



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

GRUPO DE PESQUISA EM QUÍMICA ANALÍTICA E EDUCAÇÃO

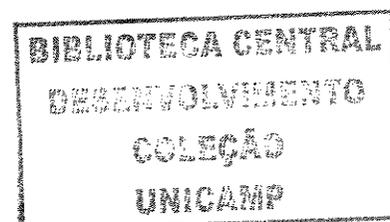
TESE DE DOUTORADO

*“Aplicações analíticas e didáticas de
antocianinas extraídas de frutas”*

AUTORA: DANIELA BROTTLO LOPES TERCI

ORIENTADORA: PROFa. DRa. ADRIANA VITORINO ROSSI

Novembro/2004



UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	T271a
UNICAMP	
V	EX
TOMBO BC	65489
PROC.	16-86-03
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	14,00
DATA	31/8/05
Nº CPD	

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA
UNICAMP

Bib ID 363992

T271a

Terci, Daniela Brotto Lopes.

Aplicações analíticas e didáticas de antocianinas
extraídas de frutas / Daniela Brotto Lopes Terci. --
Campinas, SP: [s.n], 2004.

Orientadora: Adriana Vitorino Rossi.

Tese – Universidade Estadual de Campinas, Instituto
de Química.

1. Antocianinas. 2. Frutas. 3. Aplicações analíticas.
4. Aplicações didáticas. I. Rossi, Adriana Vitorino.
II. Instituto de Química. III. Título.

Título em inglês: Analytical and didactic applications of anthocyanins extracted from fruits.

Palavras-chave em inglês: Anthocyanins, Fruits, Analytical applications, Didactic applications.

Área de concentração: Química Analítica.

Titulação: Doutora em Química Analítica.

Banca examinadora: Efraim Lázaro Reis, Romeu Cardozo Rocha Filho, Solange Cadore, Edvaldo Sabadini, Adriana Vitorino Rossi (orientadora).

Data de defesa: 29/11/2004.

"... Vou te ensinar, dizeis, vou te mostrar o caminho que deves seguir; vou te instruir, fitando em ti os meus olhos..."

Salmo de Davi
(Salmo 31,8)

Ao meu marido Douglas,
por toda atenção e amor.

Aos meus pais Veronica e Antonio Carlos
e meu irmão Humberto,
por todo carinho.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, a todos os professores que passaram pela minha vida e contribuíram para minha formação acadêmica e pessoal, em especial a Profa. Dra. Solange Cadore que me ensinou os primeiros passos no desenvolvimento de pesquisas através dos projetos de iniciação científica e a Profa. Dra. Adriana Vitorino Rossi pela amizade e pela orientação muito atenciosa e exigente do trabalho que configura esta tese de doutorado, que fez ampliar meus conhecimentos de maneira significativa.

Aos professores Dr. Aécio Pereira Chagas e Dra. Susanne Rath que deram valiosas sugestões e contribuições para o desenvolvimento deste trabalho e aos professores Dra. Raquel Tassara Nogueira, Dra. Aloísia Laura Moretto, Ms. Marcos Antonio Torres Cezário e Dr. Marcelo Ganzarolli de Oliveira que abriram espaço em suas aulas para a realização das atividades didáticas desenvolvidas neste trabalho.

Às minhas famílias, Lopes e Terci, pelo incentivo na realização desta tese de doutorado e, principalmente ao meu marido Douglas Terci pelo amor, apoio e paciência durante todos estes anos.

A todos os colegas de laboratório pela amizade, em especial à Acácia Adriana Salomão, que me ajudou muito na organização de o todo material experimental utilizado, à Juliana Terra que participou no desenvolvimento das atividades didáticas, à Tânia Aparecida Lopes Pinheiro, cujo projeto de iniciação científica inspirou a realização desta tese e ao Ricardo Pereira pela colaboração nas análises cromatográficas.

A direção e aos funcionários do Instituto de Química da UNICAMP pelo apoio acadêmico e técnico.

Por fim, agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro.

CURRÍCULO DA AUTORA

A autora desta Tese de Doutorado formou-se em Bacharelado em Química Tecnológica em 1999 pela Universidade Estadual de Campinas, sendo diplomada pelo Conselho Regional de Química IV Região por Honra ao Mérito de Melhor Aluna. Em 2001, formou-se em Licenciatura em Química pela mesma instituição. Durante a graduação, realizou Iniciação Científica com projetos sobre espectrometria de absorção atômica e métodos de pré-concentração, contemplada com bolsas de estudos financiadas pelo SAE/UNICAMP (maio/1996 a abril/1997) e PIBIC-97/CNPq (agosto/1997 a julho/1998). Participou do programa de Auxiliar Didático na disciplina Química Geral Experimental sob orientação dos Profs. Drs. Nelson Durán e Fred Yokio Fujiwara (2º sem./1998). Realizou dois estágios supervisionados em setores privados: Dow Corning do Brasil Ltda. (120 h, de agosto a novembro/1998) e IBM Brasil - Indústria, Máquinas e Serviços Ltda. (1920 h, de janeiro a dezembro/1999), atuando no desenvolvimento de um projeto sobre aplicação de silicões em óxidos e na área de Meio Ambiente trabalhando com a ISO 14000, respectivamente. Foi contratada como Professora Temporária I, através de concurso público publicado no D.O.E. de 05/07/2000, Seção II pág. 47, para dar aulas de Química Analítica Instrumental no Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza - ETE Conselheiro Antonio Prado Campinas (fevereiro a julho/2000). Foi aprovada no Processo de Admissão do Mestrado da UNICAMP no início do ano 2000. Iniciou os estudos sobre pigmentos naturais de antocianinas, incluindo aspectos analíticos e didáticos, sob orientação da Profa. Dra. Adriana Vitorino Rossi e contemplada com bolsa de mestrado da FAPESP (processos 00/02220-8). cursou os 36 créditos obrigatórios, tem sido aprovada com conceito máximo em todas as disciplinas: Métodos Cromatográficos de Separação ministrada pelos professores Dra. Carol Collins e Dra. Izabel Cristina Sales Fontes Jardim, Métodos Espectroquímicos de Análise ministrada pelos professores Dra. Adriana Vitorino Rossi, Dr. Ronei Jesus Poppi, Dr. Marco Aurélio Zezzi Arruda e Métodos Analíticos Aplicados à Determinação de Traços ministrada pelos professores Dra. Solange Cadore, Dr. Nivaldo Bacan e Dr. Manoel Luis Aleixo. No ano 2000, foi aprovada no exame de Proficiência em Inglês. No dia 06/11/2001, realizou o Exame

para passagem Direta para o Doutorado, com banca examinadora composta pelos professores Dra. Solange Cadore e Dr. Aécio Pereira Chagas, além da Dra. Adriana Vitorino Rossi, sendo aprovada sem restrições. Em 01/06/2002, teve o projeto de Doutorado Direto aprovado pela FAPESP (processo 01/12712-8)). Em 2002, concluiu os créditos obrigatórios para o programa de Doutorado da UNICAMP, cursando as disciplinas Tópicos Especiais em Química Analítica III, ministrada pelos professores Dr. Marco Aurélio Zezzi Arruda e Dra. Susanne Rath e Tópicos Especiais em Química Analítica 2, ministrada pelos professores Dra. Adriana Vitorino Rossi e Dr. Matthieu Tubino, tendo sido aprovada com o conceito máximo.

Durante a pós-graduação colaborou com a Profa. Dra. Adriana Vitorino Rossi na organização/participação de diversos eventos: II Simpósio de Profissionais do Ensino de Química – SIMPEQ (IQ-UNICAMP, 2002), 1^o Fórum dos Professores de Química do Ensino Médio (São Carlos, 2003), III SIMPEQ (IQ-UNICAMP, 2003), Oficina para professores de Química da Rede Pública Estadual de Ensino da Região de Jundiaí (Jundiaí, 2003), Programa Ciência & Arte nas Férias (IQ-UNICAMP, 2004), 14^o Encontro Nacional de Educadores em Paulínia (Paulínia, 2004), IV SIMPEQ e I Encontro Paulista de Pesquisa em Ensino de Química - EPPEQ (IQ-UNICAMP, 2004).

Durante o contínuo trabalho científico, participou de 10 eventos científicos, incluindo congressos e encontros nacionais e internos da UNICAMP. Nestes eventos, foram apresentados 25 trabalhos na forma de painel, sendo publicados em anais. Com relação a demais publicações, foi elaborado um relatório de pedido de patente (*Papel indicador de pH universal usando papel de filtro qualitativo impregnado com extratos alcoólicos de frutas contendo antocianinas*), um artigo na revista Química Nova (*Indicadores de pH: papel ou solução?*) e um artigo on-line pela Editora Moderna (*Diferentes abordagens para aulas de Química no Ensino Médio* - www.moderna.com.br/artigos/quimica/0050).

Além das atividades acadêmicas e de pesquisa, no primeiro semestre de 2003 a autora ministrou as disciplinas Química Geral e Experimental e Química Analítica Instrumental, na União das Faculdades da Fundação Hermínio Ometto de Araras - UNIARARAS e foi aprovada no concurso público de prova e títulos para provimento de cargo de professor de Química Educação Básica II no Estado de São Paulo.

Para maiores detalhes, consultar Currículo Lattes.

RESUMO

“Aplicações analíticas e didáticas de antocianinas extraídas de frutas”

Aluna: Daniela Brotto Lopes Terci

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Vitorino Rossi

As antocianinas são os principais pigmentos naturais responsáveis pela coloração vermelha, azul e roxa de flores e frutos. As cores que as antocianinas exibem, dependem, entre outros fatores, do pH do meio. Isto mostra que elas podem ser usadas como indicadores de pH. Além disso, as antocianinas podem ser oxidadas e descoloridas na presença de agentes oxidantes, como bissulfito de sódio e hipoclorito de sódio. Neste trabalho, foram exploradas diversas frutas vermelhas, fontes naturais destes pigmentos. Considerando-se aspectos como disponibilidade em praticamente todas as regiões do Brasil e sazonalidade de frutificação, as espécies selecionadas foram: *Morus nigra* (amora), *Syzygium cumini* (jambolão), *Myrciaria cauliflora* (jaboticaba) e *Vitis vinifera* (uva). Do ponto de vista analítico, os estudos realizados envolveram a otimização de procedimentos de extração, purificação, identificação, quantificação e avaliação da estabilidade das antocianinas presentes nas espécies selecionadas. Também foi feita a caracterização das diferentes espécies coloridas das antocianinas extraídas em função do pH, avaliação do uso destes extratos como indicador, em titulações ácido-base, e avaliação dos papéis de filtro impregnados com os extratos, como papel indicador de pH. Foram estudados dois importantes comportamentos das antocianinas: equilíbrio químico ácido-base e a reação de óxido-redução, que foi empregada para o desenvolvimento de uma proposta analítica simplificada para a determinação de cloro livre em amostras de produtos higienizadores. Com relação à parte didática deste trabalho, os resultados obtidos levaram ao desenvolvimento e aplicação de atividades experimentais didáticas que foram testadas com alunos e professores do ensino médio e técnico em química de escolas públicas de Campinas-SP e estudantes de graduação em química da Universidade Estadual de Campinas.

ABSTRACT

"Analytical and didactic applications of anthocyanins extracted from fruits"

Author: Daniela Brotto Lopes Terci

Adviser: Profa. Dra. Adriana Vitorino Rossi

Anthocyanins are the main natural pigments from the flavonoid class that are responsible for the red, purple and blue colors of flowers and fruits. The color that they exhibit depends on, among other factors, pH. This property indicates that anthocyanins can be used as acid-base indicator. Moreover, a nucleophilic attack by oxidizing agents such as hydrogen peroxide and sulfur dioxide can effectively decolorize anthocyanins. In this work several natural sources of these pigments were studied. Considering aspects such as availability in practically all regions of Brazil and seasonal period, were selected 4 fruits: *Morus nigra* (blackberry), *Syzygium cuminii* (jambolan), *Myrciaria cauliflora* (jabuticaba) and *Vitis vinífera* (grape). From the analytical point of view, the studies involved the optimization of extraction procedures, purification, qualitative and quantitative analysis and studies on the stability of the anthocyanins from the selected fruits. The characterization of the different colored species as a function of pH, the use of these extracts as indicator in acid-base titrimetry and the use of the extracts-impregnated filter paper as pH indicator were also studied. Two important properties of the anthocyanins were studied: the acid-base equilibrium and the oxidation/reduction reaction, used in a simplified analytical proposal for the determination of free chlorine in samples of household products, such as bleaches and disinfectants. With relation to the didactic part involved in this work, experimental activities were developed and tested with students and teachers from public high school and technical school of Campinas and also with chemistry undergraduate students from the Universidade Estadual de Campinas.

SUMÁRIO

Legendas de abreviaturas e termos	xix
Capítulo 1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
Capítulo 2. OBJETIVOS GERAIS	5

PARTE 1: APLICAÇÕES ANALÍTICAS

Capítulo 3. INTRODUÇÃO	11
3.1. Antocianinas	13
3.2. Obtenção das antocianinas a partir de vegetais	15
3.2.1. Extração.....	16
3.2.2. Purificação	17
3.2.3. Separação	17
3.2.4. Identificação.....	19
3.2.5. Quantificação.....	20
3.3. Reações das antocianinas em meio aquoso.....	22
3.3.1. Reações de equilíbrio químico ácido-base.....	23
3.3.2. Reações de óxido-redução	24
Capítulo 4. OBJETIVOS	27
Capítulo 5. PARTE EXPERIMENTAL	31
5.1. Considerações gerais.....	33
5.2. Reagentes, materiais e equipamentos	35
5.2.1. Reagentes	35
5.2.2. Soluções Tampão.....	35
5.3.3. Materiais e equipamentos.....	36
5.3. Procedimentos experimentais	37

5.3.1. Análise termogravimétrica dos extratos antociânicos	37
5.3.2. Otimização de procedimentos de extração das antocianinas	37
5.3.3. Identificação das antocianinas	39
5.3.4. Quantificação das antocianinas totais	40
5.3.5. Purificação dos extratos antociânicos brutos	41
5.3.6. Avaliação de alguns parâmetros da extração em fase sólida	44
5.3.7. Estudo da estabilidade dos extratos antociânicos brutos	45
5.3.8. Reações envolvendo as antocianinas	47
Capítulo 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
6.1. Análise termogravimétrica dos extratos antociânicos	57
6.2. Otimização de procedimentos de extração das antocianinas	58
6.3. Análise qualitativa dos extratos antociânicos	62
6.3.1. Identificação da presença da classe antocianinas	62
6.3.2. Identificação das antocianinas	64
6.3.3. Identificação dos grupos propostos por Cabrita	69
6.4. Quantificação das antocianinas totais nas frutas	71
6.5. Purificação dos extratos antociânicos brutos	78
6.6. Avaliação de alguns parâmetros da extração em fase sólida	88
6.6.1 Avaliação da recuperação das antocianinas	88
6.6.2. Avaliação da capacidade do cartucho	88
6.7. Estudo de estabilidade dos extratos antociânicos	89
6.8. Reações	100
6.8.1. Ácido-base	100
6.8.1.1. Reações de equilíbrio químico ácido-base	100
6.8.1.2. Caracterização visual das antocianinas em função do pH	101
6.8.1.3. Determinação do pK_a aparente dos extratos	105
6.8.1.4. Papel indicador de pH	109
6.8.1.5. Uso dos extratos como indicador em volumetria de neutralização	111
6.8.2. Reações de óxido-redução	118

Capítulo 7. CONCLUSÕES.....	127
PARTE 2: APLICAÇÕES DIDÁTICAS	
Capítulo 8. INTRODUÇÃO	133
8.1. Indicadores.....	135
8.2. Aspectos históricos.....	136
8.3. Experimentação no ensino de Química.....	142
8.4. Uso de extratos antociânicos naturais no ensino de Química.....	145
Capítulo 9. OBJETIVOS.....	147
Capítulo 10. DESENVOLVIMENTO.....	151
10.1. Aplicação dos experimentos nos diferentes níveis de ensino.....	153
10.1.1. Ensino Técnico.....	153
10.1.2. Ensino Médio.....	156
10.1.3. Ensino Superior.....	160
10.2. Avaliação dos experimentos por professores.....	162
Capítulo 11. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	165
11.1. Aplicação dos experimentos nos diferentes níveis de ensino.....	167
11.1.1. Ensino Técnico.....	167
11.1.2. Ensino Médio.....	170
11.1.3. Ensino Superior.....	175
11.1.4. Considerações sobre as instituições de ensino e professores....	180
11.2. Avaliação dos experimentos por professores.....	182
Capítulo 12. CONCLUSÕES.....	185
Capítulo 13. TRATAMENTO DE RESÍDUOS.....	189

Capítulo 14. CONCLUSÕES GERAIS.....	193
Capítulo 15. PERSPECTIVAS.....	197
Capítulo 16. REFERÊNCIAS.....	201
ANEXO 1: Equação para correção da absorvância devido ao espalhamento da luz...221	
ANEXO 2: Relatório de Pedido de Patente.....	223

LEGENDAS DE ABREVIATURAS E TERMOS

ANOVA	Análise da Variância
λ_{\max}	comprimento de onda de absorção máxima
A_{mv}	Máxima de Absorbância na Região do Visível
ASTM	American Society for Testing and Materials
BAW	Mistura de butanol:ácido acético:água na proporção 4:1:5 v/v/v
BuHCl	Mistura de butanol:ácido clorídrico 12 mol L ⁻¹ na proporção 1:1 v/v/v
CEB	Câmara de Educação Básica
CNE	Conselho Nacional de Educação
DF	número de graus de liberdade ,
EEPAF	Escola Estadual Professor Aníbal de Freitas
ENEM	Exame Nacional do Ensino Médio
EPPEQ	Encontro Paulista de Pesquisadores de Ensino de Química
ETECAP	Escola Técnica Estadual Conselheiro Antonio Prado
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
fc	fator de correção
FM	Fase Móvel
GEPEC	Grupo de Pesquisas em Educação Química
GPQUAE	Grupo de Pesquisa em Química Analítica e Educação
HCl-HAc	Mistura de água:ácido acético glacial:ácido clorídrico 12 mol L ⁻¹ na proporção 82:15:3 v/v/v
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPLC-CE	High Performance Liquid Chromatography - Cationic Exchange
HPLC-RP	High Performance Liquid Chromatography- Reversed-Phase
INOVA	Agência de Inovação da UNICAMP
IQ	Instituto de Química
ITAL	Instituto de Tecnologia de Alimentos
LDB	Lei de Diretrizes e Bases da Educação Nacional
MQ	Média Quadrática
MQ _r	Média Quadrática do Resíduo
MQ _R	Média Quadrática da Regressão
PC	Paper Chromatography
PCN	Parâmetros Curriculares Nacionais
PCNEM	Parâmetros Curriculares Nacionais para o Ensino Médio
Press	Predicted Residual Sum of Squares
R _f	Fator de Retenção
SIMPEQ	Simpósio de Profissionais do Ensino de Química
SPE	Solid Phase Extraction
SQ	Soma Quadrática
t ₀	Tempo de Retenção de um Produto Não Retido
TLC	Thin Layer Chromatography
t _r	Tempo de Retenção do Produto
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Espectrofotometria na região Ultravioleta e Visível

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

As principais classes de pigmentos responsáveis pela coloração de flores, frutos e folhas são as porfirinas, os carotenóides e os flavonóides (Alkema e Seager 1982). As antocianinas são pigmentos da classe dos flavonóides e são responsáveis pelas cores: azul, violeta, vermelho e rosa de flores e frutas (Brouillard e Harborne 1988).

Atualmente é observado um crescente interesse no uso das antocianinas em vários segmentos industriais, dentre os quais se destacam as indústrias:

- *farmacêutica*: comercialização de fitoterápicos. Isto se deve a relatos científicos que apontam o uso de antocianinas para controle de pressão arterial, como agente contra o diabetes e a hipoglicemia (Scharrer e Ober 1981). Outros efeitos terapêuticos já relatados incluem ação antiinflamatória (Lietti *et al.* 1976), prevenção de colesterol (Kadar *et al.* 1979), redução de doenças coronárias (Bridle e Timberlake 1996), propriedades antioxidantes (Takamura e Yamagami 1994, Wang *et al.* 1997), atividade anticancerígena (Kamei *et al.* 1995, Karainova *et al.* 1990), aumento da acuidade visual (Timberlake e Henry 1988) e combate à fragilidade capilar (Mian *et al.* 1977).

- *cosmética*: utilização em formulações principalmente na forma de extratos naturais (Arct *et al.* 2002). A atividade antioxidante das antocianinas pode influenciar no processo de peroxidação lipídica. Esta característica tende a intensificar o interesse do ponto de vista cosmético, como, por exemplo, para utilização de antocianinas em cremes anti-envelhecimento para a pele, nos quais os flavonóides podem atuar no extrato córneo e influenciar atividades enzimáticas na epiderme, bem como nos microvasos sanguíneos da derme (Arct *et al.* 2002).

- *alimentícia*: utilização como corante natural em alimentos processados. O interesse no uso das antocianinas como corante alimentício pode estar relacionado com os possíveis benefícios à saúde conferidos por estes pigmentos (Giusti *et al.* 1998).

O uso industrial das antocianinas ainda é restrito em função de algumas limitações, dentre as quais se destacam: problemas de disponibilidade de matéria-prima produtora de pigmentos na quantidade e qualidade requerida, dificuldade de purificação, capacidade corante reduzida quando comparada com corantes sintéticos e, principalmente, baixa estabilidade (Stringheta e Bobbio 2000).

As novas perspectivas do uso de antocianinas ilustram a importância dos estudos analíticos (extração, purificação, identificação e quantificação) e de estabilidade destes pigmentos, visando a obtenção de extratos padronizados. O enfoque deste tipo de estudo com espécies vegetais típicas ou nativas do Brasil e representa uma contribuição relevante no que diz respeito à exploração de espécies nacionais que podem dar impulso a novas atividades econômicas.

Considerando ainda os aspectos analíticos, na literatura há propostas do uso de antocianinas como reagente analítico, como por exemplo para a determinação de sulfito em vinho branco (Soares *et al.* 2002). Nesta tese também foi abordado o uso de antocianinas, na forma de extrato bruto e purificado, para a determinação visual e espectrofotométrica de cloro livre em amostras de produtos higienizadores.

Além das perspectivas de aplicações analíticas e industriais, vários autores têm estudado as propriedades das antocianinas como indicadores de pH, tendo em vista sua utilização no ensino de Química. A utilização de extratos naturais de antocianinas pode ser explorada didaticamente, desde a etapa de obtenção até a caracterização visual e/ou espectrofotométrica das diferentes formas coloridas que aparecem em função das mudanças de pH do meio. Podem ser elaboradas atividades experimentais para o ensino de Química no nível médio, visando a abordagem de temas envolvendo processos de separação de misturas e conceitos relacionados a equilíbrio químico e indicadores de pH. Incrementando a sofisticação e o grau de complexidade conceitual, a proposta pode ser adaptada e tornar-se adequada para o desenvolvimento de atividades didáticas para o ensino superior.

Nesta tese, foram estudadas três espécies naturais típicas do Brasil: *Morus nigra* (amora), *Syzygium cuminii* (jambolão) e *Myrciaria cauliflora* (jaboticaba), que é nativa do Brasil, num estudo paralelo com a uva (*Vitis vinifera*) que tem reconhecimento internacional como parâmetro de comparação válido para estudos com antocianinas extraídas de frutas. Os estudos das antocianinas presentes nestas espécies vegetais foram subdivididos em duas partes: a primeira abordando os aspectos analíticos e a segunda os aspectos didáticos.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS GERAIS

As espécies vegetais estudadas neste trabalho foram *Morus nigra* (amora), *Myrciaria cauliflora* (jabuticaba), *Syzygium cuminii* (jambolão) e *Vitis vinifera* (uva).

Com relação aos aspectos analíticos, este trabalho foi realizado visando:

- otimizar procedimentos de extração, purificação, identificação e quantificação das antocianinas das espécies vegetais estudadas;
- avaliar a estabilidade dos extratos antociânicos brutos;
- estudar reações envolvendo as antocianinas presentes nos extratos antociânicos brutos.

Com relação aos aspectos didáticos, este trabalho pretendeu:

- realizar uma revisão bibliográfica dos aspectos históricos dos indicadores ácido-base, pois isto caracteriza uma interessante oportunidade de discussão de tópicos de História da Química para aplicação em aulas relacionadas a este tema;
- desenvolver experimentos didáticos utilizando extratos de frutas para diferentes níveis de ensino: Médio, Técnico em Química e Superior em Química;
- aplicar os experimentos desenvolvidos, nos três níveis de ensino, utilizando diferentes abordagens didáticas,
- avaliar a adequação dos experimentos didáticos desenvolvidos, consultando opiniões de alunos e professores envolvidos nas atividades.

PARTE 1

APLICAÇÕES ANALÍTICAS

**“Não há saber mais ou saber menos: há saberes diferentes.”
Paulo Freire**

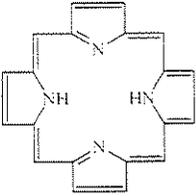
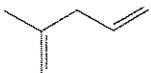
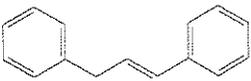
CAPÍTULO 3

INTRODUÇÃO

3.1. Antocianinas

A coloração de flores, frutos e folhas é causada pela presença de pigmentos que absorvem radiação luminosa na região ultravioleta e visível. Existem várias classes de substâncias, denominadas de agentes cromóforos, que colaboram para a coloração das espécies vegetais, destacando-se as porfirinas, os carotenóides e os flavonóides (Alkema e Seager 1982). A **Tabela 1** apresenta alguns exemplos destes corantes naturais, bem como seu grupo característico e ocorrência:

Tabela 1. Exemplos de corantes naturais (Alkema e Seager 1982, Couto *et al.* 1998).

Classe	Grupo característico	Exemplos	Ocorrência
Porfirinas		Clorofila	folhas verdes
Carotenóides		β -caroteno Licopeno	cenoura, tomate
Flavonóides		Antocianinas Flavonóis	maçã, framboesa flores amarelas

Os principais agentes cromóforos de flores e frutos são os flavonóides. Estes compostos são subdivididos em 11 classes menores, sendo que as mais importantes são: as flavonas, os flavanóis e as antocianinas (Alkema e Seager 1982, Gross 1987). O enfoque desta tese está centralizado no estudo das antocianinas.

O termo antocianina (do grego: *anthos*, flores; *kianos*, azul) foi proposto por Marquat, em 1835, para se referir aos pigmentos azuis, violetas e vermelhos encontrados em flores (Marquat 1835, Ikan 1969). No século 20, o químico e botânico Tswett, que estudou sobre a extração e propriedades de substâncias coloridas em flores, frutas e folhas, acatou o nome sugerido por Marquat (Tswett 1914a e 1914b, Heines 1972). Atualmente, sabe-se que estes pigmentos são responsáveis pelas cores rosa, laranja, vermelha, violeta e azul dos vegetais (Harborne 1958, Harborne *et al.* 1975).

A caracterização química das antocianinas foi iniciada no século 20, com os clássicos trabalhos de Willstätter e Everest, Karrer e Widmer e de Robinson e seus colaboradores (Robinson 1933, Ikan 1969, Harborne 1967).

As antocianinas são compostos polihidroxi e polimetoxi glicosados, cuja estrutura fundamental é o cátion flavílico, representado na **Figura 1** (Harborne *et al.* 1975, Harborne 1994).

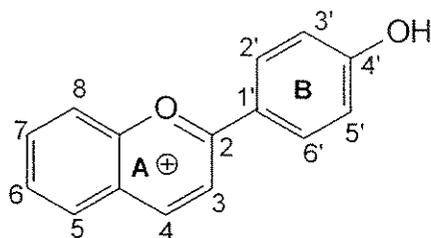
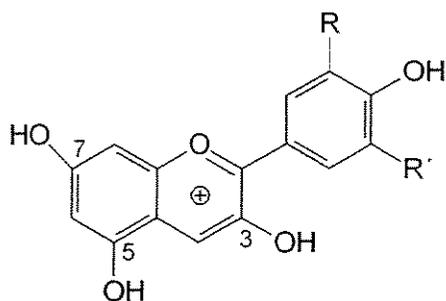


Figura 1. Estrutura do cátion flavílico (Harborne *et al.* 1975, Harborne 1994).

As antocianinas são derivadas das antocianidinas, sendo que estas últimas não possuem grupos glicosídeos e a maioria é hidroxilada nas posições 3, 5 e 7. Já nas antocianinas, uma ou mais destas hidroxilas estão ligadas a açúcares, sendo os mais comuns: glicose, xilose, arabinose, ramnose, galactose ou dissacarídeos constituídos por esses açúcares, aos quais podem estar ligados ácidos fenólicos como: *p*-counário, cafeico, fenílico e vanílico. O açúcar presente nas moléculas das antocianinas confere maior solubilidade e estabilidade a estes pigmentos, quando comparados com as antocianidinas. Os diferentes grupos R e R' ligados nas posições 3, 5 e 7 e açúcares, assim como os ácidos a eles ligados, produzem os diferentes tipos de antocianinas normalmente encontradas em frutas, conforme apresentado na **Figura 2** (Harborne *et al.* 1975, Gross 1987, Harborne 1994).



Antocianidina*	Grupo em R	Grupo em R'
cianidina	OH	H
delfinidina	OH	OH
malvidina	OCH ₃	OCH ₃
pelargodina	H	H
peonidina	OCH ₃	H
petunidina	OCH ₃	OH

*A nomenclatura dos pigmentos é derivada a partir dos vegetais em que elas foram primeiramente isoladas e foram estabelecidos por Willstätter (Gross 1987).

Figura 2. Estruturas genéricas das antocianidinas normalmente encontradas em frutas.

Na **Tabela 2** são apresentados alguns exemplos de antocianinas freqüentemente encontradas em frutas (Amaya *et al.* 1984, Teeling *et al.* 1971).

Tabela 2. Antocianinas freqüentemente encontradas em frutas (Amaya *et al.* 1984, Teeling *et al.* 1971).

Antocianina	Fonte
pelargodina-3-glicosídeo	morango
cianidina-3-glicosídeo	morango, amora, ameixa, jambolão, uva, maçã
peonidina-3-glicosídeo	cereja, jabuticaba, uva, ameixa
cianidina-3-rutínose	cereja, figo
petunidina-3-glicosídeo	uva
cianidina-3-galactosídeo	maçã
malvidina-3-glicosídeo	uva

Merece ser destacado que o número de hidroxilas, grupos metóxi e glicólicos influenciam acentuadamente na coloração das antocianinas. Maiores quantidades de grupos metoxila aumentam a intensidade da cor vermelha. Mais hidroxilas e grupos glicólicos intensificam a cor azul (Harborne 1958). Além disso, as diferentes cores exibidas pelas antocianinas dependem da influência de diversos fatores dentre os quais se destacam: presença de pequenas quantidades de outros pigmentos, gerando uma mistura de cores; copigmentação com outros flavonóides, ou seja, interação química entre flavonóides e antocianinas; quelação com metais, envolvendo coordenação de íons metálicos com as antocianinas; pH do fluido da célula vegetal; hidroxilação e metilação (Alkema e Seager 1982, Forster 1978, Harborne 1977).

O fato das antocianinas apresentarem cores diferentes, dependendo do pH do meio em que elas se encontram, faz com que estes pigmentos possam ser utilizados como indicadores naturais de pH (Mebane e Rybolt 1985, Barry 1997).

3.2. Obtenção de antocianinas a partir de vegetais

O crescente interesse na utilização de antocianinas como corante alimentício e em formulações de drogas e cosméticos tem destacado a necessidade do desenvolvimento e/ou aprimoramento de métodos analíticos para a extração, purificação, identificação e quantificação destes pigmentos obtidos a partir de espécies vegetais. Isto justifica uma breve discussão dos métodos analíticos mais utilizados na realização de cada uma destas etapas.

3.2.1. Extração

Embora sejam encontradas em todas as partes de uma planta, a presença das antocianinas se destaca nas flores e frutos (Dean 1963). Nos frutos, as antocianinas são localizadas principalmente nas cascas, embora possam ser encontradas em menores quantidades na polpa (Gross 1987).

As antocianinas são geralmente muito solúveis em solventes polares e, portanto, são facilmente extraídas com água, metanol e etanol. Geralmente, a extração é realizada em meio ácido, para prevenir a oxidação destes pigmentos (Lee e Hong 1992).

Utilizando uvas, Revilla e colaboradores compararam diversos métodos descritos na literatura para a extração de antocianinas (Revilla *et al.* 1998). Pelos resultados obtidos, concluíram que a quantidade total de antocianinas extraídas é influenciada pelo tempo de extração e pela presença de ácido no solvente extrator. Em 48 h, um acréscimo de cerca de 20% de antocianinas é extraído, quando comparado a uma extração realizada em 20 h. Com até 1% (v/v) de ácido mineral, a quantidade de antocianinas extraídas aumenta cerca de 7%, na comparação com o mesmo solvente extrator sem ácido.

Apesar da toxicidade, metanol é o solvente mais utilizado para a extração das antocianinas (Heredia *et al.* 1998, Cabrita *et al.* 2000, Pazminõ-Durán *et al.* 2001, Fernández-López *et al.* 1998, Fossen *et al.* 1998). Entretanto, para algumas aplicações do extrato nas quais o aspecto quantitativo não é o mais importante, etanol e água podem ser utilizados (Ramos *et al.* 2000, Barry 1997, Couto *et al.* 1998, Soares e Cavalheiro 2001). A limitação do uso de etanol e água está relacionada com a menor eficiência na extração das antocianinas. Metanol é 20% mais eficiente que etanol e 73% mais efetivo que água (Metivier *et al.* 1980).

Usualmente, após a extração das antocianinas, os extratos brutos são concentrados utilizando evaporadores rotativos a vácuo em temperaturas inferiores a 40 °C até massa constante (Pazminõ-Durán *et al.* 2001, Soares e Cavalheiro 2001). Isto resulta em um resíduo viscoso.

Os extratos antociânicos obtidos a partir de frutas e flores são quase sempre encontrados como uma mistura de antocianinas e também podem conter clorofila e

pigmentos pertencentes ao grupo dos carotenóides. Desta forma, muitas vezes é necessário purificar, isolar e identificar os pigmentos que compõem os extratos brutos (Harborne *et al.* 1975).

3.2.2. Purificação

Vários métodos têm sido utilizados com sucesso para a purificação dos extratos brutos de antocianinas, entre eles a precipitação com acetato de chumbo (Bockian *et al.* 1955), extração líquido-líquido (Sakamura e Francis 1961), extração com resina de troca iônica (Shrikhande e Francis 1973) e extração em fase sólida (Wilkinson *et al.* 1977).

Atualmente, o método mais utilizado é a extração em fase sólida (SPE – *Solid Phase Extraction*) (Heredia *et al.* 1998, Pazminõ-Durán *et al.* 2001, Fossen *et al.* 1998, Giusti e Wrolstad 1998, Ordaz-Galindo *et al.* 1999). Isto se deve à relativa simplicidade para a eliminação de impurezas tais como substâncias polares e não fenólicas. Os cartuchos C₁₈ e Sephadex são habitualmente os mais usados (Costa *et al.* 2000). Entretanto, Kraemer-Schafthalter e colaboradores (1998) testaram vários outros materiais, visando o estabelecimento das vantagens e limitações de cada fase sólida. Os melhores resultados foram obtidos com as fases sólidas RP Sílica gel 60, C18 seguida de Amberlite XAD-7, Serdolit PAD IV e Fractogel TSK CM 650.

O procedimento fundamental para a purificação das antocianinas por SPE envolve a aplicação do extrato antociânico bruto no cartucho contendo um material sorvente, seguido da eluição dos componentes individuais com solventes apropriados. As antocianinas são adsorvidas fortemente na fase estacionária por suas hidroxilas não substituídas (Costa *et al.* 2000). Desta forma, primeiramente são eluídos as substâncias mais polares que as antocianinas, tais como os açúcares e ácidos orgânicos; posteriormente, são eluídos os pigmentos antociânicos (Ordaz-Galindo *et al.* 1999).

3.2.3. Separação

Estudos pioneiros de Bate-Smith (1948) nesta área foram relatados em 1948, utilizando a técnica de cromatografia em papel (PC - *Paper Chromatography*). No

entanto, a maioria dos trabalhos foi feita por Geissman e Jurd (1955) e, principalmente, por Harborne, que estabeleceu valores de fatores de retenção, R_f , em diferentes solventes para um grande número de antocianinas (Harborne 1958). Desde então, encontram-se na literatura vários trabalhos que utilizam PC para a separação e identificação de antocianinas em diferentes extratos vegetais (Francis *et al.* 1966, Fuleki e Francis 1967, Fuleki 1971, Wang e Francis 1972, Trevisan *et al.* 1972, Shrikhande e Francis 1973, Jain e Seshadri 1975).

A cromatografia em camada delgada (TLC - *Thin Layer Chromatography*) é uma atraente alternativa à PC. Diferentes fases estacionárias podem ser utilizadas abrindo a possibilidade de novos mecanismos de separação. Os primeiros trabalhos com esta técnica foram desenvolvidos por Birkoffer e outros (1962), Hess e Meyer (1962), Tanner e outros (1963) e Nybon (1963). Trabalhos posteriores visaram o aprimoramento técnico, contudo os valores de R_f não são tão confiáveis quanto os da PC, devido às diferenças das espessuras das camadas de adsorvente. Além disso, em muitos casos, para a identificação das antocianinas é necessário o uso de pigmentos de referência.

Uma revisão na literatura indica que atualmente a técnica mais usada para a separação de antocianinas é a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*). Lee e Hong (1992) e Costa e outros (2000) fizeram uma extensa compilação de diversos métodos analíticos que citam o uso desta técnica.

Excelentes separações são possíveis por HPLC, com alta sensibilidade e baixo tempo de análise, especialmente quando comparadas com as em PC (Figueiredo *et al.* 1996).

A cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (HPLC-RF) é o tipo de HPLC mais utilizado para a separação de antocianinas. Entretanto, não há um procedimento padrão, pois cada laboratório tende a desenvolver um método analítico em função do conjunto de antocianinas presentes em extratos específicos (Costa *et al.* 2000). Apesar dessa diversidade, alguns parâmetros fundamentais são comuns nos diferentes métodos:

- a detecção usualmente é feita utilizando-se um detector UV selecionando um único comprimento de onda entre 520 nm e 546 nm;
- colunas C_{18} são as mais utilizadas;

- os eluentes mais utilizados são acetonitrila e metanol;
- o pH do sistema de eluição normalmente é abaixo de 2, sendo obtido pela adição de ácido fórmico, ácido acético ou ácido trifluoroacético.

A eletroforese capilar também pode ser utilizada na separação das antocianinas. Nos trabalhos dos grupos de Bridle e García-Vigueira (1997) e Costa e outros (1998), esta técnica foi utilizada para separar antocianinas de groselha, morango e *elderberry*, fruta típica do hemisfério norte. Esta técnica apresenta como características favoráveis: alta sensibilidade, alta resolução, baixo consumo de amostra e geração mínima de solvente residual (Altria 1996). No entanto, apresenta menor sensibilidade e eficiência na separação de antocianinas em amostras complexas quando comparada com a HPLC (Fernández-López *et al.* 1998). Talvez este seja o fator limitante que resulta na pequena quantidade de trabalhos publicados na literatura como o uso da eletroforese capilar para separação de antocianinas.

3.2.4. Identificação

Uma vez separadas e purificadas, as antocianinas podem ser identificadas por várias técnicas, sendo que as mais utilizadas são a espectroscopia ultravioleta e visível (UV-Vis), espectrometria de ressonância magnética nuclear (NMR – *Nuclear Magnetic Resonance*), espectrometria de massas (MS - *Mass Spectrometer*) e HPLC.

Para a identificação das antocianinas em alimentos e plantas dois procedimentos podem ser utilizados: comparação direta, quando há disponibilidade de material padrão, ou comparação indireta, se não houver material padrão. Neste caso, segundo Harborne, uma comparação cuidadosa com dados da literatura é aceitável. A comparação indireta, embora seja um método sujeito a erros, é justificada pela falta de padrões e pelo longo e tedioso procedimento para a identificação (Harborne 1984).

O uso de técnicas hifenadas, combinando a separação e a identificação das antocianinas, é comum. Isto se deve à alta seletividade, melhora do limite de determinação e redução no tempo de análise (Robards e Antolovich 1997).

HPLC pode ser usada com um detector ultravioleta (UV) ou de espectrometria de massas (MS), sendo que UV é usado para análises de rotina e desenvolvimento de

métodos e com MS podem-se identificar as estruturas das antocianinas (Costa *et al.* 2000).

Em 1992, Glässgen e colaboradores (1992) descreveram o uso da LC-ESI-MS (cromatografia líquida acoplada à espectroscopia de massas com ionização *eletrospray*) para a identificação de antocianinas em cenouras pretas. Takamura e Yamagami (1994) utilizaram HPLC-MS para separar e identificar as antocianinas presentes em uvas japonesas. Baldi e outros (1995) relataram o uso de HPLC-MS para a análise de antocianinas em cascas de uva.

Para minimizar a dificuldade da falta de padrões e dos trabalhosos procedimentos para a identificação de antocianinas, em 1999, Goiffon e colaboradores (1999) propuseram que a retenção das antocianinas poderia ser expressa por α , um termo que relaciona o tempo de retenção (t'_r) de várias antocianinas, com o tempo de retenção ($t'_{r(\text{cy-3-glu})}$) da cianidina-3-glicosídeo, que está presente em praticamente todas as frutas vermelhas. Assim, a identificação das antocianinas em frutas seria consideravelmente facilitada. Em seu trabalho, Goiffon e colaboradores determinaram o valor de α para 40 antocianinas e antocianidinas utilizando 2 tipos de eluentes: água:acetonitrila:ácido fórmico (84/6/10 v/v/v) e água:acetonitrila:ácido fórmico (81/9/10 v/v/v). Trabalhos descritos na literatura utilizam principalmente a fase móvel constituída por água:acetonitrila:ácido fórmico (81/9/10 v/v/v) (Goiffon *et al.* 1991, Lee e Hong 1992). Assim, para a identificação das antocianinas presentes nas frutas estudadas no desenvolvimento desta tese, também foi utilizado o método de Goiffon, em complementação à cromatografia em papel.

