

LIGIA M. V. TREVISAN

LICENCIADA EM QUÍMICA

Instrutora Contratada pela Universidade Estadual de Campinas

aque
1001
1022
in
5022

IDENTIFICAÇÃO DE COMPONENTES DA MYRCIARIA JABOTICABA

Tese apresentada à Faculdade de Tecnologia de Alimentos
da Universidade Estadual de Campinas Para a Obtenção do
Título de Mestre em Ciências.

T729i

21133/BC

CAMPINAS

1971



UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL



1 - INTRODUÇÃO

A jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* Berg), é uma fruta tipicamente brasileira, sendo consumida principalmente como fruta fresca durante sua breve safra. A industrialização da fruta na forma de geléia, absorve uma parcela relativamente pequena da produção, além daquela consumida na fabricação caseira de licôres e xaropes.

Dada a importância do teor e da natureza dos carboidratos, ácidos orgânicos e antocianinas no processamento de geléias, procurou-se neste trabalho identificar estes componentes na jaboticaba, bem como dosá-los afim de estabelecer bases para um processamento da fruta em condições mais adequadas.

AL
a de
rias
Myr-

940%
teor
m de
ados
en
atos.
sô
na-

utas,
difi-
s fi
cação.

2 - REVISÃO DA LITERATURA

2.1. - Composição química da jabuticaba.

Em 1966 foram publicados os resultados de ALMEIDA e col. (1) que estudaram a composição química de grande número de frutas tropicais pertencentes a várias famílias botânicas, entre elas a jabuticaba comum (Myrciaria jaboticaba Berg).

Segundo êsses autores a jabuticaba contém 94,0% de açucares totais, sendo que 3,83% representam o teor de sacarose, calculado por diferença após a dosagem de açucares redutores em uma amostra hidrolizada. Os dados de ALMEIDA e col. indicam que 80% dos sólidos totais encontrados na fruta são representados pelos carboidratos.

Os demais dados obtidos por ALMEIDA e col. sobre a composição química da jabuticaba estão relacionados no quadro abaixo:

<u>Determinação</u>	<u>Resultados</u>
Proteínas	1,17%
Matéria graxa	0,11%
Fibras	0,35%
Cinzas	0,43%
pH	5,5

2.2. - Identificação de carboidratos.

A identificação de carboidratos em frutas, constituiu-se a princípio em um trabalho bastante difícil, desde que a semelhança entre suas propriedades físicas e químicas dificulta sua separação e identificação.

Com o advento da cromatografia em papel, introduzida por CONSDEN, GORDON e MARTEN(2), a possibilidade de identificar carboidratos e outros componentes em extratos de frutas, sofreu considerável simplificação; assim ASO e MATSUDA (3), em 1951, identificaram sacarose, glicose e frutose em maçãs.

SIEGELMAN (4), em 1954, usando cromatografia monodimensional descendente e com três sistemas de solventes, identificou glicose, frutose, sacarose e xilose em pêras e maçãs.

Usando cromatografia em papel, PEYNAUD e CAILLAVET (5), em 1955, estudaram os carboidratos de pêssegos e ameixas, identificando-os como glicose, frutose e sacarose.

Em 1965, WALI e HASSAN (6), examinaram os carboidratos presentes em 38 frutas pertencentes a 31 famílias botânicas, usando cromatografia em papel. Os autores encontraram glicose, frutose e sacarose em grande parte das frutas estudadas, além de arabinose que foi identificada em maçã, figo, tangerina, uva, tâmara, manga e goiaba.

Além da cromatografia em papel, método no qual estão baseados os trabalhos acima mencionados, a separação e identificação de carboidratos pode ser feita por cromatografia em camada delgada, método êste usado por PETROVIC (7), em 1969, que separou uma mistura contendo 13 carboidratos, entre os quais glicose, frutose e sacarose, por cromatografia bidimensional em placas de celulose.

A aplicação da eletroforese na separação de

misturas de carboidratos foi estudada por CONSDEN e STANIER (8), em 1952, que determinaram as mobilidades de vários açúcares tais como frutose, manose, glicose e arabinose, quando submetidos à eletroforese em papel. ORSI (9), em 1968, relatou a aplicação de eletroforese em papel na identificação de carboidratos e outros componentes dos alimentos.

2.3. - Identificação de ácidos orgânicos.

Em 1924, NELSON (10) tentou a separação dos ácidos orgânicos não voláteis que ocorrem no damasco, por destilação fracionada de seus ésteres etílicos. NELSON obteve oito frações, das quais preparou as hidrazidas, que permitiram a identificação dos ácidos: cítrico, l-málico (presente em seis das oito frações recolhidas) e oxálico.

WAGER e ISHERWOOD (11), em 1941, empregaram colunas de sílica gel para separar os ácidos orgânicos da ervilha. As frações eluídas com uma mistura de n-butanol e clorofórmio foram submetidas à cromatografia bidimensional em papel, com a qual os autores separaram 22 ácidos, dos quais 10 foram identificados como: propiônico, valérico, butírico, acético, succínico, láctico, oxálico, cis-aconítico, málico e cítrico.

A cromatografia em coluna de sílica gel foi usada também por CLEMENTS (12), que em 1964 estudou as transformações que ocorrem com os ácidos cítrico, málico, malônico e oxálico encontrados na laranja, durante as diferentes estações do ano.

A cromatografia em coluna com resinas de troca iônica, aplicada à separação de ácidos orgânicos, foi descrita por vários pesquisadores, entre os quais OWENS e col. (13), que em 1954 relataram a separação dos ácidos cítrico, málico, oxálico e glicólico presentes em açúcar de beterraba, usando resina de troca aniônica (forma de formiato) e efetuando a separação com pH variando entre 2,8 e 3,2.

Os ácidos orgânicos da banana, pêra, uva, limão e tangerina foram separados e identificados por cromatografia bidimensional em papel, por RELVAS (14) em 1959, que encontrou os ácidos cítrico, tartárico, málico e oxálico em todas as frutas estudadas, além de ácido láctico em pêra, banana e limão, e ácido fumárico em uva.

MAZLIAK e SALSAC (15), em 1965 usando cromatografia em fase gasosa separaram os ésteres metílicos dos ácidos málico, adípico, succínico, oxálico, cítrico, pirúvico e isocítrico presentes na polpa da maçã.

Mais recentemente, BOURZEIX e col. (16), estudaram a separação de ácidos orgânicos de vinhos em placas de celulose, obtendo a resolução de misturas contendo os ácidos cítrico, tartárico, málico, citramálico, láctico e succínico.

2.4. - Identificação de pigmentos antociânicos.

Nos primeiros trabalhos publicados sobre a identificação de pigmentos de vegetais, procedia-se à sua precipitação com éter a partir de um extrato alcoólico do vegetal, seguida pela dissolução do precipitado ob

tido em metanol acidificado e posterior cristalização do pigmento. Segundo êste procedimento, BROWN (17), em 1940 isolou a petunidina 3,5 diglicosídeo em uva (variedade Hunt Muscadine).

Em 1944, HAYASHI (18) isolou a malvidina 3,5 diglicosídeo de Rhododendrom reticulatum (flôr), usando uma solução saturada de ácido pícrico para precipitar a antocianina de um extrato aquoso da planta.

BATE-SMITH (19), em 1949 através da determinação dos Rf de várias antocianinas por cromatografia em papel, estabeleceu relações entre os valores determinados e a estrutura dos pigmentos examinados. Naquêlê trabalho BATE-SMITH verificou que os Rf das antocianinas em solventes alcoólicos ou aquosos, variavam em função do número de grupamentos hidroxila ou metoxila ligados às moléculas das antocianinas.

Uma revisão dos trabalhos relacionados com a identificação de antocianinas por cromatografia em papel, foi publicada por HARBORNE (20) em 1958, que introduziu também os parâmetros de novas antocianinas.

Ainda em 1958, HARBORNE (21) introduziu o estudo das propriedades espectrofotométricas dos pigmentos de vegetais como um método que possibilitava sua identificação, desde que a técnica espectrofotométrica fôsse aplicada a soluções contendo frações purificadas de antocianinas.

Seguindo as técnicas preconizadas por HARBORNE, ALBACH e col. (22) em 1963, separaram e identificaram peonidina 3-monoglicosídeo em uva (variedade Vinífera).

Mais recentemente, associando a cromatografia

em papel ao estudo dos espectros de absorção dos pigmentos purificados, DIAZ e LUH (23), em 1969 identificaram quatro antocianinas em uva (variedade Trousseau), respectivamente: petunidina 3-glicose, cianidina 3-glicose, malvidina 3-glicose e peonidina 3-glicose.

DEKASOS (24), em 1970, baseando-se nas propriedades químicas, cromatográficas e espectrofotométricas das antocianinas identificou em cerejas (variedade Montmorency), sete pigmentos: peonidina, peonidina 3-rutinosídeo, cianidina, cianidina 3-glicosídeo, cianidina 3-rutinosídeo, cianidina 3-diglicosídeo e cianidina 3-glicosilramnoglicosídeo.

