

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**IDENTIFICAÇÃO E ESTUDO DE ESTABILIZAÇÃO DAS
ANTOCIANINAS DE CAPIM NAPIER (*Pennisetum
purpureum*)
POR β -CICLODEXTRINA**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Marcia Lis Mansilla aprovada pela Comissão Julgadora em 10 de agosto de 1998.

Campinas, 10 de agosto de 1998.


Prof. Dra. MARIA DO CARMO
GUEDES - Presidente da Banca

Marcia Lis Mansilla
Engenheira de Alimentos

Profa.Dra. Maria do Carmo Guedes
Orientadora

DISSERTAÇÃO APRESENTADA À FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM CIÊNCIAS DE ALIMENTOS

**CAMPINAS
1998**

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

M317i Mansilla, Marcia Lis
Identificação e estudo de estabilização das antocianinas de
capim napier (*Pennisetum purpureum*) por β -ciclodextrina /
Marcia Lis Mansilla. – Campinas, SP: [s.n.], 1998.

Orientador: Maria do Carmo Guedes
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Corantes. 2.Antocianina. 3.Pennisetum purpureum.
I.Guedes, Maria do Carmo. II.Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
N.º	M317i
V	Ex.
TOMBO BC/	35 302
PRCC.	395/98
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	02/10/98
N.º CPD	

CM-00117347-0

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Maria do Carmo Guedes
(orientadora)



Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy
(membro)

Profa. Dra. Delia Rodriguez Amaya
(membro)



Prof. Dr. Gil Eduardo Serra
(membro)

Campinas, Agosto de 1998

A papá.

AGRADECIMENTOS

Mis agradecimientos no sólo son para aquellos que contribuyeron en los aspectos científicos de la preparación de mi tesis, sino también a todas las personas que me acompañaron durante todo este tiempo.

Entre ellos, mi familia, mamá, Silvia, Lucio y Ricardo, que me alentaron a salir de mi "Santiago" y a aventurarme por otros senderos.

A Gustavo por el cariño profundo y el afecto de todos los días.

A Maria do Carmo, por la orientación y acompañamiento en este camino de aprendizaje que no dejó también de ser de crecimiento.

A los Drs(as) Helena Texeira Godoy, Delia Rodriguez Amaya, Gil Eduardo Serra e Felix Guillermo Reyes Reyes por su invalorable ayuda en las etapas finales de esta tesis.

A los colegas e docentes del departamento que siempre aportaron algún buen consejo y mucho de su experiencia, en especial a Janice que siempre acudió en mi auxilio, y a la Prof. Adilma que nos cedió el equipo de cromatografía.

A las secretarias y funcionarios por su paciencia y predisposición.

A los auxiliares, técnicos, profesores, compañeros y amigos del Laboratorio de Química de Alimentos por la ayuda y la amistad.

A los colegas de la Facultad de Agronomía y Agroindustrias de la Universidad Nacional de Santiago del Estero(Argentina), por su permanente disposición y afecto demostrados con su colaboración y su ayuda en todos los momentos y circunstancias en que los acosaba desde estas tierras campineiras; a la Dra. Beatriz Mishima por su incentivo y apoyo en la concreción de este proyecto profesional; a Titina por la pesada carga de trámites que realizó para mí.

A todos esos amigos que deben vivirse con el presente muy presente, porque son de otros pagos... Carmen por su amistad y su afecto permanente, Alejandra por escucharme las "neuras", Marise, Antonio, Sandra, Gustavo y a todos los que compartieron conmigo los momentos buenos y los no tanto.

A las instituciones que permitieron la realización de este proyecto que se condensa en esta disertación, a la Universidad Nacional de Santiago del Estero (Argentina), especialmente a la Facultad de Agronomía y Agroindustrias, al CICYT y al programa que impulsa el FOMECE.

CONTEÚDO

RESUMO.....	I
... I	
SUMMARY.....	II

INTRODUÇÃO.....	1
Referências bibliográficas.....	6

Capítulo 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	8
1.1 Estrutura química das Antocianinas.....	8
1.2 Determinação de antocianinas por CLAE	9
1.3 Caracterização de antocianinas por CLAE em alimentos.....	18
1.4 Aplicações em classificação quimiotaxomônica.....	21
1.5 Caracterização de antocianinas em viticultura e enologia.....	24
1.6 Estabilidade das antocianinas.....	33
1.7 Antocianinas na detecção de adulterações.....	35
1.8 Degradação de antocianinas na maturação ,processamento e estocagem de frutas e seus derivados.....	37
Referencias bibliográficas.....	42

Capítulo 2 – CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS ANTOCIANINAS DE CAPIM NAPIER (*PENNISSETUM PURPUREUM*)

Resumo.....	46
Abstract.....	47
2.1 Introdução.....	42
2.2 Material e Métodos.....	50
2.2.1 Preparação do extrato de antocianinas.....	50

2.2.2 Teor de Antocianinas totais.....	50
2.2.3 Purificação do extrato.....	50
2.2.4 Identificação da Antocianinas.....	51
2.2.4.1 Análises espectrais das antocianinas purificadas.....	51
2.2.4.2 Hidrólise controlada.....	52
2.2.4.3 Hidrólise ácida.....	52
2.2.4.3.1 Identificação dos açúcares.....	52
2.2.4.3.2 Identificação das agliconas.....	52
2.2.4.4 Hidrólise alcalina.....	53
2.2.5. Cromatografia líquida de alta eficiência.....	53
2.2.5.1 CLAE de antocianinas.....	54
2.2.5.2 CLAE de açúcares	54
2.2.5.3 CLAE de ácidos	55
2.2.5.4 CLAE das agliconas	55
2.2.6 Experimento de estabilidade.....	56
2.2.6.1 Reação de complexação.....	57
2.2.6.2 Avaliação da estabilidade	57
2.3 Resultados e discussão.....	58
2.3.1 Separação e purificação das principais antocianinas do capim napier.....	58
2.3.2 Experimentos de estabilidade.....	70
2.4 Conclusões	74
Referências bibliográficas.....	74
CONCLUSÕES.....	78
ANEXOS.....	79

RESUMO

Existe um considerável interesse mundial no desenvolvimento de corantes alimentares a partir de fontes naturais. A natureza oferece as antocianinas um grupo de matéria corante largamente distribuída em plantas, de intensa e atrativa cor vermelha. O objetivo do presente trabalho foi investigar a possibilidade do emprego de capim napier (*Pennisetum purpureum*) com fonte de antocianinas pelo seu significativo teor de pigmento.

Os pigmentos antociânicos, presentes na concentração de 67,7mg/100g, foram identificados mediante comportamento cromatográfico em papel e em camada delgada, por suas características espectrofotométricas e por seus tempos de retenção obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência e co-cromatografia. Os dados obtidos revelaram que a fração antociânica do capim napier é complexa, sendo constituída por cinco antocianinas, das quais as três principais encontradas nas proporções relativas de 68%, 11% e 15%, tiveram sua identidade estabelecidas como cianidina 3-maleoilglicosídeo, cianidina 3-glicosídeo e cianidina 3-arabinosilglicosídeo acilada com ácido siríngico, respectivamente.

A estabilidade da cianidina 3-maleoilglicosídeo assim como seu complexo com β -ciclodextrina foi estimada determinando-se a diminuição da absorvância no $\lambda_{\max}$ em função do tempo, sob exposição à luz e em sua ausência, a diferentes pH e sob atmosfera de nitrogênio. A partir dos valores de absorvância, foram calculadas as absorvâncias relativas e porcentagens de retenção de cor para cada sistema. A adição de β -ciclodextrina promoveu uma sensível estabilização à antocianina, quando pH 3,0 e luz estavam combinados, embora esses agentes isoladamente tenham sido deletéreos para a cianidina 3-maleoilglicosídeo. Observou-se alguma estabilização da cianidina 3-maleoilglicosídeo quando duas moléculas de β -ciclodextrina foram usadas, a pH 2,0 e em ausência de luz. A diminuição do número de moléculas para somente uma não imprimiu qualquer proteção ao sistema, quando exposto à luz ou em sua ausência.

SUMMARY

There is a considerable interest worldwide in the development of food colorants from natural sources. The nature offers the anthocyanins, a widespread group of colouring matters in plants, with an intense and attractive red colour.

The aim of this work was investigate the possibility of the use of napier grass (*Pennisetum purpureum*) as a source of anthocyanin which presents a significative content of pigment. The anthocyanins, present at the concentration of 67,7mg/100g, were characterized by using the chromatographic behavior on paper and thin layer chromatography, by their spectrophotometric characteristics and retention time obtained by high performance liquid chromatography. The composition of the anthocyanic fraction from the napier grass showed to be a complex mixture of five anthocyanins, the three main anthocyanins, found at the relative proportions of 68%, 11% and 15%, were respectively identified as cyanidin 3-maleoylglucoside, cyanidin 3-glucoside and cyanidin 3-arabinosylglucoside acylated with syringic acid.

The stability of cyanidin 3-maleoylglucoside as well as its complex with β -cyclodextrin was estimated by determining the decrease of the absorbance at the $\lambda_{\max}$ with time, under light exposure and at dark, at different pH and at nitrogen atmosphere. From the values of absorbance, % of colour retention were calculated to each system. Light showed to be a very strong destructive agent to the cyanidin 3-maleoylglucoside. One observed some stabilization of the cyanidin 3-maleoylglicoside when two molecules of β -cyclodextrine were used at pH 2,0 and at dark. The decrease of the number of the molecules to only one did not impart any protection to the system when exposed to light or at dark. The β -cyclodextrin addition promoted a sensitive stabilization to the anthocyanins, when both pH 3,0 and light were combined, in spite of these isolated agents had been deleterious to the cyanidin 3-maleoylglicoside.

INTRODUÇÃO

A cor não é só um fenômeno físico, determinado por algumas características do objeto que se está olhando, não é só uma questão de sinais de luz que chegam ao olho, senão que é a forma em que o olho e o cérebro juntos o interpretam. No caso dos alimentos, a cor é um atributo importante devido à sua função de “indicador”, como base para a identificação e julgamento da qualidade. As características estéticas, sensoriais e de segurança assim como a aceitabilidade dos alimentos são afetadas pela cor.

Existem evidências de que a aceitação ou rejeição de um alimento, esteja condicionada a sua cor (MAZZA & BROUILLARD, 1987). O julgamento acerca da “segurança” de um alimento baseado na cor é previo à escolha e/ou consumo do alimento. A associação de algumas cores ‘aceitáveis” a determinados alimentos começa nas primeiras etapas de nosso desenvolvimento cognitivo e permanece até o fim de nossas vidas (CLYDESDALE, 1993).

WATSON (1981) considera que para a maioria das pessoas a experiência da cor é dominante e influencia a percepção do sabor. Vários estudos mostraram o efeito da cor na percepção de outras características sensoriais, tais como a doçura, o sabor salgado e o flavor (CLYDESDALE, 1993).

A prática de colorir os alimentos vem de épocas remotas. Até meados do século X, as únicas substâncias corantes existentes eram derivadas de fontes naturais de origem animal, vegetal e mineral (WALFORD, 1980). Com a introdução dos alimentos processados, a necessidade de substâncias corantes incrementou-se, para refazer a cor natural diminuída ou perdida durante processamento ou armazenamento, para colorir alimentos ou bebidas que por si mesmos não teriam cor, ou, assegurar a uniformidade da cor nos produtos.

Na atualidade, existe claramente um interesse mundial por parte de consumidores no desenvolvimento de corantes a partir de fontes naturais. Um indicador dessa tendência é o número e distribuição das patentes de corantes

alimentares no período de 1979-1984 comparados com 1969-1978, que mostram um incremento maior de 100% no número de patente de corantes naturais. No mesmo período, o número de patentes de compostos sintéticos permaneceu constante (FRANCIS, 1992).

Em 1994, o mercado internacional de corantes naturais foi avaliado em U\$S 250 milhões, com os EUA participando com U\$S 125 milhões do mercado. A indústria de corantes alimentícios naturais experimenta um crescimento anual de 5-10% (comparando com 3-5% para sua contraparte sintética).

Os corantes naturais são obtidos de frutas, vegetais, sementes, raízes, algas e produzidos de maneiras diversas: por pressão, no caso de frutas e sementes, por extração utilizando água, soluções alcalinas ou óleos vegetais e em outros casos, ou por extração a partir de solventes orgânicos que são removidos uma vez que a cor esteja pronta para ser usada (RIBES-NIELSEN, 1990).

Quarenta e tres corantes colorantes foram autorizados como aditivos alimentares pelo Conselho da União Europeia, dos quais 16 são originários de plantas. Também tem sido usados sucos ou extratos de algumas frutas e vegetais com propósitos corantes, entre eles, as antocianinas de casca de uvas (BRIDLE & TIMBERLAKE, 1997). Nos Estados Unidos existem duas categorias de corantes permitidos: "aditivos corantes certificados" e "corantes isentos de certificação" (WISSGOTT & BORTLIK, 1996). A legislação brasileira permite o uso de corantes naturais em alimentos, sem limites (Tabela I do Decreto nº 55.871 de 26/03/65) (TAKAHASHI & YABIKU, 1992).

A preferência do consumidor por corantes naturais está associada com a imagem de serem saudáveis e de boa qualidade. Os corantes naturais incrementaram sua popularidade frente aos consumidores pelo fato dos corantes sintéticos a ser tomados como indesejáveis e perigosos; alguns sendo considerados responsáveis por reações alérgicas (CLYDESDALE, 1993).

Mesmo após de séculos de interesse nos corantes naturais, o nosso conhecimento da sua distribuição, disponibilidade e propriedades é limitado. Em todo o mundo aproximadamente 70% de todas as plantas não foram investigadas completamente, e a composição química de 0,5% foi estudada exaustivamente. A diversidade da vegetação tropical e subtropical oferece um grupo promissor de compostos vegetais ainda não explorados que pode ser aplicável às necessidades humanas (WISSGOTT & BORTLIK, 1996).

Novas fontes de corantes podem ser encontradas em áreas ainda não estudadas, entretanto, sua potencialidade como fonte de corantes comerciais estaria limitada pela disponibilidade da matéria prima, que precisaria ser cultivada em quantidades suficientes para uma extração industrial.

As antocianinas compreendem um grupo de pigmentos solúveis em água, do reino vegetal, especialmente característico das angiospermas ou plantas em floração. Elas desempenham um papel importante na atração de animais, na polinização e dispersão de sementes, como também, no mecanismo de resistência das plantas ao ataque dos insetos.

Em plantas comestíveis, as antocianinas estão amplamente distribuídas, representadas em 27 famílias, 73 gêneros e uma grande variedade de espécies. Estão especialmente associadas com frutas e flores, mas também estão presentes em cereais, raízes, grãos e gramíneas. Algumas folhas contendo antocianinas e partes de flores são também tradicionalmente consumidas em várias partes do mundo (BRIDLE & TIMBERLAKE, 1997).

A ingestão diária de antocianinas em alimentos, nos E.U.A., em 1971 foi estimada em 215 mg/dia no verão e 180 mg/dia durante o inverno (KURNAU, 1976) devido à ampla distribuição e presença em frutas e vegetais.

Existem vários trabalhos que mostram evidências de que as antocianinas não são tóxicas nem mutagênicas (SAIJA, 1994; POURRAS, 1977). Não se observaram efeitos adversos em animais alimentados com extrato de uva contendo antocianinas (BECCI *et al.*, 1983 a,b).

As antocianinas mostraram vários efeitos terapêuticos positivos, entre eles um efeito favorável na visão humana. Tem sido aplicadas também em pacientes com distúrbios circulatórios e enfermidades inflamatórias, existindo preparações farmacêuticas patenteadas contendo sais de flavilium, antocianinas e antocianidinas. Um extrato comercial de *Vaccinium myrtillus* ("bilberry"), denominado "antocianina de *Vaccinium myrtillus*" (VMA), contendo glicosídeos de delphinidina e cianidina (BAJ *et al.*, 1983), foi usado para tratamento de enfermidades de microcirculação resultante de problemas de fragilidade capilar e para manter a permeabilidade capilar normal. Uma aplicação mais recente das propriedades das antocianinas e flavonóides relacionados é sua atividade antioxidante (TSUDA *et al.*, 1994; WANG *et al.*, 1997).

O fato de que a cor vermelha das antocianinas apresentarem-se em soluções ácidas, faz com que ela sejam utilizadas principalmente na coloração de bebidas. A dosagem de aproximadamente 3 kg de um extrato de antocianinas de 1% em 1000 litros de bebida (aproximadamente 30 mg/l de antocianina) pode conferir uma cor intensa. Em laticínios e sorvetes, a adição do corante de antocianina de 0,3-0,5% p/p, imprime uma cor malva escura. O uso de corantes naturais é muito favorecido no caso de sorvetes, pois o processamento desse produto implica no emprego de temperaturas muito moderadas antes do congelamento (BRIDLE & TIMBERLAKE, 1997).

A utilidade das antocianinas como corante potencial depende de implicações econômicas e da disponibilidade de fontes com elevado teor de pigmentos e praticamente independente de sazonalidade, o que reduz as possíveis fontes para só umas poucas espécies de plantas.

Capim napier (*Pennisetum purpureum*) é uma planta cultivada para alimentação de gado, com folhas de cor vermelha-arroxeadas, apresentando significativo teor de pigmentos antocianínicos, crescendo facilmente em solos úmidos, o que possibilitaria sua utilização como uma possível fonte de corante vegetal. A espécie é originária da África, tendo sido amplamente disseminada em

regiões tropicais e subtropicais do mundo. No Brasil, é também amplamente distribuída, havendo uma regionalização de cultivares. A planta aceita solos arenosos, mas o crescimento é mais vigoroso em solos ricos e bem drenados. Não tolera solos permanentemente alagados. Encontra condições ideais nos trópicos úmidos, indo bem igualmente em regiões subtropicais. Prefere temperaturas acima de 16 °C, não suportando geadas. Plantas de porte elevado, normalmente com 2-3 metros, podendo chegar entretanto a 5 metros, às vezes curvadas por seu próprio peso, formando grandes touceiras, como ilustra a Figura 1. (CROTTFRIED KISSMANN, 1991) .



Figura 1 Plantação de *Pennisetum purpureum* (Capim napier)

Os objetivos do trabalho são, portanto, caracterizar as antocianinas presentes no capim napier e avaliar a estabilidade da principal antocianina encontrada em maior proporção relativa bem como seu complexo com β -ciclodextrinas em diferentes razões molares, frente aos agentes pH, luz e em sua ausência, sob atmosfera de nitrogênio.

Referências bibliográficas

- BAJ, A; BOMBARDELLI, E.; GABETTA, B.; MARTINELLI, E.M. (1983) Qualitative and quantitative evaluation of *Vaccinium myrtillus* anthocyanins by high-resolution gas chromatography and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **279**, 365-372.
- BECCI, P.J.; HESS, F.G.; GALLO, M.A; JOHNSON, W.D.; BABISH, J.(1983 a)
Subchronic feeding study of color extract in beagle dogs. *Food Chem. Toxicol.* , **21** (1), 75-77.
- BECCI, P.J.; HESS, F.G.; BABISH, J.G.; GALLO, M.A.; VOSS, K.A. (1983b) Reproduction study of grape color extract in rats. *Food Chem. Toxicol.*, **21**(1), 79-83.
- BRIDLE, P. & TIMBERLAKE, C.F.(1997) Anthocyanins as natural food colours. Selected aspects. *Food chemistry*. **58.**, 103-109. .
- CLYDESDALE, F.M. (1993) Color as a factor in food choice. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **33**(1), 83-101, 1993.
- FRANCIS, F.J. Food Colorants. (1984). Anthocyanins. *Critical reviews in food science and nutrition*. **28** (4)
- KUHNAU, J. (1976) The Flavonoids. A class of semi-essential food components: Their role in human nutrition. *World Review Nutr. Diet.* , **24**, 117-191.
- MAZZA, G; BROUILLARD, F. (1987) Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products. *Food Chem.* **25**, 207-225.
- POURRAT, H., BASTIDE, P., DORIER, P., POURRAT, M.^a & TRONCHE, P. (1967) Préparation et activité thérapeutique de quelques glycosides d'anthocyanes. *Chimie Thérapeutique* **2**, 33-38.
- RIBES-NIELSEN, M. (1990) Natural colours for ice cream. *Scandinavian dairy information*. **4**, 56-58.
- SAIJA, A. (1994) Effects of *Vaccinium myrtillus* anthocyaninins on triiodothyronine transport in the rat . *Pharmacol. Res.* , **22** (3) 59-60.

- TAKAHASHI, M. & YABIKU, H. (1992) Corantes naturais: usos, restrições e perspectivas. *Rev. Bras. Cor. Nat.*, **1**, 256-259.
- TSUDA, T., WATANABE, M., OHSHIMA, K., NORINOBU, S., CHOI, S.W., KAWAKISHI, S. & OSAWA, T. (1994) Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyanidin 3-O- β -D-glucoside and cyanidin. *J. of Agric.Food Chem.* **42**, 2407-2410.
- WALFORD, J. (1980) Historical development of food colours. In: *Developments in Food Colours*. Applied Science Publisher Ltd., Londres.
- WANG, H., CAO, G, PRIOR, R.L. (1997) Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 304-309.
- WATSON, R.H.J. (1981) *Natural Colours for foods and other uses*. Applied Science Publisher Ltd.
- WISSGOTT, U. & BORTLIK, K. (1996) Prospects for new natural food colorants. *Trends in Food Science & Technology.* **7**, 116-119.

CAPITULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Estrutura Química das Antocianinas

As antocianinas pertencem ao grupo geral de compostos denominados flavonóides, caracterizados pelo núcleo flavilium. Existem 4.000 flavonóides dos quais cerca de 300 são antocianinas. A molécula de antocianina está formada de duas a três partes, compreendendo, a aglicona ou antocianidina, um grupo de açúcares e um grupo de ácidos.

A constituição comum a todas as antocianidinas foi estabelecida como do cátion 2-fenilbenzopirilium, o flavilium.

Numerosas e sucessivas pesquisas mostraram os padrões de hidroxilação em antocianidinas naturais e foram classificados nos três grupos básicos: pelargonidina, cianidina e delphinidina, todas elas hidroxiladas nas posições 3, 5 e 7. Os derivados metilados também são encontrados na natureza. Das 17 agliconas conhecidas existentes na natureza, seis são mais comuns na maioria dos alimentos: pelargonidina, cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina e malvidina. (FRANCIS, 1989)

Os açúcares encontrados com maior frequência ligados as agliconas em ordem de ocorrência são: glicose, ramnose, xilose, galactose, arabinose e frutose. Eles podem estar presentes como monoglicosídeos, diglicosídeos e triglicosídeos substituídos diretamente na aglicona. Os diglicosídeos podem consistir de isômeros do mesmo açúcar ou combinações de dois açúcares diferentes. Os triglicosídeos podem ser combinações do mesmo açúcar ou dois ou três diferentes açúcares. A glicosidação das antocianidinas pode ocorrer nas posições 3, 5, 7, 3', 4', e 5'. Se um só açúcar estiver presente, ele estará sempre na posição 3. Se dois açúcares estiverem presentes, um deles estará na posição 3 e o outro pode estar na posição 3, 5, 3', 4', ou 5' (FRANCIS, 1989). Quando o número de açúcares for maior que três, eles atacam a molécula básica alternando ligações de açúcares e ácidos (FRANCIS, 1989).

Os ácidos mais encontrados nas antocianinas são, por ordem de ocorrência: cumárico, caféico, ferúlico, p-hidroxibenzóico, sinápico, malônico, acético, succínico, oxálico, e málico. Os cinco primeiros são ácidos aromáticos

e são mais facilmente detectados devido ao fato de possuírem um “ombro” no espectro a 300 a 340 nm em metanol, além disso, são mais estáveis quando do emprego de métodos convencionais de extração do pigmento que utilizam HCl diluído em metanol em que as ligações destes compostos são relativamente estáveis. Os ácidos alifáticos, por seu turno não apresentam absorção na região referida e são facilmente hidrolisados em HCl diluído (FRANCIS, 1989).

Por cerca de 80 anos, aproximadamente, as antocianinas foram consideradas como substituídas por açúcares somente nos anéis A e C , até que foi conhecida a substituição no anel B, quando YOSHITAMA (1977), reportou pela primeira vez a ocorrência de uma antocianina substituída no anel B em *Lobelia erinus*. Segundo o autor, a presença de açúcares substituintes no anel B é detectada facilmente por uma banda extra de absorção a 560-600 nm e a 600-640nm em soluções de pH neutro ou fracamente ácidas, significando que estas antocianinas são altamente coloridas em valores de pH próximos a 4, enquanto as antocianinas convencionais são quase incolores nestes valores de pH.

