

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Parcer

Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida por Maria do Carmo Guedes Santos e aprovada pela Comissão Julgadora em 28.03.88.

Campinas, 28 de março de 1988.

Bobbio

Presidente da Banca

ESTABILIDADE DAS CLOROFILAS CÚPRICAS

COMPARATIVAMENTE À DAS

CLOROFILAS MAGNESIANAS

MARIA DO CARMO GUEDES SANTOS

Química

Orientador

Prof. PAULO ANNA BOBBIO

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

CAMPINAS - 1988

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

"É preciso ter força
é preciso ter raça
é preciso ter gana, sempre.

É preciso ter manha
é preciso ter graça
é preciso ter sonho, sempre."

Milton Nascimento

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Paulo Anna Bobbio, pela dedicação e interesse no trabalho de orientação desta tese e pela amizade.

À CAPES, pela bolsa de pós-graduação.

À UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, pelas bolsa de Incentivo Acadêmico e Monitoria II.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, por possibilitar o desenvolvimento desse trabalho.

À todos do laboratório de Química de Alimentos que de uma forma ou outra contribuíram durante todo o trabalho.

À ABIA, Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação, pelas cópias do trabalho.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE TABELAS.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
RESUMO.....	ix
SUMMARY.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	03
2.1. Estrutura química da clorofila e clorofila cúpri- ca.....	03
2.2. Extração da clorofila.....	05
2.3. Preparação e formação das clorofilas cúpricas....	06
2.4. Métodos de separação e purificação de clorofilas.	07
2.5. Determinação de clorofila e clorofila cúprica....	10
2.6. Reações da clorofila e clorofila cúprica.....	13
2.7. Estabilidade da cor de clorofila e clorofila cú- prica.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1. Matéria-prima.....	20
3.2. Equipamento.....	20
3.3. Reagentes.....	21
3.4. Extração.....	21
3.4.1. Preparação do extrato acetônico das fo- lhas frescas de espinafre (<u>Spinacia</u> oleo- racea).....	21

3.4.2. Preparação do extrato clorofórmico das folhas secas de <i>Estevia rebaudiana</i>	22
3.4.3. Preparação da feofitina.....	23
3.4.4. Preparação da clorofila cúprica óleo-solúvel.....	23
3.5. Purificação da clorofila cúprica.....	23
3.6. Fracionamento da clorofila cúprica.....	24
3.7. Dosagem de Cu (II).....	26
3.8. Estabilidade da clorofila cúprica comparativamente à da clorofila.....	26
3.9. Cálculo das constantes de velocidade de reação (K) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$).....	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1. Condições experimentais.....	29
4.2. Estabilidade da clorofila cúprica e da clorofila.....	33
5. CONCLUSÕES.....	43
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
1. Condições de reação usadas no estudo da estabilidade de clorofila cúprica e clorofila.....	28
2. Rendimento das preparações de feofitina, clorofila cúprica e clorofila magnesiânica.....	31
3. Peso obtido de clorofila cúprica purificada e fracionada com n-pentano.....	32
4. Porcentagem de perda de clorofila cúprica e clorofila magnesiânica, sob diferentes condições, após 500 horas..	35
5. Constantes de velocidade de reação aparente de 1ª ordem (K) e tempo de meia-vida para sistemas de clorofila cúprica e clorofila magnesiânica.....	37

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
1. Estrutura básica porfirínica proposta por Willstater..	09
2. Estruturas das clorofilas a e b propostas por Fischer.	09
3. Estruturas das clorofilas a' e b', isômeros das clorofilas.....	14
4. Estruturas das clorofilas cúpricas a e b.....	14
5. Formação do enol seguida da alomerização.....	15
6. Fluxograma da preparação de clorofila cúprica óleo-solúvel.....	25
7. Espectro do extrato acetônico de folhas de espinafre em acetona 80% (espectro 1).....	52
8. Espectro do extrato clorofórmico das folhas de <u>Estevia</u> rebaudiana em acetona 80% (espectro 2).....	52
9. Espectro da feofitina, após acidulação, em acetona 80% (espectro 3).....	53
10. Espectro da feofitina, após acidulação, em n-propanol (espectro 4).....	53
11. Espectro do resíduo sólido e do extrato oleoso de clorofila cúprica em acetona 80% (espectro 5).....	54
12. Espectro do sistema Clorofila magnesiânica/Atmosfera inerte/Luz, em n-propanol (espectro 6).....	55
13. Espectro do sistema Clorofila magnesiânica/Atmosfera inerte/Luz, em n-propanol (espectro 7).....	56

14. Espectro do sistema Clorofila cúprica/Oxigênio/Luz, em n-propanol (espectro 8).....	57
15. Espectro do sistema Clorofila cúprica/Atmosfera inerte /Luz, em n-propanol (espectro 9).....	58
16. Espectro do sistema Clorofila cúprica/Oxigênio/Escuro, em n-propanol (espectro 10).....	59
17. Espectro do sistema Clorofila cúprica/Bissulfito de s _o dio 100 ppm/Atmosfera inerte/Escuro, em n-propanol (espectro 11).....	60
18. Espectro do sistema Clorofila cúprica/Bissulfito de s _o dio 200 ppm/Atmosfera inerte/Escuro, em n-propanol (espectro 12).....	61
19. Espectro do sistema Clorofila cúprica/Bissulfito de s _o dio 500 ppm/Atmosfera inerte/Escuro, em n-propanol (espectro 13).....	62
20. Espectro do sistema Clorofila cúprica/Peróxido de benzoíla 250 ppm/Oxigênio/Escuro, em n-propanol (espectro 14).....	63
21. Espectro do sistema Clorofila cúprica/Peróxido de benzoíla 500 ppm/Oxigênio/Escuro, em n-propanol (espectro 15).....	64
22. Espectro do sistema Clorofila cúprica/Meio ácido(Oxigênio/Escuro, em n-propanol (espectro 16).....	65

23. Espectro do sistema Clorofila magnesi ^a na / Meio ácido/ Oxigênio/Escuro, em n-propanol (espectro 17).....	66
24. Espectro do sistema Clorofila cúprica/Meio ácido/Oxigê- nio/Luz, em n-propanol (espectro 18).....	67
25. Espectro do sistema clorofila magnesi ^a na / aquecimento 40°C/Oxigênio/Escuro, em n-propanol (espectro 19).....	68
26. Espectro do sistema Clorofila cúprica/Aquecimento 40°C/ Oxigênio/Escuro, em n-propanol (espectro 20).....	69
27. Espectro do sistema clorofila cúprica/Aquecimento 60°C/ Oxigênio/Escuro, em n-propanol (espectro 21).....	70
28. Cromatograma do extrato acetônico das folhas de espina- fre.....	71
29. Cromatograma do extrato clorofórmico das folhas de Es- tevia Rebaudiana.....	72
30. Cromatograma da feofitina, após acidulação.....	73
31. Cromatograma do sistema Clorofila magnesi ^a na/Meio áci- do/Oxigênio/Escuro.....	74
32. Cromatograma do resíduo/filtrado/clorofila cúprica não fracionada.....	75
33. Cromatograma do sistema Clorofila cúprica / Bissulfito de sódio/Atmosfera inerte/Escuro.....	76

34. Cromatograma do sistema clorofila cúprica/Peróxido de benzoíla/Oxigênio/Escuro.....	77
35. Cromatograma do sistema clorofila cúprica / Aquecimento 40°C/Oxigênio/Escuro.....	78
36. Cromatograma do sistema Clorofila cúprica / Aquecimento 60°C/Oxigênio/Escuro.....	79
37. Gráfico -log Absorbância versus tempo, dos sistemas Clorofila/O ₂ /Luz, Clorofila/Atmosfera inerte/Luz e Clorofila/Meio Ácido/O ₂ /Luz.....	80
38. Gráfico -log Absorbância versus tempo, dos sistemas Clorofila/Atmosfera inerte/Escuro, Clorofila/Bissulfeto de sódio 250 ppm/Atmosfera inerte/Escuro.....	81
39. Gráfico -log Absorbância versus tempo, dos sistemas Clorofila/O ₂ /Escuro e Clorofila/Meio ácido/O ₂ /Escuro ,	82
40. Gráfico -log Absorbância versus tempo, dos sistemas Clorofila/Aquecimento 40°C/Escuro e Clorofila/Aquecimento 60°C/Escuro.....	83
41. Gráfico -log Absorbância versus tempo, dos sistemas Clorofila cúprica/O ₂ /Luz, Clorofila cúprica / Atmosfera inerte/Luz e Clorofila cúprica/Meio ácido/ O ₂ /Escuro ,	84
42. Gráfico -log Absorbância versus tempo, dos sistemas Clorofila cúprica/Meio ácido/O ₂ /Luz, Clorofila cúprica/Peróxido de benzoíla 250 ppm/O ₂ /Escuro e Clorofila cúprica/Peróxido de benzoíla 500 ppm/O ₂ /Escuro.....	85

43. Gráfico -log Absorbância versus tempo, dos sistemas Clorofila cúprica/Bissulfito de sódio 100 ppm/ Atmosfera inerte/Escuro, Clorofila cúprica/Bissulfito de sódio 200 ppm/Atmosfera inerte/Escuro e Clorofila cúprica/Bissulfito de sódio 500 ppm/Atmosfera inerte/Escuro..... 86
44. Gráfico -log Absorbância versus tempo, dos sistemas Clorofila cúprica/O₂/Escuro, Clorofila cúprica/Aquecimento 40°C/O₂/Escuro e Clorofila cúprica/O₂/ Escuro 87

RESUMO

A toxidez dos corantes artificiais usados em alimentos tem levado a uma intensa procura de substitutos naturais não tóxicos ou de baixa toxidez. Entre os corantes naturais de uso permitido em alimentos estão as clorofilas e as clorofilas cúpricas, objeto desse trabalho.

Foram preparadas clorofilas e clorofilas cúpricas, e sua resistência foi comparada quanto aos efeitos da luz, calor, acidez, agentes redutores e oxidantes, oxigênio, bem como a combinação de alguns desses fatores.

Os resultados mostraram que, ao contrário das clorofilas, as clorofilas cúpricas mostraram-se altamente resistentes aos efeitos da luz, meio ácido, oxigênio, aquecimento, e agentes redutores. Ambos os pigmentos foram rapidamente destruídos por ação de peróxidos.

A maior estabilidade das clorofilas cúpricas está possivelmente ligada à estrutura do íon de cobre ligado ao anel porfirínico.

SUMMARY

The search for natural colors as substitutes for the artificial pigments used in foods has gained considerable impulse since the toxicity of several artificial pigments has been demonstrated.

Chlorophylls and their cupric derivatives have been prepared and their resistance to effects of light, acids, oxygen, heating, and reducing agent was studied.

The results have shown that while chlorophylls are labile under the experimental conditions used, copper chlorophylls are highly stable. Peroxides rapidly destroyed both pigments.

Possibly the greater stability of copper chlorophylls can be attributed to the structure of the copper ion in the porphyrin ring.

1. INTRODUÇÃO

A aceitação de um alimento é provavelmente determinada menos pelo seu valor nutricional do que pela sua aparência, cor, sabor e aroma, embora o valor nutricional devesse ser o critério mais indicado.

A prática de adicionar corantes a alimentos processados para torná-los mais atrativos é antiga e provavelmente iniciou-se com o uso de corantes vegetais. Com o incremento do processamento industrial, a adição de corantes tornou-se prática comum e mesmo necessária pois a cor é certamente um dos mais importantes fatores que afetam o consumo de um alimento.

Corantes sintéticos começaram a atrair a atenção da indústria de alimentos porque eram considerados superiores a muitos corantes vegetais em força de tintura, estabilidade, uniformidade e disponibilidade em várias formas. Entretanto, tem sido mostrado que nem todos os corantes sintéticos são inofensivos quando ingeridos e a avaliação de sua toxicidade tem levado a restrições no seu uso, bem como à retirada de muitos da lista de corantes permitidos, o que fez renascer o interesse em encontrar alternativas, que seriam os pigmentos obtidos de fontes naturais reconhecidamente não tóxicos.

Entre os corantes de origem vegetal não tóxicos, temos a clorofila que poderia ser o substituto ideal para a cor verde obtida com corantes sintéticos. Entretanto sua instabilidade em meio ácido, e sua baixa resistência ao aquecimento e luz, impedem seu uso em larga escala.

O uso de clorofila cúprica representa no momento, a melhor solução para o problema, motivo pelo qual procurou-se neste trabalho estudar sua estabilidade face aos ácidos, luz, calor, compostos redutores e oxidantes e oxigênio, em comparação com a clorofila.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Existe um grande número de publicações referentes à clorofila mas apenas um pequeno número dessas publicações refere-se a estudos sobre a clorofila cúprica quanto a sua preparação e propriedades.

A maior parte das publicações sobre a clorofila se refere especialmente à sua análise, separação e propriedades cromatográficas. Assim, como em nosso trabalho serão feitas separações, análises e estudadas as propriedades das clorofilas cúpricas, em comparação com as propriedades das clorofilas, incluímos nesta revisão um certo número de referências que, não tratando especificamente das clorofilas cúpricas, serviram de subsídio para este trabalho.

2.1. Estrutura química da clorofila e clorofila cúprica

Aronoff (2) e Devlin (7) descreveram oito tipos de clorofilas existentes na natureza, clorofilas a, b, c, d e e, além de bacterioclorofilas a e b e bacterioviridina.

Segundo Devlin (7), as clorofilas a e b são as mais abundantes e são encontradas em todos os organismos autotróficos, exceto em bactérias pigmentadas. Já as bacterioclorofilas a e b e bacterioviridina são os pigmentos das bactérias fotossintetizadoras.

Clydesdale et al. (4) estudaram a localização das clorofilas dentro dos cloroplastos, onde estão pequenas partículas chamadas granas, compostas de lamelas contendo finalmente as moléculas da clorofila.

Segundo os referidos autores, as moléculas de clorofilas estariam unidas entre si por sua atração mútua, encaixadas entre uma camada de proteína e de lipídeo, apresentando afinidade de cada porção hidrofílica da molécula pela proteína e afinidade do radical fitila da molécula por lipídeos, tendo finalmente um carotenóide posicionado ao longo da cadeia de fitol.

A moderna estrutura das clorofilas a e b foi determinada por Fischer (12) em 1940 que manteve a estrutura básica porfirínica proposta por Willstater (50) em 1910, conforme as figuras 1 e 2, respectivamente.

A estrutura porfirínica proposta para as clorofilas, conforme figura 2, possui várias posições reativas, segundo Aroff (2) e Humphrey (19). Tais posições seriam as principais responsáveis pelas características químicas das clorofilas.

Segundo os referidos autores (2) (19), a retirada do átomo central de magnésio, do fitol esterificado no carbono 7 e o carbono 10 como um foco de oxidação são responsáveis respectivamente, pela perda de cor em meio ácido, pela alteração da solubilidade (através da hidrólise do éster) e pela formação de produtos de oxidação envolvendo a alomerização no carbono 10.

Para Schanderl et al. (33) a formação dos complexos de feofitina de cobre a e b seguia a proporção estequiométrica de uma molécula de pigmento livre de metal para um átomo de cobre, conforme figura 4.

2.2. Extração da clorofila

Heikal e El-Manawaty (17) estudaram a eficiência da extração de clorofila através de medidas de absorbância dos extratos, a 450 nm, utilizando cinco diferentes solventes: éter de petróleo, clorofórmio, éter etílico, benzeno e acetona, sendo que este último foi o solvente mais eficiente.

Humphrey (19) verificou que a acetona anidra era um solvente fraco para extração de material seco ou com baixo teor de umidade. Segundo o autor, a adição prévia de água aumentou a eficiência da extração, já que atuou sobre a dispersão coloidal da clorofila nos cloroplastos.

Strain (37), Sweeney e Martin (39), White et al. (48), Lajollo et al. (28) utilizaram acetona a 80%. Tanto o método sugerido pela AOAC (1) bem como o método sugerido por Westcott et al. (47) preconizam o uso de acetona a 85%, enquanto Schwartz et al. (34), Strain et al. (38), Schanderl et al. (33) e Jones et al. (25) utilizaram acetona 100%.

Holden (18), Strain (37) e Hynninen (20) utilizaram metanol para a extração de clorofila apesar do efeito alomerizante desse solvente.

Hynninen e Ellfolk (21) compararam vários métodos de extração de clorofila a partir de folhas de soja e encontraram que os métodos convencionais invariavelmente formavam produtos alomerizados, possivelmente pela excessiva quantidade de água presente.

Os referidos autores (21) obtiveram resultados satisfatórios empregando uma mistura de éter de petróleo-metanol-formamida (4:3:1, v/v) como solvente.

Uus et al. (41) obtiveram a partir de plantas verdes, pulverizadas, uma pasta de clorofila-caroteno, pela extração com tricloroetileno, a 40-50°C.

Hagiwara (15) extraiu o suco de folhas verdes de trigo e cevada e após secagem obteve um produto passível de ser usado em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos.

Kasperskaya e Semenova (26) extraíram vegetais para preparação de corantes, entre os quais a clorofila, com uma mistura de éter de petróleo-etanol (96:4, v/v).

O uso de grama ou alfafa seca como matéria prima para obtenção de clorofila foi mencionado por Humphrey (19).

2.3. Preparação e formação das clorofilas cúpricas

Aronoff (2) preparou clorofila cúprica aquecendo uma solução de clorofila em clorofórmio, a qual foi adicionada uma solução de acetato cúprico em metanol. A clorofila cúprica foi finalmente obtida após eliminação dos íons cúpricos residuais por extração com água e cristalizada de éter-éter de petróleo.

Complexos de cobre de feofitina a e b foram preparados por Schanderl et al. (33) a partir de solução de feofitina e solução etérea de cloreto cúprico. Os referidos autores observaram que o complexo de feofitina b teve que ser acelerada pela adição

de ácido acético glacial. A formação de cada complexo foi seguida pela observação da fluorescência. Quando completada, a fluorescência original vermelha havia desaparecido.

Schanderl et al. (32) obtiveram pigmentos contendo cobre, ao adicionarem acetato de cobre em quantidades de 0 a 100 ppm a purês de ervilhas, que foram aquecidos a refluxo para simular os efeitos da estocagem a elevadas temperaturas. Os referidos autores observaram que após vinte minutos, a formação do complexo foi completa.

Jones et al. (25) prepararam feofitina de cobre pela adição de solução 1 M de cloreto cúprico (II) à solução acetônica de feofitina, com agitação constante. Para minimizar alterações oxidativas, foram adicionados cristais de ácido ascórbico. Os referidos autores observaram que a quelação foi completa após 1 hora, seguindo a extensão da reação através de cromatografia em camada delgada.

2.4. Métodos de separação e purificação de clorofilas

Para a determinação quantitativa de clorofila em extratos de espinafre processado, Tan e Francis (40) empregaram colunas preparadas com 70% de açúcar de confeitiro e 30% de amido, obtendo a separação de clorofila da feofitina.

Strain et al. (38) entre outros, utilizaram sílica gel como adsorvente para cromatografia em colunas e em camada delgada de pigmentos clorofiláceos. Os referidos autores utilizaram vários outros adsorventes silíceos como kieselguhr, talco, e silicato de cálcio, com o propósito de averiguar as altera

ções induzidas por esses adsorventes nos pigmentos clorofila e carotenóides.

Strain et al. (38) concluíram que os diversos pigmentos eram decompostos por adsorventes silíceos, variando o grau de decomposição com o adsorvente.

Jeffrey (22) preparou placas com sacarose para separar clorofilas e carotenóides de algas verdes e pigmentos de plantas superiores. O autor não observou qualquer decomposição dos pigmentos nesse adsorvente e, após desenvolvimento em duas dimensões, a recuperação foi de 95%.

Jones et al. (23) observaram que a estabilidade dos pigmentos em placas recobertas com Kieselguhr G impregnada com óleo de amendoim aumentou na sequência: clorofilida, clorofila b, clorofila a, e feofitina.

Sievers e Hynninen (36) desenvolveram um método para separação e identificação das clorofilas a e b, feofitinas a e b, feoforbidas a e b e clorofilas a' e b' (isômeros da clorofila), (figura 4), além dos produtos da saponificação da feofitina a e b, através de cromatografia em camada delgada em placas de celulose comercial.

Humphrey (19) considerou a cromatografia em camada delgada, empregando sílica gel, como um método conveniente de separação sendo as posições dos pigmentos evidenciadas por suas próprias cores. Contudo, ao tratar as placas com anisaldeído/ H_2SO_4 , o referido autor encontrou uma quantidade considerável de material incolor no cromatograma.

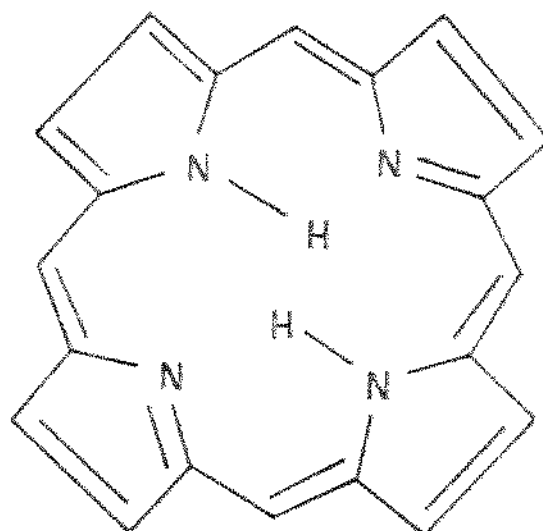


Figura 1 - Estrutura básica porfirínica proposta por Willstater.

*(-CHO)

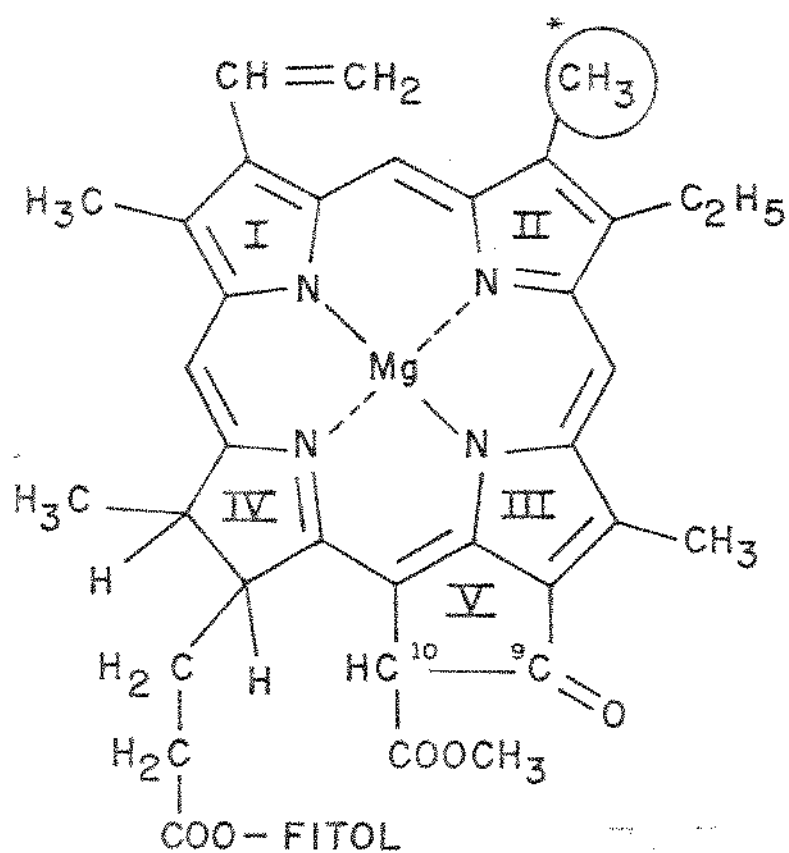


Figura 2 - Estruturas das clorofilas a e b propostas por Fischer.

Schwartz et al. (34) separaram clorofilas a e b e seus derivados por cromatografia líquida de alta pressão em um estudo destinado a detectar mudanças na clorofila durante o processamento de espinafre, onde os referidos autores utilizaram os tempos de retenção e espectros UV para identificação de todos os pigmentos separados.

Sěstak (35) preparou uma revisão detalhada sobre o uso de cromatografia em camada para separação de pigmentos, incluindo detalhes das modificações de separações em camada delgada de clorofila e suas misturas com carotenóides; métodos para separação em placas usando adsorventes inorgânicos tais como sílica gel, silicatos, kieselguhr e outros; também separações em placas feitas com adsorventes orgânicos, entre eles, açúcares, celulose ou polietileno; em seu trabalho, Sěstak descreveu as técnicas utilizadas na cromatografia com placas impregnadas com lipídeos.

2.5. "Determinação de clorofila e clorofila cúprica"

Aronoff e MacKinney (3) ressaltaram que desde que foi mostrado que as clorofilas em solução possuíam espectros que eram completamente aditivos, era possível determinar a concentração das clorofilas a e b diretamente por espectrometria das soluções.

Comar e Zscheile (6) desenvolveram várias equações para quantificar clorofila contida em extratos etéreos, e que foram adotadas pelo AOAC (1) como método oficial para determinação de clorofila total e dos componentes a e b. Os referidos autores adotaram os comprimentos de onda de 660 nm e 642,5 nm, respecti-

vamente para clorofila a e b.

Para estudar a aplicação das fórmulas de Comar e Zschei^{le} (6) à extratos acetônicos, Sweeney e Martin (39) compararam os espectros de clorofila em éter etílico e acetona a 642,5 nm e 660 nm, encontrando uma razão de 1,22 entre as absorbâncias no extrato etéreo e no extrato acetônico.

Entretanto, Vernon (42), após questionar a eficiência dos métodos espectrofotométricos que determinavam a extensão da conversão de clorofilas à feofitinas tratando o extrato acetônico como um sistema de dois componentes, derivou várias equações, todas aplicadas somente a extratos acetônicos a 80%, envolvendo leitura da absorbância em quatro distintos comprimentos de onda, 662 nm para clorofila a, 645 nm para clorofila b, 666 nm para feofitina a e 655 nm para feofitina b.

Fraser e Frankl (13) após separação e identificação das clorofilas do extrato de espinafre fresco através da cromatografia líquida de alta pressão, determinaram as concentrações de cada componente espectrofotometricamente, utilizando equações envolvendo absorbância e absortividade.

Para determinação de feofitinas de cobre (II) em misturas com clorofilas e feofitinas, em éter etílico, White et al. (49) utilizaram equações derivadas a partir de procedimentos espectrofotométricos, onde as concentrações de cada complexo foram obtidas a partir de leituras de absorbância feitas em três distintos comprimentos de onda, 649,8 nm para feofitina de cobre a, 628,2 nm para feofitina de cobre b e 667,2 nm para feofitina a.

Segundo Lajollo et al. (28), a 37°C e com atividade de água superior a 0,32, o mais importante mecanismo de degradação observado na clorofila foi a formação de feofitina; e com atividade de água inferior a 0,32, a velocidade de formação de feofitina observada foi baixa.

Alterações de cor após congelamento e armazenagem de vegetais contendo clorofila foram observadas por Dietrich et al. (8), provavelmente influenciadas pelo tempo e temperatura do branqueamento antes do congelamento. Segundo os referidos autores, tais alterações eram restritas à conversão de clorofila à feofitina, mas Walker (45) mostrou que oxidação também ocorria em feijões estocados por doze meses a -18°C.

Segundo MacKinney e Joslyn (30), para os componentes puros a e b da clorofila a reação envolvendo perda de magnésio era de primeira ordem em relação à concentração de ácido e, provavelmente, de mesma ordem em relação à clorofila. Os referidos autores (30) concluíram que os dois prótons que deslocavam o magnésio deviam reagir a diferentes velocidades, e, com toda probabilidade, a entrada do primeiro hidrogênio era o passo determinante da velocidade, além de observarem que a clorofila a reagiu de sete a nove vezes mais rapidamente que a clorofila b.

Jones e MacKay (24), em seus estudos sobre a fotodegradação da clorofila em microemulsões, mostraram que a molécula sofreu fotodegradação, quando iluminada pela luz. Os referidos autores concluíram que a reação era de primeira ordem.

Jones e MacKay (24) consideraram, em vista das indicações fornecidas pelos espectros, que o produto final formado não era feofitina, e nem possuía a estrutura porfirínica.

Em face do possível uso de clorofila cúprica em alimentos e, conseqüentemente da importância que teria a presença de íons de cobre livre no produto, a FAO (11) sugeriu um método de dosagem para cobre livre na clorofila cúprica, baseado na reação de complexação e precipitação do cobre ionizável com ácido rubeânico.

2.6. Reações da clorofila e clorofila cúprica

Clydesdale et al. (4) constataram a oxidação do anel isocíclico (V) (figura 5) da molécula da clorofila formando clorofila alomerizada, além da ruptura do anel tetrapirrólico para formar produtos finais incolores.