A presente revisão bibliográfica revelou a falta de publicações diretamente ligadas à composição da Myrciaria jaboticaba Berg ou seja, jaboticaba comum, sobre a qual só foi encontrado um trabalho relativamente antigo. Considerando o objetivo deste trabalho, fez-se uma revisão das técnicas aplicadas na identificação de carboidratos, ácidos orgânicos e pigmentos antociânicos presentes em frutas.

3 - MATERIAL

As jabuticabas foram fornecidas pela Fazenda Experimental Santa Eliza, da Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo, localizada em Campinas.

As frutas, em estado de maturação própria para consumo, foram colocadas em invólucros de polietileno e armazenadas à temperaturas variando entre -15°C e -18°C .

Além do material de uso normal em laboratório, foram utilizados neste trabalho os equipamentos abaixo relacionados:

Conjunto para eletroforese "Beckmann", com célula tipo Durrum - modelo R, série D.

Cabine Ultravioleta. Ultra Violet Products, Inc.

Conjunto Desaga para cromatografia em camada delgada.

Espectrofotômetro Beckmann - Modelo DB.

Para a eletroforese e a cromatografia em papel, foi usado papel Whatman nº1. Os reagentes empregados neste trabalho ou eram produtos pró-análise das marcas Merck, Carlo Erba, J. T. Baker, ou foram purificados no laboratório por métodos usuais.

4 - MÉTODOS e RESULTADOS OBTIDOS

4.1. - Dosagem e identificação de carboidratos.

4.1.1. - Obtenção do extrato.

A 100,0g de fruta, livres de sementes, foram adicionados 300ml de água destilada e a mistura foi agitada com agitador mecânico a 30°C, durante 30 minutos. Após filtração, o resíduo foi novamente extraído com água destilada nas mesmas condições anteriores. Em um terceiro extrato obtido do resíduo anterior resultou negativa prova qualitativa para açúcares totais. Os dois primeiros extratos foram reunidos e misturados com 50g de Dowex 50W-X₄, forma H⁺, 200-400 mesh. O líquido incolor obtido pelo tratamento com a resina catiônica foi filtrado utilizando-se celite, afim de clarificar completamente o extrato.

O extrato foi concentrado a pressão reduzida à temperatura de 40°C, até um volume aproximado de 200ml, transferido a um balão volumétrico de 250ml e o volume completado com água destilada. Este extrato foi utilizado na dosagem e identificação dos carboidratos da jabuticaba.

4.1.2. - Dosagem de carboidratos.

Os carboidratos totais foram dosados pelo método colorimétrico da antrona (25), para o que 0,50ml do extrato obtido em 4.1.1. foram diluídos a 250ml com água destilada em balão volumétrico. O teor de açúcares to

tais encontrado foi de 8,00%.

A dosagem de carboidratos redutores foi feita pelo método colorimétrico de SOMOGYI - NELSON (26), (27), em uma amostra obtida pela diluição de 0,50ml do extrato inicial (4.1.1.) a 500ml em balão volumétrico. O teor de açucares redutores encontrado foi de 7,95%.

4.1.3. - Identificação dos carboidratos.

Seis tiras de papel (30,0 x 3,0 cm), em cada uma das quais foram aplicados 40 μ l do extrato obtido em 4.1.1., juntamente com duas tiras contendo cada uma 40 μ l de uma mistura padrão de glicose, frutose e sacarose na concentração de 1% em solução aquosa, foram submetidas à eletroforese em tampão borato 0,03M a pH 9,2 durante 2 horas a 350 volts.

Em seguida, as fitas foram sêcas ao ar e reveladas com uma solução a 1% de anilina e difenilamina em acetona, a qual foi adicionado ácido fosfórico 85%, na proporção de um volume de ácido para 10 volumes de solução (28), e finalmente aquecidas em estufa a 110°C por 15 minutos.

Nas fitas contendo o extrato da jabuticaba foram reveladas três manchas, que por comparação com as fitas contendo os padrões, foram identificadas como glicose, frutose e sacarose.

4.2. - Identificação dos ácidos orgânicos.

4.2.1. - Obtenção do extrato.

Para a separação e identificação dos ácidos orgânicos, foi feito um extrato de frutas exatamente como em 4.1.1.

No extrato clarificado foi determinado o pH que era 4,5. Este foi elevado para 7,5 com NaOH 0,5N procedendo-se então à concentração a pressão reduzida à temperatura de 40°C, até um volume final aproximado de 200 ml. Após a redução de volume, o pH do extrato foi corrigido para 3,0 com HCl 0,5N. Este extrato foi utilizado na identificação dos ácidos orgânicos.

4.2.2. - Identificação dos ácidos orgânicos.

Amostras de 10 µl do extrato obtido em 4.2.1., foram aplicadas em placas de sílica gel G (200 x 200 x 0,25mm) juntamente com 10 µl de soluções aquosas 0,1% dos ácidos cítrico, tartárico, málico, oxálico e galacturônico. As placas foram desenvolvidas em n-butanol saturado com água-ácido fórmico (95:5;v/v) (29) em uma única direção. Um segundo solvente, constituído de n-butanol álcool amílico-ácido fórmico-água (7,5:2,5:3:3; v/v - fase superior) (29) foi utilizado para desenvolver outras placas de sílica gel G, também em uma única direção.

As placas foram deixadas ao ar para eliminar o ácido fórmico, e reveladas com solução alcoólica de Azul de Bromofenol contendo 0,4g/l previamente neutralizada com NaOH 0,1N até o aparecimento de coloração azul (30).

As duas manchas, perfeitamente separadas, obti

das a partir da amostra, foram tentativamente identificadas como ácido cítrico e ácido oxálico, por comparação com as manchas dos padrões. Usando a mesma técnica acima descrita foram feitos cromatogramas de misturas de extrato de jabuticaba com e sem a adição de ácido oxálico e cítrico obtendo-se em cada caso somente 2 manchas correspondentes a ácido cítrico e ácido oxálico.

Amostras de 10 μ l de extrato obtido como em 4.2.1., mas sem correção de pH para 3,0, foram submetidas à cromatografia em placas de sílica gel G juntamente com 10 μ l de solução aquosa a 0,2% dos ácidos acético, fórmico, propiônico, capróico, caprílico, oxálico e cítrico. O cromatograma desenvolvido com acetato de metila-hidróxido de amônio 2,5% (95:5; v/v) (31) foi revelado com vermelho de metila a 0,1% em etanol 98% mostrando a existência somente dos ácidos cítrico e oxálico no extrato da jabuticaba.

4.3. - Pigmentos antociânicos.

4.3.1. - Obtenção do extrato.

A extração dos pigmentos antociânicos da jabuticaba foi feita por maceração de 50g de cascas da jabuticaba com 100ml de metanol contendo 0,1% de HCl, à temperatura ambiente, durante 12 horas em atmosfera de nitrogênio e ao abrigo da luz.

O extrato metanólico foi separado e o resíduo extraído outras três vezes, de maneira análoga àquela acima descrita. Os extratos obtidos foram reunidos e la

vados duas v \hat{e} zes com \acute{e} ter sulf \acute{u} rico.

Os pigmentos foram retidos em uma coluna de 4,0 x 30,0cm, de Dowex 50W-X₄, forma H⁺, 200-400 mesh. A coluna foi lavada com \acute{a} gua destilada at \acute{e} prova negativa para a \acute{c} ucares redutores no efluente, e em seguida com 200ml de metanol absoluto.

A elui \tilde{c} o dos pigmentos retidos na coluna ca \tilde{t} ionica, foi feita com solu \tilde{c} o \tilde{e} s de HCl em metanol, com concentra \tilde{c} o de \acute{a} cido crescente de 0,1% at \acute{e} 1%. Os extra \tilde{t} os obtidos foram reunidos e concentrados \grave{a} press \tilde{a} o redu \tilde{z} ida, temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

4.3.2. - Separa \tilde{c} o dos pigmentos.

A solu \tilde{c} o contendo os pigmentos antoci \tilde{a} nicos da jabuticaba, obtida em 4.3.1., foi submetida \grave{a} cromato \tilde{g} rafia monodimensional descendente, em papel (18,0x48,0 cm). Foram feitos 100 cromatogramas, aplicando-se cada vez 0,5ml do extrato, e o seu desenvolvimento se f \hat{e} z com \acute{a} cido ac \acute{e} tico- \acute{a} gua- \acute{a} cido clor \acute{i} drico conc. (15:82:3; v/v) (solvente I) durante 16 horas, \grave{a} temperatura ambiente e abrigo da luz.

Os cromatogramas foram s \acute{e} cos ao ar e ao abrigo da luz. Em cada cromatograma foram obtidas quatro zonas (A, B, C e D a partir da linha inicial do cromatograma), das quais foram eluidas separadamente as zonas B e D com solu \tilde{c} o 0,1% de HCl em metanol.

As solu \tilde{c} o \tilde{e} s obtidas pe \tilde{l} a elui \tilde{c} o de cada fra \tilde{c} o foram filtra \tilde{d} as s \hat{o} b \tilde{r} e l \tilde{a} de vidro e concentradas a press \tilde{a} o reduzida, temperatura ambiente e ao abrigo da

luz.