1.2 DETERMINAÇÃO DE ANTOCIANINAS POR CLAE

Classicamente, as antocianinas têm sido separadas por inúmeras técnicas, incluindo métodos de cromatografia em papel, em camada delgada e em coluna. Desses métodos a cromatografia em papel tem sido o método mais usado para a separação das antocianinas individuais (HRAZDINA, 1979) e valores de suas mobilidades cromatográficas são descritos na literatura (HARBORNE, 1967).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de antocianinas, cujo emprego iniciou-se durante os anos 70, tornou-se comum em muitos laboratórios devido às suas vantagens comparadas com as de outros procedimentos cromatográficos, tais como sensibilidade e rapidez. Quando acoplada a um detetor de arranjo de diodos , transforma-se em um procedimento ideal para análises confiáveis, qualitativa e quantitativamente, de misturas complexas de antocianinas presentes em flores e frutas de diferentes espécies. (HARBORNE & GRAYER, 1988).

A CLAE pode ser utilizada para diversos objetivos, podendo ser aplicada para detectar os intermediários na hidrólise parcial de antocianinas com mais de um resíduo glicosídico ou revelando compostos que geralmente não aparecem quando são empregados outros métodos como cromatografia em papel ou cromatografia em camada delgada. A grande sensibilidade do método permite seu uso quando só pequenas quantidades de amostra estão disponíveis para a análise das antocianinas. A CLAE também pode ser usada para separações preparativas, com colunas de maior capacidade que as usadas no trabalho analítico.

Vários autores conseguiram boas separações com colunas ODS baseadas em sílica com fases móveis binárias de água com acetonitrila ou metanol. O sistema de solventes incluem um ácido, que tem a função na separação, de agir como modificador orgânico, abaixando o pH da fase móvel, mantendo assim as antocianinas na forma de cátion flavílium (Hong e Wrolstad, 1990).

A combinação da falta de disponibilidade dos padrões das antocianinas puras com os problemas de especificação dos tempos de retenção absolutos são fatores que contribuem para dificultar o uso de CLAE para a análise das antocianinas (HEBRERO *et al.*, 1989).

CASTEELE *et al.* (1983) encontraram que a importância do tipo de substituição no anel B da molécula de antocianinas foi evidenciada pelo fato de que delphinidina foi mais rapidamente eluída que cianidina, a qual precede pelargonidina e por último os compostos metoxilados, peonidina (um -OCH₃) e malvidina (dois -OCH₃).

Na **Tabela 1**, estão resumidos os tempos de retenção (t_R) para algumas das antocianinas mais comuns, conforme apresentado por HARBONE & GRAYER (1988). Segundo os autores, os dados mostram que a glicosilação aumenta a mobilidade em colunas de fase reversa, com 3,5-diglicosídeos eluindo da coluna mais rapidamente que 3-diglicosídeos. O aumento da hidroxilação da antocianidina aumenta a mobilidade, entretanto a O-metilação

reverte esta tendência, assim os glicosídeos de malvidina geralmente eluem depois de outras antocianinas.

Vários autores estudaram a aplicação de CLAE em combinação com detector de arranjo de diodos (DAD) para separar e caracterizar antocianinas.

HONG & WROLSTAD (1990a) descreveram uma análise sistemática para o uso de CLAE com detector de arranjo de diodos para separar e caracterizar antocianinas de “cranberry” (*Vaccinium macrocarpon*), de “roselle” (*Hibiscus sabdariffa*), e de morango (*Fragaria ananassa*). Os autores usaram dois procedimentos de preparação da amostra para CLAE: para a quantificação, as antocianinas em solução aquosa foram adsorvidas em cartucho Sep-pak C18 visando uma alteração mínima na composição do pigmento. Para a separação em CLAE, a solução aquosa dos pigmentos foi submetida a um procedimento mais vigoroso para remover interferentes fenólicos que absorvem no UV sendo adsorvida em polivinilpirrolidona hidratada. Para as análises de antocianinas foi usada uma coluna Supelcosil ODS (5mm x 25cm, 5 μ m), com os solventes A) ácido acético a 15 % B) acetonitrila, com eluição isocrática a 1,5 ml/min com 85% de A e 15% de B a temperatura ambiente, detecção a 520nm.

As análises de antocianinas foram realizadas em coluna Polymer Labs PLRP-S (4,6mm x 25cm, 5 μ m), com os solventes A) ácido fosfórico 4 % e B) acetonitrila 100 %, com uma etapa de eluição em gradiente e duas etapas isocráticas, detecção a 520 e 260 nm. De acordo com os resultados, os referidos autores encontraram que confirmaram os encontrados em trabalhos prévios, ou seja, para uma antocianina dada, os glicosídeos análogos eluíram na seguinte ordem crescente de tempo de retenção: galactosídeo, glicosídeo, arabinosídeo. Entretanto, os glicosídeos de delphinidina eluíram antes dos glicosídeos de cianidina, e os diglicosídeos eluíram antes dos correspondentes monoglicosídeos. Em relação às propriedades espectrais obtidas com detector de arranjo de diodos, os referidos autores encontraram que o incremento da polaridade do solvente utilizado como fase móvel influenciou nas características espectrais das antocianinas incrementando a razão $E_{440}/E_{max\ vis}$ e diminuindo o $\lambda_{max\ vis}$.

TABELA 1 Valores de tempo de retenção (min) para varios glicosídeos das antocianidinas mais comuns.

Pigmento		t _R (min)*
3-Ramnosilglicosídeo-5-glicosídeo	delfinidina	15.4
	cianidina	19.1
	petunidina	22.0
	pelargonidina	22.2
	peonidina	25.8
	malvidina	28.4
3,5-Diglicosídeo	delfinidina	18.2
	cianidina	21.7
	petunidina	25.0
	peonidina	25.0
	pelargonidina	25.3
	malvidina	32.1
3-Ramnosilglicosídeo	delfinidina	27.0
	cianidina	31.1
	petunidina	33.6
	pelargonidina	34.8
	peonidina	39.0
	malvidina	42.8

. * Dados de AKAVIA *et al.* (1981), de acordo a HARBORNE & GRAYER(1988).

HONG & WROLSTAD (1990b) usaram, também, CLAE com detector de arranjo de diodos para caracterizar o perfil de pigmentos antociânicos de varios corantes antociânicos e sucos concentrados de “blackcurrant”, “blackberries”, “black raspberry”, “elderberry”, cereja, ameixa, uva, “bilberry” e repolho roxo disponíveis comercialmente. A metodologia de CLAE para antocianinas e antocianidinas usada pelos autores segue método descrito por HONG e WROLSTAD (1986). Os autores concluíram que CLAE com detector de arranjo de diodos é uma ferramenta útil para a caracterização de antocianinas, com as características espectrais das antocianinas sendo informações úteis para

elucidar a natureza da aglicona e os padrões de substituição glicosídica, adicionalmente àquelas fornecidas pelas características de retenção em CLAE fase reversa.

As antocianinas de várias frutas vermelhas foram estudadas por GOIFFON *et al.* (1991), utilizando CLAE com o propósito de investigar os parâmetros que afetam o tempo de retenção e, em particular, as influências dos constituintes aglicona e açúcar. Estes autores resumiram os comportamentos para CLAE em fase reversa, estabelecidos na literatura:

i) A retenção da aglicona está correlacionada com a hidrofobicidade da molécula e a ordem de eluição observada é delfinidina < cianidina < pelargonidina < peonidina < malvidina.

ii) Com a mesma aglicona, a ordem de eluição é 3-galactosídeo < 3-glicosídeo < 3-rutinosídeo < 3-arabinosídeo. Entretanto, VAN de CASTELLE *et al.* (1983) encontraram que cianidina-3 arabinosídeo elui entre cianidina-3 galactosídeo e cianidina-3 glicosídeo.

iii) A adição de um segundo carboidrato à antocianidina 3-glicosídeo aumenta sua polaridade, resultando numa diminuição de sua retenção. A presença de um grupo metila na molécula de ramnose afeta o comportamento cromatográfico, assim cianidina 3-rutinosídeo elui depois de cianidina-3 glicosídeo.

Os referidos autores usaram CLAE com coluna analítica Lichrospher RP-18 (250 x 10 mm, 7 μ m) com os solventes I) água-acetonitrila (ACN)-ácido fórmico (84:6:10, v/v/v) e II) água-acetonitrila (ACN)-ácido fórmico (81:9:10, v/v/v), com fluxo de 1ml/min em cromatografia analítica e 6 ml/min em cromatografia semi-preparativa, à temperatura ambiente. Foram usadas hidrólises ácida para a análise dos fragmentos obtidos. Para a análise das agliconas foi empregada água-acetonitrila-ácido fórmico (75:15:10, v/v/v) como fase móvel.

Os autores encontraram que a variação do tipo de açúcar não resulta em variação do valor de $\log \alpha$ (onde α representa a selectividade) e portanto, independentemente do açúcar, tem-se o mesmo aumento do $\log \alpha$ para as diferentes antocianidinas. A representação do $\log \alpha$ vs antocianidinas,

em ordem crescente de hidrofobicidade, resulta na predição do comportamento de eluição mensurável e dos tempos de retenção de uma antocianina individual. Assim, o tempo de retenção de todas as antocianinas com os mesmos glicosídeos pode ser encontrado a partir da retenção de um deles e de um gráfico conhecido correspondente a outro grupo de glicosídeos.

GOIFFON *et al.* (1991) interpretaram os dados com o tratamento geral das constantes fragmentais derivadas por REKKER & KORT(1979); de acordo com estes autores as características de retenção de uma molécula dependem de sua hidrofobicidade e podem ser determinadas considerando-se cada parte da molécula de um soluto dado, tomando-se em conta as suas propriedades de hidrofobicidade. Assim, a retenção de uma antocianina simples pode ser calculada considerando os dois fragmentos: a aglicona e o glicosídeo. Seguindo a teoria de Rekker e Kort, deveria existir uma relação linear entre $\log \alpha$ e a hidrofobicidade do soluto.

Mediante tratamento matemático, considerando-se o coeficiente de partição entre fases aquosas e orgânicas P , o fator de capacidade k' e a selectividade α , os autores acima relataram as seguintes observações:

- a) a adição de um segundo açúcar à uma antocianina monoglicosilada tem menor efeito na retenção que a adição de um açúcar à uma aglicona.
- b) uma terceira molécula de açúcar tem um efeito levemente maior que o segundo açúcar em caso de uma estrutura ramificada. Interações entre dois açúcares parecem ser mais fortes em um diglicosídeo que em uma molécula de triglicosídeo.
- c) a adição de uma glicose na posição 5- de uma aglicona produz uma diminuição em $\log \alpha$ maior que a apresentada pela mesma adição à antocianina glicosilada na posição 3. Assim, de acordo com os autores acima, deve existir uma interação entre o açúcar na posição 3 e a glicose na posição 5.
- d) a modificação da fase móvel, (como um aumento na proporção de acetonitrila) produz uma diminuição em $\log \alpha$ maior para diglicosídeos e triglicosídeos que para monoglicosídeos produzindo uma alteração na ordem de eluição.

e) a contribuição da aglicona calculada da mesma forma, mostra que a adição de um grupo hidroxilado à pelargonidina, cianidina ou peonidina produz a mesma variação, (ΔOH), de $\log \alpha$. O mesmo efeito produz a adição de um grupo metoxilo à cianidina ou pelargonidina [(ΔOCH_3) variação de $\log \alpha$]. Isto possibilita a dedução dos valores de retenção de uma antocianina apartir de outra.

Através da teoria de REKKER, que estabelece que a retenção destes compostos deve-se a dois fatores independentes, um específico da aglicona e o outro do açúcar, obteve-se uma melhor compreensão da retenção de antocianinas. Estes dois fatores foram estudados e as regras que governam a cromatografia das antocianinas foram estabelecidas, permitindo prever a retenção de qualquer composto, graficamente ou por cálculos (GOIFFON *et al.*, 1991).

HEBRERO *et al.* (1989) separaram, identificaram e quantificaram mono e diglicosídeos de antocianinas de uma variedade de uvas híbrida (*Vitis vinifera* x *Vitis berlandieri* 41B), propondo o uso de CLAE com detector de arranjo de diodos para a identificação das antocianinas presentes sem isolamento prévio. Os autores usaram CLAE com detector de arranjo de diodos, usando coluna Nucleosil C-18 (25cm x 0,46cm, 5 μ m), com o sistema de solventes: A) ácido fórmico 10 % em água e B) acetonitrila, em eluição por gradiente, e fluxo 1,0 ml/min. A detecção foi realizada simultaneamente a 280, 310, 330, e 525nm. A análise das antocianidinas foi realizada sob idênticas condições. A determinação quantitativa das antocianinas presentes nas uvas foi avaliada a partir das áreas dos picos cromatográficos monitorados a 525 nm. A quantificação de monoglicosídeos e diglicosídeos de malvidina foi calculada em relação a 3-monoglicosídeo e 3,5-diglicosídeo de malvidina, respectivamente. A caracterização foi inicialmente procedida através da análise dos 20 picos obtidos do perfil cromatográfico do extrato, identificados através do tempo de retenção em CLAE e das propriedades espectrais.

Os autores acima encontraram que as antocianidinas presentes nesta variedade de uvas são delfinidina, cianidina, petunidina, peonidina, e malvidina. A mesma ordem de eluição observada nas antocianidinas persiste nos

diferentes grupos derivados, isto é, entre os 3-monoglicosídeos e 3,5-diglicosídeos. Entretanto, a acilação das antocianinas envolve uma perda de polaridade em relação aos correspondentes compostos não acilados, com um aumento no tempo de retenção.

HEBRERO *et al.* (1989) consideraram finalmente que a hidroxilação ou metilação do anel B em alguns casos pode afetar a polaridade mais que a presença ou ausência de uma segunda molécula de açúcar. Estes autores encontraram que o comprimento de onda máximo dos espectros visíveis das diferentes antocianinas mostraram um deslocamento batocrômico com o aumento da proporção de acetonitrila. Ainda, os máximos de absorção mostraram pequenas diferenças quando usava-se proporções de ácido fórmico de 4,5% ou 10%, indicando que a proporção de ácido afeta o espectro destes compostos.

LEE & HONG (1992), avaliando a literatura sobre análise cromatográfica de antocianinas, observaram que a maioria dos sistemas CLAE empregados para caracterização de antocianinas, utilizam cromatografia em fase reversa com colunas ODS (fase ligada C-18) baseadas em sílica. Entretanto, partículas de 5-6 μm geralmente representam um bom compromisso em termos de conveniência. Estes autores observaram que a eluição por gradiente parece ideal para a separação de antocianinas que estruturalmente são muito similares. A maioria dos sistemas de solventes utilizados incluem eluição por gradiente binário com metanol ou acetonitrila como modificadores orgânicos e, ocasionalmente, eluição isocrática para frutas que têm um perfil de pigmentos relativamente simples.

Além disso, esses sistemas quase sempre incluem um ácido para assegurar que as antocianinas se encontrem na forma flavilium, sendo os mais empregados, o ácido fórmico, acético, fosfórico, trifluoroacético e perclórico, bem como o emprego de detecção na faixa de comprimento de onda de 520 a 546nm.

VERSARI *et al.* (1997) determinaram o perfil antociânico de diferentes frutas vermelhas usando CLAE combinado com detector de arranjo de diodos e adotando duas condições de eluição diferentes. Para análise das amostras, foi empregada uma coluna fase reversa baseada em sílica Nucleosil 120 C18-3ODS (250 x 3,9 mm, 5µm) , à uma temperatura de 40°C. Como fase móvel foram empregados ácido fórmico e acetonitrila, com um método de eluição isocrática e outro em gradiente. A identificação das antocianinas em CLAE foi baseada nos tempos de retenção e no espectro visível que foram comparados com valores encontrados na literatura. Os autores relataram que a detecção com arranjo de diodos é uma poderosa ferramenta na identificação e caracterização do perfil de antocianinas de frutas vermelhas, entretanto os tempos de retenção dependem da glicosilação e das condições de eluição. De acordo com os autores, as diferenças entre as diversas frutas analisadas em termos de números de picos e áreas relativas, pode fornecer uma “impressão digital” para a identificação de frutas vermelhas, uma vez que o perfil antociânico é distinto para cada fruta qualitativa e quantitativamente e portanto útil na detecção de adulterações em produtos que contenham antocianinas ou na identificação de corantes adicionados a alguns produtos.

DAVIES & MAZZA (1992) separaram eficientemente as antocianinas e os flavonóides de pétalas de “*Monarda fistulosa*” em coluna em fase reversa Spheri 10-RP18 (250 x 4,6 mm., 10 µm) por CLAE, equipado com detector de arranjo de diodos, usando o sistema de solventes:A) ácido fórmico:água (5:95 v/v) e B) metanol, com eluição por gradiente. A detecção a 280 e 510 nm revelou a presença de 16 picos incluindo 5 pigmentos antociânicos. Para a caracterização dos pigmentos foram usadas técnicas analíticas auxiliares, tais como hidrólise ácida, cromatografia em papel e cromatografia em camada delgada. Os derivados da antocianina principal e a presença de acilação foram determinados baseados nos tempos de retenção e no espectro UV-visível. Estes autores encontraram que o perfil de flavonóides de “*Monarda fistulosa*” L. contém várias formas aciladas de pelargonidina 3,5- diglicosídeo, a principal antocianina sendo caracterizada como pelargonidina 3,5-diglicosídeo acilada

com ácidos malônico e coumárico, representando 81% do conteúdo total de antocianinas.

BAUBLIS & BERBER-JIMENEZ(1995) usaram CLAE no estudo das antocianinas de plantas da família Commelinaceae (especie *Tradescantia pallida*) que mostraram excelente estabilidade quando comparadas com outras antocianinas. Os autores analisaram o extrato de tradescantia usando CLAE com detector de arranjo de diodos a 520nm, com coluna YMC-Pack ODS-AM (250 x 4,6 mm, 5 µm) , com os solventes: A) ácido fórmico 10% em água (v/v) e B) metanol/tetrahidrofurano (1:1, v/v) com eluição isocrática de 15% de A em B e fluxo de 0,9 ml/min. A separação e coleta da antocianina principal foi realizada com CLAE semipreparativa usando uma coluna YMC-Pack ODS-AM (250x 10 mm), com o perfil de eluição idêntico ao da separação analítica e fluxo de 4,2 ml/min; uma segunda purificação foi feita com o sistema de solventes A) ácido fórmico 10% em água (v/v) e B) acetonitrila, com o perfil de eluição sendo 25% de B em A com fluxo de 2,4 ml/min. De acordo com os referidos autores, foi identificada a antocianina principal de *T.pallida*, a 3-O-[6-O-[2,5-di-O-(*E*)- α -L-arabinofuranosil]- β -D-glucopiranosil]-7,3'-di-O-[6-O-(*E*)-feruloil- β -D-glucopiranosil] cianidina, através de hidrólise química, espectrometria de massa, e H NMR.

1.3 CARACTERIZAÇÃO DE ANTOCIANINAS PRESENTES EM ALIMENTOS

CHANDRA *et al.*(1992) caracterizaram as antocianinas de vários cultivares de cereja (*Prunus cerasus* L.), visando identificar os cultivares com maior conteúdo antociânico. Os pigmentos foram purificados por adsorção em cartucho Sep-Pak C-18 previamente à análise em CLAE. As amostras foram analisadas em colunas C-18 Chemcopak e Capcellpak (10 x 250 mm, 5 µm), com a fase móvel: ácido fosfórico a 4% aquoso / acetonitrila (80:20, v/v) em condições de eluição isocrática com fluxo de 1,5 ml/min. As amostras foram analisadas a 520 nm com detector UV-visível. As antocianinas foram identificadas por comparação de seus tempos de retenção com amostras de suco de amora conforme descrito por HONG e WROLSTAD (1990). Os teores

de antocianinas foram expressos como porcentagens de área de pico dos cromatogramas obtidos. Os autores identificaram cianidina 3-soforosídeo, cianidina 3-glicosilrutinosídeo, cianidina 3-glicosídeo, e cianidina 3-rutinosídeo nos cultivares Monymorency, English Morello e tres híbridos “Michigan State University”. Também peonidina 3-galactosídeo foi reportada pela primeira vez em cerejas.

BAKKER *et al.*(1994) analisaram qualitativa e quantitativamente a composição antociânica de sucos de 39 genótipos de morango, usando CLAE com detector de arranjo de diodos. Foi utilizada uma coluna ODS Hypersil (100 x 2,1 mm, 5 µm), a 40 °c, com fluxo de 0,3 ml/min do sistema de solventes: A) 6 g/l ácido perclórico aq. e B) metanol , eluidos em gradiente linear. a análise quantitativa foi realizada com pelargonidina-3-glicosídeo como padrão externo. Os autores encontraram que o conteúdo de antocianinas nos sucos de morango apresentam uma média de 99,2 mg/l. Foram observadas treze (13) antocianinas em trinta e nove (39) genótipos de morango. A análise espectral evidencia a presença de oito pelargonidinas e duas cianidinas. Cianidina e pelargonidina-3-glicosídeo-succinato foram tentativamente identificadas.

GAO & MAZZA (1995a) isolaram e caracterizaram as antocianinas simples e aciladas de “blueberries” (*Vaccinium angustifolium* Ait.), usando CLAE com detector de arranjo de diodos, em coluna Supercap Pep-S (4 x 250mm, 5µm), e eluição por gradiente do sistema de solventes formado por A) 5% de ácido fórmico em água e B) metanol, com fluxo de 1,2 ml/min, a 26°C. A caracterização das antocianinas foi realizada através de hidrólise ácida e análise das agliconas e ácidos aromáticos através de CLAE, enquanto os ácidos alifáticos e açúcares foram analisados por CG. A identidade da maioria das antocininas foi confirmada por comparação com padrões de pigmentos obtidos de fontes comerciais e/ou de cascas de uvas “Cabernet Sauvignon”. Os resultados mostraram que “blueberry” contém ao menos 25 antocianinas, incluindo glicosídeos e galactosídeos acilados de delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina e malvidina.

Os mesmos autores (GAO & MAZZA, 1995b) também caracterizaram e quantificaram antocianinas e fenólicos incolores em 11 cultivares e híbridos de cereja (*Prunus avium*) através de CLAE e CG. O sistema CLAE utilizado esteve equipado com coluna em fase reversa SuperPac Pep-S (4 x 250mm, 5µm) precedida de coluna de guarda, com detector de arranjo de diodos. A fase móvel formada pelo sistema de solventes A) ácido fórmico em água (5:95, v/v) e B) metanol, em eluição por gradiente com fluxo de 1ml/min. Todos os genótipos de cereja de cor escura continham 3-rutinosídeo e 3-glicosídeo de cianidina como antocianinas principais e os mesmos glicosídeos de peonidina como antocianinas menores. Outras antocianinas menores, como pelargonidina 3-rutinosídeo foram caracterizadas pela primeira vez em cerejas.

TERAHERA *et al.* (1994) determinaram a composição antociânica do arroz vermelho aromático (*Oryza sativa* var. *Indica Tapol*) e seu vinho. A determinação da composição antociânica foi realizada usando CLAE com coluna Nucleosil 5C8 (250 x 4,6 mm) a 35 °C com fluxo de 1ml/min com detecção a 520nm. O método empregou eluição por gradiente linear dos solventes A) ácido fosfórico a 1,5% e B) 1,5% de ácido fosfórico, 20% de ácido acético, 25% de acetonitrila em água (v/v). Os autores separaram e identificaram sete (7) picos através de co-cromatografia com padrões internos. As antocianinas principais foram identificadas como cianidina 3-glicosídeo e peonidina 3-glicosídeo. Outros pigmentos menores foram identificados como cianidina 3,5-diglicosídeo, cianidina 3-soforosídeo, cianidina 3-rutinosídeo e peonidina 3-rutinosídeo, entretanto um desses pigmentos não foi identificado. Durante a preparação e armazenamento se manteve constante a proporção de peonidina 3-glicosídeo, ainda que cianidina 3-glicosídeo diminuiu de 56% a 26%.