Strain (37) estudou as reações de isomerização e oxidação ocorrendo em folhas, in vitro, assim como o efeito de vários solventes usados para tratamentos das folhas, tais como acetona, acetato de metila, metanol e etanol, todos eles formando produtos alomerizados da clorofila.

Hynninen (20) considerou que devido à sua excepcional labilidade, as clorofilas são suscetíveis às várias transformações químicas que resultam em vários produtos e isômeros. Segundo o autor, a presença de um anel isocíclico (V) (figura 5) de alta reatividade, é o responsável por essa acentuada labilidade, onde as formas enôlicas da clorofila, no carbono 9 da molécula, tem um papel chave no início do processo de oxidação. Hynninen observou que os produtos formados eram incolores e derivados da 10-alcoxi purpurina 7-lactona.

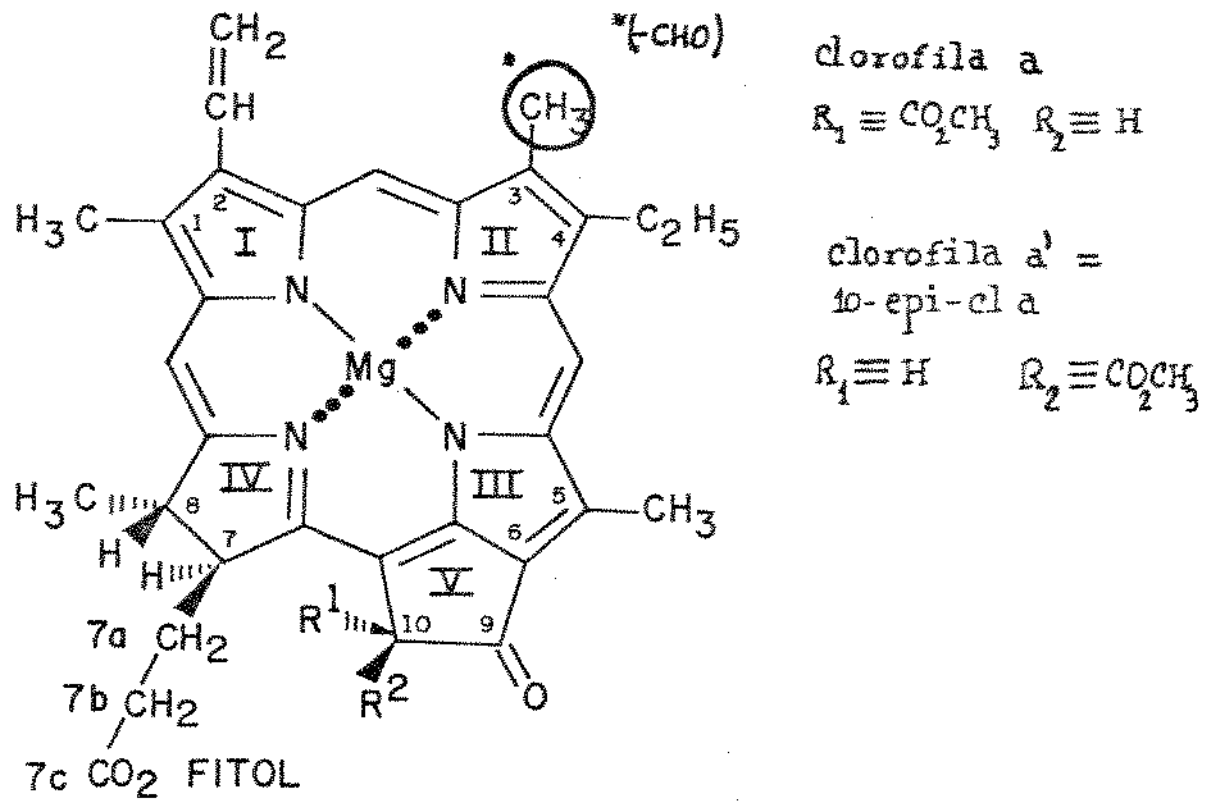


Figura 3 - Estruturas das clorofilas a' e b', isômeros das clorofilas.

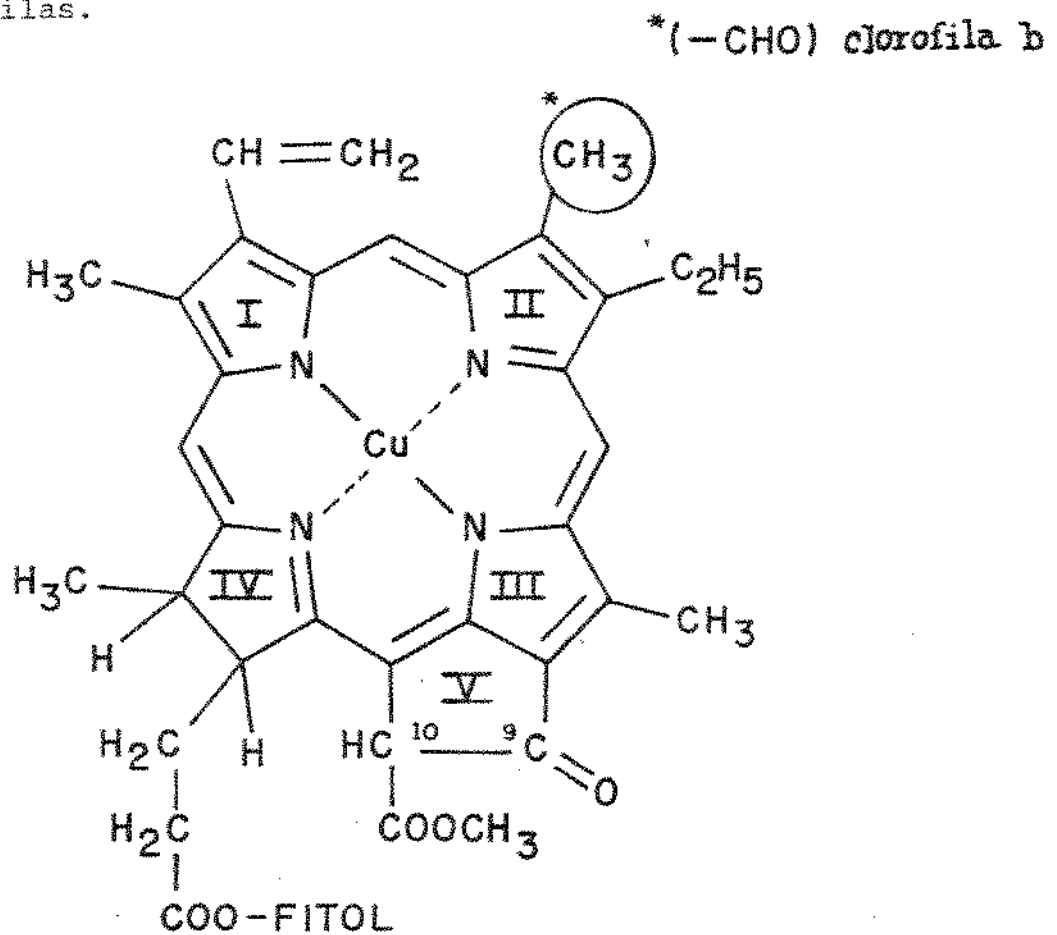


Figura 4 - Estruturas das clorofilas cúpricas a e b.

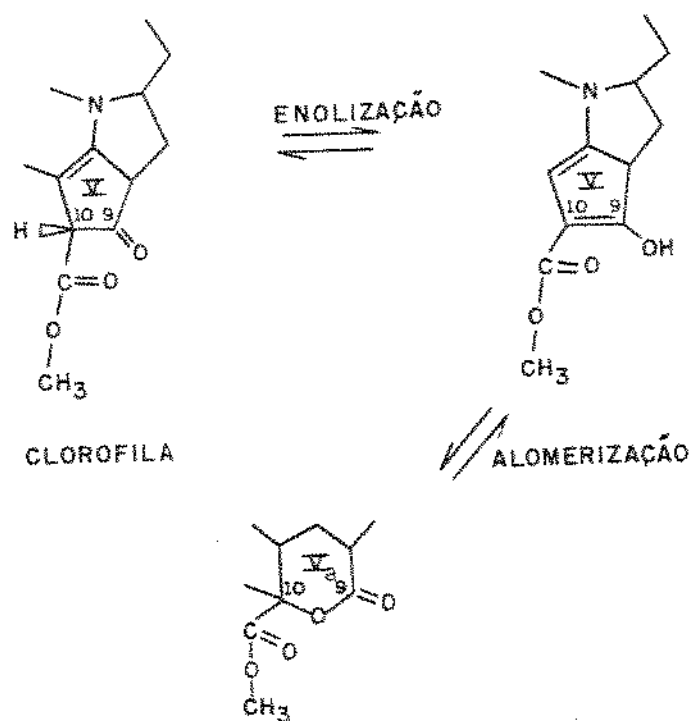


Figura 5 - Formação do enol seguida da alomerização.

MacKinney e Little (29) mostraram experimentalmente que produtos desidratados embalados em recipientes claros sofreram fotooxidação e perdiam a cor.

A conversão de clorofila à feofitina além da reação de fotooxidação, ocorridas em alimentos desidratados, foram observadas por Dutton et al. (9). Segundo os referidos autores, a reação de feofitinizacão foi observada em espinafre seco, com 18% de umidade, enquanto que a 2,5% a reação aparentemente não ocorreu.

Durante a formação dos complexos de cobre, Jones et al. (25) observaram que as mudanças ocorridas rapidamente nos pigmentos eram devidas à reação de alomerização. Os quelatos alomerizados foram distinguidos dos pigmentos não alomerizados pelo teste de fase, localização em uma coluna de açúcar e por suas curvas espectrais.

2.7. Estabilidade da cor de clorofila e clorofila cúprica

Para a manutenção da cor verde em vegetais processados termicamente, Clydesdale e Francis (5) experimentaram o uso de $MgCO_3$ combinado com uma enzima que convertia clorofila a clorofila. Os resultados não foram suficientemente conclusivos para sugerir novo tipo de processamento.

Gupte e Francis (14) combinaram o processo "HTST" com o uso de $MgCO_3$ e obtiveram um produto processado muito atrativo, mas segundo os referidos autores, o problema da perda de cor durante a estocagem não foi superado.

Clydesdale et al. (4) experimentaram a estabilização da cor e do pH de vegetais verdes processados com o uso de sistemas tamponantes, como $MgCO_3$ e sistemas de tampão fosfato, obtendo alguma melhora na cor dos produtos, mas a estabilidade do pH só foi possível com a adição de quantidades inaceitáveis de sais.

Tan e Francis (40) ao estudarem o efeito da temperatura do processamento nos pigmentos e na cor do espinafre, verificaram que com a introdução da esterilização por "HTST" no proces

samento tornou-se possível reduzir a destruição de pigmentos. Contudo, os autores verificaram a rápida degradação do pigmento durante a estocagem. O mesmo resultado foi obtido por Clydesdale et al. (4) ao experimentarem o "Processo Blair", ou seja, o uso de hidróxidos de cálcio e magnésio ou seus respectivos óxidos, a fim de produzir uma elevação do pH no sistema, minimizando a formação de feofitina. Entretanto, os referidos autores observaram que o produto não mantinha sua cor durante o armazenamento.

Partindo do resíduo da evaporação do suco de folhas de cevada, Hagiwara (16) preparou um extrato alcoólico que, diluído em água e levado a pH 7,2, manteve a coloração mesmo durante o aquecimento.

Em seu trabalho de revisão, Humphrey (19) discutiu brevemente a estabilidade dos complexos de feofitina e cobre. Segundo o autor, esses complexos são resistentes à ação de ácido clorídrico concentrado, característica que os torna seguros para colorir alimentos pois são excretados intactos.

Watson e Tom (46) estudaram a formação de complexos estáveis de íons de cobre com vários compostos. Segundo os referidos autores, a estabilidade dos complexos dependia de vários fatores, entre os quais: capacidade de doação de elétrons pelo heteroátomo e a coplanaridade entre os heteroátomos e o íon.

Segundo Watson e Tom (46), a tendência dos heteroátomos em doar seus pares de elétrons desemparelhados é uma propriedade relativa à mobilidade dos elétrons da camada de valência, tendo essa característica, uma relação inversa aos efeitos de po

larização do heteroátomo. Assim, para nitrogênio, enxofre e oxigênio, a ordem decrescente de mobilidade desses elétrons desemparelhados é $N > S > O$.

Ao discutir os quelatos de cobre e magnésio, Falk (10) considerou que, se no aquecimento de uma metaloporfirina com um íon metálico houver substituição do metal na metaloporfirina, o produto formado é termodinamicamente mais estável. Essa transformação ocorre no caso de substituição do Mg por Cu (II).

Segundo Falk (10), enquanto que magnésio ligado a anéis porfirínicos pode ser substituído por dois prótons com HCl diluído, no caso do cobre a substituição só se daria com H_2SO_4 concentrado. Conseqüentemente, Falk atribuiu maior estabilidade à ligação do átomo de cobre em relação à do magnésio, no caso das porfirinas.

Kearsley e Katsaboxakis (27) investigaram a possibilidade do uso de corantes naturais, entre eles, clorofila cúprica água-solúvel, através da avaliação de suas estabilidades sob diferentes condições de trabalho, entre elas, temperatura, pH (a 7°C e a 40°C), atividade de água, luz, sobre soluções de pigmentos puros e assim como em sistemas modelos, além de avaliarem o emprego de clorofila cúprica como corante para alimentos.

Os resultados obtidos por Kearsley e Katsaboxakis (27) mostraram que a clorofila cúprica água-solúvel era lábil ao calor e que quando dissolvida em água, dando uma solução alcalina posteriormente acidificada, resultou num precipitado com subseqüente redução na cor, sendo portanto mais estável a pH alcalinos.

A estabilidade da clorofila cúprica água-solúvel aumentou com a diminuição da atividade de água e diminuiu sensivelmente quando exposta à luz.

Segundo os referidos autores (27), muitos sistemas de alimentos parecem oferecer um efeito protetor, até mesmo estabilizante, para os corantes naturais. Nos sistemas estudados, o ácido ascórbico mostrou ter um pequeno efeito protetor sobre a clorofila cúprica água-solúvel; Já uma mistura de glucose, frutose e sacarose exerceu um considerável efeito protetor, comparável com aqueles encontrados nos sistemas açúcar/aminoácido, benzoato de sódio, metabissulfito de sódio e BHA.

Kearsley e Katsaboxakis (27) investigaram ainda a aplicação de clorofila cúprica água-solúvel como um possível corante para ervilhas congeladas a fim de substituir a clorofila natural convertida à feofitina durante o branqueamento.

Os referidos autores (27) consideraram que a vantagem do uso de clorofila cúprica água-solúvel era muito limitada porque esta degradou-se rapidamente durante o branqueamento. Quando a adição foi posterior ao branqueamento, o resultado encontrado por esses autores foi considerado satisfatório.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Matéria prima

Foram usadas folhas secas de Estevia rebaudiana (Bert.) Bertoni provenientes de Santa Catarina e Paraná, bem como folhas frescas de espinafre adquirido no comércio local.

3.2. Equipamento

- Espectrofotômetro visível-ultravioleta, UNICAM 8000.
- Banho de água, com termostato, preciso até 0,5°C, da marca Braun.
- Balança analítica Mettler.
- Balança técnica de laboratório.
- Lâmpadas fluorescentes, da marca Osram, 40 watts, luz do dia, 2500 lm (fluxo luminoso).
- Liquidificador.
- Evaporador rotatório, Buchler.
- Equipamento de vidro usual de laboratório químico como bêqueres, erlenmeyers, balões, tubos, etc.
- Extrator tipo Soxhlet.

3.3. Reagentes

Todos os reagentes usados foram da marca Merck, puros ou foram produtos comerciais purificados no laboratório conforme técnicas usuais descritas por Vogel (43).

3.4. Extração

3.4.1. Preparação do extrato acetônico das folhas frescas de espinafre (Spinacia oleracea)

Quatrocentos e trinta gramas de folhas frescas e limpas de espinafre foram trituradas em liquidificador com 1 litro de acetona resfriada a 10-12°C e com 43 gramas de carbonato de cálcio.

O material extraído no liquidificador foi filtrado em Buchner e o resíduo, após lavagem com acetona, foi reextraído, filtrado e lavado com mais acetona até que o resíduo não mais apresentasse coloração verde elevada. Todas as operações foram feitas ao abrigo da luz.

Os extratos foram combinados e o volume total obtido foi de 2 litros. O extrato foi resfriado a 10°C, filtrado do resíduo ceroso formado e o filtrado foi evaporado a seco em evaporador rotatório a 40-45°C.

O resíduo verde-escuro, de consistência cerosa, foi deixado sob vácuo, em sílica. Uma alíquota do produto foi cromatografado em placa de sílica gel 60 G, 0,25 mm, e desenvolvida

com hexano-benzeno-etanol, 100:20:7 (v/v), até que a frente do solvente tivesse corrido 15 cm. A placa está reproduzida na figura 28. Foi também obtido o espectro UV-visível do extrato em acetona 80% (figura 7).

3.4.2. Preparação do extrato clorofórmico das folhas secas de

Estevia rebandiana

A escolha de clorofórmio como solvente para extração de clorofila foi baseada no resultado de ensaios preliminares em que foram comparadas as absorbâncias a 660 nm dos extratos feitos com clorofórmio, acetona e etanol em condições experimentais iguais, além disso, a purificação da clorofila cúprica foi mais fácil de executar em clorofórmio do que em acetona, especialmente no que se refere à eliminação de excesso de íons de cobre.

O fluxograma da preparação da clorofila cúprica está na figura 6. Um total de 1800 gramas de folhas secas (6% de umidade), trituradas, foram extraídas em Soxhlet, ao abrigo da luz, por um máximo de 12 horas. Após cada extração, a solução foi parcialmente concentrada a vácuo até cerca de um terço do volume inicial.

Os extratos concentrados foram reunidos, resfriados a 10°C e filtrados a vácuo.

O filtrado foi concentrado até o volume de 800 ml. O extrato concentrado foi cromatografado em camada delgada, como no item 3.4.1. (figura 29).

Uma alíquota do extrato clorofórmico foi evaporada a seco e redissolvida em acetona 80% para obtenção de seu espectro (figura 8).

3.4.3. Preparação da feofitina

O extrato clorofórmico obtido no item 3.4.2. foi aquecido a refluxo por 10 minutos com 50 ml de ácido acético glacial. A seguir, foi evaporado a seco em evaporador rotatório e mantido em dessecador, sobre sílica, até obter-se peso constante (tabela 2).

O extrato foi cromatografado em camada delgada, do mesmo modo como no item 3.4.1., (figura 30) e seu espectro foi obtido em acetona 80% (figura 9) e também em n-propanol (figura 10).

3.4.4. Preparação da clorofila cúprica água-solúvel

O extrato evaporado obtido no item 3.4.3. foi redissolvido em 500 ml de clorofórmio e a solução foi tratada com uma solução de 1 gr de acetato de cobre (II) em 50 ml de metanol. A seguir, a solução clorofórmica foi aquecida a refluxo por 15 minutos e posteriormente evaporada a seco em evaporador rotatório e mantida em dessecador até obter-se peso constante (tabela 2).

3.5. Purificação da clorofila cúprica

O extrato proveniente do item 3.4.4. foi redissolvido em 500 ml de clorofórmio e extraído com um total de 2000 ml de água em funil de separação.

Em seguida, a solução clorofórmica foi submetida a lavagem contínua com água corrente por 6-8 horas ou até que a água de lavagem apresentasse resultado negativo numa prova para íons de Cu (II) com solução de ferrocianeto de potássio (44).

Amostras do extrato foram novamente lavadas com solução de EDTA a 10% e a seguir com água.

3.6. Fracionamento da clorofila cúprica

A clorofila cúprica, de consistência cerosa, obtida no item 3.5., foi lentamente misturada com 200 ml de n-pentano a 10-12°C e a mistura foi filtrada a vácuo. O resíduo foi seco a 45-50°C por 4-5 horas e em seguida, sob vácuo, a 40-45°C, durante 12 horas.

O resíduo seco foi mecanicamente triturado a pó fino, em almofariz, e guardado em dessecador sob vácuo e pesado (tabela 3).

O filtrado foi evaporado a seco em evaporador rotatório e colocado em dessecador a vácuo sobre sílica e pesado (tabela 3).

Amostras do resíduo e do filtrado bem como da clorofila cúprica não fracionada, foram cromatografadas em placa de sílica gel 60 G, 0,25 mm, e o cromatograma foi desenvolvido com benzeno-hexano-n-propanol 5:3:2 (v/v). O cromatograma está reproduzido na figura 31. Foram também obtidos os espectros do resíduo sólido e do extrato oleoso (figura 11).

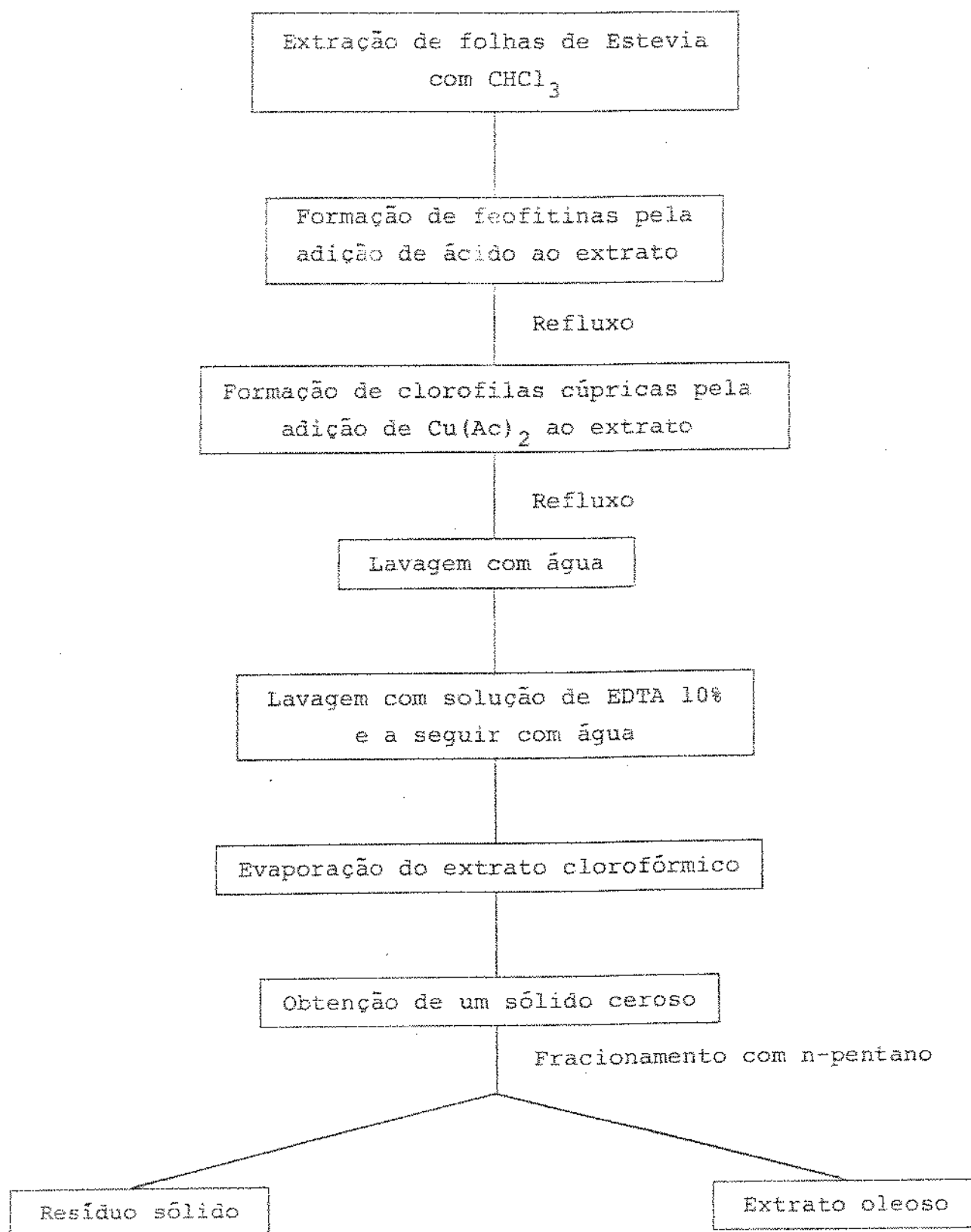


Figura 6 - Fluxograma da preparação de clorofila cúprica óleo-solúvel.

3.7. Dosagem de Cu (II)

Foram aplicados em uma placa de sílica gel 60 G, 0,25 mm, 10 µl de uma solução a 1% do resíduo sólido obtido no item 3.6., e 1,2 e 3 µl de solução padrão de cobre contendo 0,02 µg de Cu(II)/µl. O cromatograma foi desenvolvido com n-pentanol - ácido acético-água, 4:1:2 (v/v), até que a frente do solvente ascendes se 10 cm.

A placa, depois de seca, foi pulverizada com uma solução alcoólica de ácido rubeânico 0,2%, seguida de exposição aos vapores de amoníaco.

3.8. Estabilidade da clorofila cúprica comparativamente à da clorofila

Foram preparadas soluções de clorofila cúprica e clorofila em n-propanol. As características de cada amostra estão resumidas na tabela 1.

A variação da absorbância em função do tempo de reação foi o parâmetro usado para medir e comparar a estabilidade da clorofila cúprica e clorofila.

As soluções foram distribuídas em tubos de 10,0 ml com tampa rosqueada, vedados com teflon. Atmosfera inerte foi obtida pela substituição do ar por nitrogênio sobre a solução no tubo e, atmosfera de oxigênio pela substituição do ar por oxigênio.

O efeito da luz foi determinado expondo-se os tubos fechados à luz de uma lâmpada de 40 watts, luz do dia, a uma dis-

tância fixa de 3 cm da lâmpada. Os experimentos em meio ácido foram feitos adicionando-se ácido acético glacial ao n-propanol até pH 3,6 e usando esta mistura para dissolver clorofila cúprica e clorofila.

3.9. Cálculo das constantes de velocidade de Reação (K) e Tempo de meia-vida ($t_{1/2}$)

As constantes de velocidade de reação, K, foram determinadas utilizando-se os valores de $-\log$ Absorbância obtidos das curvas $-\log$ Absorbância versus tempo (figuras 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 e 44) e aplicados na equação de Arrhenius (equação 1) para reações com cinética de 1ª ordem, as absorbâncias foram lidas a 660 nm e 650 nm, respectivamente para clorofila magnesiana e clorofila cúprica.

Também foram calculados os tempos de meia-vida ($t_{1/2}$), através da equação 2. Os resultados estão resumidos na tabela 5.

$$- 2,303 \cdot \log \frac{\text{Absorbância a } t_i}{\text{Absorbância a } t_o} = Kt \quad (\text{eq. 1})$$

$$\frac{0,693}{K} = t_{1/2} \quad (\text{eq. 2})$$

Tabela 1 - Condições de reação usadas no estudo da estabilidade de clorofila cúprica e clorofila.

Amostra	Concentração (gr/l)		Atmosfera	Aditivos Adicionados	Condições	Temperatura ± 0,5°C
	Clorofila	Clorofila cúprica				
1	0,365	1,036	oxigênio	-	luz	25°
2	0,365	1,036	oxigênio	-	ausência de luz	25°
3	0,365	1,016	nitrogênio	-	luz	25°
4	0,365	-	nitrogênio	-	ausência de luz	25°
5	-	1,012	nitrogênio	bissulfito de sódio 100 mg/kg	ausência de luz	25°
6	-	1,020	nitrogênio	idem, 200 mg/kg	ausência de luz	25°
7	-	1,015	nitrogênio	idem, 500 mg/kg	ausência de luz	25°
8	0,365	-	nitrogênio	idem, 250 mg/kg	ausência de luz	25°
9	-	1,020	oxigênio	peróxido de benzoíla 250 mg/kg	ausência de luz	25°
10	-	1,016	oxigênio	idem, 500 mg/kg	ausência de luz	25°
11	0,365	1,015	oxigênio		pH 3,6 em ausência de luz	25°
12	0,125	1,019	oxigênio		pH 3,6 + luz	25°
13	0,365	1,004	oxigênio		Aquecimento em ausência de luz	40°
14	0,365	1,000	oxigênio		Aquecimento em ausência de luz	60°

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Condições experimentais

O uso de folhas secas de Estevia rebaudiana como matéria-prima para preparação de clorofila foi devido principalmente a possibilidade de utilizar um material cujo teor de pigmentos justificasse seu emprego e que, como subproduto industrial, fosse uma fonte economicamente viável.

Os resultados da tabela 2 mostram que o teor de clorofila nas folhas era satisfatório, pois por extração foi alcançado um rendimento de 5,1% de clorofila bruta. Valores ao redor de 5,0% foram considerados bons por Humphrey (19).