Dez μ l de cada fração isolada foram submetidos à cromatografia monodimensional descendente em papel. De cada uma das duas frações foram feitos três cromatogramas com os seguintes solventes: n-butanol-ácido acético-água (4:1:5; v/v - fase superior) (solvente II); ácido clorídrico conc. -água (3:97; v/v) (solvente IV) e ácido acético-ácido clorídrico conc. - água (15:3:82; v/v) (solvente I). Em todos os casos obteve-se uma só mancha correspondente a cada fração isolada.

4.3.3. - Obtenção dos Rf dos pigmentos.

Foram feitos nove cromatogramas das soluções B e D, usando-se em cada um amostras de 10 μ l das soluções. Além das frações B e D, uma amostra de malvidina 3,5 -diglicosídeo extraída de suco de uva (32) foi aplicada em cada cromatograma. Os cromatogramas desenvolvidos com os solventes II, III e IV (condições especificadas na Tabela 1), foram sêcos ao ar e os Rf dos pigmentos foram me didos. Os valores anotados (Tabela 2) representam a mé dia aritmética dos resultados obtidos em três cromatogramas desenvolvidos para cada solvente.

Após a medida dos Rf dos pigmentos, três cromatogramas foram usados para as seguintes observações: a. comportamento sob luz ultravioleta; b. mudança de côr pela ação de vapores de amônio; c. mudança de côr quando pulverizados com solução a 5% de $AlCl_3$ em etanol 98%.

Com luz ultravioleta, somente a mancha padrão de malvidina 3,5 - diglicosídeo mostrou fluorescência.

Nos cromatogramas tratados com vapôres de amônio as manchas B e D sofreram mudança da coloração rosa para azul.

No cromatograma pulverizado com solução a 5% de $AlCl_3$ em etanol 98% não houve mudança da cor de nenhuma das amostras.

A Tabela 2 (página 17), reúne os dados obtidos nas experiências aqui descritas em comparação com dados extraídos da literatura (20) para peonidina e peonidina 3-glicose (Pn-3 Glicose).

Tabela 1

Solventes e condições usadas na cromatografia dos pigmentos da jabuticaba.

Composição	Abreviat.	Fase Usada	Identificação	Tempo (hs)
Ác. acético-HCl conc. H ₂ O 15:3:2	I	miscível	antocianinas; agliconas	16
N-butanol-ác. acético-H ₂ O* 4:1:5	II	superior	antocianinas; agliconas açúcares	18
n-butanol - HCl 2N** 1:1	III	superior	antocianinas	24
HCl conc. - H ₂ O 3:97	IV	miscível	antocianinas	4
ác. acético-HCl conc. - H ₂ O 30:3:10	V	miscível	antocianidinas	13
ác. fórmico-HCl conc. - H ₂ O 5:2:3	VI	miscível	antocianidinas	6
n-butanol-piridina-H ₂ O 6:3:1	VII	miscível	açúcares	14

* - O solvente foi preparado 36hs antes de ser usado para a medida dos Rf das antocianinas.

** - O cromatograma foi equilibrado 24hs antes de ser desenvolvido. Para o equilíbrio usou-se a fase inferior do solvente.

Tabela 2

Rf e propriedades químicas dos pigmentos da jabuticaba.

Pigmento	Valores de Rf			Aparência		Ação de NH ₃	Ação de AlCl ₃
	<u>Solv. II</u>	<u>Solv. III</u>	<u>Solv. IV</u>	<u>Visível</u>	<u>U.V.</u>	<u>visível</u>	
B	0,69	0,68	0,03	rosa claro	sem	azul	negativo
D	0,40	0,27	0,07	rosa	fluores	azul	negativo
peonidina	0,70	---	--	rosa claro	cência	---	negativo(20)
Pn3-glicose	0,41	0,28	0,09	rosa		azul	negativo(20)

4.3.4. - Espectros de absorção dos pigmentos.

Os espectros de absorção no ultra violeta e visível com soluções a pH 5,0 das frações B e D (obtidas em 4.3.2.) em metanol absoluto, foram determinados antes e depois da adição de 5 gotas de solução a 5% de $AlCl_3$ em etanol 98%. Os espectros obtidos estão representados nos gráficos 1 e 2, na página 19.

Os resultados obtidos nas determinações dos espectros de absorção dos pigmentos B e D, juntamente com dados da literatura sobre peonidina e peonidina 3-mono-glicosídeo foram reunidos na Tabela 3.

Tabela 3

Relação das propriedades espectrais dos pigmentos da jabuticaba

Pigmento	λ máximo (m μ)	<u>D.O. 440 mμ</u> D.O. λ máximo	Deslocamento do λ máx. c/ $AlCl_3$
B	530	28	Zero
D	520	30	Zero
peonidina	532	--	Zero (21)
Pn-3 Gli- cose	523	---	Zero (21)

GRÁFICO - 1
ESPECTRO DE ABSORÇÃO - PIGMENTO B

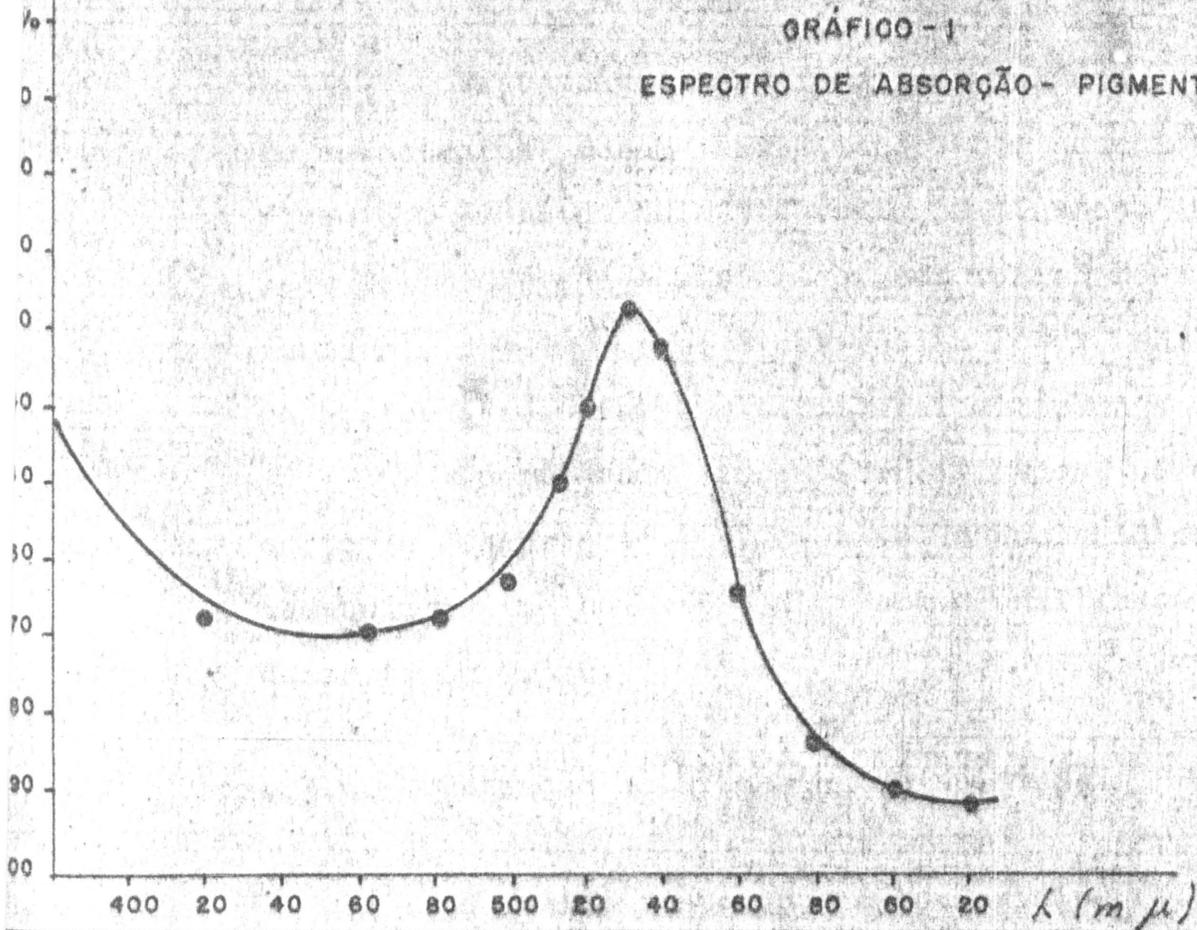
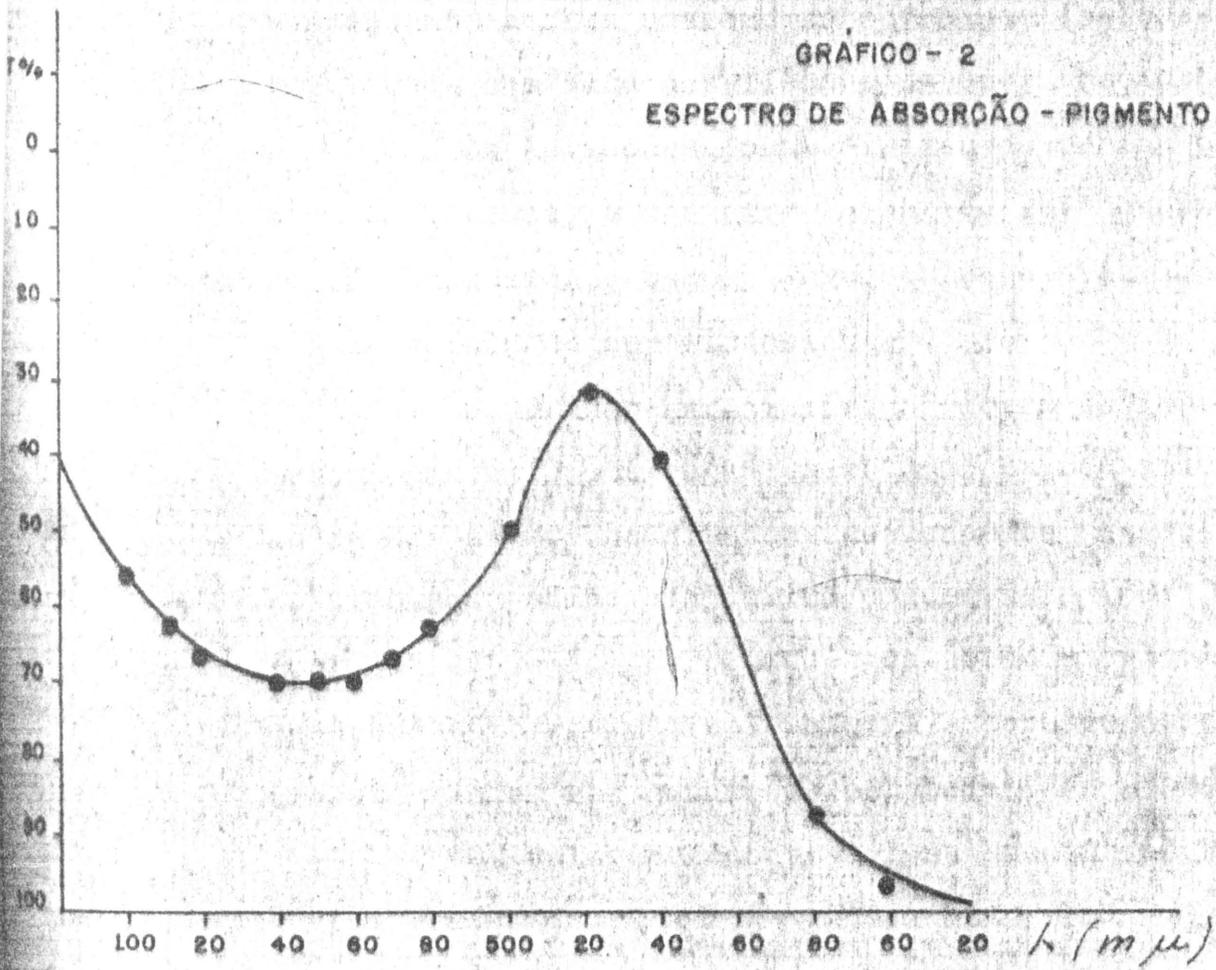