LEE & WICKER (1991) isolaram e caracterizaram os pigmentos antociânicos da casca de Lychee (*Litchi chinensis* Sonn.). As antocianinas foram identificadas depois de separadas por CLAE em coluna C-18, pelo espectro obtido “on-line” em detector de arranjo de diodos, por hidrólise alcalina e hidrólise ácida. Os autores empregaram coluna Bondapak C-18 para a análise das antocianidinas com fase móvel metanol/ácido acético/água

(20:10:70; v/v/v), fluxo de 1,2 ml/min. Para a análise das antocianinas usaram coluna PLRP-S (4,6 x 250 mm), eluição em gradiente do sistema de solventes A) 3,5% de ácido fosfórico em água e B) acetonitrila. Para identificar as antocianidinas foram usados antocianidinas de “blueberries” como antocianidinas padrões. Foi identificada a antocianina principal como cianidina 3-rutinosídeo, além de cianidina 3-glicosídeo e malvidina 3-acetilglicosídeo.

1.4 APLICAÇÕES em CLASSIFICAÇÃO QUIMIOTAXONÔMICA

Análises de antocianinas e outros flavonóides através de CLAE foram utilizadas para a distinção entre diferentes espécies de plantas.

GERASOPOULUS & STAVROULAKIS (1996) estudaram a composição e conteúdo de antocianinas em 4 cultivares de amora (*Morus sp*) usando CLAE, empregando coluna Supecosil LC-18 (250 x 46 mm) com detector de arranjo de diodos. A identificação da composição antociânica de amoras cv. Mavromournia, foi realizada comparando-se com padrões de antocianina de suco de framboesa vermelha (cv Heritage. Os autores encontraram que a composição antociânica de amora cv. Mavromournia comparada com os outros cultivares apresenta diferenças em termos de sua derivação genética. A composição antociânica desta variedade foi similar à encontrada em groselha vermelha cv Heritage ou Marcy. Foram identificadas 4 antocianinas correspondentes a 4 distintos picos: cianidina-3- soforosídeo, de cianidina 3-glucorutinosídeo, pelargonidina 3-glicosídeo, com o terceiro pico não identificado.

GIUSTI & WROLSTAD (1996) identificaram e quantificaram os pigmentos antociânicos de rabanete (*Raphanus sativus* L.) e compararam a estabilidade destas antocianinas à hidrólise ácida com outras antocianinas contendo pelargonidina. Os autores empregaram dois sistemas cromatográficos: Primeiro, para separar as antocianinas de rabanete usaram uma coluna Polymer Labs PLRP-S (5 micron) 250 x 4.6 mm i.d., com um sistema de solventes A: acetonitrila e B: 4% de ácido fosfórico com eluição em

gradiente linear e no segundo as antocianinas saponificadas, antocianidinas, e pigmentos parcialmente hidrolizados foram separados com coluna Supelcosil LC-18 (5 μ m) com o sistema de solventes A: acetonitrila e B: 4% de ácido fosfórico, 10% de ácido acético, 5% acetonitrila e água, com eluição em gradiente linear. Ambos sistemas acoplados a detector de arranjo de diodos a 280, 310 e 520 nm.

Os autores encontraram que as duas antocianinas principais foram pelargonidina 3-soforosídeo-5-glicosídeo, acilada com ácido malônico e ácido p-coumarico e a segunda com ácido ferúlico em uma razão molar de 1/1. Em relação ao estudo da estabilidade de derivados de pelargonidina à hidrólise ácida, os autores identificaram os diferentes derivados de pelargonidina em diferentes tempos de hidrólise de 5 a 70 min, através dos tempos de retenção de pelargonidina 3-glicosídeo e pelargonidina 3-soforosídeo purificados e de seus espectros de absorção.

VLAHOV (1992) estudou a variação de flavonols, flavonas e antocianinas em tres variedades de oliva (*Olea europaea*) durante a maturação visando a caracterização das frutas. As amostras foram analisadas por CLAE em fase reversa usando uma coluna Microspher C18 (10cm x 4,6mm., 3 μ m) com o sistema de solventes A): metanol e B) ácido acético: água (5:95), com eluição em gradiente linear e fluxo de 1,1 ml/min. Os picos foram identificados por comparação dos tempos de retenção com padrões puros, como cianidina-3-glicosídeo e cianidina-3-rutinosídeo. No que se refere as antocianinas, cianidina-3-rutinosídeo foi a única antocianina encontrada nas variedades Cassano e Leccino. Em contraste com estas, nas frutas da variedade Gianaffa, cianidina-3-glicosídeo estava presente junto com cianidina-3-rutinosídeo, as quais aparecem simultaneamente e aumentam durante o período de maturação, mantendo constante a razão 1 entre elas.

KADER *et al.* (1996) isolaram e identificaram os compostos fenólicos, incluindo flavonóides, de "highbush blueberries" (*Vaccinium corymbosum*, L., cultivar "Coville") cultivados no noreste da França visando a caracterização química de plantas de "blueberry" cultivadas nesse país. O pigmento

antociânico extraído foi analisado por CLAE com detector de arranjo de diodos, em coluna fase reversa Lichrosorb 100 RP-18 (250 x 4 mm, 5 µm) usando fase móvel composta pelos solventes A) água/ácido fórmico (90:10, v/v) e B) água/acetonitrila/MeOH/ácido fórmico (40:22,5:22,5:10,v/v). A eluição foi efetuada com fluxo de 1,0 ml/min. em gradiente a 22 °C. Para identificar os 15 picos do cromatograma foram usados padrões de trabalhos prévios. Os autores identificaram 3-monoarabinosídeos, 3-monogalactosídeos e 3-monoglicosídeos de cianidina, delphinidina, petunidina e peonidina.

PRICE & WROLSTAD (1995) separaram os pigmentos antociânicos de “Royal Okanogan Huckleberry” e os identificaram mediante seus tempos de retenção e espectro UV-visível dos pigmentos purificados e seus produtos de hidrólise. Os autores usaram cartucho Sep-pak C-18 para preparação da amostra das antocianinas e coluna Supelcosil C18 (250 x 4,6 mm), com o sistema de solventes A) 15% de ácido acético (aq) e B) 100% de acetonitrila em eluição isocrática a 85% do solvente A e fluxo de 1,5 ml/min, detector de arranjo de diodos a 520nm, para comparação das antocianinas com as de outras fontes e para separação das antocianidinas de sucos da fruta e das frações purificadas após hidrólise ácida; entretanto um segundo sistema com coluna Spherisorb ODS-2 (250 x 4,6 mm), eluição em gradiente do sistema de solventes A) 4% de ácido fosfórico(aq) e B) 100% de acetonitrila e fluxo de 1,3 ml/min, foi usado para separar as antocianinas não aciladas e purificar os pigmentos individuais mediante sucessivos coletas manuais. A antocianina principal encontrada foi petunidina 3-(p-coumaril-rutinosido)-5-glicosídeo. Foram identificadas onze (11) antocianinas, tendo apenas tres (3) agliconas, petunidina, delphinidina, e malvidina com a mesma substituição glicosídica, e vários graus de acilação com ácidos p-coumárico, ferúlico, e caféico.

ANDERSEN (1987) isolou as antocianinas de frutas de *Vaccinium Uliginosum* L. (Bog Whortleberry) por combinação de cromatografia “droplet counter-current” (DCCC) e CLAE semi-preparativa. DCCC foi realizada com n-butanol-ácido acético-água (4:1:5, v/v) como fase móvel. Foram recolhidas cento e sessenta (160) frações, cada uma de 4ml. O eluato foi monitorado a

510nm, observando-se um pico largo desde a fração 28 até a fração 152. A cada tres alíquotas, foram monitoradas as frações com cromatografia em camada delgada (CDD) e CLAE analítico. As frações contendo as mesmas antocianinas foram recolhidas e submetidas a CLAE semi-preparativa com coluna Supelcosil LC-18 (25 x 1cm, 5 μ m), empregando dois solventes: A) ácido fórmico-água (10:90, v/v) e B) ácido fórmico-água-metanol (10:40:50, v/v) com eluição em gradiente, volume de injeção de 100-150 μ l, e o fluxo de 3,0 ml/min, com coleta manual das frações. As antocianinas foram analisadas por CLAE com detector de arranjo de diodos, em coluna analítica Supelcosil LC-18 (25 cm x 4,6 mm, 3 μ m), com eluição em gradiente linear dos solventes A e B, e fluxo de 1,5 ml/min. Após hidrólise ,emprego de dados espectrais e co-cromatografia com compostos autênticos, foram identificados treze (13) pigmentos como 3- monoglicosídeos de malvidina, delfinidina, cianidina e petunidina, combinados com glicose, arabinose e galactose.

1.5 CARACTERIZAÇÃO DE ANTOCIANINAS PARA VITICULTURA E ENOLOGIA

É de grande interesse prático , em viticultura como em enologia, dispor de métodos de análises adequados para a análise de antocianinas quantitativa e qualitativa. Isto torna possível a caracterização de cultivares de acordo com a composição antociânica, o estudo da biossíntese de antocianinas em uvas e o monitoramento das alterações nos conteúdos destes compostos durante o processo de vinificação. Diversos autores estudaram as relações entre grupos homogêneos de pigmentos antociânicos em vinhos com critério químico estruturais tais como número de grupos hidroxila ou metoxila no anel B das antocianidinas ou os diferentes tipos de acilação, visando a catalogação e tipificação varietal. O conhecimento dos pigmentos antociânicos é importante também no acompanhamento dos processos de vinificação e envelhecimento, assim como nos estudos de biossíntese de compostos durante esses processos.

FERNANDEZ-LOPES *et al.* (1992) estudaram a evolução dos pigmentos antocianicos de um cultivar de *Vitis vinifera* L. durante a maturação mediante CLAE. O método utilizado empregou coluna Spherisorb ODS (4 x 150mm, 5µm), eluição por gradiente com o sistema de solventes A: ácido fórmico 55,0 g/l em H₂O e B: acetonitrila e detector de arranjo de diodos. As quantidades de antocianinas foram expressas como malvidina-3-glicosídeo, encontrando-se que o conteúdo total de antocianinas aumentava de 310 mg/kg a 1139 mg/kg na maturidade fisiológica. Os referidos autores também encontraram que os pigmentos monoglicosídeos representavam de 82-87% do conteúdo total de pigmentos com malvidina- 3 glicosídeo sendo o mais abundante. Os derivados de peonidina foram menos abundantes no começo do amadurecimento, mas com a maturidade os conteúdos de derivados de cianidina tornam-se menores.

PAZO *et al.*(1995) separaram e quantificaram de forma relativa as antocianinas de seis variedades de uvas negras cultivadas na Galícia (Espanha) visando uma diferenciação varietal, mediante CLAE fase reversa com detector de arranjo de diodos. As amostras de vinho foram purificadas com cartucho Sep-Pak C-18. A separação foi realizada em coluna µBondapak C-18 (3,9 x 300 mm, 10 µm), com o sistema de solventes A) 5% de ácido fórmico (aq) e B) metanol, com eluição em gradiente. A identificação das antocianinas foi realizada através de seus tempos de retenção e dos espectros UV-visível obtidos com detector de arranjo de diodos. Os autores observaram que em todas as variedades estudadas, a porcentagem de 3-glicosídeo de malvidina foi superior a 88%, enquanto o 3-glicosídeo de cianidina não superava 1,8%. Já a porcentagem de antocianinas trissubstituídas no anel B (derivados de delphinidina, petunidina e malvidina) foi muito superior aos disubstituídos (derivados de cianidina e peonidina). As variedades estudadas podem classificar-se no grupo da malvidina por conter mais do 35% de 3-glicosídeo de malvidina. Os autores encontraram que levando-se em conta as porcentagens de área dos tres derivados de malvidina, 3-glicosídeo, 3-(6-O-p-O-acetil)glicosídeo e 3-(6-O-p-cumaril)glicosídeo, obteve-se uma boa diferenciação varietal.

GAO & CAHOON (1995) estudaram o perfil antociânico de uvas híbridas *Vitis* cv. Reliance. Os autores identificaram as antocianinas mediante comparação sistemática com padrões de antocianinas e antocianidinas por CLAE fase reversa C18, pela determinação da fração glicosídica depois de completa hidrólise ácida e pelas medidas espectrais. A comparação dos tempos de retenção das antocianinas e antocianidinas com padrões foi feita com sistema CLAE com coluna RP-18 Spherisorb (150 mm x 4,6mm, 5µm) com detector UV-VIS. Os solventes usados foram: A) ácido fórmico a 10% em água e B) acetonitrila, eluídos em gradiente linear com fluxo de 1ml/min. As amostras foram purificadas em cartucho Maxiclean C-18. Os perfis cromatográficos obtidos por CLAE do extrato de antocianinas foram acompanhados a 520 nm e apresentaram sete (7) picos, identificados como delfinidina -3-glicosídeo, cianidina 3-glicosídeo e peonidina 3-glicosídeo. Outros picos foram identificados tentativamente como cianidina 3- glicosídeo, petunidina 3-glicosídeo, malvidina 3-glicosídeo e derivados de cianidinas acilados.

ROMANI *et al.* (1996) estudaram a composição de polifenóis e polisacarídeos de vinhos e uvas Tuscan, visando a identificação de vinhos através de parâmetros químicos específicos e estabelecimento da correlação entre as características químicas das uvas e qualidade dos vinhos. Foram analisadas amostras de uvas (cv.Sangiovese) de tres (3) zonas da região de Chianti (Italia) e seus correspondentes vinhos. A fração antociânica foi analisada por CLAE-DAD, usando uma coluna Aquapore RP 300 (250 x 4,6mm). As antocianinas foram separadas usando as seguintes fases móveis: A) água / ácido acético(9/1, v/v), B) água/ acetonitrila / metanol/ ácido acético (45:22,5:22,5:10, v/v), eluídas em gradiente linear de três etapas, com espectro UV-visível sendo monitorado entre 250 e 600nm e os cromatogramas detectados a 535, 330, 310 e 280 nm. Os autores encontraram que os resultados obtidos para polifenóis e polissacarídeos nas tres áreas estudadas mostravam que as uvas produzidas tinham o potencial químico necessário para vinhos de alta qualidade.

CAMEIRA-DOS-SANTOS *et al.* (1996), estudaram os componentes (pigmentos vermelhos-laranjados derivados de antocianinas) presentes no depósito coloidal superficial da membrana polimérica utilizada durante a microfiltração do vinho mediante análise com CLAE. Depois da purificação em coluna com sílica gel fase normal, os pigmentos laranjas desconhecidos obtidos na fração 2 foram isolados por CLAE semi-preparativa, empregando a coluna Bondapak RP-18 (300 x 7,8 mm, 10 μ m), fluxo de 2ml/min, a 30 °C, com os solventes A) ácido acético a 2,5% e B) acetonitrila/solvente A, (80:20, v/v), eluição em gradiente linear. Os vinhos e extratos da membrana foram analisados por CLAE usando detector de arranjo de diodos com coluna fase reversa Lichrospher 100-RP18 (250 x 4mm, 5 μ m), com os sistemas de solventes A) ácido fórmico em água 20ml/min e B) acetonitrila/água/ácido fórmico (80:18:2, v/v), eluição em gradiente linear. A caracterização das antocianinas foi realizada por comparação dos tempos de retenção e dos espectros UV-VIS com compostos de referência e dados da literatura. Os autores detectaram novos pigmentos vermelho-laranja derivados de antocianinas no curso dos experimentos de microfiltração que resultariam da condensação entre as antocianinas do vinho (possivelmente os 3-glicosídeos e 3-p-coumaroilglicosídeo de malvidina) e um outro componente do vinho, que não é um flavonol. Esta reação participaria no mecanismo de alteração da cor durante o envelhecimento dos vinhos.

BAKKER *et al.* (1986) determinaram o conteúdo total de antocianinas livres em vinhos tinto de mesa e vinho-do-porto por método CLAE e por métodos espectrais (método de Somers & Evans). Foi empregada no sistema CLAE uma coluna em fase reversa Spherisorb- Hexyl Shandon (5mm x 100 mm, 5 μ m) a 35 °C, com eluição em gradiente de ácido perclórico 0,6 % aquoso e metanol, com detector UV-VIS a 520 nm. A concentração de antocianinas nos vinhos foi quantificada com padrão externo de cloreto de malvidina-3-glicosídeo. A cor do vinho deve-se principalmente aos derivados antociânicos da fruta (monoméricos ou livre) e aos pigmentos poliméricos formados a partir das antocianinas, Somers & Evans desenvolveram um método espectral para estimar a extensão da formação de pigmentos poliméricos. As cores do vinho e

a cor devido aos pigmentos poliméricos (considerada como cor residual do vinho após branqueamento das antocianinas com alta concentração de metabisulfito de sódio.) foram medidas a 520 nm no pH do vinho, enquanto a cor dos pigmentos totais foi medida em HCl 1 M a 520 nm. O método CLAE permite a medição direta de antocianinas em vinhos vermelhos, com a integração das áreas dos picos das antocianinas monoméricas individuais determinando o conteúdo total de antocianina monomérica. Os resultados mostraram que os conteúdos de antocianinas totais medidos por CLAE foram menores que aqueles estimados pelo método espectral de Somers & Evans, com as diferenças entre os dois métodos sendo maiores para vinhos jovens, diminuindo com o envelhecimento do vinho. A CLAE mostrou que os vinhos de mesa jovens apresentam 20 a 35% de pigmentos poliméricos, e os vinhos do porto novos, de 17 a 69% de pigmentos poliméricos que aparecem como curvas difusas com longos tempos de retenção. Segundo os referidos autores, isto indicaria que os pigmentos oligoméricos formados no envelhecimento do vinho são parcialmente branqueados pelo bissulfito empregado no método espectral de modo que o conteúdo de antocianinas calculadas nesta base é muito elevado.

DALLAS *et al.* (1996) investigaram as reações de condensação produzidas durante o envelhecimento dos vinhos entre antocianinas e compostos fenólicos, formando pigmentos poliméricos. Os autores usaram várias antocianinas (3-glicosídeos de cianidina, peonidina e malvidina) e procianidina B₂ [(-)epicatequina-(4 β -8)-(-) β -epicatequina], com e sem a presença de acetaldeído, usando CLAE para estimar a degradação da concentração de antocianinas e procianidinas e detector de arranjo de diodos (DAD) para caracterização dos novos pigmentos poliméricos. Os autores empregaram CLAE preparativa com coluna Spherisorb C18 (250 x 10 mm, 5 μ m), com os solventes A) ácido acético a 2,5% e B) acetonitrila / ácido acético a 2,5% (80/20, v/v) com eluição em gradiente linear e fluxo de 2ml/min, com detector UV/VIS; para CLAE analítica, os autores citados empregaram coluna C18 Superspher 100 (250 x 4 mm, 5 μ m) com o seguinte sistema de solventes A) ácido fórmico a 40%, B) acetonitrila e C) água

bidestilada com eluição em gradiente linear com detector de arranjo de diodos a 520 nm.. De acordo com os autores, a adição de acetaldeído às soluções modelos contendo cianidina 3-glicosídeo, peonidina 3- glicosídeo e malvidina 3-glicosídeo, provocou um incremento da absorvância junto com um deslocamento batocrômico. Os referidos autores também detectaram um novo composto por CLAE em cada solução modelo. Os novos pigmentos foram monitorados por CLAE durante 4 meses mostrando que a procianidina B transformou-se em epicatequina e em outras procianidinas.

MAYEN *et al.* (1994) estudaram as mudanças nas frações de antocianinas livres e pigmentos poliméricos em mostos e vinhos de Cabernet Sauvignon e Tempranillo para comparar estas variedades com as cultivadas em regiões secas e quentes. Os autores isolaram as antocianinas com cartucho Sep-pak C-18 e as identificaram empregando sistema CLAE com coluna C-18 (220 x 4,6mm, 5µm), com eluição em gradiente linear dos solventes ácido fórmico 10% em água e acetonitrila, com fluxo de 1ml/min. e detector de arranjo de diodos, através dos tempos de retenção e dos espectros UV-VIS. As antocianinas não poliméricas identificadas foram delfinidina, peonidina e malvidina 3-glicosídeos, delfinidina, petunidina, peonidina e malvidina-3-(6-acetil-glicosídeo), malvidina-3-(6-cafeil-glicosídeos), cianidina, petunidina, peonidina, delfinidina e malvidina3-(6-coumaril-glicosídeos). Os resultados obtidos mostraram que as antocianinas livres evoluem similarmente nos mostos das duas variedades. Os derivados não acilados prevalecem nos dois tipos de mostos, entretanto os derivados acilados apresentam-se em maior quantidade na fermentação de Cabernet Sauvignon que em Tempranillo, também Cabernet Sauvignon apresenta maior tendência a produzir polímeros no período de post-fermentação produzindo vinhos mais intensamente coloridos.

BAKKER & TIMBERLAKE (1997) visando a caracterização de antocianinas (vitisinas) formadas durante o processo de envelhecimento dos vinhos empregaram CLAE semipreparativa para isolar os novos compostos e CLAE analítica para testar a pureza dos compostos coletados. As amostras de

vinho previamente purificadas com coluna Sephadex LH-20, foram retidas em cartucho Sep-pak C18 e separadas em CLAE semipreparativa com coluna Spherisorb ODS-2 (100 x 8 mm, 5 µm) a 40 °C com um sistema de solventes A) tetrahidrofurano 1% e B) metanol, com eluição em gradiente linear e fluxo de 2ml/min. Usando o sistema para CLAE analítica com coluna Spherisorb-hexyl de fase reversa (5 x 100mm) a 35 °C com fluxo de 1ml/min do sistema de solventes A) ácido perclórico a 0,6% em água e B) metanol com eluição em gradiente linear e detecção a 529, 495 e 280 nm, os referidos autores eluíram quatro (4) compostos eluídos após malvidina 3- glicosídeo.

SINGLETON & TROUSDALE (1992) estudaram as interações antocianina- taninos em vinhos brancos e tintos usando sistema CLAE acoplado com detector de arranjo de diodos, com coluna em fase reversa C-18 (100 x 4,6 mm, 3 µm), eluição em gradiente dos solventes A) fosfato ácido de amônia a 0,05M em água a pH2,6 e B) 20% de A com 80% acetonitrila. Os autores trataram vinhos brancos com taninos de semente de uva, com antocianinas e com combinações de ambos. Depois de um tempo de fermentação, as amostras foram centrifugadas e analisados os fenóis e fenóis poliméricos totais. Os dados mostraram que as antocianinas podem formar complexos rapidamente com os taninos presentes em vinhos incrementando a quantidade de polímeros retidos no vinho. As observações mostram que as antocianinas ajudam na retenção dos taninos, e assim na astringência, que de outra forma é perdida, como acontece nos vinhos brancos devido a ausência de antocianinas.

Durante a conservação e envelhecimento de vinhos tintos acontecem alterações de cor, que podem ser explicadas em termos da formação progressiva de pigmentos condensados pela interação entre antocianinas e outros compostos fenólicos extraídos da uva. Vários autores estudaram estes processos, bem como a estrutura dos pigmentos formados e os mecanismos através dos quais são formados.

RIVAS-GONZALO *et al.*(1995) estudaram a interação entre catequina e malvidina monoglicosídeo em presença de acetaldeído em soluções modelo e os compostos formados nestas reações usando dados espectrofotométricos e cromatográficos, visando elucidar o mecanismo de formação de compostos condensados entre as antocianinas e outros compostos fenólicos durante o envelhecimento dos vinhos, produzindo a mudança da cor. Malvidina 3-monoglicosídeo foi isolada do extrato purificado por cromatografia líquida de media pressão. Os autores empregaram um sistema CLAE com coluna Lichrospher 100 RP-18 (250 x 4 mm, 5µm) a 30°C, tendo como fase móvel o sistema de solventes formado por A) ácido fórmico a 5% em água e B) acetonitrila, com eluição em gradiente linear. A detecção foi monitorada por detector de arranjo de diodos a 280 e 520 nm. Foi observado o aparecimento progressivo de novos picos, além do pico correspondente à malvidina 3-glicosídeo, correspondentes a dois pigmentos condensados. O espectro destes compostos foi similar àqueles das antocianinas, mas com um deslocamento batocrômico.

Também SANTOS-BUELGA *et al.*(1995) estudaram as interações entre catequina e malvidina para determinar a evolução da cor durante o envelhecimento de vinhos e detectar o tipo de compostos formados entre eles. Os autores empregaram CLAE para analisar catequina e malvidina 3-glicosídeo com detector de arranjo de diodos e coluna Lichrospher 100 RP-18 (250 x 4mm, 5µm) a 30 °C, com os solventes A)ácido fórmico a 5% em água e B) acetonitrila, eluídos em gradiente linear com fluxo de 1,5 ml/min. A aquisição de dados foi realizada simultaneamente a 520, 440, 320 e 280 nm. Os autores encontraram que as soluções contendo malvidina-3 glicosídeo e catequina a 32 °C apresentaram progressivo esmaecimento da cor além de deslocamento hipsocrômico no espectro UV-visível, sendo interpretado como evidência da interação entre catequina e antocianina com a formação de novos compostos amarelados. Os autores propuseram um mecanismo de formação desses pigmentos, onde a antocianina na forma flavilium ligaria através do C-4 ou C-8 com a catequina dando flavenes condensados enclores, as quais através de um mecanismo oxidativo transformariam-se em derivados tipo xantilium.