Se o uso de folhas secas de Estevia foi vantajoso no que se refere à preparação de clorofila cúprica, a obtenção de clorofila do mesmo material, isenta de maiores impurezas, mostrou-se inviável pela grande quantidade de feofitina que acompanhava a clorofila e que levaria a demoradas e incertas purificações.

O uso de folhas frescas de Estevia, que eliminaria ou minimizaria o problema da feofitina, mostrou-se inviável porque não foi possível obter o material recém-colhido. Foram então usadas folhas de espinafre recém-colhidas, que normalmente contêm teores altos de clorofilas a e b e são uma fonte clássica de obtenção de clorofila em laboratório. Entretanto, foi necessário usar acetona em lugar de clorofórmio devido ao alto teor de água das folhas, cerca de 92,7 (51).

Para estudar a estabilidade da clorofila extraída do es pinafre, os extratos foram usados sem ulteriores tratamentos, já que a presença de carotenóides não produzia interferências nas análises através das medidas de absorbância a 660 nm, visto que os mesmos não absorvem na região acima. Por outro lado, a cromatografia em camada delgada dos extratos (figura 27) mostrou que realmente o teor de feofitina nos extratos acetônicos era muito baixo, não chegando a interferir nos experimentos seguintes.

A redução do teor de cobre livre do extrato clorofórmico contendo clorofila cúprica bruta foi alcançada através da lavagem com água corrente e eventualmente com solução de EDTA. O teor de cobre encontrado, empregando-se o método do ácido rubênico (11), foi inferior ao permitido pela legislação, de 200 mg/kg, confirmando então a eficiência do processo de lavagem.

O tratamento com n-pentano permitiu a obtenção de um pó preto-esverdeado, a partir de clorofila cúprica óleo-solúvel, obtida inicialmente como massa resinosa cerosa, além de permitir a eliminação de grande parte dos produtos resinosos bem como dos carotenóides.

Para os experimentos de estabilidade algumas características do n-propanol indicaram este solvente como um dos mais apropriados: sua baixa volatibilidade (temperatura de ebulição de 93°C), que permite seu uso em condições de temperatura acima da temperatura ambiente, sem perdas significativas nas temperaturas usadas (tabela 1); é também um solvente prótico, permitindo a dissociação de ácidos no meio; é de fácil purificação e recuperação e mesmo a destruição de peróxidos, sempre presentes em

Tabela 2 - Rendimento das preparações de feofitina, clorofila cúprica e clorofila magnesiana.

Produtos	Peso de matéria prima (gr)	Peso obtido (gr)	Rendimento %
Feofitina (de Estevia)	1.800,00	102,60	5,1
Clorofila cúprica (de Estevia)	102,60	104,42	96
Clorofila magnesiana (de espinafre)	430,00	1,82	0,4

Tabela 3 - Peso obtido de clorofila cúprica purificada e fracionada com n-pentano.

Produto	Rendimento (gr)	Fracionamento (gr)
Clorofila cúprica	102,26	75,52 (resíduo sólido)
		26,14 (extrato oleoso)

solventes oxigenados, é facilmente conseguida sem maiores perdas pela ação de boroidreto de sódio sobre o propanol seguida de destilação fracionada.

4.2. Estabilidade da clorofila cúprica e da clorofila

Os espectros 8 e 9 dos sistemas C.Cu/O₂/Luz e C.Cu/Atmosfera inerte/Luz, respectivamente, registraram a mesma alteração do comprimento de onda de absorção na região do vermelho, de 649 nm para 613 nm, mas nenhuma alteração no comprimento de onda do máximo de absorção na região do azul, a 413 nm. Para ambos os espectros 8 e 9, houve sensível e igual diminuição das absorbâncias dos primeiros máximos, com perda de cor após 500 horas, de 42,0% (tabela 4).

Houve entretanto, para a clorofila, um forte e rápido efeito da luz. O exame dos espectros 6 e 7, C.Mg/O₂/Luz e C.Mg/Atmosfera inerte/Luz, respectivamente, mostra uma drástica diminuição dos primeiros máximos de absorção, com perdas de cor de 95,0% e 91,0%, para oxigênio após 45 horas, e para atmosfera inerte após 25 horas, respectivamente, além da ausência de quaisquer outras absorções em outros comprimentos de onda. Resultados semelhantes foram obtidos por Jones e MacKay (24), que verificaram que o produto formado da reação de fotodegradação da clorofila não era uma porfirina, ocorrendo possivelmente uma degradação da molécula como a clivagem do anel porfirínico em uma das pontes metilênicas, produzindo estruturas tetrapirrólicas.

Entretanto, nada se pode afirmar sobre a natureza dos produtos resultante da exposição da clorofila cúprica à luz.

Comparativamente à clorofila, a perda de cor para clorofila cúprica após 45 horas, em presença de oxigênio, foi de 0,3% e, após 25 horas, em presença de atmosfera inerte, foi de 0,5%.

A relação entre os valores de tempo de meia-vida (tabela 5) para os sistemas C.Cu/O₂/Luz e C.Mg/O₂/Luz e C.Cu/Atmosfera inerte/Luz e C.Mg/Atmosfera inerte/Luz, mostra uma sobrevida 200.000 maior para a clorofila cúprica em oxigênio, e 100.000 maior para a clorofila cúprica em atmosfera inerte.

A porcentagem de perda de 0,7%, após 500 horas, (tabela 4), assim como alterações mínimas, (de cerca de 2 nm) no comprimento de onda do primeiro máximo de absorção, observadas no espectro 10, de C.Cu/O₂/Escuro, e que estão dentro do erro experimental do aparelho (2nm), foi extremamente baixa, mostrando que nem propanol nem oxigênio, na ausência de luz, foram significativamente ativos na alomerização da clorofila cúprica ao contrário da clorofila cuja perda, nessas condições, foi de 7,0%, provavelmente devido à formação de produtos alomerizados, onde houve a inserção de um átomo de oxigênio no anel isocíclico, conforme figura 4. A possibilidade de que as perdas de cor das soluções de clorofila poderiam ser resultantes do solvente n-propanol, agindo como solvente alomerizante, foi considerada por Hynninen(20). Mas deve ser lembrado que outros autores, entre os quais Strain (37) consideraram que outros solventes também são alomerizantes.

A relação entre os valores de tempos de meia-vida (tabela 5) para os sistemas C.Cu/O₂/Escuro e C.Mg/O₂/Escuro, mostra uma sobrevida três vezes maior para a clorofila cúprica.

Tabela 4 - Porcentagem de perda de clorofila cúprica e clorofila, sob diferentes condições, após 500 horas.

Condições de reação	% de perda	
	Clorofila	Clorofila cúprica
Oxigênio/Escuro	7,0	0,7
Oxigênio/Luz	95,0*	42,0
Atmosfera inerte/Escuro	6,0	-
Atmosfera inerte/Luz	91,0**	42,0
Bissulfito de sódio 100 ppm/ Escuro/Atmosfera inerte	-	sem perdas
Bissulfito de sódio 200 ppm/ Escuro/Atmosfera inerte	-	sem perdas
Bissulfito de sódio 250 ppm/ Escuro/Atmosfera inerte	2,8	-
Bissulfito de sódio 500 ppm/ Escuro/Atmosfera inerte	-	sem perdas
Peróxido de benzoíla 250 ppm/ Escuro/Oxigênio	perda imediate	100,0***
Peróxido de benzoíla 500 ppm/ Escuro/Oxigênio	perda imediate	100,0***
Meio ácido/Escuro/Oxigênio	45,0	1,8
Meio ácido/Luz/Oxigênio	96,7**	43,7
Aquecimento 40°C/Escuro/ Oxigênio	16,0	2,0
Aquecimento 60°C/Escuro/ Oxigênio	36,0	16,0

*** após 24 horas

** após 25 horas

* após 45 horas

- não foram realizados esses experimentos.

Segundo dados da tabela 4, os sistemas C.Cu/Bissulfito /Atmosfera inerte/Escuro, nas concentrações 100 ppm, 200 ppm e 500 ppm de bissulfito de sódio, não sofreram perdas de cor após 500 horas de reação, mantendo-se inalterados até trinta dias de reação.

Já a clorofila, nas mesmas condições e na concentração de 250 ppm de bissulfito de sódio, apresentou após 500 horas de reação, uma perda de 2,8%, que pode ser considerada baixa em face do tempo de reação.

Nos espectros 11, 12 e 13, pertencentes aos sistemas C.Cu/Bissulfito/Atmosfera inerte/Escuro, nas três concentrações citadas não foram observadas alterações mensuráveis nas absorbâncias de seus máximos de absorção após 720 horas de reação. Também não foi observada qualquer alteração significativa no cromatograma da clorofila cúprica em comparação com o da clorofila cúprica purificada e fracionada com n-pentano (figura 33).

Provavelmente as condições de reação utilizadas: atmosfera inerte e ausência de luz, não favoreceram a formação de radicais livres ou de espécies reativos do oxigênio, que pudessem atuar sobre a molécula tanto da clorofila quanto da clorofila cúprica, como sugeriram Pieser e Yang (31).

Já a adição de peróxido de benzoíla à solução de clorofila cúprica, em oxigênio e na ausência de luz, nas concentrações de 250 ppm e 500 ppm, provocou perda total de cor em apenas 24 horas de reação (tabela 4).

Para a clorofila, nas mesmas condições, nas concentrações de 250 ppm e 500 ppm de peróxido de benzoíla, a perda de cor foi imediata (tabela 4).

Tabela 5 - Constantes de velocidade de reação aparente de 1ª ordem (K) e tempo de meia-vida para sistemas de clorofila cúprica e clorofila.

Condições de reação	Clorofila		Clorofila cúprica	
	$K \times 10^{-4} (h^{-1})$	$t_{1/2} \times 10^4 (h)$	$K \times 10^{-4} (h^{-1})$	$t_{1/2} \times 10^4 (h)$
Oxigênio/Escuro	0,79	0,88	0,23	3,00
Oxigênio/Luz	$56,4 \times 10^4$	$0,01 \times 10^{-4}$	3,45	0,20
Atmosfera inerte/Escuro	0,69	1,00	-	-
Atmosfera inerte/Luz	$98,6 \times 10^4$	$0,007 \times 10^{-4}$	8,75	0,08
Bissulfito de sódio 100 ppm/ Atmosfera inerte/Escuro	-	-		
Bissulfito de sódio 200 ppm/ Atmosfera inerte/Escuro	-	-		
Bissulfito de sódio 250 ppm/ Atmosfera inerte/Escuro	0,69	1,00		
Bissulfito de sódio 500 ppm/ Atmosfera inerte/Escuro	-	-		
Meio ácido/Oxigênio/Escuro	55,7	0,05	0,23	3,00
Meio ácido/Oxigênio/Luz	$67,0 \times 10^4$	$0,01 \times 10^{-4}$	10,6	0,06
Aquecimento 40°C/Oxigênio/ Escuro	2,76	0,25	0,23	3,00
Aquecimento 60°C/Oxigênio/ Escuro	8,52	0,08	3,22	0,22

Nos espectros 14 e 15, dos sistemas C.Cu/Peróxido 250 ppm/O₂/Escuro e C.Cu/Peróxido 500 ppm/O₂/Escuro, verificou-se a ausência do máximo de absorção, a 649 nm, ao final de 24 horas de reação.

Sendo o peróxido de benzoíla um bom promotor de radicais livres, possivelmente na ausência de luz as posições alílicas do anel porfirínico seriam rapidamente atacadas com perda da estrutura conjugada responsável pela cor.

A resistência da clorofila cúprica ao efeito de prótons e oxigênio é aparente nos dados da tabela 4.

A porcentagem de perda para o sistema C.Mg/Meio ácido/O₂/Escuro foi de 45,0% (tabela 4), após 120 horas de reação. Nas mesmas condições e no mesmo tempo de reação, a clorofila cúprica não apresentou perda de cor, e ao final de 500 horas de reação a perda foi de 1,8%.

A possibilidade de formação de feofitina pela adição do ácido à solução de clorofila cúprica pode ser afastada uma vez que não foi registrado no espectro 16, nenhuma alteração do comprimento de onda do máximo de absorção (647 nm), ao contrário do espectro 17, da clorofila magnésiana, nas mesmas condições de reação, onde observou-se que já após 24 horas foram registrados efeitos hipocrômico e batocrômico no primeiro máximo de absorção, de 666 nm para 663 nm (máximo da feofitina, em n-propanol, figura 10), além dos efeitos hipsocrômico e hipercrômico, observados no segundo máximo da clorofila, de 433 para 413 nm.

O cromatograma (figura 31) do sistema C.Mg/Meio ácido/O₂/Escuro, revelou a ausência das zonas verdes correspondentes às clorofilas e da zona amarela, de alto R_f, devido ao β-caroteno. Por outro lado, o cromatograma mostrou o aparecimento de duas zonas cinzas largas (de intensa fluorescência vermelha quando iluminadas com luz UV, característica das feofitinas), confirmando os dados espectrofotométricos da formação de feofitina.

Como o espectro 16, de C.Cu/Meio ácido/O₂/Escuro, mostrou uma diminuição da absorbância do primeiro máximo (perda de cor de 14%) entre o primeiro e décimo oitavo dia, sem alteração no seu comprimento de onda, permanecendo essa situação até o final do experimento, é provável que tenha ocorrido uma alomerização incipiente. Tal transformação foi também observada por Jones *et al.* (23) quando da estocagem de soluções de clorofila cúprica.

Mesmo sob o efeito conjugado de luz e meio ácido, a clorofila cúprica continuou mostrando maior resistência à degradação do que a clorofila magnesiânica. De fato, os dados da tabela 4 indicam que 96,7% da cor inicial foi perdida no sistema C.Mg/Meio ácido/O₂/Luz, após 25 horas, e 0,5% (obtido através da curva Δ, gráfico.6), no sistema C.Cu/Meio ácido/O₂/Luz.

Após 500 horas de reação, a clorofila cúprica apresentou uma perda de 43,7%, correspondendo aproximadamente à metade da porcentagem de perda calculada para a clorofila magnesiânica após apenas 25 horas.

É interessante observar que a transformação causada pela adição de ácido à clorofila cúprica exposta à luz deve ser semelhante àquela produzida na clorofila cúprica exposta à luz, sem

adição de ácido, conforme indicam os espectros 16 e 18, correspondentes a esses sistemas, onde o comprimento de onda do máximo de absorção foi deslocado de 649 nm para 641 nm, em ambos os casos.

Segundo dados da tabela 4, houve perdas de cor de 2,0% e 16,0%, respectivamente para os sistemas C.Cu/Aquecimento 40°C/O₂/Escuro e C.Mg/Aquecimento 40°C/O₂/Escuro, após 500 horas de reação.

A comparação entre os valores mostra que a diferença é considerável e que o aquecimento a 40°C teve pouco efeito sobre a clorofila cúprica.

O espectro 19, do sistema C.Mg/Aquecimento 40°C/O₂/Escuro, registrou a diminuição da absorbância dos máximos de absorção característicos da clorofila e, a alteração do comprimento do segundo máximo, de 433 nm para 418 nm, após trinta e seis dias de reação, mas nenhuma alteração significativa do primeiro máximo, mostrando assim que o aquecimento a 40°C não favorece a formação de feofitina. Provavelmente, os produtos formados foram aqueles resultantes ainda da reação de alomerização produzidos pela permanência da clorofila em n-propanol e na presença de oxigênio, observados também por Strain (37) ao aquecer soluções de clorofila em n-propanol.

Já para clorofila cúprica, o exame do espectro 20, não mostrou nenhuma alteração significativa do comprimento de onda dos dois máximos de absorção. O cromatograma (figura 35) revelou que todas as zonas verdes das clorofilas cúpricas se mantiveram e não houve registro do aparecimento de novas zonas. Considerou-se assim que, os produtos finais formados podem ser os mes

mos encontrados para a clorofila magnesiana.

A relação entre os valores de tempo de meia-vida (tabela 5) para os sistemas C.Cu/Aquecimento 40°C/O₂/Escuro e C.Mg/Aquecimento 40°C/O₂/Escuro, mostra uma sobrevida doze vezes maior para a clorofila cúprica.

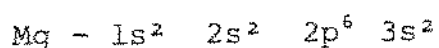
Quando a temperatura de aquecimento foi elevada a 60°C, a sobrevida da clorofila cúprica foi aproximadamente três vezes maior que a da clorofila conforme os dados de tempo de meia-vida (tabela 5).

O aquecimento a 60°C mostrou-se mais destrutivo, conforme esperado, do que a 40°C, tanto para clorofila quanto para clorofila cúprica. Entretanto, a perda de cor foi sensivelmente maior para a clorofila do que para a clorofila cúprica, com porcentagens de 36,0% e 16,0%, respectivamente (tabela 4).

O exame dos espectros e cromatogramas dos sistemas clorofila cúprica aquecida a 40°C e a 60°C, espectros 20 e 21, e figuras 35 e 36, respectivamente, mostra coincidências suficientes para que se possa admitir que os produtos finais nos dois sistemas sejam clorofilas cúpricas alomerizadas, conforme observado por Jones et al. (25).

Ao contrário da clorofila magnesiana, a clorofila cúprica não sofreu alteração em meio ácido, isto é, o íon de cobre não é substituído por prótons, mostrando que o complexo Cu-porfirina deve ter alta constante de estabilidade enquanto o complexo Mg-porfirina tem baixa constante de estabilidade e sua diferença pode ser atribuída à diferenças nas estruturas dos dois complexos que em última análise dependerá da estrutura eletrônica dos átomos de cobre e de magnésio.

Ao contrário do magnésio, o cobre possui cinco orbitais d, dos quais um ocupado por um só elétron. A distribuição dos elétrons nos dois átomos é a seguinte:



Pela teoria do campo-ligante, os cinco orbitais 3d poderão estar envolvidos na ligação com o ligante. Com isso, a ligação coordenada entre o ligante, doador, e o átomo de cobre, acceptor, adquire maior caráter covalente do que aquele estabelecido na ligação entre o ligante e o átomo de magnésio.

A substituição do Mg por Cu na clorofila é uma transformação relativamente fácil de ocorrer e isso indica uma maior estabilidade do complexo, conforme concluiu Falk (10).

A existência de orbitais do nível 3d no cobre é portanto a principal responsável pela estabilidade desse complexo. O cobre forma um complexo plano-quadrado, em que os orbitais $3d_{x^2-y^2}$, orientados para os quatro vértices, podem interagir fortemente com os quatro orbitais de valência dos ligantes, enquanto a interação com $3d_{z^2}$ é fraca. Os demais orbitais d estão envolvidos em ligações π com os ligantes.

5. CONCLUSÃO

1. As folhas de *Estevia* mostraram-se viáveis para obtenção de clorofila cúprica, que foi satisfatoriamente purificada, obtendo-se dosagem inferior a 200 mg/kg de íons cobre livre no produto final.
2. A clorofila cúprica mostrou maior estabilidade à luz do que a clorofila magnesiânica.
3. A clorofila cúprica não sofreu os mesmos efeitos alomerizantes causados pelo solvente *n*-propanol, na ausência de luz, comparativamente à clorofila magnesiânica.
4. O bissulfito de sódio, nas concentrações usadas, mostrou-se incapaz de promover a perda de cor da clorofila cúprica.
5. A clorofila cúprica e clorofila mostram baixa resistência à ação da magnesiânica peróxido de benzoíla.
6. A clorofila cúprica, comparativamente à clorofila magnesiânica, mostrou-se extremamente estável ao aquecimento a 40°C e também mais estável ao aquecimento a 60°C.
7. A clorofila cúprica mostrou-se elevadamente estável em meio ácido, em relação à clorofila magnesiânica, que degradou-se à feofitina.

8. Foi observada a superior estabilidade da clorofila cúprica comparativamente à clorofila magnesiana, quando da combinação das condições meio ácido e luz.
9. A maior estabilidade da clorofila cúprica em comparação com a clorofila, pode ser atribuída à presença de orbitais d no átomo de cobre.
10. Os agentes oxidantes, que produzam radicais livres, não devem ser adicionados a produtos contendo clorofila cúprica ou clorofila magnesiana.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AOAC, 1980. Official Methods of Analysis 13th ed. Association of Official Analytical chemists. Washington, D.C.
2. ARONOFF, S. 1953. The chemistry of chlorophyll (with special reference to foods). Adv. Food Res. 4: 153.
3. ARONOFF, S. e MACKINNEY, G. 1943. The photooxidation of chlorophyll. J. of Am. Chem. Soc. 65: 956.
4. CLYDESDALE, F.M.; FEISCHMAN, D.L.; FRANCIS, F.J. 1971. Maintenance of colour in processed green vegetables. Food Prod. Dev. 4(5): 127.
5. CLYDESDALE, F.M. e FRANCIS, F.J. 1968. Chlorophyll changes in termally processed spinach as influenced by enzyme conversion and pH adjustment. Food Technol. 22: 793.
6. COMAR, C.L. e ZSCHEILE, F.P. 1942. Analysis of plant extracts for chlorophyll a and b by a photoeletic spectrophotometric method. Plant Physiol. 17: 198.
7. DEVLIN, R.M. 1975. Chlorophyll. Em "Fisiologia Vegetal", Ed. Omega, Barcelona.
8. DIETRICH, W.C.; OLSON, R.L.; NUTTING, M.D. 1959. Time - temperature tolerance of frozen foods. XVIII. Effect of blanching condition on color stability of frozen beans. Food Technol. 13: 258.

9. DUTTON, H.J.; BAILEY, G.; KOHAKE, E. 1943. Dehydrated spinach. Changes in color and pigment during processing and storage. Ind. Eng. Chem. 35: 1173.
10. FALK, J. 1964. Porphyrins and metallo porphyrins; their general, physical and coordination chemistry and laboratory methods. Elsevier Publishing Company, Amsterdam.
11. FAO/WHO. 1975. Specifications for Identity and Purity of some Additives. WHO/FOOD/Add, Rome.
12. FISCHER, H. e STERN, A. 1940. "Die Cheme des Pyrrols". Citado em HUMPHREY, A.M. 1980. Chlorophyll. Food Chem. 5: 57.
13. FRASER, M.S. e FRANKL, G. 1985. Detection of chlorophyll derivatives in soybean oil by HPLC. J. Am. Oil Chem. Soc. 62(1): 113.
14. GUPTE, S.M. e FRANCIS, F.J. 1964. Effect of pH adjustment and high-temperature short-time processing on color and pigment retention in spinach purée. Food Technol. 18: 1645.
15. HAGIWARA, J. 1971. "Edible powder from unripe cereal grasses". Citado em FRANCIS, F.J. 1986. Handbook of food colorant potents. Food & Nutrition Press, Inc, Westport, U.S.A.

16. HAGIWARA, Y. 1972. "Preventing descoloration of chlorophyll extract on heating". Citado em FRANCIS, F.J. 1986. Hand book of food colorants patents. Food & Nutrition Press, Inc, Westport, U.S.A.
17. HEIKAL, H.A. e EL-MANAWATY, H. 1972. Effect of blanding and storage on the retention of chlorophyll and carotene in green beans. *Agric. Res. Rev.* 50(5): 225.
18. HOLDEN, M. 1976. Chlorophylls. Em "Chemistry and Biochemistry of plant pigments" (GOODWIN, T.W., ed.) Academic Press, London.
19. HUMPHREY, A.M. 1980. Chlorophyll. *Food Chem.* 5:57.
20. HYNINEN, P.H. 1979. Application of elution analysis the study of chlorophyll transformation by column chromatography on sucrose. *J. Chromatogr.* 175: 75.
21. HYNINEN, P.H. e ELLFOLK, N. 1973. Chlorophylls. I. Separation and isolation of chlorophyll a and b by multiple liquid-liquid partition. *Acta Chem. Scand.* 27: 1463.
22. JEFFREY, S.W. 1968. Quantitative thin-layer chromatography of chlorophyll and corotenoids from marine algae. *Biochim. biophys. Acta* 162: 271.
23. JONES, I.D.; BUTLER, L.S.; GIBBS, E.; WHITE, R.C. 1972. An evaluation of reversed phase partition for TLC identification of chlorophyll and derivatives. *J. Chromatogr.* 70: 87.

24. JONES, C.E. e MACKAY, R.A. 1978. Reactions in microemulsions. 3. Photodegradation of chlorophyll. J. Phys. Chem. 82(1): 63.
25. JONES, I.D.; WHITE, R.C.; GIBBS, E.; DENARD, C.D. 1968. Absorption Spectra of copper and zinc complexes of pheophytins and pheophorbides. J. Agric. Food Chem. 16(1): 80.
26. KASPERSKAYA, T.V. e SEMENOVA, N.P. 1970. "Green food color from vegetable raw material". Citado em FRANCIS, F. J. 1986. Handbook of food colorants patents. Food & Nutrition Press, Inc., Westport, U.S.A.
27. KEARSLEY, M.W. e KATSABOXAKIS, K.Z. 1981. Stability and use of natural colours in foods. Red beet powder, copper chlorophyll powder and cochineal. J. Food Technol. 15(5): 501.
28. LAJOLLO, F.; TANNENBAUM, S.R.; LABUZA, T.P. 1971. Reaction at limited water concentration. 2. Chlorophyll degradation. J. Food Sci. 36: 850.
29. MACKINNEY, G. e LITTLE, A.C. 1962. "Color of foods". Citado em CLYDESDALE, F.M.; FEISCHMAN, D.L.; FRANCIS, F. J. 1971. Maintenance of color in processed green vegetables. Food Prod. Dev. 4(5): 127.
30. MACKINNEY, G. e JOSLYN, M.A. 1940. The conversion of chlorophyll to pheophytin. J. Am. Chem. Soc. 62: 231.

31. PEISER, G.D. e YANG, S.F. 1978. Chlorophyll destruction in the presence of bisulfite and linoleic acid hydroperoxide. *Phytochem.*
32. SCHANDERL, S.H.; MARSH, G.L.; CHICHESTER, C.O. 1962. Color reversion in processed vegetables. I. Studies on regreened pea purees. *J. Food Sci.* 27: 312.
33. SCHANDERL, S.H.; MARSH, G.L.; CHICHESTER, C.O. 1962. Color reversion in processed vegetables. II. Model system studies. *J. Food Sci.* 27: 317.
34. SCHWARTZ, S.J.; WOO, S.L.; VON ELBE, J.H. 1981. High performance liquid chromatography of chlorophylls and their derivatives in fresh and processed spinach. *J. of Agric. Food Chem.* 29: 533.
35. SESTAK, Z. 1982. TLC of chlorophylls. *Photosyn.* 16(4): 568.
36. SIEVERS, G. e HYNINEN, P.H. 1977. Thin-layer chromatography of chlorophylls and their derivatives on cellulose layers. *J. Chromatogr.* 134: 359.
37. STRAIN, H.H. 1954. Chlorophylls reactions- Oxidation and Isomerization reactions of the chlorophylls in killed leaves. *Agric. Food Chem.* 2(24): 1222.
38. STRAIN, H.H.; SHERMA, J.; GRANDOLFO, M. 1967. Alterations of chloroplasts pigments by chromatography with siliceous adsorbents. *Anal. Chem.* 39(8): 926.

39. SWEENEY, J.P. e MARTIN, M. 1958. Determination of chlorophyll and pheophytin in broccoli heated by various procedures. Food. Res. 23: 635.
40. TAN, C.T. e FRANCIS, F.J. 1962. Effect of processing temperature on pigments and color of spinach. J. Food. Sci. 27: 232.
41. UUS, E.; SIIRDE, E.; KAPTEN, V.; KEEROV, I.A.; PIKKOV, L.M.; TEARO, E. 1972. Citado em FRANCIS, F.J. 1986. Handbook of food colorants patents. Food & Nutrition Press, Inc., Westport, U.S.A.
42. VERNON, L.P. 1960. Spectrophotometric determination of chlorophylls and pheophytins in plant extracts. Anal. Chem. 32(9): 1144.
43. VOGEL, A.I. 1970. A textbook of practical organic chemistry, including qualitative organic analysis, 3th. ed., Longman, London.
44. VOGEL, A.I. 1951. A textbook of qualitative chemical analysis, including qualitative analysis, 3th. ed., Longmans and Green, London.
45. WALKER, G.C. 1964. Color deterioration in frozen French beans (*Phaseolus vulgaris*). 2. The effect of blanching. J. Food Sci. 29: 389.

46. WATSON, R. e TOM, T.B. 1949. Relation of structure and effectiveness in copper deactivators. Ind. Eng. Chem. 41 (5): 918.
47. WESTCOTT, D.E.; LIVINGSTON, G.E.; ESSELEN, W.B.; FELLERS, C. R. 1955. Nonenzymatic discoloration of green bean purée. Food Res. 20: 149.
48. WHITE, R.C.; JONES, I.D.; GIBBS, E. 1963. Determination of chlorophylls, chlorophyllides, pheophytins, and pheophorbides in plant material. J. Food Sci. 28: 431.
49. WHITE, R.C.; JONES, I.D.; GIBBS, E.; BUTLER, L.S. 1977. Estimation of copper pheophytins, chlorophylls, and pheophytins in mixtures in diethyl ether. J. Agric. Food Chem. 25(1): 143.
50. WILLSTATER, R. e STOLL, A. 1913. "Investigations on chlorophyll". Citado em HUMPHREY, A.M. 1980. Chlorophyll. Food Chem. 5:57.
51. WOOSTER, H.A. e BLANCK, F.C. 1950. Nutricional Data. Heinz, A. J. Company, Pennsylvania, U.S.A.

