg de antocianina/100 g de cascas e a análise do bagaço, 112,72 mg de antocianina/100 g de resíduo livre de sementes.

O valor de $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ usado para os cálculos foi 982. Esse valor corresponde ao encontrado por FULEKI & FRANCIS (1968) na análise das antocianinas de "cranberry". O valor 982 não permite a obtenção de concentrações absolutas, pois este pode não corresponder ao valor que se obteria com uma solução 1% de antocianinas do bagaço de uva Seibel 2, no entanto, serve como um indicativo da viabilidade do bagaço como fonte de antocianinas.

A uva Seibel 2 pode ser considerada uma uva rica em antocianinas se comparada com outras variedades de uvas, como alguns cultivares de *V. Rotundifolia* que apresentam teores de 12 a 1038 mg/100 g de bagas (LAMIKANRA, 1989) e até com outras frutas, como o açaí que é conhecida pela sua cor intensa e possui concentração de 263 mg/100 mg de cascas (BOBBIO *et al.*, 2000).

O bagaço também possui alta concentração de antocianinas, apesar de ser um resíduo proveniente de um processo de produção de vinho tinto, pois ele apresenta teor que equivale a mais de 20% do teor de antocianina da casca da uva *in natura* e a quase 50% do teor antociânico do açaí.

4.3. Análise por cromatografia líquida de alta eficiência

O método de GARCIA-VIGUERA *et al.* (1998) foi modificado, pois o mesmo não apresentou boa separação dos picos para análise das antocianinas da uva. A metodologia de GARCIA-VIGUERA *et al.* (1998) otimizada mostrou uma melhor separação dos picos do que a original e poderá ter seu tempo de análise diminuído sem alteração no gradiente de eluição, pois, após várias análises de extratos brutos de bagaço de uva, verificou-se que nenhuma antocianina do mesmo apresentou tempo de retenção entre 25 e 37 minutos, onde a eluição é isocrática com 100% de metanol

(solvente B). Porém, neste intervalo, ainda é possível encontrar flavonóides não antociânicos em soluções de extrato bruto (Anexos 6 e 7).

4.4. Identificação das antocianinas do bagaço de uva Seibel 2

O extrato bruto concentrado cromatografado em papel Whatman Chr 3 mm em HCl 1% resultou em 2 bandas mal definidas em um tempo de corrida de 16 horas. Uma das bandas (Z1) era mais larga apresentando diferentes tonalidades indicando a presença de várias antocianinas (Figura 10).

A zona 2 (Z2) era mais fraca que Z1 e possuía duas tonalidades diferentes sugerindo a presença de pelo menos duas antocianinas (Figura 10).

A fase móvel HCl 1% foi utilizada em primeiro lugar para eliminar impurezas que foram extraídas juntamente com as antocianinas pelo metanol.

Z1, ao ser cromatografada em BAW, separou-se em oito antocianinas após um tempo de corrida de 30 horas (Figura 11). Destas oito antocianinas, três se apresentaram em quantidades insuficientes para identificação. As outras cinco foram denominadas de Z 1.1, Z 1.2, Z 1.3, Z 1.4 e Z 1.5, sendo que a Z 1.4 se apresentava em quantidade visualmente maior que as outras.

A zona 2 (Z2) cromatografada em BAW apresentou duas antocianinas após corrida de 52 horas (Figura 12) denominadas de Z 2.1 e Z 2.2 em quantidades relativamente menores e de cor menos intensa que as obtidas a partir de Z1.

Assim, por cromatografia em papel, foi observada a presença de pelo menos 13 antocianinas diferentes. Por CLAE, verificou-se a presença de vários picos referentes a diferentes antocianinas e que o extrato do bagaço e da uva Seibel 2 apresentam o mesmo perfil antociânico (Anexo 1). Os cromatogramas 3 e 4 (Anexo 2) mostram que o pico com tempo de retenção de 16,3 minutos (proporção de 49,9% em área) corresponde à Z1.4 e o pico com 14,9 minutos (proporção de 13,4% em área) à Z1.3.

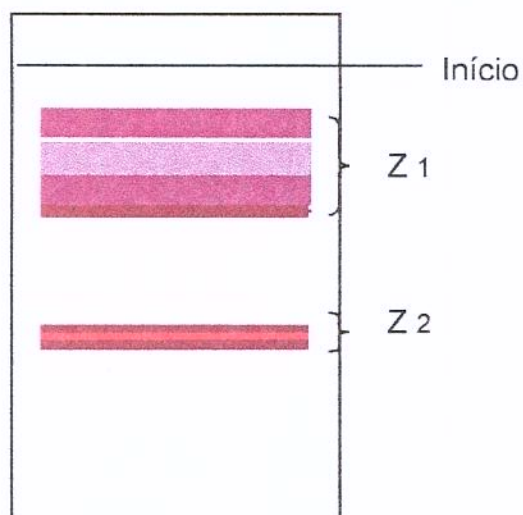
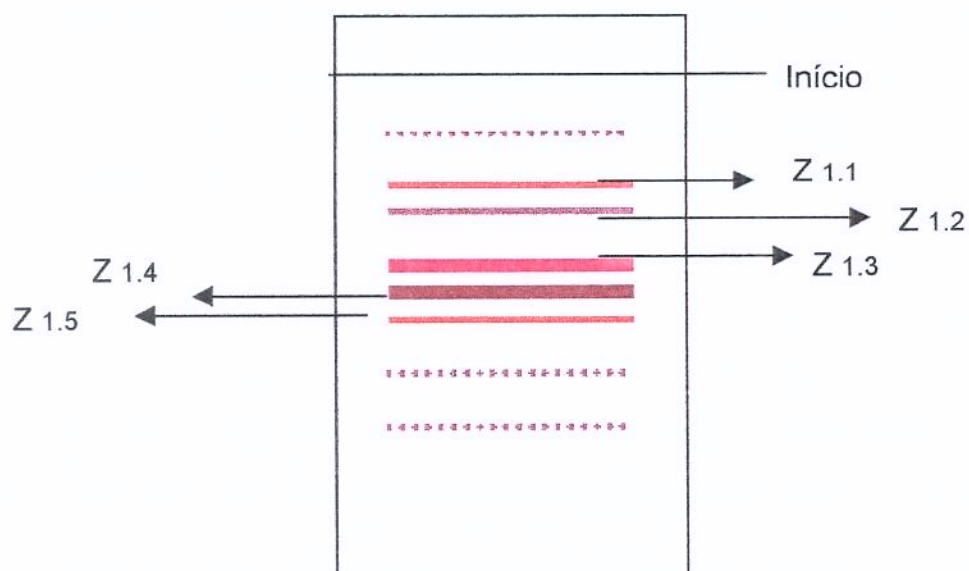


Figura 10: Esquema do cromatograma do extrato bruto após corrida de 16h em HCl 1%



..... , traços de antocianinas.

Figura 11: Esquema do cromatograma de Z1 após corrida de 30 horas com BAW

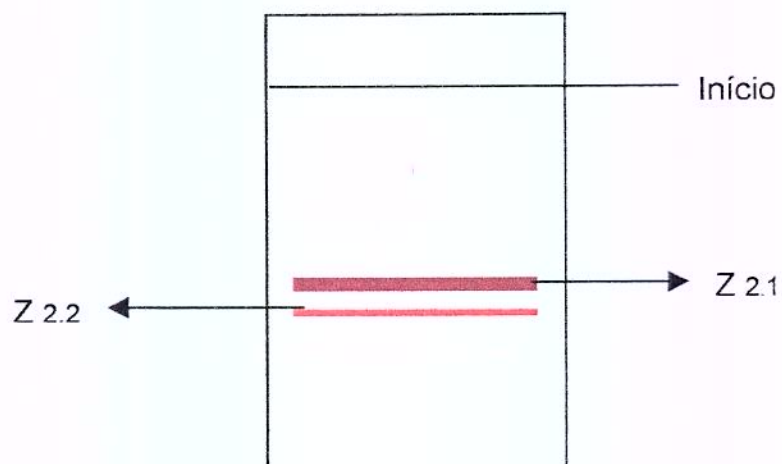


Figura 12: Esquema do cromatograma de Z2 após corrida de 52 horas com BAW

4.4.1. Identificação das antocianinas Z 1.3 e Z 1.4

Após hidrólise total ácida de Z 1.4 e de Z.1.3, os açúcares separados foram analisados por cromatografia em papel juntamente com padrões de açúcares comumente presentes em antocianinas (arabinose, glucose, xilose, galactose e ramnose). Foi revelada nos cromatogramas uma mancha com mesmo Rf da arabinose, o que indica que o açúcar ligado nas antocianidinas de Z1.4 e Z1.3 é a arabinose.

Na hidrólise ácida controlada, as alíquotas retiradas foram analisadas por cromatografia em papel (CP) em HCl 1%, BAW e AWH resultando em duas manchas referentes a antocianidina e a antocianina, tanto para Z1.3 e Z1.4, em todos os sistemas utilizados. Por esse resultado mais o resultado obtido na hidrólise total, conclui-se que existe apenas uma arabinose ligada à antocianidina de Z1.3 e Z1.4.

Após a hidrólise alcalina, os pigmentos Z 1.4 e Z1.3 foram analisados por CLAE e demonstraram o mesmo tempo de retenção que antes da hidrólise, indicando que não há ácidos nas moléculas (FRANCIS, 1982). BAKKER & TIMBERLAKE (1985), ao identificar antocianinas em cascas de uvas para produção de vinhos do porto, obtiveram tempos de retenção bem diferentes entre diversas antocianinas e suas correspondentes aciladas.

O espectro de Z 1.4 mostrou picos de absorção máxima em 538 nm no visível e 276 nm na região do UV e de Z1.3 a 538 nm e a 274 nm. Os valores de comprimento de onda máximos de 538 e 276 nm estão na mesma faixa que os da malvidina-3-glucosídeo que é a antocianina principal de muitas variedades de uva (RIBÉREAU-GAYON, 1982; BAKKER & TIMBERLAKE, 1985).

Como a antocianina Z 1.4 não apresentou deslocamento batocrômico com a adição de cloreto de alumínio, este pigmento não possui grupos hidroxilas vicinais no anel B, o que suporta a hipótese de que a antocianidina de Z 1.4 seja malvidina, pois a cianidina e a perlagonidina, antocianinas também sem hidroxilas vicinais, possuem $\lambda_{\max}$ menores que o apresentado por Z1.4. Já o pigmento Z1.3 apresentou forte coloração azul após adição de cloreto de alumínio, com deslocamento de 10 nm, o que indica a presença de hidroxilas vicinais, como ocorre com a cianidina, petunidina e delfinidina. Uma vez que a petunidina e a delfinidina possuem absorção máxima no mesmo comprimento de onda, foi necessária a realização de uma análise por CP usando-se delfinidina e petunidina como padrão. A antocianidina de Z1.3 apresentou o mesmo Rf da petunidina após análise da aglicona por CP com as fases móveis forestal e fórmico.

Os espectros de Z 1.4 e de Z1.3 não apresentaram ombro em 440 nm no espectro de absorção em solução metanólica acidificada (HCl 0,01%); a presença deste ombro indica a existência de açúcar na posição 5 da molécula (além do presente na posição 3). Isso pode ser demonstrado pela razão entre a absorvância a 440 nm e absorvância máxima na região do visível. Razão maior que 20 indica a presença de açúcar ligado apenas na posição 3 na antocianidina. Como a razão do pigmento Z1.4 foi 21 e de Z1.3 foi 24, conclui-se que a molécula de arabinose está ligada apenas na posição 3 da antocianidina, o que foi confirmado através da hidrólise com peróxido que retira apenas açúcares presentes na posição 3 (FRANCIS, 1982).

Foi utilizado padrão de malvidina 3-glucosídeo da Extrasynthese (Genay, França) na análise por CLAE para comparação do tempo de retenção, sendo que essa antocianina apresentou o mesmo tempo de retenção que Z1.4 e, através de co-

cromatografia, apresentaram um único pico. Pode-se concluir que a metodologia não é adequada para a identificação do açúcar, portanto a hidrólise ácida ainda se mostra muito eficiente quando não é possível o uso de técnicas mais avançadas, tais como RMN e espectrofotometria de massa. CASTEELE (1983) observou a dificuldade em se separar certos grupos de antocianinas, os diglicosídeos eluem antes dos monoglicosídeos, mas é difícil obter separação entre picos que possuem mesma antocianidina e número de açúcares, mas com natureza do açúcar diferente.

Pelos resultados obtidos, foi concluído que a antocianina Z 1.4 é uma malvidina 3-arabinosídeo e que Z1.3 é uma petunidina 3-arabinosídeo. O perfil antociânico encontrado para o bagaço de uva Seibel 2 é muito semelhante ao encontrado por BONATTI (1986) nas cascas de algumas variedades de uvas italianas utilizadas para a preparação de vinhos (uvas Croatina, Rara e Barbera), sendo que a autora encontrou malvidina 3-glucosídeo e petunidina 3-glucosídeo nestas uvas em proporções semelhantes às das principais antocianinas da Uva Seibel 2.

4.5.Avaliação da eficiência dos diferentes solventes

Os fatores que foram considerados importantes para a escolha do melhor solvente extrator foram capacidade de extrair maior quantidade de pigmento e preço. O solvente que melhor extraiu as antocianinas do bagaço foi o etanol 50% a pH 3,0 que resultou em um extrato com 98,1 mg de antocianinas/ 100 g de resíduo livre de sementes.

O etanol 96^oGL a pH 3,0 e o etanol adicionados de 1200 ppm dióxido de enxofre também se mostraram bons solventes extratores; com estes foram obtidas soluções com concentrações de 95,1 e 85,6 mg de antocianina/100g de resíduo, respectivamente. Embora esses dois solventes sejam bons extratores, eles apresentam algumas desvantagens como a necessidade de eliminação de SO₂ e maior extração de clorofila pelo etanol 96^oGL.

A água a pH 3,0, além de extrair pouca quantidade de antocianinas (50,3 mg/100 g de resíduo livre de sementes), é inviável, pois extraiu outras substâncias que dificultaram consideravelmente a filtração. AYED *et al.* (2000), em estudo com antocianinas de bagaço de uva, encontraram que a extração com solução aquosa adicionados de 2000 ppm de SO₂ foi mais eficiente que a extração com água. No Brasil, existe a viabilidade em se trabalhar com o etanol devido ao baixo custo deste solvente, então pode-se descartar as extrações apenas com solventes aquosos.

De acordo com METIVIER *et al.* (1980), o metanol é 20% mais eficiente que o etanol para extração de antocianinas, mas, devido à alta toxicidade deste solvente, preferiu-se a utilização do etanol para a realização do presente trabalho. Para a acidificação dos solventes extratores, foi utilizado o ácido cítrico que é amplamente empregado na indústria de alimentos e sua concentração (3%) foi a necessária para se obter pH 3,0. BIACS *et al.* (1995), estudando o processo de extração das antocianinas da uva com etanol acidificado com ácido clorídrico ou tartárico, verificaram que o ácido utilizado pode afetar a extração das antocianinas, mas não provoca diferenças na cor do produto final, no caso, pó preparado a partir de uva, como verificado através de medidas em escala colorimétrica.

Os diferentes extratos apresentaram o mesmo perfil de antocianinas determinado por CLAE, isto é, nenhum solvente extraiu seletivamente um dos pigmentos (Anexo 3 e 4). Assim, o solvente escolhido para se prosseguir com o trabalho foi o etanol 50% a pH 3,0.

4.6. Concentração do extrato por osmose reversa

O processo de filtração por osmose reversa teve duração de 1h e 20min com fluxo de início 61 mL/min e terminando com 36 mL/min. Foi possível reduzir o volume de 4L para 0,6 L em temperatura máxima de 30°C, ou seja, uma redução de 75%. O extrato inicial que possuía 3,4% de sólidos solúveis terminou o processo com 10% de sólidos solúveis, o que equivale a uma concentração de 69%, essa diferença de valores se deve provavelmente a perdas de extrato durante a pré-filtragem.

De acordo com DITSCHAEVER *et al.* (1991), o processo de concentração por osmose reversa retira a água, mantendo os componentes do extrato nas mesmas proporções e o mesmo pH inicial. Este fato foi confirmado no presente estudo, pois após a concentração, o extrato do bagaço permaneceu com o pH inalterado e não apresentou mudanças no perfil antociânico, como determinado por CLAE (Anexo 5).

4.7. Preparação do extrato parcialmente purificado (EPP) de bagaço de uva Seibel 2

Durante o processo de extração, outras substâncias como flavonóides não-antociânicos, açúcares, leucoantocianinas, produtos de degradação e produtos de reações de escurecimento podem ser extraídos juntamente com as antocianinas (FRANCIS, 1982). O bagaço de uva Seibel 2, por ser um resíduo de produção de vinho, pode conter estes compostos e, por isso, foi utilizada cromatografia em papel com HCl 1% como fase móvel com o objetivo de se obter um extrato livre de impurezas.

Foi feita a análise por CLAE na região do visível e ultravioleta para se verificar a existência de flavonóides não-antociânicos nos extratos bruto (EB) e parcialmente purificado (EPP), uma vez que as antocianinas são detectadas tanto na região da luz visível quanto na da ultravioleta e os outros flavonóides não podem ser detectados em comprimentos de onda próximos de 536 nm. Isto pode ser verificado comparando-se o cromatograma de EB (ANEXO 6) a 536 nm com o seu correspondente a 278 nm, onde se observa a presença de um pico com tempo de retenção de 17,2 minutos e área de 1104811 (equivalente a 28,2% da área total) sem o seu correspondente a 536 nm; neste mesmo cromatograma, a área correspondente ao pico da antocianina com tempo de retenção 16,5 minutos é de 165120 (equivalente a 19,9% da área total). Pode-se concluir que o EB possui um flavonóide não antociânico extraído em grande quantidade juntamente com as antocianinas e outros flavonóides presentes em menores quantidades, como se pode observar picos pequenos na região UV a 278 nm sem correspondentes na região visível a 536 nm. O cromatograma de EPP (ANEXO 7) não apresenta o pico de tempo de retenção de 17,2 minutos a 278 nm, o que indica que a

purificação por cromatografia em papel eliminou, juntamente com outras impurezas, os flavonóides não antociânicos.

4.8. Estabilidade de extrato bruto e parcialmente purificado à luz a 23°C em pH 2,2, 3,0 e 4,0

A estabilidade das antocianinas, em geral, está relacionada com sua estrutura química, pH, presença ou ausência de luz e de outros flavonóides e mesmo com a concentração da própria antocianina ou de outras antocianinas.

A degradação das antocianinas de EB e EPP em pH 2,2, 3,0 e 4,0 foi acompanhada por espectrofotometria e por cromatografia líquida de alta eficiência, observando-se a perda de absorvância da solução e a perda de áreas dos picos relacionados com os pigmentos, respectivamente.

As soluções de EB e EPP nos diferentes pH apresentaram $\lambda_{\max \text{ vis}}$ distintos (Tabela 4) nos quais foram realizadas as leituras de absorvância e análises por CLAE. As soluções de EB e EPP com absorvância inicial próxima a 1 em pH 2,2 possuem $\lambda_{\max \text{ vis}}$ menores que os das outras soluções, uma vez que neste pH a forma antociânica predominante é o cátion flavílium (vermelho) (BROUILLARD & DUBOIS, 1977; CHEMINAT & BROUILLARD, 1986; HOUBIERS *et al.*, 1998). Aumentando-se o pH, as soluções apresentam $\lambda_{\max \text{ vis}}$ maiores, pois há maior quantidade de base quinoidal (azul). As soluções de EB possuem $\lambda_{\max \text{ vis}}$ maiores do que as de EPP no mesmo pH devido à presença de flavonóides não antociânicos que estariam atuando como copigmento.