SARNI *et al.* (1995) estudaram a oxidação enzimática de compostos fenólicos em presença de ácido cafeoiltartárico e polifenoloxidase de uvas no processo de fabricação de vinhos produzindo um efeito de descoloração. Os autores estudaram soluções modelos contendo ácido cafeoiltartárico e a(s) antocianina(s) estudada(s) (cianidina 3-glicosídeo ou malvidina 3-glicosídeo). Cada antocianina foi purificada por CLAE em fase reversa em escala semipreparativa com coluna μ Bondapack C-18 (300 x 7,8 mm, 10 μ m), com o sistema de solventes A) água/ácido fórmico (98:2, v/v) e B) acetonitrila / água / ácido fórmico (80:18:2, v/v), eluídos em forma isocrática com fluxo de 2ml/min. As soluções com as misturas foram analisadas por CLAE com detector DAD com coluna em fase reversa Lichrospher RP 18 (175 x 4 mm, 5 μ m). Os compostos foram eluídos com fluxo de 1ml/min, temp. 30 °C, e como fase móvel os solventes A) ácido fórmico(20ml/L) e B) acetonitrilo/água/ácido fórmico (80:18:2, v/v), eluídos em gradiente linear. Para a quantificação, a detecção foi monitorada a 280nm. Os estudos cinéticos indicaram que cianidina 3-glicosídeo foi degradada principalmente por oxidação, entretanto malvidina 3-glicosídeo formou adutos com a quinona do ácido cafeoiltartárico. Vários produtos de oxidação, incluindo pigmentos vermelhos, foram detectados por CLAE.

CARREÑO *et al.* (1997) separaram e quantificaram o perfil antociânico de 32 variedades de uvas. Vários índices foram calculados a partir do conteúdo de antocianinas individuais relacionados com os processos de hidroxilação, metilação e esterificação no caminho biosintético. Os autores empregaram sistema CLAE com coluna Spherisorb ODS (300 x 4 mm, 5 μ m) com detector de arranjo de diodos, com eluição por gradiente do sistema de solventes A) ácido fórmico (1,2 ml/L) e B) acetonitrila, fluxo de 1,3 ml/min. e detecção monitorada simultaneamente a 310 e 525 nm. Os autores encontraram que a similaridade do perfil antociânico nas variedades é útil para propósitos quimiotaxonômicos e para estudos do metabolismo das antocianinas.

1.6 ESTABILIDADE DAS ANTOCIANINAS

INAMI *et al.*(1996) compararam a estabilidade dos pigmentos antociânicos de *Sambucus nigra* e *Sambucus canadensis* e procuraram verificar a associação entre as diferenças estruturais das antocianinas e a estabilidade desses pigmentos. Os autores usaram CLAE preparativa para isolar as antocianinas em coluna Capcell Pak C18 (20 x 250mm, 5 μ m) eluição em gradiente linear dos solventes A) 0,5% de ácido fosfórico em água (v/v) e B) 0,5% de ácido fosfórico em tetrahidrofurano 60%, fluxo de 9,0 ml/min, detector de arranjo de diodos a 520 nm. As antocianinas isoladas foram identificadas por análises espectrais e comparação dos espectros com padrões por CLAE analítica em coluna Capcell Pak C18 (4,6 x 250mm , 5 μ m), e com os mesmos solventes descritos para CLAE preparativo com eluição em gradiente linear e fluxo de 1,0 ml/min. Os autores encontraram que a antocianina de *S.canadensis*, cianidina 3-O- (6-O-E-p-coumaroil-2-O- β -D-xilopiranosil) - β -D-glicopiranosídeo-5-O- β -D-glicopiranosídeo, mostrou-se mais estável que cianidina 3-sambubiosídeo de *S.nigra*. Os referidos autores observaram que a cianidina 3-(E)-p-coumaroil-sambubiosídeo-5-glicosídeo transformou-se em tres novas antocianinas sob irradiação da luz, resultando em rápida isomerização da forma E para a forma Z do grupo p-coumaroil e sucessiva perda dos açúcares no C-5 desses dois isômeros.

SARNI- MANCHADO *et al.* (1996) estudaram a estabilidade e cor de antocianinas 3-glicosídeos de uvas e pigmentos naturais do vinho vermelho caracterizados como adutos vinilfenol antocianina 3- glicosídeo. Os compostos foram caracterizados mediante CLAE com coluna fase reversa Lichrospher 100-RP18 (250 x 4 mm, 5 μ m). As antocianinas 3-glicosídeos e seus adutos foram eluídos com os solventes A) 20 ml/L de ácido fórmico em água e B) acetonitrila- água- ácido formico (80:18:2, v/v) em gradiente linear com fluxo de 1ml/min a 30 °C. A caracterização dos compostos foi realizada por comparação da ordem de eluição e espectro UV-VIS monitorados a 250 e 600nm com dados da literatura e com dados de compostos de referência.

Os referidos autores utilizaram as áreas dos picos obtidos por CLAE de malvidina 3-glicosídeo e do aduto vinilfenol malvidina 3-glicosídeo para o acompanhamento da degradação. Foi encontrado que as soluções de antocianinas de uva perderam 80-90% do conteúdo total durante oito (8) dias de estocagem a 55 °C, enquanto as soluções dos derivados de antocianinas perderam apenas 40%. O pH exerce forte influência na cor e estabilidade das antocianinas mas sua influencia mostrou-se menor sobre novos compostos derivados de antocianinas assim como também apresentaram-se mais resistentes à degradação e branqueamento com sulfito que as antocianinas, que foram completamente descoloridas.

TSUKUI *et al.* (1996) extraíram os pigmentos de folhas vermelhas de *Perilla ocimoides* L. var. *crispa* (nome japonês, “shiso”), usadas para colorir picles no Japão, para estudar a composição antocianina e sua estabilidade ao aquecimento, irradiação de luz UV-VIS, e efeitos devido à adição de aditivos tais como polissacarídeos e glicirizinatos. Três pigmentos foram isolados por CLAE preparativo usando coluna Inertsil ODS (250 x 20 mm, 10 µm) com fluxo de 12 ml/min. O sistema de solventes usado foi acetonitrila-ácido tetrahydrofurano a 0,05%, 1:4, v/v) com eluição isocrática. CLAE analítica foi realizada com coluna Intertsil ODS-2 (250 x 4,6 mm, 5 µm) a 30°C, fluxo de 1 ml/min monitorado a 525 nm, com o mesmo sistema de solventes de CLAE preparativa. A estabilidade à luz UV e a temperatura foi avaliada através da área dos picos cromatográficos correspondentes. A composição antocianina foi analisada por CLAE analítica. A estrutura de três antocianinas isoladas foi determinada através dos análises em CLAE e CLAE-espectrometria de massas (LC/MS), como cianidina 3,5-diglicosídeo, cianidina 3-(6-p-coumaroilglicosídeo)-5-glicosídeo (shisonina) e cianidina 3-(6-p-coumaroilglicosídeo)-5-(6-malonilglicosídeo) (malonilshisonina). A antocianina predominante é malonilshisonina, que mostrou maior labilidade ao calor e à luz. Aumento no valor da absorbância foi observado apenas com a adição de glicirizinatos enquanto nenhum efeito foi observado com a adição de polissacarídeos.

1.7 ANTOCIANINAS NA DETECÇÃO DE ADULTERAÇÕES

A composição antociânica de varias frutas é muito distintivo e a análise de antocianinas foi utilizada com sucesso para detectar adulterações de sucos.

VAN GORSEL *et al.*(1992) analisaram a composição de sucos de nove espécies de frutas e de ameixas secas por seus conteúdos de açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos livres, compostos fenólicos e antocianinas, comparando a composição de sucos de ameixas frescas e processadas e avaliando os componentes que podem ser usados como marcadores de autenticidade. As antocianinas foram analisadas com CLAE com detector de arranjo de diodos e coluna Hibar Lichrosorb RP-18 (250 x 0,4mm, 5 µm) com dois sistemas de solventes como fases móveis, um formado por A) ácido fórmico a 10% e B) ácido fórmico 10% em 50% de acetonitrila, e o segundo formado por A) ácido fosfórico 0,1M e B) 20% de ácido fosfórico 0,1M mais 80% de acetonitrila, em eluição em gradiente e fluxo de 1 ml/min. A identificação tentativa foi baseada no espectro a 250-600 nm e nos tempos de retenção relativa. Os autores encontraram que todos os sucos de ameixa analisados tinham só traços ou níveis não detectáveis de antocianinas. Assim a presença de antocianinas em suco de ameixa seria uma clara marca de adulteração.

SPANOS & WROLSTAD (1987) desenvolveram uma metodologia com cromatografia líquida para determinação da composição de pigmentos antociânicos, ácidos não voláteis, e açúcares de sucos de groselha vermelha visando criar uma base de dados de referência para sucos de groselha vermelha autênticos. As antocianinas do suco foram adsorvidas em cartucho Sep-Pak C18, e analisadas por CLAE com coluna Supelcosil LC-18 (250 x 4,6 mm, 5 µm), com as fases móveis A) ácido acético a 15% e B) ácido acético a 15% em metanol, fluxo 1,2ml/min, com eluição em gradiente e detecção a 515 nm com detector UV/VIS. As antocianidinas foram analisadas com coluna Nucleosil C-18 (250 x 4,6 mm, 10µm), usando as fase móveis A) ácido acético 10% e B) acetonitrila-metanol(2:1, v/v), com eluição isocrática de 84% de A e

16% de B com fluxo de 2ml/min a 25 °C. Os picos de antocianinas foram identificados mediante avaliação do mecanismo químico envolvido na separação que inclui a polaridade total da molécula de antocianina, a natureza do açúcar ligado e a substituição do anel B, bem como pela magnitude relativa dos picos e por comparação com os tempos de retenção das antocianinas de outra frutas. Foram identificadas cianidina 3-soforosídeo, cianidina 3-glicosídeo, cianidina 3-glicorutinosídeo e cianidina 3- rutinosídeo. O perfil antociânico desta fruta é qualitativamente distintivo, com dois padrões principais quantitativos, sendo que a maioria das frutas que contém antocianinas apresentam perfis antociânicos diferentes qualitativa e quantitativamente e poderiam ser detectados por este análise. Cianidina foi a antocianidina predominantemente encontrada, com algumas amostras apresentando pelargonidina em uma proporção de 5%. Os autores concluíram que a análise das antocianidinas seria útil na detecção de adulterações com corantes contendo malvidina, delphinidina, pernidina ou petunidina. Assim, os perfis de ácidos não voláteis, açúcares e antocianidinas são úteis na detecção de adulterações.

BRIDLE & GARCIA –VIGUERA (1996) caracterizaram as antocianinas 'extras' em um vinho vermelho, provenientes da adição de "elderberry" evidenciando uma adulteração. Os autores usaram um sistema de CLAE com coluna ODS Hypersil (100 x 2,1mm., 5 µm) a 40 °C e fase móvel constituída por: A) água acidificada (0,6% ácido perclórico) e B) metanol, com eluição por gradiente linear e velocidade de fluxo de 0,3 ml/min. A detecção foi realizada com detector de arranjo de diodos a 520nm. A identificação dos picos de antocianina foi confirmada por comparação do tempo de retenção e dados espectrais com padrões isolados no laboratório. Os referidos autores encontraram que CLAE é um método particularmente sensível para detecção da adição de "elderberry" a vinhos. Nas condições utilizadas foi observado um novo pico no cromatograma do vinho correspondente à antocianina de "elderberry", cianidina-3-sambubiosídeo-5-glicosídeo. A CLAE com eluição em gradiente para antocianinas de vinho não promove a separação cianidina-3-glicosídeo e de cianidina-3-sambubiósídeo, mas, este fato pode ser usado com

vantagem para detectar antocianinas de “elderberry” em vinho. Assim, o pico de cianidina-3-glicosídeo normalmente pequeno em vinho, pode transformar-se em um marcador significativo com a presença adicional de cianidina-3-glicosídeo e cianidina-3-sambubiosídeo de “elderberry”. Desta forma, a combinação deste pico e o primeiramente eluído de cianidina-3-sambubiosídeo-5-glicosídeo em um cromatograma de vinhos vermelhos, fornecem forte evidência de adulteração com “elderberry”.

1.8 DEGRADAÇÃO DE ANTOCIANINAS DURANTE A MATURAÇÃO, PROCESSAMENTO E ESTOCAGEM DE FRUTAS E DERIVADOS.

CLAE tem sido largamente empregada no acompanhamento das mudanças sofridas na maturação, processamento e armazenamento de frutas e de seus produtos.

LISTER *et al.*(1994) estudaram as mudanças na concentração e quantidades totais de cianidina 3-galactosídeo, quercetina glicosídeo e proantocianidinas em cascas de maçã vermelhas e verdes durante a maturação destas frutas, já que a coloração vermelha destas frutas é produzida por glicosídeos de cianidina estabilizados ou co-pigmentados por glicosídeos de quercetina e proantocianidinas. Os autores usaram um sistema CLAE com coluna Aquapore RP-18 (220 x 4,6 mm) , com os solventes de eluição: A) 100ml/L de ácido acético em água e B) acetonitrila em gradiente linear a 30 °C e fluxo de 1,0 ml/min. As antocianinas foram monitoradas a 530 nm com detector UV/VIS e quantificadas por comparação com soluções padrões de concentração conhecida. Os referidos autores quantificaram os flavonoides da casca de Granny Smith, e de Splendour, cultivares de maçã verde e vermelha, respectivamente, através de CLAE durante dois temporadas (1989-1990 e 1990-1991). Ambos cultivares continham composição similar de glicosídeos de quercetina e proantocianidinas. Splendour também sintetizou glicosídeos de cianidina durante a maturação, e as concentrações de glicosídeos de quercetina e proantocianidinas diminuíram a 50% em meados da safra com aumentou durante a maturação. As proporções relativas dos principais

glicosídeos de quercetina e proantocianidinas foram estáveis durante o desenvolvimento da fruta, entretanto, para Splendour a síntese de glicosídeo de cianidina foi acompanhada por um aumento correspondente na síntese de glicosídeo de quercetina e proantocianidina. As mudanças paralelas na concentração de glicosídeos de quercetina, procianidinas e glicosídeos de cianidina durante o crescimento e maturação da fruta de ambos cultivares sugerem uma regulação coordenada das enzimas no caminho biosintético dos flavonoides durante o desenvolvimento da fruta.

GIL *et al.* (1995) identificaram e quantificaram os pigmentos antociânicos em sucos de “pomegranate”, e estudaram as mudanças na pigmentação e nas antocianinas individuais durante a maturação das frutas no cultivar “Mollar”, usando coluna LiChrochart 100 RP-18 (12,5 x 0,4cm, 5µm), sistema de solventes: A) ácido fórmico 50 g/l em água e B) metanol, com eluição por gradiente e detector de arranjo de diodos a 510 nm. As diferentes antocianinas foram identificadas através do espectro UV-visível do detector de arranjo de diodos, por seus tempos de retenção, por cromatografia em papel e por comparação com padrões autênticos. As diferentes antocianinas foram quantificadas por comparação com padrões externos de cianidina 3-rutinosídeo. No suco de “pomegranate” foram identificados derivados de delphinidina 3- glicosídeo e 3,5- diglicosídeo, cianidina 3-glicosídeo e 3,5-diglicosídeo e pelargonidina 3-glicosídeo e 3,5-diglicosídeo. Durante os primeiros estágios da maturação predominam os 3,5-diglicosídeos, e os derivados de delphinidina, com aumento da proporção de monoglicosídeos nas etapas finais da maturação até valores similares ou maiores dos diglicosídeos, com os derivados de cianidina sendo predominantes.

FERRERES *et al.* (1996) isolaram e identificaram os flavonóides e antocianinas do principal cultivar de cebola vermelha cultivada em Espanha (“Morado de Amposta”) e avaliaram a estabilidade do pigmento durante o armazenamento de cebola vermelha cortada em cubos e empacotadas em filmes perfurados. Foram isoladas 4 antocianinas e 5 flavonoides por combinação de cromatografia em coluna Sephadex LH-20, LPLC em fase

reversa usando uma coluna e CLAE semi-preparativa. A purificação das frações antociânicas em CLAE semipreparativa foi efetuada com coluna ODS-2 (259 x 0,7 mm, 5 µm); como fase móvel usou-se metanol 35% em água (contendo 5% ácido acético) e fluxo de 2 ml/min. A pureza dos compostos isolados foi testada por CLAE analítica com detector de arranjo de diodos. Os autores identificaram e quantificaram as antocianinas durante o experimento de estabilidade mediante CLAE empregando coluna Lichrochart RP-18 (120 x 4 mm, 5 µm) a 40 °C, com eluição em gradiente linear dos solventes A) água e ácido fórmico 5% e B) metanol, com fluxo de 1ml/min . As antocianinas foram quantificadas com padrões externos a 510nm. Estes autores identificaram cianidina 3-glicosídeo, cianidina 3-arabinosídeo, cianidina 3-malonilglicosídeo e cianidina 3-malonilarabinosídeo, encontrando que o conteúdo total das antocianinas diminuiu com o armazenamento após 7 dias, sendo que as antocianinas aciladas foram mais estáveis que aquelas não aciladas, evidenciando que os cultivares com elevado conteúdo de pigmentos acilados poderão manter melhor a pigmentação quando armazenados em filmes de polipropileno.

GIL *et al.* (1997) estudaram as mudanças nos atributos de qualidade pós-colheita de morango, e particularmente mudanças nas antocianinas e outros compostos fenólicos durante a estocagem em atmosfera de alto conteúdo de CO₂. Os compostos fenólicos foram separados usando um sistema CLAE acoplado a um detector de arranjo de diodos (DAD), com coluna Nucleosil C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm) a 40°C. A fase móvel foi composta pelos solventes A) ácido fórmico aquoso a 2,5% e B) metanol acidificado (ácido fórmico a 2,5%) eluída em gradiente linear e fluxo de 1ml/min. A quantificação foi realizada com padrão de cianidina 3-glicosídeo.

Cianidina 3-glicosídeo e pelargonidina 3-glicosídeo (principais componentes) foram identificadas em morangos do cultivar Selva, pelo tempo de retenção, pelo espectro UV-visível obtido com detector de arranjo de diodos, e por comparação com extratos de romã contendo estes pigmentos. Um terceiro pico encontrado apresentou espectro similar à pelargonidina 3-glicosídeo. Não houve diferenças na porcentagem de cada antocianina quando

a análise foi realizada com a fruta inteira, ainda que os conteúdos do tecido externo e interno sejam significativamente diferentes em frutas armazenadas ao ar e em CO₂.

GÓMEZ-CORDOVÉS *et al.*(1996) examinou o efeito dos tratamentos com ethephon e seniphos, dos compostos usados para adiantar ou retardar a maturação das frutas, na composição antociânica de maçãs Starking durante os 20 dias subsequentes à aplicação durante o período de maturação. Estes autores usaram CLAE fase reversa para analisar as antocianinas individuais, com coluna C18 Novapak (4,5 x 150 mm) e detector UV-VIS a 313 e 546 nm. As antocianinas foram identificadas através da comparação com padrões , encontrando cianidina 3,5-diglicosídeo, cianidina 3-glicosídeo, cianidina 3-rutinosídeo. Uma quarta antocianina foi identificada por hidrólise enzimática, mostrando ser cianidina 3- galactosídeo e outra antocianina foi identificada por comparação com os tempos de retenção de um extracto de antocianinas de cascas de uvas *Vitis vinifera* como cianidina 3-xilosídeo. A comparação dos tratamentos mostraram que frutas tratadas com ethephon têm as maiores concentrações de antocianinas e que a fruta tratada com seniphos tem maior conteúdo de antocianinas que a fruta controle. Os tratamentos também alteram a composição percentual das antocianinas, com as diferenças mais importantes sendo a diminuição na formação de cianidina 3- xilosídeo e o aumento na produção de cianidina.

GARCÍA - VIGUERA *et al.* (1997) desenvolveram uma técnica simples para analisar antocianinas de geléias visando o acompanhamento das mudanças durante o processamento e armazenamento bem como avaliar o potencial para determinar a autenticidade de alimentos processados.

A análise das antocianinas (identificação e quantificação) foi realizada por comparação cromatográfica com padrões autênticos e com o espectro obtido com detector de arranjo de diodos. A análise em CLAE foi efetuada em coluna fase reversa RP-18 Lichrochart 100 (12,5 x 0,4 cm, 5µm) usando como fase móvel o sistema de solventes A) ácido fórmico (50 ml/L) e B) metanol, eluição em gradiente e detecção a 520 nm com detector de arranjo de diodos.

Os resultados mostraram que todas as geléias de fruta continham antocianinas características da fruta fresca original, ainda que alguns compostos menores estivessem ausentes da geléia, possivelmente devido à baixa estabilidade destes pigmentos nas condições de processamento. Quando foram analisadas geléias de diferentes marcas comerciais de uma determinada fruta, obteve-se o mesmo perfil antociânico em geral, com diferenças significativas no teor total de antocianinas. As diferenças quantitativas foram devidas ao processamento, cultivar usado, data de elaboração, estágio de maturidade da fruta, etc. Os autores encontraram que esta técnica pode ser usada para detectar misturas de frutas em geléias de frutas principalmente quando frutas mais baratas ou frutas com maior estabilidade de cor são adicionadas de forma fraudulenta.

Referências bibliográficas

- AKAVIA, N.; STRACK, D. & COHEN, A. (1981) High Performance Liquid Chromatography of anthocyanidins as a new approach to study flower pigment genetics. *Z. Naturforsch.* **36C**, 378-381.
- ANDERSEN, O . M. (1987) Anthocyanins in Fruits of *Vaccinium Uliginosum* L. *J. of Food Science*, **52**, 665-667.
- BAKKER , J.; PRESTON, N.W. & TIMBERLAKE, C.F.(1986) The determination of anthocyanins in aging red wines: comparison of HPLC and spectral methods. *Am.J.Enol.Vitic.*, **37** (2), 121-126.
- BAKKER, J. & TIMBERLAKE, C.F. (1997) Isolation, identification, and characterization of new color-stable anthocyanins occurring in some red wines. *J.Agric. Food Chem.***45**, 35-43.
- BAKKER, J.; BRIDLE, P. & BELLWORTHY, S.J.(1994) Strawberry Juice Colour: a study of the quantitative and qualitative pigment composition of juices from 39 genotypes. *J.Sci.Food Agric.*,**64**, 31-37.
- BAUBLIS, A . J.& BERBER-JIMENEZ, M.D.(1995) Estructural and conformational characterization of a stable anthocyanin from *Tradescantia pallida* .*J.Agric.Food Chem.*, **43**, 640-646.
- BRIDLE, P., & GARCIA —VIGUERA (1996) A simple technique for the detection of red wine adulteration with elderberry pigments. *Food Chemistry*, **55** (2), 111-113.
- CAMEIRA-DOS-SANTOS, P-J; BRILLOUET, J-M; CHEYNIER, V. & MOUTOUNET, M. (1996) Detection and partial characterization of new anthocyanin-derived pigments in wine. *J.Sci.Food Agric.* , **70**, 204-208.
- CARREÑO, J.; ALMELA, L.; MARTÍNEZ, A . & FERNANDEZ-LOPEZ (1997) Chemotaxonomical classification of red table grapes based on anthocyanin profile and external colour. *Lebens. Wiss.u.-Technol.*, **30**, 250-265.
- CASTEELE, K.V.; GEIGER, H., DE LOOSE; R. & VAN SUMERE, C.F.(1983) Separation of some anthocyanidins, anthocyanins, proanthocyanidins and related substances by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J.Chromatog.*, **259**, 291-300.
- CHANDRA, A.; NAIR, M. G. & IEZZONI, A. F. (1992) Ev-aluation and charactarization of the anthocyanin pigments in tart cherries (*Prunus cerasus* L.) *J. Agric. Food Chem* , **40**, 967-969.
- DALLAS, C.; RICARDO-DA-SILVA, J.M., & LAUREANO, O . (1996) Products formed in model wine solutions involving anthocyanins, procyanidin B₂ , and acetaldehyde. *J.Agric.Food Chem.*, **44**, 2402-2407.
- DAVIES, A. J. & MAZZA, G. (1992). Separation and characterization of anthocyanins of *Monarda fistulosa* by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 1341-1345.
- FERNANDEZ-LOPEZ, J. A.; HIDALGO, V.; ALMEDA, L. & LOPEZ ROCA, J. M. (1992). Quantitative changes in anthocyanins pigments of *Vitis vinifera* cv. Monastrell during maturation. *J. Sci. Food Agric.*, **58**, 153-155.