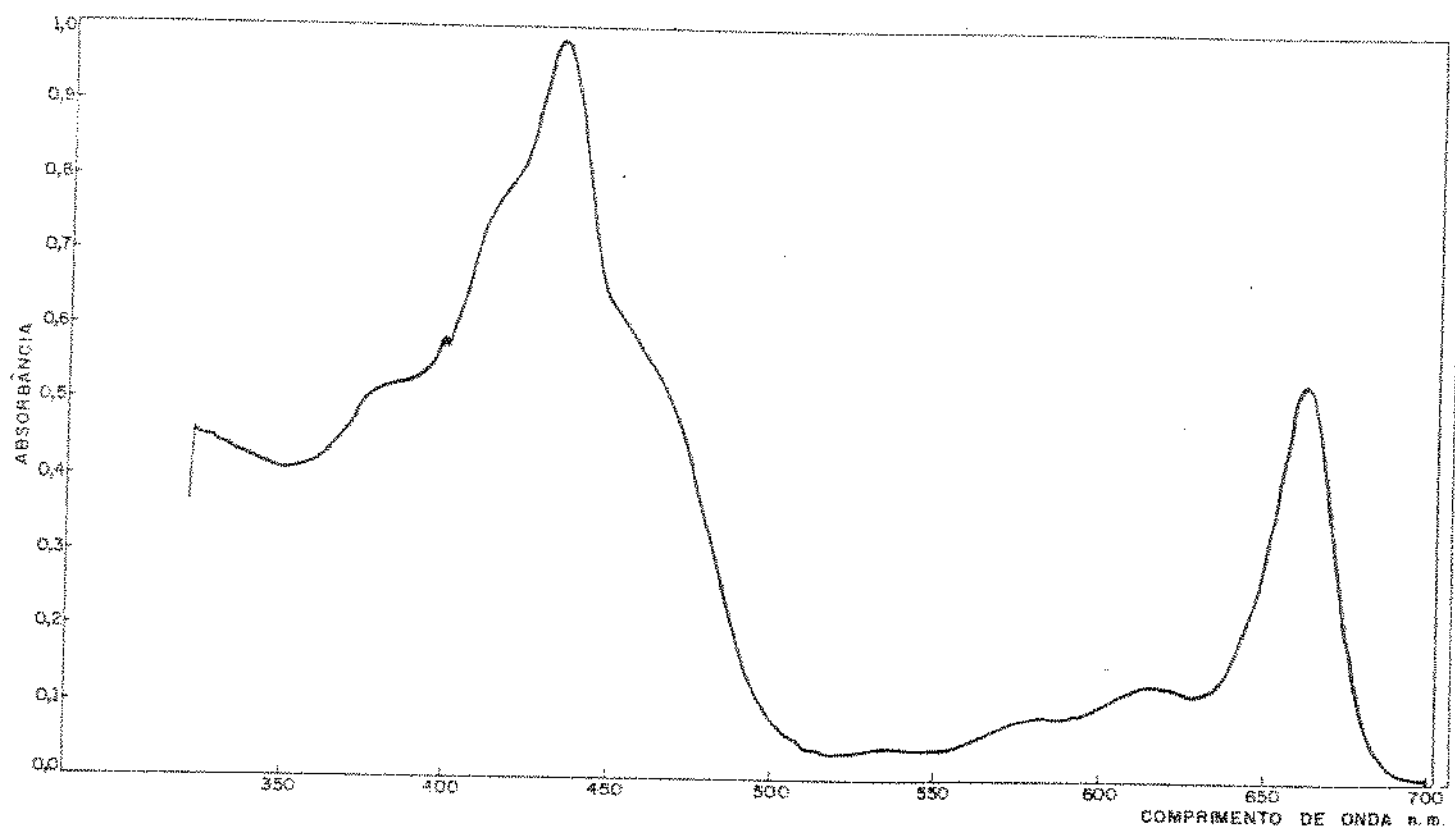


Figura 7 - Espectro do extrato acetônico de folhas de espinafre em acetona 80% (espectro 1).

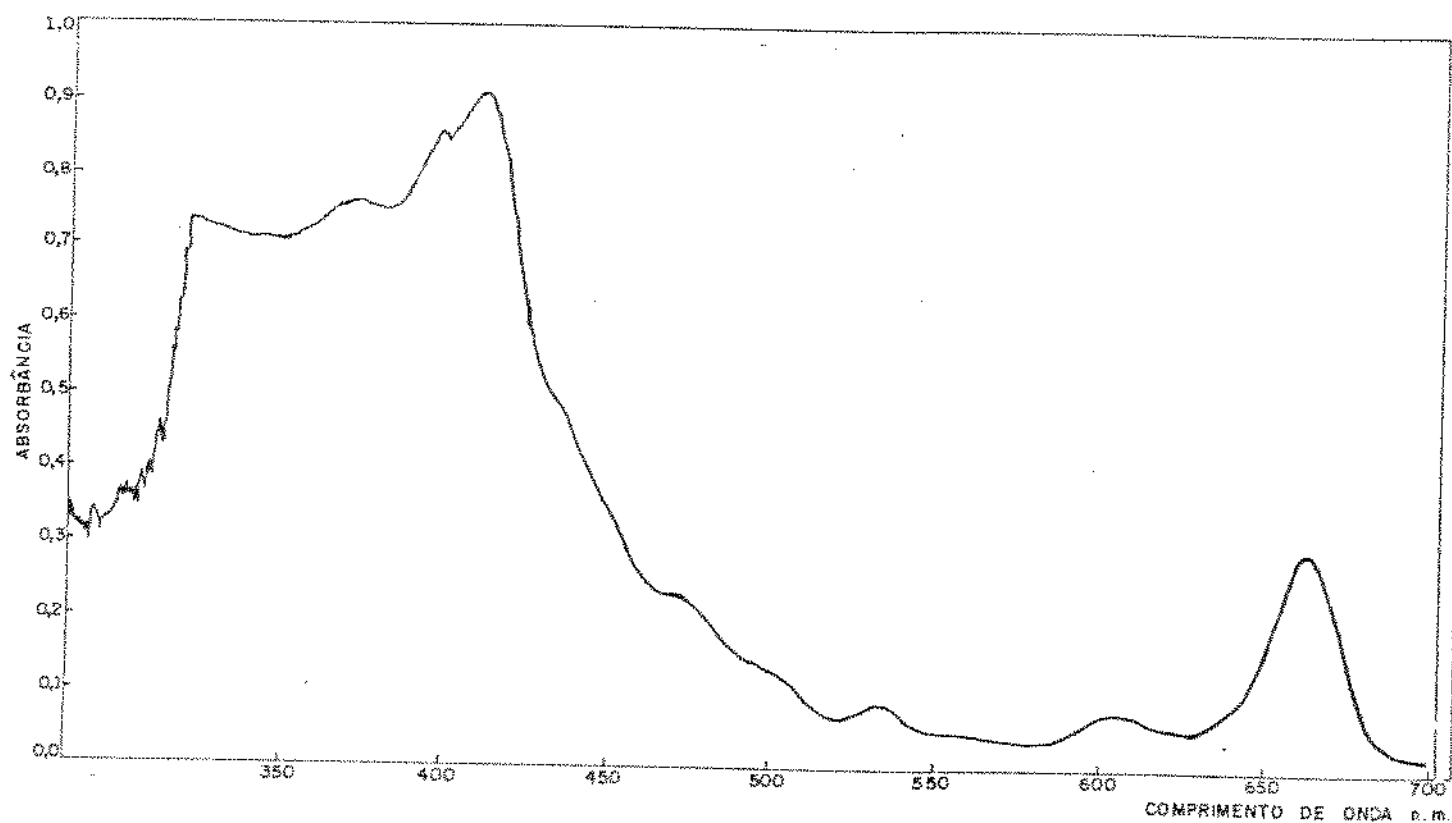


Figura 8 - Espectro do extrato clorofórmico das folhas de Estevia rebaudiana em acetona 80% (espectro 2).

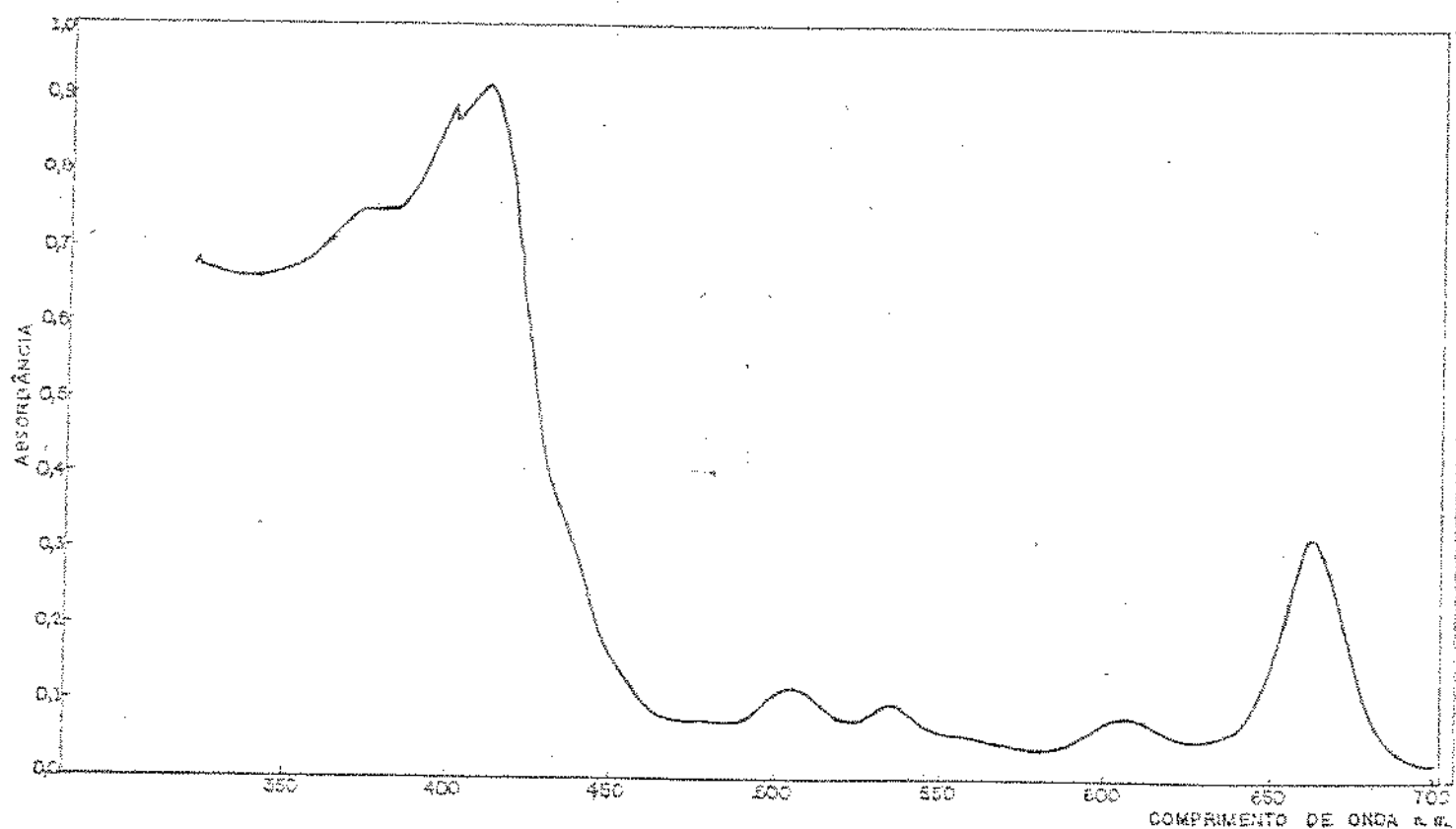


Figura 9 - Espectro da feofitina, após acidulação, em acetona 80%.
(espectro 3).

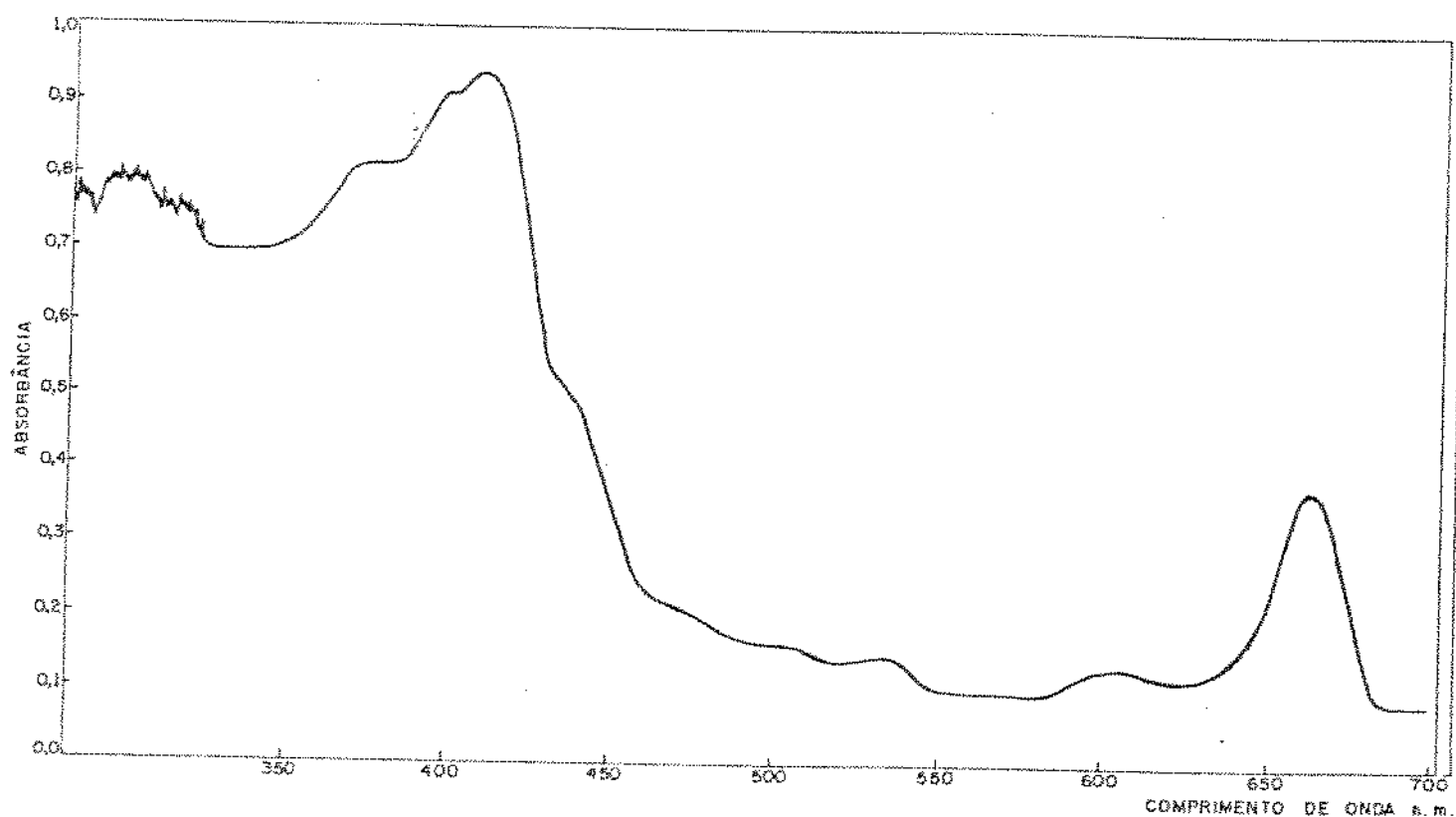


Figura 10 - Espectro da feofitina, após acidulação, em n-propanol.
(espectro 4).

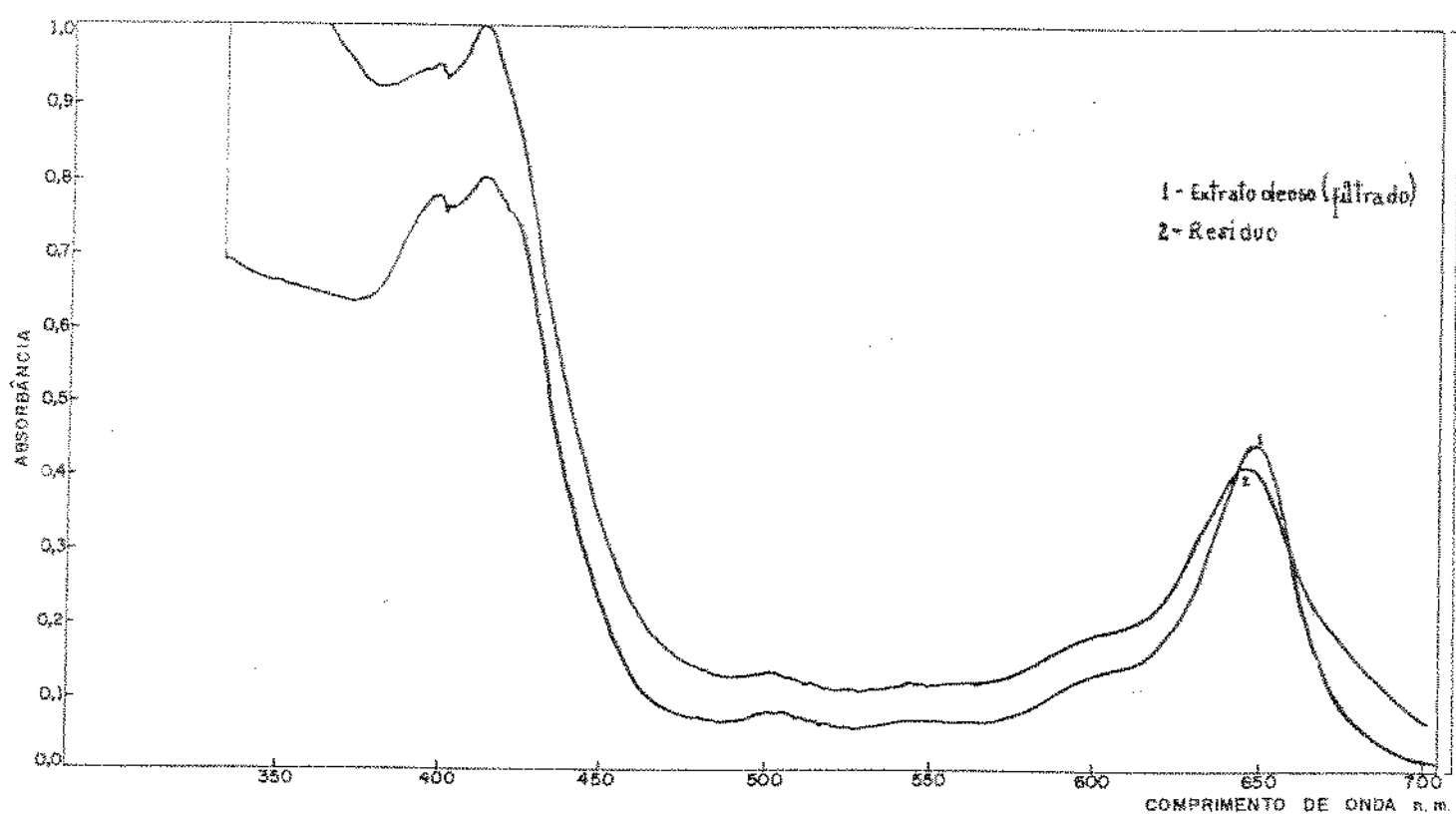
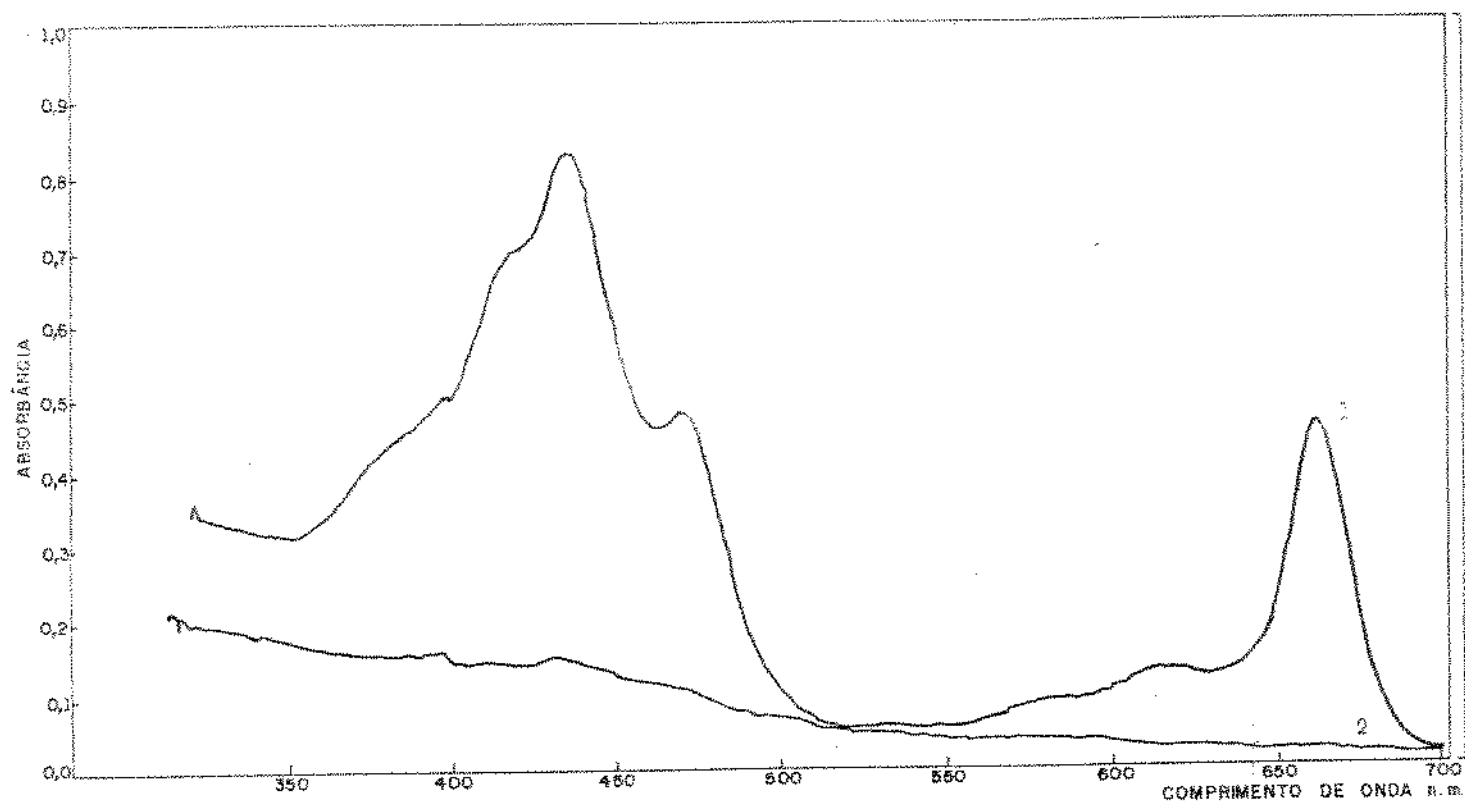


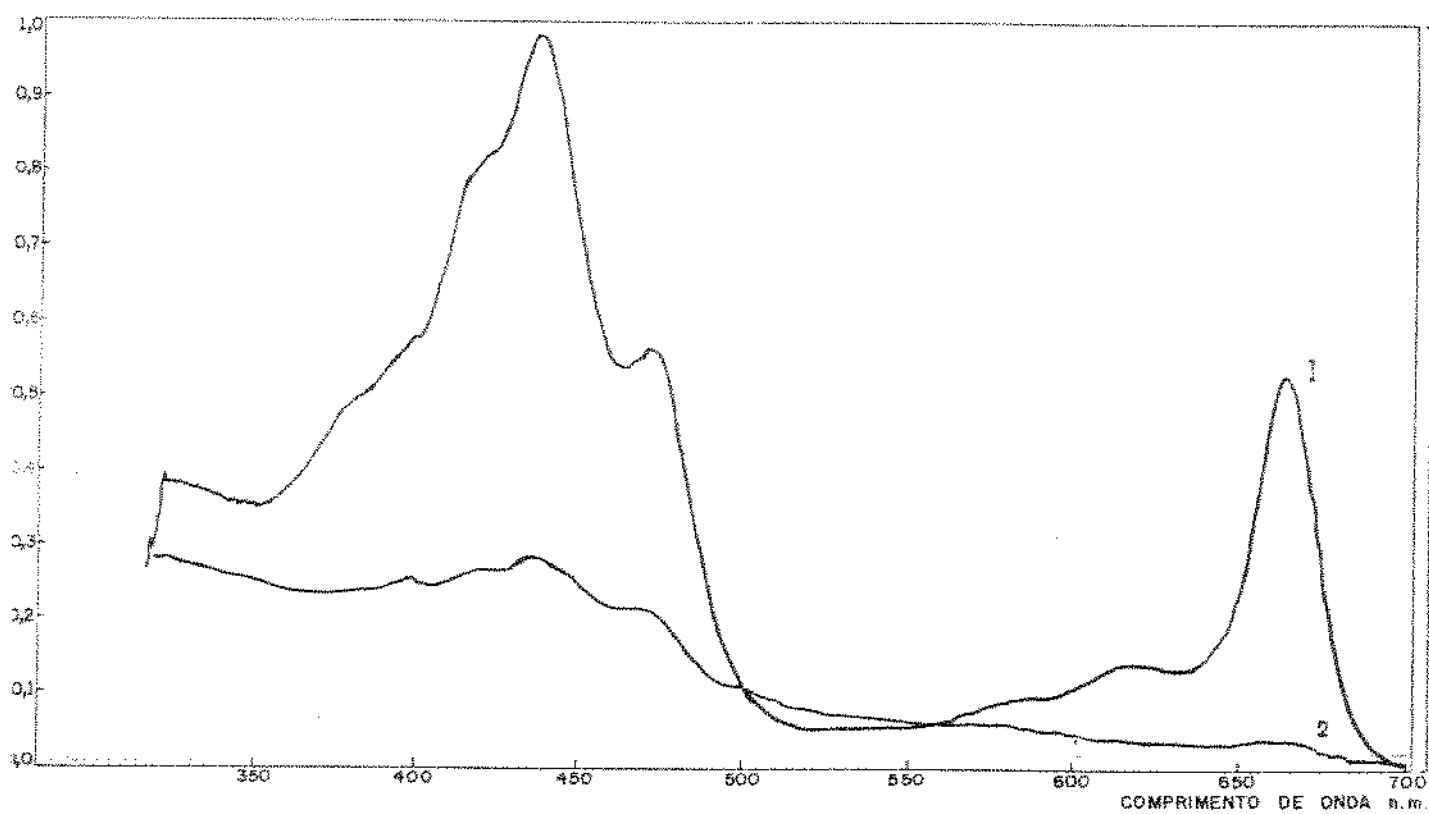
Figura 11 - Espectro do resíduo sólido e do extrato oleoso de clorofila cúprica em acetona 80% (espectro 5).