GRÁFICO - 2
ESPECTRO DE ABSORÇÃO - PIGMENTO D



4.3.5. - Hidrólise ácida das antocianinas.

Exatamente três ml de cada solução concentrada de antocianina foram hidrolizados por aquecimento a refluxo com 3,0ml de HCl 1N durante 30 minutos. O hidrolizado foi resfriado e misturado com resina Dowex 50W-X₄, forma H⁺, 200-400 mesh, e com resina Dowex 1-X₁, 50-100 mesh, forma acetato. O material foi filtrado a vácuo.

No filtrado, foram identificados os açúcares conforme descrito em 4.3.7., e as antocianidinas, retidas pela resina Dowex 50W-X₄, foram analisadas conforme descrito em 4.3.6.

4.3.6. - Obtenção do Rf das antocianidinas.

A resina contendo a antocianidina (4.3.5.) correspondente a cada uma das antocianinas isoladas (4.3.2.) foi lavada com água destilada e metanol absoluto.

As agliconas foram eluídas da resina com HCl a 0,1% em metanol, e o extrato obtido foi concentrado à pressão reduzida a temperatura ambiente e abrigo da luz, até um volume de aproximadamente 1 ml.

Os Rf das antocianidinas foram obtidos por cromatografia em papel previamente molhado com solução aquosa de HCl a 1%, na direção descendente usando-se ácido acético-água-ácido clorídrico concentrado (30:10:3;v/v) (solvente V) e ácido fórmico-água-ácido clorídrico concentrado (5:3:2;v/v) (solvente VI), para desenvolver os cromatogramas, nas condições estabelecidas na Tabela 1.

Os valores encontrados na medida do Rf das an

tocianidinas, juntamente com dados obtidos da literatura (20), estão reunidos na Tabela 4.

Tabela 4

Relação dos Rf das antocianidinas de jabuticaba

Pigmento	Valores de Rf	
	Solv. V	Solv. VI
B	0,63	0,30
D	0,62	0,30
Peonidina (20)	0,63	0,30

4.3.7. - Identificação dos açúcares.

Quarenta μ l da fração contendo açúcares obtida pela hidrólise ácida dos pigmentos (4.3.5.) foram aplicados em papel (20,0 x 48,0cm) ao lado de amostras padrões de soluções aquosas a 0,5% de glicose, arabinose, ramnose, galactose, xilose e de amostras de cada açúcar padrão adicionados ao hidrolizado obtido dos pigmentos da jabuticaba.

Os cromatogramas foram submetidos à cromatografia monodimensional descendente, com n-butanol-piridina-água (6:3:1; v/v) (solvente VII) e n-butanol-ácido acético-água (4:1:5; v/v) (solvente II), nas condições indicadas na Tabela 1.

Os resultados obtidos, os dados são:

Após o desenvolvimento, os cromatogramas foram pulverizados com solução de anilina e difenilamina 1% em acetona, à qual foi adicionado ácido fosfórico 85% na proporção de um volume de ácido para 10 volumes de solução (28). Os cromatogramas foram aquecidos em estufa à 110°C, durante 15 minutos, tendo sido então medidos os Rf e Rg (Rf em relação à glicose) dos açúcares analisados. A mistura contendo glicose e a amostra correspondente ao hidrolizado do pigmento D produziu somente uma mancha, enquanto que as demais misturas apresentaram duas manchas. Na amostra correspondente ao pigmento B, não foi revelada a presença de açúcares.

Os valores encontrados neste trabalho, estão reunidos na tabela 5, com dados obtidos da literatura. (33) e (34).

Tabela 5

Rf dos carboidratos obtidos na hidrólise ácida dos pigmentos da jabuticaba

Amostra	Solvente II		Solvente VII	
	Valores de Rf		Valores de Rg	
	Determinado	Literatura	Determinado	Literat.
D	0,16	----	0,98	----
glicose	0,16	0,18	1,00	1,00
arabinose	0,20	0,21	1,19	1,17
ramnose	0,36	0,37	1,62	1,61
galactose	0,14	0,15	0,88	0,89
xilose	0,30	0,30	1,29	1,27

4.4. - Dosagem de substâncias pecticas.

As substâncias pecticas presentes na jabuticaba foram dosadas como pectato de cálcio, segundo o método de CARRÉ e HAYNES (35), modificado por MACHNNY (36).

De acordo com o método acima mencionado, o teor de substâncias pecticas encontrado em quatro amostras de jabuticaba foi de 1,5%, sendo que esta porcentagem representa a média aritmética das quatro determinações.

5 - DISCUSSÃO

5.1. - Métodos de dosagem e identificação dos componentes de frutas.

5.1.1. - Métodos de dosagem.

Os carboidratos redutores podem ser dosados segundo métodos volumétricos ou gravimétricos, baseados na sua oxidação por soluções alcalinas de sulfato de cobre. Com estes métodos o teor de dissacarídeos não redutores só pode ser determinado por diferença (37).

No presente trabalho foram usadas técnicas semimicroanalíticas pela sua rapidez e pequeno consumo de material. Assim, para dosagem de açúcares redutores foi empregado o método colorimétrico de SOMOGYI - NELSON (26), (27) para os açúcares totais o método da antrona (25) evitando-se também assim a necessidade de hidrolisar a fração contendo os carboidratos para a determinação do teor de carboidratos totais.

Os métodos usualmente empregados para a determinação do teor de substâncias pécnicas estão baseados na sua precipitação com solventes como etanol e acetona (38) ou com solução de cloreto de cálcio (39). A precipitação com etanol ou acetona não é aconselhável para a determinação do teor de substâncias pécnicas em extratos de plantas pois estes solventes podem precipitar outros constituintes de extratos vegetais tais como amido, hemi celulosas e dextrinas.