- FERRERES, F., GIL, M. & TOMÁS-BARBERÁN A. (1996) Anthocyanins and flavonoids from shredded red onion and changes during storage in perforated films. *Food Research International*, **29** (3-4), 389-395.
- FRANCIS, F.J. (1989) Food Colorants: Anthocyanins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **28**(4), 273-314.
- GAO, L. & MAZZA, G. (1995). Characterization of acetylated anthocyanins in lowbush blueberries. *J. of Liquid Chromatography*, **18**(2), 245-259.
- GARCÍA - VIGUERA, C.; ZAFRILLA, P., TOMÁS-BARBERÁN, F.A.. (1997) Determination of authenticity of fruit jams by HPLC analysis of anthocyanins. *J.Sci.Food Agric.* **73**, 207-213.
- GERASOPOULUS, D. & STAVROULAKIS, G. (1997) Quality characteristics of four mulberry (*Morus sp*) cultivars in the area of Chania, Greece. . *J. Sci. Food Agric* , **73**, 261-264.
- GIL , M.I.; HOLCROFT, D..M., & KADER, A .A. (1997) Changes in strawberry anthocyanins and other polyphenols in response to carbon dioxide treatments. *J.Agric. Food Chem.*, **45**, 1662-1667.
- GIL, M.; GARCIA-VIGUERA, C.; ARTÉS, F.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. (1995). Changes in pomegranate juice pigmentation during ripening. *J. Sci. Food Agric.*, **68**, 77-81.
- GIUSTI E, M. & WROLSTAD R.E. (1996) Characterization of red radish anthocyanins. *J. Food Science.* , **61**, 322-326.
- GOIFFON, J.- P.; BRUN, M.; BOURRIER, M.- J. (1991). High-performance liquid chromatography of red fruit anthocyanins. *J. Chromatog.* , **537**, 101-121.
- GÓMEZ-CORDOVÉS C., VARELA, F., LARRIGAUDIÈRE, C., & VENDRELL, M. (1996) *J.Agric. Food Chem.*, **44**, 3449-3452.
- HARBORNE, J.B. & GRAYER, R.J. (1988). The anthocyanins. In: *The Flavonoids*. Editado por J.B. Harborne. Chapman and Hall Ltd., London.. 543 p.
- HARBORNE, J.B. (1967). Comparative Biochemistry of the Flavonoids, p.1-36, Academic Press, London, England.
- HEBRERO, E.; GARCIA-RODRIGUEZ, C.; SANTOS-BUELGA, C. & RIVAS-GONZALO, J. C. (1989). Analysis of anthocyanins by high performance liquid chromatography - diode array spectroscopy in a hybrid grape variety (*Vitis vinifera* x *Vitis berlandieri* 41B). *Am. J. Enol. Vitic.* **40**(4), 283-291.
- HONG V. & WROLSTAD, R.E. (1990a). Characterization of anthocyanins-containing colorants and fruits juices by HPLC/Photodiode array detection. *J. Agric. Food Chemistry.*, **38**, 698-708.
- HONG V. & WROLSTAD, R.E. (1990b) Use of HPLC Separation/Photodiode array detection for characterization of anthocyanins *J. Agric. Food Chemistry*, **38**, 708-715.
- HRAZDINA, G. (1979). Recent Techniques in the Analysis of Anthocyanins in Fruits and Beverages. *Analysis of fruits and Beverages*. Academic Press:London, Vol 1, pp 141-159.
- INAMI, O., TAMURA, I., KIKUZAKI, H. & NAKATANI, N. (1996) Stability of anthocyanins of *Sambucus canadensis* and *Sambucus nigra*. *J.Agric. Food Chem* , **44**, 3090-3096.

- KADER, F.; ROVEL, B.; GIRARDIN, M. & METCHE, M.(1996) Fractionation and identification of the phenolic compounds of Highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum*) *Food Chemistry*, **55** (1), 35-40.
- LEE, H. S. & HONG, V. (1992). Chromatographic analysis of anthocyanins. *J. Chromatog*, **624**, 221-234.
- LEE, H.S. & WICKER, L. (1991) Anthocyanin pigment in the skin of Lychee fruit. *J.Food Sci.* **56** (2), 466-468.
- LISTER, C.E.; LANCASTER, J.E.; SUTTON, K.H.(1994) Developmental changes in the concentration and composition of flavonoids in skin of a red and a green apple cultivar. *J.Sci. Food Agric.*, **64**, 155-161.
- MAYEN, M.; MERIDA, J. & MEDINA (1994) Free anthocyanins and polymeric pigments during the fermentation and post-fermentation standing of musts from Cabernet Sauvignon and Tempranillo grapes. *Am.J.Enol.Vitic.*,**45**(2), 1444-1449.
- PAZO M.; TRAVESO C.; FONTANELA A.; PAZO M.C.; SAÁ C. e CISNEROS M.C. (1995) Antocianos en vinos de Galicia .. *Alimentaria*. Julio-Agosto, 45-48.
- PRICE, H. & WROLSTAD, R.E. (1995). Anthocyanins Pigments of Royal Okanogan Huckleberry Juice. *J. Food Sci.*, **60**, 369-374.
- RIVAS-GONZALO, J.C.; BRAVO-HARO, S. & SANTOS-BUELGA, C. (1995) Detection of compounds formed through the reaction of malvidin 3-monoglicoside and catechin in the presence of acetaldehyde. *J.Agric. Food Chem.*, **43**, 1444-1449.
- ROMANI, A.; MANCINI, P.; TATTI, S. & VINCIERI, F.F. (1996) Polyphenols and polysaccharides in Tuscan grapes and wines. *Ital.J Food Sci.* **1**, 13-23.
- SANTOS-BUELGA, C.; BRAVO-HARO, S. & RIVAS-GONZALO, J.C.(1995) Interactions between catechin and malvidin-3-monoglucoside in model solutions. *Z.Lebensm.Unters.Forsh.*, **201**, 269-274.
- SARNI- MANCHADO, P.; FULCRAND, H.; SOUQUET, J-M, CHEYNIER, V. & MOUTOUNET, M. (1996) Stability and color of unreported wine anthocyanin-derived pigments. *J.Food Sci.*, **61**(5), 938-941
- SARNI, P.; FULCRAND, H.; DOUILLOL, V.; SOUQUET, J. & CHEYNIER, V. (1995) Mechanisms of anthocyanin degradation in grape must-like model solutions. *J.Sci.Food Agric.*, **69**, 385-391.
- SINGLETON, V.L. & TROUSDALE, E.K. (1992) Anthocyanin-tannin interactions explaining differences in polymeric phenols between white and red wines. *Am.J.Enol.Vitic.*, **43** (1), 63-70.
- SPANOS G.A. & WROLSTAD, R.E. (1987) Anthocyanin pigment, nonvolatile acid, and sugar composition of red raspberry juice. *J. Assoc.Off.Anal.Chem.* **70** (6), 1036-1046.
- TERAHARA, N.; YAMAGUCHI, M., & HONDA, T. (1994) Malonylated anthocyanins from bulbs of red onions, *Allium cepa* L. *Biosci.Biotech.Biochem.*, **58** (7), 1324-1325.
- TSUKUI, A., SUZUKI, A., NAGAYAMA, S. & TERAHARA, N. (1996) Stability of anthocyanin pigments from purple leaves of *Perilla ocimodes* L.var.*crispa*. *Nippon Shokuhin Kogaku Kaishi*, **43**(4), 113-119.

- VAN GORSEL, H.; LI, C.; KEBEL, E.L.; SMITS, M. & KADER, A .A. (1992) Compositional characterization of prune juice. *J. Agric.Food Chem.*, **40**, 784-789.
- VERSARI, A.; BARBANTI, D.; BIESENBRUCH, S. & FARNELL, P.J. (1997) Analysis of anthocyanins in red fruits by use of HPLC/spectral array detection. *Ital.J.Food Sci.* **2**, (9), 141-148.
- VLAHOV, G. (1992) Flavonoids in three olive (*Olea europaea*) fruit varieties during maturation. *J.Sci.Food Agric*, **58**, 157-159.
- YOSHITAMA,K. (1977) Blue and purple anthocyanins isolated from the flowers of *Tradescantia reflexa*. *Bot. Mag. Tokyo.*, **91**, 207-212.
- YU G. & CAHOON G.A. (1995). High Performance Liquid Chromatographic Analysis of Anthocianins in the Red Seedles Table Grape Reliance. *Am. J. Enol. Vitic.* **46**, 339-345.

CAPITULO 2

CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DA ESTABILIDADE DAS ANTOCIANINAS DO CAPIM NAPIER (*Pennisetum purpureum*)

RESUMO

Existe um considerável interesse mundial no desenvolvimento de corantes alimentares a partir de fontes naturais. A natureza oferece as antocianinas um grupo de matéria corante largamente distribuída em plantas, de intensa e atrativa cor vermelha. O objetivo do presente trabalho foi investigar a possibilidade do emprego de capim napier (*Pennisetum purpureum*) com fonte de antocianinas pelo seu significativo teor de pigmento.

Os pigmentos antociânicos, presentes na concentração de 67,7mg/100g, foram identificados mediante comportamento cromatográfico em papel e em camada delgada, por suas características espectrofotométricas e por seus tempos de retenção obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência e co-cromatografia. Os dados obtidos revelaram que a fração antociânica do capim napier é complexa, sendo constituída por cinco antocianinas, das quais as três principais encontradas nas proporções relativas de 68%, 11% e 15%, tiveram sua identidade estabelecidas como cianidina 3-maleoilglicosídeo, cianidina 3-glicosídeo e cianidina 3-arabinosilglicosídeo acilada com ácido siríngico, respectivamente.

A estabilidade da cianidina 3-maleoilglicosídeo assim como seu complexo com β -ciclodextrina foi estimada determinando-se a diminuição da absorbância no λ_{max} em função do tempo, sob exposição à luz e em sua ausência, a diferentes pH e sob atmosfera de nitrogênio. A partir dos valores de absorbância, foram calculadas as absorvâncias relativas e porcentagens de retenção de cor para cada sistema. A adição de β -ciclodextrina promoveu uma sensível estabilização à antocianina, quando pH 3,0 e luz estavam combinados, embora esses agentes isoladamente tenham sido deletéreos para a cianidina 3-maleoilglicosídeo. Observou-se alguma estabilização da cianidina 3-maleoilglicosídeo quando duas moléculas de β -ciclodextrina foram usadas, a pH 2,0 e em ausência de luz. somente uma não imprimiu qualquer proteção ao sistema, quando exposto à luz ou em sua ausência.

ABSTRACT

There is a considerable interest worldwide in the development of food colorants from natural sources. The nature offers the anthocyanins, a widespread group of colouring matters in plants, with an intense and attractive red colour.

The aim of this work was investigate the possibility of the use of napier grass (*Pennisetum purpureum*) as a source of anthocyanin which presents a significative content of pigment. The anthocyanins, present at the concentration of 67,7mg/100g, were characterized by using the chromatographic behavior on paper and thin layer chromatography, by their spectrophotometric characteristics and retention time obtained by high performance liquid chromatography. The composition of the anthocyanic fraction from the napier grass showed to be a complex mixture of five anthocyanins, the three main anthocyanins, found at the relative proportions of 68%, 11% and 15%, were respectively identified as cyanidin 3-maleoylglucoside, cyanidin 3-glucoside and cyanidin 3-arabinosylglucoside acylated with syringic acid.

The stability of cyanidin 3-maleoylglucoside as well as its complex with β -cyclodextrin was estimated by determining the decrease of the absorbance at the $\lambda_{\max}$ with time, under light exposure and at dark, at different pH and at nitrogen atmosphere. From the values of absorbance, % of colour retention were calculated to each system. Light showed to be a very strong destructive agent to the cyanidin 3-maleoylglucoside. One observed some stabilization of the cyanidin 3-maleoylglicoside when two molecules of β -cyclodextrine were used at pH 2,0 and at dark. The decrease of the number of the molecules to only one did not impart any protection to the system when exposed to light or at dark. The β -cyclodextrin addition promoted a sensitive stabilization to the anthocyanins, when both pH 3,0 and light were combined, in spite of these isolated agents had been deleterious to the cyanidin 3-maleoylglicoside.

INTRODUÇÃO

A cor é um dos atributos mais importantes, apreciada tanto pelo seu valor estético como para servir de base para um julgamento da qualidade de um alimento. Existe claramente um interesse mundial por parte de consumidores no desenvolvimento de corantes naturais (FRANCIS, 1984). A preferência do consumidor por corantes naturais está associada com a imagem de serem saudáveis e de boa qualidade, enquanto os corantes sintéticos tendem a ser tomado como indesejáveis e perigosos (CLYDESDALE, 1993).

Em 1994, o mercado internacional de corantes naturais foi avaliado em U\$S 250 milhões; a indústria de corantes alimentícios naturais experimenta um crescimento anual de 5-10% (comparando com 3-5% para sua contraparte sintética) (WISSGOTT & BORTLIK, 1996).

As antocianinas são pigmentos naturais vermelhos que podem ser extraídos de muitas plantas e empregados como corantes em alimentos. Estes compostos tem sido consumidos pelos homens por inúmeras gerações sob a forma de alimentos e bebidas, apresentando diversas atividades biológicas benéficas à saúde humana, entre elas, a atividade antioxidante (BAJ *et al.*, 1994; TSUDA *et al.*, 1994; WANG *et al.*, 1997).

Entretanto, sua utilização como corante potencial depende inicialmente da disponibilidade de fontes que apresentem teor significativo de pigmentos (FRANCIS, 1989).

Quimicamente, as antocianinas se apresentam como glicosídeos de antocianidinas, derivados polihidroxilados ou polimetoxilados do cátion 2-fenilbenzopirilium. As antocianinas possuem, em geral, cor vermelha em soluções aquosas ácidas, azul em pH intermediários e incolor em pH neutro. Entretanto, existe sempre um equilíbrio de quatro espécies, dependente do pH, onde a espécie cátion flavílium AH^+ , responsável pela cor vermelha, predomina em pH ácidos, enquanto as espécies pseudobases B, base quinoidal A e chalcona C, encontram-se predominantemente em valores de pH maiores. Essas transformações estruturais em soluções aquosas das antocianinas em

função do pH, explicam da reação de degradação da cor quando o fenômeno de hidratação se estabelece rápida e completamente convertendo a espécie cátion flavilium à pseudobase carbinol, incolores, a valores de pH entre 3,0-6,0. Preferencialmente, a adição da molécula de água acontece no carbono 2, onde então o equilíbrio é rapidamente deslocado para a espécie chalcona aberta incolor (C) (BROUILLARD, 1988). Assim, a estabilização das antocianinas deve acontecer com moléculas protegendo o carbono 2 da aglicona, inibindo ou retardando a reação de hidratação, num esforço para diminuir a perda de cor e a dependência do pH na manutenção da espécie vermelha cátium flavilium (AH⁺).

Também a luz, ácido ascórbico, temperatura e oxigênio são agentes nocivos às antocianinas (POEI- LANGSTON *et al*, 1981; KALLIO *et al.*, 1992, GUEDES & PEREIRA, 1998). A estabilização das antocianinas pode ser alcançada por diversos mecanismos, entre os quais a copigmentação tem sido um dos mais intensamente investigados e a sua eficiência largamente descrita (MAZZA & BROUILLARD, 1987; MACCARONE *et al.*, 1987; BOBBIO *et al.*, 1990; DANGLES *et al.*, 1992; GUEDES, 1994). A investigação de outros mecanismos protetivos à molécula da antocianina tem levado ao estudo da formação de complexos de inclusão com compostos que tenham não somente um tamanho compatível com as dimensões da cavidade, mas devem ambas moléculas possuírem características químicas que possibilitem a inclusão mantida principalmente por interações de Van der Waals e ligações de ponte de hidrogênio (FROMMING & SZEJTLI, 1994).

Capim napier (*Pennisetum purpureum*) é uma planta cultivada para alimentação de gado, com folhas de cor vermelha-arroxeadas, apresentando significativo teor de pigmentos antociânicos, crescendo facilmente em solos úmidos, o que possibilitaria sua utilização como uma possível fonte de corante vegetal. A espécie é originária da África, tendo sido amplamente disseminada em regiões tropicais e subtropicais do mundo. Encontra condições ideais nos trópicos úmidos, indo bem igualmente em regiões subtropicais. Prefere temperaturas acima de 16 °C, não suportando geadas. Plantas de porte elevado, normalmente com 2-3 metros, podendo chegar entretanto a 5 metros,

às vezes curvadas por seu próprio peso, formando grandes touceiras, como ilustra a Figura 1. (CROTTFRIED KISSMANN, 1991) .



Figura 1 Plantação de *Pennisetum purpureum* (Capim napier)

O objetivo do trabalho foi caracterizar as principais antocianinas presentes no capim napier (*Pennisetium purpureum*) como um primeiro passo para avaliar a estabilidade da principal antocianina, de maior concentração de pigmentos frente aos agentes luz e diferentes pH, bem como estimar o efeito de β -ciclodextrina como agente complexante para antocianinas.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. PREPARAÇÃO DO EXTRATO DE ANTOCIANINAS

Um quilograma de capim napier (*Pennisetum purpureum*) colhido na região do Distrito de Barão Geraldo no mês de abril de 1996, Município de Campinas, SP, foi triturado em liquidificador e macerado durante 24 horas a 5°C, ao abrigo da luz, com suficiente volume de metanol acidulado com ácido cítrico 0,5% para cobrir todo o material sólido. A maceração foi seguida de filtração em pano fino, e o extrato obtido foi concentrado sob pressão reduzida à temperatura inferior a 40°C até alcançar teor de sólidos de aproximadamente 50%. Em seguida, a clorofila residual foi extraída com éter etílico e o extrato novamente concentrado em evaporador rotatório e armazenado sob atmosfera de nitrogênio a -18°C.

2.2.2 TEOR DE ANTOCIANINAS TOTAIS

A análise quantitativa do extrato de antocianinas (mg/100g) concentrado foi realizada como descrito por LEES & FRANCIS (1972).

2.2.3 PURIFICAÇÃO DO EXTRATO

O extrato obtido em 2.2.1 foi purificado por cromatografia em papel de filtro grosso, tipo mata-borrão e os cromatogramas foram desenvolvidos sequencialmente em papel Whatman 3 MM nos seguintes sistemas de solventes: HCl 1% (HCl - água; 3:97, v/v), BFW (n- butanol - ácido fórmico - água; 100:25:60; v/v/v) e ácido acético 5% (ácido acético-água, 5:95,v/v), conforme exposto na **Figura 2-2**. Os papéis cromatográficos foram secos depois de cada desenvolvimento. As bandas de pigmentos foram cortadas, eluídas em metanol, concentradas e reaplicadas ao papel.

A pureza das frações obtidas foi comprovada por cromatografia em papel Whatman 1MM, com os seguintes solventes: BFW (n- butanol - ácido fórmico - água; 100:25:60) e AWH (ácido acético-água-ácido clorídrico, 15:82:3,

v/v/v); em por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, descrita em 2.2.

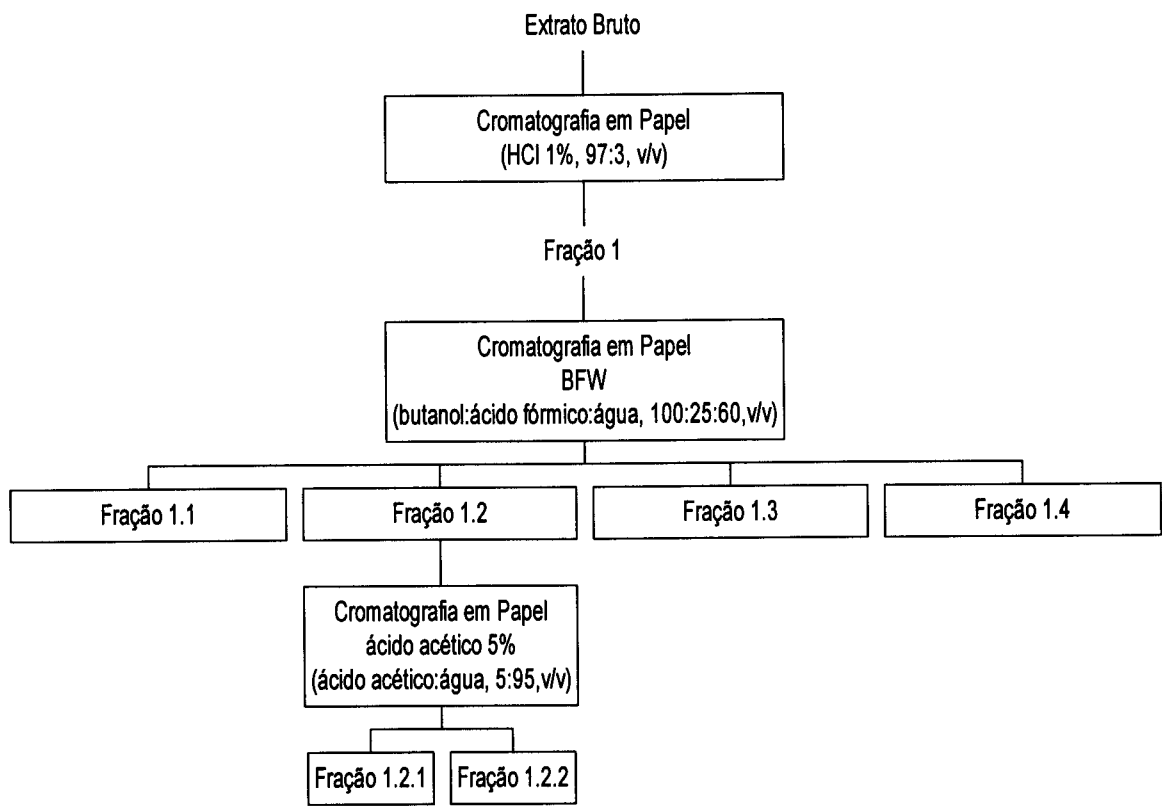


Figura 2-2 -Fluxograma das operações cromatográficas para a separação e purificação do extrato de capim napier.

2.2.4 IDENTIFICAÇÃO DAS ANTOCIANINAS

2.2.4.1 Análises espectrais das antocianinas purificadas

As antocianinas purificadas por cromatografia em papel, foram solubilizadas em metanol acidificado com HCl 0,01%, para obtenção dos espectros de UV/visível em espectrofotômetro Beckman DU-70.

A reação das antocianinas com o cloreto de alumínio, conforme método descrito por GEISSMAN et al. (1953), foi realizada para verificar a existência de hidroxilas vicinais.

2.2.4.2 Hidrólise controlada

A hidrólise controlada das soluções metanólicas das principais antocianinas purificadas foi realizada de acordo com o método descrito por FRANCIS & HARBORNE (1966). Alíquotas das soluções hidrolizadas foram retiradas após 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 60 e 75 minutos de reação e aplicadas em papel Whatman 1MM. Os cromatogramas foram desenvolvidos respectivamente em BAW (butanol:ácido acético:água; 6:1:2; v/v/v), HCl 1% e AWH (ácido acético:água:ácido clorídrico;15:82:3; v/v/v).

2.2.4.3 Hidrólise ácida

As principais antocianinas purificadas foram submetidas à hidrólise ácida para identificação da aglicona e dos açúcares, conforme método descrito por FRANCIS (1982).

2.2.4.3.1 Identificação dos Açúcares

Os açúcares livres, resultantes da hidrólise, foram identificados por cromatografia em papel Whatman 1MM, empregando como padrões, soluções glicose, ramnose, xilose, manose, galactose, frutose e arabinose. Os cromatogramas foram desenvolvidos com acetato de etila-piridina-água, (8:2:1, v/v/v) por 18 horas, e a revelação realizada com solução de nitrato de prata-hidróxido de sódio etanólico preparados como descrito por STAHL (1969).