Curva 1 - 0 horas de reação

Curva 2 - 45 horas de reação

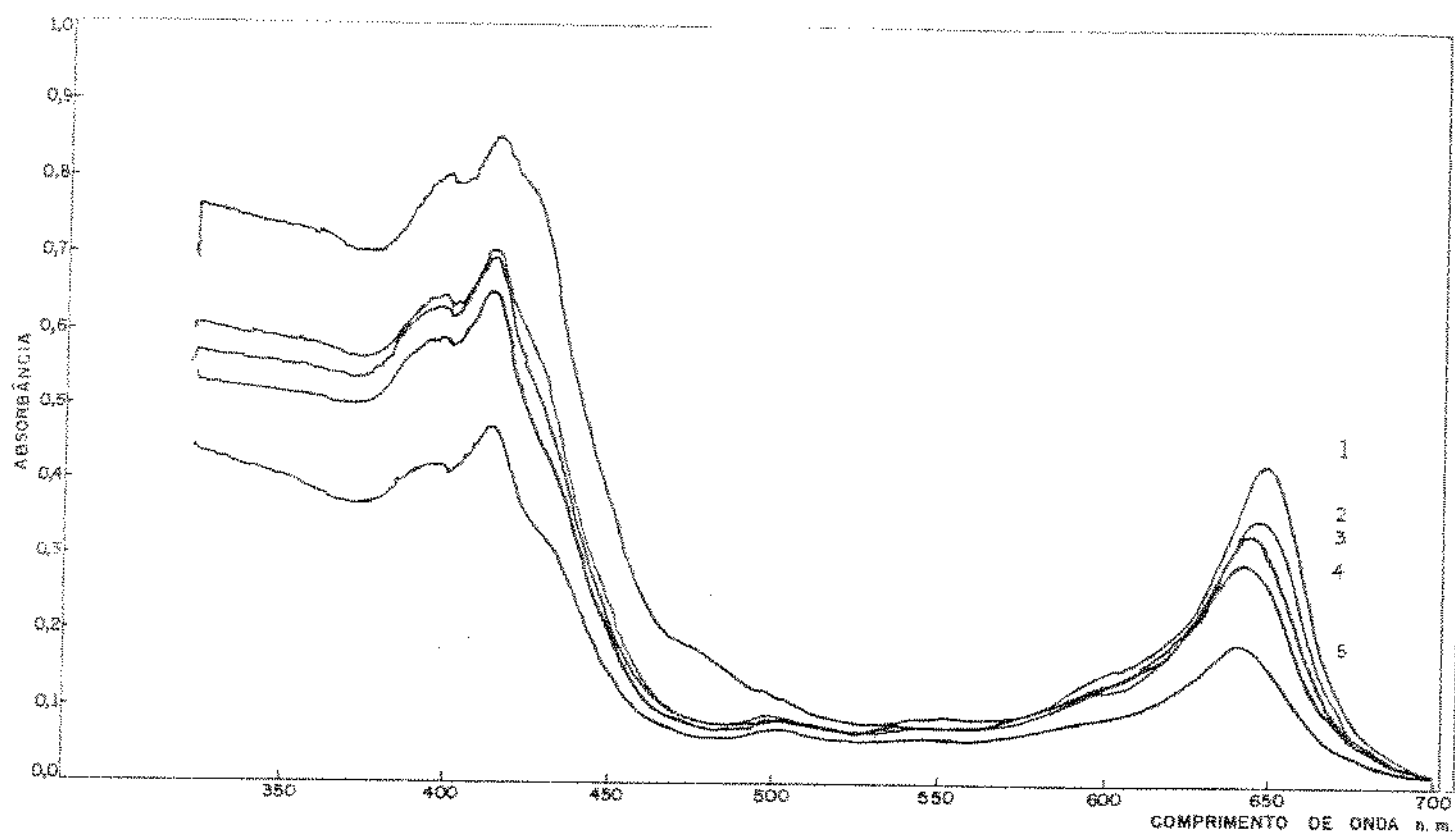
Figura 12 - Espectro do sistema Clorofila magnesiânica/Oxigênio/
Luz, em n-propanol (espectro 6).



Curva 1 - 0 horas de reação

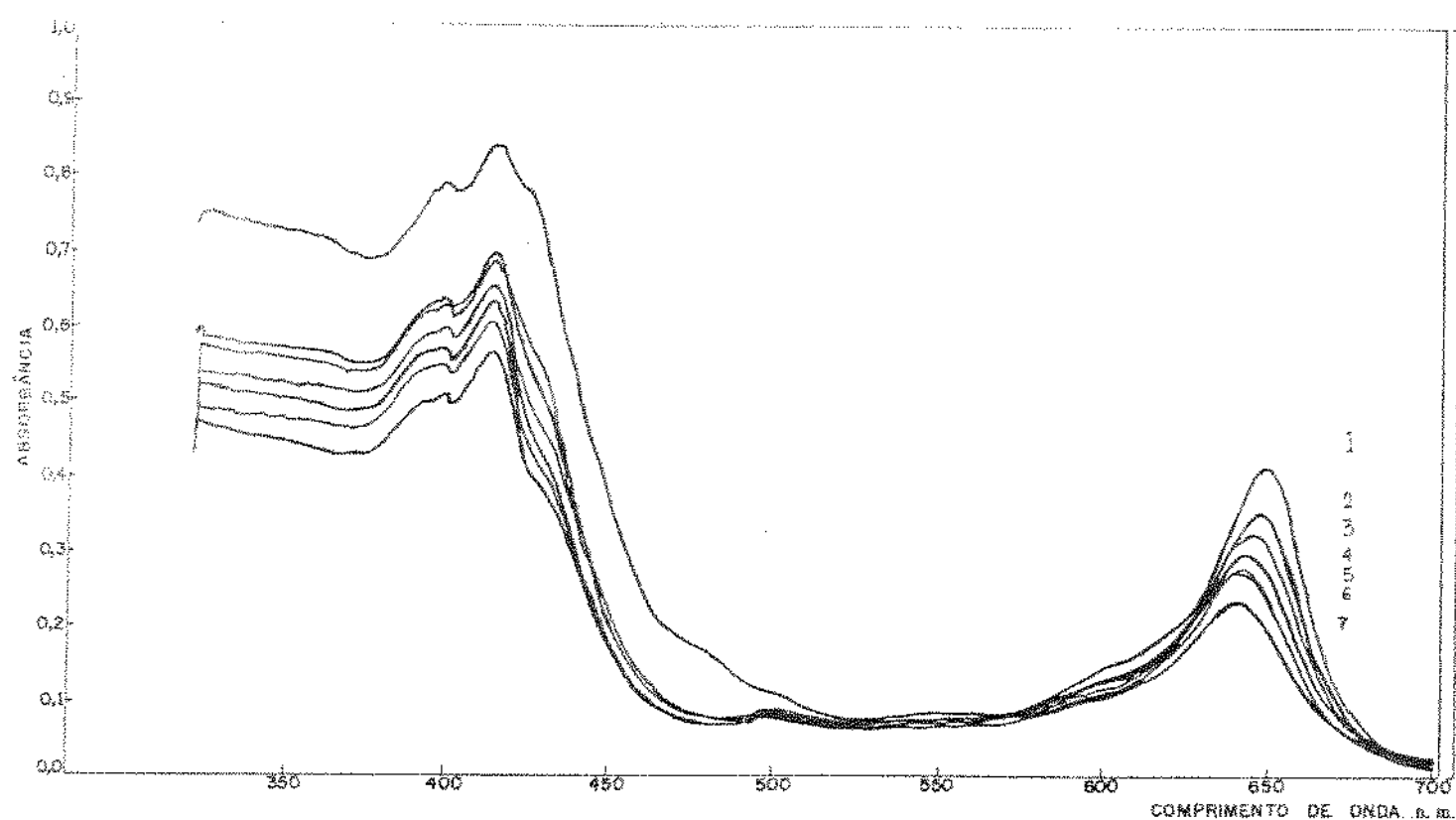
Curva 2 - 25 horas de reação

Figura 13 - Espectro do sistema Clorofila magnesiânica/Atmosfera inerte/Luz, em n-propanol (espectro 7).



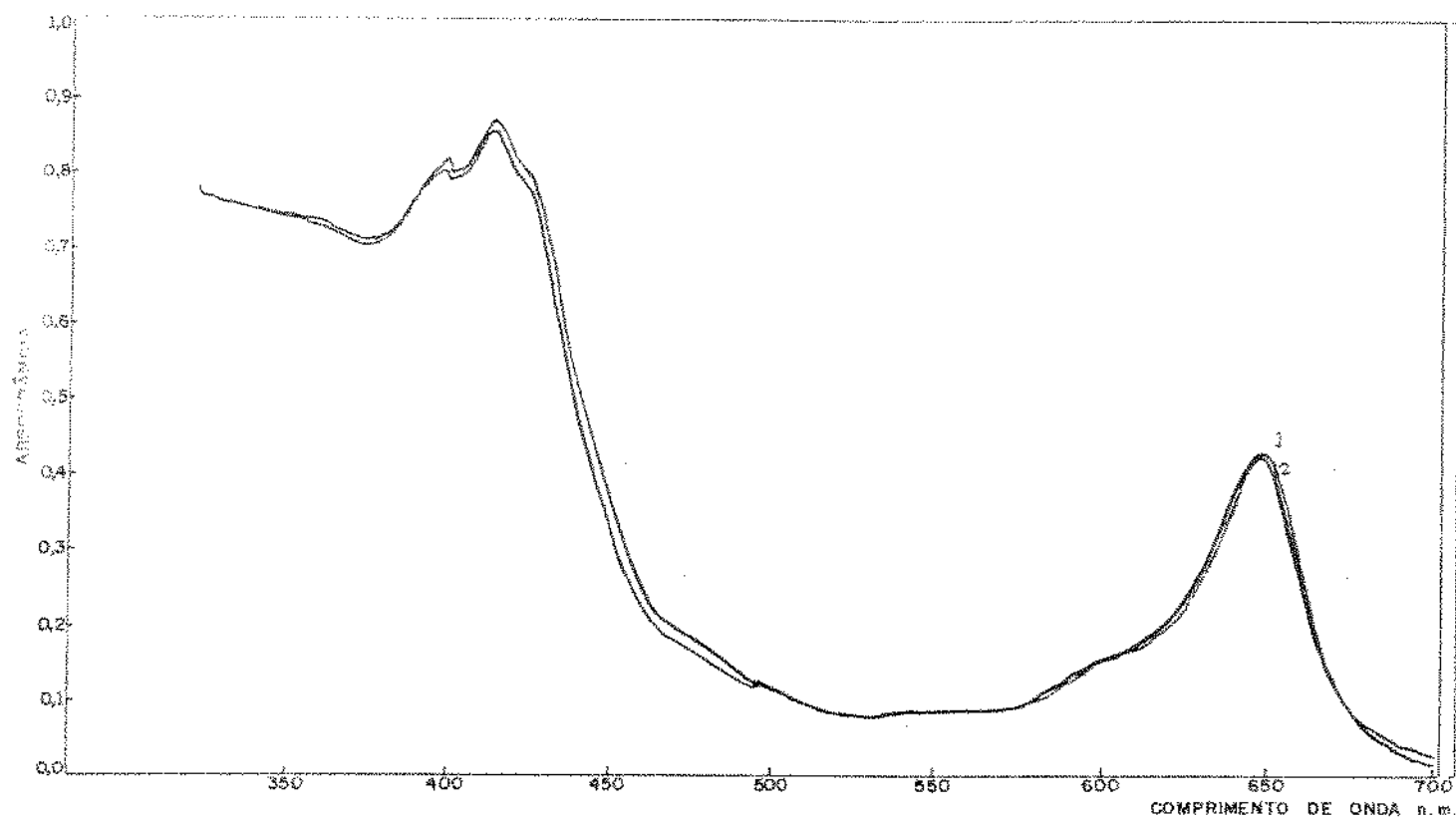
Curva 1 - 0 horas de reação
Curva 2 - 165 horas de reação
Curva 3 - 280 horas de reação
Curva 4 - 480 horas de reação
Curva 5 - 800 horas de reação

Figura 14 - Espectro do sistema clorofila cúprica/Oxigênio/
Luz, em n-propanol (espectro 8).



Curva 1 - 0 horas de reação
 Curva 2 - 100 horas de reação
 Curva 3 - 215 horas de reação
 Curva 4 - 320 horas de reação
 Curva 5 - 420 horas de reação
 Curva 6 - 560 horas de reação
 Curva 7 - 785 horas de reação

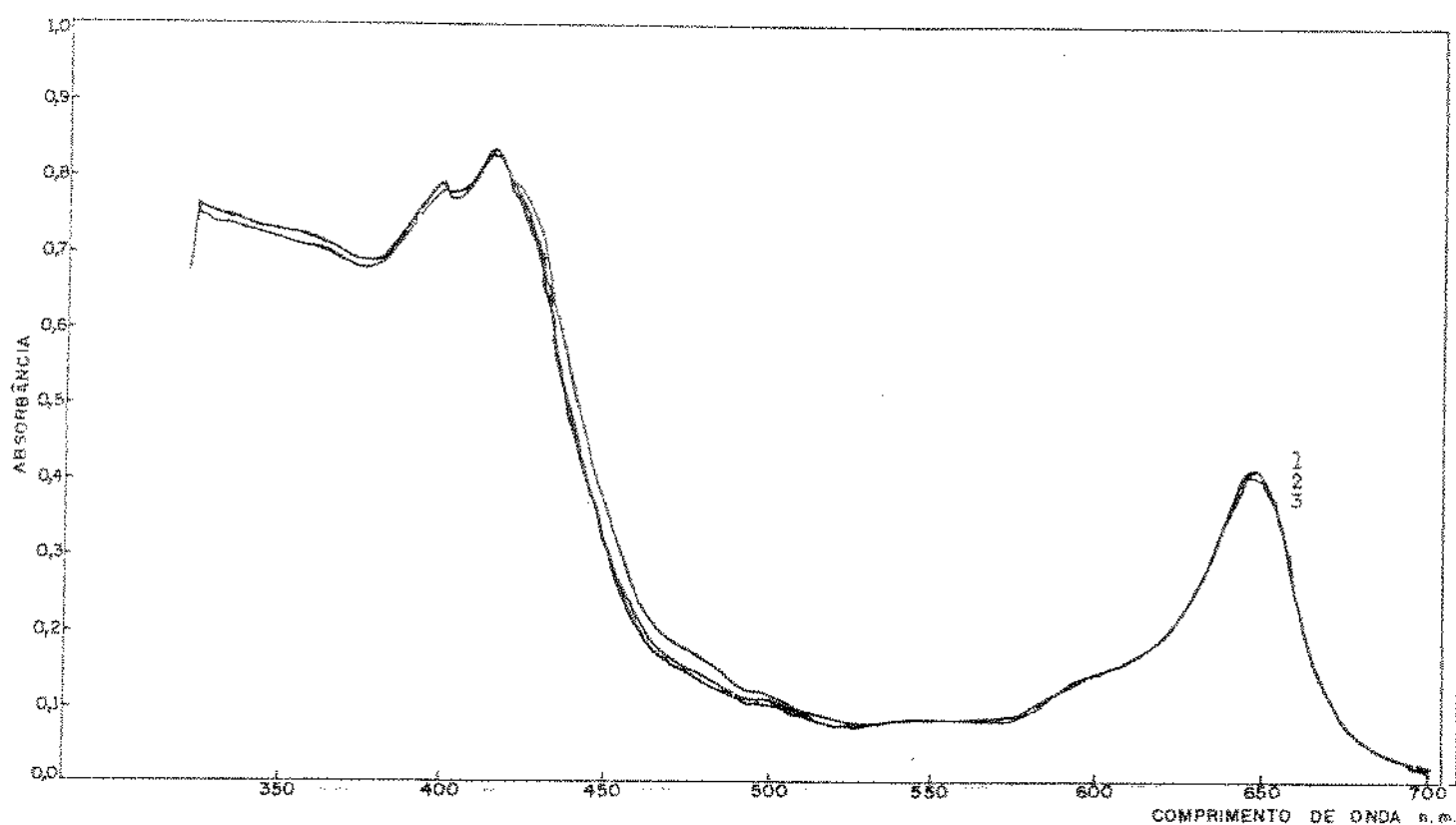
Figura 15 - Espectro do sistema Clorofila cúprica/Atmosfera inerte/Luz, em n-propanol (espectro 9).



Curva 1 - 0 horas de reação

Curva 2 - 800 horas de reação

Figura 16 - Espectro do sistema Clorofila cúprica/Oxigênio/
Escuro, em n-propanol (espectro 10).

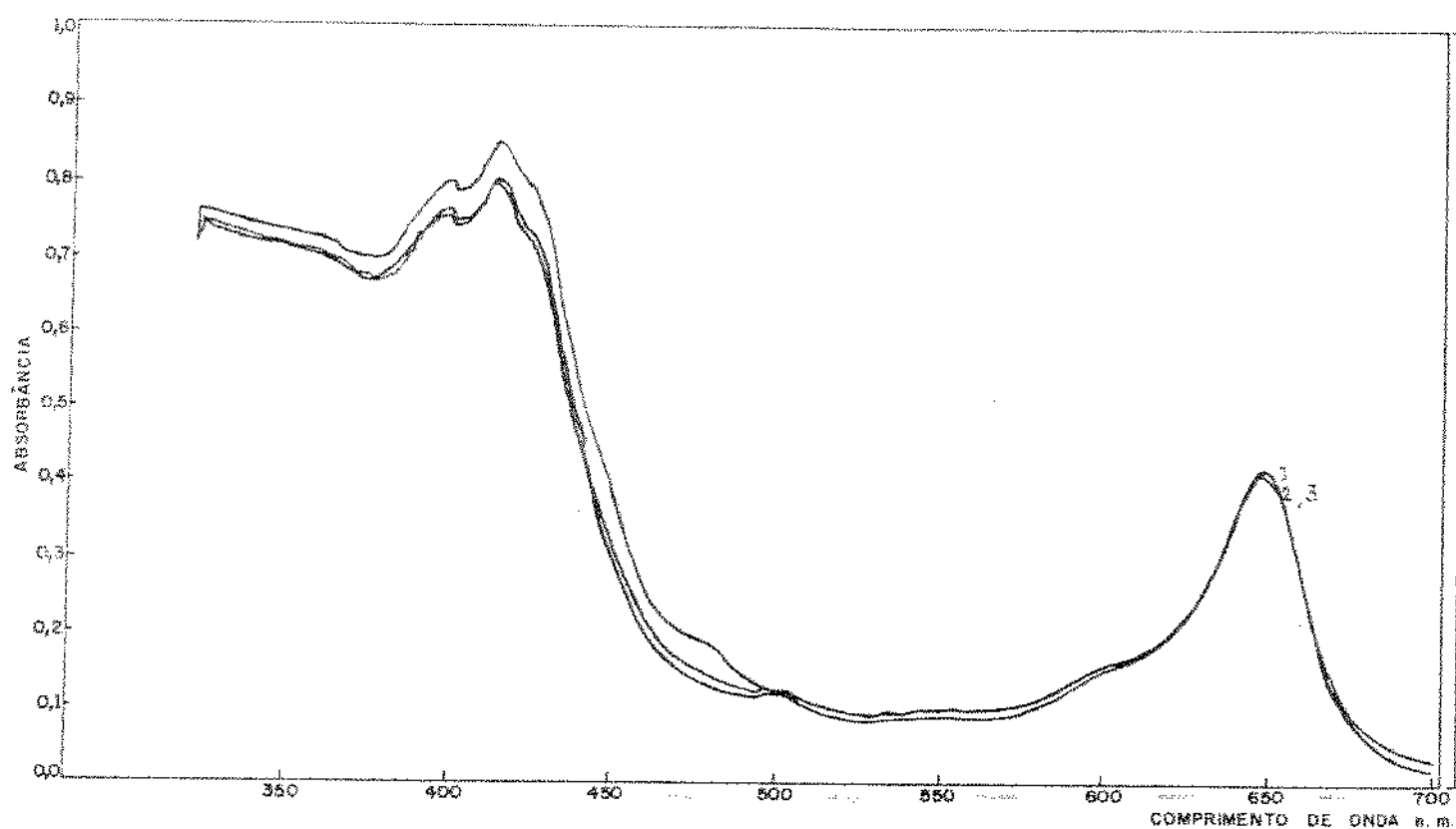


Curva 1 - 0 horas de reação

Curva 2 - 335 horas de reação

Curva 3 - 880 horas de reação

Figura 17 - Espectro do sistema Clorofila cúprica/Bissulfito de sódio 100 ppm/Atmosfera inerte/Escuro, em n-propanol (espectro 11).

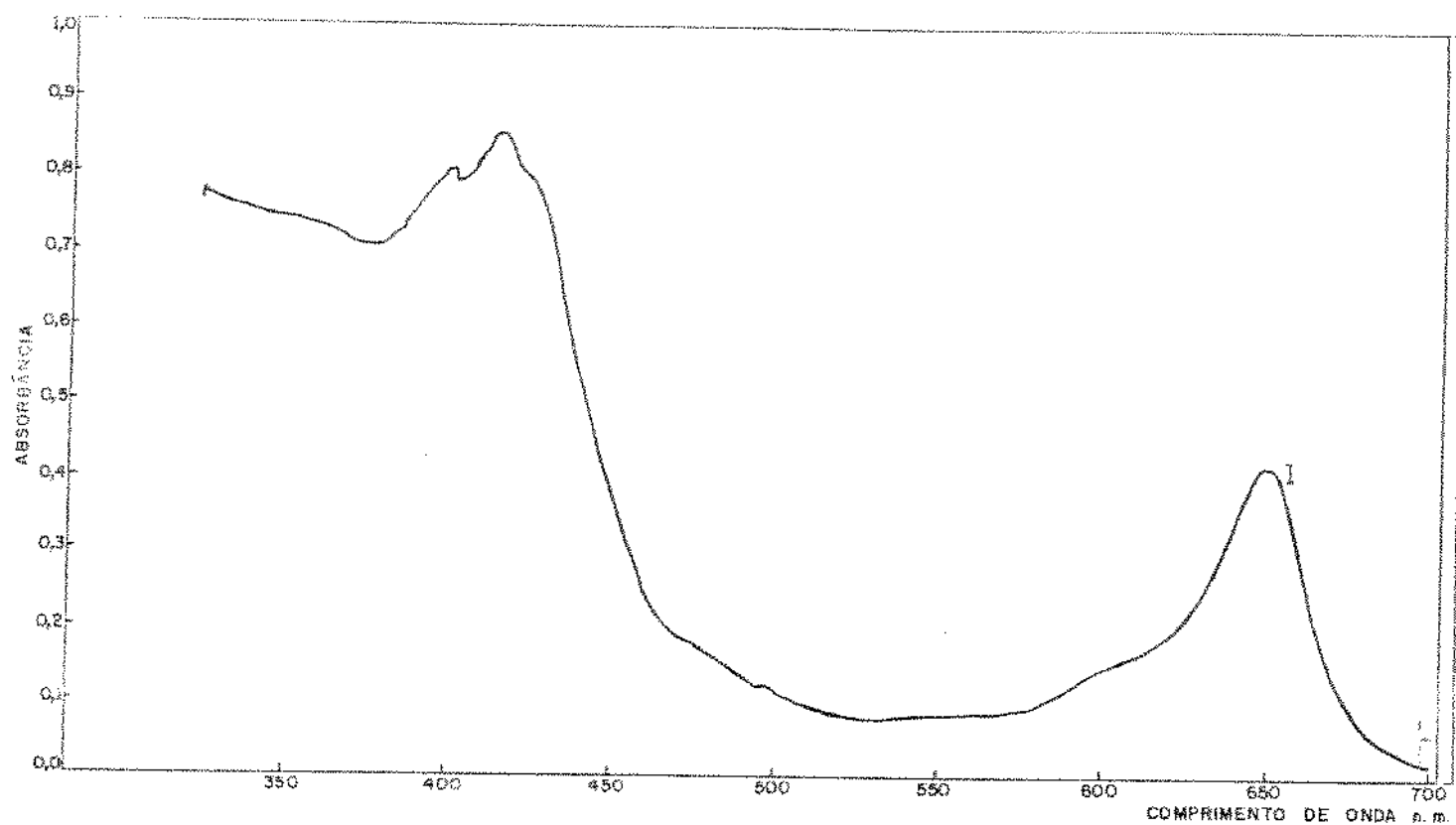


Curva 1 - 0 horas de reação

Curva 2 - 360 horas de reação

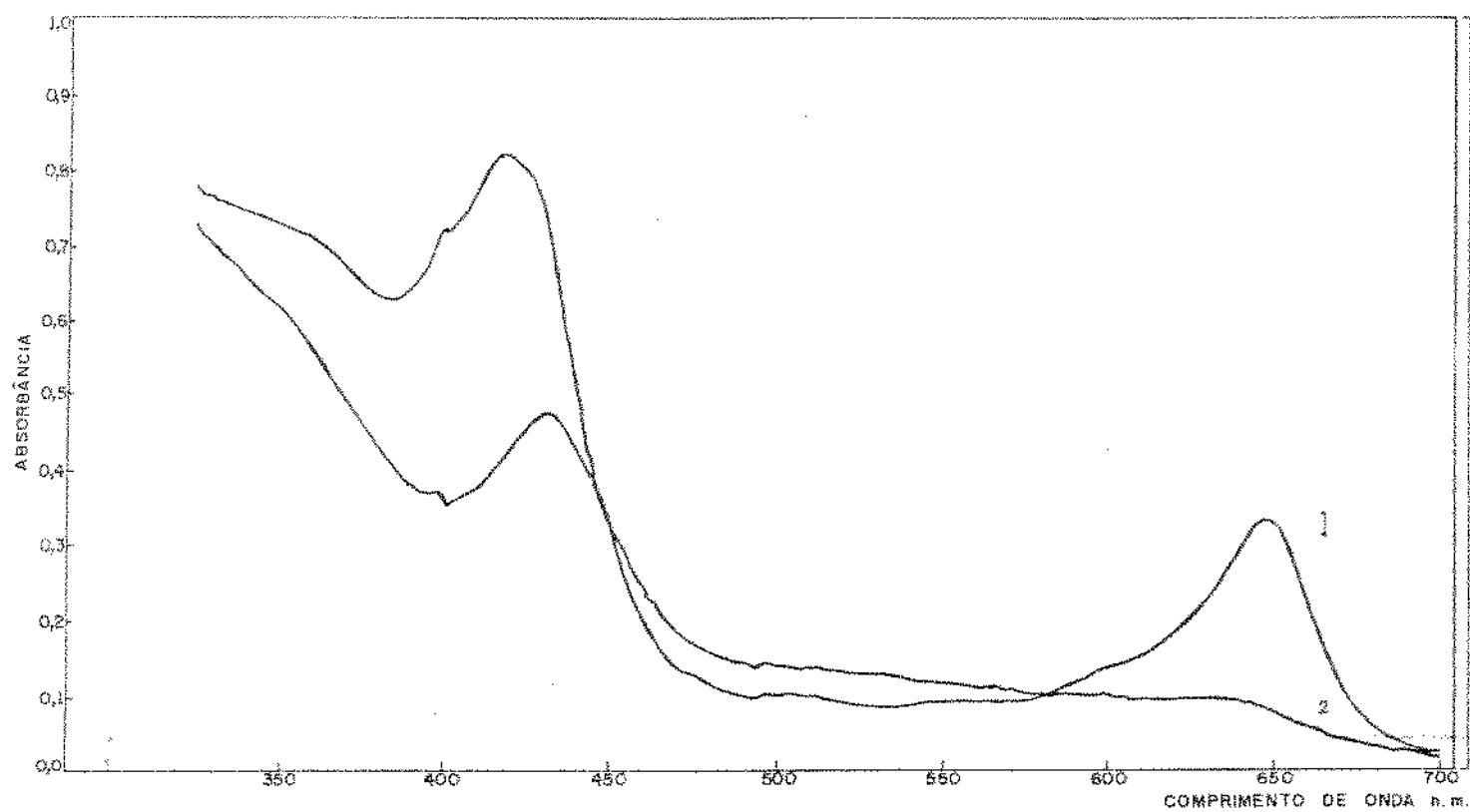
Curva 3 - 720 horas de reação

Figura 18 - Espectro do sistema Clorofila cúprica/Bissulfito de sódio 200 ppm/Atmosfera inerte/Escuro, em n-propanol (espectro 12).