3.2.5. Quantificação

A quantidade de antocianinas presentes em frutas também está relacionada a fatores climáticos, em particular à luz e à temperatura (Macheix *et al.* 1990). Desta forma, é difícil fazer uma comparação de diferentes culturas de uma mesma fruta e mais difícil ainda é fazer a comparação entre culturas e frutas diferentes. Entretanto, um cuidadoso procedimento analítico para estimar a quantidade de antocianinas em diferentes espécies pode ser feito utilizando-se vários métodos, dentre os quais se destacam: densitometria, polarografia, colorimetria, espectrofotometria, branqueamento

com dióxido de enxofre ou bissulfito de sódio e HPLC (Harborne *et al.* 1975). A **Tabela 3** apresenta alguns exemplos da quantidade de antocianinas totais habitualmente encontradas em frutas. É importante ressaltar que as quantidades de antocianinas presentes em frutas variam em função da espécie, clima, entre outros fatores.

Tabela 3. Antocianinas totais presentes em algumas frutas (Macheix *et al.* 1990).

Fruta	mg/g fruta fresca
uva	0,40 - 4,03
framboesa	0,23 - 0,59
groselha	0,12 - 0,18
morango	0,45 - 0,70

As frutas ricas em antocianinas (> 2 mg/g de fruta) são fortemente coloridas: pretas ou roxas (Macheix *et al.* 1990). Estas frutas podem representar uma importante fonte natural de corantes.

Aspectos quantitativos podem ser inferidos pelas características espectrais das antocianinas. A quantidade total de antocianinas em extratos brutos contendo outros materiais fenólicos tem sido determinada principalmente por espectrofotometria, pela medida da absorbância da solução num dado comprimento de onda. Isto é possível porque as antocianinas têm uma banda de absorção típica na região do visível, entre 490 e 550 nm. Esta banda está distante das bandas de absorção de outros compostos fenólicos, que apresentam uma absorção máxima na região do ultravioleta (Fuleki e Francis 1968a). Em muitos casos, contudo, este método simples pode sofrer interferências de produtos de degradação das antocianinas ou das reações de perda da coloração (Fuleki e Francis 1968b). Nestes casos, os métodos do pH diferencial e o subtrativo são os mais indicados para quantificar as antocianinas e seus produtos de degradação (Jackman e Smith 1996).

O método do pH diferencial envolve medidas da absorbância referente ao cátion flavílico (forma predominante em pH 1) e ao carbinol (forma predominante em pH 4,5). Este método foi introduzido por Sondheimer e Kertsz (1948). Segundo Wrolstad e colaboradores, o método do pH diferencial permite exatidão e rápidas medidas na determinação total de antocianinas (Wrolstad *et al.* 1995).

Petri e outros (1997) também propuseram um método espectrofotométrico para a determinação quantitativa das antocianinas presentes em extratos de *bilberry*,

fundamentado no uso de cloreto de uma antocianina padrão, no caso, cloreto de malvidina, para a construção da curva analítica. A curva analítica é obtida em meio ácido, onde as antocianinas apresentam-se como cátion flavílico, absorvendo na região do visível entre 465 nm e 550 nm (Gross 1987).

Outro método espectrofotométrico descrito na literatura, entretanto pouco usual, é o método subtrativo que é fundamentado no uso de agentes oxidantes tais como metabissulfito de sódio (Wrolstad *et al.* 1982, Somers e Evans 1974) ou peróxido de hidrogênio (Swain e Hills 1959), que provocam a descoloração das antocianinas. A medida da absorbância da solução de antocianinas é realizada, seguida da medida da absorbância de outra solução contendo o agente descolorante. Por diferença, a absorbância da antocianina pode ser determinada e convertida em concentração através de uma curva analítica previamente preparada com pigmentos purificados (Jackman *et al.* 1987).

Recentemente, métodos mais precisos têm sido desenvolvidos utilizando-se HPLC. Contudo, a limitação desta técnica está relacionada com a dificuldade da obtenção e o elevado custo de padrões comerciais (Chandra *et al.* 2001).

Nesta tese foram abordados somente métodos espectrofotométricos para a quantificação das antocianinas em frutas, porque estes métodos apresentam desempenho relativamente satisfatório, rapidez; baixo custo, não requerem o uso de padrões de antocianinas após o estabelecimento das condições de determinação e são adequados para determinar a quantidade de antocianinas (Wrolstad *et al.* 1982). Foi realizado um estudo comparativo dos três métodos espectrofotométricos mais citados na literatura: método de Petri e colaboradores (1997), de Sondheimer e Kertsz (1948) e Fuleki e Francis (1968a e 1968b), conhecido como método do pH diferencial.

3.3. Reações das antocianinas em meio aquoso

As reações das antocianinas em meio aquoso e as propostas de mecanismos envolvidos nestas reações ainda podem ser consideradas objetos de estudos, uma vez que não são completamente entendidas.

As principais reações estudadas são aquelas relacionadas à perda da coloração das antocianinas, das quais podem ser destacadas: reações com bissulfito (Brouillard e

Chahine 1980, Ribereau-Gayon 1959, Berké *et al.* 1998) oxidação com peróxidos (Hrazdina 1970, Yamasaki *et al.* 1996), degradação enzimática (Adams 1972, Hrazdina 1971), reações de estabilização em meio aquoso (Macheix *et al.* 1990) e mais recentemente reações com cloro livre em solução (Terci e Rossi 2001 e 2003).

Nesta tese foram enfatizados dois tipos de reações em meio aquoso envolvendo antocianinas: reações de equilíbrio químico ácido-base e reações de oxidação destes pigmentos pela ação de um oxidante forte.

3.3.1. Reações de equilíbrio químico ácido-base

Uma das características mais interessantes das propriedades químicas das antocianinas é o comportamento destas substâncias em soluções aquosas. As antocianinas apresentam diferentes estruturas em função do pH, conforme esquematizado na **Figura 3**.

De modo geral em meio fortemente ácido (pH entre 1-2) as antocianinas apresentam uma coloração avermelhada intensa. Isto corresponde ao equilíbrio entre o cátion flavílico e a pseudobase carbinol. Com o aumento do pH, as antocianinas vão se descolorindo até se tornarem praticamente incolores em pH ~ 6, devido à formação da pseudobase carbinol. Em pH 6,5 a 8 ocorre a formação das anidrobases violetas. Acima deste pH, começa a ocorrer a ionização das antocianinas. Entre pH 9 a 12, formam-se anidrobases azuis e em pH 13 a 14 ocorre a ruptura do anel heterocíclico, com a formação das chalconas (Harborne *et al.* 1975, Macheix *et al.* 1990).

A correlação entre cor e estrutura das antocianinas em meio aquoso não é tão simples de ser estabelecida. Esta correlação é limitada pelo fato de que as cores que observadas são formadas a partir das cores primárias: vermelho-laranja, azul-violeta e verde. Com isso fica difícil estabelecer se ao observar uma cor diferente dessas três, ela está sendo formada por uma combinação da reflexão das cores primárias, ou se estas estão sendo absorvidas e a cor observada é a que está sendo refletida. Entretanto, no caso de compostos orgânicos, empiricamente tem sido evidenciado que as cores tendendo para o vermelho correspondem à absorção de comprimentos de onda na região do azul, isto é, de maior energia, portanto de menor conjugação. Já o compostos que apresentam coloração tendendo ao azul correspondem a estruturas

mais conjugadas, logo absorvem em maiores comprimentos de onda (Gouveia-Matos 1999).

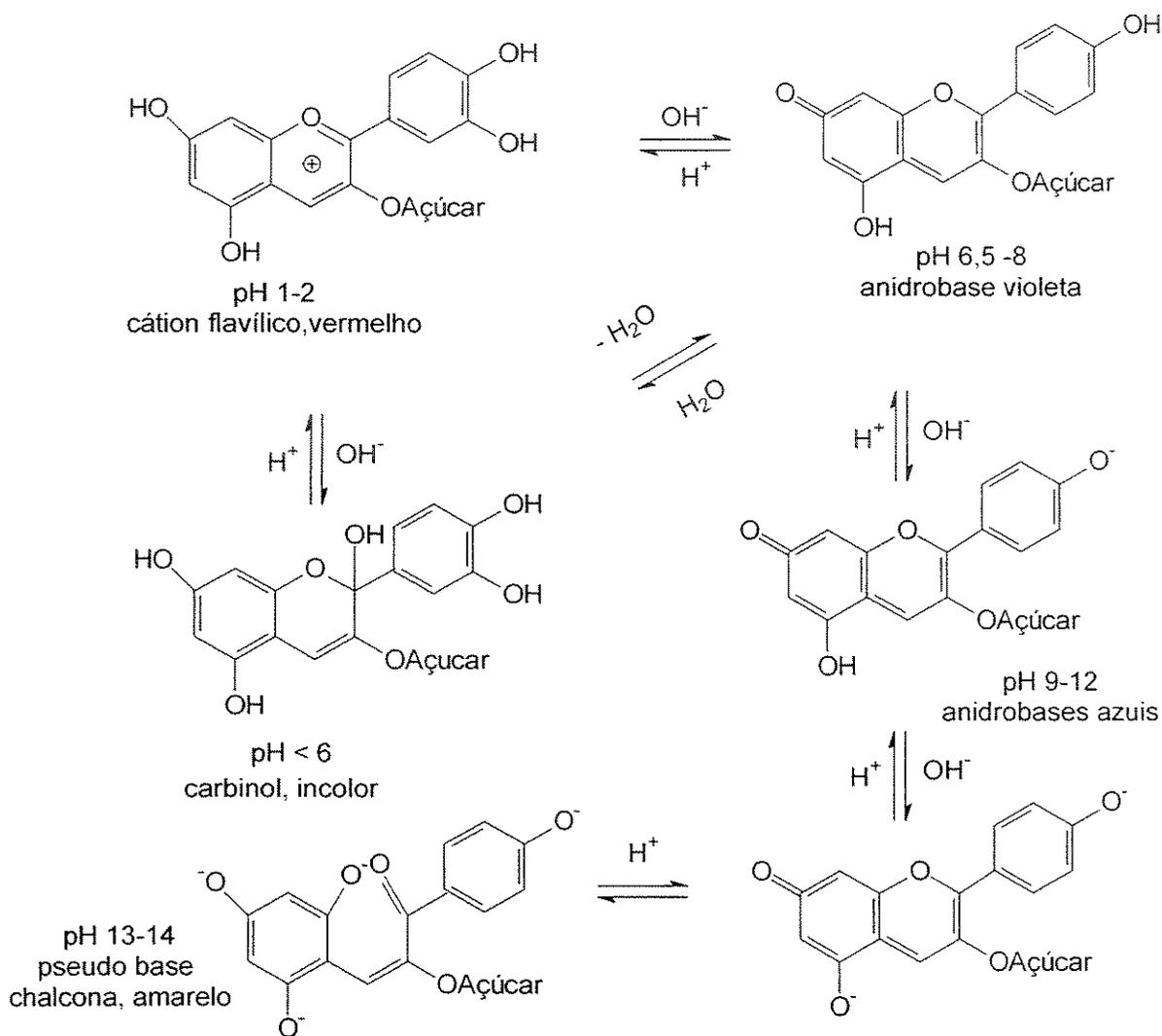


Figura 3. Mudanças estruturais das antocianinas em função do pH. (Adaptado de Brouillard 1982).

3.3.2. Reações de óxido-redução

A adição nucleofílica de agentes oxidantes às antocianinas resulta na formação de complexos estáveis e incolores. O primeiro mecanismo proposto para esta reação, utilizando dióxido de enxofre (Ribereau-Gayon 1959), considerava que a chalcona,

resultante da abertura do anel do carbinol (em equilíbrio com o cátion flavílico), estaria envolvida na formação do aduto chalcona-bissulfito, um composto incolor – **Figura 4**.

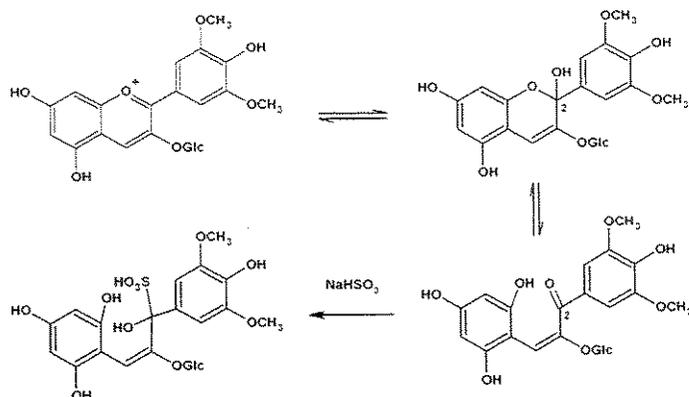


Figura 4. Primeiro mecanismo proposto para a adição de HSO_3^- à antocianina (Ribereau-Gayon 1959).

Posteriormente, a partir de estudos cinéticos e termodinâmicos, Brouillard e colaboradores (1980) propuseram que esta reação ocorria pela adição nucleofílica de HSO_3^- nas posições C_2 e C_4 das antocianinas, formando assim um sulfonato 5 ou 6, similar ao carbinol - **Figura 5**. Recentemente, Berké e colaboradores (1998), utilizando as técnicas de ressonância magnética nuclear de ^1H , ^{13}C e ^{33}S confirmaram a proposta de Brouillard e colaboradores.

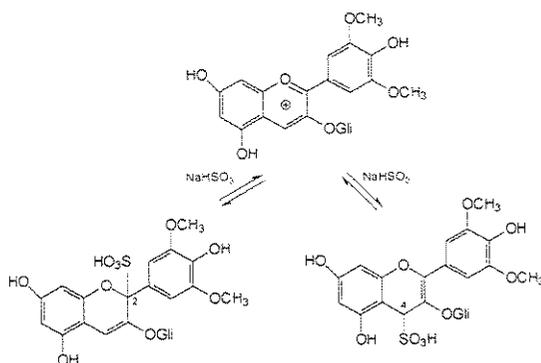


Figura 5. Mecanismo atual proposto para a adição de HSO_3^- à antocianina.

Lu e Foo (2001) observaram a adição oxidativa de acetona nas antocianinas, levando à formação de piroantocianinas, como ilustrado na **Figura 6**. O mecanismo proposto, para esta reação também envolve a adição nucleofílica da forma enólica da acetona ao C_4 do cátion flavílico, seguida de uma formação intramolecular hemicetal.

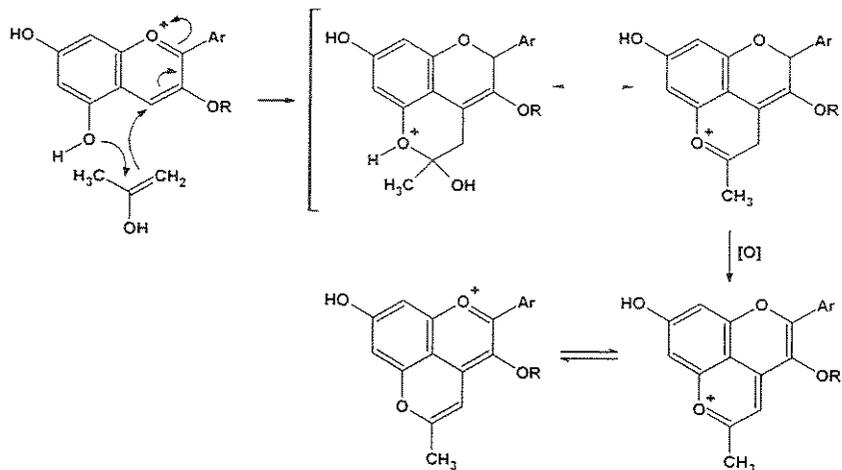


Figura 6. Mecanismo proposto para a reação entre antocianinas e acetona em meio oxidante.

Neste trabalho, foi proposta a determinação de cloro livre em produtos higienizadores, utilizando antocianinas extraídas de jambolão, fundamentada na descoloração destes pigmentos naturais. A reação entre antocianinas e cloro livre ainda não é elucidada na literatura, portanto alguns estudos de caracterização desta reação também foram realizados e os resultados discutidos.

CAPÍTULO 4

OBJETIVOS

Com relação aos aspectos analíticos, este trabalho foi realizado visando desenvolver as seguintes propostas com as espécies selecionadas:

- otimizar procedimentos de extração, purificação, identificação e quantificação das antocianinas das espécies vegetais;

- avaliar a estabilidade dos extratos antociânicos brutos em meio aquoso e etanólico;

- estudar as reações de equilíbrio químico ácido-base das antocianinas presentes nos extratos antociânicos brutos;

- estudar a reação de óxido-redução das antocianinas presentes nos extratos de jambolão com cloro livre para uso do extrato como reagente analítico.

CAPÍTULO 5

PARTE EXPERIMENTAL

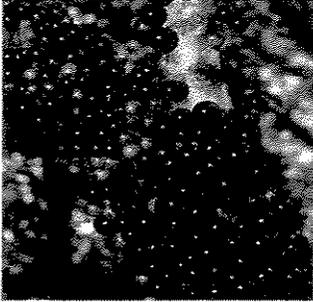
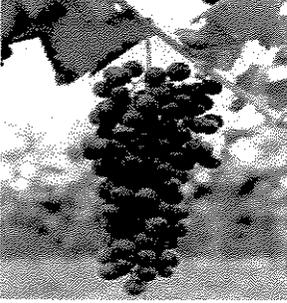
5.1. Considerações Gerais

Todos os experimentos foram realizados com reagentes de pureza analítica e/ou grau espectroscópico, seguindo-se padronizações e procedimentos recomendados pela literatura (Baccan *et al.* 2001, Vogel 1991). Para a preparação das soluções, utilizou-se água destilada (destilador de vidro) e/ou deionizada (deionizador MilliPore Milli-Q Plus).

As espécies vegetais utilizadas no decorrer deste trabalho foram *Morus nigra*, *Syzygium cuminii*, *Myrciaria cauliflora* e *Vitis vinifera* conhecidas popularmente como amora, jambolão, jabuticaba e uva, respectivamente. As uvas são cultivadas nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste. Amora, jabuticaba e jambolão são encontradas de forma subespontânea praticamente em todas as regiões do país (Silva e Tassara 1996). Estas espécies foram escolhidas por serem comuns no Brasil. A ampla disponibilidade e as diferentes épocas de frutificação facilitam a utilização destas espécies ao longo de quase todo o ano, embora, isto não seja um fator determinante para o trabalho, pois estas frutas podem ser congeladas sem perdas das propriedades químicas de interesse. A **Tabela 4** apresenta informações gerais sobre estas espécies, tais como: família botânica, origem, período de frutificação e a procedência dos exemplares utilizados neste trabalho.

Nos experimentos iniciais foram utilizadas as frutas inteira ou somente a casca. Após a otimização do procedimento de extração das antocianinas das frutas, passou-se a utilizar, nos casos da jabuticaba, jambolão e uva somente as cascas e para os experimentos com amora, a fruta inteira (casca e polpa).

Tabela 4. Informações gerais sobre as espécies utilizadas. Os dados referentes aos nomes populares, origens e períodos de frutificação foram estabelecidos de acordo com Silva e Tassara (1996).

Fotos	Informações gerais
	<p>Espécie (nome científico): <i>Morus nigra</i> Nome popular: amora Família botânica: Moraceae Origem: Ásia Frutifica em: setembro a novembro Procedência: UNICAMP – Campinas Data da coleta: setembro/2000 Número de registro: 120-023</p>
	<p>Espécie (nome científico): <i>Myrcia cauliflora</i> Nome popular: jabuticaba Família botânica: Myrtaceae Origem: Brasil Frutifica em: janeiro a fevereiro e novembro a dezembro Procedência: Residencial Moinho de Vento – Valinhos Data da coleta: fevereiro/2000 Número de registro: 120-737</p>
	<p>Espécie (nome científico): <i>Syzygium cumini</i> Nomes populares: jambolão, jamelão, jambeiro Família botânica: Myrtaceae Origem: Índia Frutifica em: janeiro a maio Procedência: Rodovia Presidente Dutra km 161 Data da coleta: abril/2000 Número de registro: 105-116</p>
	<p>Espécie (nome científico): <i>Vitis vinifera</i> Nome popular: uva Família botânica: Vitaceae Origem: Ásia, Oriente Médio Frutifica em: outubro a fevereiro Esta espécie foi adquirida em supermercados da região de Campinas, o que inviabilizou a aquisição de registro.</p>

*Com exceção da uva, adquirida comercialmente, todas as espécies foram coletadas pela autora do projeto e registradas no Herbário do Departamento de Botânica do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, onde estão depositadas as exsicatas.

5.2. Reagentes, materiais e equipamentos

5.2.1. Reagentes

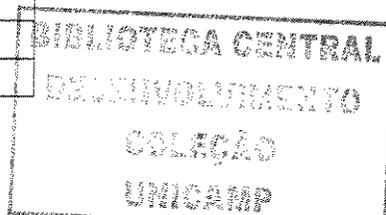
Acetonitrila (Tédia), ácido acético (Chemco), ácido ascórbico (Vetec), ácido cítrico (Vetec), ácido clorídrico (Vetec), ácido fórmico (Vetec), ácido fumárico (Synth), ácido láctico (Nuclear), ácido málico (Synth), ácido succínico (Vetec), ácido sulfúrico (Ecibra), arabinose (Synth), carbonato de sódio (SIGMA), cloreto de pelargonidina (SIGMA), etanol (Synth), fenol (Merck), frutose (Synth), galactose (Synth), glicose (Synth), hidróxido de sódio (Nuclear), maltose (Synth), metanol (Chemco), metanol grau HPLC (Tédia), sacarose (Fisher), sódio fosfato bibásico (Nuclear), sacarose (Fisher), vermelho do Congo (Vetec), xilose (Synth), hidróxido de potássio (Nuclear) e formol (Rioquímica).

5.2.2. Soluções tampão

A **Tabela 5** apresenta a composição das soluções tampão utilizadas para o desenvolvimento dos experimentos. Após o preparo das soluções os valores de pH foram confirmados com pHmetro.

Tabela 5. Composição das soluções tampão (Bates 1973).

pH	Solução tampão (Volume final = 100 mL)
1	25,0 mL de KCl 0,2 mol L ⁻¹ ; 67,0 mL de HCl 0,2 mol L ⁻¹
2	25,0 mL de KCl 0,2 mol L ⁻¹ ; 6,5 mL de HCl 0,2 mol L ⁻¹
3	4,1 mL de Na ₂ HPO ₄ 0,2 mol L ⁻¹ ; 15,9 mL de ác. cítrico 0,1 mol L ⁻¹
4	7,7 mL de Na ₂ HPO ₄ 0,2 mol L ⁻¹ ; 12,3 mL de ác. cítrico 0,1 mol L ⁻¹
5	10,3 mL de Na ₂ HPO ₄ 0,2 mol L ⁻¹ ; 9,7 mL de ác. cítrico 0,1 mol L ⁻¹
6	12,6 mL de Na ₂ HPO ₄ 0,1 mol L ⁻¹ ; 7,4 mL de ác. cítrico 0,1 mol L ⁻¹
7	16,5 mL de Na ₂ HPO ₄ 0,1 mol L ⁻¹ ; 3,5 mL de ác. cítrico 0,1 mol L ⁻¹
8	19,4 mL de Na ₂ HPO ₄ 0,1 mol L ⁻¹ ; 0,5 mL de ác. cítrico 0,1 mol L ⁻¹
9	50,0 mL de KCl/ H ₃ BO ₃ 0,1 mol L ⁻¹ ; 20,8 mL de NaOH 0,1 mol L ⁻¹
10	50,0 mL de KCl/ H ₃ BO ₃ 0,1 mol L ⁻¹ ; 43,7 mL de NaOH 0,1 mol L ⁻¹
11	50,0 mL de Na ₂ HPO ₄ 0,05 mol L ⁻¹ ; 4,1 mL de NaOH 0,1 mol L ⁻¹
12	25,0 mL de KCl 0,2 mol L ⁻¹ ; 6,0 mL de NaOH 0,2 mol L ⁻¹
13	25,0 mL de KCl 0,2 mol L ⁻¹ ; 66,0 mL de NaOH 0,2 mol L ⁻¹
14	solução saturada de KOH



5.2.3. Materiais e equipamentos

- *Secagem dos extratos*: evaporador rotativo RE 111 acoplado a um banho termostaticado Büchi 461 Water Bath e liofilizador Labconco modelo Freeze Dry System/Freezone 4.5.
- *Medidas potenciométricas*: pHmetro Analyser e eletrodo de vidro Analion V620.
- *Medidas espectrofotométricas*: espectrofotômetro Biotech Pharmacia Ultrospech 2000 ou espectrofotômetro Femto 600S, celas de quartzo ou de acrílico com 1,0 cm de caminho óptico.
- *Titulações espectrofotométricas*: espectrofotômetro Biotech Pharmacia Ultrospech 2000; bomba peristáltica Masterflex®; banho termostático MGW Lauda RC e tubos de Tygon de 0,3 mm de diâmetro.
- *Análise térmica*: analisador termogravimétrico T. A. Instruments Modelo 2950 High Resolution.
- *Análises cromatográficas para identificação das antocianinas e de ácidos orgânicos*: cromatógrafo líquido de alta eficiência Waters 600E acoplado a um detector UV-VIS Waters 484, injetor Rheodyne e um integrador Waters 746; coluna C18 da Nova Pak® de 3,9 x 150 mm.
- *Análises cromatográficas para identificação de açúcares*: cromatógrafo líquido de alta eficiência GPC Low Waters 486 acoplado a um detector por índice de refração Waters 410, bomba Waters 510, injetor Rheodyne e Software Millenium; coluna AMINEX® Carbohydrate HPX-87C de 7,8 x 300 mm.
- *Análise por cromatografia em papel*: papel cromatográfico Whatman 1 Chr, 20 cm x 20 cm.
- *Extração em Fase Sólida*: cartucho SPE C18 Varian
- *Desgaseificação das fases móveis utilizadas em HPLC*: banho de ultra-som Thornton.
- *Secagem dos papéis cromatográficos*: secador de cabelos Philips Compact 1100 HP 4814.

5.3. Procedimentos experimentais

5.3.1. *Análise termogravimétrica dos extratos antociânicos*

As curvas termogravimétricas foram obtidas com a temperatura variando de 10 °C a 900 °C, utilizando-se atmosfera inerte de gás hélio com vazão de 90 mL min⁻¹, velocidade de aquecimento de 10 °C min⁻¹ e suporte de alumina para a obtenção da temperatura máxima sem degradação dos pigmentos contidos nos extratos. As amostras foram obtidas pela maceração e imersão das frutas em água a 40 °C, numa proporção 1/3 (m/V) por 1 h. Para secagem dos extratos obtidos, testou-se a secagem à temperatura ambiente num evaporador rotativo a vácuo até massa constante e também com por liofilização. O procedimento de liofilização foi feito com temperatura entre -40 °C e -47 °C e 272 x 10⁻³ mbar. Em ambos procedimentos de secagem, objetivava-se a obtenção de extratos em pó, entretanto foram obtidos extratos viscosos para todas as frutas.

5.3.2. *Otimização de procedimentos de extração das antocianinas*

Os experimentos foram realizados utilizando-se aproximadamente 5 g de frutas e 15 mL de solvente. Foram estudadas as seguintes variáveis: tipo de solvente (água, etanol e metanol), temperatura (ambiente e 60 °C) e proporção massa da fruta/volume do solvente. A eficiência dos procedimentos de extração foi avaliada em função da quantidade de antocianinas extraídas, medindo-se a intensidade da absorbância no comprimento de onda de absorção máxima (λ_{max}) de cada extrato na região do visível. Também foi feita uma avaliação da qualidade do extrato calculando-se a razão entre o valor de máxima absorbância na região do visível no λ_{max} de cada extrato e no ultravioleta (280 nm). Utilizou-se como solvente solução tampão com pH 1. A proporção de extrato/tampão utilizada foi de 100 μL /5 mL. Os diferentes procedimentos estudados para extração das antocianinas para cada espécie estão descritos a seguir.

Amora

a. Amoras inteiras foram maceradas e aquecidas numa proporção 1/3 amora/água (m/v) entre 50 °C e 60 °C por 30 min, seguido de filtração por gravidade com papel de filtro qualitativo.

b. Amoras inteiras foram maceradas num almofariz de porcelana, seguido de filtração a vácuo com papel de filtro qualitativo.

c. Amoras inteiras foram maceradas e imersas em etanol por 24 h numa proporção 1/3 fruta/etanol (m/v), seguido de filtração por gravidade com papel de filtro qualitativo.

d. Amoras inteiras foram maceradas e imersas em etanol por 1 h numa proporção 1/3 fruta/etanol (m/v), seguido de filtração por gravidade com papel de filtro qualitativo.

e. Amoras inteiras foram maceradas e imersas em metanol por 24 h numa proporção 1/3 fruta/metanol (m/v), seguido de filtração por gravidade com papel de filtro qualitativo.

Jabuticaba

a. As cascas foram aquecidas numa proporção 1/3 casca/água (m/v) entre 50 °C e 60 °C por 30 min, seguido de filtração por gravidade com papel de filtro qualitativo.

b. As cascas foram imersas em etanol por 24 h numa proporção 1/3 casca/etanol (m/v), seguido de filtração por gravidade com papel de filtro qualitativo.

c. As cascas foram imersas em metanol por 24 h numa proporção 1/3 casca/metanol (m/v), seguido de filtração por gravidade com papel de filtro qualitativo.

Jambolão

a. As cascas foram aquecidas numa proporção 1:3 casca/água (m/v) entre 50 °C e 60 °C por 30 min, seguido de filtração por gravidade com papel de filtro qualitativo.

b. Os grãos inteiros foram imersos em etanol por 24 h numa proporção 1/3 grãos/etanol (m/v), seguido de filtração por gravidade com papel de filtro qualitativo.

c. As cascas foram imersas em etanol por 24 h numa proporção 1/3 casca/etanol (m/v), seguido de filtração por gravidade com papel de filtro qualitativo.

d. Os grãos inteiros foram macerados numa proporção 1/3 grãos/água (m/v) por 30 min, seguido de filtração por gravidade com papel de filtro qualitativo.

e. As cascas foram imersas em metanol por 24 h numa proporção 1/3 casca/metanol (m/v), seguido de filtração por gravidade com papel de filtro qualitativo.

Uva

a. As cascas foram aquecidas numa proporção 1/3 casca/água (m/v) entre 50 °C e 60 °C por 30 min, seguido de filtração por gravidade com papel de filtro qualitativo.

b. As cascas foram processadas em liquidificador numa proporção 1/5 casca/água (m/v) por 5 min, seguido de aquecimento por 20 min e filtração por gravidade com papel de filtro qualitativo.

c. Os grãos inteiros foram imersos em etanol por 24 h numa proporção 1/3 grãos/etanol (m/v), seguido de filtração por gravidade com papel de filtro qualitativo.

d. As cascas foram imersas em etanol por 24 h numa proporção 1/3 casca/etanol (m/v), seguido de filtração por gravidade com papel de filtro qualitativo.

e. Os grãos inteiros foram macerados numa proporção 1/3 grãos/água (m/v) por 30 min, seguido de filtração por gravidade com papel de filtro qualitativo.

f. As cascas foram imersas em metanol por 24 h numa proporção 1/3 casca/etanol (m/v), seguido de filtração por gravidade com papel de filtro qualitativo.

5.3.3. Identificação das antocianinas

As técnicas utilizadas no decorrer deste estudo foram cromatografia em papel (PC), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e espectrofotometria ultravioleta/visível (UV-Vis).

A PC foi realizada utilizando-se papel Whatman 1 Chr, 20 cm x 20 cm. As fases móveis utilizadas estão descritas na **Tabela 6**.

A fase móvel utilizada na HPLC foi uma mistura de água, acetonitrila e ácido fórmico (81:10:9 v/v/v) preparada com solventes de grau espectroscópico e água deionizada. A fase estacionária utilizada foi uma coluna C18. Os extratos foram

previamente filtrados com um filtro de porosidade menor que $0,5 \mu\text{m}$ e diluídos 50 vezes antes de serem injetados no cromatógrafo.

Tabela 6. Sistemas de solventes para cromatografia de antocianinas (Harborne 1958).

Eluente	Composição	Proporção (v/v)
BAW	butanol:ácido acético:água	4:1:5
BuHCl	butanol:ácido clorídrico 12 mol L^{-1}	1:1
HCl 1 %	água:ácido clorídrico 12 mol L^{-1}	97:3
HCl-HAc	água:ácido acético gacial: ácido clorídrico 12 mol L^{-1}	82:15:3

Para a análise espectrofotométrica das espécies coloridas, as soluções foram preparadas pela dissolução dos extratos secos com solução tampão de pH 1 numa concentração final entre $2,0 \text{ g L}^{-1}$ a $3,0 \text{ g L}^{-1}$. Os espectros foram obtidos utilizando-se celas de quartzo com $1,0 \text{ cm}$ de caminho óptico.

5.3.4. Quantificação das antocianinas totais

Para este estudo foram utilizados extratos previamente preparados pela maceração e imersão das cascas e/ou frutas em HCl 1% em metanol por 24 h numa proporção 1/3 fruta/água (m/V), seguindo-se filtração com papel de filtro quantitativo.

Método de Petri e colaboradores (1997)

Foi preparada uma solução padrão, dissolvendo-se $2,11 \text{ mg}$ de cloreto de pelargonidina em um balão volumétrico de $10,0 \text{ mL}$ com HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em metanol. Para a construção da curva analítica foram adicionados $65 \mu\text{L}$, $125 \mu\text{L}$, $150 \mu\text{L}$, $200 \mu\text{L}$, $250 \mu\text{L}$ e $300 \mu\text{L}$ da solução estoque em balões volumétrico de $5,00 \text{ mL}$, completando-se o volume com HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em metanol.

Para a determinação quantitativa das antocianinas em balões volumétricos de $25,0 \text{ mL}$, foram dissolvidos de 20 mg a 50 mg de extrato seco com HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em metanol. Em seguida a absorbância foi medida no λ_{max} do cloreto de perlagonidina, 522 nm .

Método de Sondheimer e Kertsz (1948)

Em um balão volumétrico de 100,0 mL, preparou-se uma solução estoque pela dissolução de 1,99 mg do indicador vermelho do Congo com uma solução de carbonato de sódio $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. Para a construção da curva analítica foram adicionados 1,0 mL, 1,5 mL, 2,0 mL, 2,5 mL e 3,0 mL da solução estoque em balões volumétricos de 25,00 mL completando-se o volume com carbonato de sódio $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹.

Para a utilização do indicador vermelho do congo como padrão, foi necessário determinar o fator de correção da absorbância. Para isso, foram adicionados 269 µL da solução estoque de cloreto de pelargonidina em 2 balões volumétricos de 5,00 mL, completando-se o volume com solução tampão de pH 2,00 e 3,40, respectivamente. Isto equivale a uma solução 1% (m/V). Pela curva analítica construída, foi obtido o fator de correção.

Para a determinação quantitativa das antocianinas, em balões volumétricos de 10,0 mL foram dissolvidos de 120 mg a 130 mg de extrato seco (roto-evaporação do solvente) com água deionizada. Em balões volumétricos de 5,00 mL foram adicionados 400 µL da solução estoque dos extratos, completando-se o volume com soluções tampão de pH 2,00 ou pH 3,40. Em seguida a absorbância foi medida no λ_{\max} de cada extrato.

Método de Fuleki e Francis (1968a e 1968b)

Em balões volumétricos de 5,0 mL foram dissolvidos de 50,0 mg a 70,0 mg de extrato seco com água deionizada. Na seqüência, 350 µL da solução estoque dos extratos foram adicionados, completando-se o volume com soluções tampão de pH 1,00 ou pH 4,50. Em seguida a absorbância foi medida no λ_{\max} de cada extrato.

5.3.5. Purificação dos extratos antociânicos brutos

A purificação dos extratos antociânicos foi feita utilizando-se cartuchos SPE-C18 da Varian de 1000 mg. O cartucho foi condicionado com a percolação de 10 mL de metanol seguidos por 10 mL de água deionizada. Em seguida, as amostras foram

percoladas pelo cartucho. De acordo com o fabricante, a capacidade de retenção do sorvente contido no cartucho é aproximadamente 1% da massa deste material (Varian 2001). Para garantir a adsorção das antocianinas totais presentes nos extratos das frutas, a quantidade de amostra percolada pelo cartucho foi calculada considerando-se 0,1% da massa total do sorvente. Para a obtenção do volume a ser percolado pelo cartucho as concentrações dos extratos foram determinadas pelo método espectrofotométrico utilizando cloreto de pelargonidina como padrão. A **Tabela 7** apresenta as concentrações das amostras utilizadas neste teste, bem como o volume de cada extrato percolado pelo cartucho.

Tabela 7. Dados das amostras utilizadas no experimento de purificação dos extratos brutos.

Extrato Aquoso	Concentração / mg L ⁻¹	Volume / mL	Massa de antocianina / mg
amora	372 ± 1	3,00	1,12
jabuticaba	218 ± 2	5,00	1,09
jambolão	505 ± 5	2,00	1,01
uva	178 ± 3	6,00	1,07

A lavagem ou “*clean - up*” do cartucho foi feita com 10 mL de HCl 0,01% e a eluição das antocianinas foi feita com 3,0 mL de HCl 0,01% em metanol. As frações obtidas foram analisadas por CP, HPLC, UV-Vis e testes químicos visuais, descritos a seguir:

Espectrofotometria UV-Vis: para a caracterização espectrofotométrica das frações, foram obtidos espectros na região do ultravioleta/visível utilizando-se solução de HCl 0,01 % (v/v) em água deionizada como branco. Quando necessário, as frações foram diluídas utilizando-se este mesmo solvente.

PC para detecção de ácidos orgânicos: a fase móvel utilizada foi uma solução 1,0 g L⁻¹ de azul de bromofenol em n-butanol com ácido acético 50% (v/v) numa proporção 2/1 (ITAL 1990). Após a aplicação das amostras, o papel foi introduzido numa cuba cromatográfica onde a fase móvel foi eluída no sentido ascendente por cerca de 1 h. Posteriormente, o papel foi seco, utilizando-se um secador de cabelo. A presença de ácidos orgânicos foi detectada pelo aparecimento de manchas amarelas.

Teste colorimétrico para a determinação de açúcares: foi obtida uma escala colorimétrica utilizando-se como padrão uma solução estoque de misturas de açúcares comumente encontrados em frutas. As soluções estoque foram preparadas pela dissolução individual dos açúcares em água deionizada: frutose ($5,06 \text{ g L}^{-1}$), glicose ($5,07 \text{ g L}^{-1}$), arabinose ($5,00 \text{ g L}^{-1}$), galactose ($5,00 \text{ g L}^{-1}$), xilose ($5,14 \text{ g L}^{-1}$) e sacarose ($5,04 \text{ g L}^{-1}$). Pela mistura destas soluções foi preparada uma solução estoque final (concentração total de açúcares $5,0 \text{ g L}^{-1}$) contendo todos os açúcares, na mesma concentração. Para a construção da escala colorimétrica, em tubos de ensaios marcados e aferidos, foram adicionados $300 \mu\text{L}$ de fenol 5% em água deionizada, quantidades variadas da solução estoque final (entre 5 e $60 \mu\text{L}$), completando-se o volume com solução de H_2SO_4 concentrado. Esta solução foi mantida em banho-maria a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 30 min. As cores resultantes nos tubos de ensaio foram observadas e comparadas com um branco, solução sem açúcar. A fim de simplificar e diminuir o tempo de análise, a observação das cores resultantes também foi feita logo após a mistura dos reagentes e à temperatura ambiente. Para a determinação de açúcares nas frações, o mesmo procedimento para a construção da curva colorimétrica foi seguido, substituindo-se a adição da solução estoque por $100 \mu\text{L}$ de cada uma das frações individuais.

HPLC: foi utilizada para a confirmação dos resultados obtidos por PC e colorimetria, visando a determinação de ácidos orgânicos e açúcares, respectivamente.

Determinação de açúcares: a fase móvel utilizada foi água deionizada filtrada com membrana de porosidade $0,45 \mu\text{m}$ (GelmanSciences - Bulk GHP) e desgaseificada com banho de ultra-som seguido de fluxo de He. A vazão da fase móvel foi de $0,6 \text{ mL min}^{-1}$. A temperatura da coluna foi fixada em $85,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$ e a do detector em $50,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$. O volume de injeção foi de $50 \mu\text{L}$. As soluções padrão dos açúcares foram preparadas pela diluição (1:10) das soluções estoques, utilizadas na determinação colorimétrica.

Determinação de ácidos orgânicos: previamente foram estudadas a composição e a vazão da fase móvel e o tipo de eluição (gradiente ou isocrática). O estudo da variação destes parâmetros foi realizado visando a adaptação de métodos já descritos na literatura (Shui e Leong 2002, Chen *et al.* 2001) às condições laboratoriais

disponíveis no IQ/UNICAMP. A **Tabela 8** apresenta as variações dos parâmetros testados. As fases móveis testadas foram filtradas com membrana de porosidade menor que 0,5 μm e desgaseificadas com banho de ultra-som. A temperatura da coluna foi fixada em $40,0 \pm 0,1$ °C. O volume de injeção foi de 20 μL .

Tabela 8. Variações dos parâmetros estudados.

Procedimento	Composição da FM	Vazão da FM /mL min ⁻¹	Tipo de eluição
1	Metanol:solução de H ₂ SO ₄ pH 2,5 (60:40)	0,8	Isocrática
2	Metanol:solução de H ₂ SO ₄ pH 2,5 (10:90)	0,8	Isocrática
3	Solução de H ₂ SO ₄ pH 2,5	1,0	Isocrática
4	Solução de H ₂ SO ₄ pH 2,5 Metanol:Solução de H ₂ SO ₄ pH 2,5 (10:90)	1,0	Gradiente: até 6 min. solução de H ₂ SO ₄ pH 2,5 após metanol:solução de H ₂ SO ₄ pH 2,5 (10:90)

Para a realização dos experimentos descritos na **Tabela 8**, soluções estoque padrão de ácido ascórbico 502 mg L⁻¹, ácido cítrico 556 mg L⁻¹, ácido tartárico 508 mg L⁻¹, ácido fumárico 538 mg L⁻¹, ácido málico 518 mg L⁻¹ e ácido succínico 512 mg L⁻¹ foram preparadas pela dissolução dos ácidos orgânicos em solução de H₂SO₄ pH 2,5. Para a verificação dos tempos de retenção de cada ácido, as soluções estoque foram diluídas 10 vezes, com exceção das soluções de ácido ascórbico e fumárico, que foram diluídas 25 vezes. Para a otimização do método cromatográfico, misturas destas soluções estoque diluídas foram injetadas.