Com a degradação das antocianinas, pode-se dizer que praticamente não houve alteração no $\lambda_{\max \text{ vis}}$ de cada solução, pois uma mudança de apenas 2 nm pode ser considerada inerente ao próprio espectrofotômetro (Tabela 4). Embora essa variação tenha sido pequena, foi observada visualmente a mudança de coloração vermelha para marrom nas soluções de EB e EPP principalmente em pH 4,0 e de intensidade um pouco mais fraca em pH 3,0. A não existência de picos na região do visível nas

soluções de EB e EPP a pH 4,0 pode sugerir que esta cor marrom tenha alterado o espectro de absorção e que o surgimento desta tonalidade esteja mais relacionada ao efeito do pH do que à exposição à luz. De acordo com FRANCIS (1982), os produtos de degradação de antocianinas são de cor marrom-avermelhada, portanto a cor percebida visualmente pode ocorrer devido à maior produção de compostos de degradação em pH 4,0 e 3,0.

Tabela 4: Efeito de luz e pH a 23°C sobre os valores de $\lambda_{\text{max vis}}$ inicial e final, constante de velocidade de reação (k) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) para as soluções de EB e EPP.

Solução	$\lambda_{\text{max vis}}$ (nm)		k (h ⁻¹)	$t_{1/2}$ (h)
	Inicial	Final		
EB pH 2,2 Luz	522	522	0,002989	231,8
Escuro	522	524	0,000262	2645,0
EB pH 3,0 Luz	524	524	0,003236	214,2
Escuro	524	522	0,000320	2165,6
EB pH 4,0 Luz	528	s/ pico ^a	0,003213	215,7
Escuro	528	s/ pico ^a	0,000316	2193,0
EPP pH 2,2 Luz	520	520	0,005475	126,6
Escuro	520	522	0,000398	1741,2
EPP pH 3,0 Luz	520	520	0,007568	91,6
Escuro	520	522	0,000529	1310,0
EPP pH 4,0 Luz	524	s/ pico ^a	0,004327	160,2
Escuro	524	s/ pico ^a	0,000362	1914,4

^a, não foi detectado pico pelo espectrofotômetro.

Os valores da constante de velocidade da reação (k) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) foram calculados a partir das absorvâncias iniciais e finais de cada solução para reações com cinética de primeira ordem, como pode ser observado na Figura 13. Os valores de k (Tabela 4) indicam que para todos os extratos, a luz possui um forte efeito

sobre a degradação das antocianinas, pois todas as soluções possuem valores de k aproximadamente dez vezes maiores na presença do que na ausência de luz.

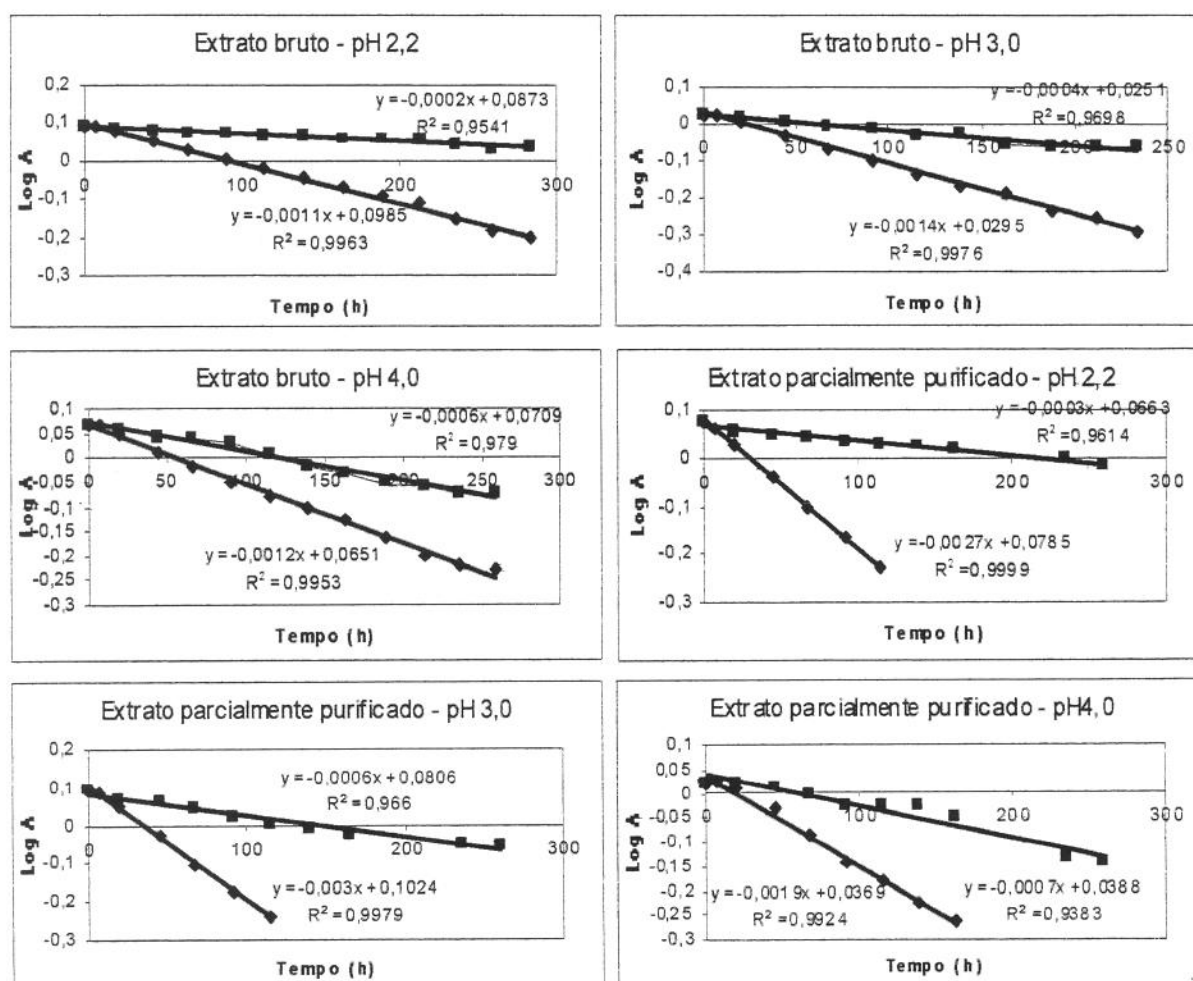


Figura 13: Efeito de luz e pH na estabilidade das antocianinas dos extratos bruto e parcialmente purificado em pH 2,2, 3,0 e 4,0. ♦, soluções na presença de luz; ■, soluções em ausência de luz.

O efeito protetor dos flavonóides não antociânicos também é muito acentuado, como pode ser visto na Tabela 4, tanto na presença quanto na ausência de luz, pois o tempo de meia-vida é maior para as soluções preparadas com EB quando comparadas com as preparadas com EPP no mesmo pH.

Comparando-se os valores de k (Tabela 4) para as soluções de EB a pH 2,2, 3,0 e 4,0, verifica-se que houve maior degradação a pH 3,0 e 4,0, tanto na presença quanto na ausência de luz, o que seria esperado, uma vez que as formas antociânicas mais abundantes nestes pH são as incolores (pseudobase e chalcona) que são mais susceptíveis à degradação, sendo a chalcona degradada a derivados do ácido benzóico (FURTADO *et al.*, 1993). É importante notar que apesar das soluções terem absorvâncias iniciais próximas a 1, ou seja, semelhantes, as concentrações de antocianinas são diferentes, pois em tampões de pH 4,0 e 3,0, são necessárias quantidades maiores de extrato para atingirem absorvância 1, principalmente em pH 4,0.

A Tabela 4 mostra que os valores de k para as soluções de EB em pH 3,0 e 4,0 são próximos tanto na ausência quanto na presença de luz. Essa semelhança de valores pode ser atribuída à formação da coloração marrom nestes pH, que possivelmente interferiu na análise, sendo que o esperado seria valores de k no pH 4,0 maiores do que no pH 3,0 (BROUILLARD, 1982; FURTADO *et al.*, 1993).

Para o EPP, foram encontrados valores de k a pH 4,0 menores do que a pH 2,2 e pH 3,0 na luz e no escuro, de onde se poderia concluir que a solução de EPP a pH 4,0 seria a mais resistente a degradação tanto em presença quanto em ausência de luz. No entanto, vale ressaltar que foi notada a presença de coloração marrom visualmente mais forte em pH 4,0 do que em pH 3,0. DUHARD *et al.* (1997), em estudo de estabilidade de corantes comercializados produzidos a partir de fontes naturais, observaram que os corantes obtidos a partir de uva italiana e francesa eram mais estáveis a pH 4,0 do que a pH 3,0 em experimentos de degradação com luz e com calor. O aparecimento de cor marrom percebida visualmente foi confirmado por esses autores através do uso de medidas na escala colorimétrica CIELAB.

A partir dos valores das áreas dos picos obtidos por CLAE nos tempos iniciais e finais (aproximadamente 50% de perda de absorvância), foram calculados a velocidade de reação (k) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) para a malvidina 3-arabinosídeo (mv 3-ar) e

para a petunidina 3-arabinosídeo (pt 3-ar) em EB e EPP (Tabelas 5 e 6), utilizando-se equações para reações de cinética de primeira ordem.

Os valores de k e $t_{1/2}$ obtidos por CLAE (Tabela 5 e 6) confirmam efeito determinante da luz na degradação das antocianinas, tanto para as soluções de EB quanto para as de EPP, pois os valores de k das soluções expostas à luz são aproximadamente 10 vezes maiores que os valores de k para as suas correspondentes na ausência de luz, como também foi observado por medidas espectrofotométricas. A luz possui efeito degradante para as antocianinas, mas as reações fotoquímicas de degradação que ocorrem têm sido pouco descritas na literatura (FURTADO *et al.*, 1993).

Tabela 5: Efeito de luz e pH a 23°C sobre os valores de constante de velocidade de reação (k) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) obtidos por CLAE para a malvidina 3-arabinosídeo.

Solução		k (h ⁻¹)	$t_{1/2}$ (h)	Perda de Ar ^a (%)	Tempo ^b (h)
EB pH 2,2	Luz	0,002842	243,8	52,2	259,5
	Escuro	0,000382	1814,1	54,8	2079,3
EB pH 3,0	Luz	0,004246	163,2	72,8	306,5
	Escuro	0,000422	1642,2	58,4	2079,3
EB pH 4,0	Luz	0,004835	143,3	63,6	209,2
	Escuro	0,000544	1273,9	67,7	2079,3
EPP pH 2,2	Luz	0,007244	95,7	56,9	116,2
	Escuro	0,0004015	1669,9	57,8	2079,3
EPP pH 3,0	Luz	0,010669	65,0	70,9	115,8
	Escuro	0,000689	1005,8	76,1	2079,3
EPP pH 4,0	Luz	0,010943	63,3	78,0	138,3
	Escuro	0,001479	468,6	95,4	2079,3

^a, área do pico; ^b, tempo em que foi retirada a alíquota final.

Tabela 6: Efeito da luz e pH a 23°C sobre os valores de constante de velocidade de reação (k) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) obtidos por CLAE para a petunidina 3-arabinosídeo.

Solução		k (h ⁻¹)	$t_{1/2}$ (h)	Perda de Ar ^a (%)	Tempo ^b (h)
EB pH 2,2	Luz	0,004082	169,8	65,3	259,5
	Escuro	0,000440	1575,0	59,9	2079,3
EB pH 3,0	Luz	0,004478	154,8	74,7	306,5
	Escuro	0,000583	1188,7	70,3	2079,3
EB pH 4,0	Luz	0,009862	70,3	87,3	209,2
	Escuro	0,000676	1025,1	75,5	2079,3
EPP pH 2,2	Luz	0,007432	93,2	57,8	116,2
	Escuro	0,002372	692,2	99,3	2079,3
EPP pH 3,0	Luz	0,012272	56,5	75,9	115,8
	Escuro	0,002498	277,4	99,4	2079,3
EPP pH 4,0	Luz	0,014992	46,2	87,4	138,3
	Escuro	0,002744	252,6	99,7	2079,3

^a, área do pico; ^b, tempo em que foi retirada a alíquota final.

A presença dos flavonóides não antociânicos no EB possui forte influência na estabilidade das antocianinas, como foi observado também nos resultados obtidos por espectrofotometria. Os tempos de meia-vida para as soluções de EB são maiores que as soluções de EPP no mesmo pH; neste caso os flavonóides copigmentariam com as antocianinas protegendo a molécula de reações de degradação.

A análise por CLAE mostrou que o pH possui efeito marcante na estabilidade das antocianinas. As soluções antociânicas de EB e EPP possuem tempos de meia-vida maiores em pH 2,2, onde a forma colorida cátion flavílium está em maior quantidade. A

perda da cor segue a ordem esperada, as soluções em pH 2,2 são as mais estáveis, seguidas das mesmas em pH 3,0 e 4,0 onde as formas antociânicas incolores, mais suscetíveis à degradação, estão em maior proporção, principalmente nas soluções em pH 4,0 (BROUILLARD, 1982; FURTADO *et al.*, 1993). Os valores de k e tempo de meia-vida para a mv 3-ar são bem diferentes em todos os pH, com exceção das soluções de EPP em pH 3,0 e 4,0 expostas à luz que possuem valores muito próximos (64,8 e 63,8, respectivamente). Essa similaridade de valores pode ter ocorrido devido a variação que pode ocorrer em análises por CLAE.

A degradação da pt 3-ar também é claramente influenciada pelo pH e pela luz e, da mesma forma que a mv 3-ar, ela apresenta valores de k e $t_{1/2}$ bem diferentes um dos outros e a mesma ordem de estabilidade entre os diferentes pH. A pt 3-ar possui valores de k maiores que os da mv 3-ar, isto poderia ser explicado pelo efeito exercido pela auto-associação das moléculas de antocianinas na sua estabilidade (HOSHINO, 1991; GOTO & KONDO, 1991; MINIATI *et al.*, 1992). O fato da pt-3-ar estar em menor quantidade dificultaria o fenômeno da auto-associação entre as formas coloridas deste pigmento, já a malvidina 3-arabinosídeo, pigmento com maior concentração, possui maior quantidade de formas coloridas disponíveis para a auto-associação fornecendo maior estabilidade a esta antocianina (RODRIGO *et al.*, 1997). FURTADO *et al.* (1993), em estudo de estabilidade com antocianidinas, verificaram que a metoxilação aumenta a estabilidade fotoquímica das formas antociânicas coloridas. Este fator também influencia fazendo com que a malvidina 3-arabinosídeo, que possui três metoxilas no anel B, possua constantes de velocidade de reação menores que as da petunidina 3-arabinosídeo.

4.9. Estabilização com diferentes concentrações de ácido tânico em soluções de EB em pH 2,2, 3,0 e 4,0 em presença de luz a 23°C

O copigmento escolhido para a estabilização das antocianinas foi o ácido tânico que forma complexos estáveis com as antocianinas, sendo que seu uso já foi estudado

com resultados positivos na estabilização da cor (MACCARONE *et al.*, 1987; BOBBIO *et al.*, 1990; BAILONI *et al.*, 1999).

As Tabelas 7, 8 e 9 mostram os valores de absorvância e comprimento de onda de absorção máxima das soluções de EB com as diferentes concentrações de ácido tânico, o aumento de absorvância produzido pela adição do copigmento e também os valores de k e $t_{1/2}$. Esses valores foram obtidos através das leituras da absorvância durante a exposição à luz das soluções de EB nos três pH.

Os resultados indicaram que a adição de ácido tânico causa efeito hiperacrômico e batocrômico em todas as soluções, mas esses efeitos são mais acentuados em altas concentrações de copigmento.

Tabela 7: Efeito de concentração de ácido tânico sobre valores de absorvância (A) inicial, comprimento de onda de absorção máxima ($\lambda_{\text{max vis}}$), constante de velocidade de reação (k) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) para as soluções de EB em pH 2,2 expostas à luz.

Concentração de ácido tânico (mg/ 100mL)	A inicial	Aumento de A (%)	$\lambda_{\text{max vis}}$ (nm)	k (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)
0	1,1015	-	522	0,0030	231,0
100	1,1790	15,7	530	0,00261	265,5
200	1,2793	16,1	534	0,00187	370,6
300	1,3206	19,9	536	0,00182	380,8
400	1,3235	20,2	536	0,00196	359,1
600	1,4198	28,9	538	0,00164	422,6
1000	1,4643	32,9	540	0,00089	778,7

Tabela 8: Efeito de concentrações de ácido tânico sobre valores de absorvância (A) inicial, comprimento de onda de absorção máxima ($\lambda_{\text{max vis}}$), constante de velocidade de reação (k) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) para as soluções de EB em pH 3,0 expostas à luz

Concentração de ácido tânico (mg/ 100mL)	A inicial	Aumento de A (%)	$\lambda_{\text{max vis}}$ (nm)	k (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)
0	1,3106	-	524	0,0032	216,6
100	1,5158	15,7	530	0,00261	265,5
200	1,6804	28,2	534	0,00285	243,2
300	1,7783	35,7	536	0,00275	252,0
400	1,8647	42,3	536	0,00282	245,7
600	1,9882	51,7	538	0,00282	245,7
1000	2,1633	65,1	540	0,00256	270,7

Tabela 9: Efeito de concentrações de ácido tânico sobre valores de absorvância (A) inicial, comprimento de onda de absorção máxima ($\lambda_{\text{máa vis}}$), constante de velocidade de reação (k) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) para as soluções de EB em pH 4,0 expostas à luz

Concentração de ácido tânico (mg/ 100mL)	A inicial	Aumento de A (%)	$\lambda_{\text{max vis}}$ (nm)	k (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)
0	1,1916	-	528	0,0032	216,6
100	1,3583	13,8	530	0,00247	280,6
200	1,5403	29,3	534	0,00304	228,0
300	1,6823	41,2	536	0,00387	179,1
400	1,7826	49,6	536	0,00434	159,7
600	2,0189	69,4	538	0,00484	143,2
1000	2,3264	95,2	540	0,00555	124,9

O pH possui forte influência nas reações de copigmentação. Em pH 2,2, as soluções apresentam efeito hipercrômico fraco se comparadas com as soluções a pH 3,0 e 4,0, nas mesmas concentrações de ácido tânico. As soluções a pH 4,0 se mostraram as mais susceptíveis ao aumento de intensidade da cor pela ação do copigmento. Como já foi previamente comentado no item 4.8, as soluções em pH menos ácidos necessitam de maiores quantidades de extrato para atingirem absorvância próxima de 1, pois o equilíbrio é deslocado no sentido de formação de formas incolores. Em pH 4,0, as formas que estavam incolores passam para coloridas, pois o complexo que se forma entre as espécies íon flavílium ou base quinoidal com o copigmento é estável e tende a deslocar o equilíbrio no sentido de formação de estruturas coloridas (BROUILLARD, 1982; BROUILLARD *et al.*, 1989; BROUILLARD *et al.*, 1990). As soluções foram deixadas em descanso por duas horas, para que o equilíbrio entre as diferentes estruturas e o complexo formado fosse atingido antes de se iniciar a degradação pela luz. Pela adição de copigmento, neste caso o ácido tânico, houve um deslocamento batocrômico que aparentemente sofreu influência do pH, pois as soluções de EB possuem praticamente o mesmo comprimento de onda de absorção máxima nos três pH, considerando-se soluções com a mesma concentração de ácido tânico.