Curva 1 - 0 e 750 horas de reação

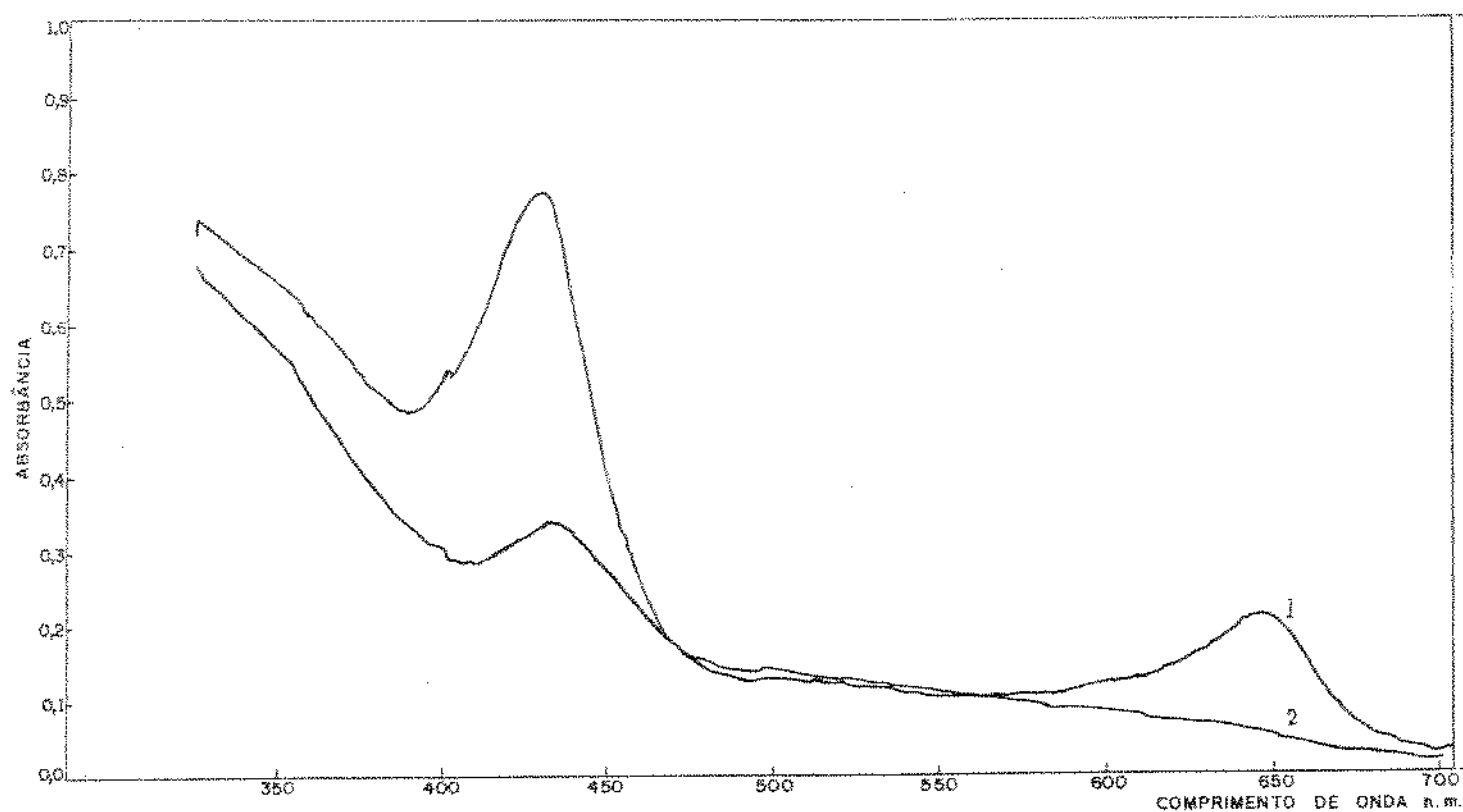
Figura 19 - Espectro do sistema Clorofila cúprica/Bissulfito de sódio 500 ppm/Atmosfera inerte/Escuro, em n-propanol (espectro 13).



Curva 1 - 0 horas de reação

Curva 2 - 24 horas de reação

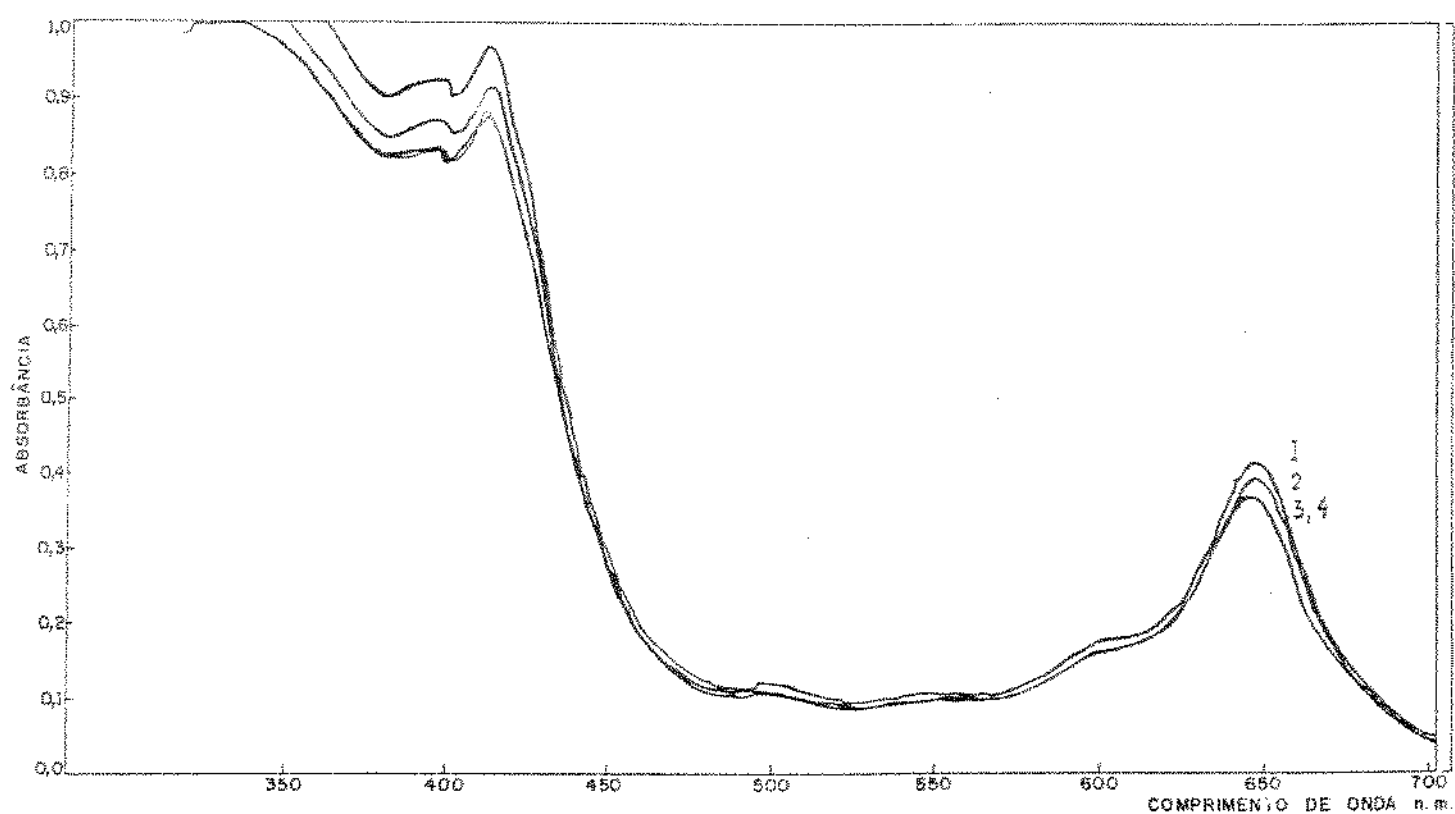
Figura 20 - Espectro do sistema Clorofila cúprica/Peróxido de benzoíla 250 ppm/Oxigênio/Escuro, em n-propanol (espectro 14).



Curva 1 - 0 horas de reação

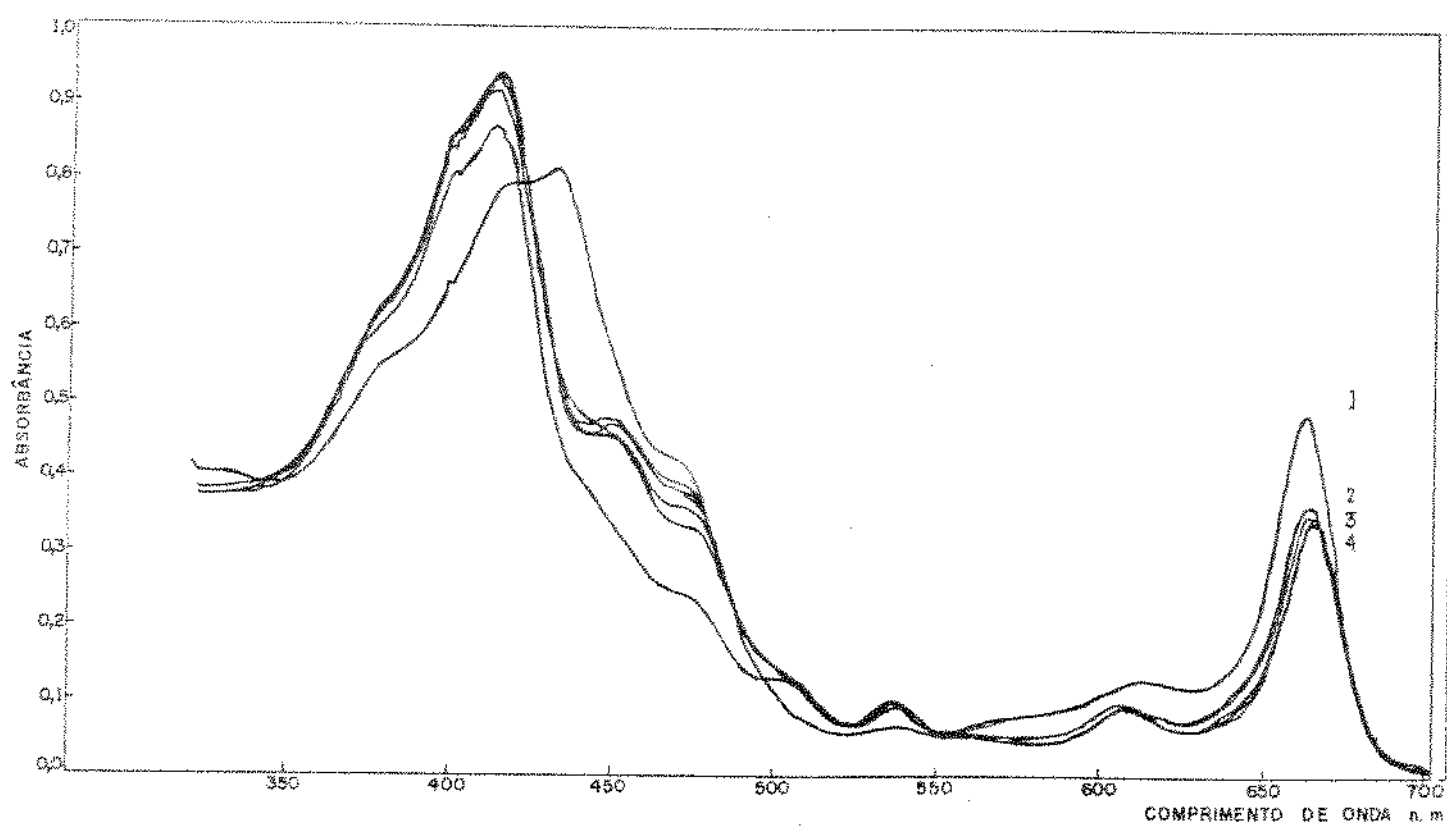
Curva 2 - 24 horas de reação

Figura 21 - Espectro do sistema Clorofila cúprica/Peróxido de benzoíla 500 ppm/Oxigênio/Escuro, em n-propanol (espectro 15).



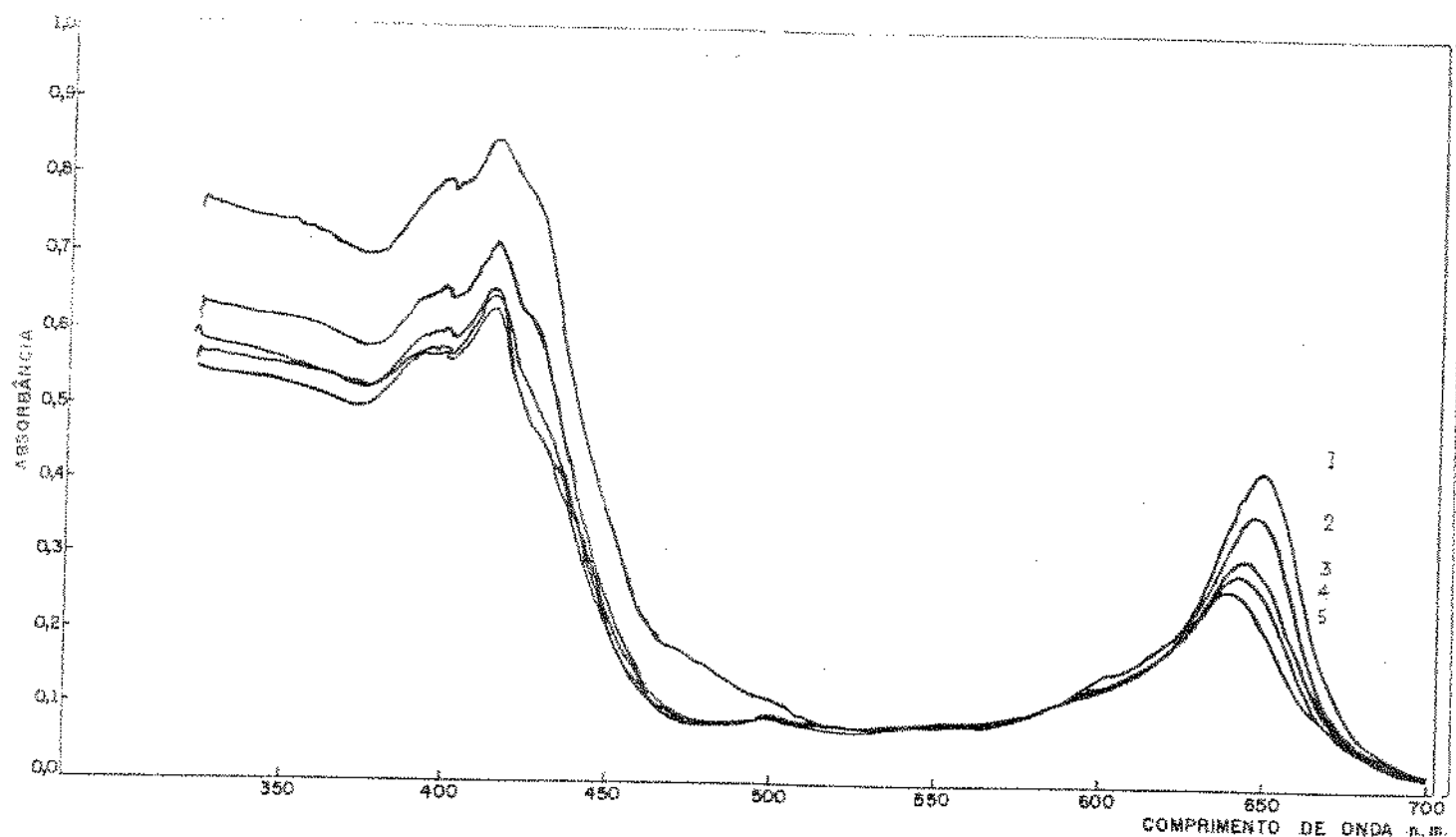
Curva 1 - 0 horas de reação
Curva 2 - 215 horas de reação
Curva 3 - 455 horas de reação
Curva 4 - 695 horas de reação

Figura 22 - Espectro do sistema Clorofila cúprica/Meio ácido/
Oxigênio/Escuro (espectro 16).



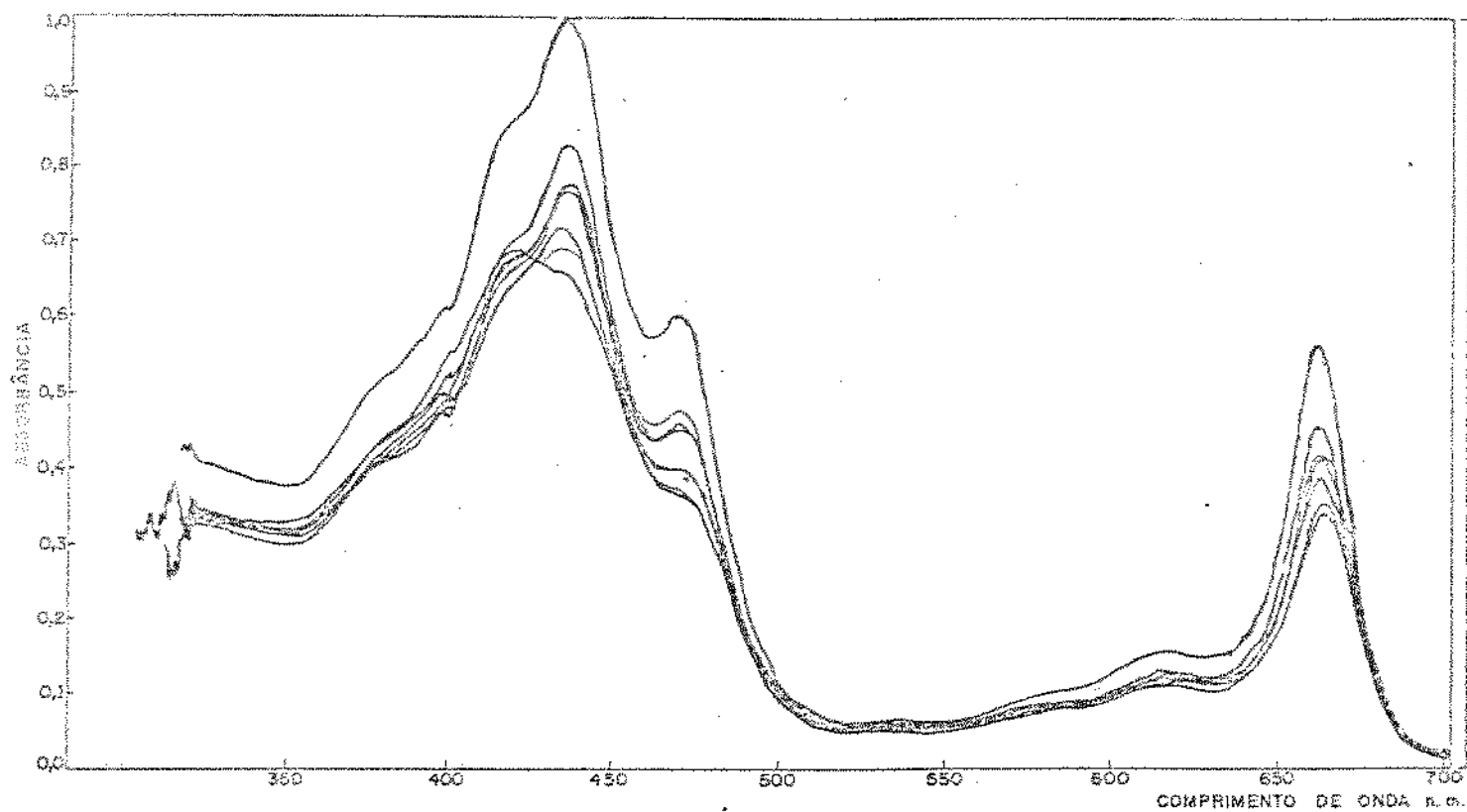
- Curva 1 - 0 horas de reação
- Curva 2 - 50 horas de reação
- Curva 3 - 420 horas de reação
- Curva 4 - 200 e 440 horas de reação
- Curva 5 - 635 e 850 horas de reação

Figura 23 - Espectro do sistema Clorofila magnesiânica/Meio ácido/Oxigênio/Escuro, em n-propanol (espectro 17).



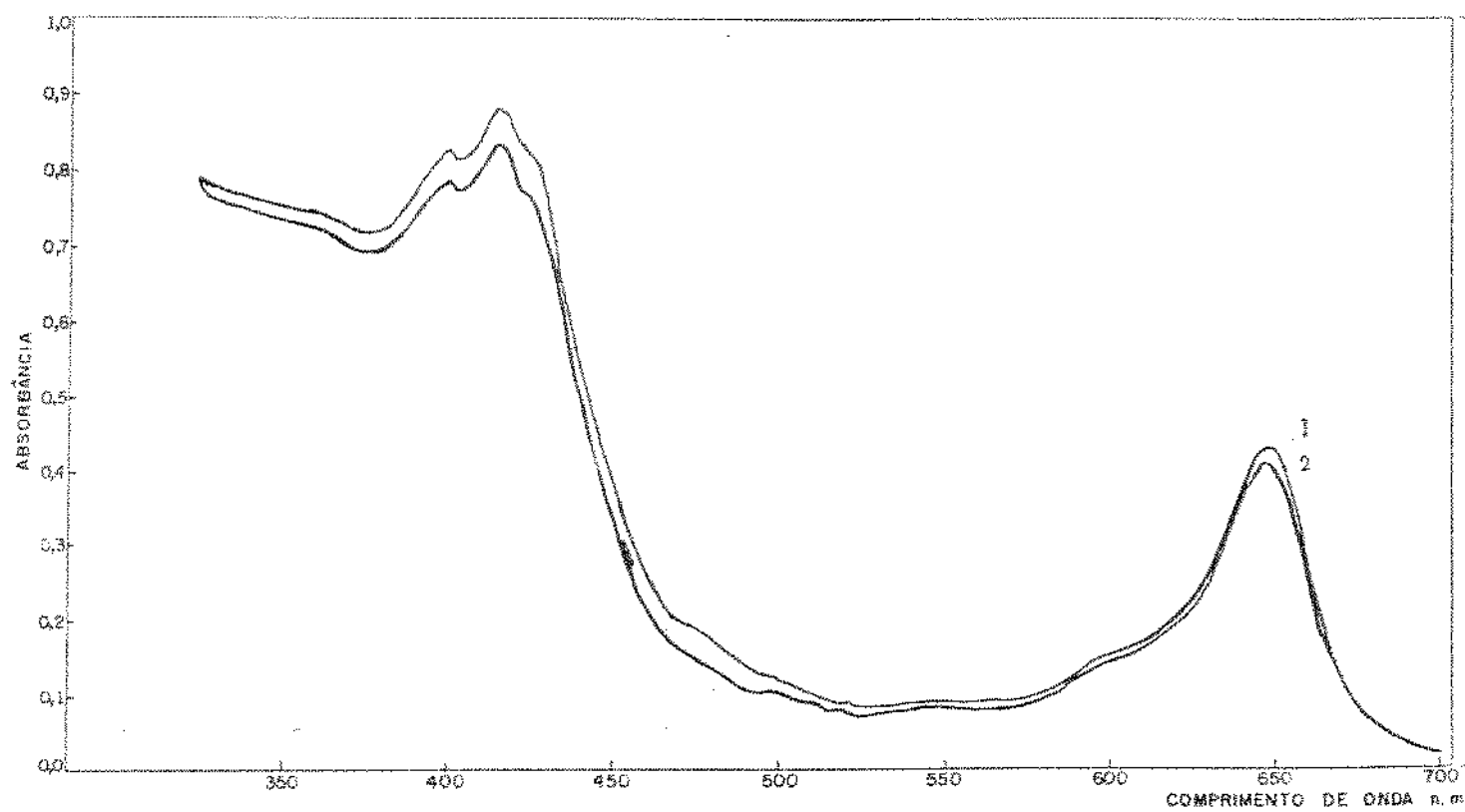
Curva 1 - 0 horas de reação
Curva 2 - 75 horas de reação
Curva 3 - 280 horas de reação
Curva 4 - 450 horas de reação
Curva 5 - 830 horas de reação

Figura 24 - Espectro do sistema Clorofila cúprica/Meio ácido/Oxigênio/Luz, em n-propanol (espectro 18).



Curva 1 - 0 horas de reação
Curva 2 - 45 horas de reação
Curva 3 - 120 horas de reação
Curva 4 - 180 horas de reação
Curva 5 - 450 horas de reação
Curva 6 - 645 horas de reação
Curva 7 - 860 horas de reação

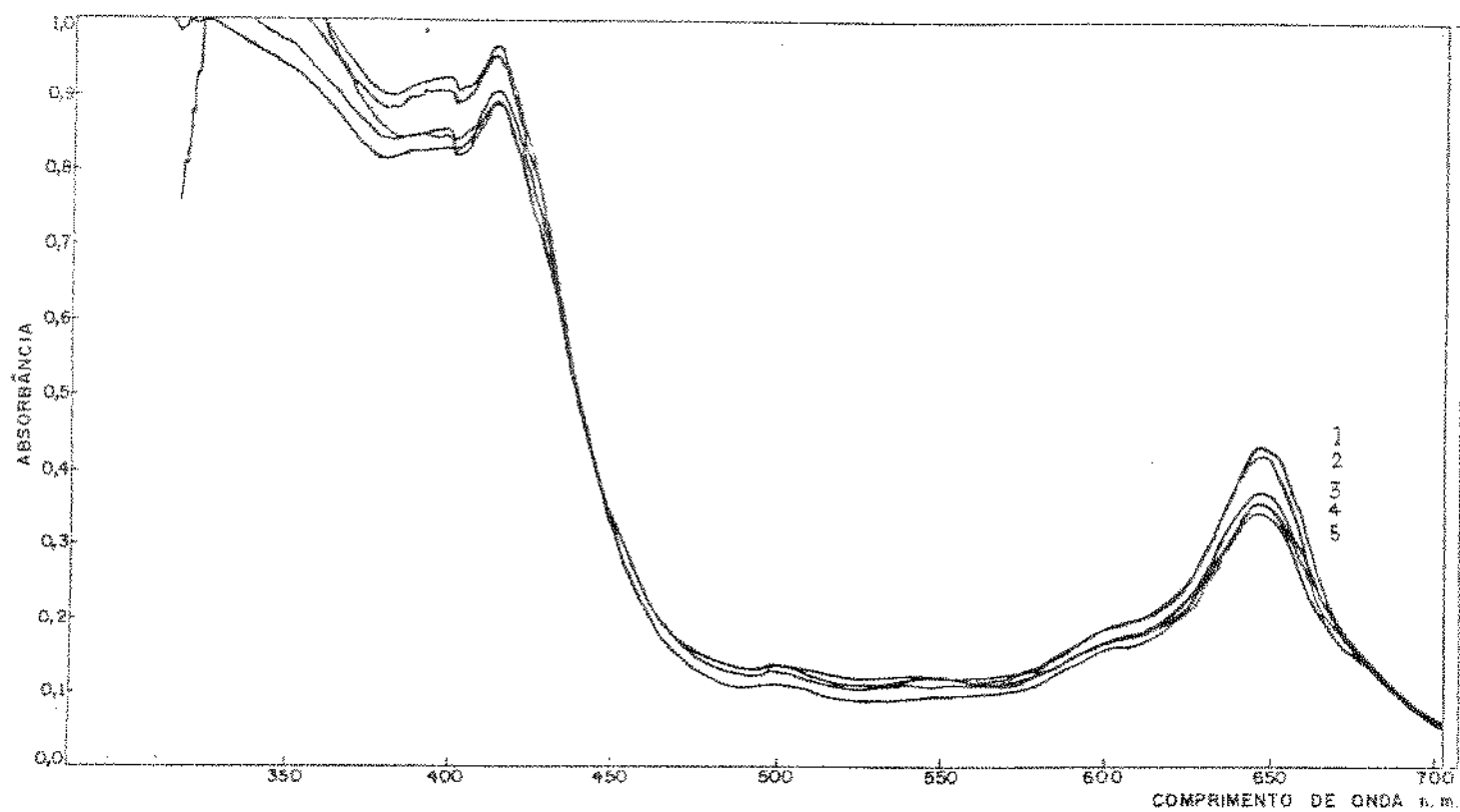
Figura 25 - Espectro do sistema Clorofila magnesiana/Aquecimento 40°C/Oxigênio/Escuro, em n-propanol (espectro 19).



Curva 1 - 0 horas de reação

Curva 2 - 810 horas de reação

Figura 26 - Espectro do sistema Clorofila cúprica/Aquecimento 40°C/Oxigênio/Escuro, em n-propanol (espectro 20).



Curva 1 - 0 horas de reação
Curva 2 - 80 horas de reação
Curva 3 - 240 horas de reação
Curva 4 - 440 horas de reação
Curva 5 - 680 horas de reação

Figura 27 - Espectro do sistema Clorofila cúprica/Aquecimento 60°C/Oxigênio/Escuro, em n-propanol (espectro 21).