As frações foram injetadas na melhor condição de análise obtida, obtida com a utilização do procedimento 4, descrito na **Tabela 8**.

5.3.6. Avaliação de alguns parâmetros da extração em fase sólida

Estudo da recuperação das antocianinas

Extratos brutos aquosos de amora, jabuticaba, jambolão e uva foram percolados pelo cartucho seguindo o procedimento descrito no item 5.3.5. A quantificação das antocianinas foi realizada prévia e posteriormente à percolação dos extratos brutos aquosos pelo cartucho.

Avaliação da capacidade do cartucho

Foram percolados pelos cartuchos volumes variados de cada um dos extratos porque a concentração dos extratos de cada fruta é variável e a avaliação da capacidade do cartucho é feita com variações na massa de antocianinas, que depende da concentração dos extratos. O cálculo dos diferentes volumes percolados foi feito em função da concentração dos extratos, considerando-se a massa de antocianina igual ou menor que 1% da massa do material sorvente. A quantificação das antocianinas foi feita nas frações referentes à percolação do extrato bruto pelo cartucho e à eluição das antocianinas retidas.

5.3.7. Estudo de estabilidade dos extratos antociânicos brutos

Foi feito um estudo incluindo os principais parâmetros que afetam a estabilidade das antocianinas (pH, temperatura e tempo de estocagem), bem como o efeito da interação destes parâmetros.

Extratos brutos aquosos

Para a avaliação da estabilidade dos extratos brutos aquosos foram realizados 27 ensaios, em triplicata, seguindo o planejamento experimental 3³ apresentado na **Tabela 9** (Barros Neto *et al.*, 1996). Em cada ensaio, foram registrados os valores da absorbância, medida no λ_{\max} de cada extrato bruto. Os valores de temperatura foram escolhidos em função dos locais usuais de armazenamento de reagentes, em laboratórios químicos: armário ($T \cong 25$ °C), geladeira ($T \cong 5$ °C) e freezer ($T \cong -10$ °C), enquanto os valores de pH e tempo de estocagem foram escolhidos em função de trabalhos já descritos na literatura (Cabrita *et al.* 2000, Fossen *et al.* 1998).

Os extratos aquosos são os mais susceptíveis a decomposição por ação microbológica e por isso apresentavam baixa durabilidade. Visando aumentar o tempo de vida útil destes extratos aquosos, foram adicionados formaldeído (formol) ou ácido cítrico, que são substâncias tidas como conservantes. O efeito da adição destes conservantes na estabilidade dos extratos foi acompanhado mediante a avaliação dos

espectros eletrônicos dos extratos em 3 períodos diferentes, $t = 0$ dia (após uma hora do preparo), $t = 30$ dias e $t = 60$ dias.

Tabela 9. Planejamento experimental para o estudo da estabilidade das antocianinas em meio aquoso. Os sinais algébricos identificam o nível de cada fator como inferior (-), intermediário (0) e superior (+).

Fatores		(+)	(0)	(-)
	pH	1	3	5
	Temperatura / °C)	-10	5	25
	tempo / dias	0	30	60

Ensaio	pH	Temperatura	Tempo de estocagem
1	+	+	+
2	0	+	+
3	-	+	+
4	+	0	+
5	0	0	+
6	-	0	+
7	+	-	+
8	0	-	+
9	-	-	+
10	+	+	0
11	0	+	0
12	-	+	0
13	+	0	0
14	0	0	0
15	-	0	0
16	+	-	0
17	0	-	0
18	-	-	0
19	+	+	-
20	0	+	-
21	-	+	-
22	+	0	-
23	0	0	-
24	-	0	-
25	+	-	-
26	0	-	-
27	-	-	-

Extratos brutos alcoólicos

Nos estudos de avaliação da estabilidade dos extratos brutos aquosos, foi observado que o parâmetro de maior influência é o pH. Extratos com pH 1 são estáveis e com o aumento do pH a estabilidade diminui significativamente. Sabendo-se que é necessário um meio com baixo valor de pH para aumentar a estabilidade dos extratos, todos os estudos com os extratos alcoólicos já foram realizados em condições ácidas. Assim, foi feito um estudo incluindo apenas variação dos seguintes parâmetros: temperatura e tempo de estocagem, bem como o efeito da interação entre eles. Foi estabelecido um planejamento experimental 3^2 , com 3 níveis para cada parâmetro, descrito na **Tabela 10**.

Tabela 10. Planejamento experimental para o estudo da estabilidade das antocianinas em meio alcoólico. Os sinais algébricos identificam o nível de cada fator como inferior (-), intermediário (0) e superior (+).

Fatores		(-)	(0)	(+)
	Temperatura / °C		-10	5
Tempo / dias		0	30	60

Ensaio	Temperatura	Tempo de estocagem
1	-	-
2	-	0
3	-	+
4	0	-
5	0	0
6	0	+
7	+	-
8	+	0
9	+	+

5.3.8. Reações envolvendo as antocianinas

Reações ácido-base (Avaliação da propriedade ácido-base das antocianinas)

Indicador de pH: para a caracterização visual e avaliação da adequação do uso dos extratos das frutas como indicador, foram adicionados em tubos de ensaios 5 mL de solução tampão com pH variando de 1 a 14 e 5 gotas dos extratos obtidos. A

observação da coloração foi feita 30 segundos após a adição do extrato. Estas soluções também foram caracterizadas espectrofotometricamente.

Papel indicador ácido-base: na etapa de filtração do procedimento de extração das antocianinas, foi observado que parte dos extratos ficava impregnada no papel de filtro. Estes papéis de filtro foram secos à temperatura ambiente, apresentando uma coloração final violeta intensa. Depois da secagem, foram recortados em tiras de aproximadamente 0,3 cm x 4,0 cm. Estas tiras foram imersas em soluções tampão com pH variando de 1 a 14, observando-se a cor resultante dos papéis. Foi construída uma escala de pH em função da cor do papel indicador. Foi preparado também um papel indicador com menores quantidades de antocianinas. Neste caso, recortou-se o papel de filtro em tiras de aproximadamente 0,3 cm x 4,0 cm, as quais foram imersas rapidamente nos extratos. Após secagem à temperatura ambiente, estas tiras de papel de filtro apresentaram uma coloração violeta de menor intensidade que as tiras obtidas diretamente do papel utilizado na filtração dos extratos. Estas tiras foram utilizadas para a construção de uma escala de pH em função da cor do papel indicador.

Papel indicador universal de pH: foi preparado recortando-se o papel de filtro em quadrados de aproximadamente 0,5 cm x 0,5 cm, os quais foram imersos rapidamente nos extratos e secos à temperatura ambiente. Posteriormente, os quadrados de papel de filtro impregnado foram fixados sobre uma fita dupla face (0,5 cm x 4,0 cm), conforme ilustrado na **Figura 7**.

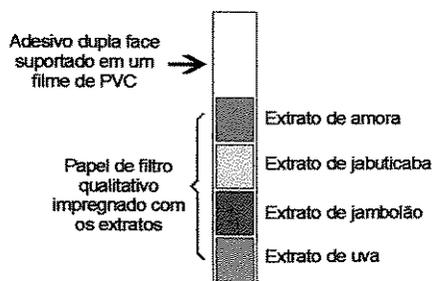


Figura 7. Esquema do papel indicador de pH universal desenvolvido.

O papel indicador de pH universal alternativo foi imerso em soluções tampão com pH variando de 1 a 14 e observou-se a cor resultante do papel. Foi construída uma escala de pH em função da cor do papel indicador

Para a avaliação do uso destes papéis de filtro impregnados com antocianinas, foram preparadas diversas soluções ácidas e básicas e mediu-se o pH utilizando-se os papéis de filtro impregnados com os extratos. Para efeitos de comparação, foram realizadas medidas das mesmas soluções utilizando-se papel indicador de pH universal da Merck[®], papel indicador de pH universal da Reagen[®] e medidas com o pHmetro. Foi avaliada também a aplicação destes papéis indicadores de pH alternativo na determinação do pH de produtos de uso doméstico.

Este estudo gerou um processo de pedido de patente que está sendo encaminhado pela Agência de Inovação da UNICAMP (INOVA). O relatório de pedido de patente foi protocolizado no Instituto Nacional de Propriedade Intelectual e recebeu o número: 8.201.475-2 (Patente Requerida).

Uso dos extratos como indicadores em volumetria de neutralização: as titulações visuais ácido-base foram realizadas utilizando-se soluções padronizadas $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de HCl, CH_3COOH , H_3PO_4 , NaOH, e NH_3 . Como indicadores, utilizaram-se os extratos aquosos e alcoólicos das frutas, a fim de avaliar sua adequação para a detecção do ponto final das titulações. Para efeito de comparação, paralelamente, foram realizadas titulações das mesmas soluções, utilizando-se indicadores sintéticos adequados (fenolftaleína, azul de bromotimol, azul de bromocresol e vermelho de metila) e titulação potenciométrica. Foram realizadas também titulações espectrofotométricas para a caracterização das espécies envolvidas no meio reacional. Todas as titulações foram realizadas utilizando-se bureta de 50,0 mL e alíquotas de 25,0 mL de titulado.

Estudo das reações de equilíbrio químico das antocianinas em soluções aquosas: foi realizado um estudo para verificar a reversibilidade das reações químicas das antocianinas presentes nos extratos variando-se o pH da solução de 1 a 14. Foi preparada uma solução adicionando-se ácido clorídrico $12,0 \text{ mol L}^{-1}$ à água deionizada até pH 1. Foram adicionados 20 mL desta solução e 2 mg do extrato seco em um béquer, elevando-se o pH da solução até 14, acrescentando-se soluções de NaOH e

KOH, com um conta-gotas. Ao obter pH 14, acrescentou-se HCl para baixar o pH da solução novamente para 1. O procedimento de abaixar e elevar o pH de uma mesma solução contendo o extrato, foi repetido 10 vezes. A variação de pH foi acompanhada utilizando-se eletrodo de vidro e de referência Ag/AgCl combinados.

Para a determinação do pK_a aparente dos extratos, foram preparadas soluções diluídas dos extratos em meio ácido (pH 1) ajustado com HCl $12,0 \text{ mol L}^{-1}$, de modo a obter um volume final de 100 mL de uma solução com valor de absorvância igual a 1 no λ_{max} de cada extrato. Para tanto, foram utilizados cerca de 0,2 g de extrato seco. Com uma bureta, volumes discretos de soluções de NaOH de concentração entre $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $5,0 \text{ mol L}^{-1}$ eram adicionados às soluções diluídas dos extratos de modo a obter uma variação de 0,2 unidade de pH.

O sistema ilustrado na **Figura 8** era constituído de banho termostatzado, vaso de reação, agitador magnético, bureta de 50,0 mL, pHmetro, bomba peristáltica e espectrofotômetro. A bomba peristáltica bombeava a solução dos extratos diluídos até o espectrofotômetro para o acompanhamento da variação da absorvância em função da adição do NaOH. O banho termostatzado foi usado para manter a temperatura do vaso de reação em $25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$. Após cada adição da solução de NaOH, o pH e a absorvância eram medidos.

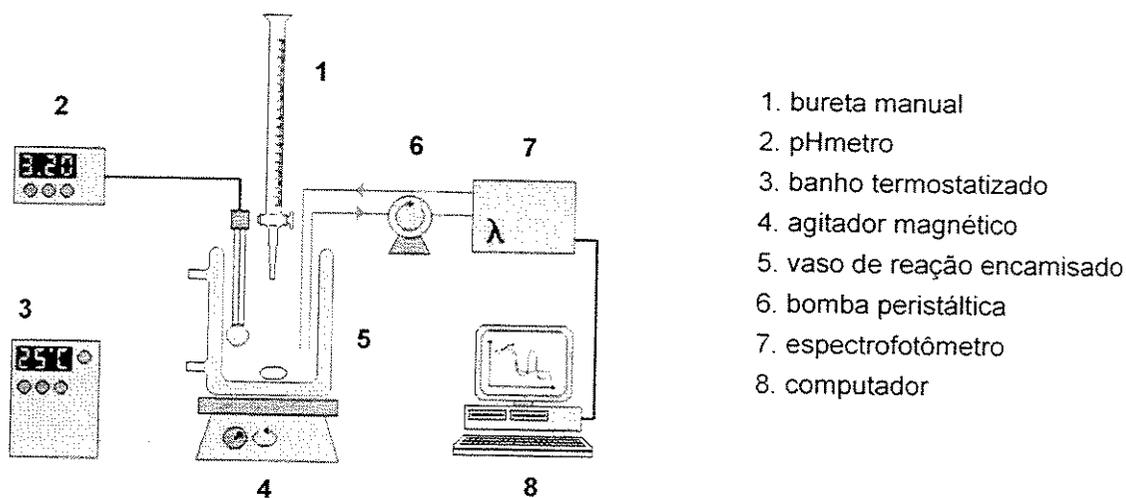


Figura 8. Esquema do sistema utilizado para a determinação do pK_a aparente dos extratos das frutas.

Reações de óxido-redução (Determinação de cloro livre)

Caracterização visual e espectrofotométrica da reação de cloro livre com os extratos alcoólico e aquoso de jambolão: para a caracterização visual foi preparada uma solução de hipoclorito de sódio 0,05% a partir da diluição de uma solução padrão 5% (55 g L^{-1}). Foram adicionados $500 \mu\text{L}$ do extrato alcoólico ou aquoso de jambolão e 1 mL de uma solução de hipoclorito de sódio $0,55 \text{ g L}^{-1}$ em tubos de ensaios. O pH foi medido e a cor resultante da solução foi observada. Para a caracterização espectrofotométrica, em um balão volumétrico de $5,00 \text{ mL}$, foram adicionados $500 \mu\text{L}$ do extrato alcoólico ou aquoso de jambolão, $1,0 \text{ mL}$ de uma solução de hipoclorito de sódio $0,55 \text{ g L}^{-1}$, completando-se o volume com água deionizada.

Os extratos aquosos e alcoólicos de jambolão apresentaram comportamentos semelhantes. Sendo assim, devido à maior durabilidade do extrato alcoólico em comparação com o extrato aquoso, nos testes descritos a seguir, passou a ser utilizado somente o extrato alcoólico de jambolão.

Obtenção da escala colorimétrica para a determinação de cloro livre: em tubos de ensaio aferidos e marcados, foram adicionados $500 \mu\text{L}$ do extrato alcoólico de jambolão, volumes variados entre $200 \mu\text{L}$ e $500 \mu\text{L}$ de solução padrão de hipoclorito de sódio $0,55 \text{ g L}^{-1}$ completando-se o volume com solução tampão (pH 1) até 5 mL . Observou-se a variação da coloração resultante em função da concentração de cloro livre.

Obtenção da curva analítica para a determinação de cloro livre: em balões volumétricos de $10,0 \text{ mL}$ foram adicionados $500 \mu\text{L}$ do extrato alcoólico de jambolão, e volumes variados de NaClO $0,55 \text{ g L}^{-1}$, completando-se o volume com solução tampão (pH 1). As medidas espectrofotométricas foram feitas no λ_{max} do extrato alcoólico de jambolão na região do visível ($\lambda_{\text{max}} = 518 \text{ nm}$).

Determinação de cloro livre em amostras de água sanitária: foram utilizadas duas amostras comerciais de água sanitária, denominadas **A** e **B**, e um tablete efervescente

de dicloroisocianurato de sódio (produto comercial para higienização de verduras), denominado de amostra **C**. A composição destas amostras, de acordo com dados fornecidos pelos fabricantes, está descrita na **Tabela 11**.

Tabela 11. Composição das amostras analisadas.

Amostra A	Amostra B	Amostra C
hipoclorito de sódio	Hipoclorito de sódio	dicloroisocianurato de sódio
hidróxido de sódio	hidróxido de sódio	—
cloreto de sódio	cloreto de sódio	—
água	água	—
teor de cloro livre: 2,0 – 2,5 %	teor de cloro livre: 2,0 – 2,4 %	teor de cloro livre 300 mg
pH aproximadamente 12	—	—

Para a determinação de cloro livre nas amostras **A** e **B**, retirou-se uma alíquota de 25,00 mL das amostras transferindo-a para um balão volumétrico de 1000,0 mL e completando o volume com água deionizada. Em um balão volumétrico de 10,00 mL, foram adicionados 500 μ L de extrato de jambolão, 700 μ L da solução da amostra diluída, completando-se o volume com solução tampão pH 1.

Para a determinação de cloro livre na amostra **C**, dissolveu-se um tablete de 498 mg de dicloroisocianurato de sódio com água deionizada em um balão volumétrico de 500,0 mL. Em um balão volumétrico de 10,00 mL, foram adicionados 500 μ L de extrato de jambolão, 1000 μ L da solução da amostra dissolvida, completando-se o volume com solução tampão pH 1.

Na determinação visual, as amostras utilizadas foram às mesmas testadas na determinação espectrofotométrica. Para a determinação de cloro livre nas amostras **A** e **B**, 500 μ L de extrato de jambolão e 900 μ L da amostra foram adicionados em tudo de ensaio marcado e aferido em 5,00 mL, completando-se o volume com solução tampão pH 1.

Para a determinação de cloro livre na amostra na **C**, foram adicionados 500 μ L de extrato de jambolão, 600 μ L da amostra e foram adicionados em tudo de ensaio marcado e aferido em 5,00 mL, completando-se o volume com solução tampão pH 1. A coloração resultante foi comparada com a escala colorimétrica após 1 min.

Todas as determinações de cloro livre nas amostras **A**, **B** e **C** foram realizadas em 5 replicatas. Os resultados obtidos foram comparados com o método padrão de

determinação de cloro livre em amostras de água sanitária (ASTM D2022 – titulação iodométrica).

A determinação de cloro livre pelo método espectrofotométrico foi feita simultaneamente com extratos de jambolão bruto e purificado. Para a avaliação do método espectrofotométrico proposto, foram estudados alguns parâmetros de validação (ICH 1996).

CAPÍTULO 6

RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Análise termogravimétrica dos extratos antocianínicos

Visando a determinação da temperatura do início da decomposição das antocianinas, para evitar a degradação destes pigmentos no procedimento de extração aquosa, foram obtidas as curvas termogravimétricas - **Figura 9** - para os extratos secos de amora, jabuticaba, jambolão e uva.

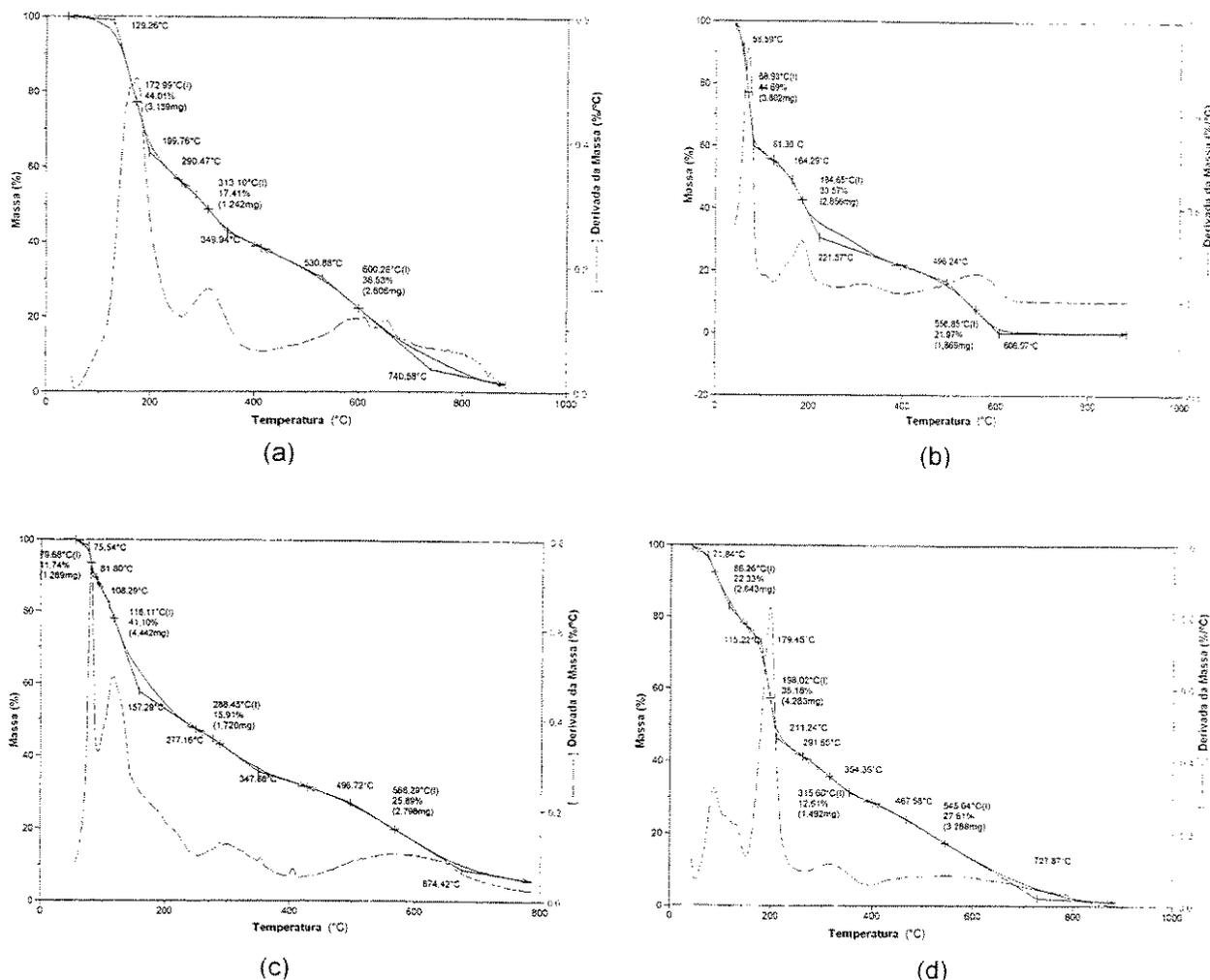


Figura 9. Curvas termogravimétricas dos extratos de (a) amora, (b) jabuticaba, (c) jambolão e (d) uva.

De modo geral, os extratos apresentam perda de massa a partir de aproximadamente 60 °C, portanto são termicamente estáveis até esta temperatura. Estas perdas são contínuas até aproximadamente 740 °C, o que é característico de compostos orgânicos. Os resultados obtidos indicaram que a extração das antocianinas

utilizando água e aquecimento pode ser realizada com segurança, isto é, sem a degradação destes pigmentos até 60 °C (Soares 2001).

6.2. Otimização de procedimentos de extração das antocianinas

Este estudo visou a adaptação dos procedimentos descritos na literatura (Harborne 1958, Forster 1978, Lee e Hong 1992, Barry 1997) para a extração de antocianinas a partir de vegetais, considerando-se aspectos como: simplicidade, tempo de extração, toxicidade do solvente extrator e custos.

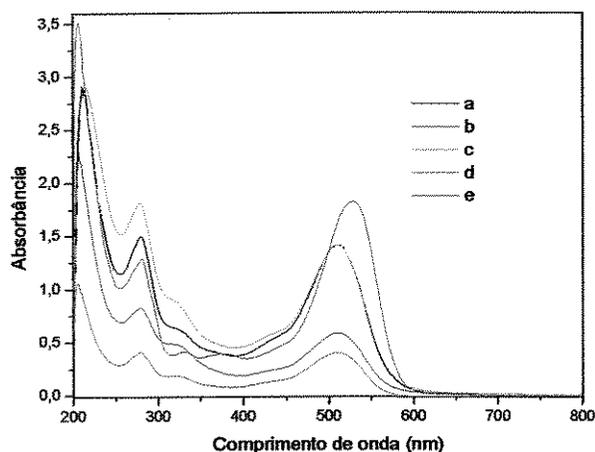
Os espectros no UV-Vis indicam que as antocianinas podem ser detectadas seletivamente na região do visível (465-550 nm). Já na região do ultravioleta, as absorvâncias dependem também de outros compostos, tais como ácidos fenólicos e taninos, dentre outros (Giusti e Wrolstad 2002, Fuleki e Francis 1968a). Assim, a eficiência dos procedimentos de extração foi avaliada espectrofotometricamente, em função da quantidade de antocianinas extraídas e da qualidade do extrato.

A qualidade ou pureza do extrato pode ser avaliada em função da razão entre o valor de *máxima absorvância na região do visível* (A_{mv}) e ultravioleta (280 nm). Segundo Petri e colaboradores (1997), podem ser considerados extratos de boa qualidade aqueles que possuem pequenas quantidades de outros polifenóis, cuja razão A_{mv}/A_{280nm} é maior que 1,0.

Os espectros obtidos para os diferentes procedimentos de extração das antocianinas e os resultados da avaliação da qualidade dos extratos de amora estão apresentados na **Figura 10**.

O procedimento b é mais trabalhoso que os procedimentos a, c, d e e devido à obtenção de um material pastoso que requer vácuo para ser filtrado; além disso, seu rendimento é muito baixo, pois são necessários cerca de 5 g de amora para a obtenção de 1 mL de extrato com baixa qualidade. O procedimento d apresenta um tempo de extração menor que c. Apesar da boa qualidade desse extrato, a quantidade de antocianinas extraídas é pequena, o que é evidenciado pela baixa absorção na região do visível. Os procedimentos de extração a, c e e apresentaram a melhor eficiência de extração, com boa qualidade de extratos, sendo que os procedimentos a e c apresentaram intensidade de absorção semelhante. A eficiência da extração do

procedimento e foi maior, o que foi verificado tanto pela avaliação da intensidade de absorvância quanto pela qualidade do extrato. Contudo, devido à toxicidade do metanol, este procedimento foi mantido apenas para os estudos nos quais os aspectos quantitativos são relevantes. Para os demais experimentos passaram a ser utilizados os extratos obtidos pelo procedimento a (denominado extrato aquoso de amora) e c (denominado extrato alcoólico de amora).

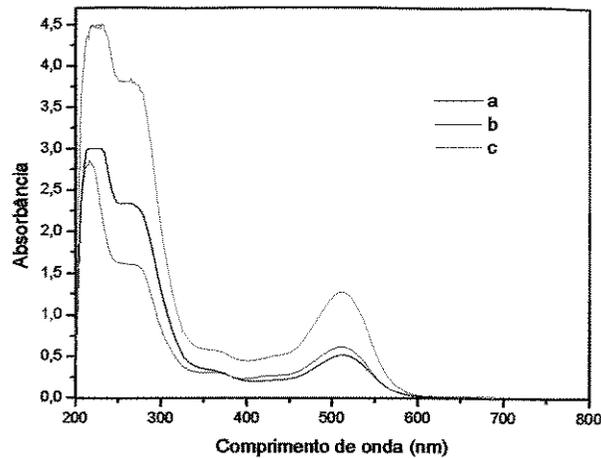


Procedimento de extração	$A_{(280nm)}$	A_{mv}	$A_{mv} / A_{(280nm)}$
a	1,503	1,415	0,941
b	0,832	0,588	0,707
c	1,821	1,412	0,775
d	0,412	0,403	0,978
e	1,281	1,824	1,424

Figura 10. Espectros dos extratos de amora obtidos pelos diferentes procedimentos de extração. (a) Maceração e aquecimento numa proporção 1/3 amora/água (m/V) entre 50 e 60 °C por 30 min. (b) Maceração. (c) Maceração e imersão em etanol por 24 h numa proporção 1/3 fruta/água (m/V). (d) Maceração e imersão em etanol por 1 h numa proporção 1/3 fruta/água (m/V). (e) Maceração e imersão em HCl 1% em metanol por 24 h numa proporção 1/3 fruta/água (m/V). A tabela ao lado dos espectros apresenta os valores de absorvância obtidos em 280 nm e λ_{max} cada extrato, bem como a razão entre eles.

Nos estudos com jabuticaba, os extratos a e b, apresentaram intensidade de absorção semelhantes, enquanto que o extrato c apresentou uma intensidade significativamente maior - **Figura 11**.

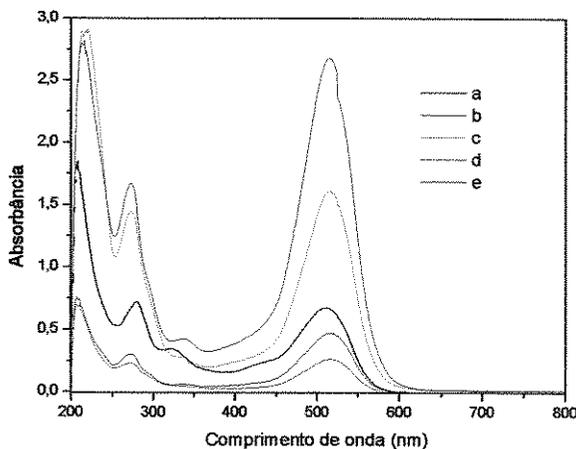
Pela avaliação da qualidade dos extratos de jabuticaba, os resultados indicados na **Figura 11** mostraram a presença de grandes quantidades de outros compostos polifenólicos em todos os extratos, uma vez que a razão A_{mv}/A_{280nm} foi menor que 0,5. Assim, independente do procedimento de extração, a quantidade de outros polifenóis extraídos juntamente com as antocianinas é relativamente alta, o que justificou o estudo posterior para purificação destes extratos. Os extratos que continuaram a ser utilizados foram aqueles obtidos pelos procedimentos a e b, sendo denominados de extrato aquoso de jabuticaba e extrato alcoólico de jabuticaba, respectivamente. Para fins quantitativos será utilizado o extrato c.



Procedimento de extração	$A_{(280\text{nm})}$	A_{mv}	$A_{\text{mv}}/A_{(280\text{nm})}$
a	2,170	0,508	0,234
b	1,523	0,612	0,402
c	3,628	1,275	0,351

Figura 11. Espectros dos extratos de jaboticaba obtidos pelos diferentes procedimentos de extração. (a) Aquecimento numa proporção 1/3 casca/água (m/V) entre 50 e 60 °C por 30 min. (b) Imersão em etanol por 24 h numa proporção 1/3 casca/água. (c) Imersão em HCl 1% em metanol por 24 h numa proporção 1/3 casca/água (m/V). A tabela ao lado dos espectros apresenta os valores de absorbância obtidos em 280 nm e λ_{max} cada extrato nm, bem como a razão entre eles.

Nos estudos com jambolão, todos os extratos apresentaram boa qualidade de acordo com os resultados apresentados na **Figura 12**. Entretanto, os que apresentaram melhores desempenhos, considerando-se a intensidade da absorção da região do visível foram os extratos a, c e e.

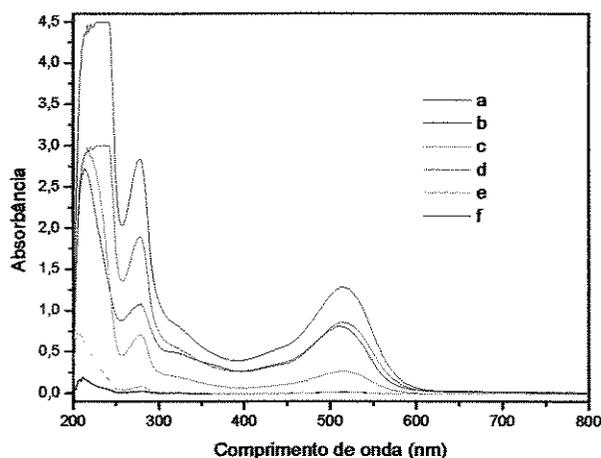


Procedimento de extração	$A_{(280\text{nm})}$	A_{mv}	$A_{\text{mv}}/A_{(280\text{nm})}$
a	0,723	0,664	0,918
b	0,268	0,467	1,633
c	1,331	1,607	1,207
d	0,208	0,259	1,245
e	1,515	2,679	1,768

Figura 12. Espectros dos extratos de jambolão obtidos pelos diferentes procedimentos de extração. (a) Aquecimento numa proporção 1/3 casca/água (m/V) entre 50 e 60 °C por 30 min. (b) Maceração e imersão dos grãos em etanol por 24 h numa proporção 1/3 grãos/água. (c) Imersão das cascas em etanol por 24 h numa proporção 1/3 casca/água. (d) Maceração e imersão dos grãos em etanol por 24 h numa proporção 1/3 grãos/água. (e) Imersão em HCl 1% em metanol por 24 h numa proporção 1/3 casca/água (m/V). A tabela ao lado dos espectros apresenta os valores de absorbância obtidos em 280 nm e λ_{max} cada extrato nm, bem como a razão entre eles.

Os extratos obtidos a partir dos grãos de jambolão macerados, b e d, resultaram em extratos de baixa concentração de antocianinas. Esse fato pode ser justificado devido à maior parte dos pigmentos de antocianinas no jambolão ser encontrada na casca da fruta, embora a polpa também seja pigmentada. Além disso, a formação de uma pasta após a maceração, resulta em perda do material e dificuldade no processo de filtração. Para os procedimentos posteriores, passaram a ser utilizados os extratos a e c, denominados de extrato aquoso de jambolão e extrato alcoólico de jambolão, respectivamente. Para fins quantitativos passou a ser utilizado o extrato e.

Para os estudos com uva, os extratos b, c e e obtidos a partir do processamento da casca em liquidificador, dos grãos imersos em etanol e dos grãos macerados, respectivamente, apresentaram baixa qualidade, conforme resultados apresentados na **Figura 13**, além da baixa concentração de antocianinas, evidenciada pela baixa absorção na região do visível.



Procedimento de extração	$A_{(280\text{nm})}$	A_{mv}	$A_{\text{mv}}/A_{(280\text{nm})}$
a	1,076	0,800	0,743
b	0,025	0,011	1,740
c	0,702	0,263	0,375
d	1,887	0,855	0,453
e	0,077	0,014	0,182
f	2,830	1,282	0,453

Figura 13. Espectros dos extratos de uva obtidos pelos diferentes procedimentos de extração. (a) Aquecimento numa proporção 1/3 casca/água (m/V) entre 50 e 60 °C por 30 min. (b) Processamento das cascas em liquidificador numa proporção 1/5 cascas/água, seguida de aquecimento por 20 min. (c) Imersão dos grãos em etanol por 24 h numa proporção 1/3 grãos/água. (d) Imersão das cascas em etanol por 24 h numa proporção 1/3 casca/água. (e) Maceração e aquecimento dos grãos numa proporção 1/3 casca/água (m/V) entre 50 e 60 °C por 30 min. (f) Imersão em HCl 1% em metanol por 24 h numa proporção 1/3 casca/água (m/V). A tabela ao lado dos espectros apresenta os valores de absorvância obtidos em 280 nm e λ_{max} cada extrato nm, bem como a razão entre eles.

No caso do extrato b, provavelmente a baixa concentração se deveu ao processamento da casca no liquidificador, já que este exige um volume maior de água, em comparação ao simples aquecimento quando se usa a mesma quantidade de casca

de uva, como no extrato a. A extração de antocianinas a partir de grãos de uva inteiros, como no caso dos extratos c e e, resultou em extratos de baixa concentração, pois as antocianinas presentes na uva encontram-se principalmente na casca. Por isso, quando se usam quantidades equivalentes em massa de casca ou do grão inteiro, a concentração do extrato obtido a partir dos grãos é menor do que quando se utiliza apenas a casca. Pelos motivos citados anteriormente, passaram a ser utilizados somente os extratos a (denominado extrato aquoso de uva) e d (denominado extrato alcoólico de uva).

Os valores da **Tabela 12** indicam que os procedimentos selecionados para a extração das antocianinas de uma mesma fruta apresentam uma variação de até 10% em relação a quantidade de antocianinas extraídas. Este valor é coerente com outros métodos de extração utilizados para esta finalidade em trabalhos da literatura (Bobbio *et al.* 2000).

Tabela 12. Dados sobre a variação na extração das antocianinas em frutas vermelhas.

Fruta	Solvente extrator	Média da extração (mg/100g de fruta)	Variação da extração (%)
amora	metanol	550 ± 27	5
	etanol	396 ± 15	4
	água	253 ± 8	3
jabuticaba	metanol	217 ± 3	1
	etanol	156 ± 14	9
	água	131 ± 8	6
jambolão	metanol	231 ± 14	6
	etanol	178 ± 8	4
	água	154 ± 10	6
uva	metanol	215 ± 22	10
	etanol	168 ± 10	6
	água	143 ± 8	6

6.3. Análise qualitativa dos extratos antociânicos

6.3.1. Identificação da presença da classe antocianinas

As cores e as mudanças de cores nos vegetais ocorrem pela presença e/ou interação de três classes de substâncias: porfirinas, carotenóides e flavonóides (Alkema e Seager 1982). Em alguns casos, a cor resultante é dependente de interações químicas e/ou do pH. A **Tabela 13** apresenta os compostos das três principais classes

de pigmentos encontrados em plantas, a coloração produzida e algumas propriedades espectrais.

A **Figura 14** apresenta os espectros de absorção na região do UV-Vis dos extratos brutos de amora, jabuticaba, jambolão e uva, bem como os valores de $\lambda_{\text{máx}}$ na região do visível.

Tabela 13. Classificação dos compostos coloridos e algumas propriedades espectrais dos principais corantes encontrados em vegetais (Harborne 1975 *et al.*, Harborne 1991, Alkema e Seager 1982).

Classe	Composto	Cor produzida	$\lambda_{\text{máx}}$ no visível / nm*	$\lambda_{\text{máx}}$ no UV / nm*
Porfirina	clorofila	Verde	600 – 660 430 – 470	—
Carotenóide	caroteno (α, β, γ) xantofila	amarelo, laranja e vermelho Amarelo	400 – 500 (uma banda de absorção intensa e duas bandas de absorções menos intensas)	—
flavonóide	flavona flavonol antocianina	amarelo amarelo vermelho, azul, roxo e magenta	— — 465 – 550	365 – 390 e 250 – 270 270 – 280

* Todos estes valores são aproximados, pois podem variar com o solvente usado e o pH.

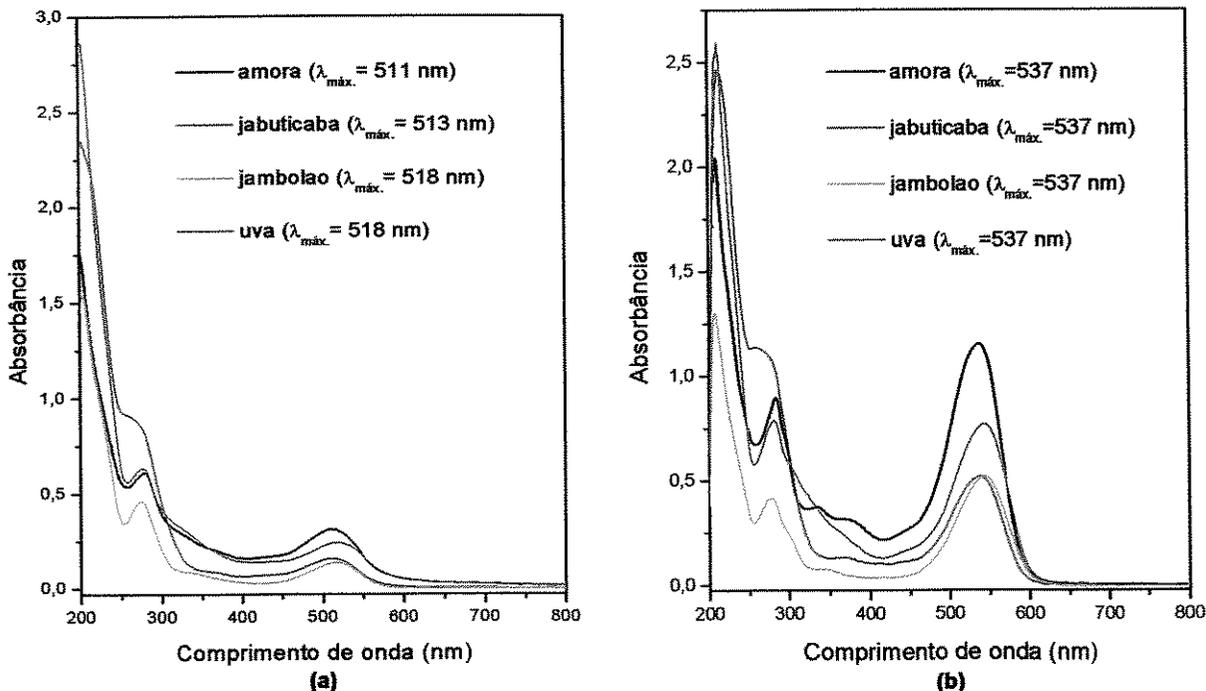


Figura 14. Espectros de absorção eletrônica dos extratos brutos de amora, jabuticaba, jambolão e uva. (a) aquosos e (b) alcoólicos.

O espectro de absorção eletrônica das antocianinas é caracterizado por duas bandas separadas, uma na região do visível (465 nm a 550 nm), determinada pela conjugação do anel B, e outra na região do ultravioleta (270 nm a 280 nm) determinada pela conjugação do anel A da (vide **Figura 1**, página 9). Nos espectros obtidos, apresentados na **Figura 14**, essas absorções características podem ser observadas, indicando a presença deste grupo de pigmentos nos extratos destas frutas. A presença das outras classes de corantes, tais como os carotenóides, porfirinas, flavonas e flavonóis, não foi detectada.

Sondheimer e Kertz observaram que antocianinas dissolvidas em meio alcoólico apresentam espectros diferentes dos daquelas dissolvidas em meio aquoso. Em seus estudos com morangos, eles observaram que, em meio alcoólico, o λ_{\max} das antocianinas aparece em 520 nm, enquanto que em meio aquoso, $\lambda_{\max} = 500$ nm (Sondheimer e Kertsz 1948). Este deslocamento batocrômico apresentado pelo extrato alcoólico também foi observado no presente trabalho, conforme ilustram os espectros da **Figura 14**.