A escolha do método introduzido por CARRÉ e HAYNES (35) para a determinação do teor de substâncias

pécticas da jabuticaba deve-se ao fato de que a dosagem das substâncias pécticas como pectato de cálcio é relativamente simples, de rápida execução e se constitui no método atualmente mais empregado para dosagem de substâncias pécticas em sucos de frutas.

5.1.2. - Métodos de identificação de carboidratos, ácidos orgânicos e pigmentos antociânicos.

5.1.2.1. - Carboidratos.

Dentre os métodos encontrados na literatura sobre a identificação de carboidratos em frutas, os mais comumente empregados são: cromatografia em papel, cromatografia em camada delgada e eletroforese, sendo o primeiro o mais comumente empregado na resolução de misturas de carboidratos. Embora a separação obtida seja satisfatória, a cromatografia em papel não se constitui em um processo rápido, uma vez que os solventes geralmente usados requerem 20 horas ou mais para irrigar um cromatograma (34).

A separação por cromatografia em camada delgada é feita usando-se como adsorvente kieselguhr G ou sílica gel G e entre os solventes polares mais usados para o desenvolvimento dos cromatogramas podem ser citados: acetato de etila-isopropanol-água (65:25,5:22,5; v/v) e n-butanol-ácido acético-água (60:30:10; v/v) (40).

Entretanto, ensaios preliminares realizados neste trabalho, usando os solventes já mencionados além de outros indicados por STAHL e col. (40) em placas de

kieselghur e sílica gel G, não forneceram bons resultados na separação de misturas contendo glicose, frutose e sacarose, principalmente no que diz respeito à separação entre glicose e frutose.

Tendo-se em vista que glicose, frutose e sacarose são açúcares que ocorrem com frequência em frutas, a cromatografia em camada delgada, apesar da rapidez com que pode ser desenvolvida, mostrou-se desaconselhável para ser usada neste trabalho, enquanto que a eletroforese em papel revelou-se um processo eficiente, quando, no início deste trabalho foram realizados ensaios com sistemas padrões contendo glicose, frutose e sacarose.

Seguindo a técnica de eletroforese em papel, usada por HASHIMOTO e col. (41), a separação entre esses três açúcares foi conseguida em duas horas, com resultados reprodutíveis para amostras contendo de 20 µg até 100 µg de açúcares.

5.1.2.2. - Ácidos orgânicos.

A separação de ácidos orgânicos presentes em extratos de vegetais, pode ser conseguida pela aplicação de métodos cromatográficos diretamente aos sucos, evitando-se extrações com solventes, geralmente demoradas e pouco satisfatórias principalmente com ácidos policarbônicos.

A cromatografia em coluna, especialmente com resinas de troca aniônica, tem sido empregada na separação de ácidos orgânicos contidos no extrato de um vegetal (42), após verificação da pureza das frações obtidas.

Também na identificação dos ácidos orgânicos que ocorrem em frutas a cromatografia em papel tem sido o método mais empregado, devido a sua capacidade de resolução das misturas. No entanto, a separação dos componentes de uma mistura de ácidos orgânicos por cromatografia em papel, direta dos extratos vegetais além de demorada é prejudicada pela presença de outros produtos normalmente presentes nos extratos de frutas, dificultando a separação nítida dos ácidos. Neste trabalho a cromatografia em camada delgada de sílica gel G, utilizando-se para o desenvolvimento das placas os mesmos solventes usados na cromatografia em papel, permitiu a separação de misturas artificiais contendo os ácidos cítrico, tartárico, málico e oxálico, e para o extrato a separação dos ácidos presentes não sofreu interferências de açúcares ou outras impurezas.

Além disso, a cromatografia em camada delgada com sílica gel G, permitiu a separação de misturas padrões de ácidos monocarboxílicos de baixo peso molecular, conforme descrito em 4.2.2.

5.1.2.3. - Pigmentos antociânicos.

Para a separação e identificação de antocianinas, as técnicas mais largamente usadas por diferentes autores (43, 44), são: cromatografia em coluna, cromatografia mono e bidimensional em papel e em placas, e finalmente eletroforese.

A cromatografia de antocianinas em coluna com poliamida, ácido silícico ou celulose em pó, embora seja

um processo ainda usado, tende a ser substituída ou precedida pelo uso de resinas de troca iônica, que são empregadas atualmente na purificação e concentração inicial dos extratos.

As colunas com resinas catiônicas (Dowex 50W X₄), são particularmente úteis na purificação dos extratos obtidos de frutas ou flôres, ricos em açúcares, ácidos e sais orgânicos, os quais dificultam a separação e purificação dos pigmentos com os adsorventes usuais(45).

A cromatografia em camada delgada, com placas de celulose, técnica ainda pouco difundida para antocianinas, mostrou-se inadequada neste trabalho, pois a separação obtida foi incompleta, com qualquer um dos solventes usados.

Neste trabalho, os pigmentos foram isolados do extrato metanólico obtido das cascas da jabuticaba por coluna de Dowex 50W-X₄, e a separação das antocianinas foi feita por cromatografia em papel, o que permitiu o uso das pequenas quantidades dos pigmentos disponíveis.

5.2. - Discussão dos resultados obtidos.

5.2.1. - Carbohidratos.

Os dados da eletroforese em papel dos extratos obtidos em 4.1.1. mostraram que somente glicose, frutose e sacarose estão presentes na jabuticaba, tendo sido observado que a quantidade de sacarose deveria ser inferior aquelas de glicose e frutose. Efetivamente o teor de sacarose encontrado foi de 0,05%, enquanto que para os açúcares redutores o valor encontrado foi de 7,95%.

A predominância absoluta dos açúcares redutes (glicose e frutose) em relação à sacarose está aparentemente em discordância com os valores encontrados por ALMEIDA e col. (1), que determinaram um teor de sacarose na jabuticaba de 3,85%. Possivelmente diferentes estágios de maturação poderiam alterar a proporção de açúcares totais e redutores.

Entre as frutas não climatéricas, grupo no qual inclue-se a jabuticaba, existem frutas como a laranja e o grapefruit nas quais o teor de sacarose diminue com a maturação (46).

5.2.2. - Ácidos orgânicos livres.

As placas de sílica gel G contendo o extrato obtido em 4.2.2., quando desenvolvidas com n-butanol saturado de água - ácido fórmico (95:5; v/v), permitiram a identificação de ácido cítrico por comparação com amostras puras deste ácido. Uma segunda mancha presente no cromatograma localizou-se na região correspondente ao ácido oxálico da amostra padrão.

A irregularidade da segunda mancha presente no extrato não permitiu a sua identificação positiva, que foi posteriormente conseguida com a cromatografia do extrato da jabuticaba (4.2.2.) ao qual foram adicionados os ácidos cítrico e oxálico, pois nêstes cromatogramas foram obtidas somente duas manchas, exatamente correspondentes àquelas dos padrões de ácido cítrico e ácido oxálico.

Enquanto que o ácido cítrico ocorre com fre

quência em vegetais devido a sua participação no ciclo de Krebs, a presença de ácido oxálico é menos comum e a sua participação não foi ainda totalmente explicada, apesar de ser possível a sua participação na biossíntese dos compostos do ciclo de Krebs, a exemplo de acetaldeído e outros compostos formados por dois átomos de carbono.

A ausência de ácidos orgânicos voláteis foi verificada em extratos da fruta cuidadosamente manipulados durante sua preparação e cromatografia, a um pH suficiente para evitar possíveis perdas por volatilização.

5.2.3. - Pigmentos antociânicos.

5.2.3.1. - Extração e separação dos pigmentos.

O solvente comumente usado para a extração dos pigmentos antociânicos de frutas e flôres é o metanol (20) e a adição de ácido clorídrico durante a extração dos pigmentos contribui para a maior estabilidade dos pigmentos que nestas condições permanecem na forma de cloretos.

O tratamento com resina catiônica Dowex 50W-X₄ aplicado aos extratos metanólicos obtidos das cascas da fruta, permitiu o isolamento das antocianinas, que ficaram retidas na coluna, de outros componentes do extrato como açúcares, flavonas, flavonóides e leucoantocianinas entre outros, os quais foram respectivamente eliminados pelas sucessivas lavagens com água e metanol absoluto.

A separação das quantidades necessárias para a

identificação dos pigmentos antocianínicos presentes na solução obtida pela eluição dos pigmentos da coluna de Dowex 50W-X₄, foi conseguida por cromatografia preparativa em papel, de acordo com as condições mencionadas em 4.3.2., tendo-se obtido 4 zonas: A, B, C e D.

O exame visual dos cromatogramas mostrou que a intensidade de coloração das zonas A e C era consideravelmente menor em relação à intensidade das zonas B e D, o que levou a concluir pela baixa concentração de pigmentos nas zonas A e C.

A cromatografia de uma amostra de extrato de jabuticaba não tratado com a resina catiônica mostrou a presença dos pigmentos correspondentes às zonas B e D, mas não foram encontrados os pigmentos correspondentes às zonas A e C. Este fato levou à suposição de que as zonas A e C seriam compostos resultantes do tratamento com a resina catiônica, provavelmente correspondentes a pigmentos antocianínicos derivados dos pigmentos originais.