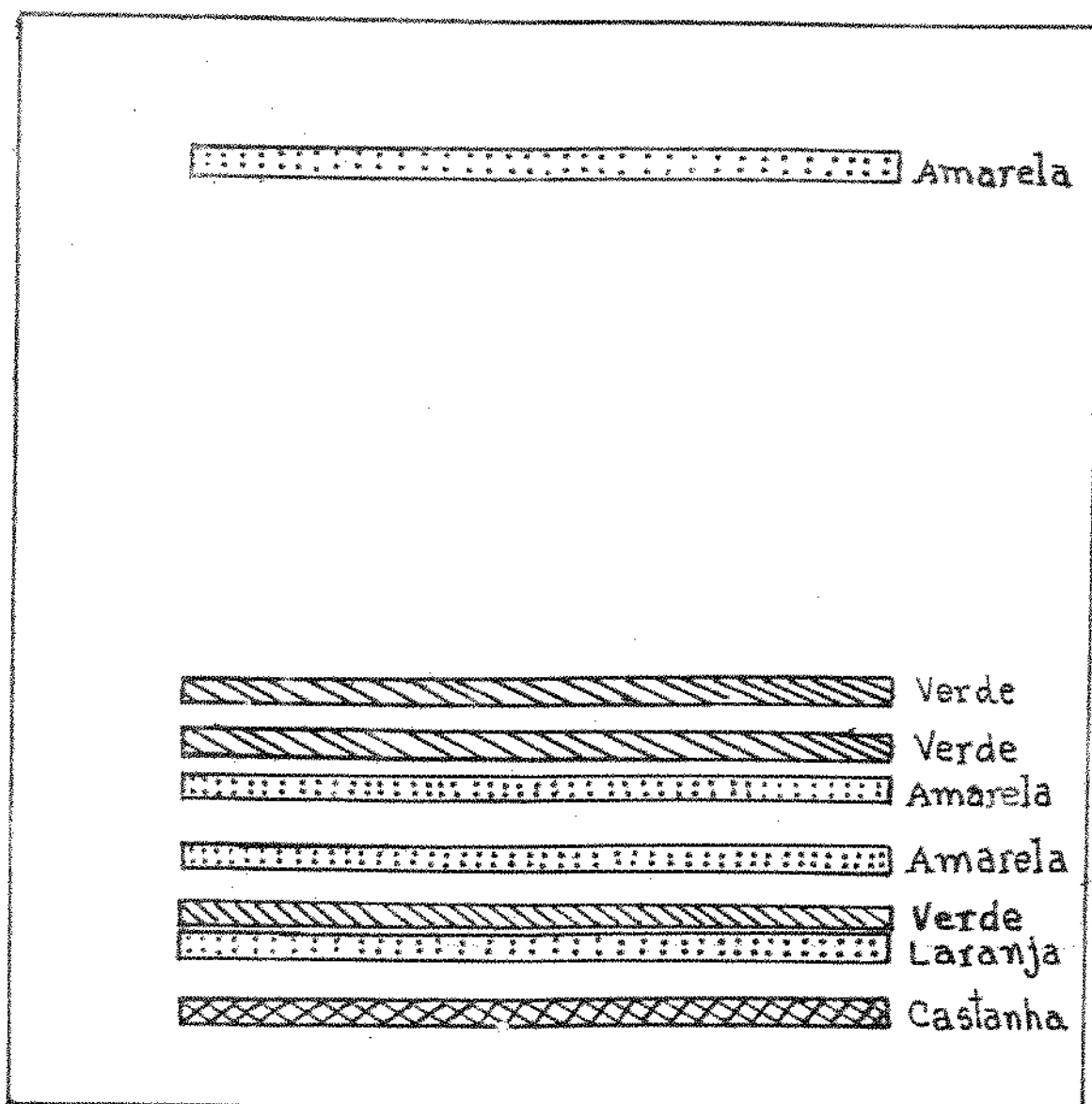


Figura 28 - Cromatograma do extrato acetônico de folhas frescas de espinafre.

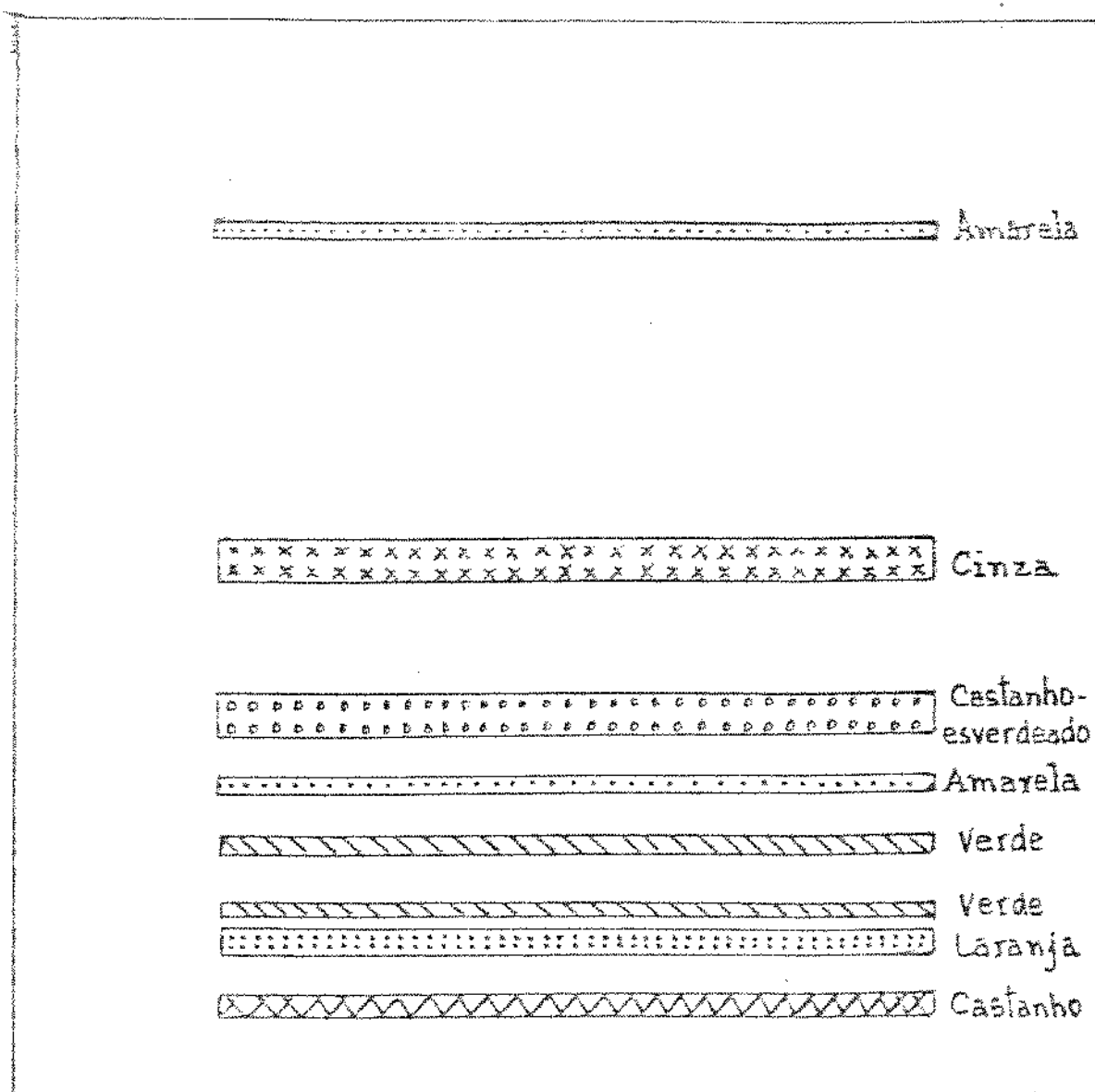


Figura 29 - Cromatograma do extrato clorofórmico das folhas de Stevia rebaudiana.

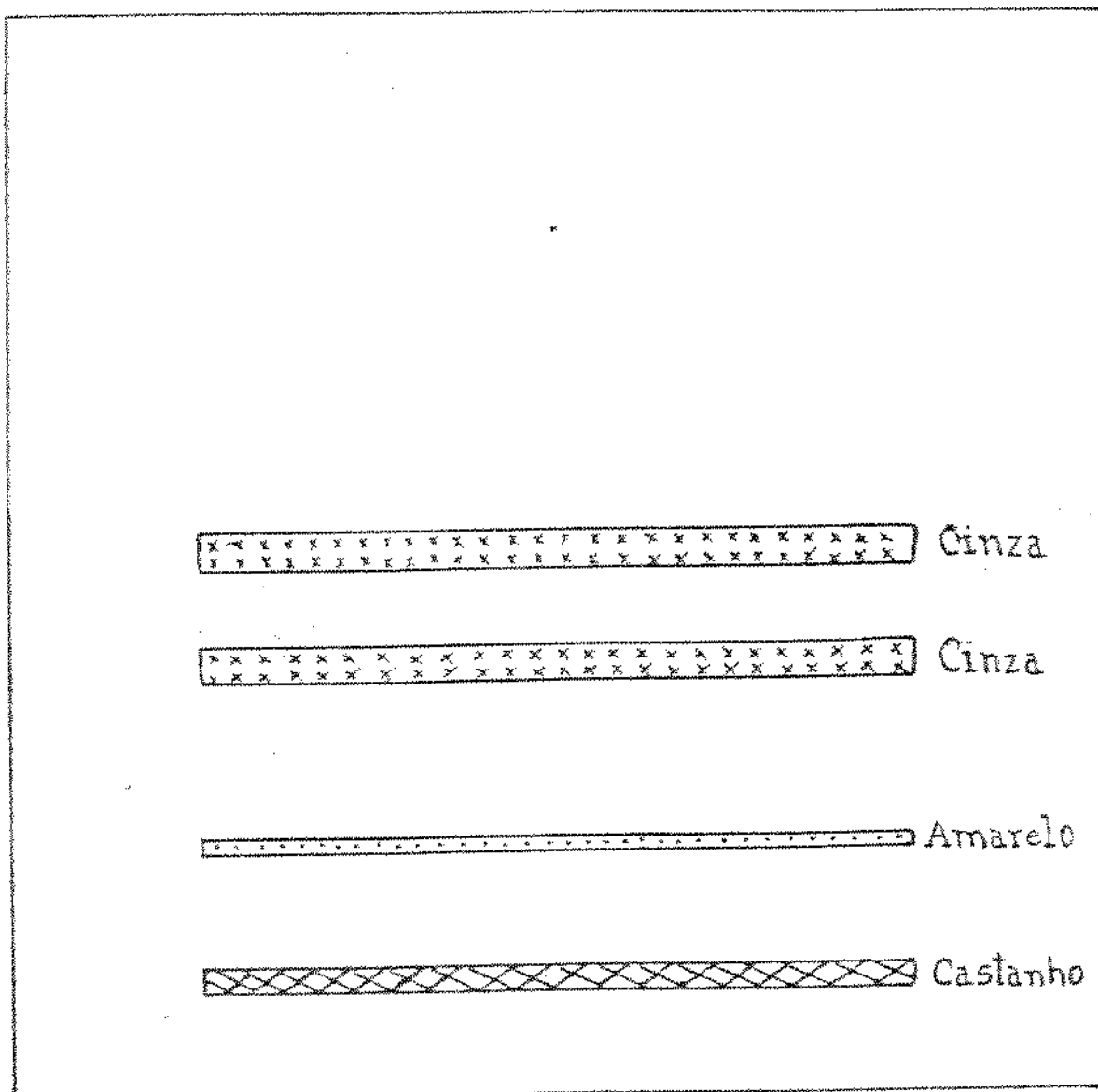


Figura 31 - Cromatograma do sistema Clorofila magnesiânica/Meio ácido/Oxigênio/Escuro.

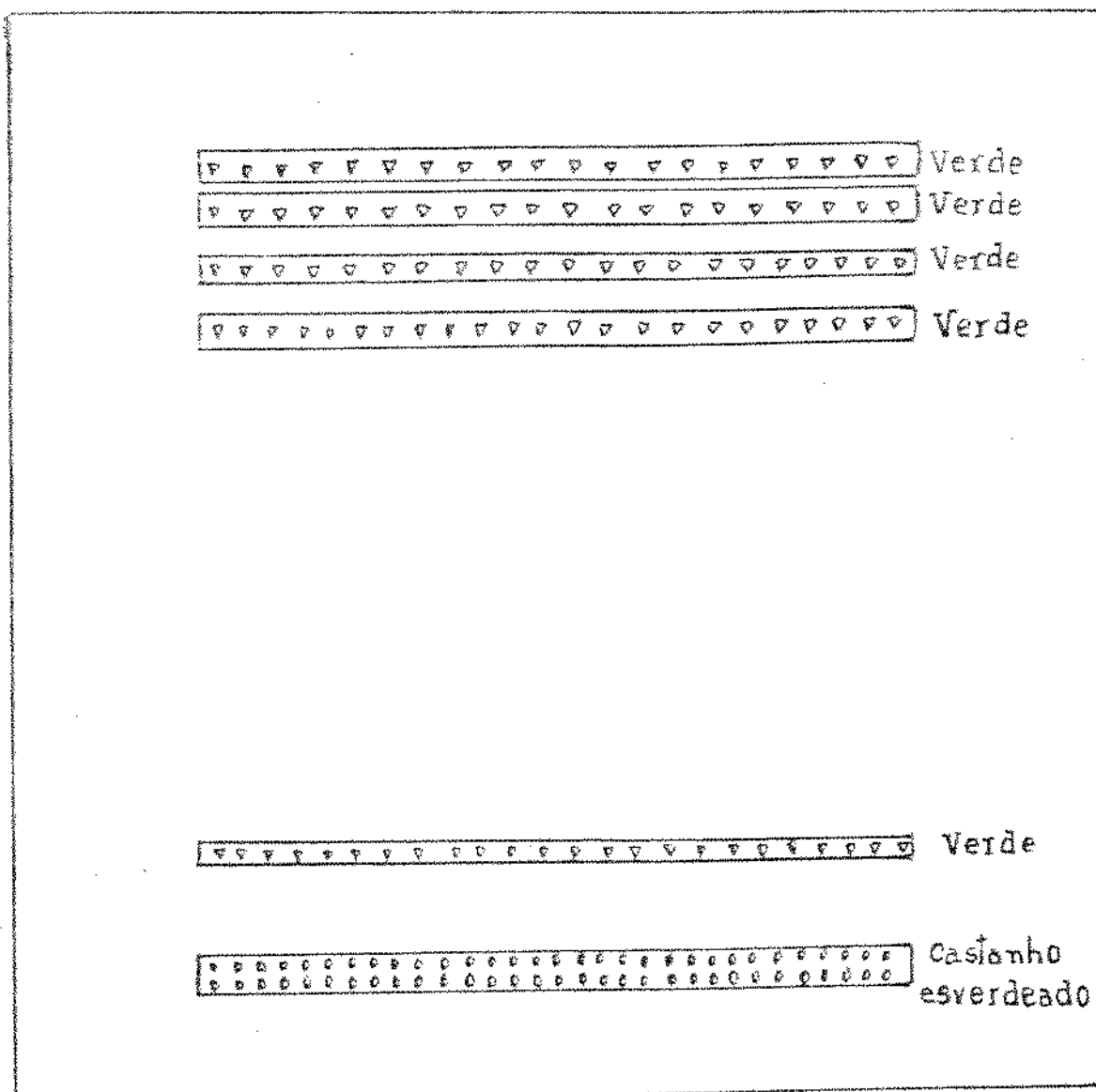


Figura 33 - Cromatograma do sistema Clorofila cúprica/Bissulfito de sódio/Atmosfera inerte/Escuro.

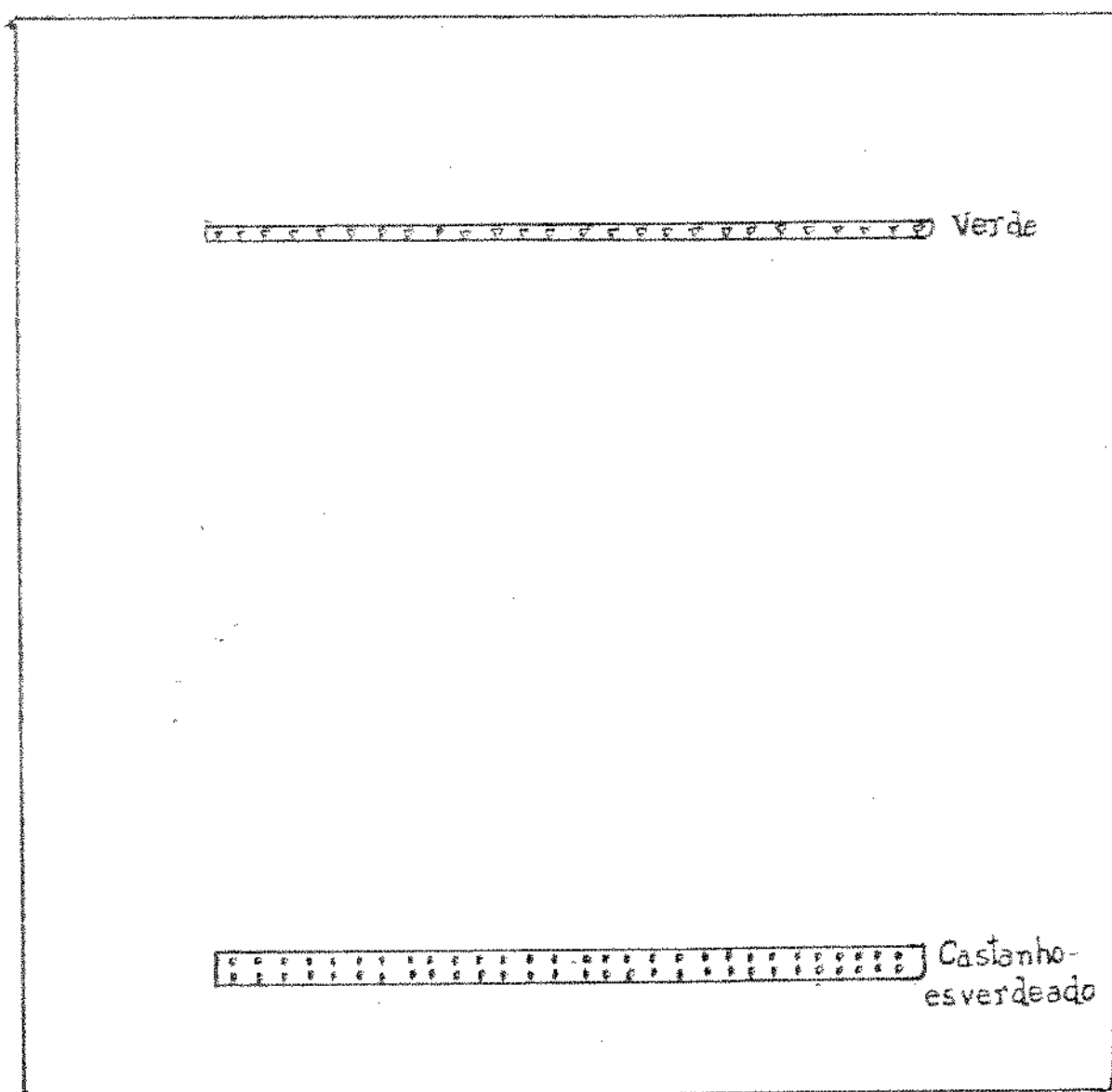


Figura 34 - Cromatograma do sistema Clorofila cúprica/Peróxido de benzoíla/Oxigênio/Escuro.

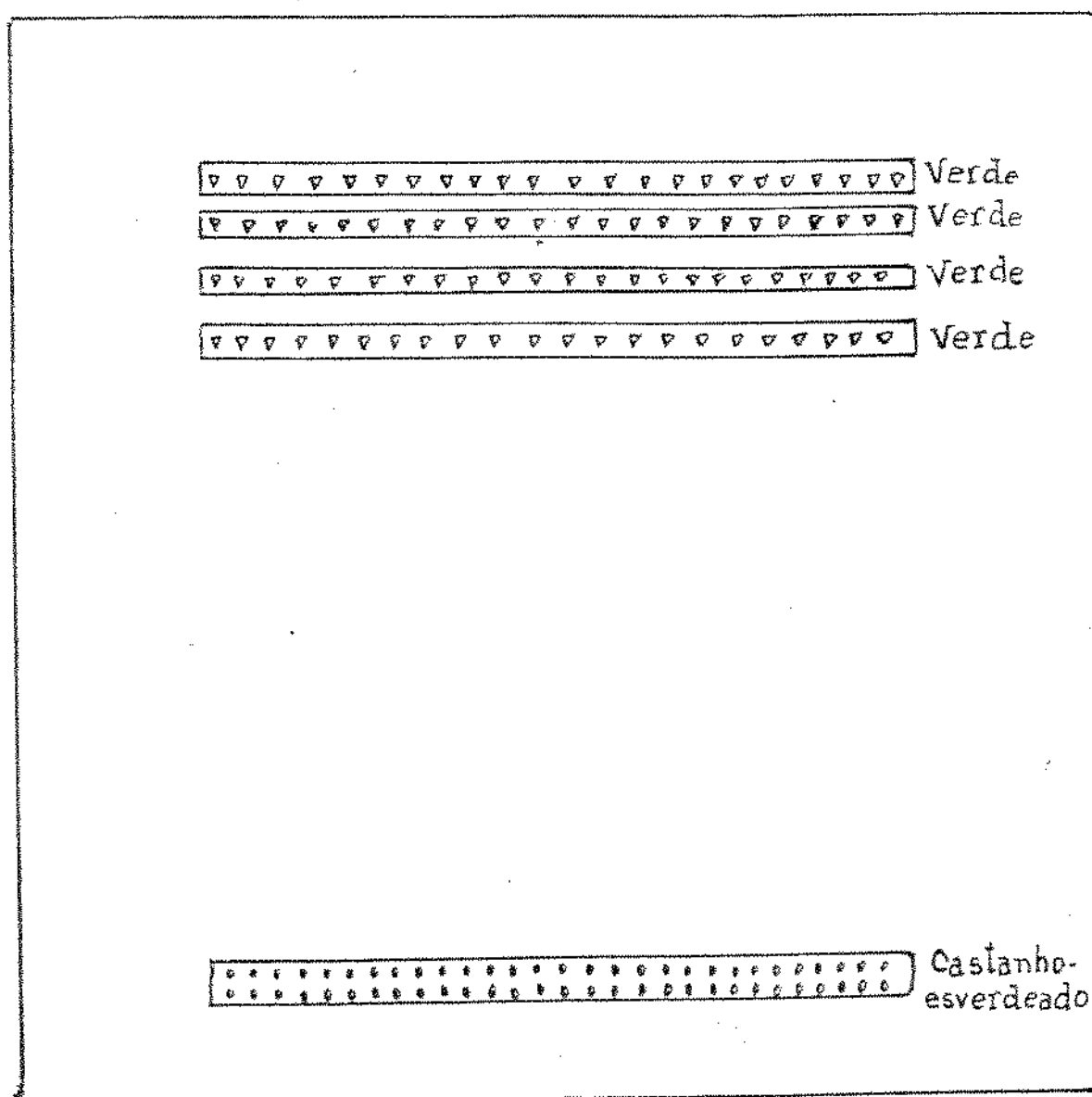


Figura 35 - Cromatograma do sistema Clorofila cúprica/Aquecimento 40°C/Oxigênio/Escuro.

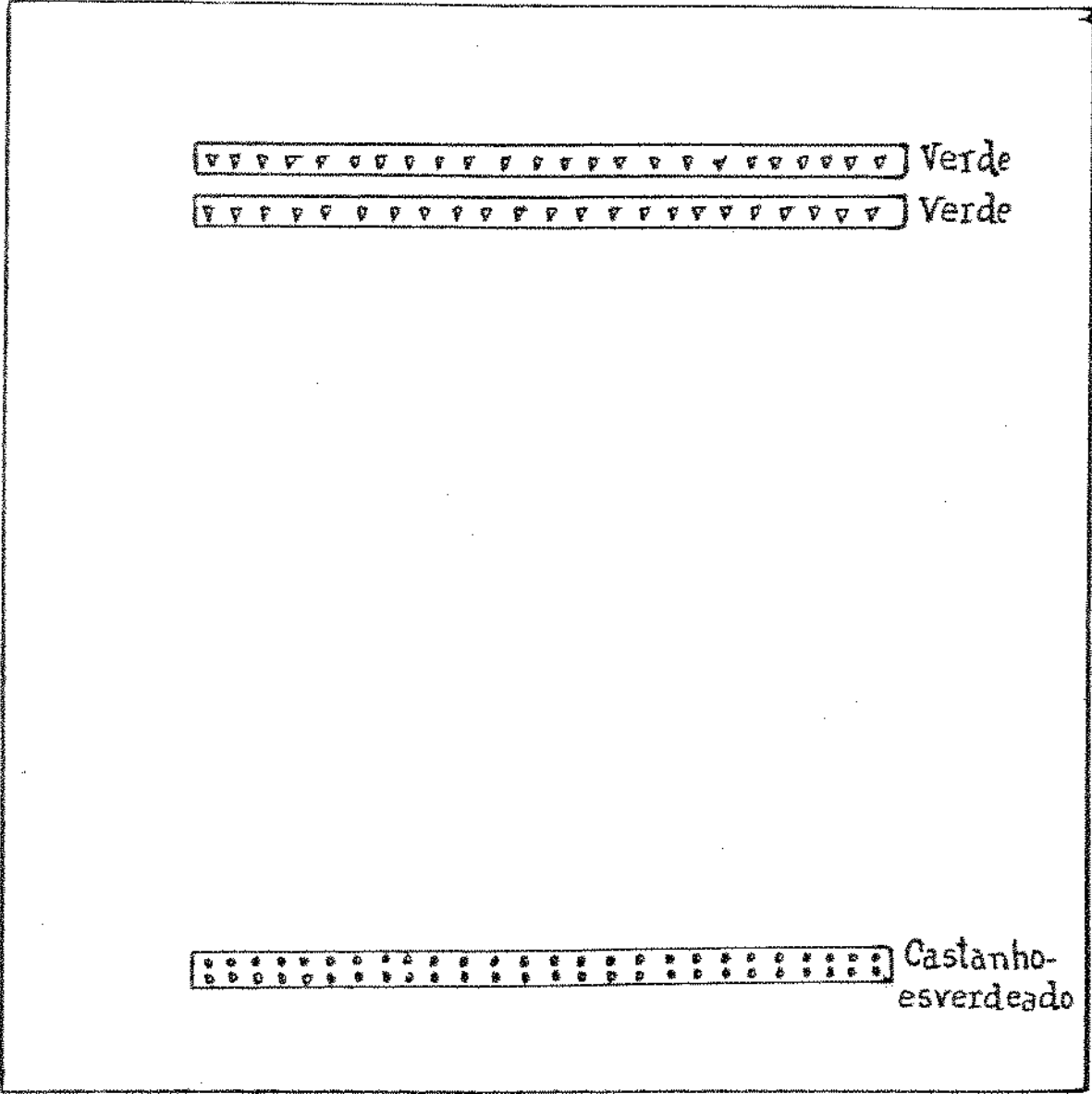


Figura 36 - Cromatograma do sistema Clorofila cúprica/Aqueci-
mento 60°C/Oxigênio/Escuro.

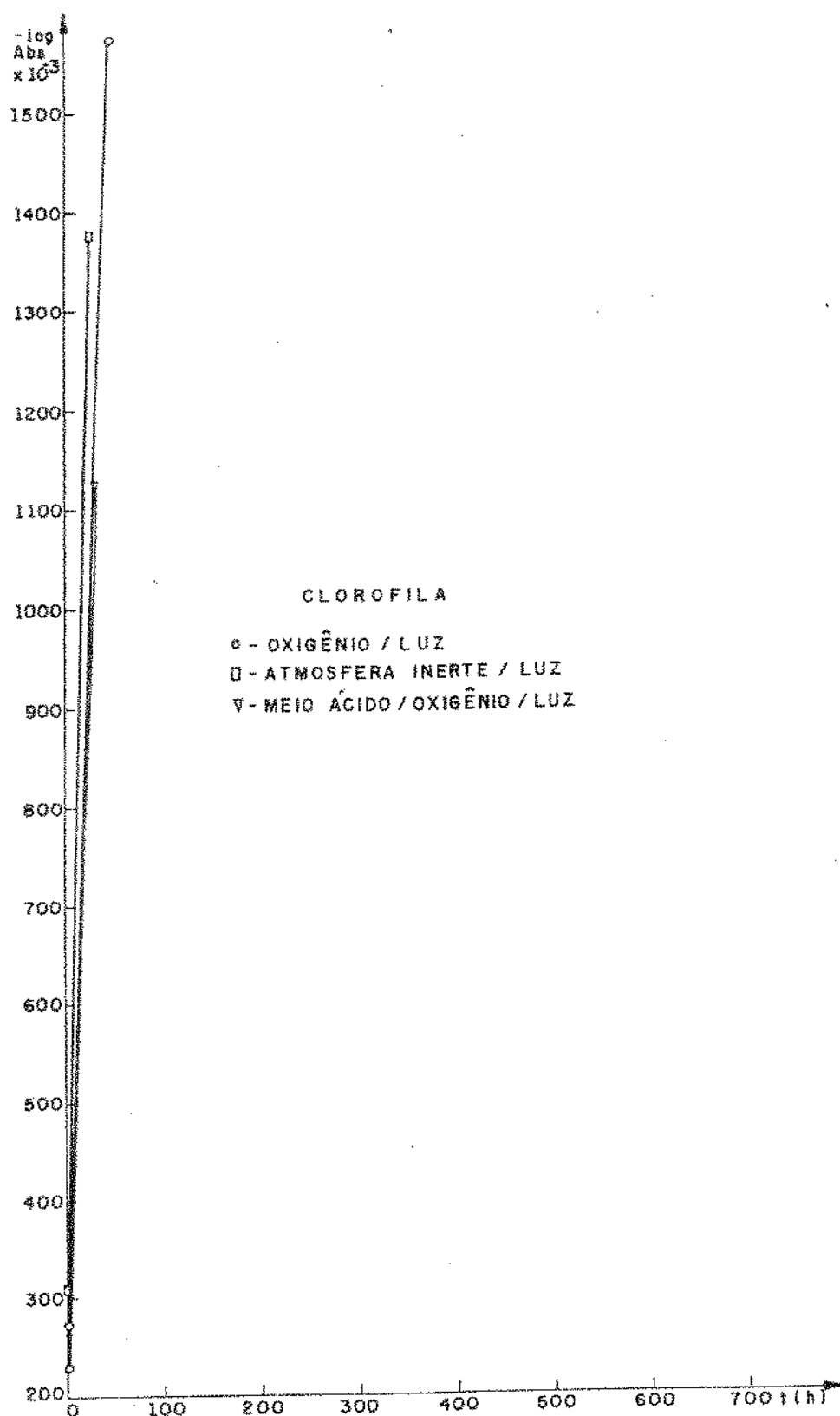


Figura 37 -log Absorbância versus tempo, dos sistemas Clorofila/
 /O₂/Luz, clorofila/Atmosfera inerte/Luz e Clorofila/
 Meio ácido/O₂/Luz.