Apesar das soluções de EB a pH 4,0 terem sofrido maior efeito hipercrômico provocado pela adição de copigmento, os valores de k e $t_{1/2}$ (Tabela 9) indicam que a perda de sua coloração adquirida com a copigmentação é mais rápida que nos outros pH e também foi notada visualmente a formação de uma cor marrom. O aparecimento desta mesma cor também foi observado a pH 3,0, embora com menor intensidade. O pH 2,2 se mostrou o mais efetivo para reações de copigmentação, seguido do pH 3,0 e, por último, o pH 4,0. Estes dados estão de acordo com os obtidos por MINIATI *et al.* (1992) que em estudo de copigmentação com diferentes antocianinas, encontraram que soluções antociânicas com copigmento apresentavam maior retenção de cor a pH 2,5 do que a 3,5, sendo que a perda de cor maior foi a pH 4,5, após exposição de 120 dias a 5°C e 20°C.

A concentração de ácido tânico escolhida para a realização dos experimentos de estabilização de antocianinas de EB e EPP em cada pH sob efeito de luz e temperatura (50 e 60°C) foi 600 mg/100 mL, pois ela se mostrou eficiente e a concentração de 1000 mg/100 mL não parece oferecer maior proteção. Apesar da concentração de 100 mg/100 mL ter sido eficiente na manutenção da cor para todos os pH, foi escolhida a concentração de 600 mg/100 mL pois, mesmo não aumentando o $t_{1/2}$ em solução de pH 4,0, ela provocou um aumento na intensidade da cor muito evidente em todos os pH e um aumento no $t_{1/2}$ no pH 2,2 de quase o dobro do que o valor sem o copigmento.

4. 10. Efeito da acidez do solvente A na análise por CLAE

As áreas dos picos da malvidina 3-arabinosídeo e da petunidina 3-arabinosídeo são maiores a pH 4,0 e menores a pH 2,2, sendo de valor intermediário o pico a pH 3,0, mesmo todas as soluções tendo absorvância próxima de 1,0. Esse fato provavelmente se deve à detecção das formas incolores presentes a pH 3,0 e 4,0, o que sugere que a acidez da fase móvel desloca o equilíbrio no sentido de formação de espécies coloridas, principalmente o cátion flavílium.

Com o objetivo de se observar o comportamento das soluções antociânicas de EB e EPP em pH 2,2, 3,0 e 4,0 no solvente A, estas foram diluídas a 50% com a solução de ácido fórmico 5% (solvente A). A absorvância e o pH de cada solução foram medidos antes e depois da diluição e os valores de absorvância encontrados não correspondem àqueles esperados em uma diluição 1:1 (Tabela 10). Esses resultados indicam que a solução de ácido fórmico 5%, que possui pH 1,65, é suficientemente ácida para deslocar o equilíbrio para a formação de espécies coloridas que seriam detectadas no cromatógrafo.

Não foi possível fazer as diluições com solução de ácido fórmico 5% e metanol, na proporção de 85:15, que é o início do gradiente da análise por CLAE, pela impossibilidade de se realizar medidas de pH confiáveis na presença de metanol.

Tabela 10: Efeito da acidez de ácido fórmico 5% sobre os valores de absorvância (A) e $\lambda_{\text{max vis}}$ das soluções de EB e EP a pH 2,2, 3,0 e 4,0

Soluções	$\lambda_{\text{max vis}}$ antes da diluição	A antes da diluição	$\lambda_{\text{max vis}}$ depois da diluição	A depois da diluição	pH depois da diluição
EB pH2,2	522	1,1138	520	0,6774	1,91
EB pH3,0	524	1,1880	520	1,0330	2,15
EB pH4,0	526	0,8146	522	1,2120	2,35
EPP pH 2,2	520	1,0976	520	0,6581	1,78
EPP pH3,0	520	1,0485	520	1,0668	2,02
EPP pH 4,0	524	0,8063	518	2,0532	2,07

4.11. Estabilização com ácido tânico de extrato bruto e parcialmente purificado em pH 2,2, 3,0 e 4,0 na presença de luz a 23°C

Como já foi dito anteriormente no item 4.9, a adição de ácido tânico em soluções aquosas de antocianinas desloca o equilíbrio das formas antociânicas no sentido de formação de espécies coloridas, provocando efeito batocrômico e hiperocrômico. Com a presença de ácido tânico na concentração de 600 mg/100 mL, foi observado forte efeito batocrômico, pois todas as soluções de EB e EPP tiveram o $\lambda_{\text{max vis}}$ deslocado para 538 nm em todos os pH. O efeito hiperocrômico ocorreu em todas as soluções, mas com intensidade maior em pH 4,0, sendo o pH 3,0 intermediário e, para o pH 2,2, o aumento da intensidade da cor foi menor. As soluções com pH 3,0 e 4,0 do EPP apresentaram aumento de absorvância maior do que as respectivas de EB. Esse fato poderia ser explicado pela presença de maior quantidade de formas incolores nas soluções de EPP que não possui flavonóides não-antociânicos complexando com as antocianinas, desta forma, mesmo com absorvância próxima a 1 como as soluções de EB pH 3,0 e 4,0, as respectivas soluções de EPP possui maior predominância de formas incolores disponíveis para a formação do complexo copigmento/pigmento.

Para os cálculos de constante de velocidade de reação (k) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) das soluções com e sem ácido tânico, foram utilizadas equações para reações com cinética de primeira ordem (Figura 14) utilizando-se os valores de absorvância inicial e final (aproximadamente 50% de perda de cor) de cada solução. Como foi observado no item 4.9, as soluções de EB e EPP sem ácido tânico analisadas por espectrofotometria mostraram degradação diferente da maioria dos autores (BROUILLARD, 1982; FURTADO *et al.*, 1993), por interferência dos compostos de degradação marrons formados em pH 3,0 e 4,0; já as soluções com ácido tânico apresentaram uma seqüência de degradação de acordo com o esperado, sendo as soluções a pH 2,2 as mais estáveis (MINIATI *et al.*, 1992), como pode se observar pelos valores da Tabela 11.

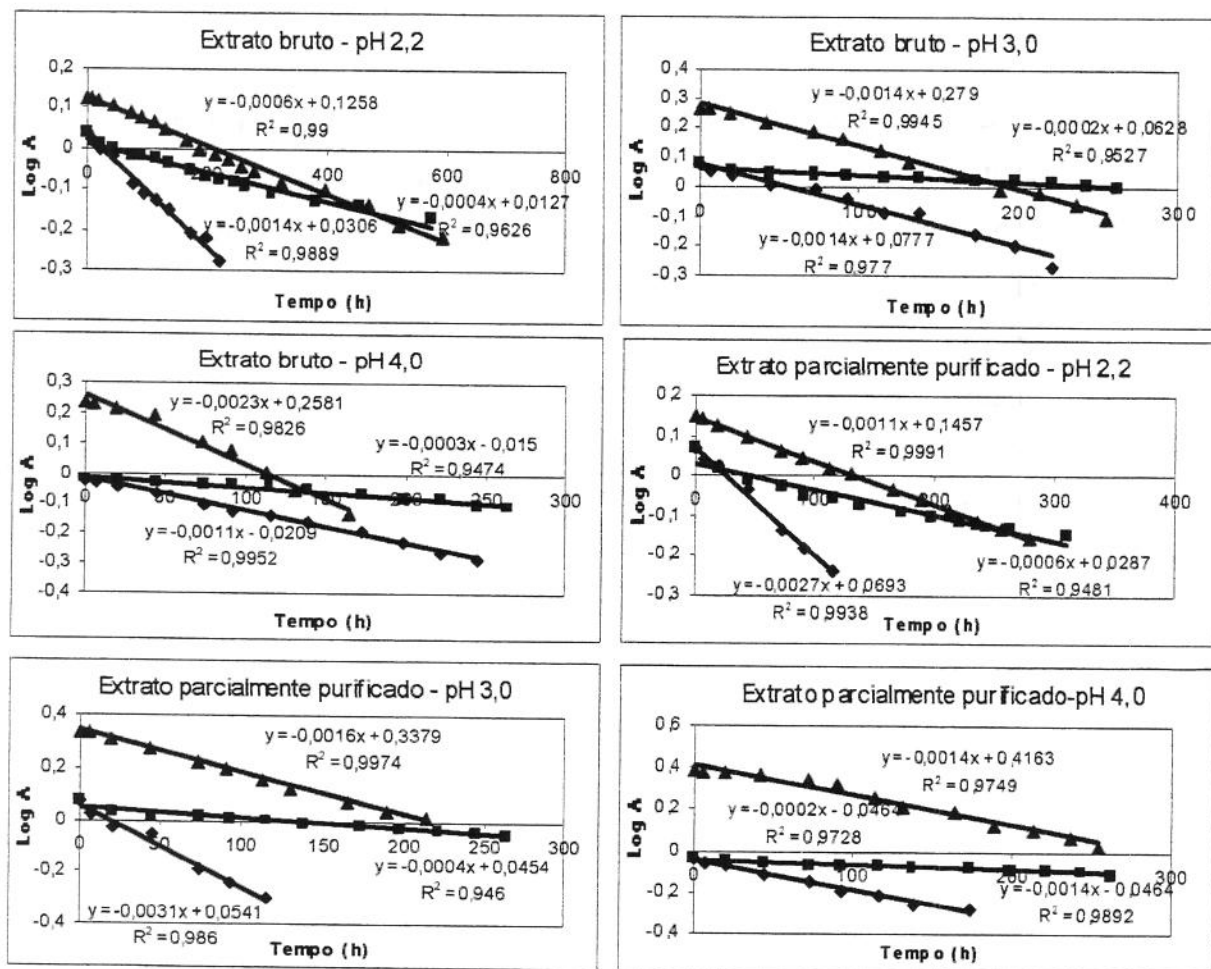


Figura 14: Efeito de luz, pH e adição de ácido tânico na estabilidade das antocianinas dos extratos bruto e parcialmente purificado em pH 2,2, 3,0 e 4,0. ◆, soluções na presença de luz; ■, soluções na ausência de luz; ▲, soluções adicionadas de ácido tânico (600 mg/ 100 ml) na presença de luz.

Tabela 11: Efeito de luz e pH e adição de ácido tânico a 23⁰C sobre os valores de λ_{maxvis} inicial e final, constante de velocidade de reação (k) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) para as soluções de EB e EPP

Solução	$\lambda_{\text{max vis}}$		k (h ⁻¹)	t _{1/2} (h)	
	Inicial	Final			
EB pH 2,2	Luz	522	524	0,003297	210,2
	AT ^b	538	538	0,001319	525,2
	Escuro	522	524	0,000347	1997,1
EB pH 3,0	Luz	524	524	0,003526	196,5
	AT ^b	538	536	0,003319	208,8
	Escuro	524	524	0,000338	2050,3
EB pH 4,0	Luz	528	s/ pico ^a	0,002466	281,0
	AT ^b	538	s/ pico ^a	0,005165	134,3
	Escuro	528	s/ pico ^a	0,000282	2457,4
EPP pH 2,2	Luz	520	522	0,006059	114,4
	AT ^b	538	538	0,002502	277,0
	Escuro	520	522	0,000464	1493,9
EPP pH 3,0	Luz	520	522	0,007288	95,1
	AT ^b	538	538	0,003496	198,2
	Escuro	520	522	0,000424	1634,4
EPP pH 4,0	Luz	524	s/ pico ^a	0,003213	215,7
	AT ^b	538	536	0,003275	211,6
	Escuro	524	s/ pico ^a	0,000298	2325,0

^a, não foi detectado pico pelo do espectrofotômetro; ^b, AT, solução com 600 mg/100 mL de ácido tânico.

Para as soluções preparadas com EB, a estabilização da cor por copigmentação foi significativa em pH 2,2, onde se pode observar uma diminuição na velocidade de reação e, conseqüentemente, um aumento no tempo de meia-vida; no pH 3,0 essa estabilização não foi tão evidente e no pH 4,0, a constante de velocidade de reação foi aumentada com a adição do copigmento. As soluções de EPP em pH 2,2 e 3,0 adicionadas de ácido tânico também se mostraram mais estáveis com a exposição à luz do que as mesmas sem ácido tânico; em pH 4,0, como ocorreu com a solução de EB, não foi observado efeito de estabilização pela adição de copigmento (Tabela 11).

As soluções de EB adicionadas de ácido tânico se mostraram mais estáveis do que as respectivas preparadas com EPP e ácido tânico, provavelmente devido a presença de flavonóides não antociânicos, com exceção da solução de EPP pH 4,0 com ácido tânico, que possui $t_{1/2}$ maior que a equivalente preparada com EB. Com a adição de ácido tânico, o EB em pH 4,0 apresentou menor estabilidade à luz do que o EPP, ao contrário do que ocorre quando não há a adição deste copigmento (Tabela 11). Neste caso, os flavonóides não antociânicos existentes apenas no EB que estariam protegendo as antocianinas poderiam ter um k de complexação menor do que o do ácido tânico, assim, a presença destes flavonóides poderia dificultar a formação do complexo antocianinas-ácido tânico diminuindo a estabilidade da solução copigmentada de EB em pH 4,0.

Utilizando-se equações para reações de primeira ordem, foram calculados a velocidade de reação e tempo de meia-vida para as soluções expostas à luz a partir dos valores das áreas iniciais e finais (aproximadamente 50% de perda de absorvância) dos picos da malvidina 3-arabinosídeo e petunidina 3-arabinosídeo obtidos por CLAE (Tabelas 12 e 13).

Tabela 12: Efeito de luz, pH e adição de ácido tânico a 23°C sobre os valores de constante de velocidade de reação (k) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) obtidos por CLAE para a malvidina 3-arabinosídeo.

Solução		k (h ⁻¹)	$t_{1/2}$ (h)	Perda de Ar ^a	Tempo ^c (h)
EB pH 2,2	Luz	0,00501	138,3	67,0	221,5
	AT ^b	0,002062	336,2	70,5	592,0
	Escuro	0,000476	1455,9	57,9	1815,0
EB pH 3,0	Luz	0,005637	122,9	67,2	198,0
	AT ^b	0,004589	151,013	69,0	255,5
	Escuro	0,000663	1045,2	70,0	1815,0
EB pH 4,0	Luz	0,006061	114,3	69,9	198,0
	AT ^b	0,020574	33,7	93,2	131,0
	Escuro	0,000788	879,4	76,0	1815,0
EPP pH 2,2	Luz	0,008534	118,8	62,8	116,0
	AT ^b	0,00284	244,0	49,4	279,5
	Escuro	0,000664	1043,7	70,0	1815,0
EPP pH 3,0	Luz	0,006564	105,6	53,3	116,0
	AT ^b	0,004704	147,3	63,4	213,5
	Escuro	0,001125	616,0	87,0	1815,0
EPP pH 4,0	Luz	0,007008	98,9	78,8	221,5
	AT ^b	0,008839	78,4	84,8	255
	Escuro	0,002294	302,1	98,4	1815,0

^a, área do pico; ^b, solução com 600 mg/100 mL de ácido tânico; ^c, tempo em que foi retirada a alíquota final.

Tabela 13: Efeito de luz, pH e adição de ácido tânico a 23°C sobre os valores de constante de velocidade de reação (k) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) obtidos por CLAE para a petunidina 3-arabinosídeo.

Solução	k (h ⁻¹)	$t_{1/2}$ (h)	Perda de Ar ^a	Tempo ^c (h)
EB pH 2,2 Luz	0,00550	126,0	70,4	221,5
AT ^b	0,002595	267,1	70,6	472,0
Escuro	0,000759	913,0	74,8	1815,0
EB pH 3,0 Luz	0,007382	93,9	76,8	198,0
AT ^b	0,006897	100,5	82,8	255,5
Escuro	0,000822	843,1	77,5	1815,0
EB pH 4,0 Luz	0,011217	61,8	89,1	198,0
AT ^b	0,019370	35,7	92,1	131,0
Escuro	0,001132	612,2	87,2	1815,0
EPP pH 2,2 Luz	0,008460	81,9	62,5	116,0
AT ^b	0,004284	161,8	69,8	279,5
Escuro	0,000961	721,1	82,5	1815,0
EPP pH 3,0 Luz	0,008585	80,7	63,1	116
AT ^b	0,007281	95,2	78,9	213,5
Escuro	0,001866	371,4	96,6	1815,0
EPP pH 4,0 Luz	0,009275	74,7	91,3	263,5
AT ^b	0,015405	45,0	96,6	255,0
Escuro	0,003281	211,2	99,9	1815,0

^a, área do pico; ^b, solução com 600 mg/100 mL de ácido tânico, ^c, tempo em que foi retirada a alíquota final.

Para a malvidina 3-arabinosídeo (Tabela 12), o efeito de estabilização da cor pela adição de ácido tânico foi observado com maior intensidade a pH 2,2 das soluções de EB e EPP, sendo a primeira a mais estável, com menor velocidade de decomposição. Nas soluções com pH 3,0 destes extratos, foi observada uma menor estabilização, já naquelas com pH 4,0, o ácido tânico não se comportou como um agente estabilizante das antocianinas, pois essas soluções tiveram a velocidade de reação aumentada com a adição do copigmento (Tabela 12). Nada foi encontrado na literatura sobre estabilização com ácido tânico em pH 4,0, mas sabe-se que o ácido tânico é um composto instável neste pH, o que possivelmente pode dar origem a derivados que podem auxiliar na degradação fotoquímica das antocianinas. Foi observado através dos dados obtidos por CLAE que em pH 4,0, a solução de EB com ácido tânico possui constante de velocidade de reação maior que a da solução preparada com EPP, como já foi discutido anteriormente, os flavonóides não antociânicos que existem no EB poderiam ter um k de complexação com as antocianinas menor do que o do complexo formado entre o ácido tânico e a antocianina e a presença deste flavonóides comprometeriam a copigmentação da antocianina com o ácido tânico neste pH.

A petunidina 3-arabinosídeo apresentou o mesmo comportamento, no entanto, os tempos de meia-vida foram menores do que os obtidos com a malvidina 3-arabinosídeo possivelmente devido a menor quantidade de moléculas deste pigmento o que dificultaria o processo de auto-associação, como já foi discutido anteriormente e também ao maior número de grupos metoxilas presentes na malvidina o que promoveria maior estabilidade desta antocianina à luz (FURTADO *et al.*, 1993).

4.12. Estabilidade de extrato bruto e parcialmente purificado em pH 2,2, 3,0 e 4,0 à temperatura de 50°C em ausência de luz

As antocianinas, quando expostas a altas temperaturas, são rapidamente degradadas, ou seja, perdem a cor de forma irreversível, pois o aumento da temperatura favorece a formação de chalcona que é degradada a derivados do ácido

benzóico (BROUILLARD, 1982; MARKAKIS, 1982; GARCÍA-VIGUERA *et al.*, 1998). As soluções de EB e EPP em pH 2,2, 3,0 e 4,0 expostas à temperatura de 50°C tiveram a degradação acompanhada por espectrofotometria e por CLAE, sendo que foram calculados a constante de velocidade de reação e tempo de meia-vida utilizando-se valores de absorvância e de área dos picos obtidos por CLAE, considerando-se a degradação das antocianinas como reação de primeira ordem (Figura 15).

Mesmo com os gráficos (Figura 15) das soluções de EB e EPP em pH 4,0 expostas a 50°C não sendo características de primeira ordem como as mesmas em pH 2,2 e 3,0, considerou-se, para efeito comparativo, a degradação em pH 4,0 como de primeira ordem. As soluções de EB e EPP em pH 4,0 quando expostas a temperatura apresentaram coloração marrom visualmente mais intensa do que as soluções expostas a luz dos experimentos anteriores logo no início da exposição, o que poderia ter interferido na forma dos gráficos. No entanto, para os cálculos de k e $t_{1/2}$, foram utilizadas as equações de primeira ordem, pois, para estudos de estabilidade ao calor, outros autores têm utilizado essas equações (DARAVINGAS & CAIN, 1965, 1968; BROUILLARD, 1982; CEREMOGLU *et al.*, 1994; RODRÍGUEZ-SAONA *et al.*, 1999).