Nos cromatogramas obtidos pela técnica de cromatografia em papel, a presença de antocianinas foi observada em todos os extratos. Isto foi evidenciado pelo aparecimento de manchas rosas, que ao serem reveladas com vapores de amônia tornaram-se azuis. Tal como na análise espectrofotométrica, grupos carotenóides e porfirinas não foram detectados. A presença destes corantes seria caracterizada pelo aparecimento de manchas amarela e verde, respectivamente, nos cromatogramas. Isto indica que estes corantes estão em baixa concentração nos extratos antociânicos, quando comparados com as antocianinas, ou que os processos de extração utilizados não são ideais para extraí-los. A **Figura 15** ilustra um exemplo dos cromatogramas obtidos.

6.3.2. Identificação das antocianinas

Os valores de R_f estão relacionados com a maior ou menor interação do soluto (antocianinas) com a fase móvel (FM). Estas interações dependem da polaridade da FM e do soluto. No entanto as estruturas das antocianinas presentes nos extratos de uva e de jambolão são muito similares, o que indica que apresentam polaridades semelhantes, resultando numa difícil separação.

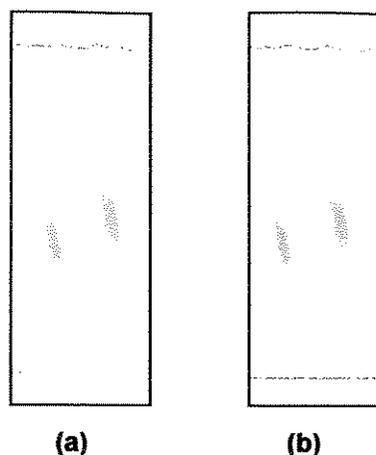


Figura 15. Exemplos de cromatogramas obtidos para a detecção de antocianinas nos extratos brutos. (a) Cromatograma do extrato de jambolão bruto. (b) Cromatograma do extrato de jambolão bruto após a revelação com vapores de amônia.

Assim, não foi possível separar as antocianinas dos extratos de uva e de jambolão por cromatografia de papel. De acordo com dados da literatura, a diferença entre os valores de R_f das antocianinas presentes nestas frutas é muito pequena (Harborne 1967). Com isso, ocorre a sobreposição das manchas e, por consequência, é difícil separar as antocianinas para posterior identificação. Extratos de jambolão e uva podem ser considerados misturas complexas, pois envolvem componentes com pequenas diferenças de valores de R_f . Nestes casos, para obter uma boa separação o desenvolvimento do cromatograma requer um tempo de até 40 h (Jain e Seshadri 1975). Este fator torna o método muito lento e inviável, quando se deseja uma análise simples e rápida (Teeling *et al.* 1971).

Para os extratos de jabuticaba e de amora foi possível separar e identificar as antocianinas devido à diferença dos valores de R_f . A **Tabela 14** apresenta os valores de R_f da literatura (Harborne 1958) e os obtidos experimentalmente. Não foi possível obter a separação das antocianinas do extrato de amora com a maioria das fases móveis utilizadas, pois a diferença entre os valores de R_f , de acordo com a literatura, é pequena. Assim, somente com a utilização da fase móvel HCl-HAc foi possível conseguir a separação das antocianinas presentes no extrato de amora.

Para a complementação destes estudos de identificação das antocianinas presentes nos extratos das frutas, utilizou-se a técnica de HPLC. Entretanto, a não disponibilidade de padrões de antocianinas e alguns fatores que afetam a retenção,

como temperatura ambiente, tipo de coluna e equipamento utilizado, dificultam a identificação destes pigmentos.

Tabela 14. Antocianinas comumente encontradas na jabuticaba e amora.

	Fase móvel	R _f (literatura)	R _f (obtido)	Antocianina identificada
Jabuticaba	BAW	0,26	0,29	delfinidina-3-glicosídeo
		0,38	0,35	cianidina-3-glicosídeo
		0,41	0,42	peonidina-3-glicosídeo
	BuHCl	0,11	0,15	delfinidina-3- glicosídeo
		0,25	0,26	cianidina-3-glicosídeo
		0,30	0,34	peonidina-3-glicosídeo
	HCl-HAc	0,18	0,18	delfinidina-3-glicosídeo
		0,26	0,28	cianidina-3-glicosídeo
		0,33	0,35	peonidina-3-glicosídeo
	HCl 1 %	0,03	0,03	delfinidina-3-glicosídeo
		0,17	0,18	cianidina-3-glicosídeo
		0,09	0,07	peonidina-3-glicosídeo
Amora	BAW	0,37	0,40	cianidina-3-rutinose
		0,38	0,40	cianidina-3-glicosídeo
	BuHCl	0,25	0,24	cianidina -3-rutinose
		0,25	0,24	cianidina-3--glicosídeo
	HCl-HAc	0,43	0,43	cianidina -3-rutinose
		0,26	0,28	cianidina-3--glicosídeo
	HCl 1 %	0,19	0,18	cianidina -3-rutinose
		0,17	0,18	cianidina-3--glicosídeo

Para minimizar estas dificuldades, Goiffon e outros (1999) propuseram que a retenção das antocianinas poderia ser expressa por α , um termo que relaciona o tempo de retenção de várias antocianinas, t'_r , com o tempo de retenção da cianidina-3-glicosídeo, $t'_{r(cy-3-glu)}$, que está presente em praticamente todas as frutas vermelhas. Assim, a identificação das antocianinas seria facilitada.

$$\alpha = t'_r / t'_{r(cy-3-glu)}$$

Equação 1

onde: $t'_r = t_r - t_0$

t_r = tempo de retenção do produto

t_0 = tempo de retenção de um produto não retido

Em seu trabalho, Goiffon e outros (1999) determinaram o valor de α para 40 antocianinas e antocianidinas utilizando HPLC-RP, eluição isocrática e dois sistemas eluentes: água:acetonitrila:ácido fórmico (84:6:10 v/v/v) e água:acetonitrila:ácido fórmico (81:9:10 v/v/v).

No presente trabalho, optou-se pelo uso do eluente água:acetonitrila:ácido fórmico (81:9:10 v/v/v), que é o mais citado na literatura para separação e identificação de antocianinas em frutas vermelhas, quando se utiliza coluna C18 e eluição isocrática (Lee e Hong 1992). Vale ressaltar que esta fase móvel possui pH muito baixo (1,9) o que resulta na diminuição do tempo de vida útil da coluna.

Os valores de α obtidos a partir dos cromatogramas da **Figura 16**, bem como os valores citados na literatura estão descritos na **Tabela 15**.

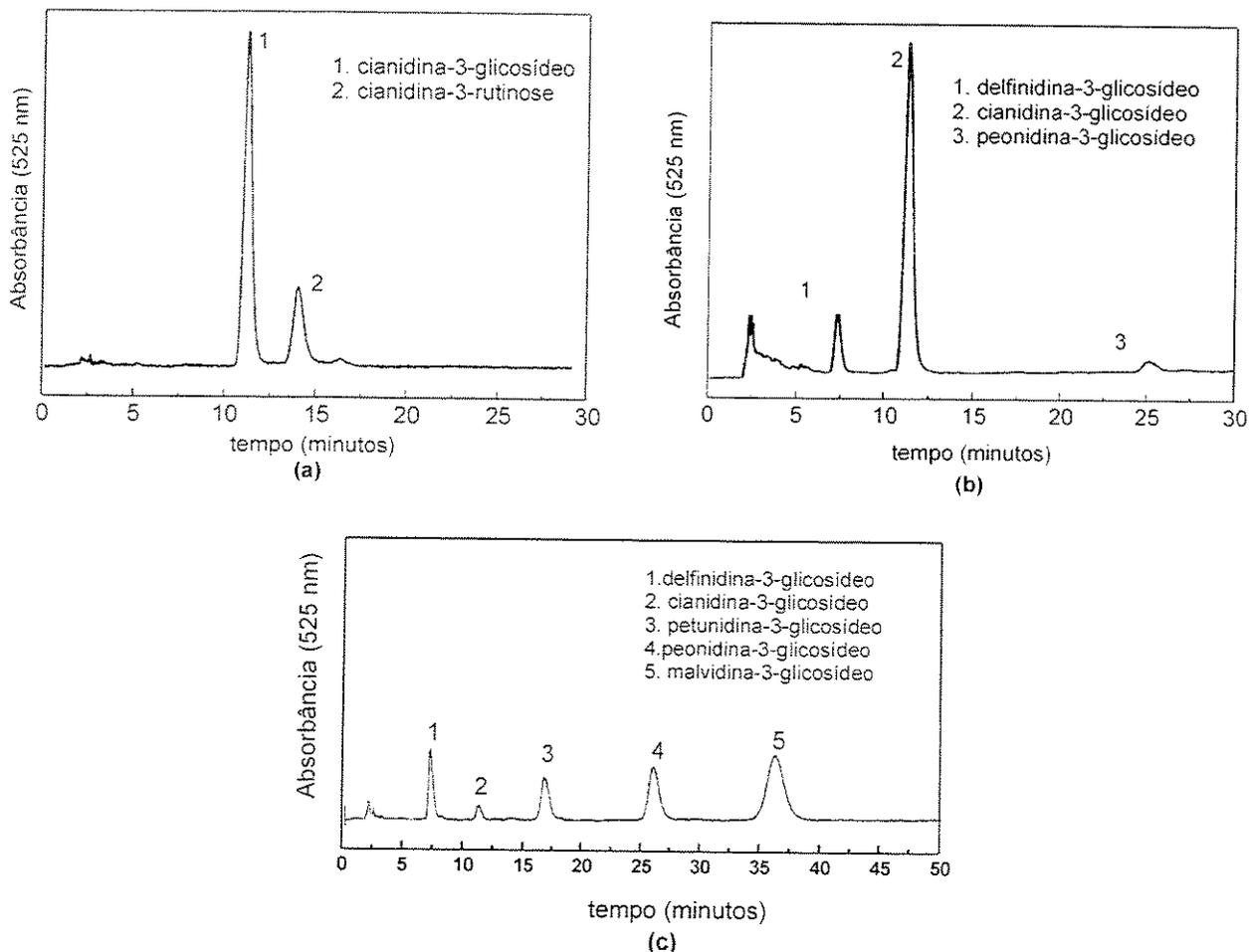


Figura 16. Cromatograma dos extratos de (a) amora, (b) jabuticaba e (c) uva.

Comparando-se os valores de α citados na literatura com os obtidos experimentalmente, as antocianinas presentes nos extratos de amora, jabuticaba e uva foram identificadas.

Tabela 15. Valores de α obtidos a partir dos cromatogramas das frutas e os citados na literatura.

Fruta	Pico	Tempo de retenção (min)	α^*	α^{**}	Antocianina
amora	1	11,38	1,00	1,00	cianidina-3-glicosídeo
	2	14,26	1,31	1,29	cianidina-3-rutinoze
jabuticaba	1	7,27	0,56	0,58	delfinidina-3-glicosídeo
	2	11,21	1,00	1,00	cianidina-3-glicosídeo
	3	25,12	2,56	2,56	peonidina-3-glicosídeo
uva	1	7,25	0,57	0,58	delfinidina-3-glicosídeo
	2	11,23	1,00	1,00	cianidina-3-glicosídeo
	3	16,88	1,61	1,51	petunidina-3-glicosídeo
	4	26,13	2,61	2,56	peonidina-3-glicosídeo
	5	36,4	3,70	3,61	malvidina-3-glicosídeo

* Valores de α obtidos experimentalmente.

** Valores de α citados na literatura.

A identificação das antocianinas do extrato de jambolão não pode ser realizada diretamente pelo método proposto por Goiffon e outros (1999), uma vez que a presença da cianidina-3-glicosídeo (tempo de retenção aproximadamente em 11 min) não foi detectada neste extrato **Figura 17a**. Assim, para a aplicação desse método foi necessária a dopagem do extrato de jambolão com extrato de uva que contém a cianidina-3-glicosídeo. Pela comparação conjunta dos cromatogramas dos extratos de uva (**Figura 16c**), de jambolão (**Figura 17a**) e da mistura destes (**Figura 17b**) foi possível separar e identificar os picos referentes a cada fruta e as respectivas antocianinas.

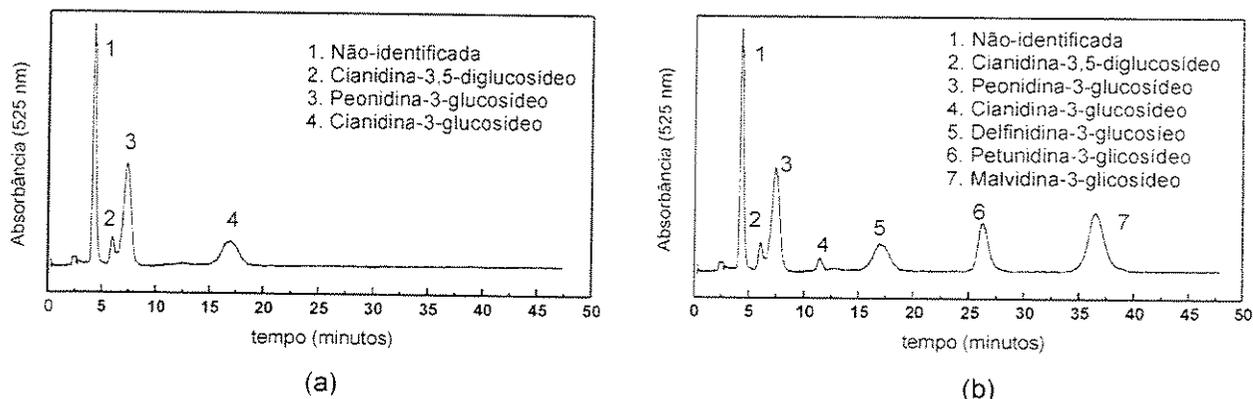


Figura 17. Cromatogramas: (a) extrato de jambolão e (b) mistura de extrato de jambolão com uva.

Os valores de α obtidos para os extratos de jambolão, tendo como referência a cianidina-3-glicosídeo presente na uva, bem como a identificação das antocianinas, estão descritos na **Tabela 16**.

Tabela 16. Valores de α do cromatograma do jambolão (**Figura 17**) e os citados na literatura (Goiffon *et al.* 1999).

Pico	Tempo de retenção (min)	α^*	α^{**}	Antocianina identificada
1	4,10	0,21	----	não identificada
2	5,88	0,40	0,40	cianidina-3,5-diglicosídeo
3	7,97	0,56	0,58	peonidina-3-glicosídeo
4	17,02	1,60	1,51	delfinidina-3-glicosídeo

* Valores de α obtidos experimentalmente. ** Valores de α citados na literatura.

A identificação das antocianinas pelo procedimento comparativo proposto por Goiffon certamente está sujeita a erros. Porém, a não disponibilidade de padrões justifica a utilização deste método.

6.3.3. Identificação dos grupos propostos por Cabrita e colaboradores (2000)

Os trabalhos do grupo de Cabrita (2000), indicam que as antocianinas podem ser divididas em dois grandes grupos, de acordo com a curva obtida pelo comprimento de onda de máxima absorção de cada antocianina em função do pH conforme a **Figura 18**.

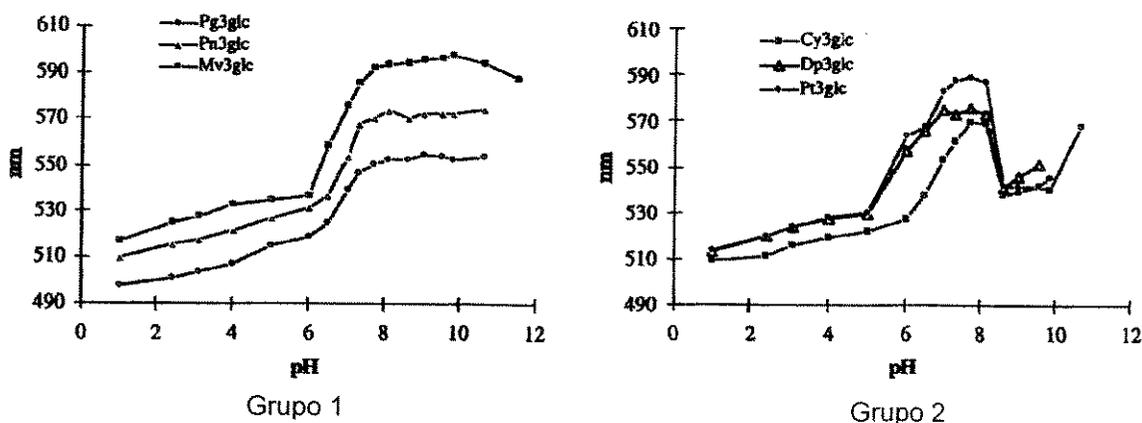


Figura 18. Curvas obtidas por Cabrita e outros (2000). Absorção na região do visível, no λ_{\max} em diferentes valores de pH para 6 antocianinas comuns em frutas: Pg3glc = perlargonidina-3-glicosídeo, Pn3glu = peonidina-3-glicosídeo, Mv3glu = malvidina-3-glicosídeo, Cy3glu = cianidina-3-glicosídeo, Dp3glc = delfinidina-3-glicosídeo e Pt3glc = petunidina-3-glicosídeo.

O *Grupo 1* é caracterizado por curvas paralelas apresentando um gradual efeito batocrômico até pH 6. Entre pH 6,0 e 7,6, o efeito batocrômico aumenta significativamente, mas a coloração azulada não apresenta grandes variações acima de pH 8,0. Algumas antocianinas pertencentes a este grupo são: pelargonidina-3-glicosídeo, peonidina-3-glicosídeo e malvidina-3-glicosídeo. O *Grupo 2* apresenta uma curva similar à do *Grupo 1* entre pH 1,0 e 8,1. Contudo, as antocianinas deste grupo apresentam um significativo efeito hipsocrômico entre pH 8,1 a 8,6. São deste grupo as antocianinas: cianidina-3-glicosídeo, delphinidina-3-glicosídeo e petunidina-3-glicosídeo.

Essas curvas características de cada grupo podem ser explicadas pelos substituintes nas posições 3' e 5' na estrutura fundamental das antocianinas. O número de substituintes hidroxil no anel B da *Figura 1* (página 9) causa um efeito hipsocrômico em valores de pH relativamente baixos, bem como para valores de pH alto (Harborne 1994, Torskangerpoll *et al.* 1998).

Como ilustrado na *Figura 19*, os extratos brutos aquosos de amora, jabuticaba e jambolão apresentaram curvas semelhantes às do *Grupo 2*, enquanto que o extrato bruto de uva apresenta características semelhantes ao *Grupo 1*. Esta classificação pode ser explicada em função do grupo de antocianinas predominantes em cada extrato.

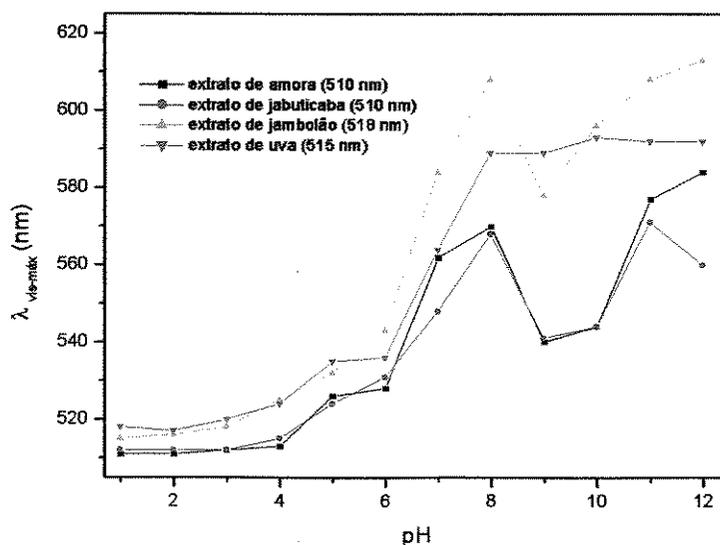


Figura 19. Variação de λ_{\max} com o pH (dissolução em soluções tampão) para os extratos brutos aquosos de amora, jabuticaba, jambolão e uva.

A *Tabela 17* apresenta os valores de área de cada antocianina descrita nos cromatogramas (*Figuras 16 e 17*) obtidos para cada extrato individualmente, bem como

o valor de área relativa de cada grupo de acordo como a divisão proposta pelo grupo de Cabrita (2000).

Tabela 17. Composição dos extratos de frutas em função do tipo e área das antocianinas.

Extrato	Antocianina	Área total do pico*	Área relativa (Grupo 1: Grupo 2)
amora	cianidina-3-glicosídeo	1048024	0:100
	cianidina-3-rutiose	313393	
jabuticaba	cianidina-3-glicosídeo	1665288	4:96
	delfinidina-3-glicosídeo	220600	
	peonidina-3-glicosídeo	77444	
jambolão	não-identificada	893745	40:60 ***
	cianidina-3,5-diglicosídeo	107291	
	peonidina-3-glicosídeo	853754	
	delfinidina-3-glicosídeo	263525	
	delfinidina-3-glicosídeo	261010	
uva	cianidina-3-glicosídeo	65874	69:31
	petunidina-3-glicosídeo	298554	
	peonidina-3-glicosídeo	491613	
	malvidina-3-glicosídeo	853375	

* Unidade arbitrária

** Área relativa foi calculada como sendo a razão da soma das áreas de todos os picos do cromatograma pela soma das áreas referentes ao grupo 1 ou grupo 2, de acordo com Cabrita. Matematicamente, tem-se que: $A_{relativa} = A_{grupo} / A_{total}$, onde A_{total} = soma das áreas de todos os picos do cromatograma e A_{grupo} = área dos picos dos cromatogramas das antocianinas classificadas no grupo 1 ou grupo 2.

*** Considerando-se que a antocianina não identificada pertença ao grupo 2.

Os dados da **Tabela 17** indicam que nos extratos de amora, jabuticaba e jambolão predominam as antocianinas do *Grupo 2*, enquanto que no extrato de uva predominam as antocianinas do *Grupo 1*, o que é concordante com a literatura. Para os outros extratos não há informação disponível (Fernández-López *et al.* 1998, Cabrita *et al.* 2000).

6.4. Quantificação das antocianinas totais nas frutas

A quantificação das antocianinas totais nas frutas foi realizada utilizando-se 3 métodos distintos descritos na literatura: o método de Petri e colaboradores (1997), o método de Sondheimer e Kertsz (1948) e o método de Fuleki e Francis (1968a e 1968b).

Este estudo foi realizado para comparar o desempenho destes métodos, a fim de verificar a repetibilidade e precisão, bem como as limitações e vantagens de cada um,

para facilitar a escolha do método mais adequado para quantificação de antocianinas em frutas ou em extratos antociânicos.

Para a análise quantitativa das antocianinas nos extratos de amora, jabuticaba, jambolão e uva, pelo método de Petri e colaboradores (1997), foi construída uma curva analítica - **Figura 20** - utilizando cloreto de pelargonidina dissolvido em solução tampão com pH 1, em $\lambda_{\max} = 522 \text{ nm}$.

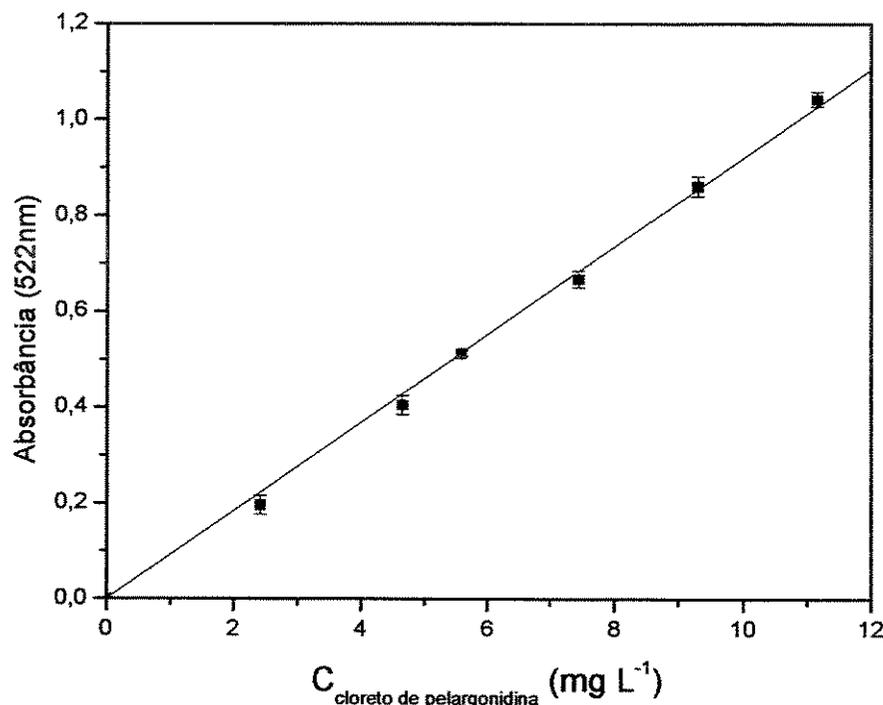


Figura 20. Curva analítica para a determinação quantitativa das antocianinas pelo método de Petri e Kéry, $A_{522\text{nm}} = (1,88 \times 10^{-2}) + (9,41 \times 10^{-2} C_{\text{cloreto de pelargonidina}})$; coeficiente de correlação linear = 0,9993.

O método proposto por Sondheimer e Kertsz (1948) é fundamentado na variação da absorbância em função do pH. A quantificação é feita medindo-se a absorbância dos extratos em λ_{\max} no visível, em pH 2,00 e 3,40. A diferença entre os valores de absorbância é proporcional à concentração das antocianinas em solução em termos da concentração do corante vermelho do congo.

Para a aplicação deste método, inicialmente foram estudados os efeitos do pH e da concentração na intensidade de absorbância dos extratos das frutas em 500 nm.

Os resultados apresentados na **Figura 21** indicam que a concentração das antocianinas e o pH do meio afetam fortemente a intensidade da absorção destes pigmentos na região do visível.

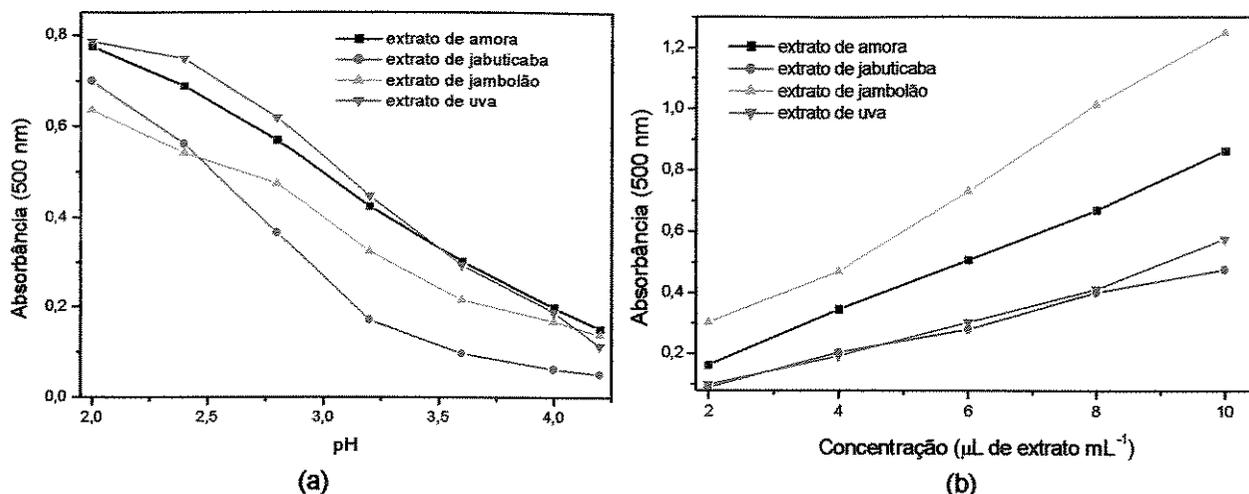


Figura 21. (a) Efeito do pH na absorbância das antocianinas, 30 μ L de extrato mL⁻¹. (b) Efeito da concentração do extrato na absorbância das antocianinas em pH 2,00.

Quando o pH de uma solução contendo antocianinas é reduzido ou quando a concentração das antocianinas em solução é aumentada, a absorção na região do visível aumenta. Sendo a absorbância proporcional à concentração das antocianinas em um determinado pH, pode-se concluir que o aumento de absorção obtido em função do pH também é proporcional à concentração. Isto é um indicativo da possibilidade da aplicação do método de Sondheimer e Kertsz (1948) para a quantificação dos extratos de amora, jabuticaba, jambolão e uva. Assim, para a aplicação deste método, inicialmente foi construída a curva analítica utilizando o corante vermelho do Congo, conforme a **Figura 22**.

O corante vermelho do Congo pode ser convenientemente utilizado como padrão, pois apresenta uma intensa absorção na mesma região do visível que as antocianinas e absorvidade molar semelhante. Entretanto é necessário estabelecer um fator de correção, uma vez que numa mesma concentração de corante, a intensidade da absorção do vermelho do Congo em 500 nm é maior que a intensidade de absorção das antocianinas. Para a determinação do fator de correção, preparou-se uma solução de cloreto de pelargonidina de concentração igual a 10,00 mg L⁻¹. A concentração desta solução foi determinada pelo método de Sondheimer e Kertsz (1948), usando a

equação da curva analítica da **Figura 22**. Os valores obtidos estão descritos na **Tabela 18**.

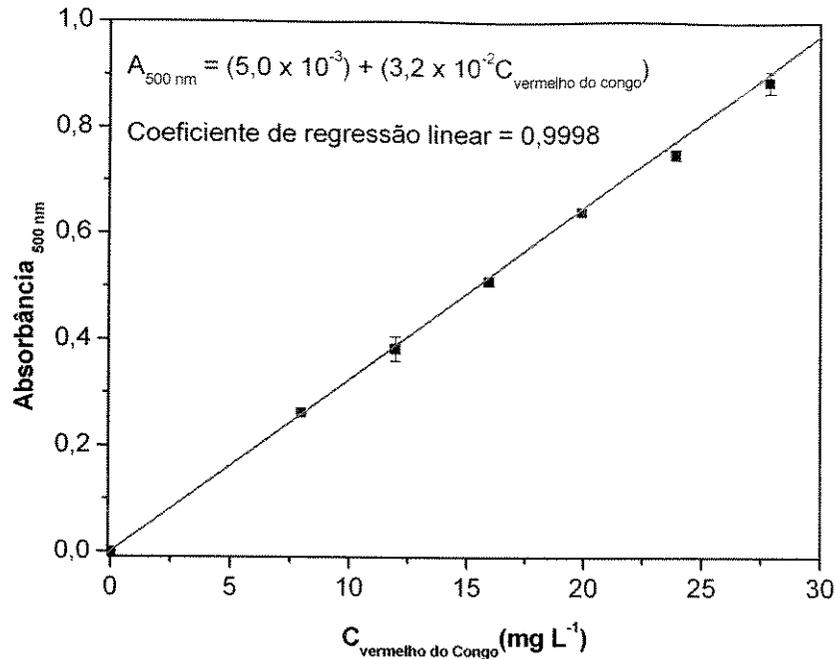


Figura 22. Curva analítica utilizando o corante vermelho do Congo. $A_{500\text{nm}} = (5 \times 10^{-3}) + (3,2 \times 10^{-2} C_{\text{vermelho do Congo}})$; coeficiente de correlação linear = 0,9996.

Tabela 18. Determinação da concentração da solução padrão de cloreto de pelargonidina usando a equação da curva analítica obtida com soluções padrão de vermelho do Congo.

Solução	$A_{\text{pH } 2,00}$	$A_{\text{pH } 3,40}$	ΔA_{pH}	Conc. da solução de cloreto de pelargonidina (mg L^{-1} de vermelho do Congo)
1	0,727	0,384	0,343	10,67
2	0,734	0,398	0,336	10,45
3	0,730	0,392	0,338	10,52
Concentração média: $10,54 \pm 0,09 \text{ mg L}^{-1}$				

O valor médio da concentração da solução de cloreto de pelargonidina testada pode ser expresso como $10,54 \text{ mg L}^{-1}$ de vermelho do Congo. Sabendo-se que a concentração das soluções de cloreto de pelargonidina preparada era $10,00 \text{ mg L}^{-1}$, tem-se que o fator de correção (FC), obtido com a **Equação 2**, foi igual a 0,95.

$$FC = \frac{C_{\text{solução de cloreto de pelargonidina}} (\text{mg L}^{-1})}{C_{\text{solução de vermelho do congo}} (\text{mg L}^{-1})}$$

Equação 2

O método proposto por Fuleki e Francis (1968a e 1968b) conhecido por método do pH diferencial, também é fundamentado nas transformações estruturais reversíveis que as antocianinas sofrem com a mudança do pH, resultando em diferentes espectros de absorção. O cátion flavílico, de coloração vermelha, é a forma predominante em pH 1,0; em pH 4,5, predomina o carbinol que é incolor (Harborne *et al.* 1975).

O método do pH diferencial é fundamentado nas transformações que resultam nessas diferentes estruturas coloridas, sendo que a diferença de absorbância é proporcional à concentração das antocianinas, sendo a determinação fundamentada na Lei de Beer.

As frutas contêm uma mistura de antocianinas e cada pigmento pode ter absorvidade molar significativamente diferente, assim os resultados podem variar dependendo da antocianina utilizada como padrão. A cianidina-3-glicosídeo é a antocianina predominante na amora e na jabuticaba. No caso da uva, há uma distribuição relativamente equivalente dos cinco tipos de antocianinas, incluindo a cianidina-3-glicosídeo; porém no jambolão não foi detectada a presença desta antocianina.

O método do pH diferencial utiliza como padrão a cianidina-3-glicosídeo. Isto se deve a fatores históricos e à ocorrência desta antocianina em praticamente todas as frutas vermelhas. Considerando-se as diluições e dissoluções necessárias, o cálculo para a determinação da concentração das antocianinas em mg de antocianinas/100g de fruta, envolve o uso da **Equação 3** cuja dedução é apresentada no **Anexo 1**.

$$C_{(mg/100g)} = \frac{238,6 \times A \times m_e}{m_p \times m_c} \quad \text{Equação 3}$$

onde: $A = (A_{pH\ 1,0\ (510\ nm)} - A_{pH\ 1,0\ (700\ nm)}) - (A_{pH\ 4,5\ (510\ nm)} - A_{pH\ 4,5\ (700\ nm)})$
 m_e = massa em g do extrato resultante do procedimento de extração
 m_p = massa em g do extrato utilizada no preparo da solução
 m_c = massa em g da casca utilizada no procedimento de extração

Para a aplicação deste método, as amostras não podem conter material particulado em suspensão. Entretanto, alguns extratos de frutas podem apresentar suspensões coloidais, causando espalhamento da luz. Isto pode ser corrigido pela leitura em um comprimento de onda onde não há nenhuma absorção referente às amostras. Por isso utiliza-se a diferença de absorbância: $A_{\lambda\ vis.\ máx.} - A_{700nm}$.

Os resultados médios obtidos na determinação quantitativa das antocianinas presentes nas frutas pelos métodos estudados são apresentados na **Tabela 19**.

Tabela 19. Resultados médios obtidos na determinação quantitativa das antocianinas presentes nas frutas pelos métodos de Petri e colaboradores, Sondheimer e Kertsz e Fuleki e Francis.

Método	Concentração média na casca e/ou fruta (mg/g)			
	amora	jabuticaba	jambolão	uva
Petri e colaboradores	261 ± 2	315 ± 3	378 ± 4	235 ± 4
Sondheimer e Kertsz	292 ± 2	310 ± 4	381 ± 3	236 ± 5
Fuleki e Francis	291 ± 3	314 ± 8	386 ± 6	227 ± 6

Para a análise estatística dos resultados obtidos pelos métodos testados, foram empregados o teste F e o teste t de Student.

O teste F é utilizado para comparar dois conjuntos de dados em termos das estimativas de desvios padrão, tendo em vista indicar se a precisão dos métodos é semelhante. Quando o valor de F for menor que o tabelado, significa que a precisão dos métodos difere apenas em função dos erros aleatórios. Quando este valor for maior que o tabelado significa que o método que apresenta menor valor de desvio padrão relativo é também o mais preciso (Caulcutt e Boddy 1983). O valor de F é dado pela **Equação 5**.

$$F = \frac{S_A^2}{S_B^2} \quad \text{Equação 5}$$

onde: S_A = desvio padrão de A
 S_B = desvio padrão de B

A **Tabela 20** apresenta os valores de F resultantes da comparação entre os métodos testados.

Tabela 20. Comparação dos resultados dos métodos testados usando o teste F.

Valor calculado de F.			
O valor de F tabelado é 6,39 para $v^{***} = 4$ e $\alpha = 0,05$.			
Fruta	P e S	P e F	F e S
amora	0	2,25	2,25
jabuticaba	1,78	7,11	4,00
jambolão	1,78	2,25	4,00
uva	1,56	2,25	1,44

P = Método de Petri e colaboradores S = Método de Sondheimer e Kertsz F = Fuleki e Francis
 $***v$ é o grau de liberdade (n - 1), onde n é igual a 5 determinações.

Pelos valores do teste F apresentados na **Tabela 20** pode ser observado que para a quantificação das antocianinas totais nos extratos todos os métodos estudados apresentaram a mesma precisão, com exceção para o extrato de jabuticaba. Neste caso, a comparação do método do pH diferencial com o método de Petri indicou resultados com precisão estatisticamente diferentes com grau de confiança de 95 %.

Após a aplicação do teste F, utilizou-se o teste t de Student para determinar se 2 conjuntos de medidas, obtidas por métodos diferentes, são estatisticamente diferentes. Quando o valor de t calculado for superior ao valor de t tabelado, então há uma diferença significativa entre os resultados obtidos pelos métodos comparados, num dado nível de confiança ou significância. Assim, este teste é utilizado para verificar a concordância entre métodos analíticos (Caulcutt e Boddy 1983).

Na comparação dos resultados de dois diferentes métodos, para um mesmo número de determinações realizadas, o valor de t é obtido pela **Equação 4**.

$$t = \frac{X_A - X_B}{\sqrt{\frac{S_A^2 + S_B^2}{n-1}}} \quad \text{Equação 4}$$

onde: X_A = média aritmética de A
 S_A = desvio padrão de A
 n = número de determinações

X_B = média aritmética de B
 S_B = desvio padrão de B

Os valores de t calculados estão descritos na **Tabela 21**.

Tabela 21. Comparação dos resultados dos métodos testados usando o teste t.

Fruta	Valor calculado de t		
	P e S	P e F	S e F
amora	21,920	16,641	0,554
jabuticaba	2,000	0,234	0,894
jambolão	1,200	2,218	1,491
uva	0,312	2,219	2,305

P = Método de Petri e Kéry

S = Método de Sondheimer e Kertz

F = Fuleki e Francis

**v é o grau de liberdade (n - 1), onde n é igual a 5 determinações.

O valor de t calculado para o extrato de amora pelo método de Petri e colaboradores, quando comparado com o método de Sondheimer e Kertz e de Fuleki e

Francis foi significativamente maior que o valor de tabelado. Como, a probabilidade da diferença dos resultados serem causadas apenas por erros aleatórios é menor que 0,05%, então esta diferença não pode ser explicada considerando-se apenas estes erros. Estas comparações permitem afirmar que os resultados do método de Petri e colaboradores comparados aos demais métodos testados foram estatisticamente diferentes com grau de confiança de 95 %, mas não foi possível concluir qual deles é o mais exato. Para isto seria necessário conhecer a concentração real das antocianinas totais em cada extrato, que não é um dado disponível.

6.5. Purificação dos extratos antociânicos brutos

O procedimento mais usado para purificar antocianinas por SPE (do inglês *Solid Phase Extraction*) envolve a aplicação do extrato bruto de antocianinas na coluna (cartucho), contendo um material sorvente, seguindo-se da eluição dos pigmentos com solventes apropriados. Primeiramente são eluídos os componentes com polaridade maior que as antocianinas, tais como, açúcares, ácidos orgânicos e substâncias solúveis em água usando ácido clorídrico diluído ou água deionizada como eluente. Posteriormente, as antocianinas, menos polares, são eluídas utilizando-se uma mistura de metanol/HCl ou água/metanol/HCl como eluente (Ordaz-Galindo *et al.* 1999).

Para a purificação dos extratos brutos aquosos de amora, jaboticaba, jambolão e uva, os extratos foram transferidos para um cartucho C₁₈, cujo sorvente é o octadecil, uma fase apolar, cujo mecanismo de interação principal é fundamentado em forças de Van der Waals. Este cartucho foi escolhido de acordo com indicações da literatura (Costa *et al.* 2000; Kraemer-Schafthalter *et al.* 1998).

Inicialmente, os cartuchos foram condicionados com metanol e água; depois os extratos brutos foram percolados nos cartuchos. As antocianinas ficaram retidas no sorvente, evidenciado pelo aparecimento de um anel de coloração rosa na fase sorvente. Os ácidos orgânicos e açúcares foram eluídos com solução aquosa de HCl 0,01% (v/v). Em seguida as antocianinas foram eluídas com uma solução de HCl 0,01 % (v/v) em metanol. Para a avaliação deste procedimento de purificação, as frações

coletadas em cada uma das etapas (percolação, lavagem e eluição) foram analisadas por diferentes técnicas. Nas frações iniciais, referentes às etapas da percolação da amostra e da lavagem do cartucho, esperava-se a presença de ácidos orgânicos e açúcares, enquanto que nas frações referentes à etapa de eluição apenas a presença das antocianinas era esperada.

Detecção de ácidos orgânicos

A detecção de ácidos orgânicos nas frações foi realizada por CP, de acordo com o método proposto pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL 1990)* e por HPLC, pela adaptação de alguns métodos descritos na literatura às condições laboratoriais disponíveis (Shui e Leong 2002, Chen *et al.* 2001). Para a adaptação de alguns métodos de HPLC descritos na literatura, inicialmente foram feitos testes para a escolha da FM e tipo de eluição usando ácidos padrões. Os cromatogramas obtidos estão apresentados na **Figura 23**.