A formação de artefatos resultantes do tratamento de extratos de pigmentos com resinas de troca iônica foi também verificada por HETMANSKY e NYBOM (47), que ao estudarem as antocianinas do ruibarbo verificaram que dos três pigmentos isolados, apenas a cianidina 3-rutinosídeo ocorria naturalmente, enquanto que os outros dois aparentemente derivados da pelargonidina, resultaram do tratamento com Dowex 50W-X₄.

5.2.3.2. - Identificação dos pigmentos antociânicos da jabuticaba.

A molécula das antocianidinas contém um núcleo central, comum a todos êsses pigmentos, denominado cátion flavilium, abaixo representado.



Em todas as antocianidinas nas posições 5 e 7, do anel A e na posição 3 do anel B, estão ligados grupos hidroxila.

A diferença entre as várias antocianidinas está no número de grupos hidroxila ou metoxila ligados ao anel C. As antocianinas são os glicosídeos das antocianidinas em que os carboidratos podem estar ligados às posições C_3 e C_5 do cátion de flavilium constituindo os 3-monosídeos, 5-monosídeos e 3,5-dimonosídeos, que representam a maior parte das antocianinas de ocorrência natural. Somente em alguns casos excepcionais o carboidrato pode estar ligado ao C_7 .

Os pigmentos antociânicos isolados de um vegetal são usualmente identificados mediante a análise de um conjunto de dados obtidos pelo estudo de suas propriedades cromatográficas, espectrofotométricas e químicas. A hidrólise ácida das antocianinas permite a confirmação dos resultados obtidos no estudo das propriedades acima mencionados.

A medida dos R_f das antocianinas e antocianidii

nas em sistemas de solventes alcoólicos e aquosos, a observação da fluorescência e as mudanças da côr rosa quando êstes pigmentos são submetidos à ação de vapores de amônio e de $AlCl_3$ podem fornecer importantes indicações sôbre a estrutura das antocianidinas e antocianinas.

Os valores de R_f das antocianinas em solventes contendo n-butanol (solventes alcoólicos) são usualmente da ordem de 0,40, enquanto que as antocianidinas apresentam nêstes solventes R_f da ordem de 0,70 (45). Também os valores de R_f obtidos em solventes aquosos podem fornecer indicações sôbre a estrutura dos compostos estudados; o aumento no número de carboidratos ligados à antocianidina causa o aumento do valor dos R_f em solventes aquosos.

A ausência de fluorescência nos compostos antociânicos sob luz ultravioleta indica que a posição 5 do anel A do cation flavilium possui um grupo hidroxila livre. Portanto a ausência de fluorescência em antocianinas pode eliminar a possibilidade de que êstes compostos sejam diglicosídeos (21).

Os vapores de amônio, quando mudam para azul a côr dos pigmentos antociânicos indicam a presença de antocianinas ou antocianidinas enquanto que o tratamento com solução de $AlCl_3$ pode indicar o grupo de antocianidinas ao qual pertence o pigmento estudado. Assim, quando a côr dos pigmentos não se modifica pelo tratamento com $AlCl_3$, teríamos pigmentos antociânicos que não possuem grupos hidroxilas vicinais livres (20). Nêste caso, as antocianidinas possíveis são aquelas que possuem

apenas um grupo hidroxila ou então um grupo hidroxila junto com um ou dois grupos metoxila como substituintes no anel C; e a antocianidina deverá pertencer ao grupo da pelargonidina, peonidina ou malvidina. As estruturas destas antocianidinas estão abaixo relacionadas.



No estudo das propriedades espectrofotométricas de pigmentos antociânicos são importantes os valores dos máximos de absorção dos pigmentos, a observação dos desvios destes máximos de absorção pela adição de $AlCl_3$ e a porcentagem da relação $D.O. 440 m\mu / D.O. \lambda_{m\acute{a}x.}$:

Os máximos de absorção, quando aliados a outros dados (propriedades cromatográficas e químicas) podem indicar com razoável precisão a identidade do composto isolado.

Por outro lado, a observação do efeito do $AlCl_3$ sobre os máximos de absorção dos pigmentos leva às mesmas conclusões já mencionadas anteriormente para o efeito deste reagente quando pulverizado em cromatogramas contendo pigmentos antociânicos.

O cálculo da porcentagem da relação $D.O. 440 m\mu / D.O. \lambda_{m\acute{a}x.}$ permite, principalmente para antocianinas, a verificação da presença de 3-monoglicosídeos e diglicosídeos, pois para os primeiros os valores desta relação são da ordem de 30, enquanto que para 5-monoglicosídeos e 3,5 diglicosídeos os valores são da ordem de 12 (48).

Finalmente, a identificação dos pigmentos antocianicos é complementada pela análise dos produtos obtidos na hidrólise ácida das antocianinas, ou seja, as suas respectivas agliconas e carboidratos.

Nêste trabalho, os dois pigmentos da jabuticaba foram identificados pela análise dos dados obtidos no estudo de tôdas as propriedades acima mencionadas.

Os dados reunidos na Tabela 2 (página 17) sobre as propriedades químicas e cromatográficas dos dois pigmentos isolados da jabuticaba permitiram as seguintes conclusões:

a. Ação de vapôres de amônio: Os dois pigmentos B e D sofreram mudança de cor original para azul. Isto indicou a presença de antocianinas e antocianidinas.

b. Valores de Rf: O pigmento B nos solventes alcoólicos (solventes II e III) apresentou valores de Rf da ordem de 0,70, portanto evidenciou-se a presença de uma antocianidina (43).

O pigmento D apresentou valores de Rf correspondentes aos valores encontrados na literatura para antocianinas (45).

No solvente IV, os pigmentos B e D apresentaram valores de Rf de 0,03 e 0,07 respectivamente. Êstes dados indicaram que na estrutura do pigmento D havia um maior número de moléculas de carboidratos em relação à estrutura do pigmento B (20).

c. Verificação da fluorescência: Os cromatogramas dos pigmentos B e D quando examinados sob luz ultravioleta, mostraram ausência de fluorescência. Êste comportamento

eliminou a possibilidade da presença de antocianinas do tipo 3,5 diglicosídeos (20). Considerando que pelas suas propriedades cromatográficas, o pigmento D deveria ser uma antocianina, esta deveria ser um 3-monoglicosídeo ; com o mesmo tipo de informações evidenciou-se que o pigmento B seria uma antocianidina.

d. Ação de solução de $AlCl_3$: Nos cromatogramas dos pigmentos B e D tratados com solução de $AlCl_3$, não foi verificada mudança da cor dos dois pigmentos. Esta propriedade, conforme já foi mencionado neste trabalho indicou que os dois pigmentos eram derivados da pelargonidina, peonidina ou malvidina.

e. Determinação dos máximos de absorção: Os máximos de absorção dos pigmentos B e D determinados em solução metanólica, foram 530 m μ e 520 m μ respectivamente. O valor de 530 m μ determinado para o pigmento B corresponde ao valor indicado para a peonidina (48), enquanto que os máximos de absorção para pelargonidina e malvidina são 520 m μ e 542 m μ respectivamente (48).

A determinação de 520 m μ como o máximo de absorção do pigmento D indicou que esta antocianina correspondia à peonidina 3-monoglicosídeo, pois para malvidina 3-monoglicosídeo e pelargonidina 3-monoglicosídeo os valores indicados são 535 m μ e 506 m μ respectivamente (48).

f. Deslocamento dos máximos de absorção pela ação de $AlCl_3$: Não foi observado desvio nos máximos de absorção dos dois pigmentos após a adição de solução de $AlCl_3$. Este fato confirmou a presença de derivados da peonidina, pelargonidina ou malvidina.

g. Cálculo da porcentagem da relação $D.O. 440m\mu/D.O. \lambda_{m\acute{a}x.}$
O valor da relação $D.O. 440 m\mu/D.O. \lambda_{m\acute{a}x.}$ determinado para o pigmento B foi 28. Embora esta relação seja mais útil na diferenciação entre antocianinas, são também conhecidos alguns valores para antocianidinas (48). Dekasos (24) encontrou o valor 26 para a peonidina, enquanto que HARBORNE (21) indicou os valores de 39 para pelargonidina e 19 para malvidina. Portanto o valor determinado neste trabalho é comparável àquele indicado para peonidina.

Para o pigmento D, o valor calculado da relação $D.O. 440 m\mu/D.O. \lambda_{m\acute{a}x.}$ foi 30. Valores desta ordem indicam 3-monoglicosídeos (48), o que veio confirmar a estrutura já proposta para o pigmento D. Por outro lado para os 3-monoglicosídeos da pelargonidina e malvidina os valores encontrados na literatura são 38 e 19 respectivamente. Para a peonidina 3-monoglicosídeo o valor indicado é 28 (48).

h. Identificação dos produtos da hidrólise ácida: Os valores de R_f obtidos para as agliconas correspondentes aos pigmentos B e D, reunidos na Tabela 4 (página 21), compatíveis com os valores indicados para a peonidina (20), e confirmaram a estrutura das agliconas correspondentes aos dois pigmentos, já evidenciada pelas observações anteriores. A cromatografia das frações correspondentes aos açúcares obtidos da hidrólise ácida do pigmento D, mostrou que o açúcar deste pigmento era a glicose, ficando então esclarecida sua estrutura que é a da peonidina 3-monoglicosídeo. Para o pigmento B, a ausência de carboidratos na fração correspondente confirmou que a estrutura do pigmento era a da peonidina.