A Tabela 14 mostra que os valores de comprimento de onda de absorção máxima, de modo geral, não variaram de forma significativa após aproximadamente 50% de perda de absorvância, com exceção das soluções de EB e EPP em pH 4,0 que tiveram a forma do espectro original alterada, perdendo o pico de absorção máxima devido ao surgimento de coloração marrom visualmente mais intensa que a observada nos experimentos de estabilidade à luz a 23°C, como já comentado anteriormente.

De acordo com os valores de constante de velocidade de reação e tempo de meia-vida obtidos por espectrofotometria apresentados na Tabela 14, as soluções preparadas com EB são mais estáveis do que as preparadas com EPP nos mesmos pH devido a presença de flavonóides não antociânicos. Como ocorreu nos experimentos de estabilidade a luz, as soluções de EB e EPP em pH 4,0 apresentaram constantes de velocidade de reação menores que aquelas com pH 2,2 e 3,0, pois nesse experimento

a 50°C, houve a formação de cor marrom mais intensa do a observada nos experimentos com exposição à luz interferindo na análise espectrofotométrica.

Tabela 14: Efeito de temperatura e pH em ausência de luz sobre os valores de $\lambda_{\text{max vis}}$ inicial e final, constante de velocidade de reação (k) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) para as soluções de EB e EPP.

Solução	$\lambda_{\text{max vis}}$		k (h ⁻¹)	t _{1/2} (h)
	Inicial	Final		
EB pH 2,2-50°C	522	524	0,003871	179,1
23°C	522	522	0,000519	1335,3
EB pH 3,0-50°C	524	520	0,004522	153,3
23°C	524	524	0,000405	1712,8
EB pH 4,0- 50°C	528	s/ pico ^a	0,00242	286,4
23°C	528	s/ pico ^a	0,000284	2441,9
EPP pH 2,2-50°C	520	522	0,009592	72,2
23°C	520	520	0,000543	1277,2
EPP pH 3,0-50°C	520	520	0,009601	72,2
23°C	520	520	0,000395	1754,0
EPP pH 4,0-50°C	524	s/ pico ^a	0,007053	98,3
23°C	524	s/ pico ^a	0,000302	2294,9

^a, não foi detectado pico pelo do espectrofotômetro.

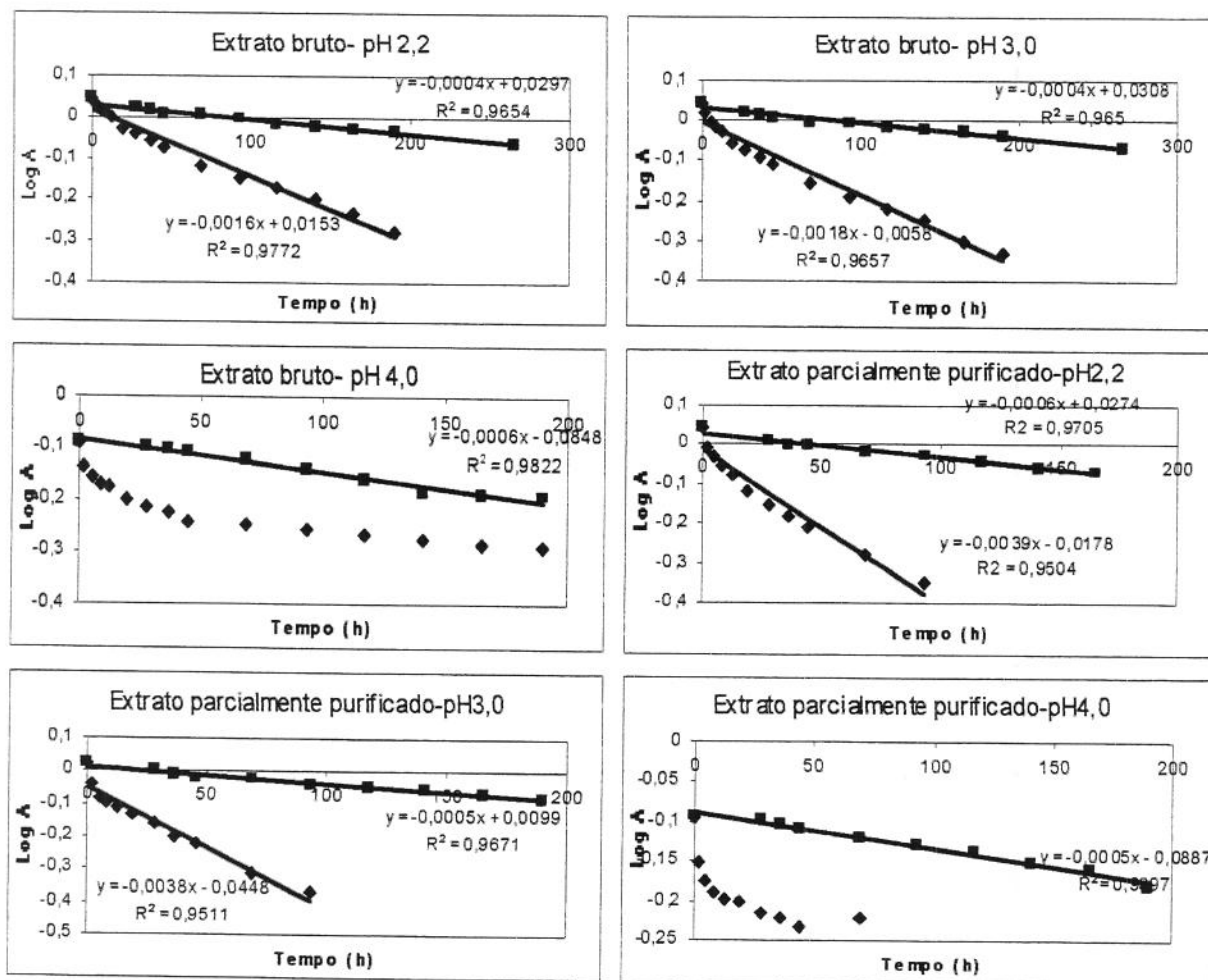


Figura 15: Efeito de temperatura (50°C) e pH na estabilidade das antocianinas dos extratos bruto e parcialmente purificado em pH 2,2, 3,0 e 4,0. ♦, soluções expostas à temperatura de 50°C em ausência de luz; ■, soluções expostas a temperatura de 23°C em ausência de luz.

A Tabela 15 mostra os valores de constante de velocidade de reação e tempo de meia-vida para a malvidina 3-arabinosídeo obtidos por CLAE. As soluções de EB se mostraram mais estáveis que as de mesmos pH preparadas com EPP devido à presença de flavonóides não antociânicos que se complexam com as antocianinas estabilizando as formas coloridas. No pH 2,2, a malvidina 3-arabinosídeo se mostrou mais estável que nos outros pH, seguido do pH 3,0 e 4,0, tanto nas soluções de EB, quanto nas de EPP. A petunidina 3-arabinosídeo (Tabela 16) apresentou o mesmo

comportamento, mas com valores de k maiores que aos encontrados para a malvidina 3-arabinosídeo devido às diferenças na estrutura e de concentração, como discutido anteriormente.

Comparando-se esses valores de constante de velocidade de reação destes pigmentos com os obtidos no experimento de estabilidade a luz (item 4.8, tabelas 5 e 6), percebe-se que a temperatura de 50°C diminui a estabilidade dessas antocianinas de forma mais intensa que a luz, pois as mesmas apresentaram velocidades de reação maiores quando expostas a 50°C.

Tabela 15: Efeito de temperatura e pH em ausência de luz sobre valores de constante de velocidade de reação (k) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) obtidos por CLAE para malvidina 3-arabinosídeo.

Solução	k (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)	Perda de Ar ^a (%)	Tempo ^b (h)
EB pH 2,2-50°C	0,01064	65,1	63,0	93,5
23°C	0,000558	1241,0	62,9	1776,0
EB pH 3,0-50°C	0,01574	44,0	77,1	93,5
23°C	0,000730	948,8	72,7	1776,0
EB pH 4,0-50°C	0,01970	35,2	74,3	69,0
23°C	0,000800	866,3	75,8	1776,0
EPP pH 2,2-50°C	0,01894	36,6	72,9	69,0
23°C	0,000928	746,3	84,9	1776,0
EPP pH 3,0-50°C	0,017819	33,8	60,2	45,0
23°C	0,001109	625,1	86,1	1776,0
EPP pH 4,0-50°C	0,0304	22,8	74,6	45,0
23°C	0,001661	417,3	94,8	1776,0

^a, área do pico; ^b, tempo em que foi retirada a alíquota final.

Tabela 16: Efeito da temperatura e pH em ausência de luz sobre valores de constante de velocidade de reação (k) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) obtidos por CLAE para a petunidina 3-arabinosídeo.

Solução	k (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)	Perda de Ar ^a (%)	Tempo ^b (h)
EB pH 2,2-50°C	0,01278	54,2	69,7	93,5
23°C	0,000633	1094,7	67,5	1776,0
EB pH 3,0-50°C	0,0124	55,9	81,5	93,5
23°C	0,000973	712,0	82,2	1776,0
EB pH 4,0-50°C	0,02815	24,6	85,7	69,0
23°C	0,002073	334,3	75,0	1776,0
EPP pH 2,2-50°C	0,04537	15,3	95,6	69,0
23°C	0,001909	636,1	96,6	1776,0
EPP pH 3,0-50°C	0,098579	7,0	98,8	45,0
23°C	0,003271	211,9	99,7	1776,0
EPP pH 4,0-50°C	0,01312	5,28	99,7	45,0
23°C	0,003572	194,0	99,8	1776,0

^a, área do pico; ^b, tempo em que foi retirada a alíquota final.

Estes resultados estão em concordância com os encontrados por vários autores que verificaram que aumentando-se a temperatura, o equilíbrio das formas antociânicas é deslocado no sentido de formação de chalcona que é clivada formando vários compostos que podem reagir dando origem a produtos de degradação de cor marrom por mecanismo ainda pouco elucidado (BROUILLARD, 1982; PIFFAUT *et al.*, 1994; INAMI *et al.*, 1996; GARCÍA-VIGUERA *et al.*, 1998; RODRIGUEZ-SAONA *et al.*, 1999).

4.13. Estabilização de extrato bruto e parcialmente purificado com ácido tânico em pH 2,2, 3,0 e 4,0 à temperatura de 50°C em ausência de luz

O ácido tânico provocou efeito hipercrômico e deslocamento batocrômico nas soluções de EB e EPP em pH 2,2, 3,0 e 4,0, como já foi discutido em 4.11. Para obter os valores de velocidade de reação e tempo de meia-vida foram utilizadas equações para reações com cinética de primeira-ordem (BROUILLARD, 1982; CEREMOGLU *et al.*, 1994). De acordo com os gráficos na Figura 16, as soluções de EB e EPP em pH 4,0 não apresentaram retas perfeitas (valor de R^2 está baixo se comparado com as outras), mas essa degradação foi considerada de primeira ordem.

Como já foi discutido em 4.12, compostos de degradação de cor marrom surgiram logo no início do experimento e alteraram a forma do espectro destas soluções, fazendo com que o pico na região do visível não fosse detectado. Em comparação com a Figura 15 em 4.12, essas curvas das soluções em pH 4,0 da Figura 16 estão melhores, sendo possível se verificar uma reta, pois assim que o espectro teve sua forma alterada pela interferência dos compostos de degradação sem observação de pico no visível, foi realizada a leitura final antes mesmo de se atingir 50% de perda de absorvância.

As soluções adicionadas de ácido tânico, nos pH 3,0 e 4,0, ou seja, aquelas em que se notou efeito hipercrômico com maior intensidade, apresentaram uma queda intensa na absorvância no início do experimento (intervalo de 12 horas), provavelmente esse fato se deve não à degradação da antocianina, mas ao efeito da temperatura que pode desfazer o complexo pigmento/copigmento diminuindo o efeito hipercrômico do copigmento (BROUILLARD *et al.*, 1989; BARANAC *et al.*, 1997_a).

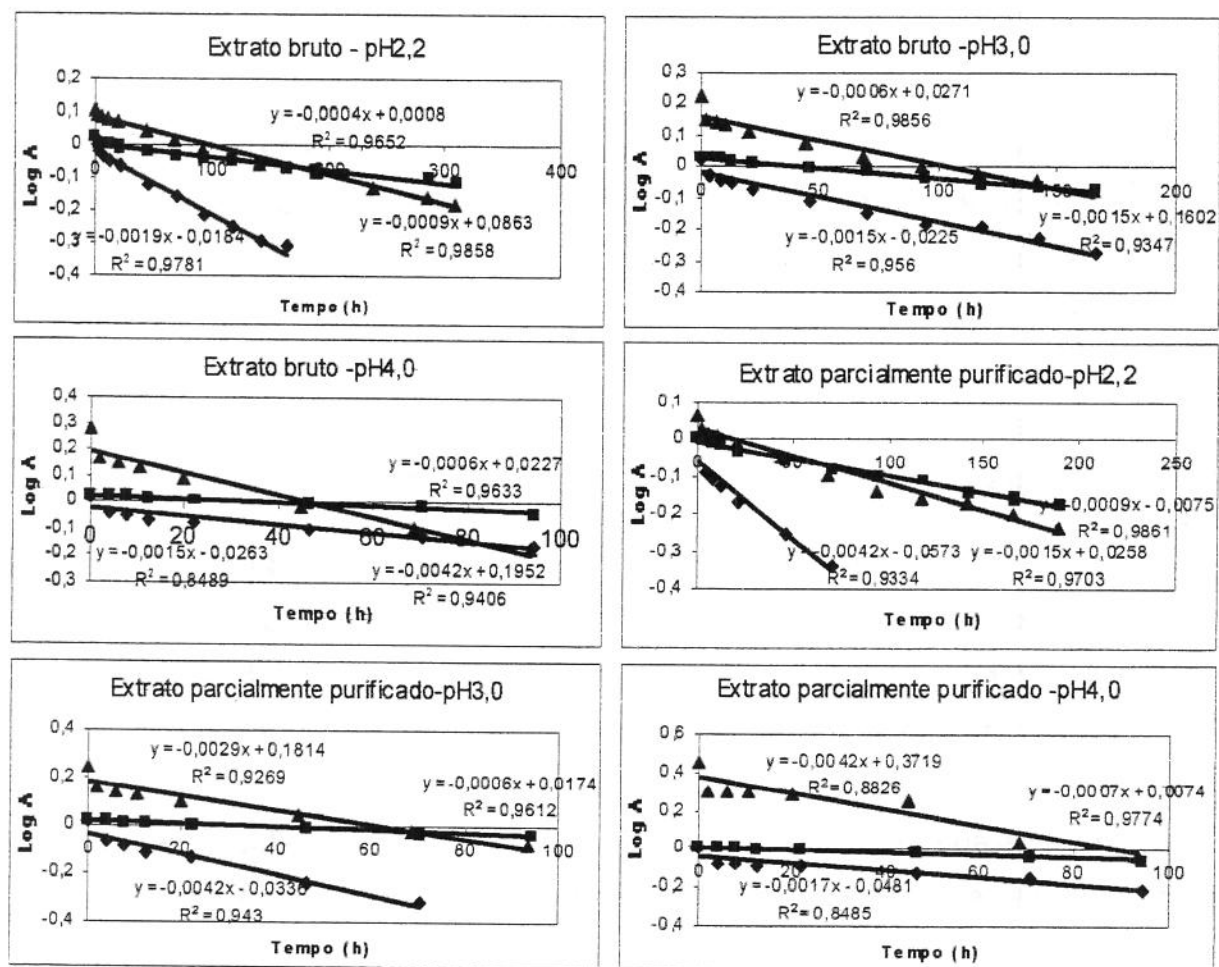


Figura 16: Efeito de temperatura (50°C), pH e adição de ácido tânico na estabilidade das antocianinas dos extratos bruto e parcialmente purificado em pH 2,2, 3,0 e 4,0. ♦, soluções expostas a 50°C em ausência de luz; ■, soluções expostas a 23°C na ausência de luz; ▲, soluções adicionadas de ácido tânico (600 mg/ 100 ml) expostas a 50°C em ausência de luz.

Os resultados obtidos por espectrofotometria (Tabela 17) se mostraram incoerentes também neste caso, devido à interferência dos compostos de coloração marrom formados durante a exposição das antocianinas ao calor, desta forma, os resultados obtidos por CLAE foram analisados mais detalhadamente. De acordo com a Tabela 17, as soluções de EB e EPP sem a adição de ácido tânico apresentaram a ordem de estabilidade alterada, sendo as soluções em pH 3,0 e 4,0 mais estáveis que as mesmas em pH 2,2. Todas as soluções adicionadas de ácido tânico apresentaram comprimento de onda de absorção máxima deslocado para 538 nm, que com o decorrer do experimento foi diminuindo, com exceção das soluções em pH 4,0 que não apresentaram pico de absorção máxima. As soluções de extrato bruto em pH 2,2 se mostraram muito estáveis com a presença do copigmento com um tempo de meia-vida de 326,3 h. Já as soluções de EB pH 3,0 e 4,0 apresentaram k maior com a presença do ácido tânico do que sem, como ocorrido nos experimentos de estabilização na presença de luz. As soluções de EPP pH 2,2 e 3,0 apresentaram k diminuído com a adição do copigmento, mas a solução em pH 4,0, apresentou k aumentado com a adição do mesmo.

Na Tabela 18 estão apresentados os valores de velocidade de reação e tempo de meia-vida para a malvidina 3-arabinosídeo calculados a partir das áreas dos picos obtidos por CLAE referentes a esse pigmento. As soluções sem copigmento de EB se mostraram mais estáveis que as preparadas com EPP também sem copigmento, sendo a solução de EB em pH 2,2 a mais estável, como observado em 4.11. Com a adição de ácido tânico, a solução de EB em pH 2,2 apresentou um tempo de meia-vida praticamente duas vezes maior que a mesma sem o copigmento, mas as soluções de EB em pH 3,0 e 4,0 tiveram o k aumentado com a adição. Possivelmente, o ácido tânico pode estar complexando com os flavonóides não antociânicos ficando impedido de participar da copigmentação com as antocianinas. YOON *et al.* (1998) também encontrou que o ácido tânico, mesmo sendo o copigmento que provocou maior efeito hipercrômico entre os analisados, não melhorou a estabilidade à temperatura de 70°C

em pH 3,0 de soluções obtidas de uma variedade de arroz coreano pigmentado, apesar de retardar a fotodegradação neste mesmo pH.

Como observado em 4.11, as soluções de EB com ácido tânico em pH 4,0 se mostraram menos estáveis que as de EPP com ácido tânico, possivelmente devido ao k de complexação do ácido tânico com antocianina ser maior que o dos flavonóides não antociânicos, sendo que neste pH, a presença destes flavonóides impossibilita a copigmentação eficaz do ácido tânico.

As soluções de EPP apresentaram valores de constante de velocidade de reação menores com a adição de ácido tânico, mas em pH 4,0, a malvidina 3-arabinosídeo teve sua estabilidade diminuída com a adição do copigmento. A petunidina 3-arabinosídeo apresentou o mesmo comportamento que a malvidina 3-arabinosídeo, só que com valores maiores de k , devido a diferenças na estrutura e de concentração, como já discutido.