Os cromatogramas da **Figura 23a e 23b** indicaram que o uso de um solvente orgânico (metanol) comprometeu a resolução dos picos. Isto pode ser devido ao coeficiente de partição e ao comportamento competitivo entre o metanol e os ácidos orgânicos pelos sítios ativos da fase estacionária. Os cromatogramas obtidos com a utilização de solução de H₂SO₄ a pH 2,5 como fase móvel apresentaram melhor resolução quando comparados com os obtidos com metanol/solução de H₂SO₄ a pH 2,5. Entretanto, devido à sobreposição e alargamento dos picos, não foi observada a separação adequada - **Figura 23c**. Para minimizar estas inadequações, foram feitos testes utilizando-se eluição por gradiente. Os cromatogramas obtidos com eluição por gradiente com a adição de metanol após 6 min. de corrida apresentaram a melhor resolução, como pode ser notado pela **Figura 23d**. Em função dos resultados obtidos, optou-se pelo uso do sistema de eluição por gradiente, devido à boa separação dos ácidos orgânicos padrões num tempo de análise razoável, em torno de 10 min.

* BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria nº 76 de 26 de novembro de 1986. Dispõe sobre os métodos analíticos de bebidas e vinagre. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 28 nov. 1986. Seção 1, pt. 2.

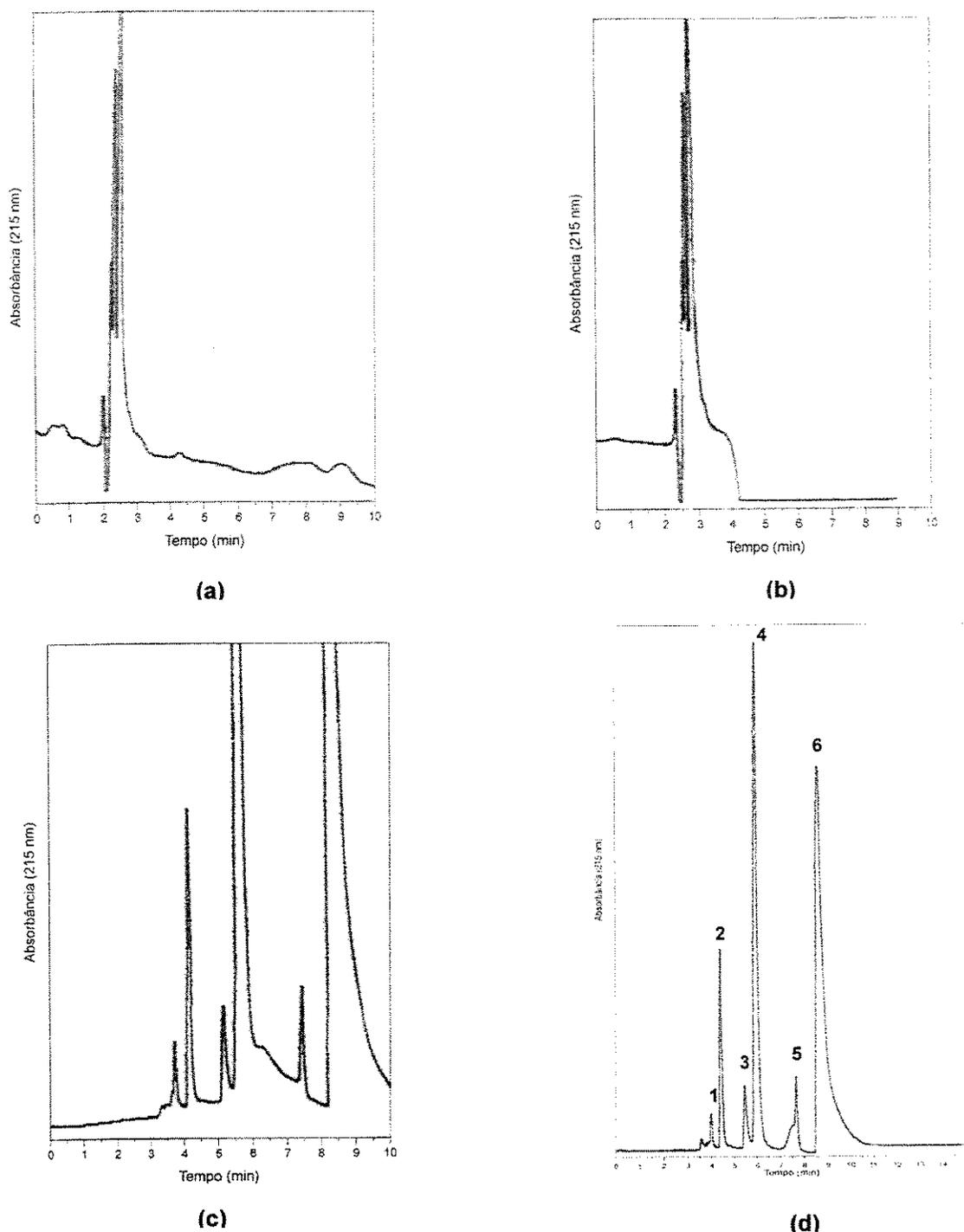


Figura 23. Cromatogramas da mistura padrão de ácidos orgânicos. **(a)** Eluição isocrática com metanol: solução de H₂SO₄ pH 2,5 (60:40) e vazão 0,8 mL/min. **(b)** Eluição isocrática com metanol: solução de H₂SO₄ pH 2,5 (10:90) e vazão 0,8 mL/min. **(c)** Eluição isocrática com solução de H₂SO₄ pH 2,5 e vazão 1,0 mL/min. **(d)** Eluição por gradiente com solução de H₂SO₄ pH 2,5 até 6 min. e após metanol: Solução de H₂SO₄ pH 2,5 (10:90). Identificação dos padrões: 1. ácido tartárico 2. ácido málico, 3. ácido ascórbico 4. ácido cítrico 5. ácido fumárico 6. ácido succínico.

Pelos cromatogramas das frações, sem diluição, referentes a purificação das antocianinas retidas no sorvente - **Figura 24** - pode ser observada uma diminuição da intensidade de absorbância, indicando a eliminação dos ácidos orgânicos presentes no extrato de uva. O mesmo perfil cromatográfico foi observado para os extratos de amora, jabuticaba e jambolão, isto é, a diminuição da intensidade de absorção em função da seqüência crescente das etapas de purificação.

Nos cromatogramas das frações das antocianinas purificadas (frações f), dos diferentes extratos contendo antocianinas - **Figura 25** - observou-se absorção na mesma região dos ácidos orgânicos, entretanto o perfil cromatográfico das frações purificadas foi significativamente diferente do perfil das frações referentes à percolação dos extratos e lavagem do cartucho. Estas absorções podem advir do caráter fenólico das antocianinas, que absorvem no ultravioleta.

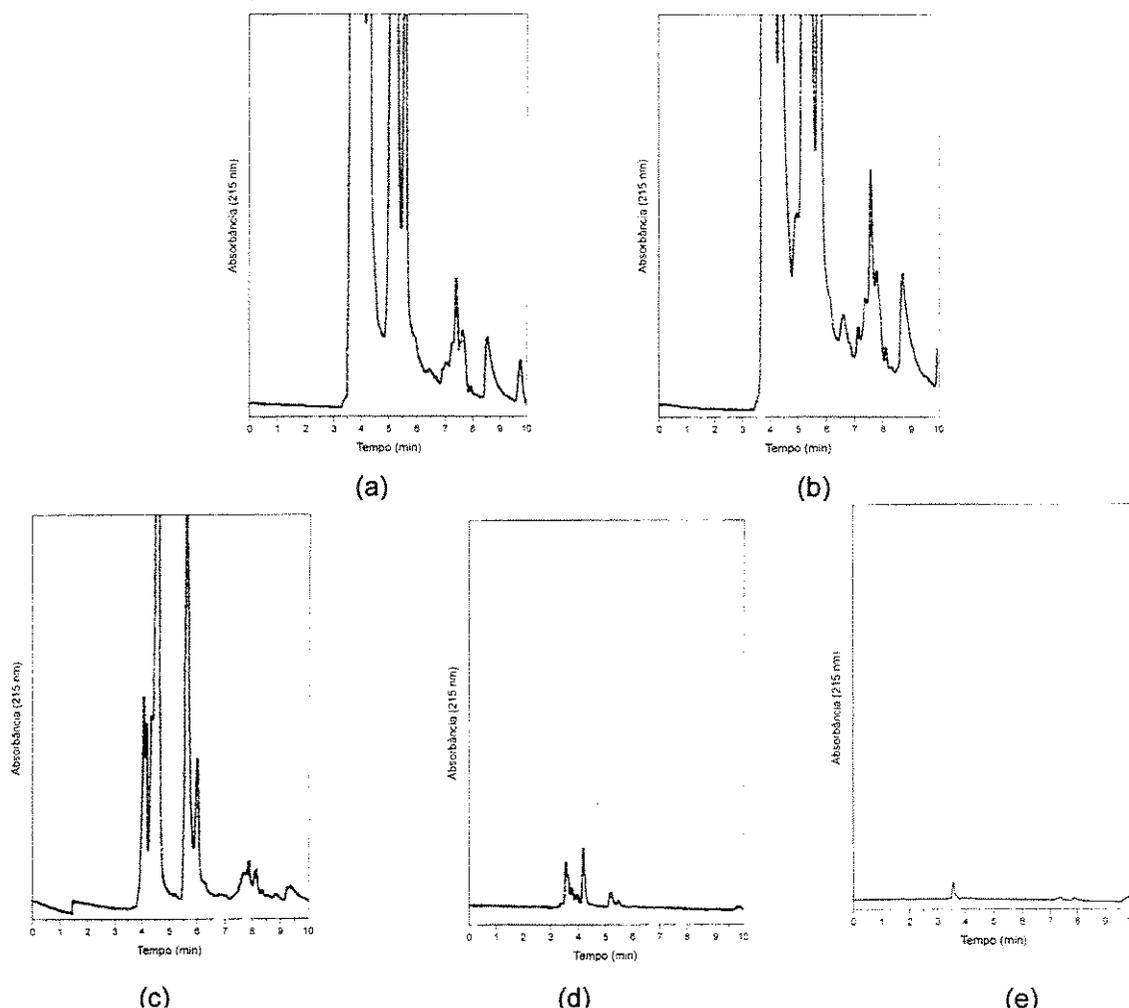


Figura 24. Cromatogramas das frações referentes à purificação do extrato de uva. (a) e (b) frações referentes à percolação da amostra. (c) a (e) frações referentes à lavagem do cartucho.

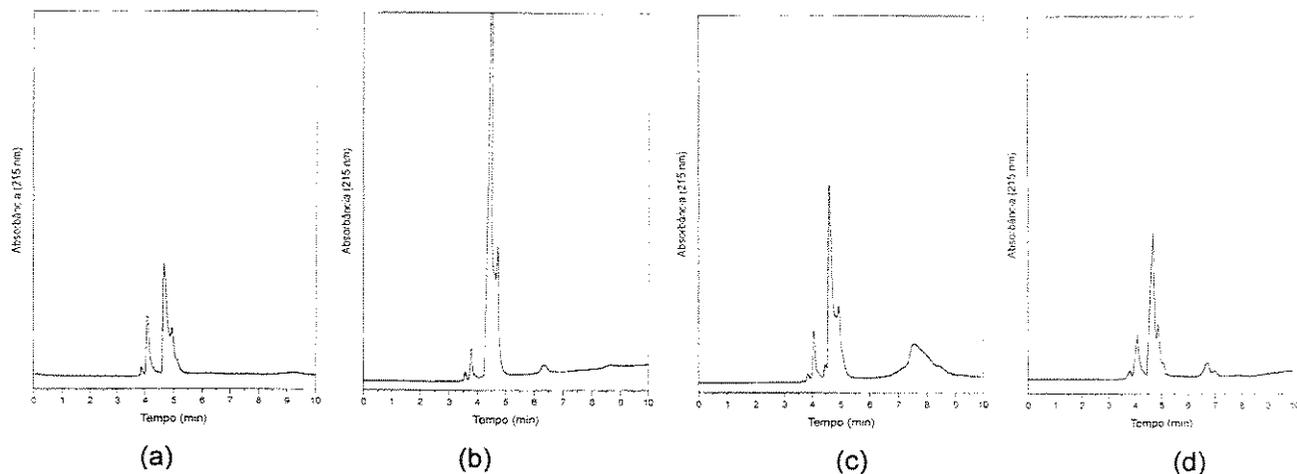


Figura 25. Cromatogramas das frações referentes à eluição das antocianinas dos extratos aquosos de: (a) amorá (b) jaboticaba, (c) jambolão e (d) uva.

O método de separação desenvolvido por HPLC dos principais ácidos orgânicos encontrados em frutas mostrou-se adequado nos estudos pela utilização de padrões. Entretanto, os resultados obtidos referentes à injeção das frações coletadas dos extratos de frutas não foram satisfatórios, pois os cromatogramas obtidos apresentaram baixa resolução. Isto pode ser justificado pela interferência de compostos fenólicos presentes nestas frações. Assim, para identificação dos ácidos orgânicos presentes nestas frações, um método de preparo de amostra, visando a eliminação de compostos fenólicos interferentes, deve ser estudado. Porém, para os objetivos deste trabalho, a identificação dos ácidos não é requerida, portanto este estudo não foi estendido.

Para confirmar os resultados obtidos pelo método por HPLC desenvolvido, verificou-se a presença dos ácidos nas frações utilizando-se cromatografia de papel. A **Tabela 22** apresenta os resultados obtidos pela técnica de cromatografia em papel, sendo que (+) significa que a presença de ácidos orgânicos foi detectada, enquanto que (-) significa que a presença não foi detectada.

Tabela 22. Resultados obtidos na determinação de ácidos orgânicos nas frações utilizando cromatografia em papel.

Fração	Extratos aquosos			
	amorá	jaboticaba	jambolão	uva
a	+	+	+	+
b	+	+	+	+
c	+	+	+	+
d	-	+	-	+
e	-	-	-	-
f	-	-	-	-

Detecção de açúcares

Os métodos para a detecção de açúcares nas frações coletadas foram fundamentados na adaptação do clássico método espectrofotométrico de determinação de açúcares proposto por Dubois e colaboradores (1956), além de HPLC por troca catiônica, utilizada como método comparativo.

Com relação ao método de Dubois e colaboradores, a literatura relata que o limite de quantificação para a determinação de açúcares pelas medidas espectrofotométricas é de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Entretanto, como o monitoramento das frações deve ser o mais simples e rápido possível, optou-se pelo desenvolvimento de um método de determinação visual, já que a solução de fenol e ácido sulfúrico torna-se amarela na presença de açúcares. A **Figura 26** apresenta a escala colorimétrica obtida, indicando a possibilidade de detectar visualmente a presença de açúcares em concentrações acima de $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$.

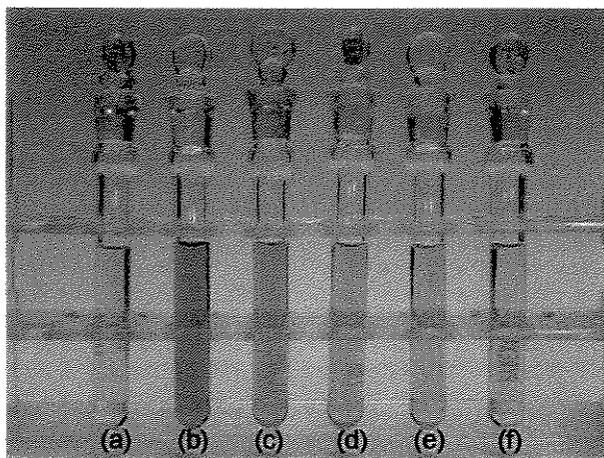


Figura 26. Escala colorimétrica para a detecção de açúcares. Concentração da mistura de açúcares em $\mu\text{g L}^{-1}$: (a) 0,0; (b) 150,0; (c) 37,5; (d) 18,7; (e) 10,0 e (f) 2,5.

O método colorimétrico desenvolvido foi empregado para a determinação de açúcares nas frações obtidas. A **Tabela 23** apresenta os resultados obtidos, sendo que (+) significa que a presença de açúcares foi detectada, enquanto que (-) significa que a presença não foi detectada.

Tabela 23. Resultados obtidos na determinação de açúcares nas frações.

Fração	Extratos aquosos			
	amora	jabuticaba	jambolão	uva
A	+	+	+	+
B	+	+	+	+
C	+	+	+	+
D	-	-	-	+
E	-	-	-	-
F	-	-	-	-

Para verificar a validade do método de determinação colorimétrica de açúcares, realizaram-se determinações comparativas por cromatografia líquida de alta eficiência por troca catiônica (HPLC-CE).

Os testes com HPLC-CE foram realizados pelo método usual de determinação de carboidratos em sucos cítricos (Waters Corporation 1992, Dolenc-Sturm *et al.* 1999, Lee e Coates 2000). Este método utiliza uma coluna contendo como fase estacionária uma resina de estireno divinilbenzeno sulfonada com o contra-íon Ca^{2+} e emprega água deionizada como fase móvel. O principal mecanismo de separação é a exclusão estérica, entretanto interações entre o cátion metálico (Ca^{2+}) hidratado com as hidroxilas dos açúcares e efeitos de partição podem influenciar na separação de compostos com massas moleculares similares ou idênticas (Lee e Coates 2000). A **Figura 27** apresenta os cromatogramas de todas as frações coletadas.

A utilização de HPLC-CE para verificar a presença de açúcares nas frações coletadas dos extratos de amora, jabuticaba, jambolão e uva, confirmou os resultados obtidos pelo método colorimétrico. Isto é, não foi detectada a presença de açúcares nas frações purificadas.

É importante ressaltar que o detector de índice de refração é o mais utilizado para a determinação de açúcares em frutas. Apresenta limite de detecção que varia de $4,5 \mu\text{g L}^{-1}$ a $30 \mu\text{g L}^{-1}$, entretanto não responde uniformemente a todos tipos de açúcares. O método colorimétrico desenvolvido detecta a quantidade total de açúcares, com limite de detecção de $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$. O menor limite de detecção do método colorimétrico justifica a detecção de açúcares até nas frações c para os extratos de amora, jabuticaba e jambolão e na fração d para o extrato de uva, enquanto o método cromatográfico detectou apenas até as frações b (extratos de amora, jabuticaba e jambolão) e c para o extrato de uva.

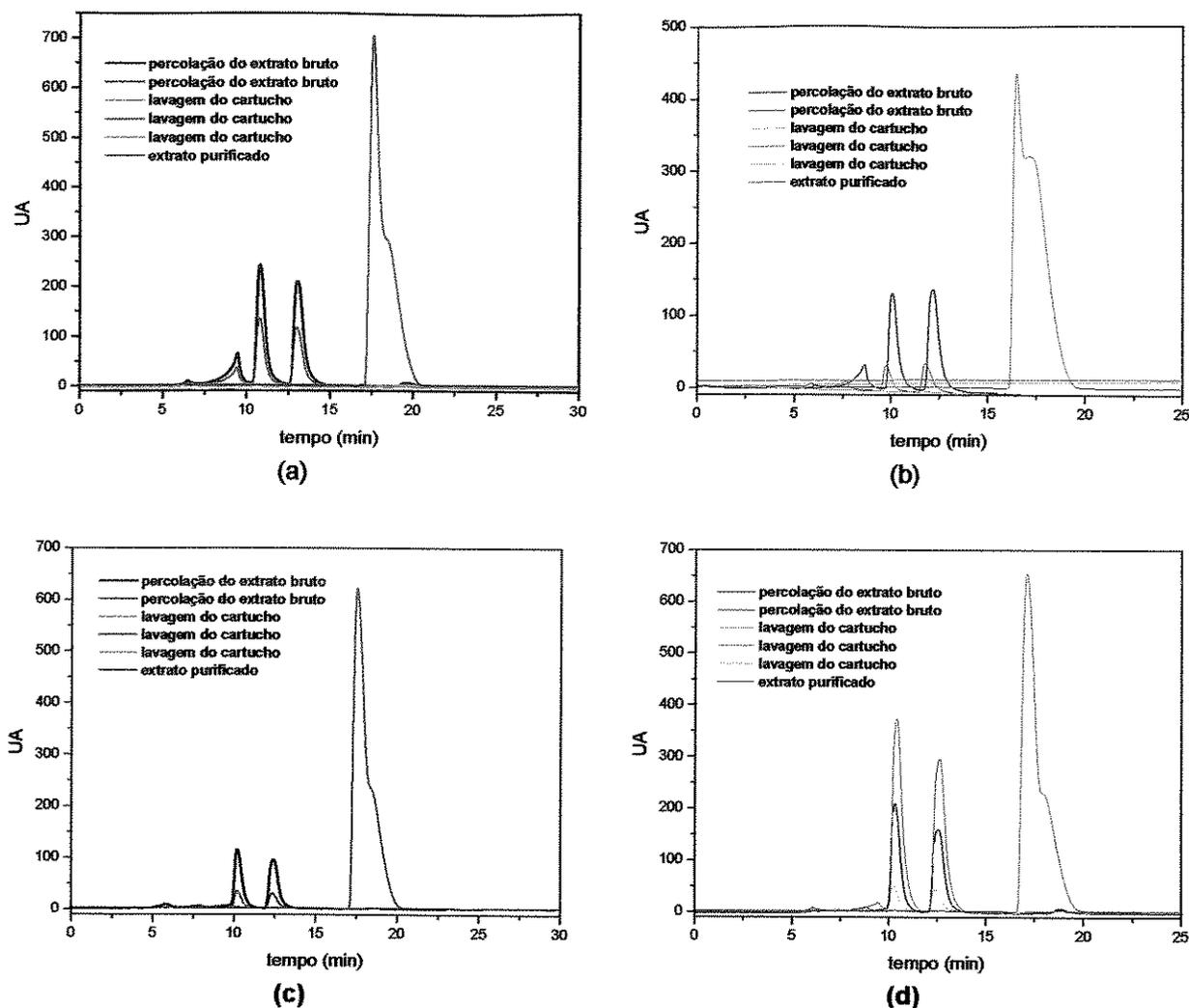


Figura 27. Cromatogramas das frações coletadas no procedimento de purificação dos extratos brutos aquosos de (a) amora, (b) jaboticaba, (c) jambolão e (d) uva.

Os cromatogramas das frações referentes a eluição do cartucho apresentam um pico intenso em aproximadamente 17 min, referente ao metanol, presente somente na fração que contém as antocianinas purificadas. Isto ocorre em função dos diferentes valores de índices de refração da água e do metanol (Atkins 1994).

Os resultados do método colorimétrico para verificar a ausência de açúcares nas frações purificadas foram confirmados por HPLC-TC. Além desta confirmação, as análises cromatográficas permitiram identificar os principais açúcares presentes nos extratos. Os cromatogramas apresentados na **Figura 28** são referentes à primeira

fração coletada na etapa de percolação da amostra, usada para a identificação dos açúcares presentes nos extratos.

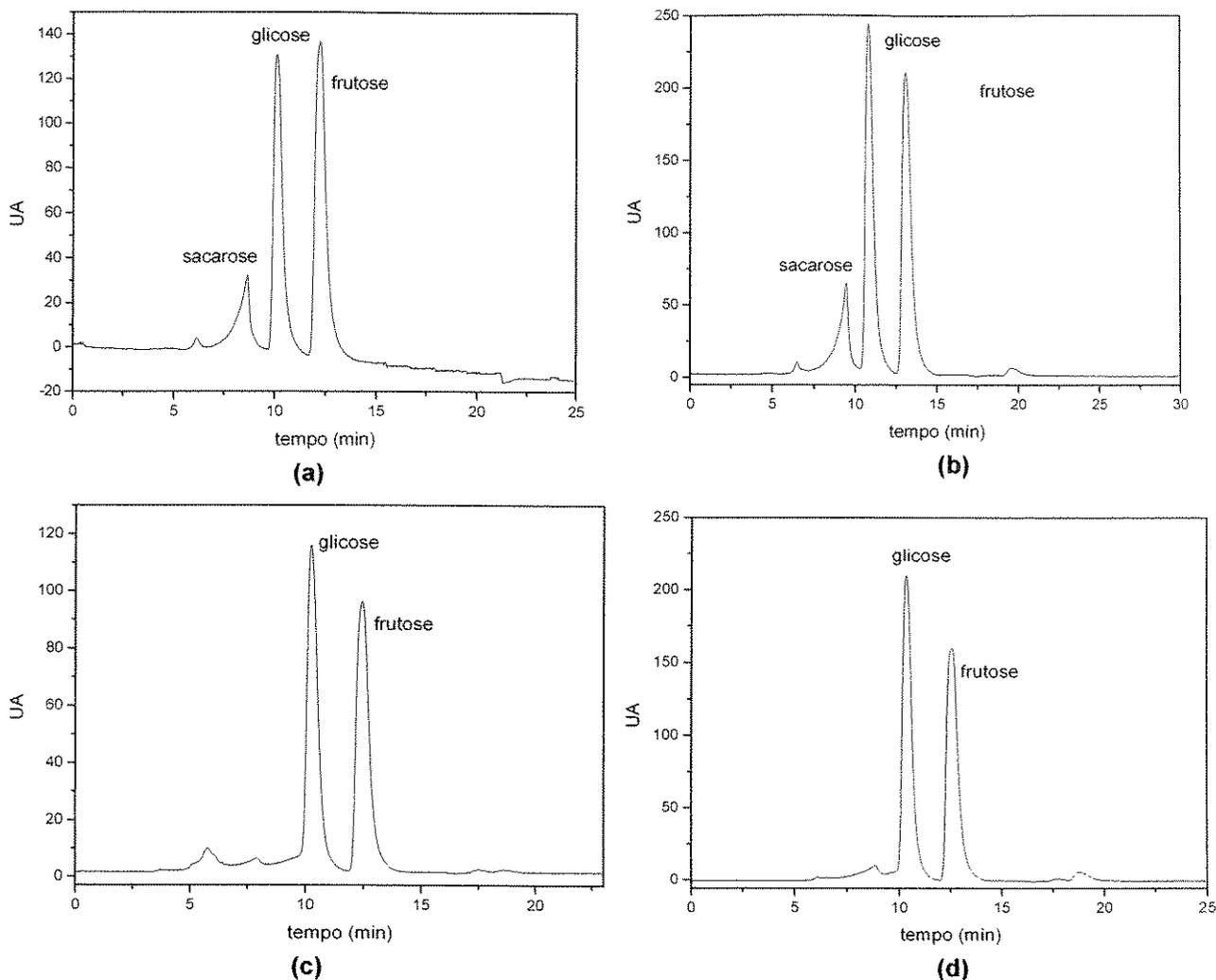


Figura 28. Cromatogramas para a identificação dos principais açúcares presentes nos extratos de (a) amora, (b) jabuticaba, (c) jambolão e (d) uva.

Espectrofotometria UV-Vis

Os espectros referentes às frações coletadas nas etapas de percolação da amostra, lavagem e eluição do cartucho, bem como os espectros do extrato bruto das frutas estão apresentados na **Figura 29**.

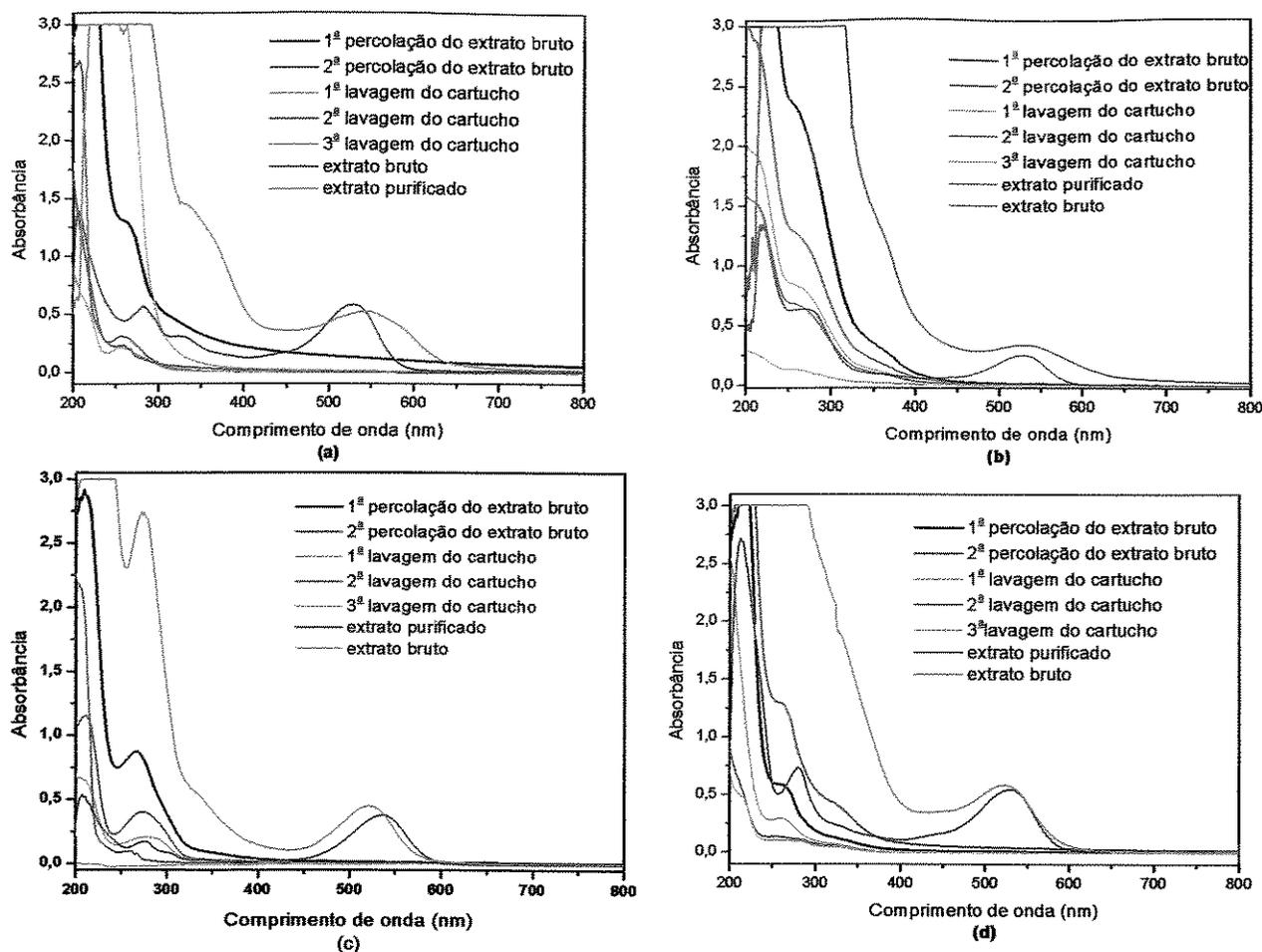


Figura 29. Espectros UV-Vis dos extratos brutos e das frações coletadas no procedimento de purificação. (a) amora, (b) jabuticaba, (c) jambolão e (d) uva.

Os espectros das frações coletadas - **Figura 29** - indicaram a presença de antocianinas somente na fração referente à etapa de eluição, ou seja, da obtenção do extrato purificado. Isto é evidenciado pela absorção na região do visível.

Comparando-se os espectros destas frações com o espectro dos extratos brutos - **Figura 29** - observou-se uma melhor definição nas bandas de absorção na região do ultravioleta (200 nm a 300 nm). Isto indica que outros compostos fenólicos além das antocianinas, presentes nos extratos brutos, que também absorvem nesta região, foram eliminados pelo procedimento de purificação utilizado.

Os testes químicos, bem como as técnicas analíticas utilizadas para a avaliação da eficiência do método de purificação estudado, apresentaram resultados concordantes. Além disso, tendo em vista os resultados obtidos, foi possível concluir

que SPE é um procedimento adequado para a purificação das antocianinas em extratos naturais de frutas.

6.6. Avaliação de alguns parâmetros da extração em fase sólida

6.6.1. Avaliação da recuperação das antocianinas

Para o estudo de recuperação das antocianinas, extratos brutos de concentração conhecida foram percolados pelo cartucho. O eluato foi recolhido em balão volumétrico de 5,0 mL e quantificado pelo método espectrofotométrico, utilizando cloreto de pelargonidina como padrão. Os resultados obtidos estão descritos na **Tabela 24**.

Tabela 24. Avaliação da percentagem de recuperação das antocianinas.

Extrato	Massa de antocianina percolada (mg)	Massa de antocianina recuperada / mg	Recuperação / %
Amora	1,1160	1,0860	97
Jaboticaba	1,0985	1,0879	99
Jambolão	1,5149	1,4527	96
Uva	1,0712	0,9820	92

Pelos resultados apresentados na **Tabela 24** observou-se que a porcentagem de recuperação das antocianinas nos diferentes extratos é superior a 90%. Estes valores são adequados para propósitos analíticos que utilizam SPE para purificação de compostos fenólicos (Suárez *et al.* 1996). Também estão de acordo com dados relatados na literatura para suco de uva (Jaworski e Lee 1987, Oszmiansky e Lee 1990) ou produtos de maçã (Kermasha *et al.* 1995, Suárez *et al.* 1996).

6.6.2. Avaliação da capacidade do cartucho

A capacidade do cartucho é definida como a quantidade de compostos que podem ser retidos sobre a fase sólida (Varian 2001). A capacidade da retenção típica para cartuchos apolares, tal como o utilizado neste trabalho, Bond Elut C18 500 mg, é aproximadamente 1%, porém, ocasionalmente, pode exceder 5% da massa total de sorvente contida no cartucho. Assim, teoricamente, a massa total da espécie de interesse que poderia ficar retida pode variar de 5 mg a 25 mg, além das espécies interferentes. Porém, estimativas porque é necessário considerar que outros

compostos presentes na amostra também podem ficar retidos no sorvente, diminuindo a capacidade efetiva do cartucho.

A **Tabela 25** apresenta as concentrações dos extratos utilizados, bem como o volume máximo teórico que pode ser percolado pelo cartucho considerando-se 1% da massa de sorvente em função da quantidade das antocianinas.

Tabela 25. Dados para a realização dos testes de avaliação da capacidade do cartucho.

Extrato	Concentração / mg L ⁻¹	Volume de extrato* / mL
amora	436 ± 7	11
jabuticaba	124 ± 2	40
jambolão	206 ± 1	24
uva	187 ± 8	26

*Volume máximo que poderia ser percolado pelo cartucho considerando-se 1% da massa de sorvente

Pelos valores das porcentagens de recuperação das antocianinas, descritas na **Tabela 26**, observou-se uma perda significativa da quantidade de antocianina recuperada em função do aumento do volume de extrato percolado. Assim, o volume de percolação adequado, considerando-se uma porcentagem de recuperação acima de 95% é de 3,0 mL; 5,0 mL; 5,0 mL; e 3,0; mL para os extratos de amora, jabuticaba, jambolão e uva respectivamente, nas concentrações indicadas na **Tabela 25**. Estes baixos volumes podem ser justificados pelo fato do procedimento de extração das antocianinas não ser seletivo, produzindo um extrato com grandes quantidades de outros compostos nele presentes, dentre os quais se destacam os ácidos orgânicos, açúcares e outras substâncias fenólicas.

6.7. Estudo de estabilidade dos extratos antociânicos

A estabilidade dos extratos antociânicos foi determinada visualmente, pela observação da presença de fungos e/ou coloração marrom e pela medida de absorbância no comprimento de onda de máxima absorção.

Tabela 26. Quantificação das antocianinas presentes nos extratos purificados.

Extrato	Volume de extrato / mL	Massa de antocianina percolada / mg	Massa de antocianina recuperada nas frações purificadas / mg	Recuperação /%
amora	5	2,1800	1,6710 1,6656 1,6614	76 ± 1
	4	1,7440	1,5870 1,5323 1,6530	91 ± 3
	3	1,3080	1,2818 1,2904 1,2715	98 ± 1
jabuticaba	20	2,4857	1,4665 1,4291 1,4896	59 ± 1
	10	1,2428	0,8254 0,8003 0,8123	65 ± 1
	5	0,6214	0,6028 0,5987 0,6112	97 ± 1
jambolão	10	2,0633	1,5988 1,6732 1,5404	78 ± 3
	7	1,4445	1,2402 1,2960 1,1768	86 ± 3
	5	1,0316	0,9915 1,011 1,0085	97 ± 1
uva	5	0,9350	0,8268 0,8232 0,8151	88 ± 1
	4	0,7480	0,6031 0,6111 0,5991	81 ± 1
	3	0,5610	0,5684 0,5784 0,5251	99 ± 4

Extratos aquosos

Os fatores escolhidos para o estudo da estabilidade dos extratos brutos aquosos em função das condições de armazenamento foram pH, tempo e temperatura de armazenamento.

Os valores que aparecem na **Tabela 27** são as médias e as estimativas dos desvios padrão dos 3 ensaios realizados para cada combinação de níveis de fatores, num total de 81 ensaios para cada extrato.

Tabela 27. Dados experimentais da investigação do efeito da acidez (pH), tempo de estocagem (t) e temperatura (T) na variação da absorbância dos extratos aquosos. Os sinais algébricos identificam o nível de cada fator como inferior (-), intermediário (0) e superior (+). Os valores de absorbância foram medidos em pH = 1 para todos os ensaios.

Ensaio	Níveis			Absorbância média de triplicatas \pm desvio da média			
	pH	T	t	Extrato de amora ($\lambda = 512$ nm)	Extrato de jaboticaba ($\lambda = 512$ nm)	Extrato de jambolão ($\lambda = 517$ nm)	Extrato de uva ($\lambda = 513$ nm)
1	-	-	-	0,96 \pm 0,03	1,036 \pm 0,002	0,899 \pm 0,006	0,732 \pm 0,009
2	0	-	-	0,487 \pm 0,003	0,526 \pm 0,004	0,087 \pm 0,003	0,360 \pm 0,001
3	+	-	-	0,122 \pm 0,003	0,170 \pm 0,001	0,030 \pm 0,004	0,088 \pm 0,003
4	-	0	-	0,941 \pm 0,006	1,040 \pm 0,006	0,92 \pm 0,01	0,698 \pm 0,001
5	0	0	-	0,51 \pm 0,02	0,529 \pm 0,006	0,086 \pm 0,003	0,330 \pm 0,002
6	+	0	-	0,117 \pm 0,001	0,160 \pm 0,001	0,008 \pm 0,001	0,092 \pm 0,003
7	-	+	-	0,99 \pm 0,01	1,058 \pm 0,004	0,967 \pm 0,007	0,762 \pm 0,004
8	0	+	-	0,53 \pm 0,01	0,514 \pm 0,002	0,089 \pm 0,002	0,366 \pm 0,001
9	+	+	-	0,119 \pm 0,002	0,147 \pm 0,001	0,008 \pm 0,001	0,08 \pm 0,02
10	-	-	0	0,97 \pm 0,02	1,07 \pm 0,02	0,85 \pm 0,02	0,759 \pm 0,009
11	0	-	0	0,448 \pm 0,002	0,472 \pm 0,004	0,062 \pm 0,004	0,384 \pm 0,002
12	+	-	0	0,144 \pm 0,004	0,169 \pm 0,001	0,027 \pm 0,002	0,104 \pm 0,002
13	-	0	0	0,952 \pm 0,002	1,060 \pm 0,003	0,967 \pm 0,007	0,790 \pm 0,001
14	0	0	0	0,461 \pm 0,008	0,502 \pm 0,008	0,070 \pm 0,002	0,332 \pm 0,005
15	+	0	0	0,092 \pm 0,006	0,29 \pm 0,03	0,026 \pm 0,001	0,102 \pm 0,001
16	-	+	0	0,968 \pm 0,001	1,13 \pm 0,02	1,04 \pm 0,05	0,79 \pm 0,02
17	0	+	0	0,103 \pm 0,001	0,39 \pm 0,01	0,07 \pm 0,01	0,164 \pm 0,002
18	+	+	0	0,14 \pm 0,03	0,27 \pm 0,03	0,034 \pm 0,003	0,106 \pm 0,002
19	-	-	+	0,90 \pm 0,01	0,97 \pm 0,04	0,86 \pm 0,01	0,84 \pm 0,01
20	0	-	+	0,51 \pm 0,01	0,65 \pm 0,01	0,060 \pm 0,001	0,043 \pm 0,002
21	+	-	+	0,130 \pm 0,007	0,174 \pm 0,006	0,006 \pm 0,001	0,043 \pm 0,005
22	-	0	+	0,75 \pm 0,08	1,24 \pm 0,01	0,99 \pm 0,08	0,89 \pm 0,02
23	0	0	+	0,366 \pm 0,004	0,710 \pm 0,002	0,078 \pm 0,002	0,360 \pm 0,001
24	+	0	+	0,15 \pm 0,01	0,227 \pm 0,002	0,012 \pm 0,001	0,079 \pm 0,001
25	-	+	+	0,94 \pm 0,03	1,12 \pm 0,01	1,09 \pm 0,02	0,593 \pm 0,002
26	0	+	+	0,143 \pm 0,002	0,43 \pm 0,02	0,018 \pm 0,001	0,168 \pm 0,006
27	+	+	+	0,17 \pm 0,03	0,150 \pm 0,001	0,046 \pm 0,004	0,251 \pm 0,002

Para estudar a interação/efeito entre os principais fatores que afetam a estabilidade das antocianinas em meio aquoso, recorreu-se ao uso de modelos empíricos para a interpretação dos dados experimentais. O método para avaliar a qualidade do ajuste do modelo foi a análise de variância (ANOVA). A **Tabela 28** traz os resultados obtidos.

Tabela 28. Análise de variância para o ajuste dos modelos linear, cúbico e quadrático com os dados da **Tabela 27**.