2.2.4.3.2 Identificação das agliconas

A solução contendo a aglicona separada dos açúcares foi concentrada sob pressão reduzida a temperatura e ressolubilizada em metanol. A solução

contendo a aglicona foi cromatografada em papel Whatman 1MM com os solventes BAW (butanol:ácido acético glacial:água; 4:1:5; v/v/v); Forestal (ácido acético glacial:água:ácido clorídrico;30:3:10, v/v/v); e Ácido fórmico (ácido fórmico:ácido clorídrico:água; 5:2:3; v/v/v) e os valores de R_f foram comparados com os valores de R_f de padrões de cianidina, delphinidina e petunidina, obtidos de amora, berinjela e alho, respectivamente, conforme descrito por GUEDES e LYRIO (1998).

2.2.4.4 Hidrólise alcalina

A hidrólise alcalina das principais antocianinas purificadas, para a identificação dos ácidos, foi realizada conforme metodologia descrita por FRANCIS (1982).

Os extratos etéreos da hidrólise alcalina foram submetidos à cromatografia em placa fina de sílica, juntamente com padrões de ácido cafeico, cumárico, ferúlico, sinápico, cinâmico, siríngico, p-hidroxibenzóico, e com padrões de ácidos maléico, málico, malônico, succínico, oxálico e acético. As placas foram desenvolvidas respectivamente em TAE (tolueno-ácido acético-etanol, 15:3:1, v/v) conforme descrito por BOBBIO *et al.* (1982) e em benzeno-metanol-ácido acético(79:14:7, v/v) e reveladas com solução de verde de bromocresol, conforme método descrito por STAHL (1972), respectivamente.

2.2.5 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Cromatografia líquida de alta eficiência foi realizada para avaliação da pureza das principais antocianinas em papel. Os açúcares, ácidos e agliconas das referidas antocianinas foram também analisadas por CLAE.

Metanol de grau cromatográfico(Omnisolv), ácido fosfórico (Merck, p.a.) e ácido clorhídrico (Merck, p.a.) foram filtrados em sistema Millipore de filtração a vácuo, utilizando membranas de 0,5 μ m (Millipore). Todas as fases móveis foram desgaseificadas em ultrassom (30 minutos) antes da utilização.

2.2.5.1 CLAE de antocianinas

Para avaliação da pureza das principais antocianinas purificadas em papel, obtidas no item 2.2.3 foi utilizado um cromatógrafo líquido Shimadzu (CLAE I), modelo LC-10A, com duas bombas e sistema automático de injeção Shimadzu SIL-10 A, que introduzia 50 µl de amostra. Para a separação dos compostos foi utilizada coluna CLC-ODS(M) (Shimadzu), com partículas de 5µm, com dimensões de 250 x 4,6 mm d.i.(Shimadzu Co.,Japão) protegida por uma coluna de guarda Shim-Pack CLC-GODS 10 x 4mm d.i. (Shimadzu Co., Japão). Empregou-se eluição por gradiente da fase móvel formada pelo sistema de solventes A) 0,5% de Ácido Fosfórico e B) Metanol , em eluição por gradiente linear de A/B (95/5) até (40:60), 1% / min. A temperatura da coluna foi ajustada para 40°C, e fluxo da fase móvel a 1,0 ml/min. A detecção foi realizada primeiramente com detector UV-visível, marca Shimadzu, modelo SPD-10A, a 530nm e posteriormente utilizando um detector de arranjo de diodos, marca Shimadzu, modelo SPD-M 10A, operando a 280nm e 520nm. Todas as amostras foram filtradas em filtros Sigma PTFE, Z22,741-2, antes de serem injetadas no cromatógrafo.

2.2.5.2 CLAE de açúcares

Para análise dos açúcares das principais antocianinas purificadas o hidrolizado obtido por hidrólise ácida foi concentrado até securo e redissolvido em água, sendo posteriormente injetado num cromatógrafo líquido de alta eficiência, marca Shimadzu, modelo LC-10A com coluna Shim-Pack SCR-101P (Shimadzu Co., Japão) (300x7,9mm), empacotada com resina de poliestireno sulfonado (10µ) carregada com cátions Pb^{+2} , com modo de separação por filtração em gel e coluna de guarda (40 x 5,0 mm) com as mesmas características de empacotamento da coluna analítica. Como fase móvel, foi utilizada água ultra-pura, com fluxo 0,6 ml/min. A temperatura da coluna foi ajustada para 80°C, e fluxo da fase móvel a 0,6 ml/min. O volume de injeção foi de 40 µL ajustado no injetor automático, tendo sido utilizado detector de índice de refração, Shimadzu, modelo SPD-10A.

2.2.5.3 CLAE de ácidos

Para análise dos ácidos das principais antocianinas purificadas, o extrato etéreo, obtido da hidrólise alcalina, como descrito no item **2.2.4.4** foi injetado e padrões de ácidos alifáticos foram analisados por CLAE utilizando um cromatógrafo marca Shimadzu, modelo LC-10A, com coluna específica para ácidos orgânicos monocarboxílicos e dicarboxílicos Shim-Pack SCR-101H (300 x 7,9mm d.i.), empacotada com resina de troca catiônica copolímero sulfonado de poliestileno-divinilbenzeno. O solvente utilizado foi ácido fosfórico pH 2,1, a uma vazão de 0,6 ml/min, a temperatura de 50 °C ; a detecção foi monitorada com detector de arranjo de diodos Shimadzu, modelo SPD-M10A, a 200 e 210 nm .

Para a identificação dos ácidos aromáticos, empregou-se CLAE usando um sistema cromatográfico com bomba Waters 510, coluna fase C-18, Microsorb-MV VARIAN (25 cm x 4,6mm d.i.), 5µm de diâmetro de partícula. O extrato etéreo foi evaporado até secar e ressolubilizado na fase móvel constituída por água:metanol:ácido acético (80:20:0,5; v/v), eluídos de modo isocrático com fluxo de 1ml/min. A detecção foi realizada com detector UV-visível Waters modelo 486, operado a 279nm. Todas as amostras foram filtradas com filtro Sigma PTFE, Z22,741-2.

2.2.5.4 CLAE das agliconas

Para análise das agliconas das principais antocianinas purificadas, uma alíquota do hidrolizado das frações purificadas obtido por hidrólise ácida foi injetada em cromatógrafo líquido para analisar as agliconas, usando o mesmo sistema empregado para antocianinas como descrito no item **2.2.5.1**. A aglicona empregada como padrão foi obtida a partir da amora, conforme encontrado por GUEDES & LYRIO (1997).

Uma segunda análise das agliconas foi realizada empregando-se um segundo sistema cromatográfico, denominado Sistema CLAE II, usando um cromatógrafo marca VARIAN, com coluna modelo Microsorb-MV Rainin, marca VARIAN, fase C18 (25cm x 4,6mm d.i.), 5 µm de diâmetro de partícula, com o

sistema de solventes metanol: água : ácido clorídrico (50:50:0,5, v/v), eluídos de forma isocrática, a uma vazão de 1ml/min. Detector UV-visível a 530nm. As amostras foram filtradas com filtros Sigma PTFE, z22,741-2.

2.2.6 EXPERIMENTO DE ESTABILIDADE

A estabilidade da principal antocianina purificada, de maior concentração no pigmento, e de seus respectivos complexos com β -ciclodextrina foi estudada frente aos agentes, pH 2,0 e 3,0, luz, ausência de luz e atmosfera de nitrogênio.

A principal antocianina foi liofilizada e solubilizada em soluções tampão citrato/fosfato a pH 2,0 e 3,0. Soluções de cianidina 3-maleoilglicosídeo, em concentrações variando entre 10^{-3} - 10^{-4} M foram preparadas de modo a se obter leituras de absorvância próximo a valores de 1,0, devido à rapidez com que a absorvância diminuiu ao longo do experimento, respeitando-se assim, a mesma faixa de concentração sugerida para a formação de complexos com copigmentos (MAZZA & BROUILLARD, 1990).

As soluções tamponadas de antocianinas e seus respectivos complexos, foram distribuídas (5 mL) em tubos de ensaio de 15 mL com tampa rosqueável. Cada tubo foi imediatamente submetido a um fluxo de N_2 por 15 segundos e fechado, sendo metade dos tubos deixada no escuro e outra metade exposta à luz de lâmpadas fluorescentes de 40 W, 2500 Lux, guardando uma distância de 10 cm entre a lâmpada e os tubos. Todos os tubos permaneceram em ambiente com temperatura de 25 °C.

Para os sistemas sem adição de β -ciclodextrinas tanto na presença como na ausência de luz, as leituras de absorvância foram tomadas imediatamente após o preparo das soluções tamponadas. Para os sistemas com adição do agente complexante, expostos à luz e em ausência de luz, as respectivas leituras foram tomadas após duas horas do preparo das soluções para efetiva complexação. Durante as primeiras 12 horas e a intervalos de aproximadamente 24 horas foram retiradas alíquotas para a obtenção do espectro UV-visível e leitura das absorvâncias no comprimento de onda de máxima absorção (528 nm), com tempo total de experimento de 384 horas, em

espectrofotômetro Beckman DU-70.

2.2.6.1 Reação de complexação

Soluções de cianidina 3-maleoilglicosídeo de concentração ao redor de $10^{-4}M$ foram preparadas, com soluções tampão citrato/fosfato a pH 2,0 e 3,0.

O agente de complexação β -ciclodextrina foi adicionado às soluções tamponadas da antocianina na razão molar pigmento/copigmento de 1:1 e 1:2 e os experimentos realizados como descritos no item 3.2.2.1.

O **Quadro 3-1** resume as condições de reação utilizadas para o estudo da estabilidade da cianidina 3- maleoilglicosídeo.

Quadro 3-1 Condições de reação utilizadas para a cianidina 3-maleoilglicosídeo e seus complexos com β -ciclodextrina sob atmosfera de nitrogênio.

Amostra	pH	Agente	Adição de β -ciclodextrina (CD) razão molar pigmento β -CD
1	2	ausência de luz	---
2	2	luz	---
3	2	ausência de luz	1: 1
4	2	luz	1: 1
5	2	ausência de luz	1: 2
6	2	luz	1: 2
7	3	ausência de luz	---
8	3	luz	---
9	3	ausência de luz	1: 2
10	3	luz	1: 2

2.2.6.2 Avaliação da estabilidade

Curvas da absorbância relativa ($A-A_0$) versus tempo foram construídas para estimar a estabilidade da antocianina e seus complexos pela análise da perda de absorção dos sistemas frente aos agentes descritos anteriormente. Porcentagens de retenção de cor foram calculadas tomando-se valores de absorbância iniciais e finais determinados para cada sistema.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DAS PRINCIPAIS ANTOCIANINAS DO
CAPIM NAPIER

O teor de antocianinas totais, de 67,7 mg/100g em base úmida, justificou o estudo de sua composição antociânica.

O capim napier mostrou-se uma mistura complexa de pelo menos cinco antocianinas, evidenciado pelos números de picos do cromatograma obtidos na cromatografia líquida de alta eficiência do extrato metanólico, como ilustra a **Figura 2-3**, e cujas proporções relativas estão apresentadas na **Tabela 2-1**.

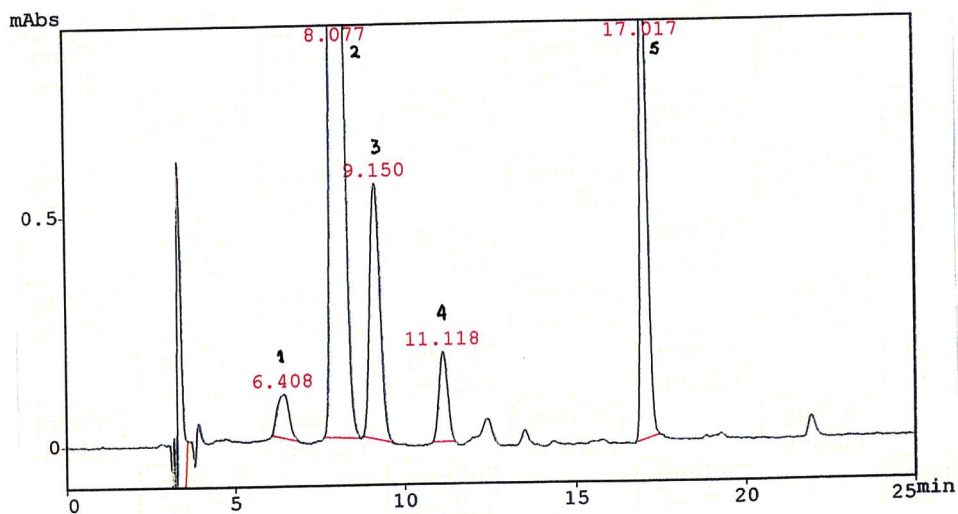


Figura 2-3: Perfil cromatográfico obtido por CLAE do extrato metanólico de capim napier (*Pennisetum purpureum*). Eluição monitorada a 520 nm. Condições de análise detalhadas no texto.

Tabela 2-1. Proporções relativas das antocianinas do extrato metanólico(Fração 1) de capim napier, obtidos a partir da CLAE.

Nº de Pico					
	1	2	3	4	5
área (%)	2,2	68,2	10,8	3,2	15,5

As operações cromatográficas, detalhadas no fluxograma exposto na Figura 2-2, para separação e purificação das antocianinas, resultaram na obtenção final de tres principais antocianinas, com maior concentração do pigmento, denominadas de frações F.1.2.1, F.1.2.2 e F.1.4, cujos perfis cromatográficos, após análise por CLAE, estão expostos na **Figura 2-4**.

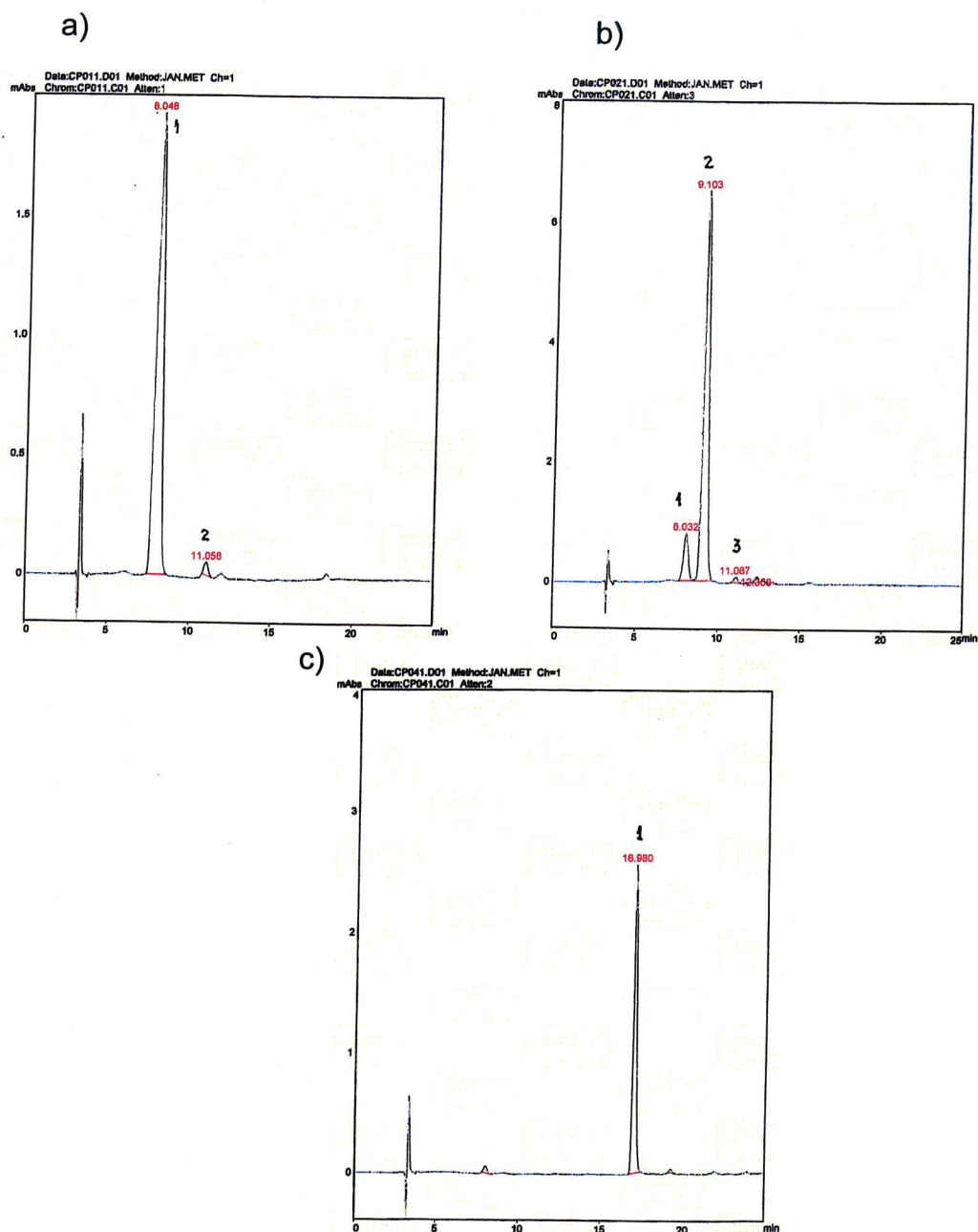


Figura 2-4: Perfis cromatográficos em CLAE das frações purificadas obtidas após cromatografia em papel preparativa (a) fração 1.2.1; (b) fração 1.2.2 (c) fração 1.4. Condições cromatográficas descritas no texto.

As proporções relativas das antocianinas presentes nas frações acima, e apresentadas na **Tabela 2-2**, sugerem a pureza das mesmas.

Tabela 2-2: Proporções relativas das antocianinas presentes nas Frações 1.2.1 e 1.2.2 e 1.4, obtidas após separação cromatográfica em papel.

Frações							
1.2.1			1.2.2			1.4	
Pico			Pico			Pico	
1		2	1	2	3	1	2
A(%)	97,8	2,1	10,4	87,3	2,3	2,8	96,1

A análise das relações $\Delta\lambda$ AlCl_3 e $\text{Abs}_{440}/\text{Abs}_{\lambda_{\text{max}} \text{ vis}}$ cujos valores estão sumarizados na **Tabela 2-3**, mostra que para todas as tres referidas frações, tem-se uma estrutura orto-hidroxilada no anel B, como as das cianidinas, delphinidinas e petunidina e que seus açúcares estão ligados unicamente à posição 3 da aglicona, como descrito por HARBORNE (1967). Adicionalmente a razão $\text{Abs}_{440}/\text{Abs}_{\lambda_{\text{max}}}$, segundo FRANCIS (1982), alcança valores próximos quando a aglicona cianidina está substituída na posição 3. De fato, os valores de λ_{max} , tanto na região do visível como de UV, estão muito próximos ao da cianidina.

As agliconas das frações F 1.2.1, F.1.2.2 e F.1.4, obtidas após hidrólise ácida, como descrito em **2.2.4.3.2**, apresentaram, nos tres solventes indistantemente, idêntica mobilidade (R_f) da cianidina padrão, respectivamente na cromatografia em papel e tempos de retenção próximos ao da cianidina em CLAE, sendo confirmada pelos resultados da co-cromatografia, como evidenciado pelos perfil cromatográfico apresentados nas **Figuras 2-5 e Anexo 1 e 2**, para as frações F. 1.2.1 e F 1.2.2 e **Figura 2-6**, para a fração F.1.4

Tabela 2-3. Características espectrais das antocianinas constituintes das frações F.1.2.1, F.1.2.2 e F.1.4, em metanol acidificado com HCl 0,01%.

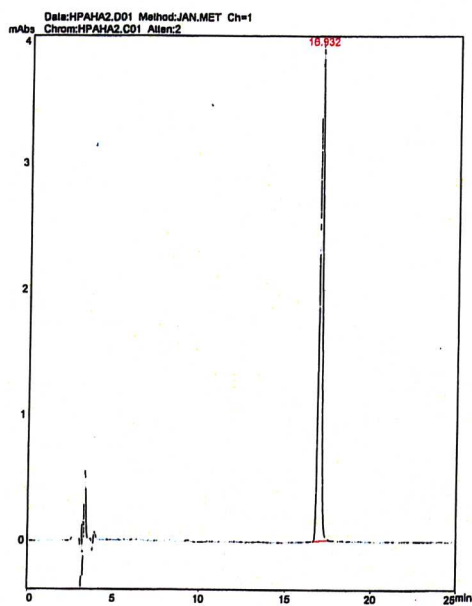
Características	Fração 1.2.1	Fração 1.2.2	Fração 1.4	Cianidina 3-glicosídeo *
λ máx. visível (nm)	528	526	528	523
λ máx. UV (nm)	280	272	218	274
λ ácido (nm)	-	-	338	-
$A_{\text{max acilo}} / A_{\text{max vis}}$	-	-	183	-
$\Delta\lambda \text{ AlCl}_3$ (nm)	+24	+21	+26	25
$A_{440}/A_{\text{máx. Vis.}}$	24	30	26	24

*HARBONE (1967)

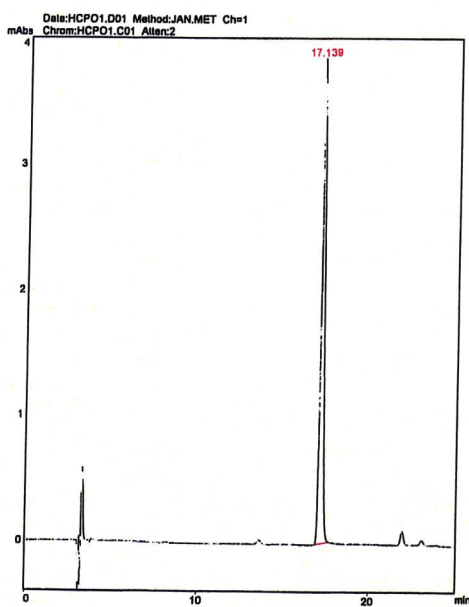
A hidrólise controlada, como descrito no item 2.2.4.2 é de grande importância na determinação das partes e grupos que compõem a antocianina, uma vez que o número de manchas intermediárias que aparecem entre as manchas da aglicona e da antocianina intacta, nos papéis cromatográficos, fornece com precisão o número de açúcares ligados à porção aglicona (HARBORNE, 1967).

As frações F.1.2.1 e F.1.2.2 apresentaram uma única mancha intermediária, evidenciando a presença de uma única molécula de açúcar ligada à aglicona, enquanto duas manchas intermediárias apareceram na fração F.1.4, portanto, possivelmente dois açúcares estão ligados à aglicona dessa fração.

a)



b)



c)

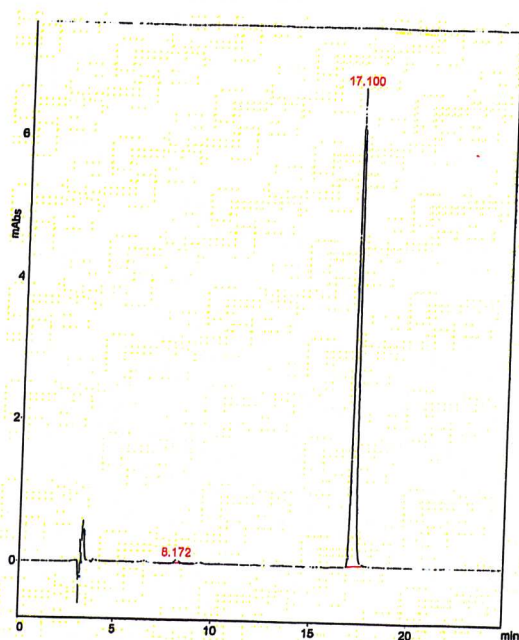


Figura. 2-5: Perfis cromatográficos obtidos por CLAE, no sistema cromatográfico CLAEI de: (a) padrão de aglicona cianidina ; (b) aglicona da Fração 1.2.1; (c) aglicona da Fração 1.2.2. Condições cromatográficas descritas no texto.