Tabela 17: Efeito de temperatura, pH e adição de ácido tânico em ausência de luz sobre os valores de $\lambda_{\text{max vis}}$ inicial e final, constante de velocidade de reação (k) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) para as soluções de EB e EPP

Solução	$\lambda_{\text{max vis}}$		k (h ⁻¹)	$t_{1/2}$ (h)
	Inicial	Final		
EB pH 2,2-50°C	522	524	0,005027	137,9
AT-50°C	538	532	0,002124	326,3
23°C	522	524	0,000309	2240,9
EB pH 3,0-50°C	524	524	0,003656	189,6
AT-50°C	538	530	0,005577	124,3
23°C	524	524	0,000282	2464,8
EB pH 4,0-50°C	528	s/ pico ^a	0,004539	152,6
AT-50°C	538	s/ pico ^a	0,0110964	62,5
23°C	528	s/ pico ^a	0,000268	2582,8
EPP pH 2,2-50°C	520	520	0,011159	62,1
AT-50°C	538	530	0,00364	190,4
23°C	520	520	0,000379	1828,5
EPP pH 3,0-50°C	520	520	0,01108205	62,534
AT-50°C	538	536	0,008052	86,1
23°C	520	520	0,000369	1880,3
EPP pH 4,0-50°C	524	s/ pico ^a	0,005239	132,3
AT-50°C	538	s/ pico ^a	0,01196	57,9
23°C	524	s/ pico ^a	0,000308	2249,6

^a, não foi detectado pico pelo do espectrofotômetro.

Tabela 18: Efeito de temperatura, pH e adição de ácido tânico em ausência de luz sobre valores de constante de velocidade de reação (k) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) obtidos por CLAE para a malvidina 3-arabinosídeo.

Solução	k (h ⁻¹)	$t_{1/2}$ (h)	Perda de Ar ^a (%)	Tempo ^c (h)
EB pH 2,2-50 ⁰ C	0,008381	82,7	75,2	166,5
AT ^b -50 ⁰ C	0,005082	136,4	79,3	309,5
23 ⁰ C	0,000508	1364,2	69,4	2328,0
EB pH 3,0-50 ⁰ C	0,008579	80,8	77,8	190,5
AT ^b -50 ⁰ C	0,009645	71,9	81,4	165,5
23 ⁰ C	0,000746	929,0	82,4	2328,0
EB pH 4,0-50 ⁰ C	0,010975	63,1	53,9	70,5
AT ^b -50 ⁰ C	0,037145	18,7	96,9	93,5
23 ⁰ C	0,000820	854,3	90,9	2328,0
EPP pH 2,2-50 ⁰ C	0,011307	61,3	54,9	70,5
AT ^b -50 ⁰ C	0,006087	113,8	68,4	189,5
23 ⁰ C	0,000661	1048,4	78,5	2328,0
EPP pH 3,0-50 ⁰ C	0,013377	51,8	61,1	70,5
AT ^b -50 ⁰ C	0,009666	71,7	59,5	93,5
23 ⁰ C	0,000896	773,4	87,6	2328,0
EPP pH 4,0-50 ⁰ C	0,019528	35,5	74,8	70,5
AT ^b -50 ⁰ C	0,021954	31,6	87,2	93,5
23 ⁰ C	0,001285	539,2	95,0	2328,0

^a, área do pico; ^b, solução com 600 mg/100 mL de ácido tânico; ^c, tempo em que foi retirada a alíquota final.

Tabela 19: Efeito da temperatura, pH e adição de ácido tânico em ausência de luz sobre valores de constante de velocidade de reação (k) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) obtidos por CLAE para a petunidina 3-arabinosídeo.

Solução	k (h ⁻¹)	$t_{1/2}$ (h)	Perda de Ar ^a (%)	Tempo ^c (h)
EB pH 2,2-50 ⁰ C	0,007499	92,4	71,3	166,5
AT ^b -50 ⁰ C	0,006367	108,9	86,1	309,5
23 ⁰ C	0,000649	1067,8	78,0	2328,0
EB pH 3,0-50 ⁰ C	0,008891	77,9	81,6	190,5
AT ^b -50 ⁰ C	0,011468	60,4	85,0	165,5
23 ⁰ C	0,001003	690,7	90,3	2328,0
EB pH 4,0-50 ⁰ C	0,018415	37,6	72,7	70,5
AT ^b -50 ⁰ C	0,044990	15,4	98,5	93,5
23 ⁰ C	0,002147	320,1	99,3	2328,0
EPP pH 2,2-50 ⁰ C	0,025381	27,3	83,3	70,5
AT ^b -50 ⁰ C	0,007455	93,0	75,7	189,5
23 ⁰ C	0,000842	823,0	85,9	2328,0
EPP pH 3,0-50 ⁰ C	0,055259	12,5	98,0	70,5
AT ^b -50 ⁰ C	0,018287	37,9	81,9	93,5
23 ⁰ C	0,001718	389,7	98,4	2328,0
EPP pH 4,0-50 ⁰ C	0,077012	9,0	99,6	70,5
AT ^b -50 ⁰ C	0,041569	16,7	97,9	93,5
23 ⁰ C	0,002885	240,2	99,9	2328,0

^a, área do pico; ^b, solução com 600 mg/100 mL de ácido tânico; ^c, tempo em que foi retirada a alíquota final.

4.14. Estabilidade e estabilização com ácido tânico de extrato bruto e parcialmente purificado em iogurte à temperatura de 8°C

Cor é um fenômeno físico-sensorial que está diretamente relacionado ao objeto em questão ou pigmento, à fonte iluminadora e ao observador. Para a descrição detalhada da coloração de um objeto, é necessária a análise de três atributos da cor: a sua tonalidade (vermelha, verde, azul etc.), luminosidade (clara e escura) e saturação (pureza da cor). Para acompanhar a alteração de cor de iogurtes coloridos com extratos antociânicos (EB e EPP) após 21 dias de exposição à temperatura de 8°C, fez-se necessário o uso de medidas colorimétricas pelo fato destas permitirem uma observação das alterações sem erros inerentes a interpretação visual, como efeito de mudança de fonte e de observador.

De acordo com GONNET (1998), as medidas de cor em escala CIELAB são mais adequadas para se verificar diferenças de cor entre soluções antociânicas com ou sem a presença de copigmento do que apenas as medidas de diferenças de comprimento de onda de absorção máxima e absorvância. No presente trabalho, as medidas em escala CIELAB e CIELCH, obtidas através de um colorímetro triestímulo, se mostraram eficientes para comparação de diferenças de cor que não seriam perceptíveis visualmente em iogurtes coloridos. GONNET (1999), em estudo de copigmentação, encontrou que as alterações na absorção ocorridas no λ_{maxvis} das soluções de antocianinas não representam as variações de cores percebidas por um observador humano, por isso o mesmo autor concluiu que para estudar os efeitos da adição de copigmentos com o intuito de utilizá-los como aditivos em alimentos para melhorar a coloração de produtos com antocianinas, deve-se realizar o estudo através de escalas colorimétricas, pois as mesmas consideram os atributos da percepção de cores. SKREDE *et al.* (1992), em estudo de estabilidade com xaropes de morango e "blackcurrant", verificaram que a degradação de antocianinas livres não tem impacto imediato na mudança visual da cor do produto.

Na Tabela 20 estão apresentados os valores das medidas de cor nas escalas CIELAB e CIELCH dos iogurtes adicionados de EB e EPP com e sem ácido tânico após 9 e 21 dias a 8^oC em ausência de luz. Os valores de L* correspondem à luminosidade e a* e b* são valores de coordenadas de cor, sendo a* referente ao eixo que vai do verde (-a*) ao vermelho (+a*) e b* ao eixo que vai do azul (-b*) ao amarelo (+b*). Os valores de C* ("chroma") se refere à saturação da cor e h ("hue angle") ao ângulo da tonalidade da cor que é um valor expresso em graus. O valor h igual a 0^o equivale vermelho (a*), 90^o ao amarelo (b*), 180^o ao verde (-a*) e 270^o ao azul (-b*).

A Tabela 21 apresenta as diferenças colorimétricas entre os diferentes iogurtes coloridos com EB e EPP com e sem ácido tânico no período de 21 dias nas escalas CIELAB e CIELCH. Os valores de ΔL são referentes à luminosidade e Δa^* e Δb^* às coordenadas de cor; ΔE é um valor que indica o valor da diferença sem indicar a direção, ΔC^* indica a diferença de saturação e ΔH , diferença de tonalidade. Para o cálculo das diferenças de cor para cada iogurte colorido com EP e EPP após período de 21 dias a 8^oC, foi utilizado como referência o iogurte no tempo inicial, portanto as diferenças apresentadas são entre 0 e 9 e 0 e 21 dias. Para os iogurtes adicionados de ácido tânico, foram calculadas diferenças entre o iogurte no tempo inicial sem o ácido tânico e o mesmo com ácido tânico e também as diferenças entre 0 e 9 e 0 e 21 dias dos iogurtes adicionados de copigmento.

Os valores de L*, a* e b* (Tabela 20) dos iogurtes coloridos com EB e EPP no tempo inicial (0 dia) indicam que os coloridos com EPP são mais luminosos, com mais tonalidade de vermelho e amarelo do que os mesmos com EB, possivelmente devido às diferenças de composição entre o extrato bruto, que possui outros compostos, e parcialmente purificado e também às diferenças nas concentrações utilizadas para colorir os iogurtes.

Os iogurtes coloridos com EB armazenados a 8^oC apresentaram, de modo geral, maiores alterações na cor após 21 dias do que aqueles adicionados com EPP. Os iogurtes, tanto os de EB quanto EPP, apresentaram altos valores de luminosidade

(acima de 70) e valores menores de a^* e b^* , devido às próprias características de um iogurte colorido que geralmente se apresenta com cor rosada pálida.

Tabela 20: Coordenadas de cor em escala CIELAB e CIELCH (D65/ 10°) para iogurtes coloridos com EB e EPP armazenados a 8°C com e sem adição de ácido tânico.

AMOSTRA	DIAS	L*	a*	b*	C*	hab
EB-1	0	73,95	4,96	0,18	4,96	2,08
	9	74,00	4,42	0,87	4,50	11,14
	21	74,16	4,17	1,10	4,17	14,78
EB-2	0	74,46	4,78	0,41	4,80	4,90
	9	74,53	4,21	1,11	4,35	14,77
	21	74,65	4,16	1,44	4,40	19,09
EB-AT ^a -1	0	70,20	7,06	-2,18	7,39	17,16
	9	70,53	6,79	-1,97	7,07	16,18
	21	70,62	6,78	-2,06	7,09	16,90
EB-AT ^a -2	0	70,46	7,13	-2,22	7,47	17,29
	9	70,60	6,53	-1,82	6,78	15,57
	21	70,90	6,62	-1,84	6,87	15,53
EPP-1	0	77,36	5,12	1,84	5,44	19,77
	9	77,72	4,68	2,19	5,17	25,08
	21	77,68	4,54	2,30	5,09	26,87
EPP-2	0	77,04	5,84	1,73	6,09	16,50
	9	77,55	5,36	2,05	5,74	20,93
	21	77,15	4,99	2,10	5,41	22,82
EPP-AT ^a -1	0	74,28	5,28	0,94	5,36	10,09
	9	74,45	5,16	1,09	5,27	11,93
	21	74,09	5,07	1,13	5,19	12,56
EPP-AT ^a -2	0	74,36	5,09	0,90	5,17	10,03
	9	74,51	5,08	1,02	5,18	11,35
	21	74,03	5,06	1,15	5,19	12,80

^a, AT, ácido tânico na concentração de 600 mg/ 100 mL.

Tabela 21: Diferenças de cor em escala CIELAB e CIELCH (D65/10°) entre iogurtes coloridos com EB e EPP com e sem ácido tânico.

AMOSTRA	DIAS	ΔL^*	Δa^*	Δb^*	ΔE^*	ΔC^*	ΔH^*
EB-1	0-9 ^b	0,05	-0,54	0,69	0,88	-0,46	0,75
	0-21 ^c	0,21	-0,79	0,92	1,23	-0,79	1,02
EB-2	0-9 ^b	0,07	-0,57	0,70	0,91	-0,45	0,62
	0-21 ^c	0,19	-0,62	1,03	1,22	-0,40	1,14
EB-AT ^a -1	0-0 ^d	-3,75	2,1	-2,36	4,90	2,43	2,02
	0-9 ^b	0,33	-0,27	0,21	0,48	-0,32	-0,12
	0-21 ^c	0,42	-0,28	0,12	0,52	-0,30	-0,03
EB-AT ^a -2	0-0 ^d	-4,00	2,35	-2,62	5,33	2,67	2,30
	0-9 ^b	0,14	-0,60	0,40	0,73	-0,69	-0,05
	0-21 ^c	0,44	-0,51	0,38	0,77	-0,60	-0,22
EPP-1	0-9 ^b	0,36	-0,44	0,35	0,67	-0,27	0,49
	0-21 ^c	0,32	-0,58	0,46	0,81	-0,35	0,65
EPP-2	0-9 ^b	0,51	-0,48	0,32	0,77	-0,35	0,46
	0-21 ^c	0,11	-0,85	0,37	0,93	-0,68	0,63
EPP-AT ^a -1	0-0 ^d	-3,08	0,16	-0,90	3,21	-0,08	-0,90
	0-9 ^b	0,17	-0,12	0,15	0,26	-0,09	0,17
	0-21 ^c	-0,19	-0,21	0,19	0,34	-0,17	0,22
EPP-AT ^a -2	0-0 ^d	-2,68	-0,75	-0,83	2,90	-0,92	-0,62
	0-9 ^b	0,15	-0,01	0,12	0,19	0,01	0,12
	0-21 ^c	-0,33	-0,03	0,25	0,42	0,02	0,30

^a, ácido tânico na concentração de 600 mg/ 100 mL; ^b, 0-9, diferença de cor entre iogurte no dia 0 e 9; ^c, 0-21, diferença de cor entre o iogurte no dia 0 e 21; ^d, 0-0, diferença de cor entre o iogurte sem ácido tânico no dia 0 e entre o iogurte com ácido tânico no dia 0.

A partir dos valores de L^* , a^* e b^* apresentados na Tabela 20 e também dos valores das diferenças ΔL^* , Δa^* e Δb^* na Tabela 21, é possível perceber um aumento de luminosidade, diminuição da cor vermelha e aumento da cor amarela com o decorrer

do tempo. O aumento da luminosidade ocorre paralelamente ao desaparecimento da cor com o tempo devido à degradação das antocianinas que colore os iogurtes. No caso dos iogurtes coloridos com EPP, observou-se um aumento da luminosidade maior entre os dias 0 e 9 e uma diminuição entre 9 e 21. Esses dados estão de acordo com os encontrados por outros autores (DUHARD *et al.*, 1997; GARCÍA-VIGUERA & BRIDLE, 1998) que, em estudos de estabilidade de antocianinas, verificaram um aumento da luminosidade, diminuição de a^* e aumento de b^* .

Na Tabela 21 estão apresentados os valores de ΔE^* (escala CIELAB) que se referem ao valor das diferenças de cor ocorridas nas amostras. Os iogurtes com EB apresentaram valores de ΔE^* após 21 dias a temperatura de 8°C maiores que os valores dos iogurtes com EPP (Tabela 21), o que significa que as variações, de modo geral e sem indicar a direção das mesmas, foram maiores para os iogurtes coloridos com EB. Porém, os valores apresentados pelos iogurtes coloridos por ambos os extratos (menores que 1 para EPP e menores que 1,3 para EB) são considerados pequenos, pois não foi possível, após período de 21 dias, a percepção visual de alterações na coloração destes iogurtes. Em experimentos de estudo de cores com soluções de cianina e também desta com copigmento, GONNET (1998) considerou como “threshold” o valor ΔE^* igual a 1, ou seja, abaixo deste valor, as alterações encontradas por ele são imperceptíveis visualmente. Apesar da diferença de cor ΔE^* terem sido menores para os iogurtes com EPP, estes se mostraram com uma grande alteração percebida visualmente que deixou o iogurte com aparência comprometida (sinereze). Já os iogurtes coloridos com EB não sofreram esse tipo de alteração e a cor se manteve visualmente estável.

Os valores de ΔC^* (Tabela 21) mostraram que, tanto para os iogurtes com EB quanto os com EPP, a tendência foi a diminuição da saturação da cor com o decorrer do tempo. Os valores de ΔH^* para os iogurtes de EB e EPP mostraram uma tendência de aproximação da tonalidade em direção ao amarelo no decorrer do experimento, sendo que essa tendência foi mais acentuada nos iogurtes coloridos com EB. As

alterações ocorridas nos iogurtes com EB e EPP eram esperadas, pois no pH destes iogurtes (pH 4,0), as formas antociânicas mais abundantes são as incolores (BROUILLARD, 1982) que são mais susceptíveis à degradação. Portanto, com o desaparecimento da cor vermelha e azulada das formas coloridas, há o surgimento de cor amarela devido a formação de chalcona e também de compostos de degradação (SKREDE *et al.*, 1992; DUHARD *et al.*, 1997; GARCÍA-VIGUERA & BRIDLE, 1998)

Comparando-se os valores de L^* , a^* e b^* (Tabela 20) e os de ΔL^* , Δa^* e Δb^* (Tabela 21) dos iogurtes adicionados de EB e EPP no tempo inicial (0 dia) com os mesmos adicionados de ácido tânico também no tempo inicial, percebe-se uma diminuição da luminosidade (L^*), ou seja, a cor ficou mais escura, e mudança de coloração em direção ao azul e vermelho relacionadas a presença do copigmento. Essas alterações foram percebidas visualmente, fato que se reflete pelos valores de ΔE^* (Tabela 21) que foram mais elevados do que os valores das diferenças entre 0 e 21 dias dos mesmos iogurtes com e sem ácido tânico.

Os iogurtes coloridos com EPP mostraram valores de diferença de cor ΔE^* (Tabela 21) após a adição do copigmento menores do que os encontrados nos iogurtes com EB. Nos iogurtes, o fato das diferenças ΔE^* referentes ao copigmento serem menores naqueles com EPP do que com EB não significa necessariamente que a copigmentação tenha sido mais eficiente naqueles com EB, apenas indica que a percepção da cor após a adição do ácido tânico é mais intensa no iogurte colorido com EB.

Os valores de ΔC^* (Tabela 21) para os iogurtes com EB indicam que a adição do copigmento provocou aumento da saturação, ou seja, a cor se tornou mais pura e os valores de ΔH^* indicam que o ângulo de tonalidade da cor mudou em direção ao amarelo. Já para os iogurtes com EPP, os valores de ΔC^* indicam que a adição do copigmento provocou uma diminuição na saturação e os valores de ΔH^* , uma mudança do ângulo de tonalidade em direção ao eixo $+a^*$, que equivale ao vermelho. De modo geral, a adição melhorou a estabilidade da cor das antocianinas, além de a ter

escurecido e avermelhado, pois os valores das diferenças de cor para os iogurtes coloridos com EB e EPP adicionados de ácido tânico foram menores após 21 dias do que as diferenças encontradas para os mesmos sem o copigmento.

Os valores de L^* , a^* e b^* (Tabela 20) e de ΔL^* , Δa^* e Δb^* (Tabela 21) obtidos dos iogurtes adicionados de EB e ácido tânico indicam que, após 21 dias a 8°C , houve, de modo geral, um ligeiro aumento da luminosidade (ΔL^* de 0,42 e 0,44 após 21 dias) e diminuição da cor vermelha e azul e aumento da cor amarela. O valor de ΔE^* para esses iogurtes não são valores que indicam alterações significativas (ΔE^* de 0,52 e 0,77), o que foi confirmado pelo fato de não ter sido observadas visualmente alterações na coloração após 21 dias. Os valores de ΔC^* (Tabela 21) indicam que, com o decorrer do tempo, as cores dos iogurtes com EB e ácido tânico ficaram menos saturadas e os valores de ΔH^* indicam que houve uma variação muito pequena em direção ao eixo $+a^*$ (vermelho).