Modelo	Extrato	Fonte de variação	v	SQ	MQ	Teste F	Teste V
LINEAR	Amora	Regressão	3	2,93	$9,80 \times 10^{-1a}$	69,78	0,44
		Resíduos	23	$3,20 \times 10^{-1}$	$1,40 \times 10^{-2b}$	(4,76)	
		Total	26	3,25			
	Jaboticaba	Regressão	3	3,54	1,18 ^a	124,48	0,29
		Resíduos	23	$2,20 \times 10^{-1}$	$9,48 \times 10^{-3b}$	(4,76)	
		Total	26	3,76			
	Jambolão	Regressão	3	3,94	1,31 ^a	27,29	1,48
		Resíduos	23	1,10	$4,80 \times 10^{-2b}$	(4,76)	
		Total	26	5,04			
	Uva	Regressão	3	1,94	$6,50 \times 10^{-1a}$	47,04	0,48
		Resíduos	23	$3,40 \times 10^{-1}$	$1,50 \times 10^{-2b}$	(4,76)	
		Total	26	2,28			
CÚBICO	Amora	Regressão	16	3,16	$2,00 \times 10^{-1a}$	22,42	0,78
		Resíduos	10	$8,90 \times 10^{-2}$	$8,92 \times 10^{-3b}$	(3,86)	
		Total	26	3,25			
	Jaboticaba	Regressão	16	3,70	$2,30 \times 10^{-1a}$	39,78	0,51
		Resíduos	10	$5,80 \times 10^{-2}$	$5,78 \times 10^{-3b}$	(3,86)	
		Total	26	3,76			
	Jambolão	Regressão	16	5,04	$3,10 \times 10^{-2a}$	587,12	0,067
		Resíduos	10	$5,28 \times 10^{-3}$	$5,28 \times 10^{-4b}$	(3,86)	
		Total	26	5,04			
	Uva	Regressão	16	2,20	0,14 ^a	23,26	0,55
		Resíduos	10	$6,00 \times 10^{-2}$	$5,89 \times 10^{-3b}$	(3,86)	
		Total	26	2,26			
QUADRÁTICO	Amora	Regressão	9	3,07	$3,40 \times 10^{-2a}$	31,07	0,47
		Resíduos	17	$1,90 \times 10^{-1}$	$1,11 \times 10^{-3b}$	(3,77)	
		Total	26	3,25			
	Jaboticaba	Regressão	9	3,65	$4,10 \times 10^{-1a}$	62,97	0,27
		Resíduos	17	$1,11 \times 10^{-2}$	$6,54 \times 10^{-2b}$	(3,77)	
		Total	26	3,76			
	Jambolão	Regressão	9	5,02	$5,60 \times 10^{-1a}$	421,05	0,061
		Resíduos	17	$2,31 \times 10^{-2}$	$1,33 \times 10^{-3b}$	(3,77)	
		Total	26	5,04			
	Uva	Regressão	9	2,11	$2,30 \times 10^{-2a}$	24,99	0,48
		Resíduos	17	$1,70 \times 10^{-1}$	$1,00 \times 10^{-2b}$	(3,77)	
		Total	26	2,28			

a. Média Quadrática da regressão b. Média Quadrática do resíduo.

Para a avaliação dos modelos foram calculados os valores de $F_{(p-1), (n-p)}$ dados pela **Equação 7** e comparados com os tabelados (Barros Neto *et al.* 1996).

$$F_{(p-1), (n-p)} = \frac{MQ_R}{MQ_r} \quad \text{Equação 7}$$

onde: p = número de parâmetros do modelo,
 n = número de ensaios;
 MQ_R = média quadrática da regressão
 MQ_r = média quadrática dos resíduos

Para todos os extratos brutos os valores de $F_{(p-1), (n-p)}$ no nível de 95% de confiança são altamente significativos, ou seja, qualquer um dos modelos pode ser usado para avaliar o efeito da interação entre os parâmetros estudados. Para decidir qual modelo é mais adequado, foi feita uma comparação dos valores da soma quadrática dos resíduos com os valores previstos (denominado nesta tese de teste V). O teste V é fundamentado na diferença entre valores medidos experimentalmente e os previstos; portanto, quanto menor este valor, melhor será a adequação do modelo ao sistema de estudo.

Tanto para o extrato de amora quanto para o de uva, utilizando-se o teste V e o teste F, concluiu-se que o modelo mais adequado para a análise dos dados é o linear, cujas equações respectivas são dadas por:

$$\text{Absorbância} = 0,48 - 0,40pH - 3,1 \times 10^{-3}T - 4,0 \times 10^{-3}t \quad \text{Equação 8}$$

$$\text{Absorbância} = 0,38 - 0,33pH - 5,71 \times 10^{-3}T - 1,40 \times 10^{-3}t \quad \text{Equação 9}$$

Pelos resultados do teste V obtidos para o extrato de jabuticaba, concluiu-se que o modelo menos adequado é o cúbico, pois apresenta um alto valor obtido na aplicação do teste V e um valor de F menor que os demais modelos. Apesar do modelo linear apresentar um valor de F superior ao modelo quadrático, ele apresenta maior valor no teste V, quando comparado com o modelo quadrático. Assim para decidir que modelo é mais adequado aplicou-se um outro teste F (denominado nesta tese de teste F') (Barros Neto *et al.* 1996) comparando a redução na soma quadrática residual por unidade de parâmetros adicionados à própria média quadrática do modelo contendo maior número

de parâmetros. Se este valor não for significativo, é porque não é necessário aumentar o número de parâmetros. A relação de interesse é dada pela **Equação 10**.

$$F' = \frac{[SQ_{r,linear} - SQ_{r,quadrática}] / d}{MQ_{r,quadrática}} \quad \text{Equação 10}$$

onde: $SQ_{r,linear}$ = soma quadrática residual do modelo linear;

$SQ_{r,quadrática}$ = soma quadrática residual do modelo quadrático;

$MQ_{r,quadrática}$ = média quadrática residual do modelo quadrático e

d = a diferença no número de parâmetros dos dois modelos (nesse caso $d = 10 - 4 = 6$).

Utilizando os valores das **Tabela 28**, tem-se que o valor de $F'_{6,17}$ é 2,78. Comparando este resultado com o valor tabelado no qual $F'_{6,17} = 4,45$, no nível de 95% de confiança, concluiu-se que o modelo linear é melhor que o quadrático, pois o valor de F' obtido não é significativo, ou seja, é menor que o tabelado. Assim, o modelo mais adequado para a análise dos dados referentes ao extrato de jabuticaba é o linear, cuja equação é dada por:

$$\text{Absorbância} = 0,60 - 0,44\text{pH} - 4,6 \times 10^{-3} T - 2,8 \times 10^{-3} t \quad \text{Equação 11}$$

Para o extrato de jambolão, os valores de $F_{(p-1), (n-p)}$ são altamente significativos. Entretanto, o valor superior para os modelos cúbico e quadrático indica que estes modelos explicam uma porcentagem de variância maior, quando comparado com o modelo linear. Isto é esperado, uma vez que estes modelos usam mais parâmetros. Pelos valores do teste V pode-se decidir que o modelo menos adequado é o linear, pois apresenta um alto valor pela aplicação do teste V e um valor de F menor que os demais modelos. Assim, para decidir qual destes modelos é mais adequado também foi aplicado o teste F' . Utilizando os valores da **Tabela 27**, tem-se que o valor de $F'_{6,17}$ é 4,82. Comparando este resultado com $F_{6,17}$, que é 4,96, no nível de 95% de confiança, foi possível concluir que o modelo quadrático é melhor que o cúbico, pois o valor de F obtido não é significativo, ou seja, é menor que o tabelado. Assim, para a análise dos dados referente ao extrato de jambolão a equação é dada por:

$$A = 1,7 - 0,85\text{pH} + 4,3 \cdot 10^{-03} T + 7,7 \cdot 10^{-04} t + 0,10\text{pH}^2 - 2,5 \cdot 10^{-05} T^2 - 2,8 \cdot 10^{-06} t^2 - 1,08 \cdot 10^{-03} \text{pH} T - 2,1 \cdot 10^{-04} \text{pH} t + 2,810 \cdot 10^{-05} T t$$

$$\text{Equação 12}$$

Pelos valores dos coeficientes estimados descritos nas **Equações 8, 9, 11 e 12** é possível observar que o aumento do pH, T e t influenciam negativamente no valor da absorbância, isto é, diminuem a sua intensidade. Sabendo, que a diminuição da intensidade da absorbância está relacionada com a degradação das antocianinas, pode-se concluir que as antocianinas presentes nos extratos brutos das frutas são mais estáveis a baixos valores de pH, T e t, tal como descrito em alguns trabalhos na literatura, realizados com antocianinas purificadas (Cabrita *et al.* 2000, Fossen *et al.* 1998).

Também foi possível observar que o aumento da temperatura e do tempo de estocagem influenciaram cerca de 6 e 8%, respectivamente, na degradação das antocianinas presentes no extrato de amora, enquanto que o aumento do pH exerce uma influência de aproximadamente 83% na degradação destes pigmentos. Para o extrato de jabuticaba, a temperatura e o tempo de estocagem influenciam cerca de 0,8 % e 5 %, respectivamente na degradação das antocianinas, enquanto que o pH exerce uma influência de aproximadamente 73% na degradação destes pigmentos. Para os extratos de jambolão e de uva, a temperatura e o tempo de estocagem influenciam menos que 1% na degradação das antocianinas, enquanto que o pH exerce uma influência de aproximadamente 50 % e 87 % respectivamente, na degradação destes pigmentos.

A influência dos 3 fatores estudados pode ser visualizada nas superfícies apresentadas na **Figura 30**, onde é possível perceber que somente o pH afeta significativamente a degradação das antocianinas, de acordo com as condições e as variáveis estudadas. Isto também foi observado nos estudos realizados pelos grupos de Cabrita e colaboradores (2000) e por Abdel-Aal e Hucl (2003).

As superfícies, que ilustram a influência dos parâmetros estudados obtidas para o extrato de amora, apresentadas na **Figura 30**, são semelhantes para os demais extratos. Assim, tomando-se o extrato de amora como exemplo e considerando-se o pH constante, foi possível observar a diminuição da absorbância em função do aumento do tempo de estocagem. Observa-se também que o aumento da temperatura diminui a intensidade da absorbância num dado valor de pH. Entretanto, estas variações de absorbâncias não são tão significativas quanto a diminuição da absorbância em função do aumento do pH. É adequado lembrar que outros fatores, tais como concentração

das antocianinas, luz, presença de enzimas e composição da solução tampão, não avaliados neste estudo, podem influenciar a estabilidade de extratos brutos de antocianinas em meio aquoso.

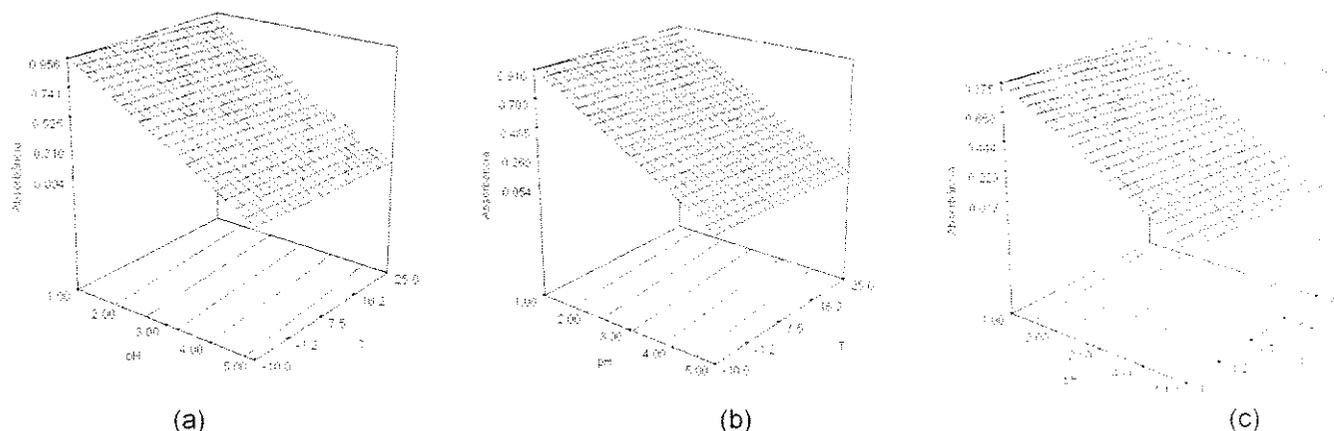


Figura 30. Superfícies de resposta (absorbância em 521 nm) para o extrato bruto de amora em função do pH e da temperatura. (a) $t = 0$ dia (após 1h da extração), (b) $t = 30$ dias e (c) $t = 60$ dias.

Extratos alcoólicos

Durante a estocagem dos extratos alcoólico e aquoso das frutas, foi observado visualmente que a degradação resultante da presença de fungos e/ou coloração marrom é menor no extrato alcoólico quando comparado com o aquoso, nas mesmas condições de armazenamento. Para investigar a estabilidade dos extratos alcoólicos foi feito um estudo, em meio ácido (pH 1 a 2), considerando-se os fatores tempo e temperatura de estocagem. Optou-se por estudar somente estes fatores devido à grande influência do $\text{pH} > 2$ na degradação das antocianinas e também pela dificuldade em medir pH de soluções alcoólicas. Foram realizadas triplicatas de 9 ensaios, seguindo o planejamento fatorial 3^2 . Os valores da **Tabela 29** são médias e estimativas dos desvios padrão dos 3 ensaios realizados para cada combinação de níveis de fatores, num total de 27 ensaios para cada extrato.

Tabela 29. Dados experimentais da determinação de absorvância para investigar o efeito tempo de estocagem (t) e temperatura (T) na variação da absorvância dos extratos alcoólicos.

Ensaio	T (°C)	t (dias)	Extrato de amora ($\lambda = 512$ nm)	Extrato de jabuticaba ($\lambda = 512$ nm)	Extrato de jambolão ($\lambda = 517$ nm)	Extrato de uva ($\lambda = 513$ nm)
1	-	-	0,646 \pm 0,003	0,81 \pm 0,01	0,68 \pm 0,02	0,727 \pm 0,007
2	-	0	0,64 \pm 0,02	0,82 \pm 0,03	0,610 \pm 0,001	0,73 \pm 0,01
3	-	+	0,67 \pm 0,03	0,83 \pm 0,03	0,70 \pm 0,03	0,70 \pm 0,01
4	0	-	0,66 \pm 0,02	0,82 \pm 0,03	0,64 \pm 0,01	0,729 \pm 0,004
5	0	0	0,647 \pm 0,009	0,80 \pm 0,02	0,62 \pm 0,01	0,72 \pm 0,01
6	0	+	0,66 \pm 0,01	0,797 \pm 0,005	0,74 \pm 0,02	0,75 \pm 0,01
7	+	-	0,678 \pm 0,009	0,831 \pm 0,003	0,69 \pm 0,01	0,73 \pm 0,01
8	+	0	0,64 \pm 0,01	0,82 \pm 0,03	0,667 \pm 0,006	0,743 \pm 0,002
9	+	+	0,68 \pm 0,01	0,80 \pm 0,02	0,66 \pm 0,02	0,763 \pm 0,004

Para estudar a interação/efeito entre os principais fatores que afetam a estabilidade das antocianinas em meio alcoólico, também se recorreu ao uso de modelos empíricos para a interpretação dos dados experimentais. Em função do baixo número de parâmetros e por consequência, baixo número de experimentos realizados, a análise estatística dos dados experimentais foi feita considerando-se apenas os valores de *F* e de *Press*, (*Predicted Residual Sum of Squares ou Soma dos Quadrados dos Resíduos Previstos*). O valor de *F* testa a hipótese nula do modelo, ou seja: valores grandes de *F* indicam que a variância explicada pelo modelo é maior, isto é, o modelo é estatisticamente significativo e ajusta satisfatoriamente o conjunto de dados. Já o valor de *Press* indica como o modelo se ajusta aos dados experimentais; quanto menor o valor, melhor é o ajuste. A **Tabela 30** traz os resultados obtidos.

Para a escolha do melhor modelo para o extrato de amora, observou-se que o modelo linear é inadequado, devido à comparação dos valores de *F* e *Press* com os para os modelos quadrático e cúbico. Entretanto, para a escolha entre estes dois modelos, além destes valores é foi necessário avaliar um outro parâmetro, já que o modelo quadrático apresenta um melhor valor de *Press*, enquanto que o cúbico apresenta um melhor valor de *F*. Assim, para esta escolha deve ser levado em consideração o número de graus de liberdade (DF) e quanto maior o DF, melhor é o ajuste do modelo. O número de graus de liberdade para o modelo cúbico é 7, enquanto que para o quadrático é 3. Assim, o melhor modelo de ajuste para o extrato de jabuticaba é o cúbico. As **Equações 13 a 16**, que descrevem o modelo mais adequado para cada extrato, estão descritas na **Tabela 31**.

Tabela 30. Análise da variância (ANOVA) para o ajuste dos modelos linear, cúbico e quadrático.

Modelo	Extrato	v	F	Press	Melhor modelo
AMORA	linear	2 ^a 6 ^b	1,23	2,93x10 ⁻³	Cúbico
	cúbico	7 ^a 1 ^b	5,56	8,07x10 ⁻³	
	quadrático	5 ^a 3 ^b	3,62	2,89x10⁻³	
JABUTICABA	linear	2 ^a 6 ^b	6,11x10 ⁻¹	4,07x10 ⁻³	Quadrático
	cúbico	7 ^a 1 ^b	7,20 x10 ⁻¹	3,90x10 ⁻²	
	quadrático	5 ^a 3 ^b	1,59	2,82x10⁻³	
JAMBOLÃO	linear	2 ^a 6 ^b	3,40x10 ⁻²	2,40x10 ⁻²	Cúbico
	cúbico	7 ^a 1 ^b	7,8	5,10x10⁻³	
	quadrático	5 ^a 3 ^b	1,66	5,40x10 ⁻³	
UVA	linear	2 ^a 6 ^b	2,35	3,88x10⁻³	Linear
	cúbico	7 ^a 1 ^b	3,81 x10 ⁻²	7,61x10 ⁻²	
	quadrático	5 ^a 3 ^b	1,13	6,22x10 ⁻³	

a. Regressão (modelo)

b. Resíduo

Tabela 31. Equações dos modelos ajustados para os extratos alcoólicos das frutas.

Extrato	Equação	
amora	$A = 0,65 + 8,94 \times 10^{-4}t - 8,75 \times 10^{-4}T + 1,91 \times 10^{-5}t^2 + 1,72 \times 10^{-5}T^2 - 6,09 \times 10^{-5}Tt + 5,24 \times 10^{-7}t^2T + 7,23 \times 10^{-7}tT^2$	<i>Equação 13</i>
jabuticaba	$A = 0,81 - 5,08 \times 10^{-03}t - 3,67 \times 10^{-03}T - 3,50 \times 10^{-03}t^2 - 1,51 \times 10^{-03}T^2 - 1,2 \times 10^{-03}tT$	<i>Equação 14</i>
jambolão	$A = 0,66 - 3,37 \times 10^{-3}t - 1,50 \times 10^{-3}T + 7,81 \times 10^{-3}t^2 + 1,19 \times 10^{-3}T^2 + 1,85 \times 10^{-4}tT - 2,33 \times 10^{-6}t^2T - 4,63 \times 10^{-6}tT^2$	<i>Equação 15</i>
uva	$A = 0,73 + 4,50 \times 10^{-03}t - 1,30 \times 10^{-03}T$	<i>Equação 16</i>

Pelas equações descritas na **Tabela 31**, tal como nos extratos aquosos, o tempo e temperatura de estocagem não exercem influência significativa na degradação das antocianinas nas condições e variáveis estudadas.

Principalmente dois tipos de reações colorimétricas não enzimáticas ocorrem durante a estocagem dos extratos contendo antocianinas: a coloração vermelha das antocianinas é perdida e um pigmento de coloração marrom é desenvolvido (Sondheimer e Kertsz 1948). Embora a degradação das antocianinas não seja

significativa durante o período máximo de armazenamento proposto, a vida útil dos extratos é limitada em função destas reações colorimétricas e da proliferação de fungos.

Após 30 dias de armazenamento foi observada a presença de fungos em todos os extratos aquosos armazenados à temperatura ambiente e tamponados em pH 3 e 5. Independentemente do valor do pH de tamponamento dos extratos, após 60 dias todos extratos armazenados à temperatura ambiente apresentavam fungos e coloração marrom ou amarela, resultante da decomposição do extrato. Os extratos tamponados em pH 3 e 5 e armazenados em geladeira apresentaram fungos após 60 dias de estocagem. Não foi evidenciada presença de fungos nem perda da coloração dos extratos armazenados em freezer doméstico. Já nos extratos alcoólicos, não foi evidenciada a presença de fungos ou perda da coloração em nenhuma das condições de armazenamento utilizadas pelo período de 60 dias. A degradação dos extratos brutos aquosos pela ação de fungos é mais rápida, quando comparada com a degradação dos extratos alcoólicos correspondentes nas mesmas condições de armazenamento.

A **Tabela 32** traz o tempo de vida útil ou estabilidade dos extratos em função do aparecimento de fungos. Estes dados indicam que a degradação das antocianinas é mais rápida em temperaturas maiores e em meio aquoso.

Tabela 32. Estudo da durabilidade dos extratos em meio ácido (pH<3).

	Amora	Jaboticaba	Jambolão	Uva
Extrato aquoso armazenado na geladeira	1 mês	1 mês	1 mês	2 meses
Extrato aquoso armazenado no freezer	12 meses	12 meses	12 meses	12 meses
Extrato aquoso armazenado a T _{amb.}	15 dias	15 dias	15 dias	1 mês
Extrato alcoólico armazenado na geladeira	12 meses	12 meses	12 meses	12 meses
Extrato alcoólico armazenado no freezer	12 meses	12 meses	12 meses	12 meses
Extrato alcoólico armazenado a T _{amb.}	12 meses	12 meses	12 meses	12 meses

Com o objetivo de aumentar o tempo de vida útil dos extratos aquosos, estudou-se o efeito da adição de alguns conservantes, como ácido cítrico e formaldeído (formol). A estabilidade dos extratos com os conservantes foi inicialmente acompanhada por espectrofotometria na região do visível. A **Figura 31** exemplifica os espectros obtidos após a preparação dos extratos de amora e jaboticaba

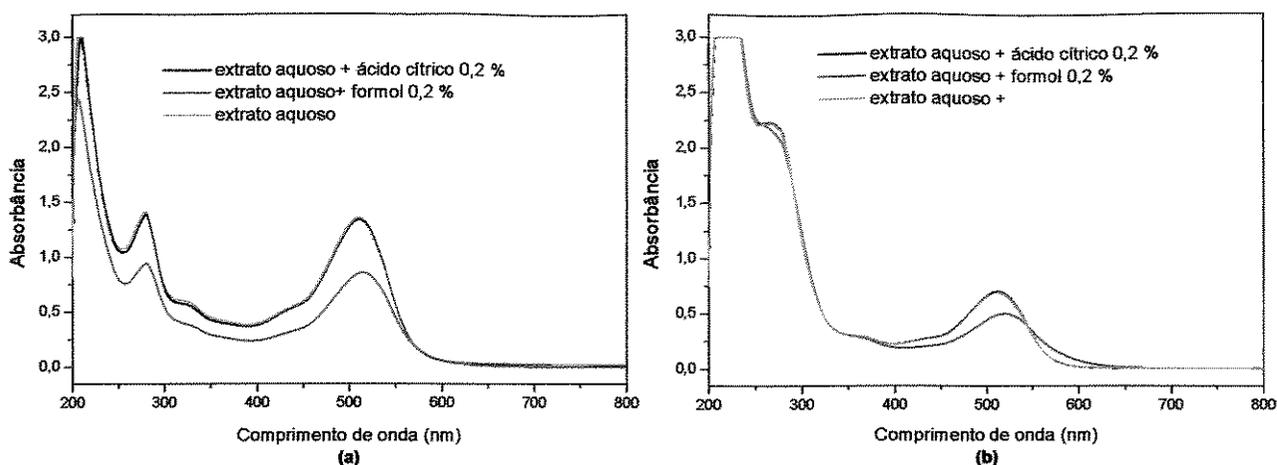


Figura 31. Caracterização espectrofotométrica dos extratos aquosos de (a) amora e (b) jabuticaba sem e com a adição de conservantes.

Nos extratos aquosos e naqueles contendo ácido cítrico, observou-se que os espectros de absorção apresentam o mesmo perfil. Já nos extratos contendo formol observaram-se alterações nos espectros de absorção. Além disso, foram observadas alterações da coloração dos extratos e a propriedade de indicador de pH foi prejudicada, pois se observou uma variação pouco perceptível da cor com o pH. Estes são alguns indicativos que as antocianinas reagem com formol, portanto este não pode ser usado como conservante.

A adição de ácido cítrico, em curto prazo (15 dias) não alterou as propriedades dos extratos, porém também não melhorou a durabilidade. Desta forma, usar os extratos alcoólicos ainda parece ser o mais recomendável com bases nos presentes resultados, quando se deseja uma maior durabilidade de extratos de antocianinas.

6.8. Reações

6.8.1. Ácido-base

6.8.1.1. Reações de equilíbrio químico ácido-base

A **Figura 3** apresenta o esquema das principais transformações estruturais das antocianinas causadas por variações de pH, acompanhadas da mudança de coloração. Na literatura, existem algumas propostas de explicação do mecanismo das reações de equilíbrio químico em função do pH do meio em que as antocianinas se encontram.

Algumas destas hipóteses consideram que o equilíbrio químico é reversível, enquanto outras apontam que, em meio muito alcalino, pH entre 13 e 14, ocorre a formação de um chalcona, que leva à decomposição da antocianina (Brouillard e Dubois 1977, Gross 1987).

Ao se elevar o pH dos extratos de frutas inicialmente acidificados até 13 e 14, observou-se a formação de uma espécie amarela, provavelmente a pseudo-base chalcona. Adicionando-se HCl nesta solução até voltar ao meio ácido, em torno de pH 1, a coloração vermelha do extrato foi recuperada. Assim, foi observado que os mecanismos das reações de sistemas químico em função do pH envolvendo as antocianinas extraídas das frutas estudadas são reversíveis sob determinadas condições e tempo. Para os extratos dessas frutas, a reversibilidade das reações foi observada por um período de até 8 h. Após este período foi observada a formação da pseudo-base chalcona de modo irreversível. Já no caso dos extratos de uva e jambolão o sistema é reversível mesmo após um período de 72 h.

6.8.1.2. Caracterização visual das antocianinas em função do pH

Nas **Figuras 32 a 35**, que ilustram a variação de cor dos extratos em função do pH, notam-se pequenas variações de cores e de intensidade na comparação entre os extratos aquoso e alcoólico da mesma fruta e na comparação dos extratos obtidos com as diferentes frutas estudadas. Este fato pode ser decorrente do fenômeno de auto-associação das antocianinas presentes nos extratos. Este fenômeno é influenciado pelas quantidades, tipos de antocianinas e interação com o solvente (Hoshiro *et al.* 1981). No caso da comparação entre extratos aquoso e alcoólico da mesma fruta, os fatores mais significativos são a quantidade de antocianinas presentes em cada extrato e a interação com solvente, uma vez que os tipos de antocianinas extraídas são os mesmos. O fenômeno de auto-associação pode também explicar os comportamentos diferentes dos extratos de amora, jaboticaba, jambolão e uva. Neste caso, os diferentes tipos de antocianinas presentes exercem possivelmente uma grande influência.

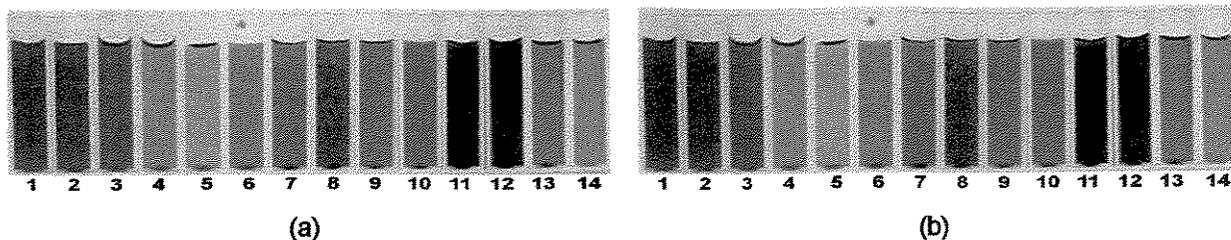


Figura 32. Escalas de pH obtidas com os extratos de amora (a) alcoólico e (b) aquoso

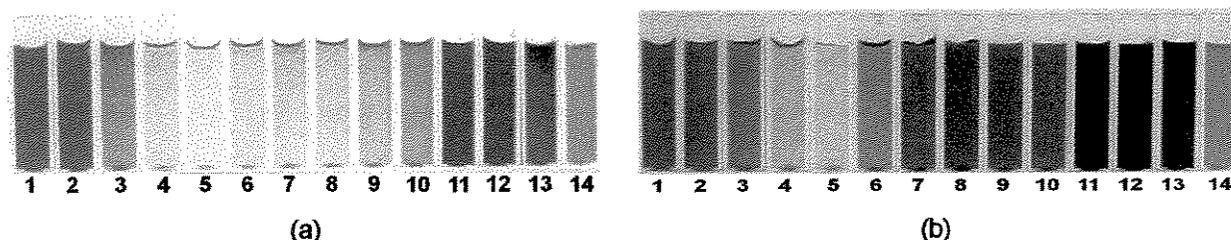


Figura 33. Escalas de pH obtidas com os extratos de jabuticaba (a) alcoólico e (b) aquoso.

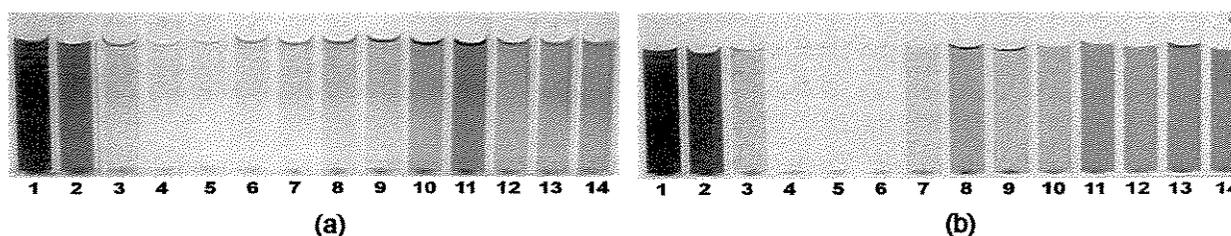


Figura 34. Escalas de pH obtidas com os extratos de jambolão (a) alcoólico e (b) aquoso.

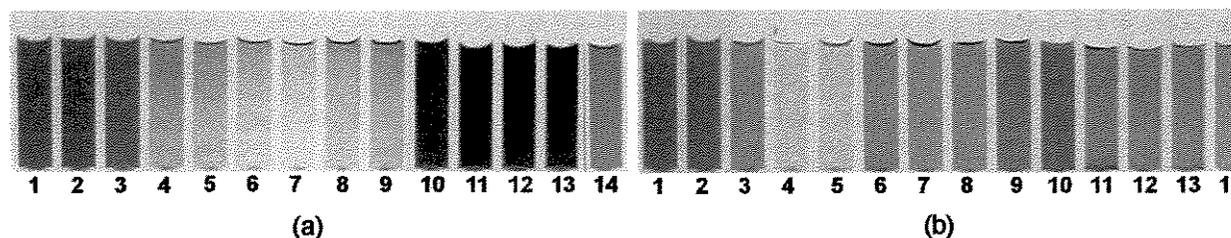


Figura 35. Escalas de pH obtidas com os extratos de uva (a) alcoólico e (b) aquoso.

Devido à significativa variação de cor dos extratos das frutas em função do pH, considera-se que todos extratos podem ser utilizados como indicador de pH, diferenciando faixas estreitas.

A modificação de cor pode ser associada aos espectros de absorção dos extratos em diferentes valores de pH, ou seja, com a modificação de λ_{\max} . As **Figuras 36 a 39** apresentam os espectros obtidos em diferentes valores de pH para os extratos aquosos e alcoólicos de amora, jabuticaba, jambolão e uva.

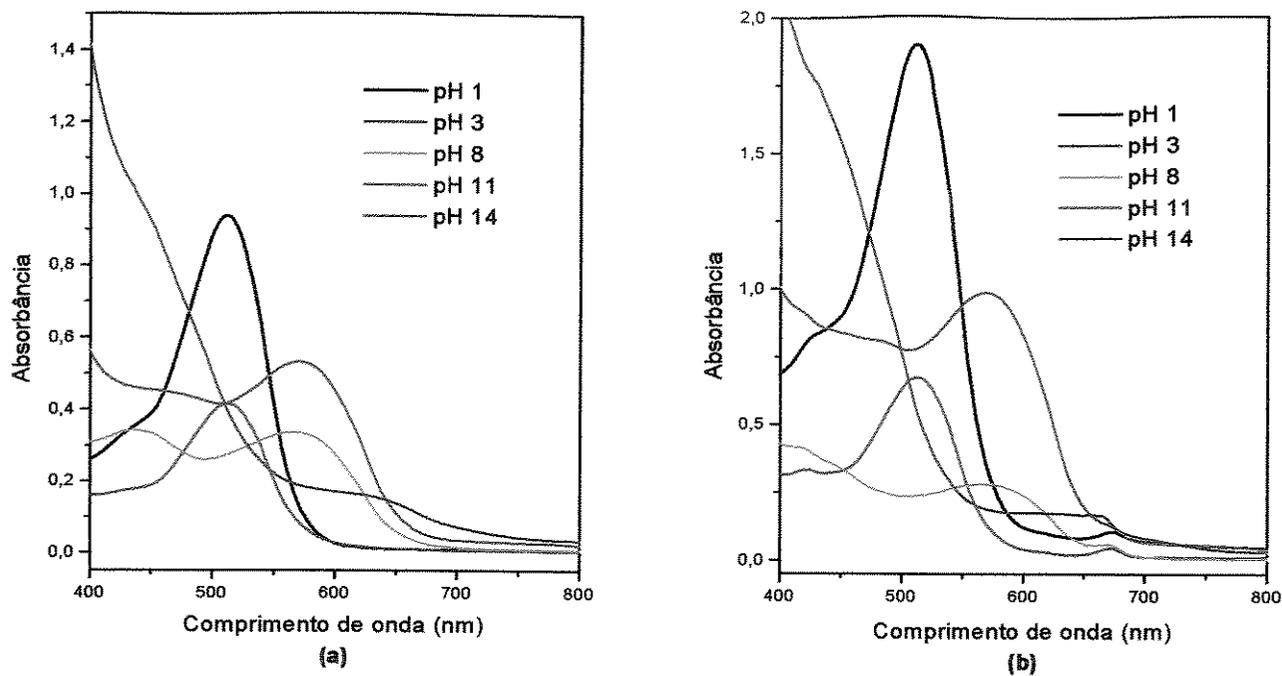


Figura 36. Caracterização espectrofotométrica do extrato de amora (a) aquoso e (b) alcoólico.

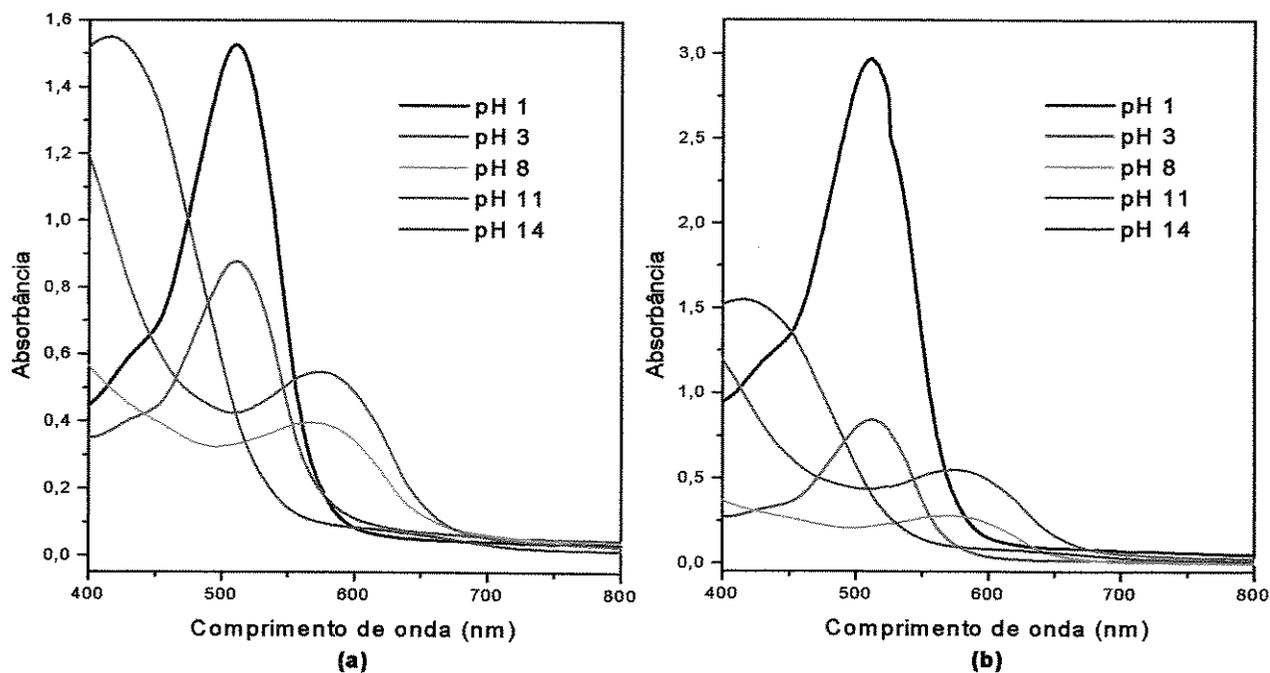


Figura 37. Caracterização espectrofotométrica do extrato de jaboticaba (a) aquoso e (b) alcoólico.

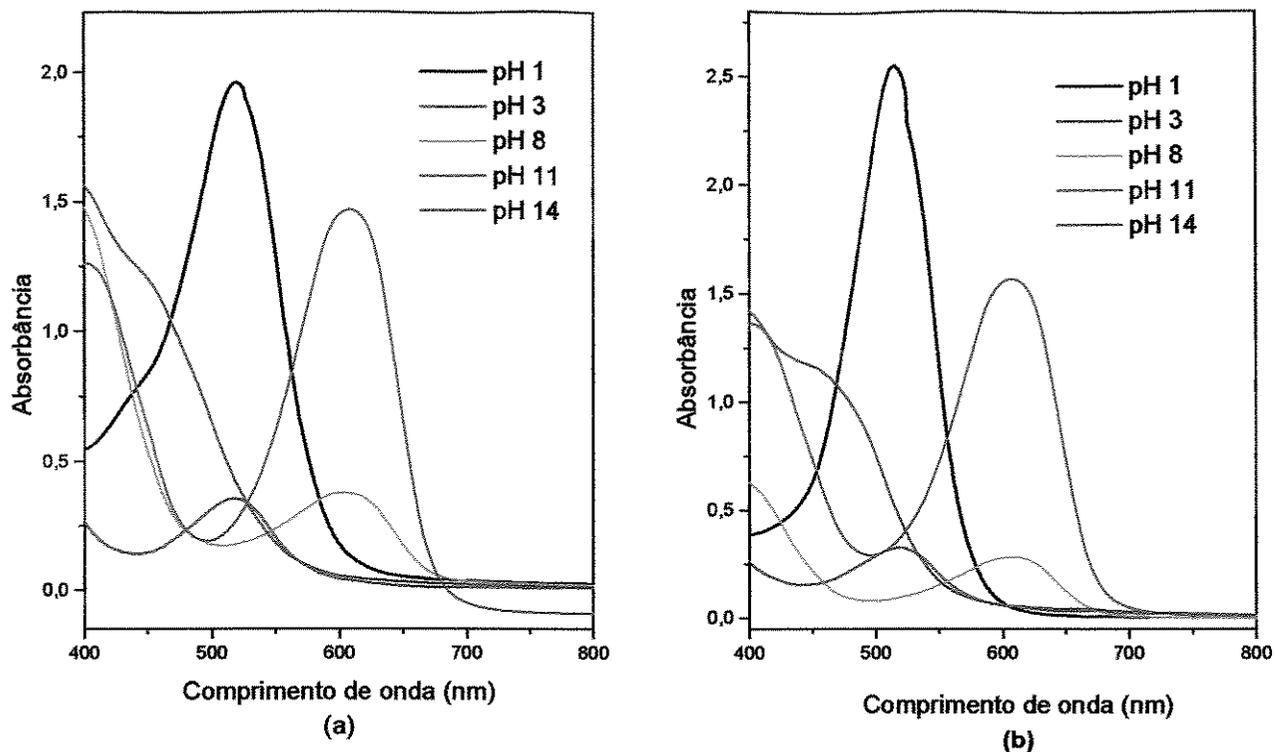


Figura 38. Caracterização espectrofotométrica do extrato de jambolão (a) aquoso e (b) alcoólico.

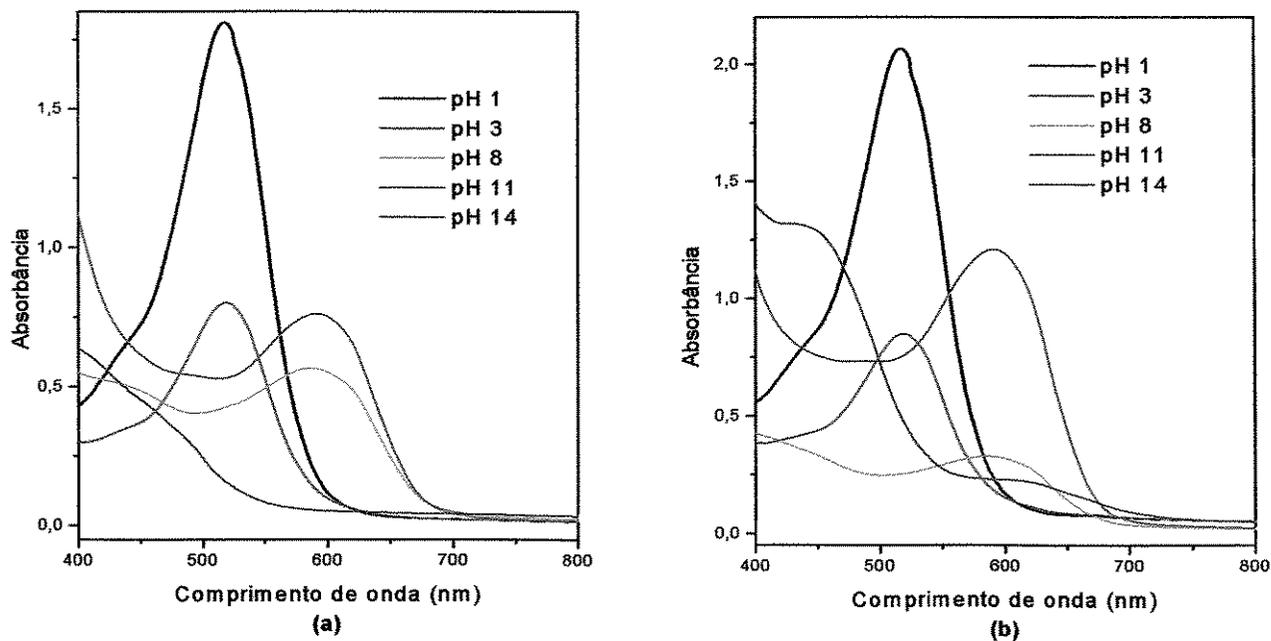


Figura 39. Caracterização espectrofotométrica do extrato de uva (a) aquoso e (b) alcoólico.