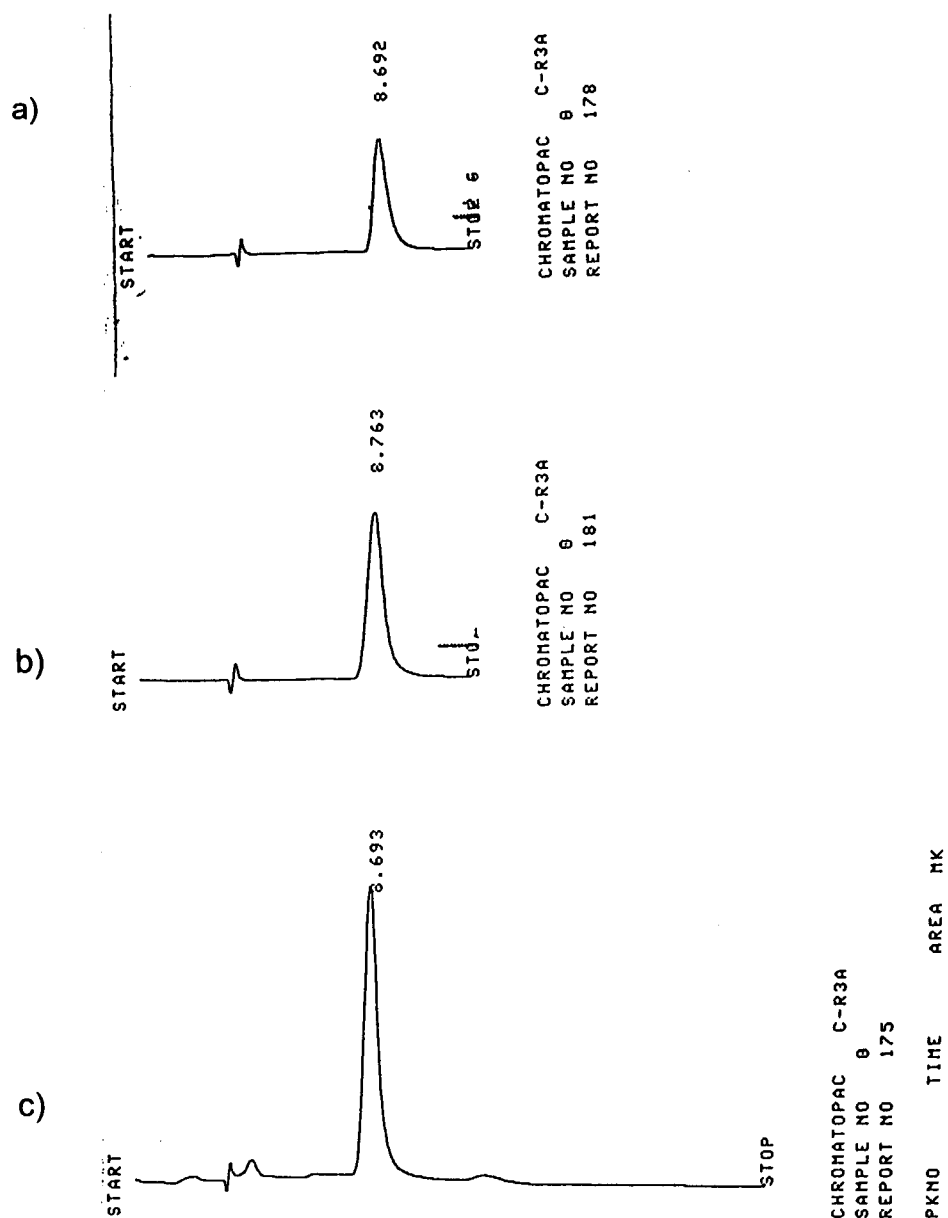


Figura 2-6. Perfis cromatográficos obtidos por CLAE com o sistema cromatográfico CLAEII de: (a) padrão de aglicona cianidina ; (b) aglicona da Fração 1.4 ; (c) co-cromatografia da aglicona da Fração 1.4 com padrão de cianidina. Condições cromatográficas descritas no texto.

A natureza dos açúcares das principais antocianinas foi determinada por suas mobilidades cromatográficas (R_f) empregando cromatografia em papel, por seus tempos de retenção obtidos por CLAE (cujos cromatogramas estão apresentados nas **Figuras 2-7**) e comparados aos de padrões aplicados nos mesmos sistemas cromatográficos, sumarizados na **Tabela 2-4**. Assim, glicose constitui-se os açúcares de ambas as frações 1.2.1 e 1.2.2 e arabinose e glicose constituem-se o dissacarídeo da fração 1.4.

Foram determinadas a presença e a natureza dos ácidos aromáticos e alifáticos, possíveis componentes da molécula das tres antocianinas.

O exame preliminar das características espectrais presentes na **Tabela 2-3**, revela que a fração 1.4 apresenta uma absorção na região compreendendo 310-340nm, característica da presença de ácido aromático (HARBORNE, 1967), além de uma elevada razão $A_{\text{max acilo}}/A_{\text{max vis}}$, sugerindo a possibilidade de mais de uma molécula de ácido ligadas ao açúcar (SAITO *et al*, 1985).

Em razão disso, o extrato etéreo da fração 1.4 obtido da hidrólise alcalina, como descrito no item **2.2.4.4**, foi submetido a cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida. Os valores de mobilidade cromatográfica e do tempo de retenção obtido dos perfis cromatográficos dispostos na **Figura 2-8**, indicam a presença do ácido sirínico na molécula da antocianina da fração 1.4.

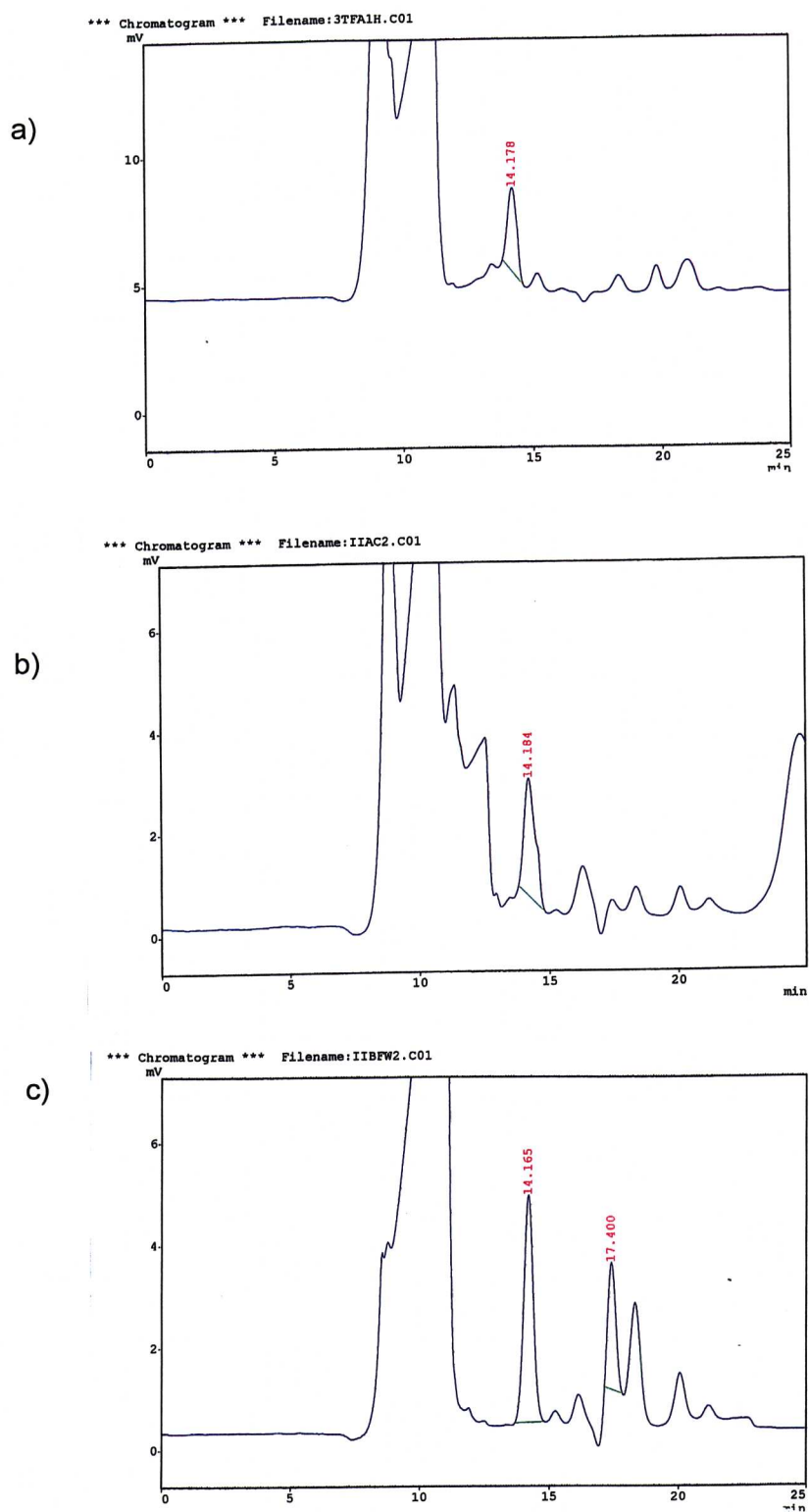


Figura 2-7 Perfis cromatográficos das frações glicosídicas correspondentes às frações 1.2.1, 1.2.2 e 1.4. Condições experimentais descritas no texto.

Tabela 2-4 Valores dos tempos de retenção (min) para padrões de açúcares e ácidos alifáticos, obtidos por CLAE, nos sistemas empregados neste estudo.

Padrões		t_R (min)	
Açúcares			
	Glicose		14,1
	Frutose		18,3
	Arabinose		17,3
	Galactose		16,0
	Xilose		15,2
	Ramnose		19,5
Padrões	t_R	Padrões	t_R
Ácidos			
Málico	13,6	Gálico	3,8
Maleico	11,7	Cafeico	14,0
Malónico	14,4	Siríngico	16,7
Succínico	16,7	Vanílico	18,4
Oxálico	9,6	Ferúlico	36,9
Acético	20,1		

Foram determinadas a presença e a natureza dos ácidos aromáticos e alifáticos, possíveis componentes da molécula das tres antocianina

Embora detectada a inexistência de absorção na região do espectro indicada para ácidos aromáticos, procedeu-se a uma cromatografia em camada delgada para ácidos alifáticos e cromatografia líquida como descrita nos itens 2.2.4.4.1 e 2.2.5.3 respectivamente.

Os dados obtidos de mobilidade cromatográfica (R_f) aliados aos tempos de retenção, obtidos pelo perfil cromatográfico, apresentado na **Figura 2-8** são comparados aos de padrões, relacionados na **Tabela 2-4**, indicam a presença de ácido maleico apenas na molécula da antocianina da Fração 1.2.1.

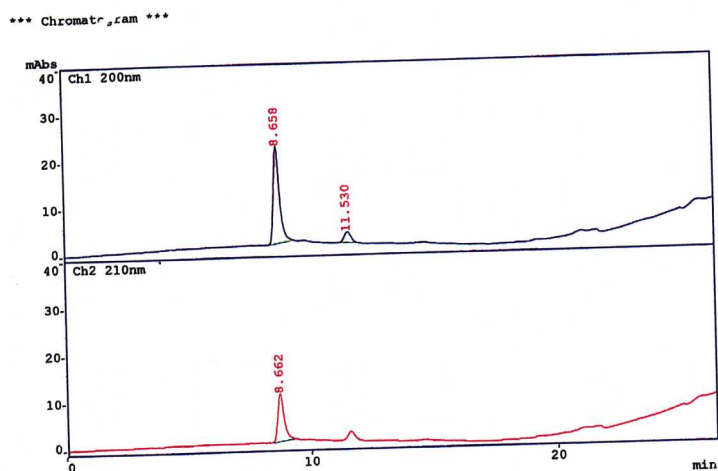


Figura 2-8: Perfil cromatográfico em CLAE do extracto etéreo das frações 1.2.1 para determinação de ácidos alifáticos . Condições experimentais descritas no texto.

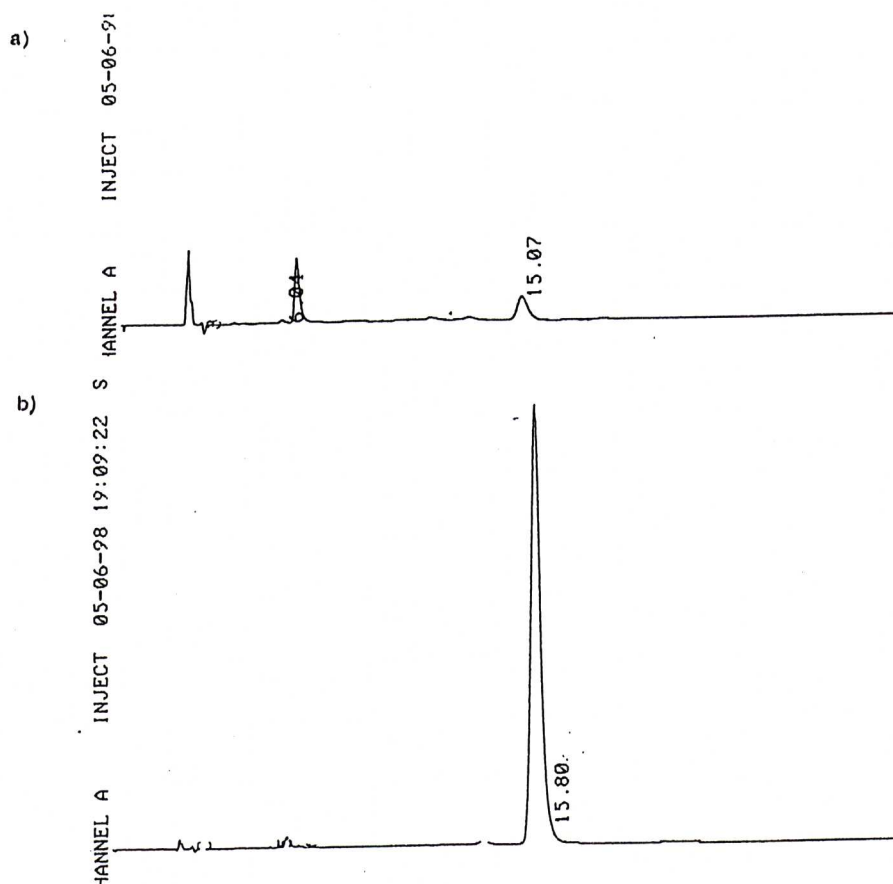


Figura 2-9 Perfil cromatográfico obtido por CLAE do extrato etéreo da fração 1.4. para determinação de ácidos aromáticos. Condições experimentais descritas no texto

Além dos tempos de retenção sumarizados na **Tabela 2-5**, os espectros de absorção, obtidos por DAD, confirmam a identidade da aglicona cianidina nas frações 1.2.1 e 1.2.2 (**Figuras 2-5 e 2-11**)

Tabela 2-4 Tempos de retenção obtidos em CLAE com detector UV-visível e arranjo de diodos e comprimentos de onda de máxima absorção (em detecção com arranjo de diodos) das frações 1.2.1 e 1.2.2 e suas respectivas agliconas.

	t_R (min) (DAD)	$\lambda_{\text{máx. vis.}}$ (nm) (DAD)
Fração 1.2.1	8,063	520
Fração 1.2.2	9,103	520
Aglicona da fração 1.2.1	18,368	526
Aglicona da fração 1.2.2	18,802	526
Aglicona cianidina padrão	18,785	526

a)

b)

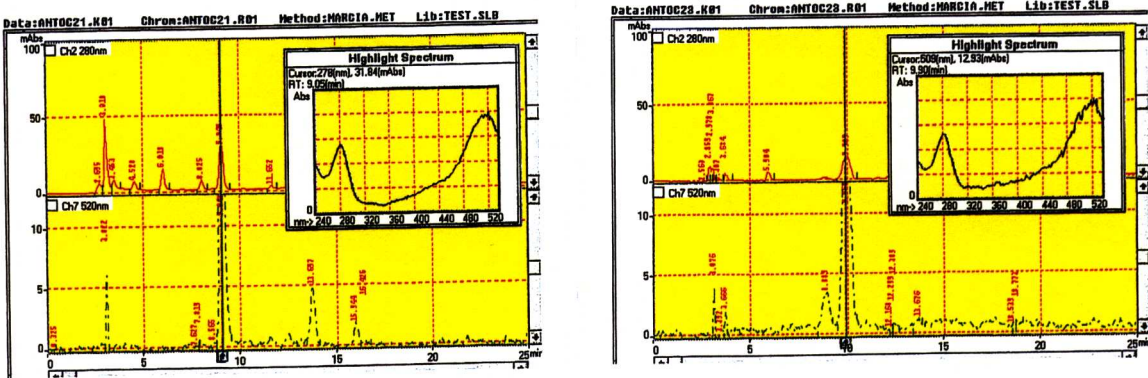
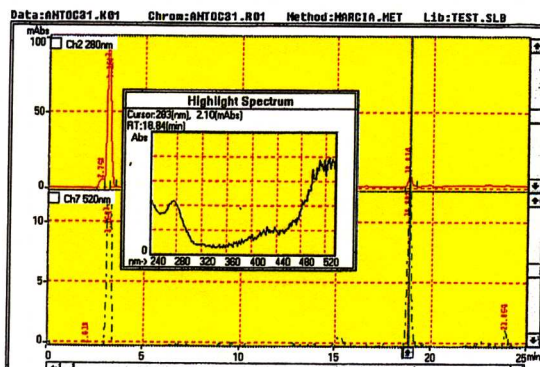
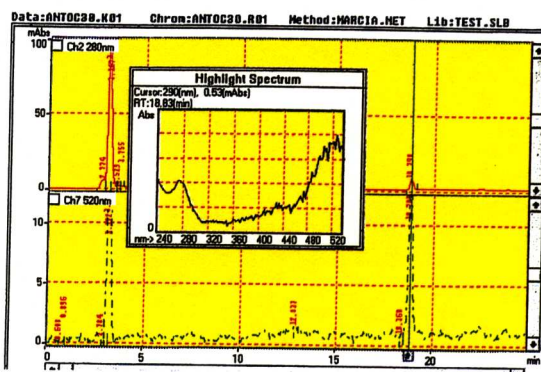


Figura 2-10: Perfis cromatográficos em CLAE e espectro UV-visível dos picos correspondentes às antocianinas das frações 1.2.1 (a) e 1.2.2 (b) , obtidos com detector de arranjo de diodos. Condições experimentais descritas no texto.

a)



b)



c)

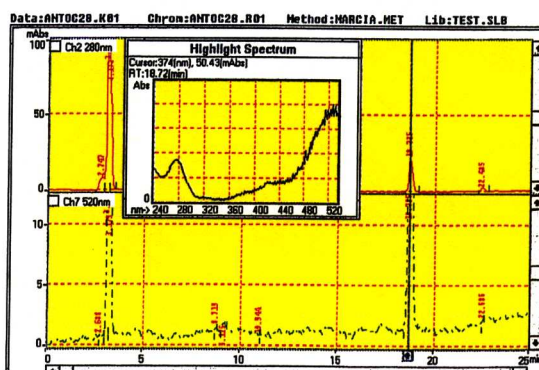


Figura.2-11: Perfis cromatográficos em CLAE e espectro UV-visível dos picos obtidos com detector de arranjo de diodos de: a) aglicona da fração 1.2.1; b) aglicona da fração 1.2.2. c) aglicona padrão de cianidina. Condições cromatográficas descritas no texto.

As identidades das antocianinas presentes nas frações 1.2.1, 1.2.2 e 1.4, pode ser finalmente estabelecida como sendo cianidina 3-maleoilglicosídeo, cianidina 3-glicosídeo e cianidina 3-arabinosídeo e glicosídeo, acilado com ácido siríngico.

Existe pouca informação a respeito das características de eluição de pigmentos acilados com ácido alifáticos. A natureza polar de um éster de ácido malônico resultaria na diminuição da retenção quando comparados com antocianinas não aciladas (TAKEDA *et al.*, 1986). No perfil cromatográfico do extrato metanólico de capim napier, observou-se que o pico 2 correspondente à antocianina da fração 1.2.1 identificada como cianidina 3-glicosídeo acilada

com ácido maléico, elui com menor tempo de retenção que o pico 3 correspondente a antocianina da fração 1.2.2 uma cianidina 3-glicosídeo, o que mostraria que a acilação alifática poderia promover a diminuição do tempo de retenção. Entanto a acilação aromática produz um aumento no tempo de retenção das antocianinas usando CLAE em fase reversa (TAKEDA et al., 1986; KIM, 1989). No perfil cromatográfico de capim napier observou-se que o pico 5 correspondente a fração 1.4, apresentou um tempo de retenção de 17,1 min., aproximadamente o dobro do tempo apresentado por cianidina 3-glicosídeo (pico 3), fato que evidencia uma acilação da molécula de antocianina que estaria aumentando o carácter polar da molécula através dos ácidos aromáticos ligados a ela.

2.3.2 EXPERIMENTOS DE ESTABILIDADE

Uma vez estabelecida a identidade das tres principais antocianinas presentes no capim napier, aquela com maior concentração de pigmento, na proporção relativa de 68%, identificada como cianidina 3-maleoilglicosídeo foi usada para os estudos de estabilidade.

Os pH 2,0 e 3,0 foram escolhidos pela maior concentração da especie fortemente colorida AH^+ e instabilidade crescente em pH maiores a 3,0.

As curvas de absorvância relativa($A-A_0$) em função do tempo para pH 2,0 e pH 3,0 (**Figura 2-12** e **Figura 2-13**) e os valores de porcentagem e retenção da cor, relacionados na **Tabela 2-5** , evidenciam a maior instabilidade da cianidina 3-maleoilglicosídeo a pH 3,0, tanto no escuro como na luz, o que seria esperado uma vez que a cor vermelha predomina em pH ácidos, possivelmente tendo ocorrido um deslocamento do equilibrio em direção à pseudobase incolor B (MAZZA & BROUILLARD, 1987), aparentemente acelerada pela luz, uma vez que a porcentagem de retenção de cor foi determinada como sendo maior para os sistemas deixados ao abrigo da luz.

Elevada perda de absorção foi observada para os sistemas expostos à luz, 50% superior em relação aos sistemas em ausência de luz, em ambos os

maleoilglicosídeo.

A existência de ácido alifático na sua molécula parece não lhe oferecer adicional proteção, uma vez que ela apresenta valores de porcentagem de retenção próximos aos encontrados para cianidinas mono- e diglicosiladas não aciladas (SWEENEY & IACOBUCCHI, 1983; STRINGHETTA, 1991, GUEDES, 1994), sugerindo que somente a acilação com ácidos aromáticos, e em particular as duplas ligações dos ácidos cinâmicos, contribuíram para uma forte associação com o cromóforo (DANGLES *et al*, 1993; GAKH *et al*, 1997).

Diferentemente dos complexos formados por copigmentos como galotaninos e flavonóides, as β -ciclodextrinas promoveram um decréscimo inicial na absorvância quando da formação do complexo de inclusão, o que está de acordo com os resultados reportados por YAMADA *et al*. (1990) e CHANDRA (1992).

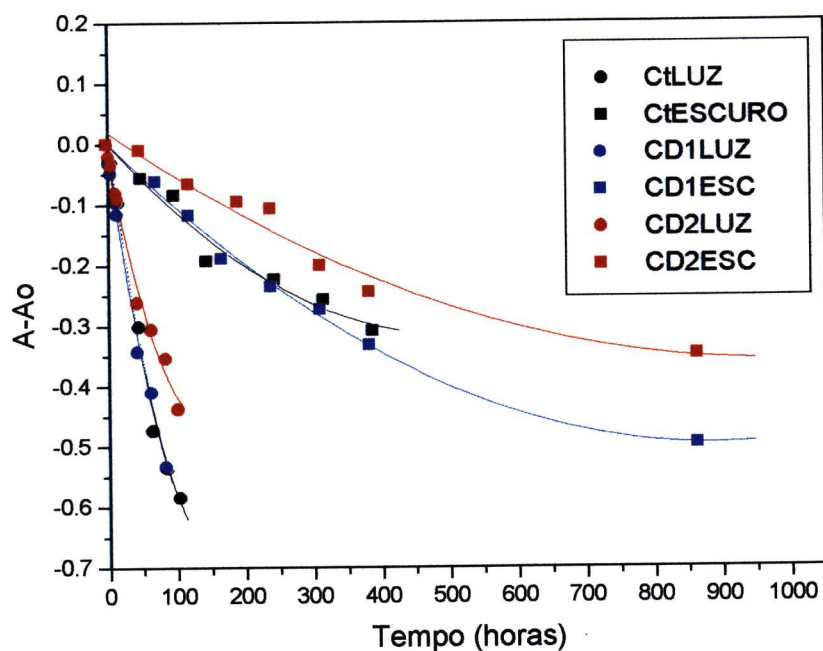


Figura 2-12 Absorvância relativa ($A-A_0$) versus tempo, a pH2, para cianidina 3-maleoilglicosídeo e seus complexos com β -ciclodextrina nas razões molares 1:1 e 1:2, em presença e ausência de luz, onde Ct= cianidina 3-maleoilglicosídeo, CD1= complexo com β -ciclodextrina 1:1 e CD2= complexo com β -ciclodextrina 1:2.