Os iogurtes com EPP e ácido tânico apresentaram valores de L^* , a^* e b^* (Tabela 20) e de ΔL^* , Δa^* e Δb^* (Tabela 21) que indicam que, após período de 9 dias a 8°C , houve um aumento da luminosidade, diminuição do tom vermelho e aumento do amarelo. Após 21 dias, a luminosidade diminuiu e a cor ficou menos vermelha e mais amarelada. Esses resultados são semelhantes aos encontrados por DUHARD *et al* (1997) para soluções antociânicas de uva a pH 3,0 expostas a 80°C , que, até certo período de exposição, a luminosidade aumentou e no final do experimento, a solução já se encontrava mais escura do que inicialmente. Os mesmos autores consideraram que, no início, quando a luminosidade aumentou, as formas coloridas das antocianinas foram degradadas resultando em diminuição de vermelho e no final do experimento, os produtos de cor marrom que se formam após degradação da chalcona deixaram a solução mais escura que inicialmente.

Os valores de ΔE^* (Tabela 21) para os iogurtes com EPP e ácido tânico indicam que as variações ocorridas na cor foram menores que para os coloridos com EB e ácido tânico após 21 dias. Como já foi discutido, os valores da diferença de cor ΔE^* obtidos

para os iogurtes coloridos com EB e EPP copigmentados não refletem alterações significantes, pois não foram visualmente notadas alterações nos mesmos após 21 dias. Da mesma forma que os iogurtes com EPP sem ácido tânico, foi observada alteração na aparência dos mesmos copigmentados (sinerese). Os valores de ΔH^* (Tabela 21) para estes iogurtes indicam que, de modo geral, o ângulo de tonalidade foi alterado em direção ao amarelo.

O comportamento apresentado pelas amostras em relação ao aumento de coloração amarela com o decorrer do tempo já era esperado, uma vez que as antocianinas a pH 4,0 são degradadas formando compostos de coloração marrom. Mesmo sendo possível a determinação das alterações por medidas colorimétricas, as mudanças de cor não são consideradas significativas, uma vez que visualmente elas são imperceptíveis. O extrato bruto foi mais adequado para se colorir os iogurtes, adicionados ou não de copigmento, mesmo apresentando diferenças de cores maiores que os coloridos com extrato parcialmente purificado, pois não provocaram alterações na textura após 21 dias, ao contrário da adição de EPP que comprometeu a aparência do iogurte.

5. CONCLUSÕES

A uva Seibel 2 apresentou teor antociânico de 500,5 mg/100 g de cascas e o seu bagaço apresentou 112, 72 mg/100 g do resíduo sem sementes, viabilizando seu uso como fonte de antocianinas, sendo que este possui pelo menos 13 antocianinas diferentes, das quais as principais são a malvidina-3-arabinosídeo e petunidina-3-arabinosídeo.

Entre os solventes testados, o que melhor extraiu as antocianinas foi o etanol 50% a pH 3,0 acidificado com ácido cítrico. O processo de concentração por osmose reversa seguido de evaporação a vácuo permitiu uma concentração eficiente sem alterar o perfil antociânico do extrato.

Apenas a análise espectrofotométrica não foi suficiente para estudar a estabilidade e estabilização das antocianinas de bagaço de uva Seibel 2 a luz, pH e temperatura devido a interferência de compostos de degradação de cor marrom. A análise por cromatografia líquida de alta eficiência se mostrou adequada para este estudo de estabilidade e estabilização, sendo possível acompanhar a degradação das principais antocianinas separadamente.

O extrato bruto tem maior estabilidade do que o parcialmente purificado quando expostos à luz a 23°C ou à temperatura de 50°C em ausência de luz.

Os extratos bruto e parcialmente purificado do bagaço de uva Seibel 2 se apresentaram mais estáveis no pH 2,2, seguido do 3,0 e por último, o 4,0 em experimentos de exposição à luz e também à temperatura de 50°C.

A exposição de soluções de antocianinas do bagaço de uva Seibel 2 à luz e também à temperatura de 50°C provocou aumento na degradação dos pigmentos, sendo que a temperatura de 50°C provocou maior aumento na degradação se comparada com a luz.

A copigmentação com ácido tânico na concentração de 600 mg/100mL se mostrou mais eficiente em estabilizar as antocianinas do bagaço em pH 2,2 do que em 3,0 e 4,0. No pH 4,0, essa concentração provocou diminuição no tempo de meia-vida das soluções expostas à luz e também à temperatura de 50°C.

A malvidina 3-arabinosídeo apresentou maior estabilidade à luz e à temperatura nos diferentes pH do que a petunidina 3-arabinosídeo por diferenças na concentração e na estrutura química.

O uso de medidas colorimétricas foi eficiente para descrever as alterações na cor de iogurtes coloridos com os extratos bruto e parcialmente purificado, sendo possível se verificar a diminuição de vermelho e de luminosidade e o aumento do amarelo após 21 dias a 8°C, devido à degradação das antocianinas.

As diferenças colorimétricas foram maiores para os iogurtes coloridos com EB do que EPP, mas não foram percebidas visualmente alterações na cor destes iogurtes coloridos com EB ou EPP.

A adição de ácido tânico na concentração de 600 mg/100 mL provocou diminuição na luminosidade e aumento na cor vermelha. A copigmentação provocou a diminuição das diferenças de cor após 21 dias, quando comparadas com as diferenças dos iogurtes sem ácido tânico.

O extrato bruto se mostrou mais eficiente para colorir os iogurtes, uma vez que o parcialmente purificado deixou os iogurtes com aparência comprometida no final do experimento.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, J. B. Thermal degradation of anthocyanin with particular reference to the 3-glycosides of cyanidin in acidified aqueous solution at 100^o C. **J. Sci. Fd. Agric.**, v.24, p.747-762, 1973.
- ASEN, S. Known factors responsible for infinite flower color variations. **Acta Hort.**, v. 63, 217-223, 1976.
- ASEN, S.; STEWART, K. H.; NORRIS, K. H.; MASSIE, D. R. A stable blue non-metallic co-pigment complex of delphinin and C-glycosylflavones in prof. blaauw iris. **Phytochem.**, v.9, p.619-627, 1970.
- ASEN, S., NORRIS, K. H., STEWART, R. N. Effect of pH and concentration of the anthocyanin-flavonol co-pigment complex on the color of 'Better Times' roses. **J. Am. Soc. Hort. Sci.**, v.96, p. 770-773, 1971.
- ASEN, S.; STEWART, K. H.; NORRIS, K. H. Co-pigmentation of anthocyanins in plant tissues and its effect on color. **Phytochem.**, v.11, p.1139-1144, 1972.
- ASKAR, A. Application of natural colorants in the food industry. **Fruit Proces.**, v.2, p.42-44, 1999.
- AYED, N.; YU, H. L.; LACROIX, M. Using gamma irradiation for the recovery of anthocyanins from grape pomace. **Rad. Physics Chem.**, V. 57, p. 277-279, 2000.
- BAILONI, M.; BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. Stability of anthocyanins from *Acalypha hispida* and copigment effect. **Acta Alimentaria**, v. 22, 161-62, 1999.
- BAKKER, J.; TIMBERLAKE, C.F. The distribution of anthocyanins in grape skin extracts of port wine cultivars as determined by high performance liquid chromatography. **J. Sci. Food Agric.**, v. 36, p.1315-1324, 1985.

- BAUBLIS, A.; SPOMER, A.; BERBER-JIMÉNEZ, M. D. Anthocyanin pigments: comparison of extract stability. **J. Food Sci.**, v.59, n. 6, p. 1219-221, 1994.
- BAYER, E.; EGETER, H.; FINK, A.; NETHER, K.; WEGMANN, K. Complex formation and flower colors. **Angew. Chem. Interat. Edit.**; v.5, 1966.
- BARANAC, J. M.; PETRANOVIC, N. A.; DIMITRIC-MARKOVIC, J. M.
Spectrophotometric study of anthocyanin copigmentation reactions. **J. Agric. Food Chem.**, v.44, n.5, p. 1333-1336, 1996
- BARANAC, J. M.; PETRANOVIC, N. A.; DIMITRIC-MARKOVIC, J. M.
Spectrophotometric study of anthocyanin copigmentation reactions. II. Malvin and the non glycosidized flavone quercetin. **J. Agric. Food Chem.**, v. 45, n. 5, 1694-1697, 1997a
- BARANAC, J. M.; PETRANOVIC, N. A.; DIMITRIC-MARKOVIC, J. M.
Spectrophotometric study of anthocyanin copigmentation reactions. III. Malvin and the nonglycosidized flavone morin. **J. Agric. Food Chem.**, v.45, n5, p.1698-1700, 1997b.
- BARANAC, J. M.; PETRANOVIC, N. A.; DIMITRIC-MARKOVIC, J. M.
Spectrophotometric study of anthocyan copigmentation reaction. 4. malvin and apigenin 7-glucoside. **J. Agric. Food. Chem.**, v.45, p.1701-1703, 1997c.
- BIACS, P. K.; TÓTH, Á.; PAP, L.; BIACS, P. A. Production and analytical testing of powdered grape coloring agent. **Acta Aliment.** v. 24, n. 3, p. 297-306, 1995.
- BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A.; STRINGUETA, P. C.; CASTRO, J. O. Effect of different copigments on the stability of anthocyanins. **Bull. Liaison- Groupe Polyphenols**, 15, 29-32, 1990.
- BOBBIO, F. O.; DRUZIAN, J. I.; ABRÃO, A. P.; BOBBIO, P. A.; FADELLI, S.
Identificação e quantificação das antocianinas do fruto do açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.). **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v. 20, n. 3, 388-390, 2000.

- BONATTI, A. Estrazione delle antocianine moglucosidate durante la macerazione. **Industrie delle bevande**. Jun., p.197-201, 1986.
- BRONNUM-HANSEN, K.; FLINK, J. M. Anthocyanin colourants from elderberry (*Sambucus nigra* L.). 3. Storage stability of the freeze dried product. **J. Food Tech.**, v. 20, p. 725-33, 1985.
- BROUILLARD, R. Origin of exceptional colour stability of the zebrina anthocyanin. **Phytochem.**, v.20, p.143-145. 1981.
- BROUILLARD R. The *in vivo* expression of anthocyanin color in plants. **Phytochem.**, v.22, p.1311-1323, 1983.
- BROUILLARD, R. Chemical Structure of Anthocyanins. In: MARKAKIS, P. (ed), **Anthocyanins as Food Colors**. Academic Press Inc., 1982. cap 1, p. 1-39.
- BROUILLARD, R.; MAZZA, G. SAAD, Z.; ALBRECHT-GARY, A. M.; CHEMINAT, A. The copigmentation reaction of anthocyanins: a microprobe for the structural study of aqueous solution. **J. Am. Chem. Soc.**, v.111, p.2604-2610. 1989.
- BROUILLARD, R.; WIGAND, M. C.; CHEMINAT, A. Loss of colour, a prerequisite to plant pigmentation by flavonoids. **Phytochem.**, v.29, p.3457-3460, 1990.
- BROUILLARD, R.; LANG J. The hemiacetal-*cis*-chalcone equilibrium of malvin, a natural anthocyanin. **Can. J. Chem.**, v.68, p.755-762, 1990.
- BROUILLARD, R.; DUBOIS J. E. Mechanism of structural transformation of anthocyanins in acidic media. **J. Am. Chem. Soc.**, v.99, p.1359-1364, 1977.
- CALVI, J. P.; FRANCIS, F. J. Stability of concord grape (*V. labrusca*) anthocyanins in model systems. **J. Food Sci.**, v. 43, n. 5, p. 1448-56, 1978.
- CASTEELE, K. V.; GEIGER, H.; LOOSE, R.; SUMERE, C. F. V. Separation of some anthocyanidins, anthocyanins, proanthocyanidins and related substances by

- reversed-phase high-performance liquid chromatography. **J. Chromat.**, v.259, p.291-300, 1983.
- CEREMOGLU, B.; VELIOCLU, S.; ISIK, S. Degradation kinetics of anthocyanins in sour cherry juice and concentrate. **J. Food Sci.**, v59, n. 6, p. 1216-18, 1994.
- CHEMINAT, A.; BROUILLARD, R. PMR investigation of 3-O-(β -D-glucosylmalvidin structural transformation in aqueous solution. **Tetrahedron Lett.**, v.27, p.4457-4460, 1986.
- CHEN, L. J.; HRAZDINA, G. Structural aspects of anthocyanin-flavonoid complex formation and its role in plant color. **Phytochem.**, v.20, p.297-303, 1981.
- CLYDESDALE, F. M.; MAIN, J. H.; FRANCIS, F. J.; DAMON JR., R. A. Concord grape pigments as colorants for beverages and gelatin desserts. **J. Food Sci.**, v. 43, p.1687-1697, 1978.
- DANGLES, O.; BROUILLARD, R. A spectroscopic method based on the anthocyanin interaction and applied to the quantitative study of molecular complexes. **J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2**, p. 247-57, 1992a.
- DANGLES, O.; BROUILLARD, R. Polyphenol interactions. The copigment case: thermodynamic data from temperature variation and relaxation kinetics, Medium effect. **Can. J. Chem.**, v. 79, p. 2174-189, 1992b.
- DANGLES, O.; SAITO, N.; BROUILLARD, R. Anthocyanin intramolecular copigment effect. **Phytochem.**, v. 34, n. 1, p. 119-24, 1993.
- DARAVINGAS, G., CAIN, R. F. Changes in the anthocyanin pigments of raspberries during processing and storage. **J. Food Sci.**, 30, 400-405, 1965.
- DARAVINGAS, G; CAIN, R.F. Thermal degradation of black raspberry anthocyanin pigments in model systems. **J. Food Sci.**, v.33, p.138-142, 1968.

- DAVIES, A. J.; MAZZA, G. Copigmentation of simple and acylated anthocyanins with colorless phenolic compounds. **J. Agric. Food Chem.**, v.41, p.716-720, 1993.
- DUHARD, V.; GARNIER, J. C.; MEGARD, D. Comparison of the stability of selected anthocyanin colorants in drink model systems. **Agro Food Ind. Hi Tech**, v.8, p.28-34, 1997.
- DUITSCHAEVER, C. L.; ALBA, J.; BUTEAU, C.; ALLEN, B. Riesling wines made from must concentrated by reverse osmosis. I. Rxperimental conditions and composition of musts and wines. **Am. J. Enol. Vitic.**, v. 42, n. 1, p. 19-25, 1991.
- ELHABIRI, M.; FIGUEIREDO, P.; TOKI, K.; SAITO, N.; BROUILLARD, R. Anthocyanin-aluminium and gallium complexes in aqueous solution. **J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2**, p.355-362, 1997.
- FIGUEIREDO, P.; GEORGE, F.; TATSUZAWA, F.; TOKI, K.; SAITO, N.; BROUILLARD, R. New features of intramolecular copigmentation by acilated anthocyanins, **Phytochem.**, 51, n.1,p.125-132, 1999.
- FOSSEN, T.; CABRITA, L.; ANDERSEN, O. M. Color and stability of pure anthocyanins influenced by pH including the alkaline region. **Food Chem.**, v.63, p.435-440, 1998.
- FRANCIS, F. J. Analysis of Anthocyanins. In: MARKAKIS, P. (ed), **Anthocyanins as Food Colors**, Academic Press Inc., 1982. cap 7, p. 181-205.
- FRANCIS, F. J. Food colorants: Anthocyanins. **Crit. Rev. Food Sci. Nut.**, v.28, p.273-314, 1989.
- FULEKI, T.; FRANCIS, F. J. Quantitative methods for anthocyanins. 1. Extraction and determination of total anthocyanin in cranberries. **J. Food Sci.**, v. 33, p. 72-7, 1968.
- FURTADO, P.; FIGUEIREDO, P.; NEVES, H. C.; PINA, F. Photochemical and thermal degradation of anthocyanidins. **J. Photochem. Photobiol. A: Chem.**, v. 75, p. 113-38, 1993.

- GARCIA-VÍGUERA, C.; BRIDLE, P. Influence of structure on colour stability of anthocyanins and flavilium salts with ascorbic acid. **Food chem.**, v. 64, p. 21-6, 1998.
- GARCIA-VÍGUERA, C.; ZAFRILLA, P.; ARTÉS, F.; ROMERO, F.; ABELLÁN, P.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Colour and anthocyanin stability of red raspberry jam. **J. Sci. Food Agric.**, v. 78, p. 565-73, 1998.
- GONNET, J.; Colour effects of co-pigmentation of anthocyanins revisited – 1. A colorimetric definition using the CIELAB scale. **Food Chem.**, v. 63, n. 3, p.409-15, 1998.
- GONNET, J.; Colour effects of co-pigmentation of anthocyanins revisited – 2. A colorimetric look at the solutions of cyanin co-pigmented by rutin using the CIELAB scale. **Food Chem.**, v. 66, p. 387-94, 1999.
- GOTO, T.; KONDO, T.; TAMURA, H.; IMAGAWA, H. Structure of gentiodelphin, an acylated isolated from *Gentiana makinoi*, that is stable in dilute aqueous solution. **Tetrahedron Letters**, v. 23, n. 36, p. 3695-698, 1982.
- GOTO, T.; KONDO, T.; TAMURA, H.; KAWAHORI, K.; HATTATORI, H.; Structure of platyconin, a diacylated anthocyanin isolated from the chinese bell-flower *Platycodon grandiflorum*. **Tetrahedron Lett.**, v.24, 2181-2187, 1983.
- GOTO, T. Structure, stability and color variation of natural anthocyanins. **Prog. Chem. Org. Nat. Prod.**, v.52, p.113-158, 1987.
- GOTO, T.; KONDO, T. Structure and molecular stacking of anthocyanins-flower color variation. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, v.30, p.17-33, 1991.
- HANG, Y. D.; Recovery of food ingredients from grape pomace. **Proc. Biochem.**, Fev, p. 2-4, 1988.

- HARBONE, J. B. Spectral methods of characterizing anthocyanins. **Biochem. J.**, v. 70, p. 22-28, 1958.
- HARBONE, J. B. **Comparative Biochemistry of the Flavonoids**, Academic Press, London, England, 1967.
- HARBONE, J. B. Variation in and functional significance of phenolic conjugation in plants. In **Recent Advances in Phytochemistry, v.12. Biochemistry of Plant Phenolics**, SWAIN, T., HARBONE, J. B., VAN SUMERE, C. F., Plenum Press, New York, 1979.
- HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Anthocyanins and others flavonoids. **Natural Product Report**, v. 12, p.639-658, 1995.
- HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Anthocyanins and others flavonoids. **Natural Product Report**, p.632-652, 1998.
- HOSHINO, T.; MATSUMOTO, U. GOTO, T. The stabilizing effect of the acyl group on the co-pigmentation of acylated antocyanins with C-glucosylflavones. **Phytochem.**, v.19, p.663-667. 1980.
- HOSHINO, T.; GOTO, T. Effects of pH and concentration on the self-association of malvin quinonoidal base - eletronical and circular dichroic studies. **Tetrahedron Lett.**, v.31, p.1593-1596, 1990.
- HOSHINO, T. An approximate estimate of self-association constants and the self-stacking conformation of malvin quinonoidal bases studied by H NMR. **Phytochem.**, v.30, p. 2049-2055, 1991.
- HOUBIERS, C.; LIMA, J. C.; MAÇANITA, A. L.; SANTOS, H. Color stabilization of malvidin-3-glucoside: self-aggregation of the flavylium cation and copigmentation with the z-chalcone form. **J. Phys. Chem. B.**, 102, p. 3578-85, 1998.