Pelos espectros apresentados nas **Figuras 36 a 39**, foi possível observar que as características espectrais são semelhantes para os todos os extratos. Observou-se

também que a variação do pH afeta a intensidade da cor das antocianinas. A similaridade entre os espectros indica que todos estes extratos apresentam o mesmo tipo e distribuição das formas em equilíbrio. De um modo geral, em meio ácido (pH 1-5) a solução apresenta uma coloração avermelhada, cuja máxima absorção ocorre entre 512 e 520 nm, sendo que esta diminui a intensidade conforme o valor de pH aumenta.

Em pH 6-8, a coloração predominante é violeta, sendo que a máxima absorção ocorre entre 560 nm e 580 nm. Em pH 9-12, a coloração predominante é a azul esverdeada onde a máxima absorção ocorre entre 580 nm e 610 nm. Finalmente, em pH mais elevado 13-14, aparece uma coloração amarelada com forte absorção abaixo de 400 nm.

6.8.1.3. Determinação do pK_a aparente dos extratos

A importância da determinação do pK_a aparente está relacionada à possibilidade do uso de extratos brutos contendo antocianinas como indicadores ácido-base.

A absorção de luz por uma substância química depende de suas propriedades físico-químicas, que estão estritamente relacionadas aos grupos funcionais presentes na molécula. Estes grupos funcionais podem sofrer alterações em função do pH, conforme a constante de equilíbrio, ou seja, o pK_a da substância. Portanto, para a caracterização de substâncias químicas, a determinação do valor do pK_a é de grande importância.

Na literatura há a descrição de vários métodos para a determinação do pK_a , dentre os quais se destacam: titulação de soluções supersaturadas; titulação em mistura de solventes; determinação espectrofotométrica pela avaliação de espectros de UV-Vis e avaliação de dados de solubilidade. Os valores de pK_a obtidos por estes diferentes métodos são concordantes, entretanto trata-se de métodos utilizados para a determinação do pK_a de substâncias puras, com concentração conhecida (Sistovaris *et. al.* 1991).

Os extratos de amora, jaboticaba, jambolão e uva são misturas de substâncias cujas concentrações são desconhecidas. No entanto, isto não limita o uso destes extratos como indicadores de pH.



Nos estudos com estes extratos, pode-se determinar os valores de pK_a aparente diretamente a partir da curva de titulação, usando o método do “meio volume”. Desde que $\Delta pH/\Delta V$ seja pequeno na região do “meio volume”, o valor de pK_a aparente pode ser determinado com exatidão (Jürg 1964).

Quando 50% de uma solução de um ácido fraco HA é neutralizada com uma base forte, tem-se que a concentração de HA é igual à concentração de A^- .

Sendo

$$K_a = \frac{[H^+] \times [A^-]}{[HA]} \quad \text{Equação 17}$$

Fazendo a substituição das concentrações, chega-se a:

$$K_a = [H^+] \quad \text{Equação 18}$$

$$\text{ou } pH = pK_a \quad \text{Equação 19}$$

Assim, os valores de pK_a aparente podem ser obtidos a partir do cálculo da primeira derivada das curvas de titulação espectrofotométrica no ponto de 50% da titulação, onde $pK_a = pH$ (Flash 1994, Merkel *et. al.* 1976). Para a determinação do pK_a aparente, foram realizadas medidas de absorbância na região do UV-Vis em função da variação do pH, em meio ácido (pH 1-7) e meio básico (pH 7-12). O mecanismo simplificado das transformações estruturais das antocianinas em meio aquoso ácido e básico é apresentado na **Figura 40**.

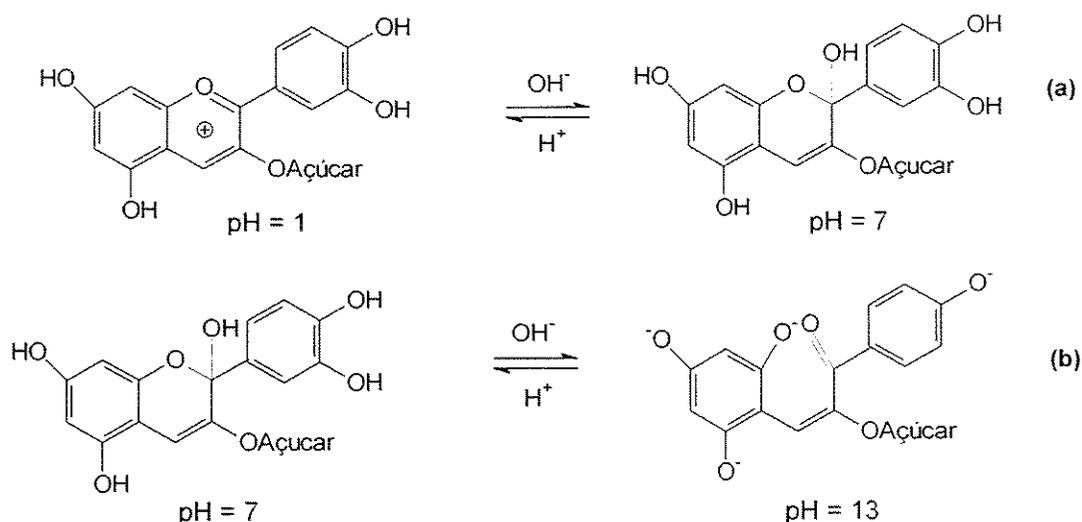


Figura 40. Estruturas químicas das antocianinas. (a) meio ácido ($pH < 7$) e (b) meio básico ($pH >$

7).

Na reação representada na **Figura 40a** ocorre a hidratação do cátion flavílico com a formação de grupo hemiacetal, a pseudobase carbinol. A reação representada na **Figura 40b** é caracterizada por um equilíbrio tautomérico, com a formação da pseudobase chalcona.

A **Figura 41** exemplifica os espectros das antocianinas presentes nos extratos em meio ácido, em função do pH. Observou-se um decréscimo contínuo da absorvância, em $\lambda = 517$ nm indicando o desaparecimento da banda característica do cátion flavílico com a formação da pseudobase carbinol (incolor).

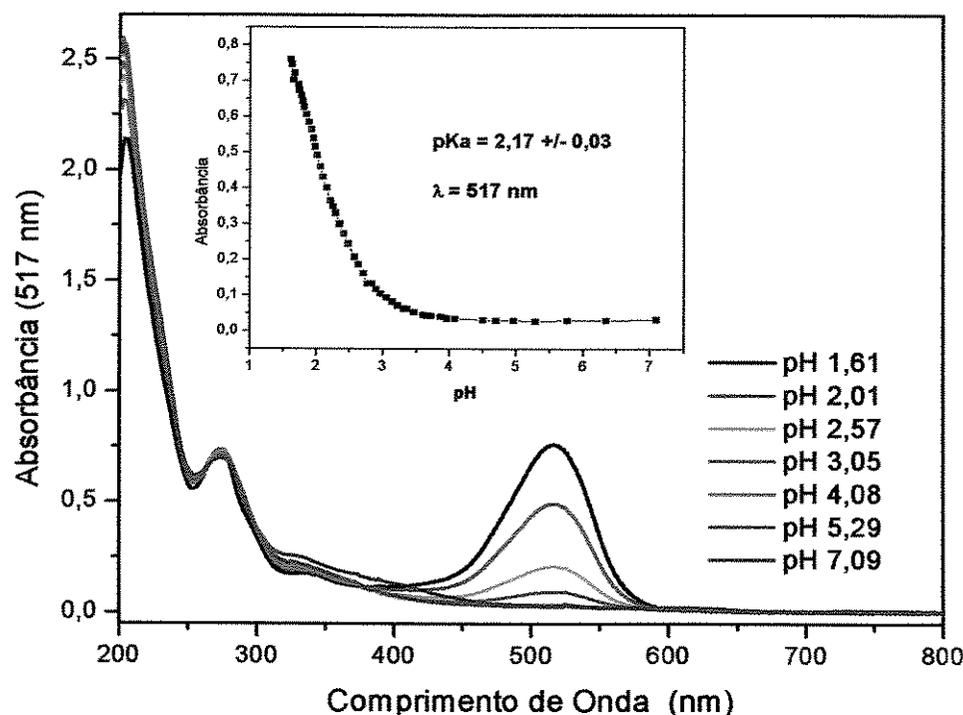


Figura 41. Espectros de absorção do extrato de jambolão em meio ácido.

A variação de absorvância em λ_{\max} de cada extrato permitiu construir um gráfico de absorvância em função do pH, do qual é possível obter o valor do pK_a aparente para o equilíbrio representado no gráfico inserido na **Figura 41**.

A pesquisa bibliográfica realizada sobre determinação do pK_a de antocianinas indicou escassez de dados sobre este assunto. Foi encontrado somente um artigo, no qual Sondheimer (1953) determinou o valor do pK_a em meio ácido para perlagonidina-3-glicosídeo purificada, obtendo um valor de $2,98 \pm 0,06$.

A **Figura 42** exemplifica os espectros de absorção das antocianinas presentes no extrato de jambolão em função do pH em meio alcalino.

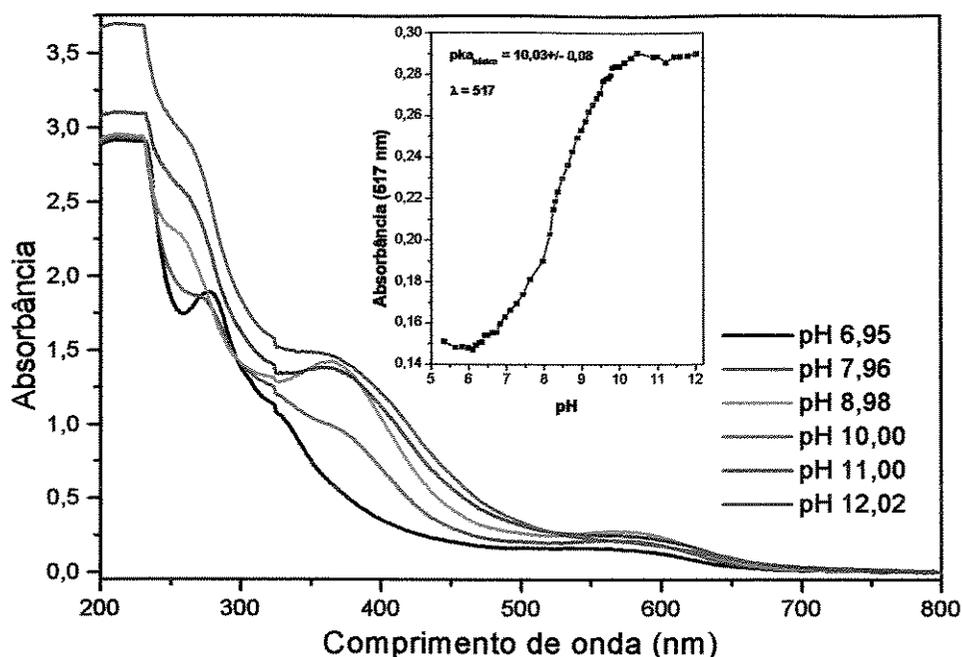


Figura 42. Espectros de absorção do extrato de jambolão em meio básico.

Na **Figura 42** observa-se um grande aumento da absorção na região do ultravioleta, caracterizado pela formação da pseudobase chalcona. No caso do extrato de jambolão, a pseudobase chalcona apresenta coloração amarelo esverdeado, por isso nota-se também um aumento na banda de absorção na região do visível, em torno de 560-580 nm característica desta coloração. Tal como a determinação do pK_a aparente em meio ácido, a variação de absorbância no comprimento de onda de máxima absorção, permitiu construir um gráfico de absorbância em função do pH (inserido na **Figura 42**), do qual foi possível obter o valor do pK_a aparente para o equilíbrio descrito na **Figura 40b**.

Os valores de pK_a aparentes obtidos para os extratos de amora, jabuticaba, jambolão e uva estão listados na **Tabela 32**.

Tabela 32. Valores do pKa aparente dos extratos em meio aquoso.

Fonte	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)*	pK _{ácido}	pK _{abásico}
amora	518	2,92 ± 0,02	8,22 ± 0,05
jabuticaba	512	3,05 ± 0,07	9,25 ± 0,08
jambolão	517	2,17 ± 0,03	10,03 ± 0,08
uva	515	3,01 ± 0,04	9,04 ± 0,06

6.8.1.4. Papel indicador de pH

Papéis indicadores universais de pH são tiras de papel impregnadas com um ou mais corantes indicadores ácido-base que podem ser usados para a uma rápida obtenção de informação relacionada ao valor do pH de diversos tipos de amostras.

Os papéis indicadores de pH e ácido-base são largamente utilizados em laboratórios industriais, de ensino e pesquisa. A facilidade do preparo de papel indicador a partir dos extratos de amora, jabuticaba, jambolão e uva e de papel de filtro, aliada ao baixo custo estimulou a investigação da viabilidade do uso de papéis de filtro impregnados com estes extratos como indicador de pH ou ácido-base.

O papel indicador de pH obtido pelo recorte do papel de filtro resultante da filtração dos extratos apresentou viabilidade de uso, para distinção de meios ácido, neutro e básico, tornando-se vermelho, lilás e azul respectivamente. Seu uso pode ser considerado uma opção alternativa viável para substituição ao papel tornassol, empregado para esta mesma finalidade.

Os papéis obtidos a partir do rápido mergulho nos extratos de amora, jabuticaba, jambolão ou uva apresentaram maior variação de cor, conforme descrito na **Tabela 33**.

Tabela 33. Variação da cor do papel de filtro impregnado com os extratos das frutas.

Extrato	pH	Cor	Extrato	pH	Cor
Amora	1-2	rosa	Jabuticaba	1-2	rosa
	3-6	lilás		3-6	lilás
	7-10	roxo		7-12	roxo
	11-12	roxo azulado		13	azul
	13	azul		14	verde amarelado
	14	verde amarelado		Uva	1-2
Jambolão	1-2	rosa	3		lilás rosado
	3-6	lilás	4-6		lilás
	7-10	roxo	7		lilás azulado
	8	roxo	8		azul acinzentado
	11-12	roxo azulado	9-10		roxo azulado
	13	azul	11-13		azul
	14	verde amarelado	14	verde	

Após o estudo da variação da cor destes papéis indicadores em função do pH, mediu-se o pH de soluções aquosas e produtos de limpeza com o papel de filtro impregnado com os extratos, comparando-os com os obtidos por medidas realizadas com papel indicador universal comercial Merck®. A **Tabela 34** descreve os resultados obtidos, os quais indicam que o papel indicador alternativo pode ser usado com considerável confiabilidade para medidas de faixa de pH em meio aquoso.

Tabela 34. Comparação entre os resultados obtidos na determinação do pH utilizando o papel indicador alternativo com o papel indicador universal.

Solução	Indicador Universal comercial	Indicador de amora	Indicador de jabuticaba	Indicador de uva	Indicador de jambolão
NH ₃ 0,1 mol.L ⁻¹	11	11-12	11-12	11-13	11-12
KI 10%	7	7-10	7-12	6-7	3-6
NaOH 0,1 mol.L ⁻¹	13	13	13	11-13	13
HCl 0,1 mol.L ⁻¹	1	1-2	1-2	1	1-2
KCl 0,2 mol.L ⁻¹	6	3-6	3-6	6-7	3-6
Ácido acético 0,1 mol.L ⁻¹	3	3-6	3-6	3	3-6
Vinagre (rosado)	3	3-6	3-6	3	3-6
Desengordurante (amarelo)	12	11-12	7-12	11-13	12
Desengordurante (azul)	11	11-12	7-12	11-12	12
Desinfetante (verde)	8	7-12	7-12	8	7-10
Desinfetante (lilás)	8	7-12	7-12	8	7-10
Desinfetante (amarelo)	8	7-12	7-12	8	7-10

A maioria dos papéis indicadores universais de pH é obtida a partir da impregnação de papéis apropriados com soluções de indicadores sintéticos e secos sob uma atmosfera inerte e condições constantes (Erwin *et al.* 1989).

De acordo com o procedimento usual para a obtenção de papel indicador de pH, é necessário comprar ou sintetizar todos os indicadores utilizados na impregnação do papel e controlar a etapa de secagem.

Em função dos resultados satisfatórios obtidos com os papéis de filtro impregnados com os extratos de amora, jabuticaba, jambolão e uva, também foi desenvolvido um papel indicador de pH universal utilizando todas as frutas.

Os papéis indicadores de pH universais obtidos apresentaram uma nítida variação de cor em função do pH, que foi caracterizada de acordo com sistema de cores Pantone Matching System®. A **Figura 41**, mostra a variação de cor em função do

pH dos quatro pigmentos (antocianinas extraídas das frutas) impregnados no papel de filtro, bem como o código das cores do sistema Pantone Matching System®.

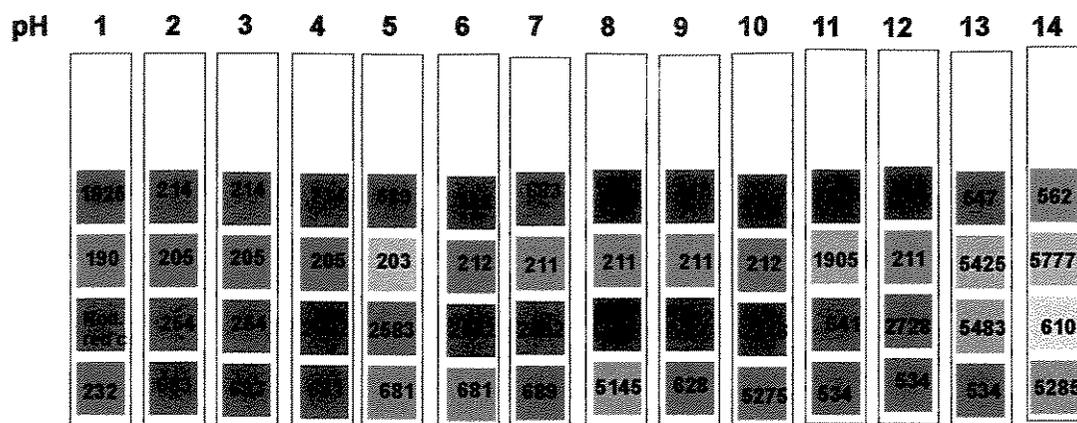


Figura 43. Escala de pH obtida com o papel indicador de pH feito a partir dos extratos das frutas. Alguns códigos de cores Pantone®, tidas como primárias, não apresentam códigos numéricos.

Como observado na **Figura 43**, a estreita faixa de pH apresenta um desempenho comparável aos papéis indicadores de pH comerciais, isto levou a elaboração de um relatório técnico para pedido de patente - **Anexo 2**. É importante salientar que estes papéis são estáveis por um período de 12 meses.

6.8.1.5. Uso dos extratos como indicador em volumetria de neutralização

Volumetria de neutralização ou volumetria ácido-base é uma técnica de análise química que se aplica à determinação de substâncias de caráter ácido ou básico. Fundamenta-se, de modo simplificado, na reação entre íons H^+ e OH^- :



Equação 20

Uma das maneiras usadas para se detectar o ponto final das titulações ácido-base envolve a variação de cor de algumas substâncias chamadas indicadores, que são ácidos ou bases orgânicas fracas que apresentam colorações diferentes para suas formas ácida ou forma básica, dependendo do pH da solução que os contém.

Como as antocianinas apresentam colorações diferentes em função do pH do meio em que se encontram, existe a possibilidade destes corantes atuarem como

indicadores em titulações ácido-base. A **Tabela 35** apresenta as mudanças de cores dos diferentes extratos, quando usados como indicadores em titulações de ácidos monoproticos. A **Figura 44** apresenta duas fotos, para ilustração.

Tabela 35. Coloração inicial (1) e final (2) dos extratos em titulação ácido-base.

Sistema	Amora	Jaboticaba	Jambolão	Uva
HCl/NaOH	rosa ¹ cinza ²	rosa ¹ cinza ²	rosa ¹ verde ²	rosa ¹ azul ²
HCl/ NH ₃	rosa ¹ roxo ²	rosa ¹ cinza ²	rosa ¹ verde ²	vermelho ¹ azul ²
HAc/NaOH	rosa ¹ cinza ²	n/a	rosa ¹ amarelo esverdeado ²	rosa ¹ verde ²
NaOH/HCl	azul esverdeado ¹ rosa ²	verde ¹ rosa ²	amarelo ¹ rosa ²	azul esverdeado ¹ rosa ²
NaOH/HAc	azul esverdeado ¹ rosa ²	verde ¹ rosa ²	amarelo ¹ rosa ²	azul esverdeado ¹ rosa ²
NH ₃ /HCl	azul esverdeado ¹ rosa ²	n/a	amarelo esverdeado ¹ rosa ²	azul esverdeado ¹ rosa ²

n/a: não se aplica. Os extratos de jaboticaba são inadequados como indicadores em sistemas envolvendo ácidos ou bases fracos.

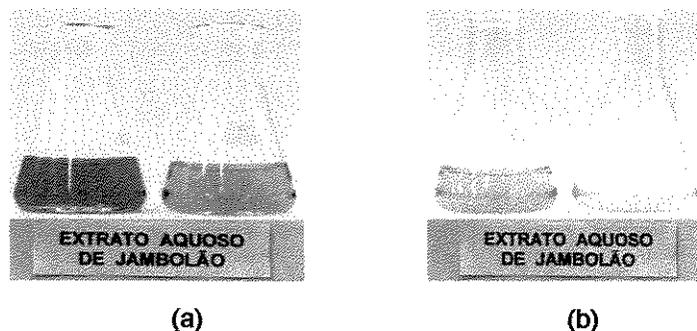


Figura 44. Mudanças de cores do extrato de jambolão, quando usado como indicador em volumetria de neutralização. Determinação (a) de HCl com NaOH e (b) de NaOH com HCl.

Para avaliar a adequação dos extratos de antocianinas para utilização nas titulações, foram considerados os desvios entre os volumes dos pontos finais detectados com o uso do extrato, com os indicadores convencionais e pelo método potenciométrico. Os resultados obtidos na titulação dos diferentes sistemas ácido-base em presença dos extratos de amora, jaboticaba, jambolão e uva como indicadores em comparação com indicadores convencionais e com titulações potenciométricas são apresentados na **Tabela 36**.

Tabela 36. Comparação entre os resultados de detecção dos pontos finais em titulações ácido-base, utilizando-se os extratos das frutas, indicadores convencionais e potenciometria.

	Sistema	Extrato aquoso Erro relativo(%)			Extrato alcoólico Erro relativo(%)		
		P e I	P e E	I e E	P e I	P e E	I e E
Amora	HCl/NaOH	0,4	0,2	0,4	0,4	0,2	0,4
	HCl/ NH ₃	0,6	2	1	0,5	1	1
	HAc/NaOH	0,2	1	1	0,2	1	0,8
	NaOH/HCl	0,2	0,3	0,5	0,2	0,4	0,2
	NaOH/HAc	0,3	1	0,7	0,4	1	0,6
	NH ₃ /HCl	0,4	1	0,7	0,4	1	0,5
Jaboticaba	HCl/NaOH	0,1	1	1	0,1	0,3	0,1
	NaOH/HCl	0,1	0,9	1	0,1	0,7	0,5
Jambolão	HCl/NaOH	0,2	0,3	0,1	0,3	0,2	0,1
	HCl/ NH ₃	0,6	0,9	0,3	0,2	0,3	0,1
	HAc/NaOH	0,2	0,2	0,1	0,6	0,5	0,1
	NaOH/HCl	0,9	0,7	0,3	0,6	0,5	0,1
	NaOH/HAc	0,3	0,7	0,4	0,6	0,1	0,7
	NH ₃ /HCl	0,2	0,1	0,3	0,8	0,8	0,4
Uva	HCl/NaOH	0,1	0,1	0,2	0,3	0,1	0,2
	HCl/ NH ₃	0,3	0,2	0,3	0,1	0,2	0,3
	HAc/NaOH	0,2	0,2	0,4	0,3	0,1	0,2
	NaOH/HCl	0,8	0,4	0,4	0,3	0,2	0,1
	NaOH/HAc	0,9	0,4	0,6	0,6	0,2	0,4
	NH ₃ /HCl	0,2	0,4	0,6	0,8	0,2	0,6

* Média de 3 determinações.

Condições: volume de ácido titulado = 25,00 mL; bureta de 50 mL, todos os reagentes utilizados em concentrações próximas a 0,1 mol.L⁻¹.

P = titulação potenciométrica

I = titulação utilizando-se indicadores convencionais (fenolftaleína, vermelho de metila, etc)

E = titulação utilizando-se 5 gotas dos extratos de fruta como indicadores

Para a discussão dos resultados descritos na **Tabela 36**, visando a avaliação da adequação dos extratos antociânicos como indicadores do ponto final de titulações ácido-base, faz-se necessário salientar alguns pontos:

1. Dados da literatura consideram aceitável a variação de 0,1% entre os volumes gastos em titulação (Skoog *et al.* 1997). Entretanto, considerando a propagação dos erros inerentes a todas as demais etapas do procedimento, pode-se estimar que a variação final dos resultados pode superar 0,1 %.

2. Parece haver um senso comum em aceitar variações de 0,1 % nos resultados de triplicatas de titulações nas aulas experimentais de ensino superior. A literatura consultada, porém, não documenta este aspecto.

3. Segundo Couto e colaboradores (1998) que avaliaram a adequação de extratos de flores para a determinação do ponto final de titulações ácido-base, para fins didáticos pode-se aceitar um erro relativo de até 3%.

Nesta tese, o objetivo primordial do estudo da utilização de extratos antociânicos em volumetria ácido-base estava relacionado ao seu uso em aulas experimentais em diversos níveis, incluindo o ensino médio. Neste nível de ensino, os aspectos mais importantes estão relacionados às reações químicas, estequiometria de reação e cálculo de concentrações, não sendo abordados aspectos analíticos, tais como exatidão e precisão. Na tentativa de generalizar as conclusões, foram considerados extratos adequados para uso como indicador de ponto final de titulações ácido-base, aqueles que resultaram em erros relativos menores que 2% quando comparados com os indicadores convencionais e/ou titulação potenciométrica.

De acordo com resultados descritos na **Tabela 36**, verificou-se que entre titulações potenciométricas e visuais usando os extratos de amora, principalmente quando se têm sistemas envolvendo ácido ou base fraca, os erros relativos variam entre 1 % e 2 %. Isto se deve à mudança gradual de cor nas imediações do ponto de equivalência, o que dificulta a visualização do ponto final da titulação. Entretanto, apresentam erros relativos menores que 0,5 % na determinação do ponto final em titulações ácido-base que envolvam ácidos e/ou bases fortes.

Os extratos de jabuticaba não são recomendáveis para a determinação do ponto final da titulação em sistemas que envolvam ácidos ou bases fracas, pois a mudança de cor é pouco perceptível. Pelo fato da mudança de cor ser muito gradual, os resultados obtidos apresentam erros em torno de 3%, quando comparados aos resultados de titulações potenciométricas ou visuais com indicadores convencionais.

O uso dos extratos de jambolão e de uva apresentou erros relativos menores que 1 % para todos os sistemas ácido/base estudados.

Titulações potenciométricas fornecem resultados mais exatos e precisos, quando comparadas com titulações visuais. Em alguns casos verificou-se que o erro relativo entre as titulações potenciométricas e as visuais, usando indicadores convencionais, foi maior do que aquele obtido comparando-se as titulações potenciométricas com as visuais utilizando-se o extrato de uva, principalmente quando nos sistemas envolvendo ácido ou base fraca. Devido à facilidade de obtenção dos extratos das frutas estudadas,

bem como a diferentes épocas de disponibilidade destas, o uso destes indicadores podem ser favoráveis.

A utilização destes extratos pode representar uma alternativa viável para aplicações didáticas.

Também foram realizadas titulações espectrofotométricas com o objetivo de acompanhar as variações de cor da solução, que está relacionada às diferenças de absorbância em dados comprimentos de onda.

De acordo com a Lei de Beer, a absorbância é diretamente proporcional à concentração da espécie absorvente. Conseqüentemente, quando uma titulação envolve uma espécie absorvente, a representação da absorbância num determinado comprimento de onda fixo, em função do volume adicionado da solução titulante, consiste em duas retas inclinadas que se cortam no ponto final da titulação (Skoog 1996). Entretanto, nas titulações realizadas utilizando-se os extratos das frutas, observou-se a presença de 3 bandas absorventes, por isso os gráficos da absorbância em função do volume de titulante foram construídos em 3 comprimentos de onda, conforme exemplificado na **Figura 45**. Foram escolhidos os comprimentos de onda de 360 nm, 520 nm e 620 nm, que são referentes à máxima absorção das diferentes bandas coloridas predominantes nos diferentes meios reacionais.

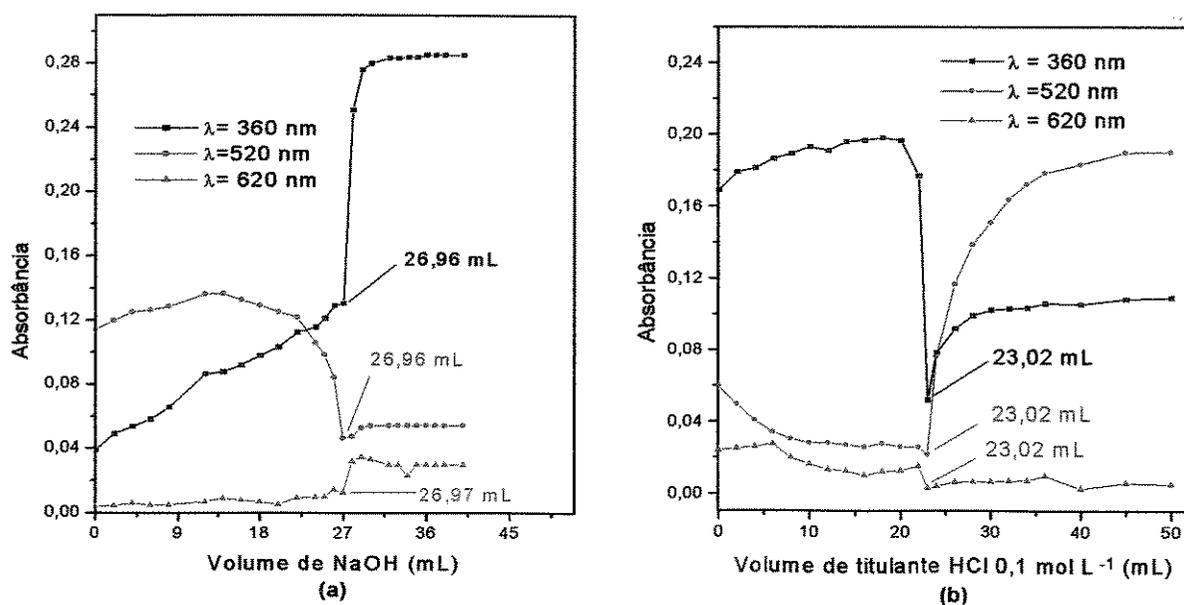


Figura 45. Titulação espectrofotométrica utilizando extrato de uva, (a) determinação de HCl com NaOH e (b) determinação de NaOH com HCl.

Pelas curvas das titulações espectrofotométricas obtidas com os extratos das frutas, verificou-se que o volume do ponto final da titulação independe do comprimento de onda considerado. Entretanto, a **Figura 45** indica que a titulação espectrofotométrica realizada em comprimentos de onda na faixa de 400 nm a 600 nm é mais adequada, tendo em vista que valores superiores não apresentaram variação significativa de absorvância no decorrer da titulação, o que resulta em erros maiores.

Com extrato de uva, a coloração inicial da solução na titulação de base pela adição de ácido é azul esverdeada. Com a adição do titulante (ácido), a solução vai perdendo a coloração até ficar praticamente incolor. Neste ponto, ocorre uma viragem do indicador, correspondente ao mínimo valor de absorvância. Continuando a adição de ácido, a solução adquire coloração rosa, por isso os valores de absorvância em 522 nm aumentam novamente e este ponto é detectado como ponto final na titulação visual. Já no caso da titulação de ácido pela adição de uma base, a coloração inicial do titulado é rosa e, conforme o titulante (base) é adicionado, a solução vai descolorando até ficar praticamente incolor. Neste ponto ocorre uma viragem do indicador, correspondente ao mínimo valor de absorvância. Continuando a adição de titulante, ou seja, após o volume do ponto final da titulação, a solução adquire coloração azul esverdeada, por isso os valores de absorvância em 522 nm aumentam novamente e este ponto é detectado como ponto final na titulação visual. A **Figura 45** ilustra essas mudanças.

Com extratos de amora, jabuticaba e jambolão, a titulação espectrofotométrica apresentou o mesmo perfil, havendo apenas algumas variações nas cores dos indicadores.

A utilização dos indicadores naturais também foi avaliada num sistema envolvendo ácido poliprótico. Teoricamente, as curvas de titulação destes ácidos deveriam apresentar números de pontos de equivalência iguais ao número de átomos de hidrogênio. Entretanto, na prática, este fato não é sempre observado devido aos baixos valores de constantes de ionização, que levam a uma mudança muito suave de pH nas proximidades dos pontos de equivalência.

Titulações visuais de ácidos polipróticos, como de ácido fosfórico, requerem cuidados especiais, pois, usualmente, envolvem o uso de mais de um indicador ácido-base para identificar o ponto final da titulação, além da adição de eletrólitos.

Visando testar a aplicabilidade das antocianinas como indicador para titulação de ácidos polipróticos, foram realizadas titulações visuais e espectrofotométricas para determinação de ácido fosfórico.

Para avaliar a adequação dos extratos na determinação de ácido fosfórico, foram realizadas titulações visuais na presença dos extratos como indicador, em comparação com o método de titulação convencional, utilizando-se alaranjado de metila e timolftaleína (Baccan *et al.* 2001), e com titulação potenciométrica. Os resultados obtidos, descritos na **Tabela 37**, indicam que o uso dos extratos de amora, jambolão e uva apresentam erros relativos menores que 4% quando comparados com a titulação potenciométrica na determinação do primeiro ponto de equivalência e erros inferiores a 1% na determinação do segundo ponto de equivalência. Foram obtidos valores de erros relativos semelhantes na comparação com os resultados obtidos entre a titulação convencional e a potenciométrica. Neste contexto, pode-se considerar que estes extratos servem como indicadores dos pontos finais de titulações de ácido poliprótico, como o ácido fosfórico.

Tabela 37. Resultados de detecção do primeiro e segundo ponto de equivalência na determinação de ácido fosfórico.

	Extrato	Volume ¹ (mL)*	Volume ² (mL)*	Erro relativo do 1 ^o PE (%)	Erro relativo do 2 ^o PE (%)	
Amora	aquoso	11,89 ± 0,02	23,90 ± 0,04	1	0,4	
	alcoólico	11,85 ± 0,04	23,85 ± 0,02	1	0,6	
Jambolão	aquoso	11,73 ± 0,02	23,97 ± 0,02	2	0,3	
	alcoólico	11,55 ± 0,04	24,00 ± 0,04	4	0,2	
Uva	aquoso	12,15 ± 0,04	23,90 ± 0,02	1	0,6	
	alcoólico	12,10 ± 0,04	24,00 ± 0,04	1	0,2	
titulação convencional		-----	11,50 ± 0,02	24,10 ± 0,04	4	0,2
titulação potenciométrica		-----	11,99 ± 0,01	24,04 ± 0,02	-----	-----

1. Média de 3 determinações do primeiro ponto de equivalência.

2. Média de 3 determinações do segundo ponto de equivalência.

* Condições: volume de ácido titulado = 25,00 mL; bureta de 50 mL, todos os reagentes utilizados em concentrações próximas a 0,1 mol.L⁻¹; extrato: 5 gotas.

Obs. Os extratos de jabuticaba não apresentaram resultados satisfatórios para a detecção do ponto final da titulação do primeiro ponto de equivalência.

Na titulação espectrofotométrica utilizando-se uma solução padrão de NaOH 0,1042 mol L⁻¹, solução de H₃PO₄ 0,05 mol L⁻¹, extratos de amora, jambolão e de uva, observou-se uma variação de absorvância pronunciada entre o primeiro e o segundo ponto de equivalência, confirmando a possibilidade do uso destes extratos para a determinação do primeiro e do segundo ponto de equivalência do ácido fosfórico de

uma maneira simplificada, quando comparada com a titulação convencional. A **Figura 46** exemplifica o perfil desta titulação.

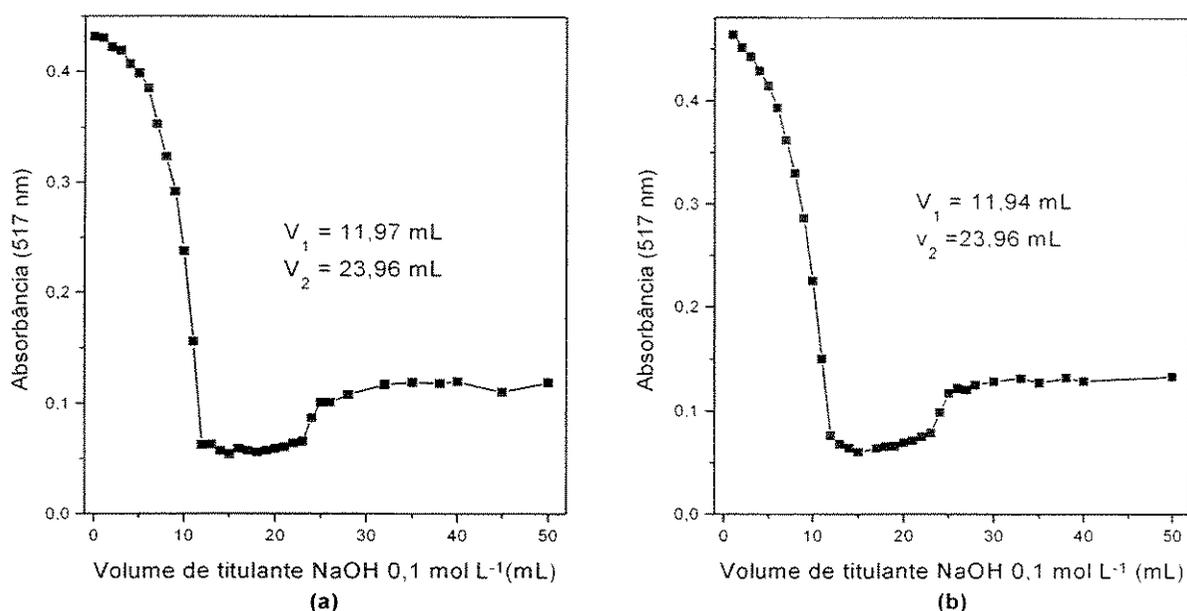


Figura 46. Titulação espectrofotométrica para determinação de H₃PO₄ com NaOH em 517 nm. (a) Extrato de jambolão aquoso. (b) Extrato de jambolão alcoólico.

Pela **Figura 46** também é possível observar que o volume do primeiro e do segundo pontos de equivalência estão próximos dos valores calculados teoricamente: 12,00 mL e 24,00 mL.

Com os extratos de amora, a coloração inicial do titulado era vermelha, mudando para rosa no primeiro ponto de equivalência e para cinza no segundo ponto de equivalência. Com os extratos de jambolão, a coloração inicial do titulado era vermelha, mudando para incolor no primeiro ponto de equivalência e para verde-amarelado no segundo ponto de equivalência, indicando o término da titulação. Já no caso dos extratos de uva, a coloração inicial do titulado também era vermelha, mudando para rosa primeiro ponto de equivalência e depois para azul esverdeado no segundo ponto de equivalência.

6.8.2. Reações de óxido-redução

A presença do íon oxônio positivo próximo à posição C₂ torna as antocianinas susceptíveis a ataques nucleofílicos. A oxidação das ligações duplas pode descolorir as

antocianinas, causando a clivagem do anel nas posições C₂ ou C₄ (Berkè *et. al.* 1998, Brouillard e Chahine 1980, Sondheimer e Kertsz 1952).

As antocianinas reagem com hidrogênio-sulfito de sódio sendo reduzidas e perdendo a coloração, conforme descrito na **Figura 47** (Berkè *et. al.* 1998). Esta reação representa a adição do ânion ao carbono C₃, no anel em que se localiza o cátion flavílico, ou seja, o anel formado pelo oxigênio. Neste caso, a perda da cor está relacionada ao fato do anel perder uma ligação dupla pela formação do novo composto com o bissulfito de sódio, diminuindo a capacidade cromófora (Berkè *et. al.* 1998).