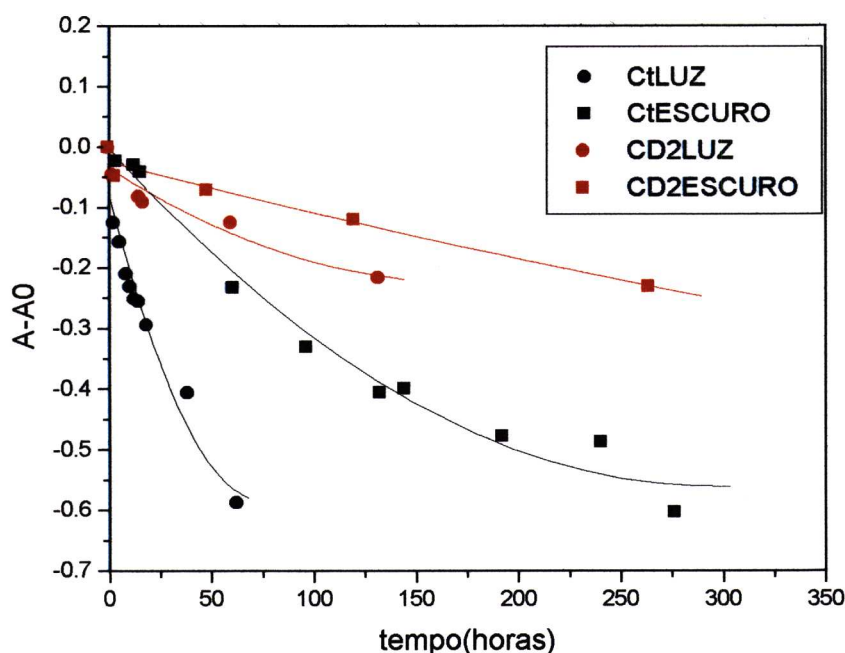


Figura 2-13 Absorvância relativa ($A-A_0$) versus tempo, a pH3, para a cianidina 3-maleoilglicosídeo e seu complexo com β -ciclodextrina na razão molar de 1:2, em presença e ausência de luz, onde Ct= cianidina 3-maleoilglicosídeo, CD2=complexo com β -ciclodextrina 1:2.

Como apresentado nas **Figuras 2-12 e 2-13**, a β -ciclodextrina mostrou aumentar a estabilidade da antocianina a pH 2,0 quando na razão molar de 1:2, com maior efeito na ausência de luz. Entretanto, na razão molar 1:1 não foi observado efeito estabilizante assim na luz como no escuro. Enquanto a pH 3,0, a β -ciclodextrina na razão molar 1:2 apresentou forte efeito estabilizante tanto na luz como na sua ausência como pode observar-se na figura.

O exame dos valores de porcentagem de retenção de cor mostra que reação de complexação parece favorecida pela luz quando o pH é 3,0

Tabela 2. Porcentagem de retenção de cor $(A_0-A)/A_0$ para a cianidina 3-maleoilglicosídeo, em pH 2,0, pH 3,0, presença e ausência de luz, com e sem adição de β -ciclodextrina (CD), nas razões molares de pigmentos/ β -ciclodextrina de 1: 1 e 1: 2, em intervalos de tempo determinados para cada sistema.

SISTEMAS		% RETENÇÃO DA COR	
pH 2,0 - luz ^a		40,7	
pH 3,0 - luz ^b		24,0	
pH 2,0- ausência de luz ^c		75,7	
pH 3,0- ausência de luz ^c		52,2	
pH 2,0- luz ^d		43,7	
CD 1:1			
pH 2,0-ausência de luz ^e		91,3	
CD 1:1			
pH 2,0-luz ^f		52,8	
CD 1:2			
pH 2,0-ausência de luz ^g		94,8	
CD 1:2			
pH 3,0-luz ^h		64,2	
CD 1:2			
pH 3,0- escuro		76,4	
CD 1:2			
a: após 64hs	b: após 62hs	c: após 144hs	d: após 64 hs
e: após 72hs	f: após 64 hs	g: após 64hs	h: após 132hs
i: após 120hs			

Estes resultados estão de acordo aos encontrados por YAMADA *et al* (1980) e sugerem que o complexo de inclusão pode proteger a antocianina da decomposição apesar da sua forma pseudobase lábil

2. 4 CONCLUSÕES

Capim napier pode ser considerado fonte promissora de matéria corante, em virtude de seu significativo teor de antocianinas de 67,7mg/100g, quando comparado a outras folhas.

A análise das características espectrais combinada ao comportamento em cromatografia em papel, e camada delgada e pelos tempos de retenção obtidos por CLAE comparados ao de padrões e co-cromatografias, estabeleceu que este capim é constituído por cinco antocianinas, das quais três delas estão presentes nas proporções relativas de 68%, 11% e 15%, foram identificadas, respectivamente como, cianidina 3-maleoilglicosídeo, cianidina 3-glicosídeo, e cianidina 3-arabinosilglicosilada acilada com ácido siríngico.

A cianidina 3-maleoilglicosídeo mostrou-se mais estável a pH 2,0 que a pH 3,0, com a luz sendo o agente mais destrutivo para a cianidina 3-maleoilglicosídeo, principalmente a pH 3,0.

A adição de β -ciclodextrinas promoveu estabilização à cianidina 3-maleoilglicosídeo quando a pH 3,0 e luz estiveram combinados, com aumento da retenção da cor, em relação ao sistema não complexado, de 62,5%.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSEN, O.M. (1989). High- performance liquid chromatographic analysis of anthocyanins with diode-array detector. *J. Food Sci.*, **50**, 1230-1234.
- BAJ, A; BOMBARDELLI, E.; GABETTA, B.; MARTINELLI, E.M. (1983) Qualitative and quantitative evaluation of *Vaccinium myrtillus* anthocyanins by high-resolution gas chromatography and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **279**, 365-372.
- BORGER, G.& BARZ, W. (1988) Malonated flavonol 3-glucosides in *Cicer Arietinum*. *Phytochemistry*, **27**, 3714-3716.
- BRIDLE, P.; LOEFFLER, R.S.T.; TIMBERLAKE, C.F.; SELF, R. (1984) Cyanidin 3-malonylglucoside in *Cichorium intybus*. *Phytochemistry* **23**, 2968-2970.
- CHANDRA, A.; NAIR, M. G. & IEZZONI, A. F. (1993). Isolation and stabilization of anthocyanins from tart cherries (*Prunus cerasus* L.). *J. Agric. Food Chem.* **41**(7), 1062-1065.
- CLYDESDALE, F.M. (1993) Color as a factor in food choice. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **33**(1), 83-101.

- CROTTFRIED KISSMANN, K. (1991) *Plantas Infestantes e Nocivas*. Tomo I. BASF Brasileira S.A. São Paulo. 603pp.
- DANGLES, O. & BROUILLARD, R. (1992) Polyphenols interactions. The copigmentation case: thermodynamic data from temperature variation and relaxation kinetics. Medium effect. *Can. J. Chem.*, **70**, 2174-2189.
- FRANCIS, F.J. (1982). Analysis of anthocyanins. Em *Anthocyanins as Food Colors* (P. Markakis, ed.), p.182-208, Academic Press, New York.
- FRANCIS, F.J. (1989). Food Colorants. Anthocyanins. *Critical reviews in food science and nutrition*. **28** (4) 273-313.
- FULEKI, T.; FRANCIS, F.J. (1968). Quantitative methods for anthocyanins. 3. Purification of cranberry anthocyanins. *J. Food Sci.*, **33**, 266-274.
- GEISSMAN, T.A.; JORGENSEN, E.C. & HARBORNE, J.B. (1953). The effect of aluminium chloride on absorption spectra of anthocyanins. *Chemical Industry*, December, 1389-1291.
- GUEDES, M. C. & LYRIO, S. A. (1997). Intensificación del color y estabilidad de las antocianinas. *Ciencia e Tecnología de Alimentos*, in press.
- GUEDES, M. C. (1994). Influência do anel B na estabilidade das antocianinas e antocianidinas. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.
- GUEDES, M.C. & PEREIRA, D.L.^o (1998) Comparative stabilization of anthocyanins from napier grass (*Pennisetum purpureum*) with tannic acid, ascorbic acid and citric acid. In "Proceedings of the XVI th International Conference of the Group Polyphenols".
- HARBORNE, J.B. (1958 b) Spectral Methods of Characterizing Anthocyanins. *Biochem.J.* **70**, 22-28.
- HARBORNE, J.B. (1958). The chromatographic identification of anthocyanin pigments. *J. Chromatog.* **1**, 473-488.
- HARBORNE, J.B. (1967) Comparative biochemistry of flavonoids, p.1-36. Academic Press. Londres. England.
- HARBORNE, J.B.; BOARDLEY, M. (1985) The widespread occurrence in nature of anthocyanins as zwitterions. *Z.Naturforsch.* **40C**, 305
- HEBRERO, E.; GARCIA-RODRIGUEZ, C.; SANTOS-BUELGA, C. e RIVAS-GONZALO, J. C. (1989). Analysis of anthocyanins by high performance liquid chromatography - diode array spectroscopy in a hybrid grape variety (*Vitis vinifera* x *Vitis berlandieri* 41B). *Am. J. Enol. Vitic.* **40**(4), 283-291.
- IDAKA, E.; OHASHI, Y.; OGAWA, T. (1987) Structure zebrinin, a novel acylated anthocyanin isolated from *Zebrina pendula*. *Tetrahedron Lett.*, **28** (17), 1901-1904.
- KIM, H.J.; NONAKA, G.I.; FUJIEDA, K.; UEMOTO, S. (1989) Anthocyanidin malonylglucosides in flowers of *Hibiscus syriacus*. *Phytochemistry*, **28**, 1503.
- KALLIO, H; PALLASALO, S.; KARPPA, J. & LINKO, R.R. (1986) Comparison of the half lives of the anthocyanins in the juice of crowberry, *Empetrum nigrum* *J. Food Sci.*, **51**(2), 408-410.
- LEES, D.H. & FRANCIS, F.J. (1972) Quantitative methods for anthocyanins: 6. Flavonols and anthocyanins in fresh cranberries. *Hortscience* **7**, 83-84, citado por FRANCIS, F.J. (1982).

- MARKHAM, K.R. (1982) *Techniques of Flavonoid Identification*; Academic Press: New York, 1982.
- MAZZA, G; BROUILLARD, F. Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products. *Food Chem.* **25**, 207-225, 1987.
- MAZZA, G. & MINIATI, E. (1993) *Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- PINA, F.; FIGUEIREDO, P.; SILVA, M.G. & NEVES, H.C. (1992). Photodegradation of malvidin 3,5-diglucoside in aqueous solution. In "Proceedings of the XVI th International Conference of the Group Polyphenols".
- POEJ-LANGSTON, M.S. & WROLSTAD, R.E. (1982) Color degradation in an ascorbic acid-anthocyanin-flavonol system. *J. Food Sci.*, **46**, 1218-1220.
- SAITO, N.; ABE, K; HONDA, T.; TIMBERLAKE, C.; BRIDLE, P. (1985) Acylated delphinidin glucosides and flavonols from *Clitoria ternatea*. *Phytochemistry*, **24**, 1583-1585
- SCHEFFELDT, P & HRAZDINA, G. (1978) Copigmentation of Anthocyanins under Physiological conditions. *Journal of Food Science*, **43**, 517-520.
- STAHL, E. (1969) *Thin-layer chromatography, a laboratory handbook*. Springer-Verlag, New York, pp899.
- STRINGHETA, P. C. (1990). Identificação da Estrutura e Estudo da Estabilidade das Antocianinas Extraídas da Inflorescência de Capim Gordura (*Melinis minutiflora*, Pal. De Beauv.). Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo
- SWEENEY & IACOBUECCI, 1983. Effects of substitution on the stability of 3-deoxianthocyanidins in aqueous solution. *J. Agric. Food Chem.*, **31**, 531-534
- TAKEDA, K.; HARBORNE, J.B.; SELF, R. (1986) Identification of malonated anthocyanins in the Liliaceae and Labiatae. *Phytochemistry*, **25**, 2191.
- TSUDA, T., WATANABE, M., OHSHIMA, K., NORINOBU, S., CHOI, S.W., KAWAKISHI, S. & OSAWA, T. (1994) Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyanidin 3-O-b-D-glucoside and cyanidin. *J. of Agric. Food Chem.* **42**, 2407-2410.
- YAMADA, T., KOMIYA, T & AKAKI, M. (1980) Formation of an inclusion complex of anthocyanin with cyclodextrin. *Agric. Biol. Chem.*, **44** (6), 1411-1413.
- WISSGOTT, U. & BORTLIK, K. (1996) Prospects for new natural food colorants. *Trends in Food Science & Technology*. **7**, 116-119.
- WANG, H., CAO, G, PRIOR, R.L. (1997) Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 304-309.

CONCLUSÕES

Capim napier pode ser considerado fonte promissora de matéria corante, em virtude de seu significativo teor de antocianinas de 67,7mg/100g, quando comparado a outras folhas.

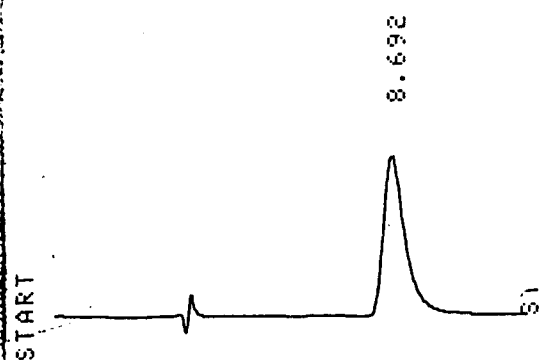
A análise das características espectrais combinada ao comportamento em cromatografia em papel, e camada delgada e pelos tempos de retenção obtidos por CLAE comparados ao de padrões e co-cromatografias, estabeleceu que este capim é constituído por cinco antocianinas, das quais três delas estão presentes nas proporções relativas de 68%, 11% e 15%, foram identificadas, respectivamente como, cianidina 3-maleoilglicosídeo, cianidina 3-glicosídeo, e cianidina 3-arabinosilglicosilada acilada com ácido siríngico.

A cianidina 3-maleoilglicosídeo mostrou-se mais estável a pH 2,0 que a pH 3,0, com a luz sendo o agente mais destrutivo para a cianidina 3-maleoilglicosídeo, principalmente a pH 3,0.

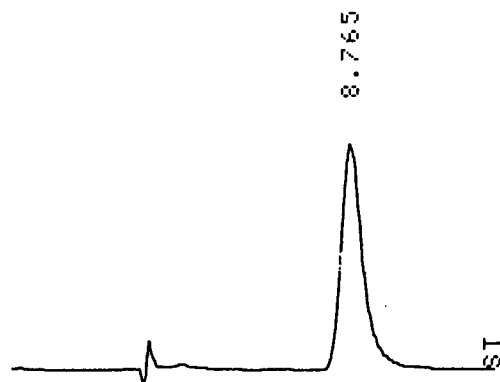
A adição de β -ciclodextrina promoveu uma sensível estabilização à antocianina, quando pH 3,0 e luz estavam combinados, embora esses agentes isoladamente tenham sido deletéreos para a cianidina 3-maleoilglicosídeo. Observou-se alguma estabilização da cianidina 3-maleoilglicosídeo quando duas moléculas de β -ciclodextrina foram usadas, a pH 2,0 e em ausência de luz. A diminuição do número de moléculas para somente uma não imprimiu qualquer proteção ao sistema, quando exposto à luz ou em sua ausência.

ANEXOS

a)

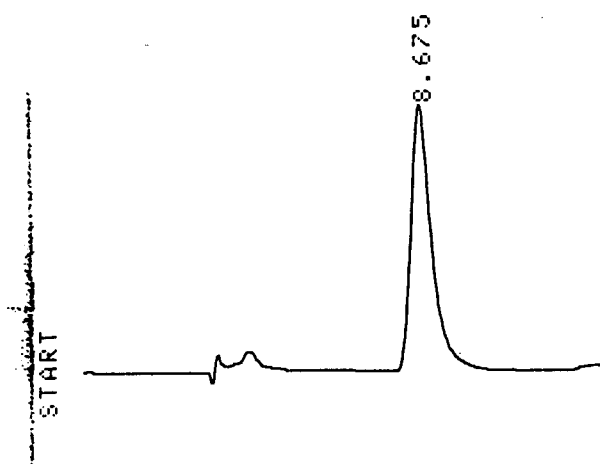


b)



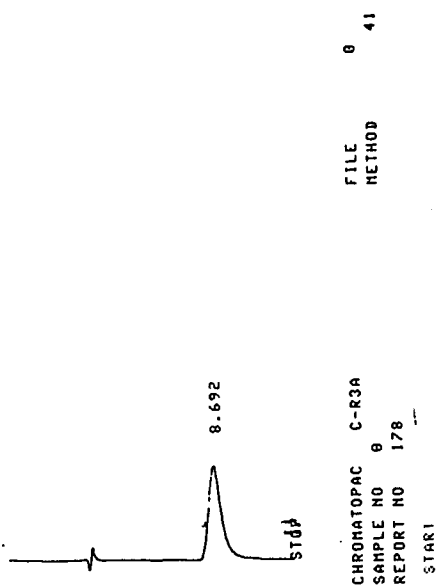
CHROMATOPAC C-R3A
 SAMPLE NO 0
 REPORT NO 182

c)

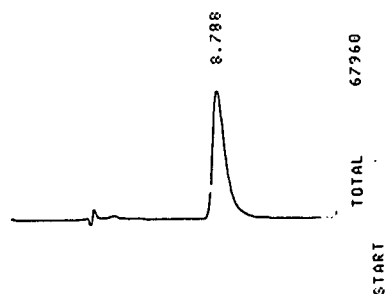


Anexo 1 Perfis cromatográficos obtidos por CLAE (sistema CLAEII) de : padrão da aglicona cianidina, b) aglicona da antocianina da fração 1.2.1 e c) co-cromatografia da aglicona da antocianina 1.2.1 com padrão de cianidina. Condições cromatográficas descritas no texto.

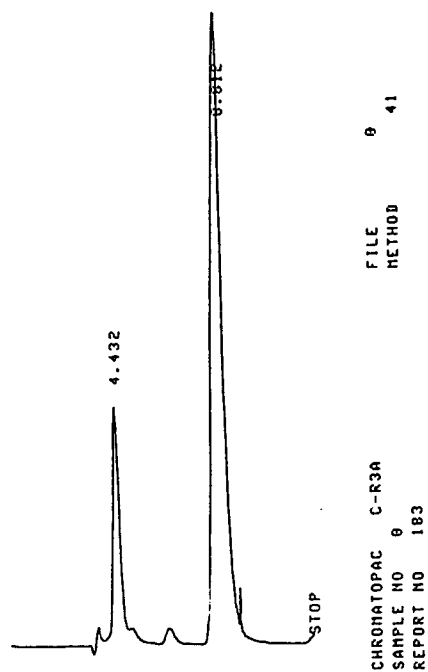
a)



b)



c)



Anexo 2 Perfis cromatográficos em CLAE (sistema CLAEII) de a) padrão da aglicona cianidina b) aglicona da antocianina da fração 1.2.2 e c) co-cromatografia da aglicona da antocianina correspondente à fração 1.2.2 com padrão de cianidina. Condições cromatográficas descritas no texto.

a)

Tempo (h)	A	1/A	-log(A)
0	0,799	1,25156	0,097
3	0,775	1,29032	0,111
6	0,766	1,30548	0,116
11	0,713	1,40252	0,147
13	0,715	1,3986	0,146
15	0,703	1,42248	0,153
44	0,497	2,01207	0,304
64	0,325	3,07692	0,488
85	0,263	3,80228	0,58
103	0,214	4,6729	0,67

b)

Tempo (h)	A	-log(A)	1/A
0	0,794	0,1	1,2594
48	0,737	0,132	1,3568
96	0,709	0,149	1,4104
144	0,601	0,193	1,6638
192	--	0,221	--
243	0,57	0,244	1,7543
315	0,536	0,271	1,8656
387	0,485	0,315	2,0618

c)

Tempo (h)	A	-log(A)	1/A
0	0.728	0.138	1.37363
3	0.697	0.157	1.43472
6	0.68	0.167	1.47059
11	0.64	0.194	1.5625
13	0.632	0.199	1.58228
15	0.612	0.213	1.63399
44	0.385	0.415	2.5974
64	0.318	0.498	3.14465
85	0.194	0.712	5.15464

d)

Tempo (h)	A	-log(A)	1/A
0	0.716	0.145	1.39665
72	0.654	0.184	1.52905
120	0.598	0.223	1.67224
168	0.527	0.278	1.89753
240	0.48	0.318	2.08333
312	0.442	0.355	2.26244
384	0.383	0.417	2.61097
864	0.219	0.66	4.56621

e)

Tempo (h)	A	-log(A)	1/A
0	0.648	0.188	1.54321
3	0.627	0.203	1.5949
6	0.612	0.213	1.63399
11	0.566	0.247	1.76678
13	0.567	0.246	1.76367
15	0.558	0.253	1.79211
44	0.386	0.413	2.59067
64	0.342	0.466	2.92398
85	0.294	0.532	3.40136
103	0.21	0.678	4.7619

f)

Tempo (h)	A	-log(A)	1/A
0	0.648	0.188	1.54321
48	0.638	0.195	1.5674
120	0.582	0.235	1.71821
192	0.553	0.257	1.80832
240	0.541	0.267	1.84843
312	0.447	0.35	2.23714
384	0.403	0.395	2.48139
864	0.299	0.524	3.34448

Anexo3. Dados de Absorvância da cianidina 3- maleoilglicosídeo: a) pH 2, em presença de luz; b) pH2, em ausência de luz; c) pH2, CD1:1, em presença de luz;d) pH2, CD1:1, em ausência de luz; e) pH2, CD 1:2, em presença de luz; f) pH2, CD 1:2, em ausência de luz.

a)

Tempo (h)	A	1/A	-log(A)
0	0,799	1,25156	0,097
3	0,775	1,29032	0,111
6	0,766	1,30548	0,116
11	0,713	1,40252	0,147
13	0,715	1,3986	0,146
15	0,703	1,42248	0,153
44	0,497	2,01207	0,304
64	0,325	3,07692	0,488
85	0,263	3,80228	0,58
103	0,214	4,6729	0,67

b)

Tempo (h)	A	-log(A)	1/A
0	0,794	0,1	1,2594
48	0,737	0,132	1,3568
96	0,709	0,149	1,4104
144	0,601	0,193	1,6638
192	--	0,221	--
243	0,57	0,244	1,7543
315	0,536	0,271	1,8656
387	0,485	0,315	2,0618

c)

Tempo (h)	A	-log(A)	1/A
0	0,772	0,112	1,2953
2	0,647	0,189	1,5456
5	0,615	0,211	1,6260
8	0,562	0,25	1,7793
10	0,541	0,267	1,8484
12	0,521	0,283	1,9193
14	0,517	0,287	1,9342
18	0,478	0,321	2,0920
38	0,366	0,437	2,7322
62	0,185	0,733	5,4054

d)

Tempo (h)	A	-log(A)	1/A
0	0,834	0,079	1,1990
3	0,811	0,091	1,2330
12	0,805	0,094	1,2422
15	0,793	0,101	1,2610
60	0,602	0,22	1,6611
96	0,503	0,298	1,9880
132	0,429	0,368	2,331
144	0,435	0,361	2,2988
192	0,357	0,447	2,8011
240	0,348	0,458	2,8735
276	0,232	0,635	4,3103

Anexo4. Dados de Absorvância da cianidina 3- maleoilglicosídeo: a) pH2, em presença de luz, b) pH2, em ausência de luz, c) pH 3, em presença de luz; d) pH3, em ausência de luz.

a)

Tempo (h)	A	-log(A)	1/A
0	0.604	0.218	1.65563
2	0.559	0.253	1.78891
15	0.523	0.281	1.91205
17	0.514	0.289	1.94553
60	0.479	0.32	2.08768
132	0.388	0.411	2.57732

b)

Tempo (h)	A	-log(A)	1/A
0	0.508	0.294	1.9685
3	0.461	0.336	2.1692
48	0.438	0.359	2.28311
120	0.388	0.411	2.57732
264	0.278	0.556	3.59712

Anexo 5. Dados de Absorvância da cianidina 3- maleoilglicosídeo com adição de β- ciclodextrina na razão de 1:2, a pH 3: a) em presença de luz; b) em ausência de luz.