6 - RESUMO e CONCLUSÕES

O emprêgo da cromatografia em papel e em camada delgada, além da eletroforese em papel permitiu a identificação dos açucares, ácidos orgânicos livres e pigmentos antociânicos da jaboticaba comum (Myrciaria jaboticaba Berg). Dos resultados obtidos concluiu-se que:

1. Com a aplicação da eletroforese em papel foi possível a separação e identificação de glicose, frutose e sacarose em um extrato aquoso obtido das frutas de Myrciaria jaboticaba Berg e sacarose.
2. O conteúdo de glicose e frutose encontrado foi de 7,95% enquanto o de sacarose foi de 0,05%.
3. A adaptação para cromatografia em camada delgada de sistemas de solventes usados para cromatografia em papel de ácidos orgânicos permitiu a separação e identificação dos ácidos orgânicos existentes na jaboticaba.
4. Ácido cítrico e oxálico foram os únicos ácidos encontrados na pólpa e casca da jaboticaba.
5. O uso de resina de troca catiônica no isolamento de pigmentos antociânicos presentes em um extrato metanólico das cascas da fruta permitiu a separação de quatro pigmentos antociânicos dos quais dois foram identificados como resultantes de interação da resina com os pigmentos presentes na fruta.
6. A cromatografia em papel e o estudo das propriedades químicas dos pigmentos isolados da jaboticaba mostraram a presença de uma antocianidina e uma antocianina (monoglicosídeo), derivadas da pelargonidina, peonidina ou malvidina.

7. A determinação dos máximos de absorção dos dois pigmentos, assim como o estabelecimento de outras características espectrofotométricas levaram à conclusão de que os pigmentos eram a peonidina e a peonidina 3-monoglicosídeo.
8. A análise das antocianidinas obtidas por hidrólise ácida dos dois pigmentos confirmaram que a aglicona destes compostos era a peonidina.
9. A cromatografia em papel das frações que deveriam conter os açúcares correspondentes aos dois pigmentos antocianínicos confirmaram a presença de glicose em um dos pigmentos. A estrutura da peonidina proposta para o segundo pigmento estudado foi também confirmada pela ausência de açúcares como produto de sua hidrólise ácida.

7 -- SUMMARY

The sugars and organic acids present in Myrcia jaboticaba Berg, were extracted with water at 30°C. The sugars of the concentrated extracts were separated by paper electrophoresis, and glucose, fructose and sucrose were identified. The organic acids were separated using thin layer chromatography, citric and oxalic acids were identified.

The anthocyanin pigments were extracted from the skins using methanol containing 0,1% HCl. They were purified on an ion-exchange resin and separated using paper chromatography.

The chromatographic and chemical properties of the anthocyanin pigments supplied the first indications about the structure of the two isolated pigments. Peonidin and Peonidin 3-monoglucoside were identified through the Rf values and spectral properties.

The two structures were subsequently confirmed by paper chromatography of the sugars obtained by acid hydrolysis of the pigments.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMEIDA, J.R.; O. Valsechi - Guia de Composição de Frutas - Boletim nº21 - ESALQ - (1966).
2. CONSDEN, R; A.H. Gordon; A.J.P. Martin - Biochem. J. 38, 224 (1944).
3. ASO; MATSUDA - J. Agric. Res. 2, 135 (1951). in The Biochem. of Fruits and their Products: Vol.1 Ed. de 1970 da Academ. Press.
4. SIEGELMAN, H.W. - Proc. Am. Soc. Hort. Sci. 64, 232 (1954).
5. PEYNAUD, E; H. Caillavet - Am. Nut. Alim. IX, 56.A 173 (1955). in The Biochem. of Fruits and then Products - Vol. 1 - Ed. de 1970 da Academic Press.
6. WALI, J.A; Y.M. Hassen - Proc. Am. Soc. Hort. Sci. 87 254 (1965).
7. PETROVIC, S.M. - Mikroc. Acta 3, 599 (1969).
8. CONSDEN, R; W.M. Stanier - Nature, 169, 783 (1952).
9. ORSI, F. - Elelmsiz. Hazlenyek, 14, 4, 161 (1968) cf. Food Sci. and Techn. Abstracts 1, 5 (1969).
10. NELSON, E.K. - J. Am. Chem. Soc., 2, 46, 2506 (1924).
11. WAGER, H.G; F.A. Ishewood - Analyst, 86, 260 (1941).
12. CLEMENTS, R.L. - J. Fd. Sc. 29, 281 (1964).
13. OWENS, H.S; A.E. Goodman; J.B. Stark - Anal. Chem. 25, 1507 (1953).
14. RELVAS, M.E.A. Arq. Port. Bioquim. III, 866 (1959).
15. MAZLIAK, P.; L. Salsac - Phytochem. 4, 693 (1965).
16. BOURZEIX, M; J. Guitraud; F. Champagnol - Ann. Technol. Agric. 19, 1, 69 (1970).

17. BROWN, W.L. - J. Am. Chem. Soc. 62, 2808 (1940).
18. HAYASHI, K. - Acta Phytochim. 14, 39 (1944) in The Chemistry of Flavonoid Compds. 257 Geissman, Ed. de 1962 da Mac Millan Co.
19. BATE-SMITH, E.C. - Nature, 161, 835 (1948).
20. HARBORNE, J.B. - J. of Chromat. 1, 6 (1958).
21. HARBORNE, J.B. - Biochem. J. 70, 1, 22 (1958).
22. ALBACH, R.F.; R.E. Kepner; A.D. Webb - J. Fd. Sci. 28, 177 (1963).
23. DIAZ, R.C.; B.S. Luh - J. Fd. Sci. 34, 415 (1969).
24. DEKASOS, E.D. - J. Fd. Sci. 35, 237 (1970).
25. MORRIS, D.L. - Science, 104, 254 (1948).
26. SOMOGYI, M. - J. Biol. Chem. 160, 61 (1945).
27. NELSON, N. - J. Biol. Chem. 153, 375 (1944).
28. FONSECA, H.; J.D.P. Arzolla - Boletim Didático nº7, ESALQ (1965).
29. International Federation of Fruit and Juice Producers Boletim nº23.
30. RANDEKATH, KURT - Thin Layer Chromatography:256, Ed. de 1966 da Academic Press.
31. "SHELL" Research Ltd. - Thornton Research centre (GREAT Britain) J. Chromat. 15, 108 (1965).
32. HAYASHI KŌZŌ in The Chemistry of Flavonoid Compds: 249 - 280, Geissman, Ed. de 1962 da Mac Millan Co.
33. PARTRIDGE, S.M. - Biochem. J. 42, 2; 238 (1948).
34. LYNN, D.Y.C.; B.S. Luh - F. Fd. Sci, 29, 735 (1964).
35. CARRÉ, M.H.; D. Haynes - Biochem. J. 16, 60 (1922).
36. MACHNNY - Food and Drugs Laboratory - Ottawa (1944).

37. LANE, J.H.; L. Eynon - J. Soc. Chem. Ind. 42, 32 T
(1923).
38. WICHMANN, J.H. - J. Assoc. Offic. Agric. Chem. 6, 35
(1922).
39. KERTESZ, Z.I. - The pectic substances: 215-220, Ed.
de 1951 da Inters. Pub. Inc.
40. STAHL, E. - Thin Layer Chromat: 461 - 469. Ed. de
1965 da Academ. Press.
41. HASHIMOTO, Y.; I. Mori; M. Kimura - Nature, 170,
975 (1952).
42. SCHWARTZ, J.H.; B.G. Reba; W.L. Porter - J. Agric.
Fd. Chem. 10, 1, 43 (1962).
43. LI, K.C.; A.C. Wagenknecht - J. Am. Chem. Soc. 78,
979 (1956).
44. SCHLLER, D.R.; J.H. Elbe - J. Fd. Sci. 33, 439 (1968)
45. SEIKEL, M.K. - in The Chemistry of Flavonoid Com-
pounds: 34 - 67, Geissman, Ed. de 1962 da
Mc Millan Co.
46. SINGLETON, V.L.; W.A. Gortner - J. Fd. Sci. 30, 19,
(1965).
47. HETMANSKY, W.; Nybom, N. - Fruchtsaft Ind. 13, 6,
256 (1969).
48. JURD; LEONARD - in the Chemistry of Flavonoid Com-
pounds: 107 - 155, Geissman - Ed. da Mac
Millan de 1962.

9 - AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. André Tosello, Diretor da Faculda
de de Tecnologia de Alimentos, pelas facilidades que pro
porcionou para o desenvolvimento dêste trabalho.

Ao Dr. Paulo Anna Bobbio, pelo estímulo e dedi
cação sempre demonstrados na orientação dêste trabalho.