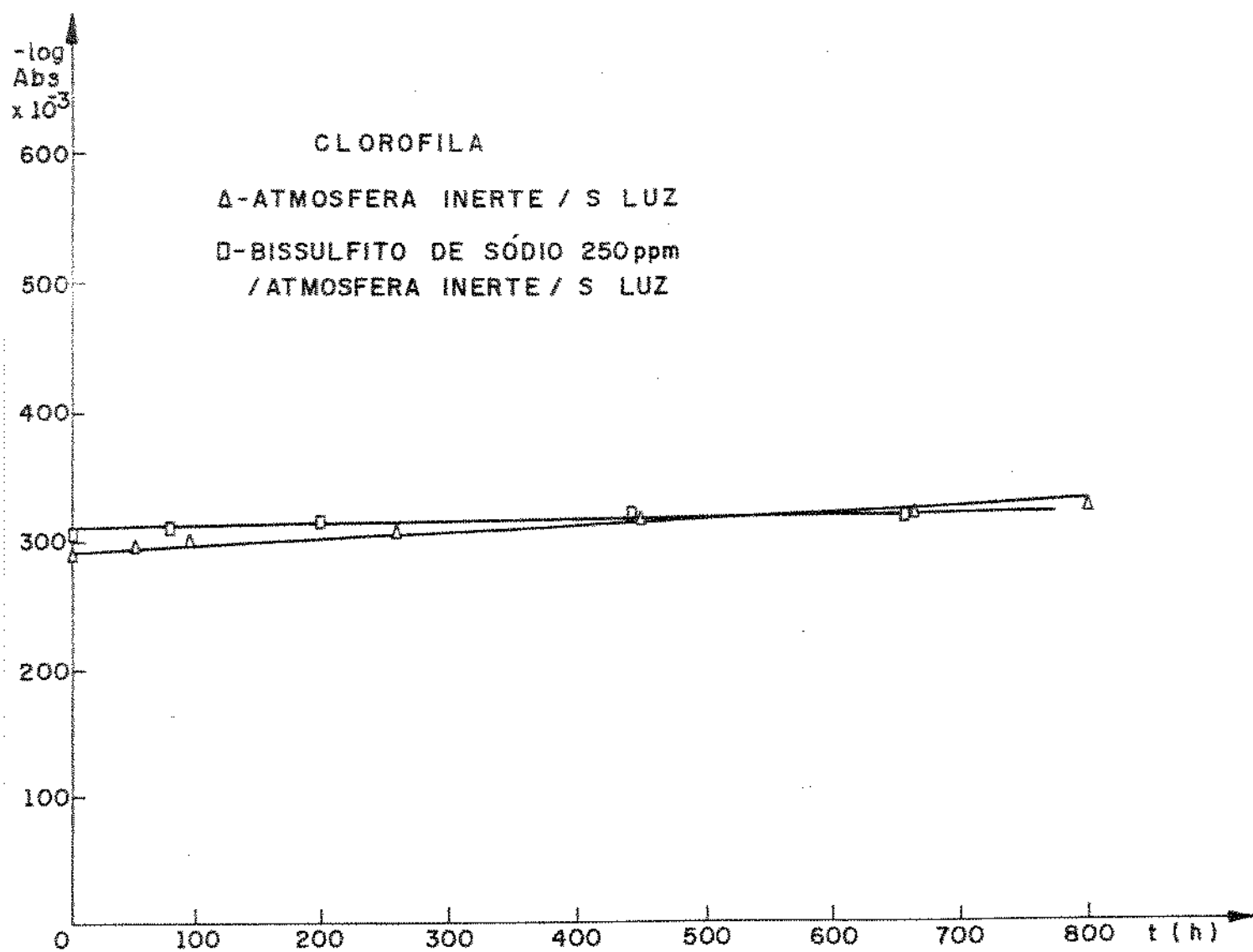


Figura 38 -log Absorbância versus tempo, dos sistemas Clorofila/ Atmosfera inerte/Escuro, Clorofila/Bissulfito de sódio 250 ppm/Atmosfera inerte/Escuro.

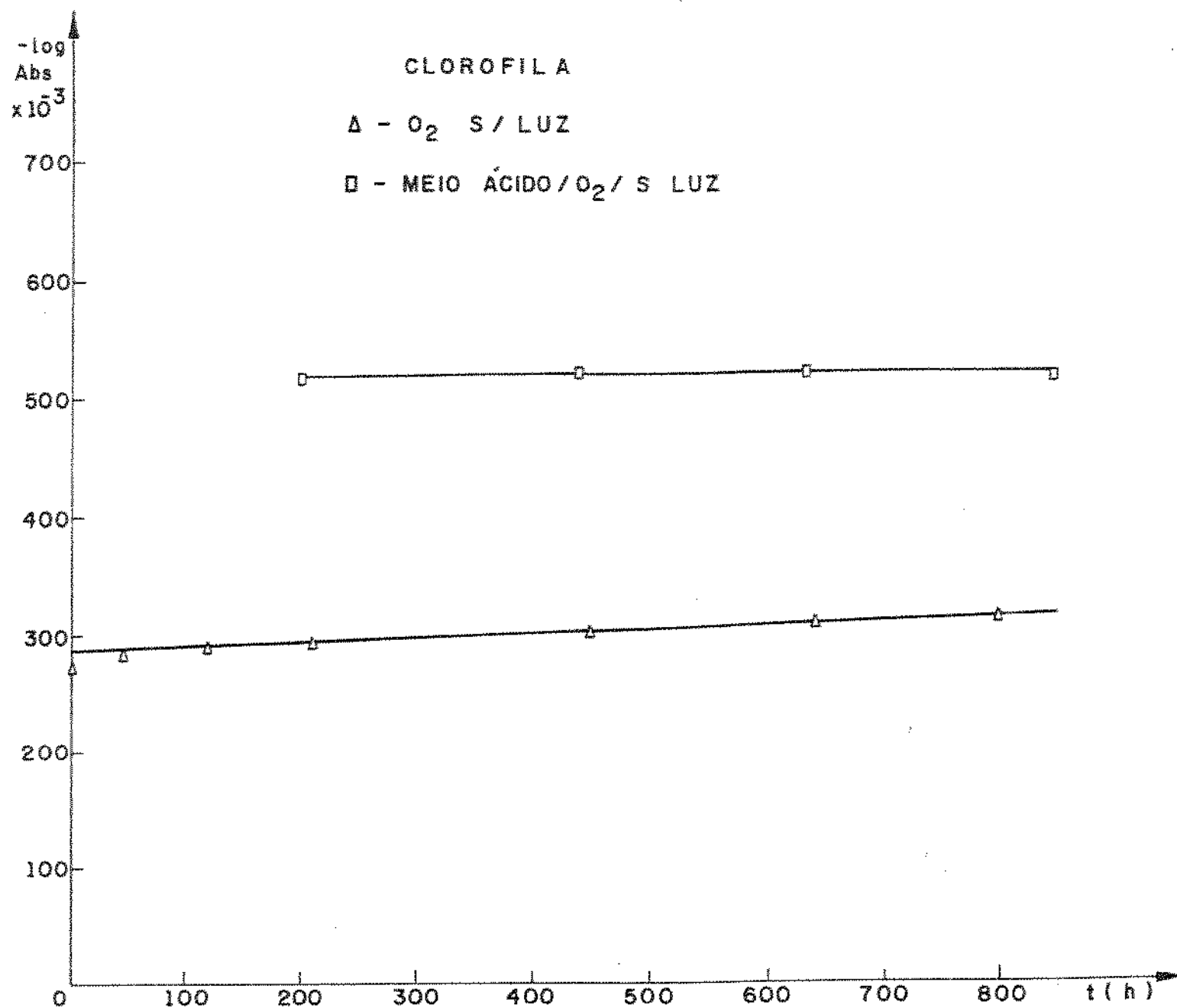


Figura 39 -log Absorbância versus tempo, dos sistemas Clorofila/O₂/Escuro e Clorofila/Meio ácido/O₂/Escuro.

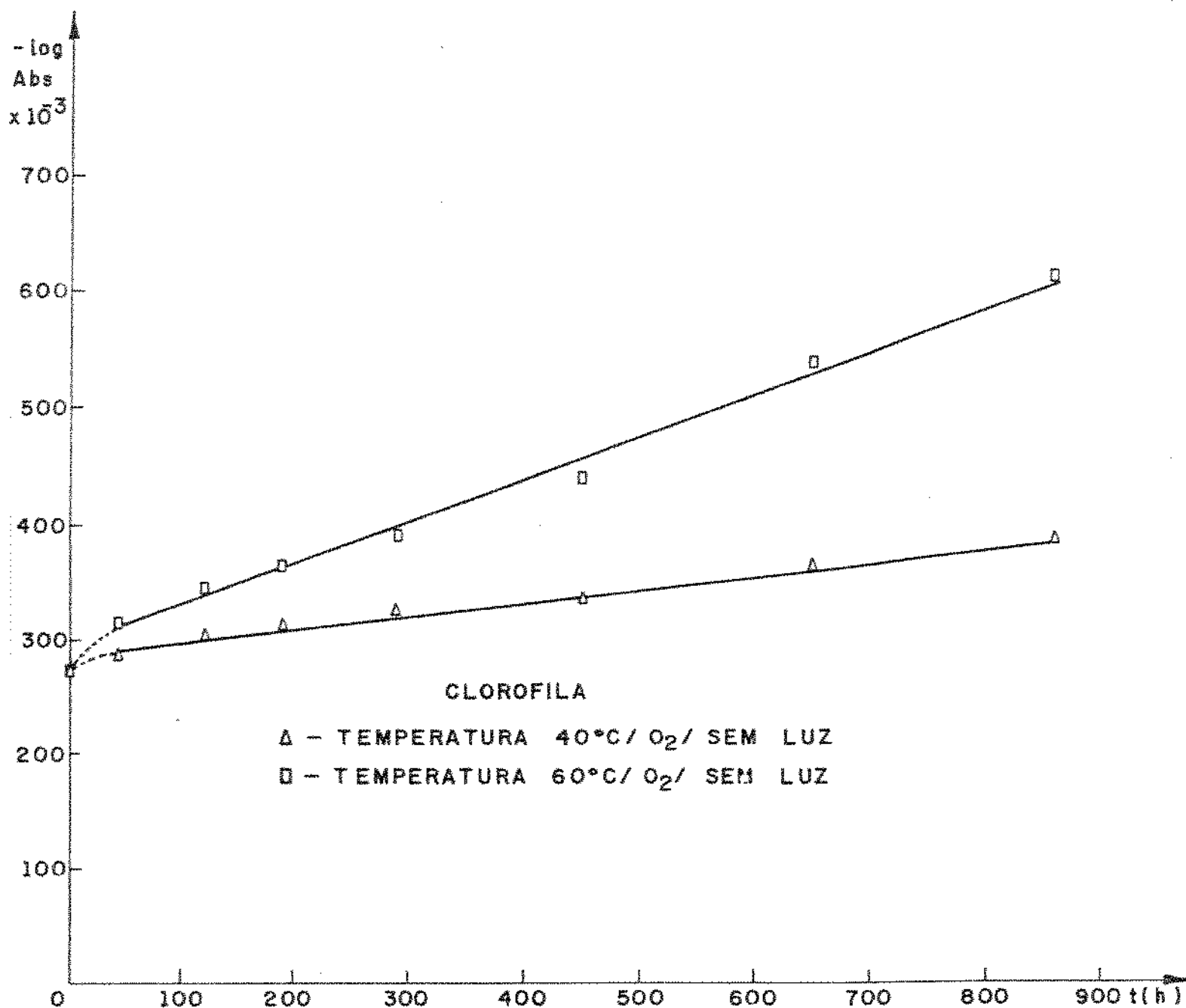


Figura 40 $-\log$ Absorbância versus tempo, dos sistemas Clorofila/ Aquecimento 40°C/Escuro e Clorofila/Aquecimento 60°C/ Escuro.

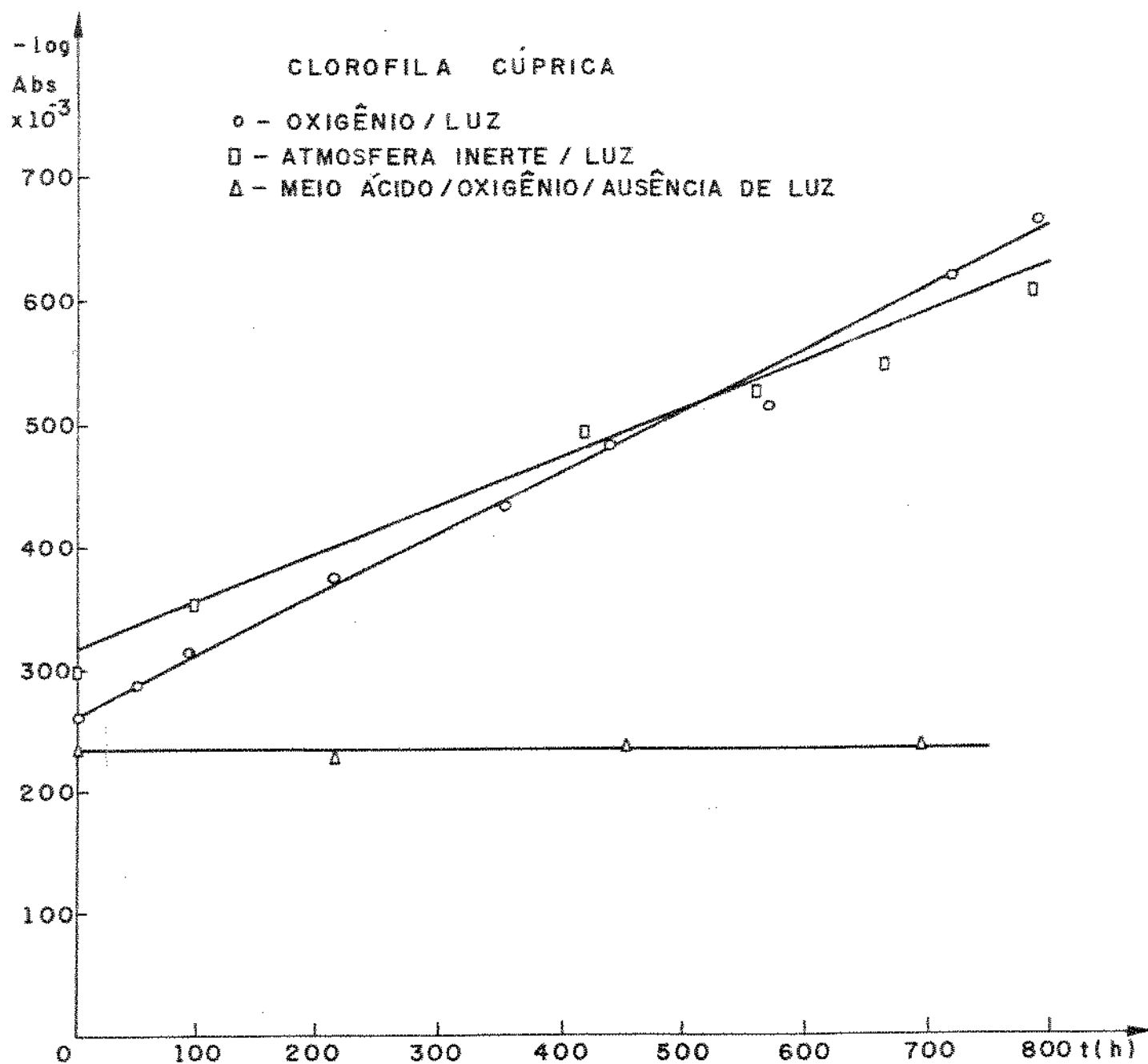


Figura 41 -log Absorbância versus tempo, dos sistemas Clorofila/cúprica/ O_2 /Luz, Clorofila cúprica/Atmosfera inerte/Luz e Clorofila cúprica/Meio ácido/ O_2 /Escuro.

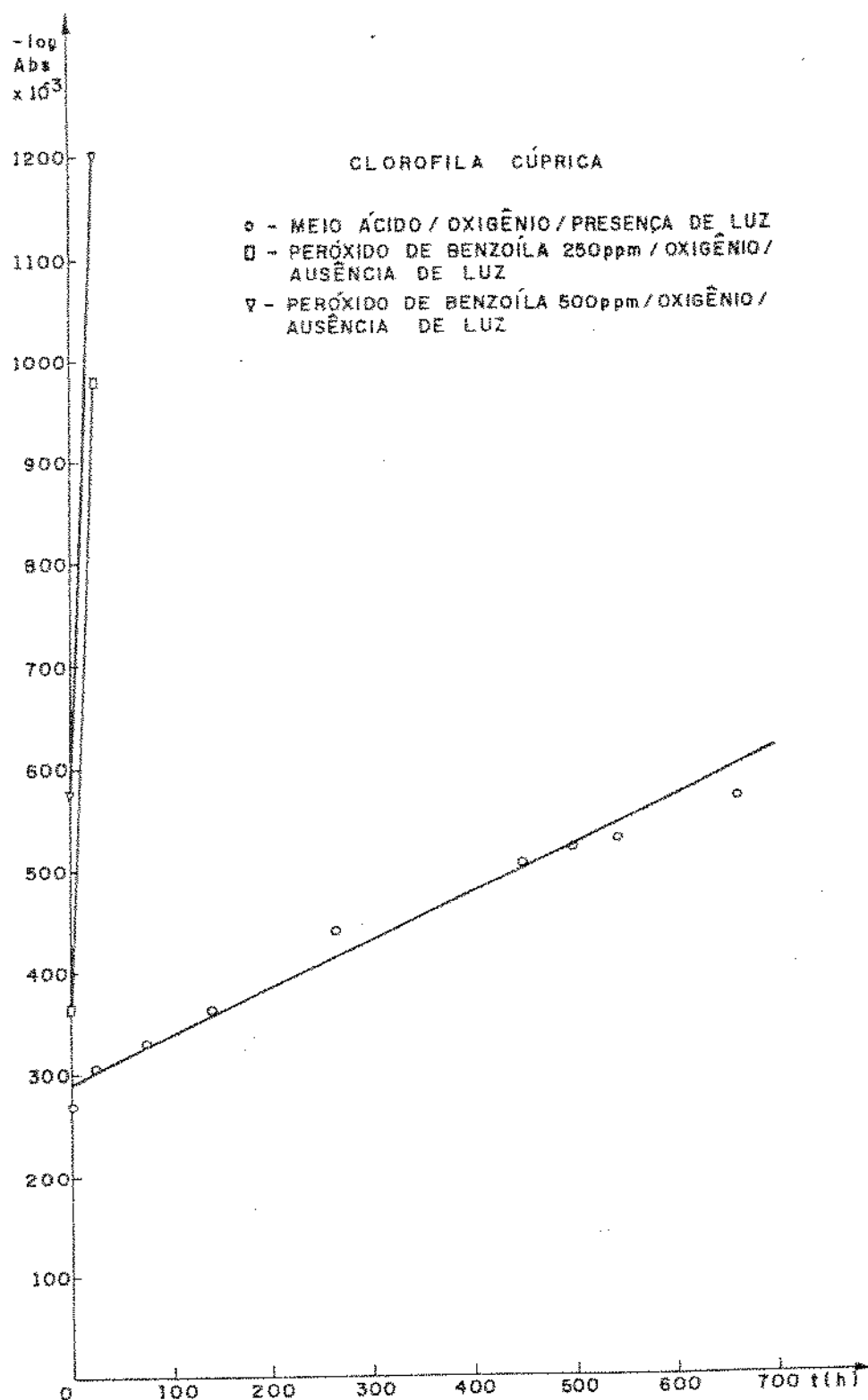


Figura 42 -log Absorbância versus tempo, dos sistemas Clorofila cúprica/Meio ácido/O₂/Luz, Clorofila cúprica/Peróxido de benzoíla 250 ppm/O₂/Escuro e Clorofila cúprica/Peróxido de benzoíla 500 ppm/O₂/Escuro.

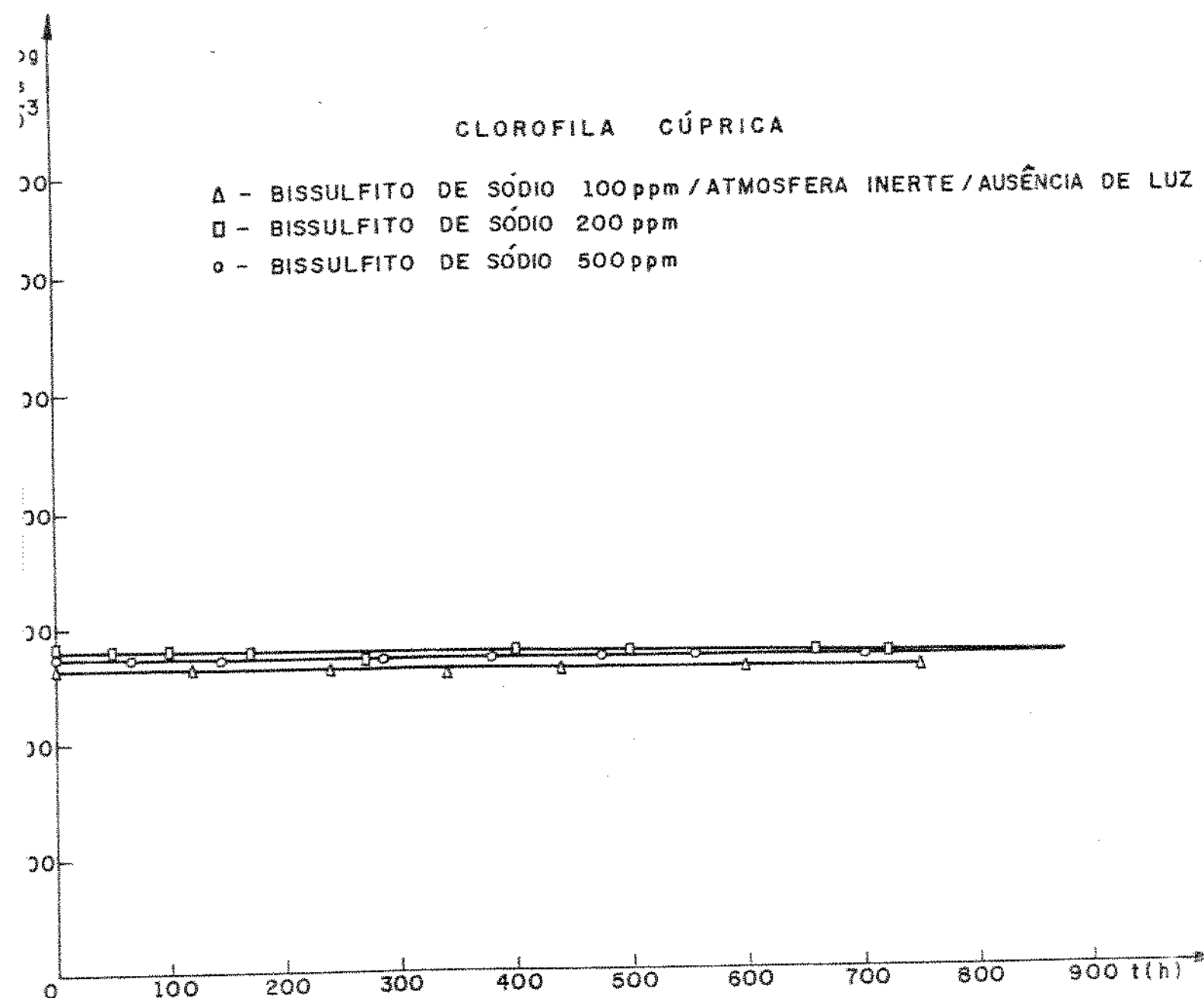


Figura 43 -log Absorbância versus tempo, dos sistemas clorofila cúprica/Bissulfito de sódio 100 ppm/Atmosfera inerte/Escuro, Clorofila cúprica/Bissulfito de sódio 200 ppm/Atmosfera inerte/Escuro e Clorofila cúprica/Bissulfito de sódio 500 ppm/Atmosfera inerte/Escuro.

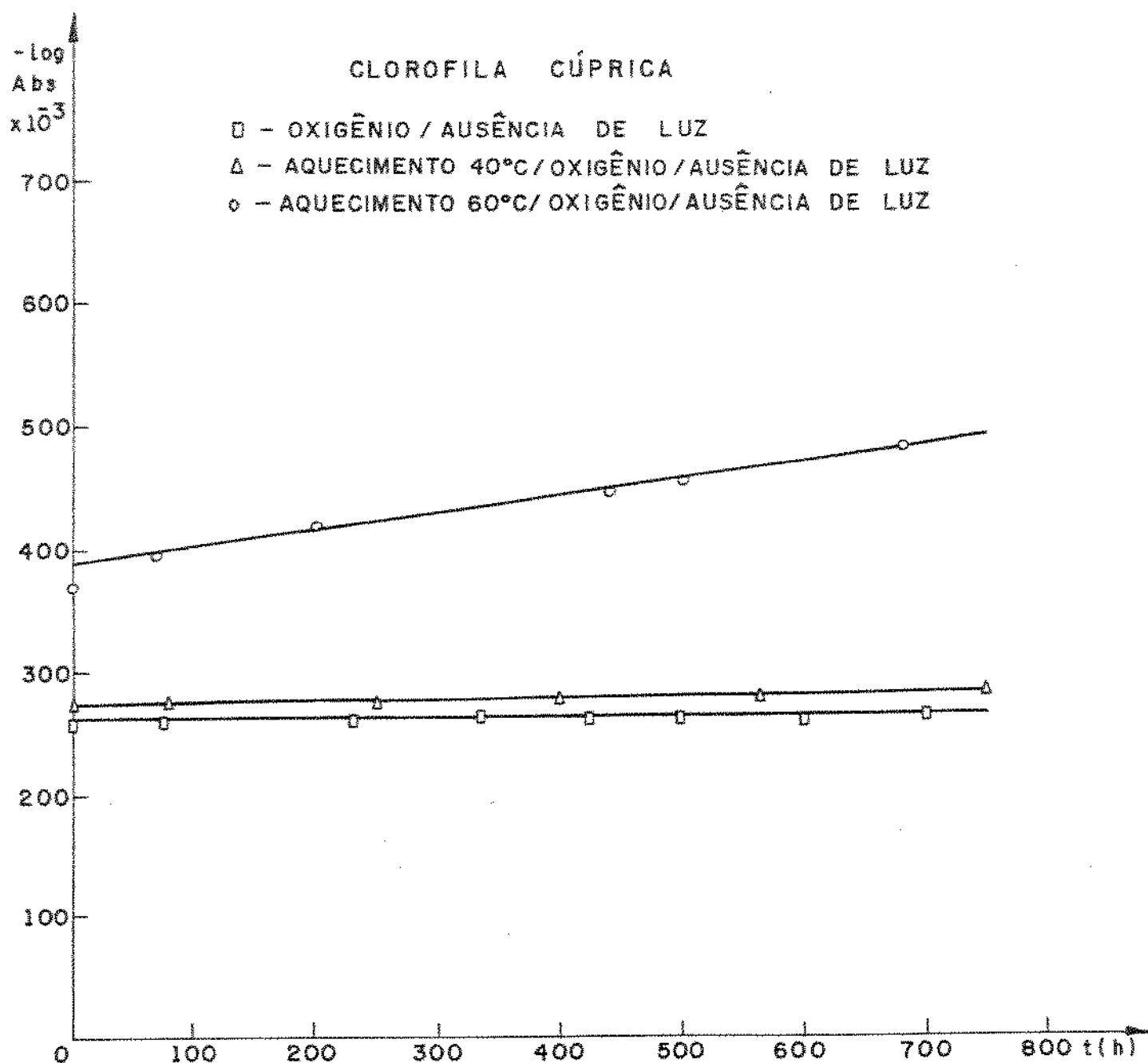


Figura 44 -log Absorbância versus tempo, dos sistemas clorofila cúprica/O₂/Escuro, Clorofila cúprica/Aquecimento 40°C/O₂/Escuro e Clorofila cúprica/O₂/Escuro.