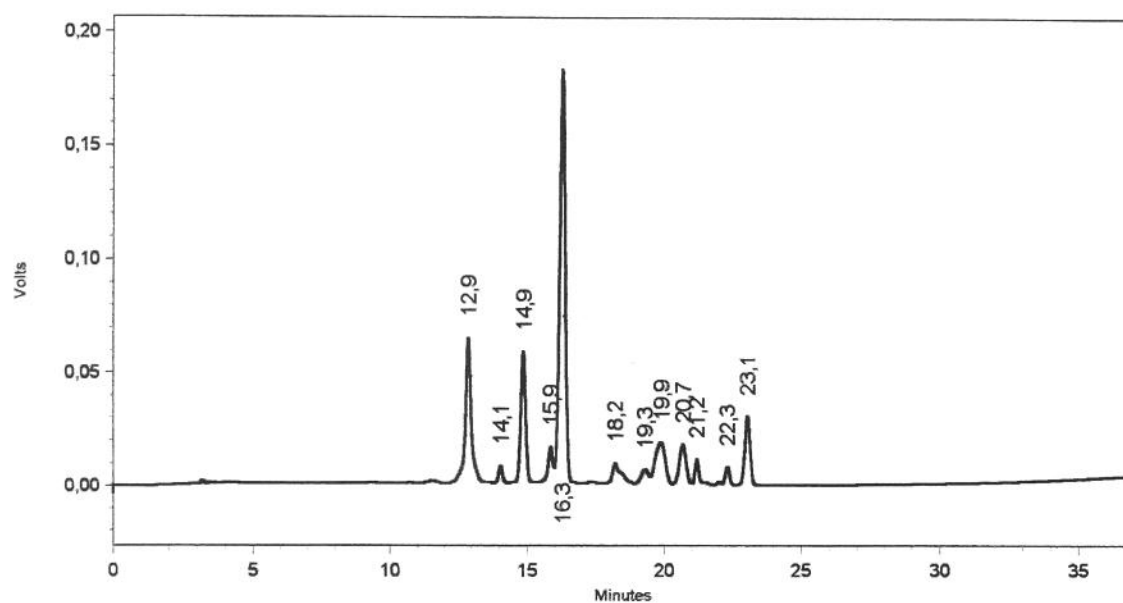
- HRAZDINA, G. Reactions of anthocyanins in food products. **Lebensm.-Wiss. u Technol.**, v.7, n. 4,p. 103-108, 1974.
- IACOBUCCI, G. A.; SWEENEY, J. G. The chemistry of anthocyanins , anthocyanidins and related flavylum salts. **Tetrahedron**, 39, v.19, 279-308, 1983.
- INAMI, O.; TAMURA, I.; KIKUZAKI, H.; NAKATANI, N. Stability of anthocyanins of *Sambucus canadensis* and *Sambucus nigra*. **J. Agric. Food Chem.**, v. 44, p. 3090-6, 1996.
- LAMIKANRA, O. Anthocyanins of *Vitis rotundifolia* hybrid grapes. **Food Chem.**, v. 33, p.225-37, 1989.
- LANCRENON, X. Recent trends in the manufacturing of natural red colours. **Proc. Biochem.**, Out., p. 16, 1978.
- MACCARONE, E.; MACCARONE, A.; RAPISARDA. Technical note: colour stabilization of orange fruit, juice by tannic acid. **Int. J. Food Sci. Technol.**, v.22, p.159-162, 1987.
- MAIN, J. H.; CLYDESDALE, F. M.; FRANCIS, F. J. Spray drying anthocyanin concentrates for use as food colorants. **J. Food Sci.**, v.43, 1978.
- MARKAKIS, P.; LIVINGSTON, G. E.; FELLERS, C. R. Quantitative aspects of strawberry pigment degradation. **Food Res.**, v.32, p.117-130, 1957.
- MAZZA, G.; BROUILLARD, R. Recent developments in stabilization of anthocyanins in food products. **Food Chem.**, v.24, p.207-225, 1987.
- MAZZA, G.; BROUILLARD, R. The mechanism of co-pigmentation of anthocyanins in aqueous solution. **Phytochem.**, v.29, p.1097-1102, 1990.
- MAZZA, R.; MINIATI, E. **Anthocyanins in Fruits, Vegetables and Grains**. CRC Press Inc USA, 1993. cap 1, p.1-28.

- METIVIER, R. P.; FRANCIS, F. J.; CLYDESDALE, F. M. Solvent extraction of anthocyanins from wine pomace. **J. Food Sci.**, v. 45, p. 1099-100, 1980.
- MEYER, A. S.; HEINONEN, M.; FRANKEL, E. N. Antioxidant interactions of catechin, cyanidin, caffeic acid, quercetin, and allagic acid on human LDL oxidation. **Food Chem.**, v.61, n. 1 /2, p. 71-5, 1997.
- MINIATI, E.; DAMIANI, P.; MAZZA, G. Copigmentation and self-association of anthocyanins in food model systems. **Ital. J. Food Sci.**, n.2, p.109-117, 1992.
- MOK, C; HETTIARCHY, N. S. Heat stability of sunflower-hull anthocyanin pigment . **J. Food Sci.**, v. 55, n.2, 553-55, 1991.
- OSAWA, Y. Copigmentation of Anthocyanins. In: MARKAKIS, P. (ed), **Anthocyanins as Food Colors**. Academic Press Inc., 1982. cap 2, p. 41-68.
- PALOMINO, O.; GÓMEZ-SERRANILLOS, M. P.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; VILLAR, A. Study of polyphenols in grape berries by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **J. Chromat. A**, v. 870, p. 449-451, 2000.
- PIFFAUT, B.; KADER, M.; GIRARDIN, M.; METCHE, M. Comparative degradation pathway of malvidin-3,5-diglucoside after enzymatic and thermal treatments. **Food Chem.**, v. 50, p. 115-20, 1994.
- Resolução CNS/MS no 04/88, de 24/11/88. Aditivos Intencionais em Alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, 19 de dezembro de 1988. Seção 1, pt.1.
- RIBÉREAU-GAYON, P. The anthocyanins of grapes and wines. In: MARKAKIS, P. (ed), **Anthocyanins as Food Colors**. Academic Press Inc., 1982. cap 8, p. 209-44.
- RICE, A. C. Collaborative study of the identification of grape varieties. **J. A. O. A. C.**, v. 51, n. 4, 1968.

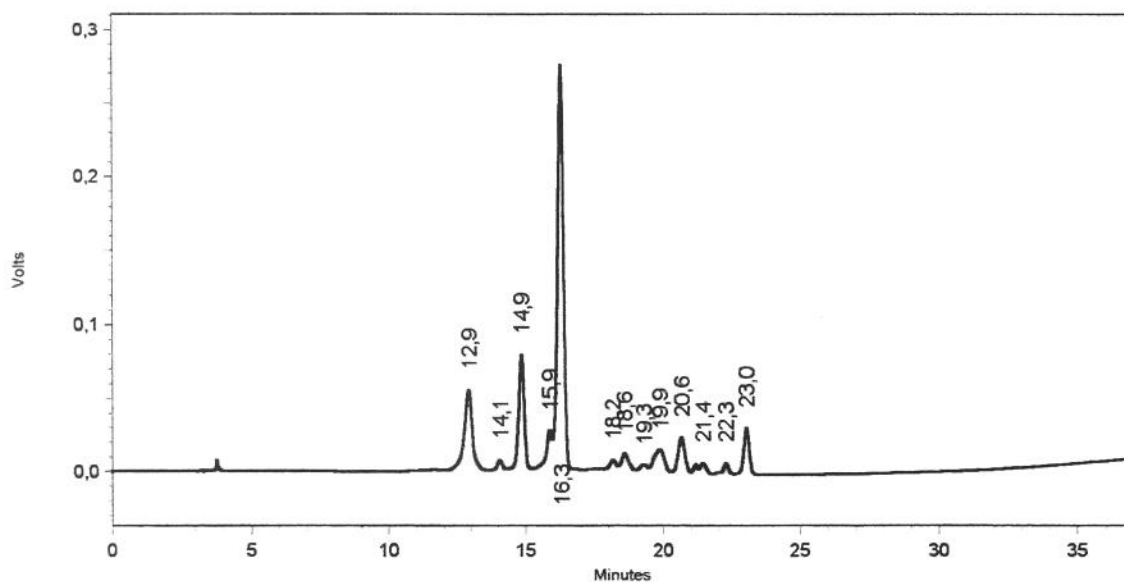
- RODRÍGUEZ-SAONA, L. E.; GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Color and pigment stability of red radish and red-fleshed potato anthocyanins in juice model systems. **J. Food Sci.**, v. 64, n. 3, p. 451-6, 1999.
- RODRIGO, J.; PÉREZ, E. E.; BOBBIO, F. O.; Estudios de estabilidad a la luz de antocianinas de repollo morado (*Brassica oleracea*, variedad capítara morada) In: **II Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos**, 1997, Campinas, p.37,
- SAITO, N. Light absorption of anthocyanin-containing tissue of fresh flowers by use of the opal glass transmission method. **Phytochem.**, v.6, p. 1013-1018, 1967.
- SCHEFFELDT, P.; HRAZDINA, G. Co-pigmentation of anthocyanins under physiological conditions. **J. Food Sci.**, v.43, p.517-523.1978.
- SHI, Z. L.; FRANCIS, F. J.; DAUN, H. Quantitative comparison of stability of anthocyanins from *Brassica oleracea* and *Tradescantia pallida* in non sugar drink model and protein model systems. **J. Food Sci.**, v. 57, n. 3, 768-70, 1992.
- SKREDE, G.; WROLSTAD, R. E.; LEA, P.; ENERSEN, G. Color stability of strawberry syrups. **J. Food Sci.**, v. 57, n. 1, p. 172-7, 1992.
- SOUZA, J. S. I. **Uvas para o Brasil**. 2ª ed.; Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz de Queiroz, v. 1, 1995, p.563.
- STANTON, J. L.; Consumer food trends that will impact food and beverage consumption world wide. **Fruit Proces.**, v. 2, p. 48-51, 1999.
- STEWART, R. N.; NORRIS, K. H.; ASEN, S. Microspectrophotometric measurement of pH effect on color of petal epidermal cell. **Phytochem.**, v.14, p.937-942, 1975.
- TEISSEDRE, P. L.; FRANKEL, E. N.; WATERHOUSE, A. L.; PELEG, H.; GERMAN, J. B. Inhibition of *in vitro* human LDL oxidation by phenolic antioxidants from grapes and wines. **J. Sci. Food Agric.**, v. 70, p. 55-61, 1996.

- TIMBERLAKE, C. F.; BRIDLE, P. Flavilium salts anthocyanins. In: HARBONE, J. B.; MADRY, T. J.; MADRY, H. **The Flavonoids**. London: Chapman & Hall Ltd, 1975. p. 215-266.
- TIMBERLAKE, C. F.; BRIDLE, P. Anthocyanins: colour augmentation with catechin and acetaldehyde. **J. Sci. Food Agric.**, v.28, p.539,544. 1977.
- WALFORD, J. **Development in Food Colors**. C.1, Applied Science Publisher, England, 1980.
- WESCHE-EBELING, P.; ARGÁIZ-JAMET, A.; HERNANDEZ-PORRAS, L. G.; LOPEZ-MALO, A. Preservation factors and processing effects on anthocyanin pigments in plums. **Food Chem.**, v. 57, n. 3, p. 399-403, 1996.
- WILLIAMS, M.; HRAZDINA, G. Anthocyanins as food colorants: effects of pH on the formation of anthocyanin-rutin complexes. **J. Food Sci.**, v. 44, p.66-71, 1979.
- YOON, J. M.; HAHN, T. R.; YOON, H. H.; Effect of copigmentation on the stability of anthocyanins from a korean pigmented rice variety. **Kor. J. Food Sci. Tech.**, v. 30, n. 4, p. 733-8, 1998.
- ZWEIG, G.; SHERMA, J. Detection reagents for paper and/or thin layer chromatography. In: **CRC Handbook of chromatography: General date and principles**. Cleveland, Ohio, 1986, CRC Press, Vol. II, p. 103-189.

ANEXO 1

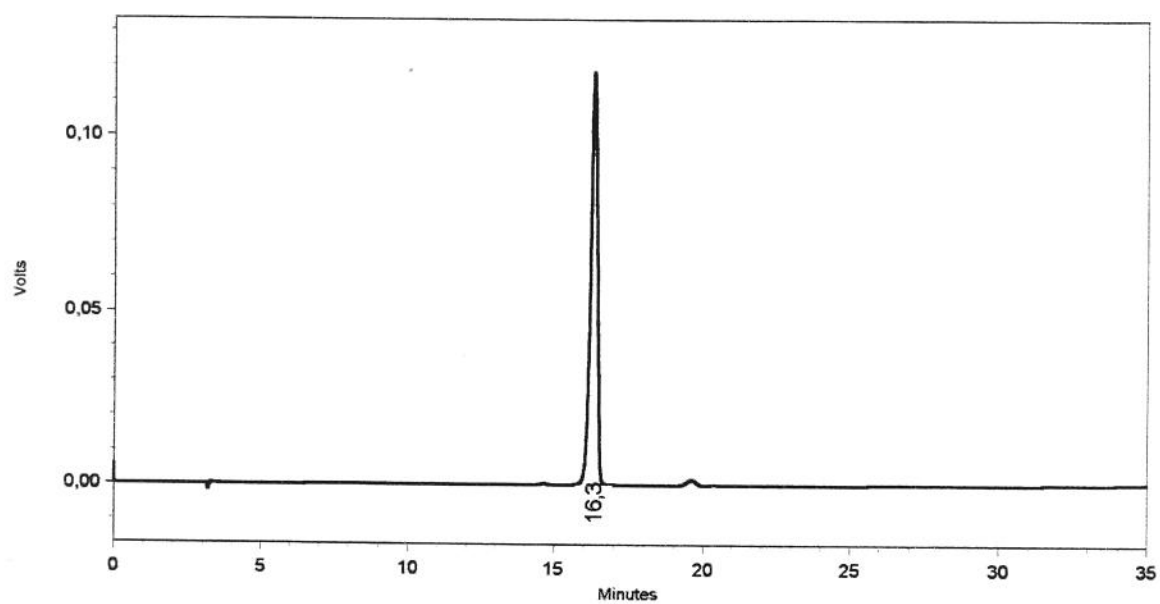


Cromatograma 1: Extrato de uva Seibel 2 a 536 nm.

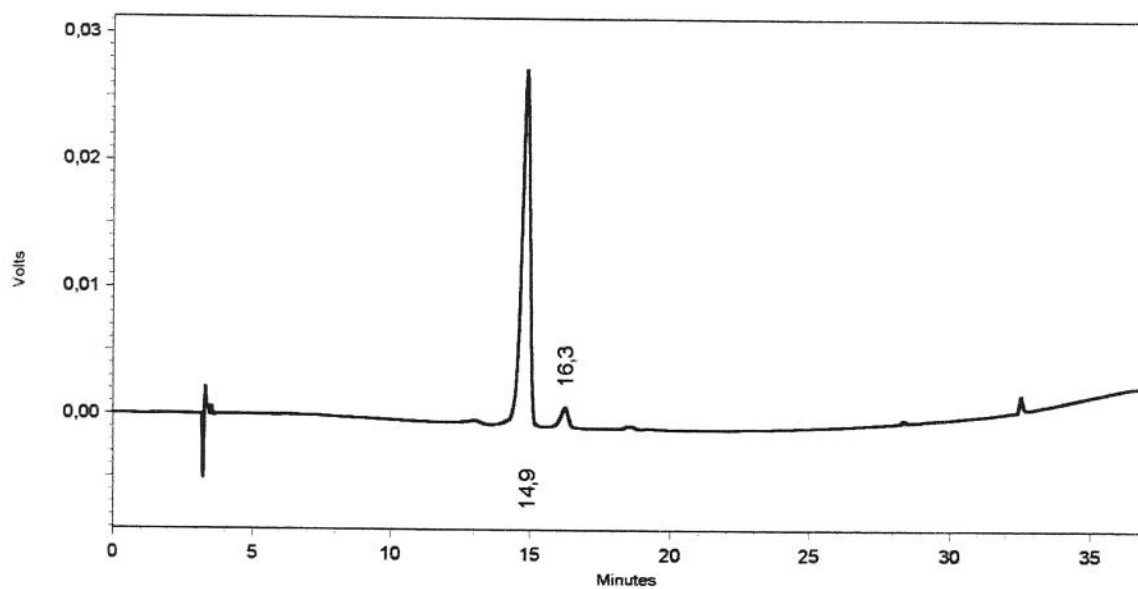


Cromatograma 2: Extrato de bagaço de uva Seibel 2 a 536 nm.

ANEXO 2

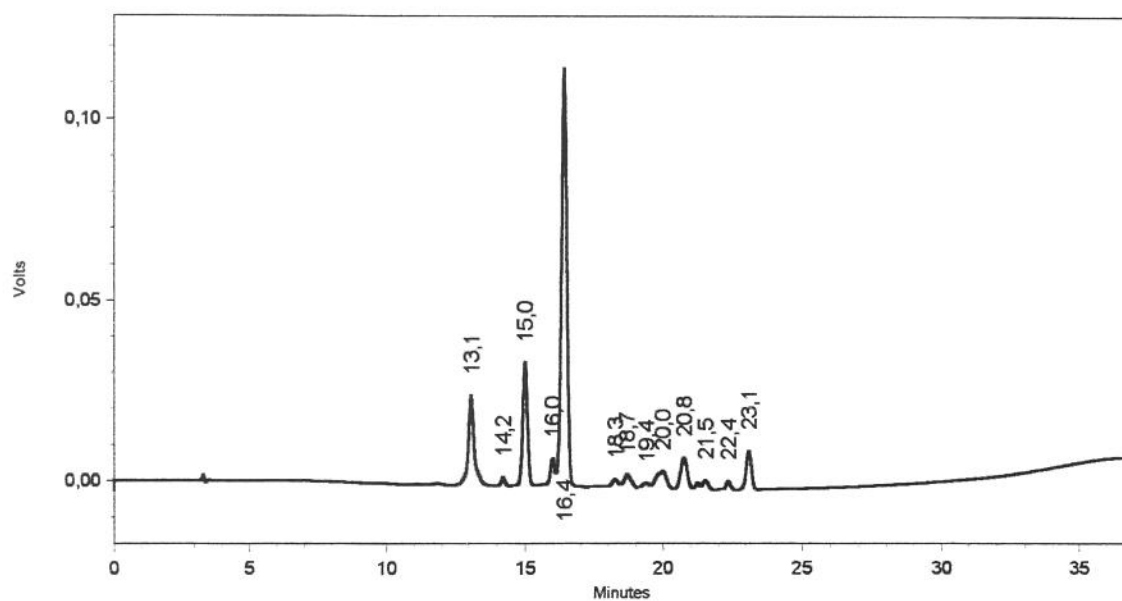


Cromatograma 3: Antocianina Z1.4 (malvidina-3-arabinosídeo) a 536nm.