À Organização dos Estados Americanos, ao Con
selho Nacional de Pesquisas pela doação de drogas e equi
pamentos e a todos aquêles que direta ou indiretamente
colaboraram na realização dêste trabalho.

Figura 1

Separação dos Ácidos Orgânicos de jabuticaba por cromatografia em camada delgada com n-butanol sat. de água - Ác. Fórmico.

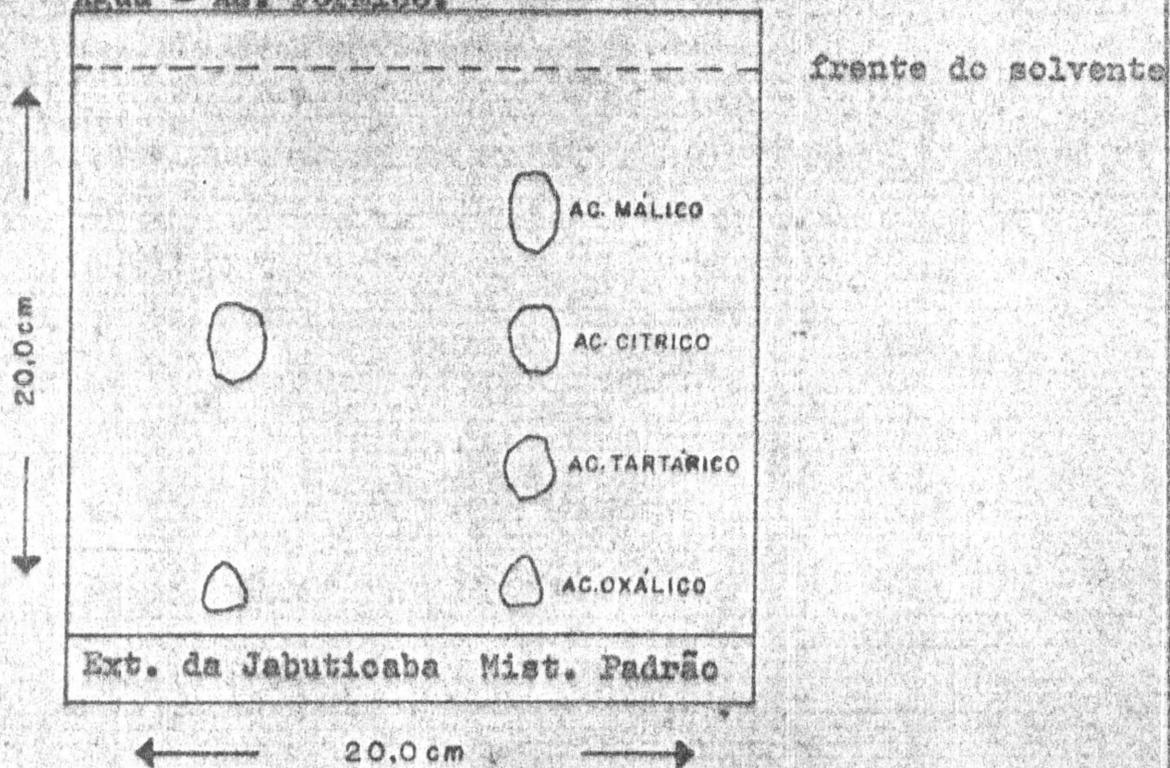


Figura 2

Separação dos Carbohidratos da Jabuticaba por eletroforese em papel.

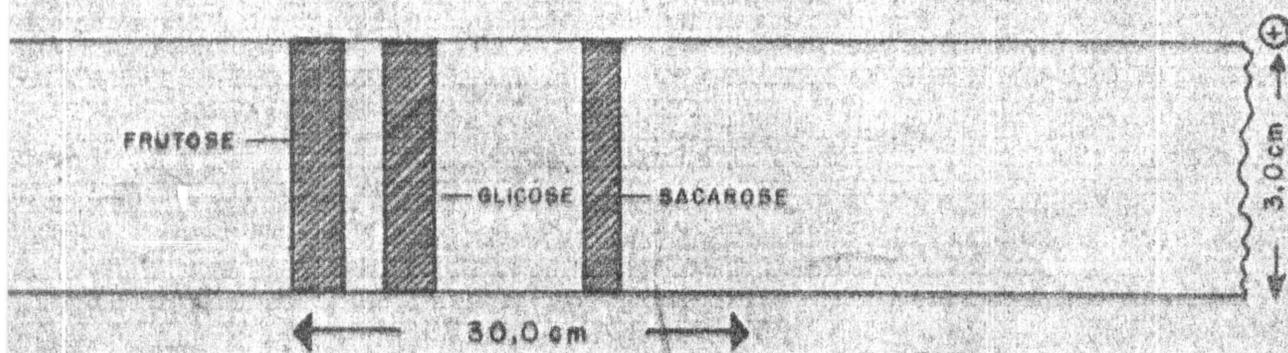
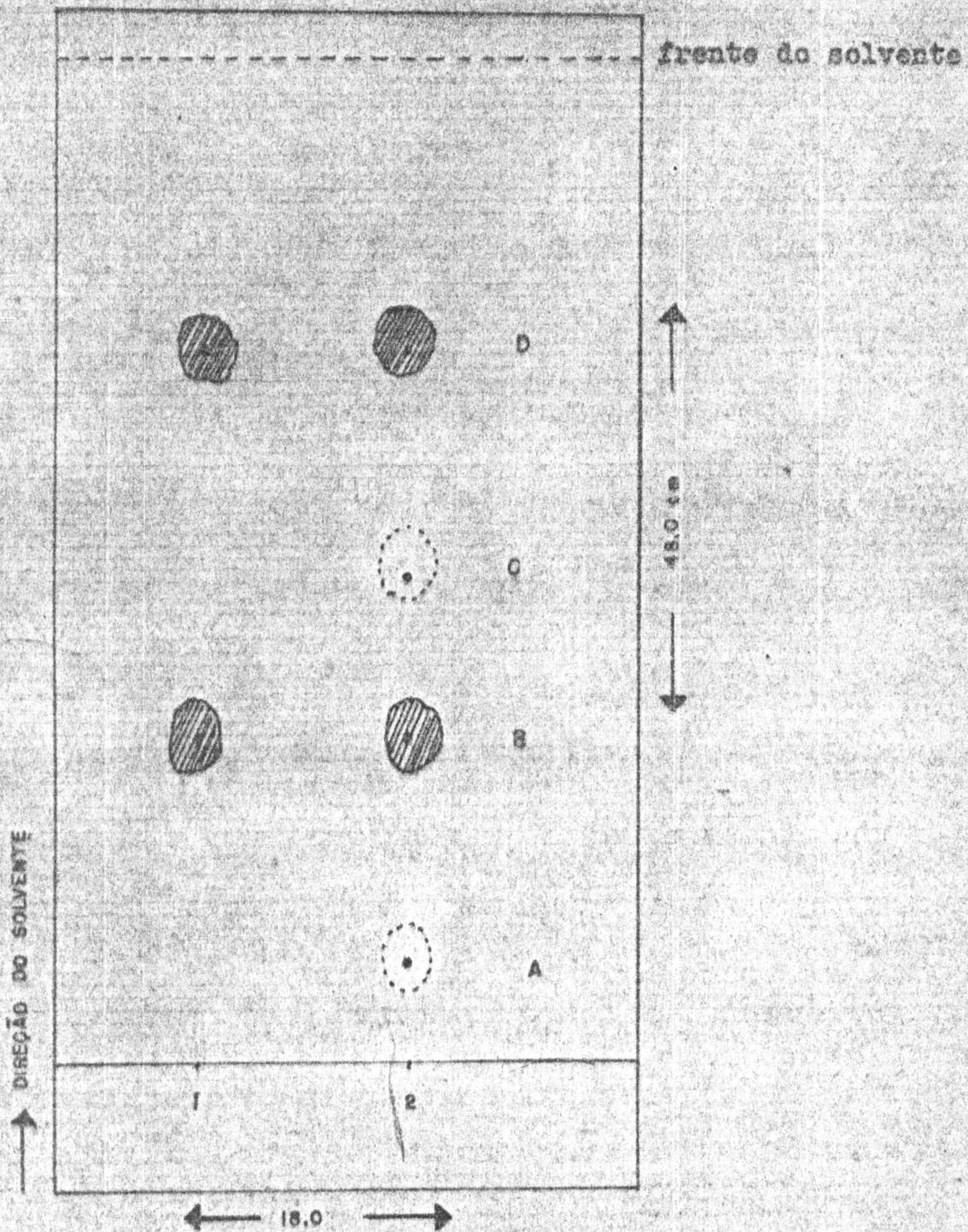


Figura 3

Separação dos pigmentos antocianí-
cos da jabuticaba por cromatogra-
fia em papel com Ác. Acético-Água-
Ác. Clorídrico (Solvente I).



- 1 - Extrato dos pigmentos da jabuticaba.
- 2 - Extrato dos pigmentos da jabuticaba tratado com Dowex 50W-X₄.