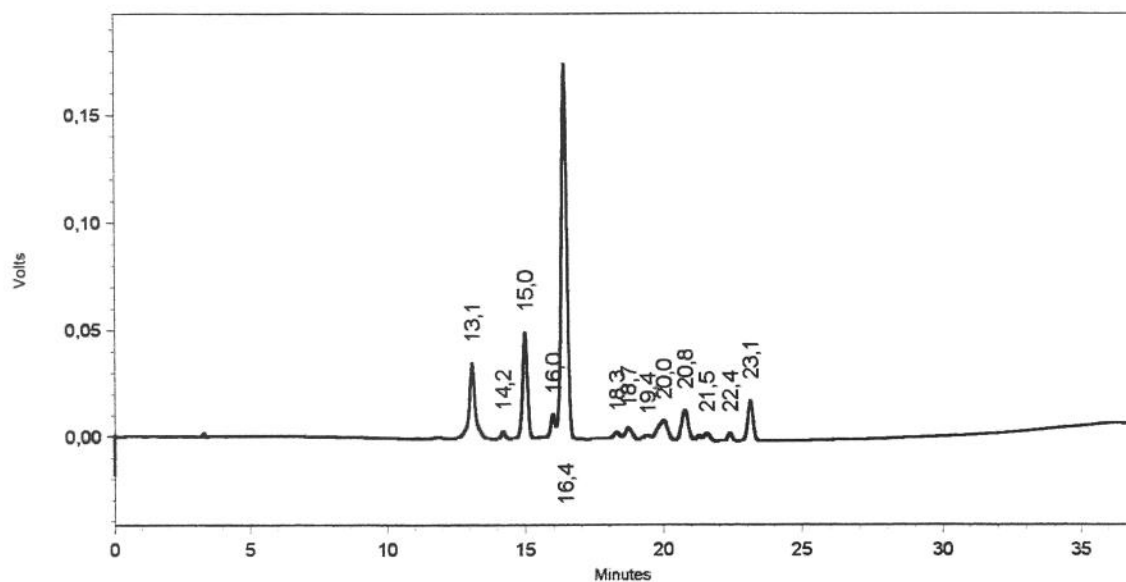


Cromatograma 4: Antocianina Z1.3 (petunidina-3-arabinosídeo) a 536 nm.

ANEXO 3

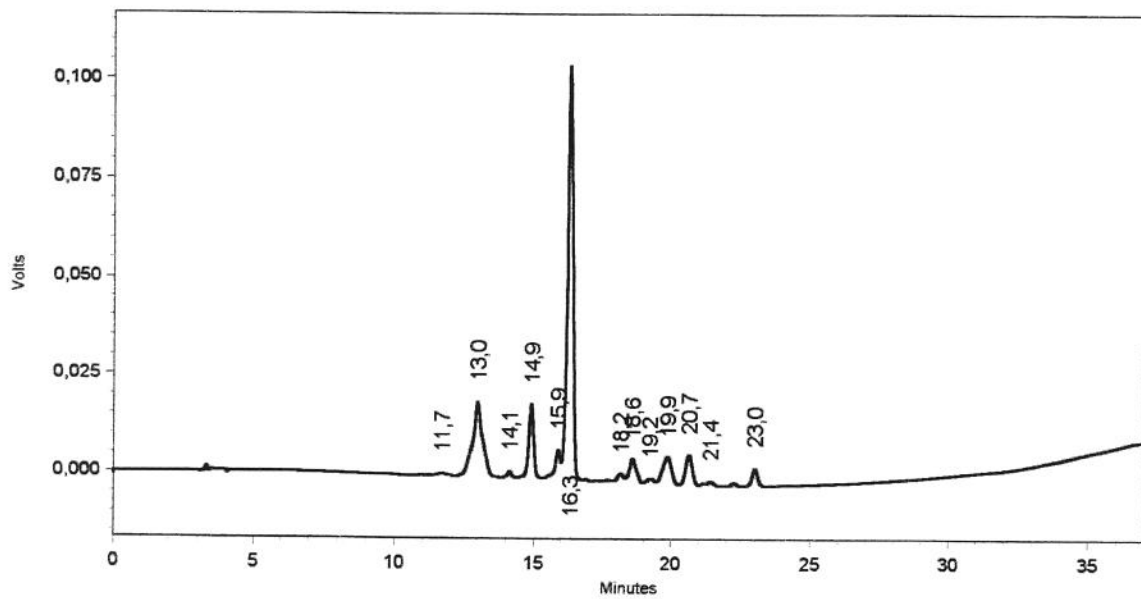


Cromatograma 5: Extrato bruto obtido a partir de extração do bagaço com etanol.

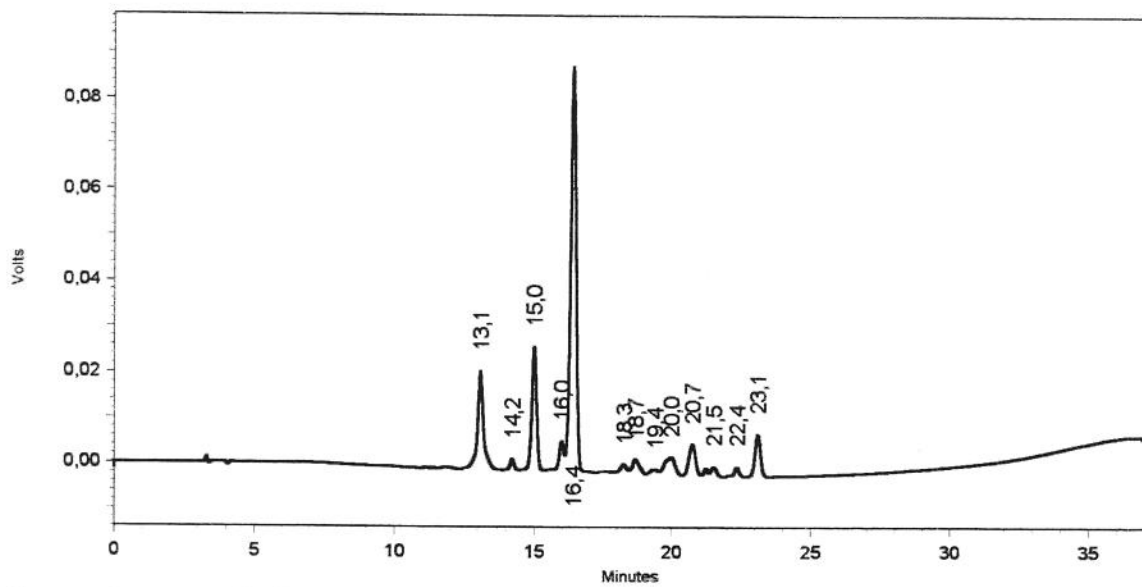


Cromatograma 6: Extrato bruto obtido a partir de extração do bagaço com etanol adicionado de 1200 ppm de dióxido de enxofre.

ANEXO 4

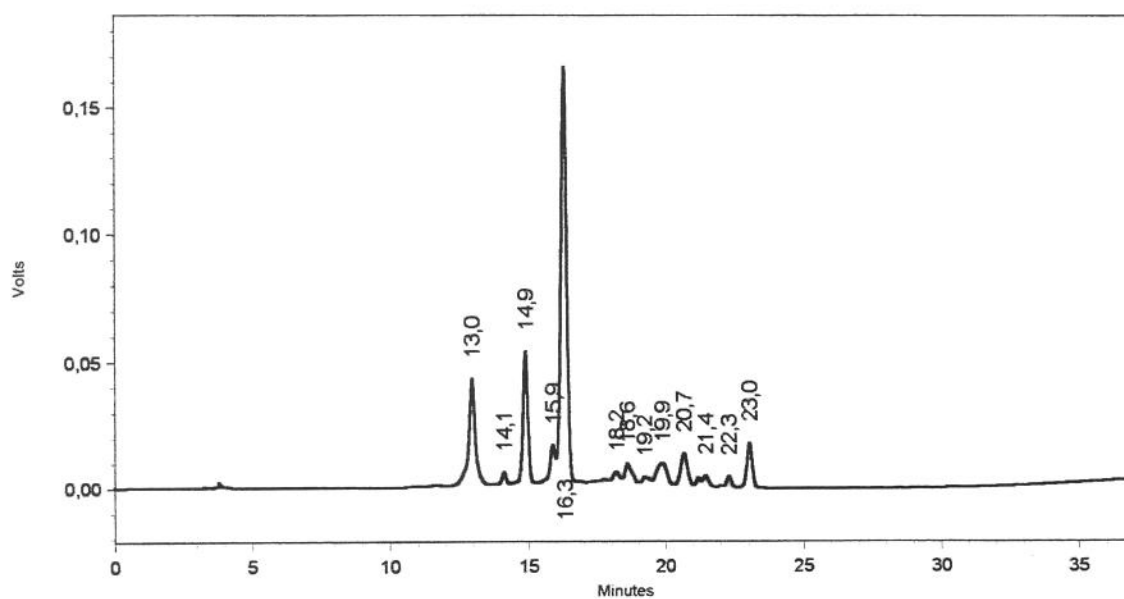


Cromatograma 7: Extrato bruto obtido a partir de extração do bagaço com água.

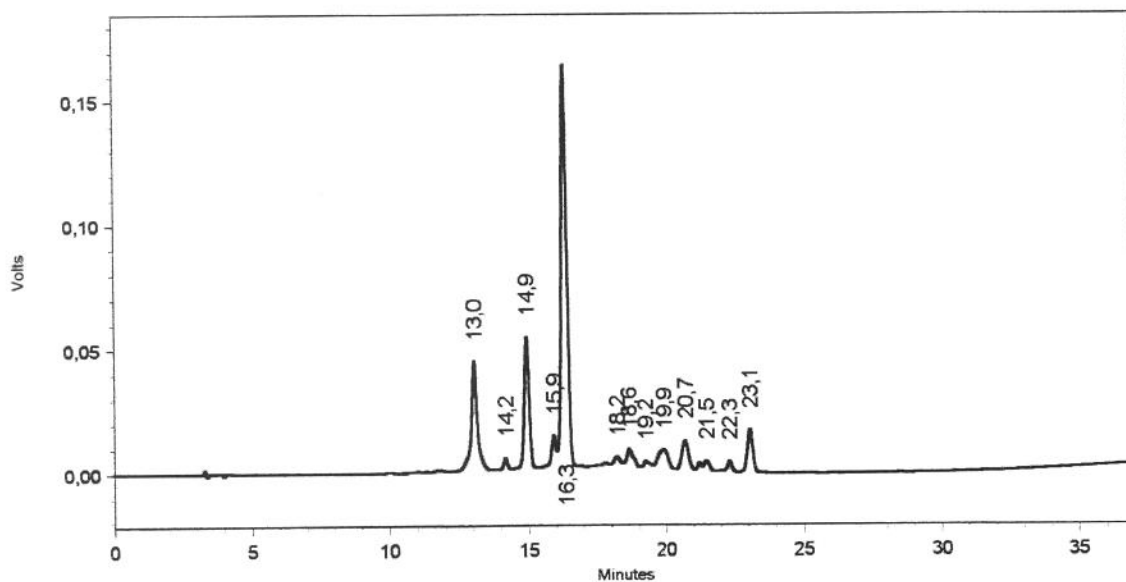


Cromatograma 8: Extrato bruto obtido a partir de extração do bagaço com etanol 50%.

ANEXO 5

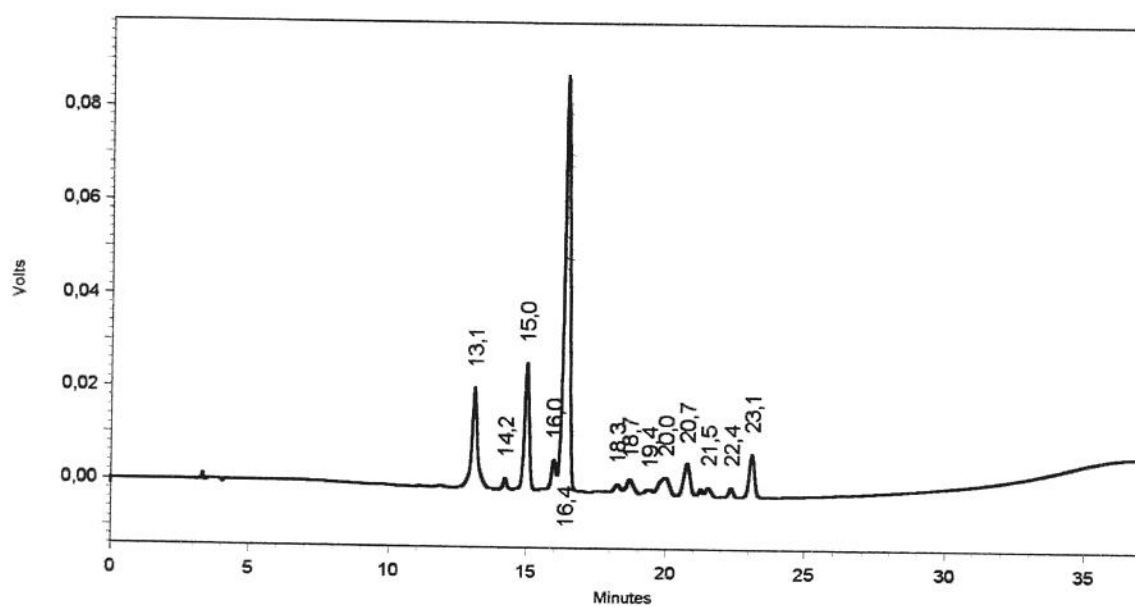


Cromatograma 9: Extrato bruto antes da concentração por osmose reversa.

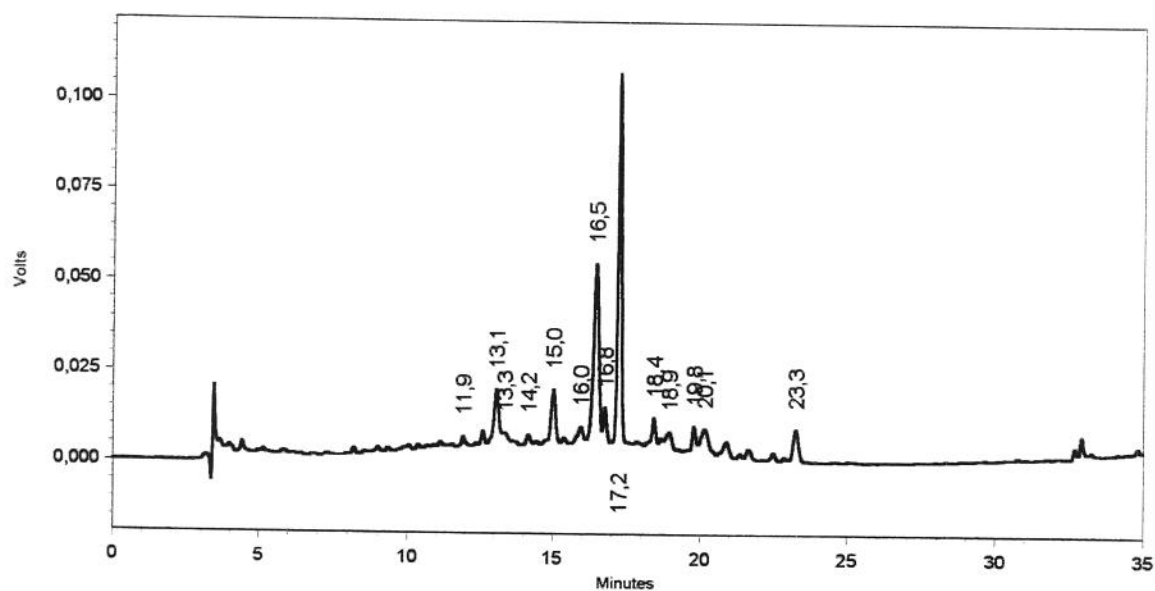


Cromatograma 10: Extrato bruto após concentração por osmose reversa.

ANEXO 6

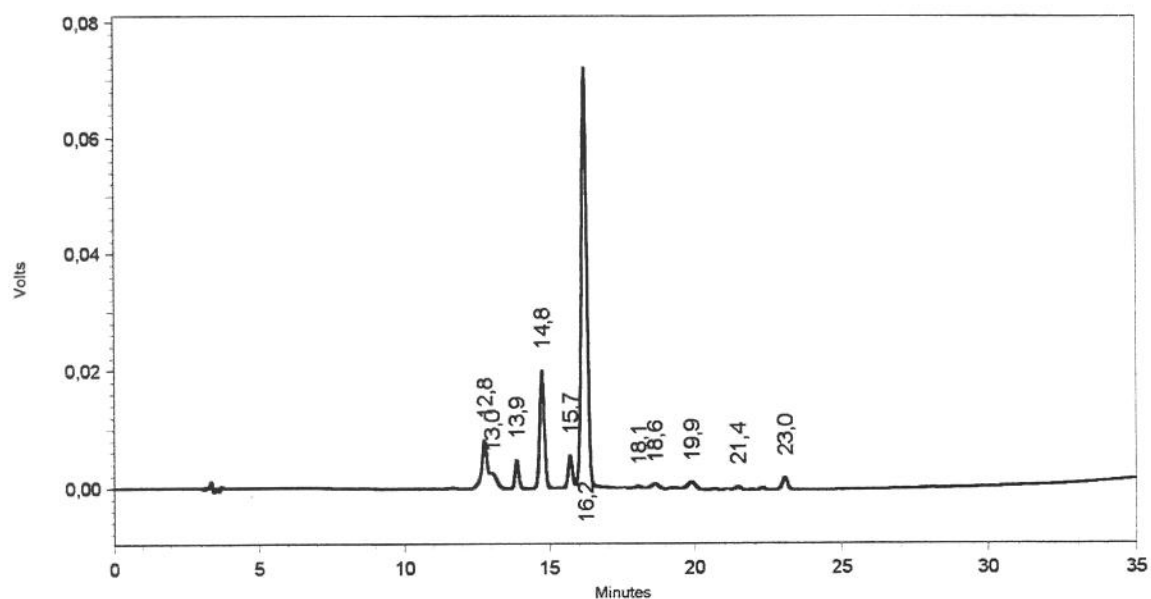


Cromatograma 11: Extrato bruto a 536 nm.

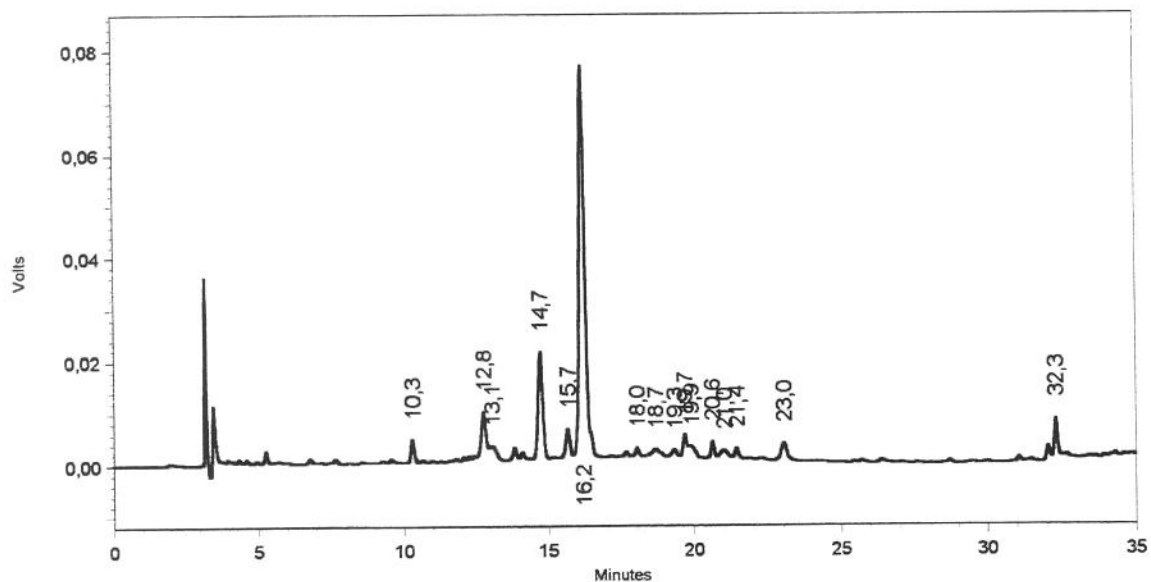


Cromatograma 12: Extrato bruto a 278 nm.

ANEXO 7



Cromatograma 13: Extrato parcialmente purificado a 536 nm.



Cromatograma 14: Extrato parcialmente purificado a 278 nm.