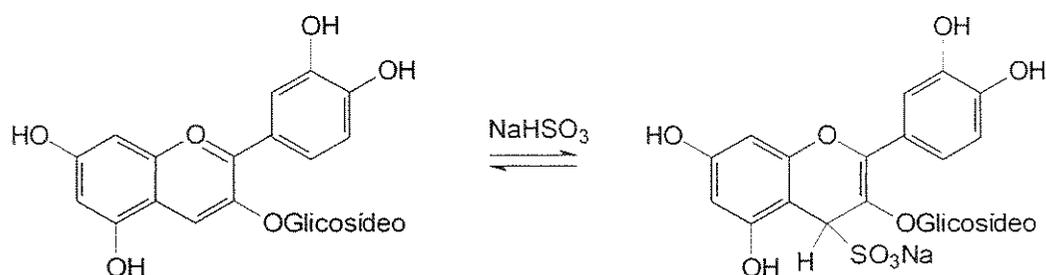


Figura 47. Esquema da reação de óxido-redução entre uma antocianina genérica e bissulfito de sódio.

No presente trabalho, foi proposta a reação das antocianinas presentes nos extratos de jambolão com cloro livre utilizando-se os mesmos princípios da reação de óxido-redução descrita anteriormente.

Para a caracterização visual e espectrofotométrica da reação de cloro livre com os extratos de jambolão, em um tubo de ensaio, foram adicionados 5 mL de uma solução de NaClO 0,55 g L⁻¹ e 500 µL do extrato alcoólico ou aquoso. Após a adição do extrato o valor de pH deveria permanecer constante (pH = 10) e a solução deveria adquirir uma coloração verde. Entretanto, obteve-se uma solução de coloração amarela quase incolor e o valor de pH caiu para 6. Adicionando-se NaOH ou HCl na solução resultante no tubo de ensaio, as reações características das antocianinas em meio aquoso deixaram de ser notadas.

A **Figura 48** apresenta os espectros da solução resultante da mistura de cloro livre com extrato de jambolão e o espectro esperado de uma solução de pH 10 contendo o extrato.

Pelos resultados obtidos nos testes visuais e na caracterização espectrofotométrica, pode-se propor a ocorrência de uma reação entre as antocianinas presentes no extrato de jambolão com o cloro livre. Este fato é evidenciado pela ausência das absorções referentes às antocianinas em pH 10.

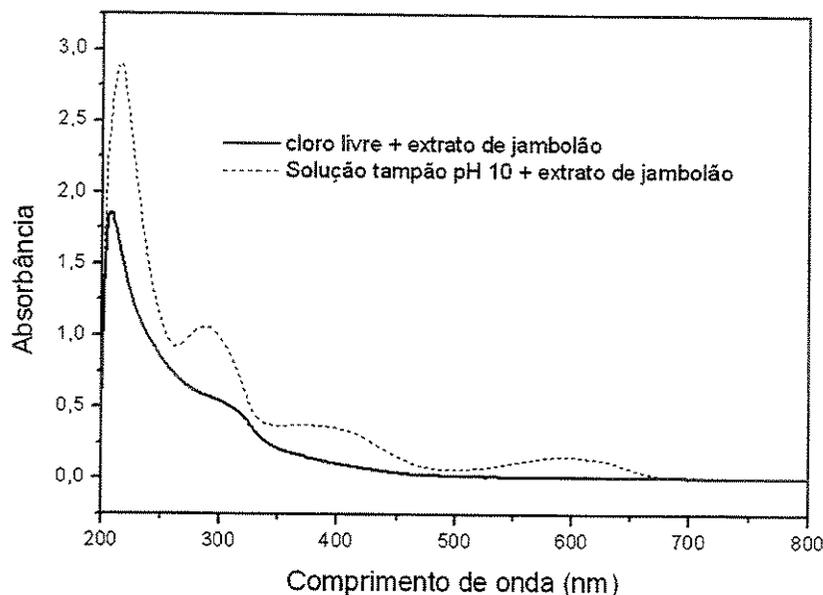


Figura 48. Espectros da solução resultante da mistura de cloro livre com o extrato de jambolão e de uma solução de pH 10 contendo o extrato de jambolão.

Os testes visuais indicaram também que a reação ocorrida deveria ter destruído as antocianinas de modo irreversível, uma vez que a propriedade de mudança de cor das antocianinas em função do pH deixou de ser notada.

Tendo em vista os resultados obtidos, foi proposto o desenvolvimento de um método analítico para a determinação de cloro livre em produtos bactericidas de uso doméstico - água sanitária e dicloroisocianurato de sódio - utilizando-se extratos de jambolão.

Água sanitária é uma solução aquosa de hipoclorito de sódio, hidróxido de sódio e água. Esta solução é preparada pela injeção de gás cloro a uma solução de hidróxido de sódio, gerando NaClO (Vogt *et. al.* 1985, Clapper *et. al.* 1979), sendo que "cloro ativo" é a quantidade de "cloro livre" produzido pela acidificação desta solução (Süss 1985).

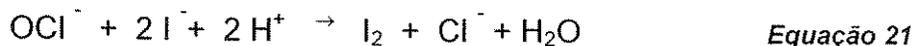
Dicloroisocianurato de sódio - **Figura 49** - é preparado pela reação de ácido hipocloroso e aminas, amidas, iminas ou imidas, gerando "cloro livre" quando dissolvido

em água (Dychdala 1991). Tabletes de dicloroisocianurato de sódio podem ser usados para a esterilização e desinfecção de água potável, vegetais e água de piscina (Dychdala 1991, Odlaug e Pflug 1976, Blatchley 1994).



Figura 49. Fórmula estrutural do dicloroisocianurato de sódio.

Usualmente, titulações colorimétricas e iodométricas são utilizadas para a determinação de hipoclorito como “cloro livre” (Taras *et. al.* 1971, Tian e Dasgupta 2000). Em meio ácido, hipoclorito atua como um agente oxidante:



Na presença de excesso de iodeto, o íon triodeto (I_3^-), que apresenta um máximo de absorção em 370 nm, é formado e pode ser medido por técnicas espectrofotométricas. A desvantagem do método iodométrico é a fácil oxidação aeróbica dos íons iodeto em soluções fortemente ácidas. Contudo isto pode ser evitado se a solução não for estocada e o ácido for adicionado *in situ* (Taras *et. al.* 1971, Tian e Dasgupta 2000).

Tian e Dasgupta (2000) descreveram um método para a determinação de cloro livre em efluentes industriais cloro-álcali por injeção em fluxo, baseado na descoloração do alaranjado de metila, um indicador ácido-base.

Nesta tese, é proposta a descoloração das antocianinas presentes no extrato de jambolão para a determinação de cloro livre.

Os experimentos foram realizados em meio ácido (pH 1) para garantir a presença das antocianinas na forma de cátion flavílico e também a geração de cloro livre. Foi observado que a descoloração das antocianinas é influenciada pela quantidade de cloro livre presente na solução. As soluções passam de vermelho a incolor, em função da concentração de cloro livre - **Figura 50**.

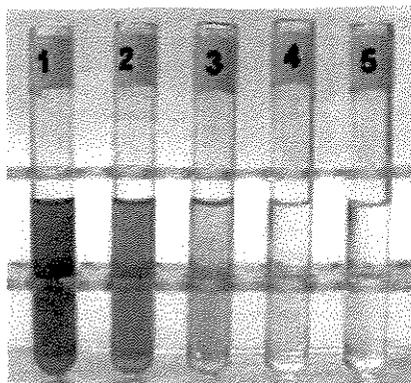


Figura 50. Escala colorimétrica para a determinação visual de cloro livre. Concentração nos tubos de ensaio (mg L^{-1}): (1) 0 (2) 14 - 28 (3) 41 - 55 (4) 69 - 82 and (5) > 96.

Após estes estudos preliminares foram realizadas medidas espectrofotométricas, com o objetivo de investigar o estabelecimento de um método espectrofotométrico e um método visual para a determinação de cloro livre com a utilização de extratos de jambolão.

No desenvolvimento do método espectrofotométrico, os resultados obtidos, indicaram uma relação linear entre as concentrações de antocianinas e de cloro livre.

A proposta foi testada para determinação de cloro livre em produtos de limpeza com um procedimento de análise bastante simples. A análise de cloro livre em água sanitária é realizada com o objetivo de avaliar seu poder de desinfecção.

Os resultados das análises de produtos de limpeza indicaram a possibilidade da utilização do procedimento utilizando-se comparação visual para experimentos didáticos para o ensino médio, técnico e/ou superior. No ensino superior, em aulas de Química Analítica Instrumental, existe a possibilidade de realizar experimentos para a verificação da Lei de Beer e para a determinação de cloro livre através de medidas espectrofotométricas.

Para a determinação espectrofotométrica de cloro livre, a curva analítica da **Figura 51** foi construída utilizando-se uma solução padrão de cloro livre 55 mg L^{-1} .

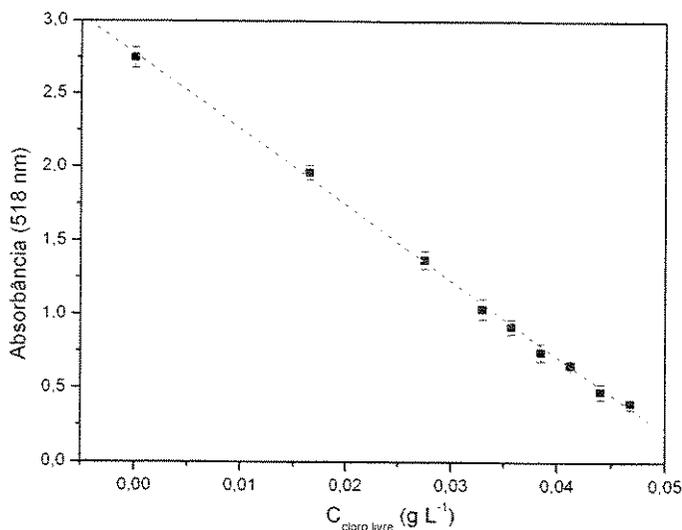


Figura 51. Curva analítica para a determinação de cloro livre em amostras de higienizadores. Absorbância_(518nm) = 2,77 - 51,2 C_{cloro livre}; coeficiente de correlação linear: -0,9991.

Para a determinação visual utilizou-se a escala colorimétrica ilustrada na **Figura 50**, embora, um outro modo para a determinação colorimétrica possa ser feito usando a escala de cores Pantone®[#], como mostrado na **Tabela 38**.

Tabela 38. Determinação da concentração de cloro livre em amostras de higienizadores usando a escala Pantone®.

Concentração (mg L ⁻¹)	Número da cor da escala Pantone®
	pH 1
0	213
14 – 28	212
41 – 55	210
69 – 82	217
> 96	Incolor

Os resultados mostrados na **Tabela 39** indicaram a viabilidade do uso da determinação espectrofotométrica e visual de cloro livre em produtos bactericidas usando uma interessante reação com extrato de jambolão. Observou-se também que o erro relativo para a determinação de cloro livre nos tabletes de dicloroisocianurato de sódio foi maior que aqueles obtidos para as soluções de hipoclorito de sódio, quando comparado com o método padrão. Contudo, o resultado obtido pelo método proposto apresentou um valor mais próximo ao rotulado pelo fabricante. É possível que a matriz

[#] A escala de cores Pantone® pode ser obtida a partir de programas computacionais como o Corel Draw® ou pode ser adquirido um guia Pantone® em lojas especializadas.

orgânica da amostra possa causar interferência nas análises pelo método padrão, já que é indicado especificamente para soluções de hipoclorito de sódio.

Tabela 39. Resultados da determinação da concentração de cloro livre em amostras comerciais

Amostra	Fabricante	Método Espectrofotométrico	Método Visual	ASTM D2022	Erro relativo* (%)
água sanitária (A)	20 – 25 g L ⁻¹	(22,5 ± 0,3) g L ⁻¹	21 – 31 g L ⁻¹	22,34 g L ⁻¹	0,7
água sanitária (B)	20 – 24 g L ⁻¹	(20,7 ± 0,3) g L ⁻¹	21 – 31 g L ⁻¹	20,94 g L ⁻¹	1
dicloroisocianurato de sódio	300 mg	(304 ± 2) mg	249 – 374 mg	317 mg	4

*Comparação entre o método espectrofotométrico e o método ASTM.

Os métodos desenvolvidos são simples, usam poucos reagentes, apresentam baixo custo e são rápidos, quando comparados com análises volumétricas. Devido a estas características favoráveis, pode-se recomendar a utilização destes métodos em escolas que não possuem sofisticada infra-estrutura laboratorial para o ensino de diversos conceitos químicos fundamentais, dentre os quais se destacam: equilíbrio químico, solução tampão, análises quantitativa e reações de branqueamento. Trata-se de uma boa opção de tentativa de contextualização experimental, pelo uso de compostos naturais e amostras comerciais. Além disso, representam opções interessantes para o desenvolvimento de habilidades laboratoriais como preparo de soluções e procedimentos de extração/separação.

Foram estudadas algumas figuras de mérito, visando comparar os resultados obtidos com a utilização do extrato bruto e do extrato purificado de jambolão para a determinação de cloro livre em produtos higienizadores. Os valores obtidos estão descritos na **Tabela 40**, o qual indica os valores das principais características para a avaliação do método mais adequada para a obtenção dos resultados analíticos desejados. A seguir descreve-se cada uma destas características que foram estudadas e usadas para a comparação dos métodos desenvolvidos: (ICH 1994, ICH 1996)

- *Sensibilidade*: o método é considerado sensível quando uma pequena mudança na concentração ou quantidade do analito[#] causa uma grande mudança no sinal analítico. É definida como o coeficiente angular da curva analítica.

- *Limite de detecção*: é a menor quantidade de um analito em uma amostra que pode ser detectada e calculada, mas não necessariamente quantificada com exatidão.

[#] Analito: nesta tese é definido como substância a ser analisada, ou seja, a espécie de interesse.

Há várias maneiras para calcular o limite de detecção. Nesta tese, foi calculado pela estimativa do desvio padrão, resultante das medidas de 12 amostras tidas como branco (sem cloro livre). Assim, $LD = 10 \times s$, onde LD = limite de detecção e s = estimativa do desvio padrão do branco.

- *Limite de quantificação*: é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser quantitativamente determinada com precisão e exatidão adequadas. Foi calculado utilizando-se a seguinte expressão: $LQ = 3 \times LD$, onde LQ = limite de quantificação e LD = limite de detecção.

- *Precisão (repetibilidade)*: expressa a concordância dos resultados analíticos, cujas medidas tenham sido feitas exatamente do mesmo modo. Foram feitas 9 determinações, ou seja, análise em triplicata de 3 amostras com concentrações diferentes conhecidas. As concentrações foram escolhidas em 3 níveis da faixa linear: inferior, intermediário e superior. Foi calculada pela expressão: $\%P = (100 \times s) / M$, onde P = precisão, s = estimativa do desvio padrão de 3 replicatas e M = valor médio da concentração de 3 replicatas.

- *Precisão intermediária*: expressa a concordância dos resultados analíticos, cujas medidas tenham sido feitas num mesmo laboratório, entretanto em dias diferentes e utilizando equipamentos, materiais e reagentes diferentes. Foi calculada utilizando a mesma expressão da precisão (repetibilidade). Nesta tese, a precisão intermediária substituiu o conceito de reprodutibilidade, já que este é muito complicado de ser realizado, pois envolve a disponibilidade de diferentes laboratórios para a realização das análises.

- *Exatidão*: expressa a concordância entre o valor de concentração medido e o seu valor tido como verdadeiro, em função da diferença entre esses valores, expressa pelo erro relativo. Quanto melhor a exatidão, menor o erro relativo ($\%E_r$) que foi calculado a partir dos resultados de análise pelo método padrão, C_{ASTM} , (ASTM D2022) e do método proposto $C_{\text{método proposto}}$, pela seguinte equação: $\%E_r = (C_{ASTM} - C_{\text{método proposto}} / C_{ASTM}) \times 100$; onde $C_{\text{método proposto}}$ é a determinação da concentração das amostras pelo método proposto e C_{ASTM} é a determinação da concentração da amostra pelo método padrão da ASTM.

- A faixa linear de um procedimento analítico é o intervalo entre a menor concentração na qual a medida quantitativa pode ser feita com precisão e exatidão

adequada até a concentração na qual a curva analítica perde a linearidade. O limite inferior geralmente também é considerado como o limite de quantificação.

• A linearidade de um método analítico é a sua característica de fornecer, dentro de uma dada faixa, resultados que são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra.

Tabela 40. Parâmetros de validação para o método proposto (ICH 1996).

	Extrato bruto			Extrato purificado		
Sensibilidade	7,5 10 ⁻²			5,8 10 ⁻²		
Limite de detecção / mg L ⁻¹	0,50			0,31		
Limite de quantificação / mg L ⁻¹	1,5			0,94		
Precisão (repetibilidade)						
1,97 mg L ⁻¹	3%			3%		
4,93 mg L ⁻¹	2%			2%		
6,90 mg L ⁻¹	3%			0,07%		
Precisão intermediária	1 ^o dia	2 ^o dia	3 ^o dia	1 ^o dia	2 ^o dia	3 ^o dia
1,97 mg L ⁻¹	3%	17%	13%	3%	3%	2%
4,93 mg L ⁻¹	2%	2%	2%	2%	2%	3%
6,90 mg L ⁻¹	0,07%	1%	3%	2%	2%	1%
Exatidão	E _r (%)			E _r (%)		
Amostra A	0,8			0,7		
Amostra B	2			1		
Amostra C	4			4		
Linearidade	0,9969			0,9987		
Faixa linear / mg L ⁻¹	1,5 a 8,0			0,94 a 8,0		

Com relação à sensibilidade, faixa linear e a linearidade, ambos os extratos apresentaram comportamentos semelhantes. Os limites de detecção e de determinação obtidos para o extrato bruto foram mais altos que os obtidos com o extrato purificado. Entretanto, as amostras aos quais os métodos se aplicam apresentam concentrações superiores a estes limites, o que torna irrelevante a utilização destes valores para a escolha do tipo de extrato mais adequado. Com relação à precisão (repetibilidade) e precisão intermediária foi possível observar que com a diminuição da concentração de cloro livre na amostra, o extrato bruto apresenta menor precisão, quando comparado ao extrato purificado. Assim, a escolha do tipo de extrato a ser utilizado depende da faixa de concentração da amostra e da precisão desejada.

CAPÍTULO 7

CONCLUSÕES

As análises termogravimétricas indicaram que a extração das antocianinas utilizando água/aquecimento pode ser realizada até 60 °C, sem a degradação destes pigmentos.

A extração das antocianinas das espécies vegetais *Vitis vinifera* (uva) e *Syzygium cuminii* (jambolão), *Morus nigra* (amora) e *Myrciaria cauliflora* (jabuticaba) pode ser feita de uma maneira simples utilizando etanol ou água. O extrato aquoso pode ser obtido pela maceração e aquecimento numa proporção 1/3 fruta ou casca/água (m/V) entre 50 °C e 60 °C por 30 min e o extrato alcoólico pela imersão em etanol por 24 h de mistura numa proporção 1/3 fruta ou casca/água (m/V). De modo geral, para cada 3 g de fruta e/ou casca obtêm-se 9 mL de extrato com concentração de antocianinas variando em torno de 10% entre diferentes extrações.

Com relação aos estudos de identificação, utilizando a cromatografia em papel observou-se a presença de cianidina-3-glicosídeo e cianidina-3-rutinoose nos extratos de amora e cianidina-3-glicosídeo, delphinidina-3-glicosídeo e peonidina-3-glicosídeo nos extratos de jabuticaba. Estes resultados foram confirmados por HPLC. Já para os extratos de uva e jambolão, a identificação foi feita utilizando-se apenas HPLC, uma vez que a cromatografia em papel mostrou-se inviável. As antocianinas identificadas nos extratos de uva foram delphinidina-3-glicosídeo, petunidina-3-glicosídeo e malvidina-3-glicosídeo, e no extrato jambolão peonidina-3-glicosídeo, cianidina-3-glicosídeo e cianidina-3,5-diglicosídeo.

Pelos estudos comparativos dos três principais métodos de quantificação das antocianinas totais (métodos de Petri, de Sondheimer e do pH diferencial) foi possível constatar que todos são reprodutíveis e apresentam boa precisão. Entretanto, os métodos fundamentados nas medidas da diferença das absorbâncias em diferentes valores de pH são mais acessíveis devido ao custo consideravelmente menor, quando comparado ao método proposto por Petri. Comparando-se os métodos fundamentados nas medidas da diferença das absorbâncias - Sondheimer e do pH diferencial - o método do pH diferencial é mais simples e rápido, pois não necessita da construção de uma curva analítica tal como requerido no método de Sondheimer. A concentração média de antocianinas, em mg antocianina/g de fruta, obtida pelo método mais destacado na literatura, o do pH diferencial, desenvolvido por Fuleki e Francis, foi de 291 ± 3 para o extrato de amora, 314 ± 8 no extrato de jabuticaba 386 ± 6 para o extrato de jambolão e 227 ± 6 para o extrato de uva. A purificação dos extratos utilizando a extração em fase sólida com cartucho C18

mostrou-se adequada, pois é possível obter um extrato livre de açúcares, ácidos orgânicos e outros compostos fenólicos diferentes das antocianinas. Os métodos empregados para a avaliação da pureza do extrato, tais como, cromatografia em papel, espectrofotometria UV-Vis, HPLC e testes químicos foram apropriados.

Com relação à estabilidade das antocianinas nos extratos brutos aquosos ou alcoólicos, concluiu-se que estes pigmentos são mais estáveis a baixos valores de pH, temperatura e tempo de estocagem, sendo que os extratos alcoólicos apresentam estabilidade maior que os aquosos. Também foi possível observar que a temperatura e o tempo de estocagem influenciam menos que 10% na degradação das antocianinas, enquanto que o pH exerce uma influência acima de 80%.

Com relação aos estudos das reações ácido-base envolvendo antocianinas foi possível constatar que os extratos antociânicos apresentaram potencialidade para atuarem:

- como indicadores visuais para a determinação de pontos finais em titulações ácido-base, já que os pontos de viragem observados apresentam erros iguais ou inferiores a 2% quando comparados com erros obtidos com a titulação potenciométrica e erros iguais ou inferiores a 1%, quando comparados com uso de indicadores convencionais. Os extratos de amora, jambolão e uva podem ser utilizados nos vários sistemas de titulações ácido-base: ácido forte/base forte, ácido forte/base fraca, ácido fraco/base forte. Entretanto os extratos de jaboticaba apresentam resultados satisfatórios somente quando empregados em sistemas ácido forte/base forte e vice-versa;

- na determinação do pH de soluções aquosas e produtos de uso doméstico utilizando-se os extratos em solução e/ou papéis de filtro deles impregnados;

A reação de óxido-redução das antocianinas com cloro livre, evidenciada pela mudança de coloração, pela variação do pH do meio reacional e por análises espectrofotométrica (UV-Vis), foi utilizada para a quantificação de cloro livre em amostras de higienizadores. Os resultados obtidos pelo método espectrofotométrico desenvolvido apresentaram concordância com os obtidos pelo método padrão da ASTM, possuindo erros inferiores a 1% na determinação de cloro livre em água sanitária.

PARTE 2

APLICAÇÕES DIDÁTICAS

*“Ninguém é tão grande que não possa aprender,
nem tão pequeno que não possa ensinar.”*

Autor desconhecido

CAPÍTULO 8

INTRODUÇÃO

8.1. Indicadores

O termo indicador (do latim: *indicare*) significa “revelador” e pode ser utilizado para a obtenção de informações químicas no decorrer de uma reação (Rancke-Madsen 1972). Reagentes indicadores são substâncias capazes de mudar a cor de um sistema químico no qual estão dissolvidas, em função de diversos fatores, tais como pH, potencial elétrico, complexação com íons metálicos e adsorção em sólidos. Os reagentes indicadores são freqüentemente usados para detectar o ponto final de titulações. São também utilizados em análises qualitativas, semiquantitativas e quantitativas, particularmente de íons inorgânicos (CRC Handbook 1971, Erwin *et al.* 1989).

Os indicadores que são adicionados diretamente à solução são chamados de *indicadores internos*. A concentração de um indicador interno deve ser muito menor quando comparada com a concentração da substância que está sendo analisada. Os indicadores que são usados fora do sistema observado são chamados de *indicadores externos*, que incluem os papéis indicadores (Erwin *et al.* 1989).

De acordo com o mecanismo responsável pela mudança de cor ou tipos de titulações para as quais são aplicados, os indicadores podem ser classificados em diversos grupos. Alguns exemplos que podem ser citados são:

- indicadores de óxido-redução: podem sofrer oxidação ou redução, respondem às mudanças de potencial elétrico para alteração de sua coloração nas proximidades do ponto de equivalência em volumetria de óxido-redução.
- indicadores metalocrômicos: são agentes complexantes que, ao reagirem com íons metálicos, têm suas colorações modificadas e servem para indicar o ponto final de titulações de complexação.
- indicadores de adsorção: normalmente são corantes aniônicos que são atraídos pelas partículas carregadas positivamente produzidas imediatamente após o ponto de equivalência em volumetria de precipitação. A adsorção do corante carregado negativamente na superfície do precipitado carregado positivamente muda a cor original do corante. Esta cor indica o ponto final da titulação.
- indicadores ácido-base são substâncias orgânicas fracamente ácidas (indicadores ácidos) ou fracamente básicas (indicadores básicos), que apresentam

cores diferentes para suas formas protonada ou desprotonada, em solução. Isto significa que mudam de cor em função do pH (Baccan *et al.* 2001, Bányai 1972). Próximo ao ponto de equivalência de uma titulação ácido-base, estes indicadores exibem uma mudança de cor quando neutralizados por uma base ou por um ácido (Harris 2001, Sandell e West 1969, Terra 2004). Os indicadores de pH apresentam diversas formas, portanto diversas cores e são utilizados para diferenciar valores de pH numa escala de pH.

Nesta tese, foi estudada a propriedade das antocianinas atuarem como indicadores ácido-base e também como indicadores de pH, em função do comportamento destes pigmentos em soluções aquosas.

8.2. Aspectos históricos

Historicamente, os indicadores ácido-base constituem a classe mais antiga dos indicadores conhecidos (Rancke-Madsen 1972).

Na década de 1630, Angelo Sala usou algumas espécies vegetais para identificar substâncias ácidas (Walden 1952). Três décadas mais tarde, Robert Boyle, descreveu em seu livro "*Experiments Upon Colors*" o uso de indicadores naturais extraídos a partir de violetas, rosas, tornassol, pau-brasil, *snowdrops*^{*}, *primroses*^{*} e *cochineal*^{*}. Estes indicadores eram utilizados na forma de solução ou impregnados em papel branco (Oesper 1964).



Ângelo Sala
(1576 – 1637)

Boyle observou que, em meio ácido, alguns dos extratos de plantas estudados tornavam-se vermelho e verde ou azul em meio alcalino, porém não fez nenhuma elucidação sobre quais substâncias eram responsáveis por estas mudanças de cores. Também observou que extratos obtidos a partir de flores brancas e amarelas não apresentavam nenhuma variação de cor em função da acidez ou basicidade do meio (Mebane e Rybolt 1985, Rancke-Madsen 1972).



Robert Boyle
(1627 – 1691)

Vale ressaltar que nesta época, ainda não existiam os conceitos de pH, ácidos e bases. Entretanto, Boyle sugeriu a primeira definição para ácido: "*Ácido é qualquer*

^{*} Espécies encontradas na América do Norte, Ásia e Europa.

substância que torna vermelho os extratos de plantas". É importante ressaltar que esta afirmação está relacionada com as espécies estudadas por Boyle.

A partir de Boyle, publicações sobre o uso de extratos de plantas como indicador tornaram-se freqüentes. Os extratos mais utilizados nesta época eram os de violeta e de *Heliotropium Tricoccum*, chamado em inglês de *litmus* e em francês de *tournesol* (Rancke-Madsen 1972), de onde vem nosso tornassol.

Durante o século 18, notou-se que os indicadores de diferentes fontes não apresentavam as mesmas mudanças de cor. Em 1775, Bergman escreveu que extratos de plantas azuis eram mais sensíveis aos ácidos, ou seja, apresentavam uma variação gradual de cor, que servia para diferenciar ácidos fortes e fracos. Por exemplo, ácido nítrico tornava o extrato vermelho, já o vinagre não. E quando se trabalhava com extrato de tornassol esta mudança gradual de cor não era observada (Oesper 1964).

Em 1767, W. Lewis, usou pela primeira vez extratos de plantas para a determinação do ponto final em titulações ácido-base. Antes disso, a única aplicação dos extratos obtidos a partir de diversas espécies de plantas era para a análise qualitativa de águas minerais mencionada por Boyle, Iorden e duClos (Lewis 1767, Jensen 1980, Rheinboldt 1945).

Do ponto de vista industrial, a primeira utilização de indicadores ocorreu em 1782. Guyton Morveau precisava demonstrar a neutralização do ácido nítrico na fabricação de nitrato de potássio e nitrato de sódio. Para isto, utilizou papel impregnado com extrato de pau-brasil (Oesper 1964).

Somente entre 1913 e 1922, Willstätter e Robinson observaram que as antocianinas eram os pigmentos responsáveis pela coloração de diversas flores e que a cor dos extratos dessas flores variava em função da acidez ou basicidade do meio. As antocianinas possuíam coloração avermelhada em meio ácido, violeta em meio neutro e azul em condições alcalinas (Ikan 1969, Brouillard e Dubois 1977). Este estudo explicou as mudanças de cores de extratos vegetais observadas por Boyle.

Por aproximadamente 100 anos (1767 a 1877), os químicos usaram extratos de plantas, particularmente violeta e tornassol, em titulação ácido-base. No entanto, em alguns casos a mudança de cor não era muito perceptível e as soluções indicadoras apresentavam baixa durabilidade. Muitas sugestões foram propostas para melhorar estas limitações. Em 1806, Mohr recomendou que a solução de AgCl em NH₄OH para

ser utilizada na determinação de ácidos inorgânicos. Esta teoria estava fundamentada no fato do AgCl formar um complexo, $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+$, quando colocado em meio amoniacal (Baccan *et al.* 1991). Com a adição de ácido, deixa de haver NH_3 para complexar íons Ag^+ , o que levaria à precipitação do AgCl, indicando o ponto final da titulação. Contudo, não foi encontrado relato na literatura consultada que ateste a utilização deste indicador (Oesper 1964).

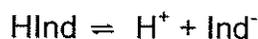
Em 1875, Weiske propôs que a solução de cloreto de ferro (III)-ácido salicílico pudesse ser utilizada como indicador ácido-base. Em solução neutra, o salicilato de ferro (III) apresenta coloração violeta, porém é descorada na presença de ácidos inorgânicos (Weiske 1875). Contudo, assim como a proposta de Mohr, também não foi utilizada.

O primeiro indicador sintético obtido com sucesso foi a fenolftaleína, sendo desenvolvido por Luck em 1877 (Luck 1877). Logo após, em 1878, Lunge propôs o uso do alaranjado de metila (Lunge 1878, Oesper 1964, Mebane e Rybolt 1985).

No início do século 20, Szily e Friedenthak, propuseram o uso de indicadores para a determinação colorimétrica de pH, antes disso só eram usados em titulações (Szily 1904, Friedenthak 1904, Oesper 1964).

Por vários séculos, os químicos utilizaram os indicadores ácido-base naturais e, posteriormente, indicadores sintéticos sem se preocuparem com os mecanismos responsáveis pelas mudanças de cores. Entretanto, o aumento do uso de indicadores e as diferenças de comportamento apresentadas por eles levaram ao desenvolvimento da teoria dos indicadores.

A primeira tentativa da explicação do funcionamento de indicadores ácido-base foi proposta por Wilhelm Ostwald em 1894 (Oesper 1964, Erwin *et al.* 1989). De acordo com Ostwald as mudanças de cores em função do pH são devidas à dissociação iônica das moléculas dos indicadores, que podem atuar como doador ou receptor de prótons:



onde: HInd representa o indicador na forma ácida de coloração A;
Ind⁻ o indicador na forma básica de coloração B.



Wilhelm Ostwald
(1853 – 1932)

Equação 22

Os espectros de absorção das formas HInd e Ind⁻ são diferentes. Se a lei do balanço de massa é aplicada na **Equação 22** e os coeficientes de atividade negligenciados, tem-se:

$$K_a = \frac{[H^+][Ind^-]}{[HInd]} \quad \text{Equação 23}$$

ou

$$-\log[H^+] = -\log K_a + \log \frac{[Ind^-]}{[HInd]} \quad \text{Equação 24}$$

$$pH = pK_a + \log \frac{[Ind^-]}{[HInd]} \quad \text{Equação 25}$$

onde K_a é a constante de dissociação do indicador e pK_a é a função logarítmica negativa na base 10.

De acordo com a **Equação 25**, a razão $[HInd]/[Ind^-]$ é uma função do pH. Consequentemente, a cor de um indicador em solução depende do pH.

Quando a concentração de ambas as formas do indicador são iguais, a **Equação 25** pode ser simplificada:

$$pH = pK_a \quad \text{Equação 26}$$

Indicadores que são capazes de trocar mais que um próton e possuem vários valores de pK_a correspondentes, sendo que as equações descritas anteriormente devem ser ajustadas apropriadamente. Embora, a teoria de Ostwald estabeleça uma boa explicação do comportamento dos indicadores, ela é aparentemente incompleta, pois esta teoria considera que a mudança de cor dos indicadores está relacionada apenas com a ionização destas substâncias, não levando em consideração os rearranjos intramoleculares que podem resultar desta ionização. Isto levou ao desenvolvimento da teoria cromófora, proposta por Hantzsch em 1907, que explica a mudança de cor dos indicadores em termos da mudança da estrutura das moléculas orgânicas (Bányai 1972, Oesper 1964, Hantzsch 1907).

Segundo a teoria cromófora, a cor das substâncias está relacionada à presença de certos grupos de átomos ou de ligações duplas presentes na molécula denominados

de grupos cromóforos. As principais classes de grupos cromóforos estão ilustradas na **Figura 52**.

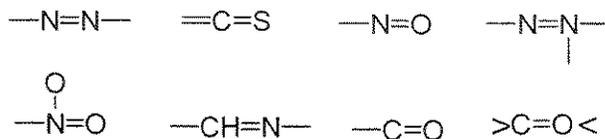


Figura 52. Principais grupos cromóforos encontrados em moléculas orgânicas.

Na teoria cromófora, os indicadores compreendem o equilíbrio de duas formas tautoméricas, distintamente coradas, sendo que a mudança de coloração destas substâncias ocorre em função da formação ou desaparecimento do grupo cromóforo. No caso do *p*-nitrofenol, por exemplo, as formas tautômeras estão descritas na **Figura 53**.

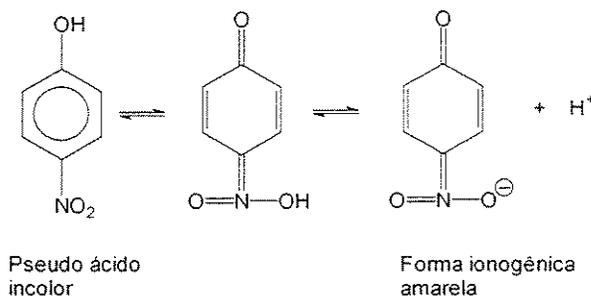


Figura 53. Formas tautoméricas do *p*-nitrofenol.

Conseqüentemente, a variação do pH causa não somente mudanças no equilíbrio de ionização do indicador ácido ou básico, mas também um rearranjo intramolecular. A forma incolor, também chamada de pseudo-ácido ou pseudo-base, muda para uma forma ácida ou básica colorida, chamada de forma ionogênica ácida ou básica.

A teoria de Hantzsch permite uma melhor explicação do mecanismo de mudança de cor dos indicadores que a de Ostwald, mas apresenta como desvantagem a perda da possibilidade de discussões quantitativas. Em 1938, Kolthoff, propôs a união destas teorias para eliminar esta limitação.

De acordo com Kolthoff, indicadores ácido-base são ácidos ou bases fracas, nas quais a forma ionogênica possui estrutura e, portanto, cor diferente da pseudo-forma.

No caso de um indicador ácido, a mudança de cor é regulamentada pelo equilíbrio entre a forma ionogênica ácida (HA) e a forma pseudo-ácida (PA), seguida da dissociação eletrolítica da forma ácida, conforme descritas nas equações seguintes.

Do equilíbrio:



tem-se a constante de equilíbrio do pseudo-ácido, K' :

$$K' = \frac{[HA]}{[PA]} \quad \text{Equação 28}$$

Considerando-se a ionização da forma ácida dada por:



chega-se à constante de ionização da forma ácida, K_a :

$$K_a = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]} \quad \text{Equação 30}$$

Substituindo-se a **Equação 28** na **Equação 30** tem-se:

$$K_a = \frac{[H^+][A^-]}{K'[PA]} \quad \text{Equação 31}$$

Com os devidos rearranjos chega-se à constante de ionização aparente do indicador ácido K_i :

$$K_i = \frac{[H^+][A^-]}{[PA]} = K_a K' \quad \text{Equação 32}$$

Desta forma, a concentração de H^+ é dada por:

$$[H^+] = K_i \frac{[PA]}{[A^-]} \quad \text{Equação 33}$$

onde: K_i representa a constante de ionização aparente do indicador ácido.

$[A^-]$ representa a concentração da forma ionizada.

Então, a mudança de cor do indicador é associada à concentração de íons H^+ , em concordância com a teoria de Ostwald. A diferença é simplesmente que K_i é a constante de ionização aparente do processo e seu valor é igual ao produto da constante de ionização real e a constante do equilíbrio pseudo-ácido.

Os valores de pK_a e pK_i são obtidos pelo valor de pH onde ocorre a mudança de cor do indicador. A mudança de cor de um indicador geralmente se estende por uma faixa de pH. Esta faixa é chamada de *região de transição* ou *intervalo de transição* e é definida por $pK_i \pm 1$. Nesta região as cores das várias formas do indicador coexistem.

Os mecanismos das mudanças de cores das principais classes de indicadores de pH convencionais, que incluem os corantes azo, nitrofenóis, ftaleínas e sulfonaftaleínas são claramente explicados tanto pela teoria de Ostwald, como pela teoria cromófora. No entanto, os mecanismos de mudanças de cores dos indicadores naturais obtidos a partir da extração de antocianinas de espécies vegetais são bem mais complexos e ainda são objetos de estudos.

8.3. Experimentação no ensino de Química

As perspectivas de trabalho pedagógico que podem ser desenvolvidas com a utilização de extratos de frutas contendo antocianinas em atividades didáticas representam uma importante ferramenta para fortalecer a articulação da teoria com a prática. Isto é bastante desejável por favorecer o sucesso do processo de ensino/aprendizagem, o que nem sempre é tarefa trivial, principalmente quando o tema é a Química.

A contextualização do ensino é fundamental para que a aprendizagem seja efetiva e isto fica bem claro na essência dos Parâmetros Curriculares Nacionais (PCN's) nos quais se preconiza que *“a concepção curricular seja transdisciplinar e matricial, de forma que as marcas das linguagens, das ciências, das tecnologias e, ainda, dos conhecimentos históricos, sociológicos e filosóficos, como conhecimentos que permitem*

uma leitura crítica do mundo, estejam presentes em todos os momentos da prática escolar" (Parâmetros Curriculares Nacionais 2001).

Os PCN's representam a proposta para o Ensino Médio, fundamentada nos critérios estabelecidos pela Lei de Diretrizes e Bases da Educação Nacional, LDB/96 (Lei 9.394/96) e regulamentados pela Câmara de Educação Básica do Conselho Nacional de Educação (Parecer nº 15/98, aprovado em 01/06/98, Resolução CEB/CNE nº 03/98), com uma ampla discussão sobre temas multidisciplinares e interdisciplinares. Os assuntos devem ser propostos e tratados de uma maneira global, articulando-se competências e habilidades que serão desenvolvidas em cada disciplina e nos conjuntos das disciplinas, em cada área e no conjunto das áreas (Parâmetros Curriculares Nacionais 2001).

Com relação ao ensino de Química, além de temas interdisciplinares, os PCN's enfatizam a exploração de conceitos químicos a partir do cotidiano dos alunos. Além disso, destaca-se que a experimentação na escola média tem função pedagógica e desenvolve habilidades cognitivas, tais como controle de variáveis, tradução da informação de uma forma de comunicação para outra (gráficos, tabelas e equações químicas), elaboração de estratégia para resolução de problemas, tomada de decisão baseada em análises de dados e valores, respeito às idéias dos colegas e colaboração no trabalho coletivo (Parâmetros Curriculares Nacionais 2001).

Os PCN's também trazem uma sugestão de abordagem didática para os conteúdos de Química, tendo como ponto de partida a apresentação de fatos concretos, observáveis e mensuráveis, ou seja, a exploração de aspectos qualitativos, já que os conceitos que o aluno traz para a sala de aula advêm principalmente de sua leitura do mundo macroscópico. Após o estudo dos fatos macroscópicos, inicia-se a construção de modelos microscópicos e matemáticos, abordando os aspectos quantitativos.

Com relação ao Ensino Superior, os princípios das Diretrizes Curriculares para os Cursos de Graduação também preconizam fortalecer a articulação da teoria com a prática.

De acordo com os principais pontos abordados pelos PCN's e pelos princípios das Diretrizes Curriculares para os Cursos de Graduação em Química, a proposta

didática inserida neste projeto, que consiste na elaboração de experimentos utilizando extratos vegetais, é plenamente pertinente.

Além de a experimentação no ensino ser recomendada na legislação educacional vigente no Brasil, experimentos bem planejados podem proporcionar importantes oportunidades para os alunos vivenciarem situações de investigação, o que contribui favoravelmente para o processo de construção do conhecimento (Beltran e Ciscato 1991, Moreira 1981).

Muitas pesquisas têm sido desenvolvidas visando uma análise crítica sobre o papel da experimentação no ensino de Química. Schnetzler e Aragão (1995) relataram que aulas experimentais constituem um espaço constante de investigação que leva a uma contínua reflexão e revisão sobre o trabalho dos professores e o aprendizado dos alunos. Hodson (1993) afirmou que o ensino de disciplinas científicas deve ocorrer principalmente pela realização de experimentos.

Recentemente, no I Encontro Paulista de Pesquisadores de Ensino de Química – EPPEQ, realizado no Instituto de Química da UNICAMP em 17 e 18 de setembro de 2004, a experimentação no ensino de Química foi um tema amplamente discutido, tomando por base o texto *“The laboratory in science education: foundations for the twenty-first century”* (Hofstein e Lunetta 2004). Nestas discussões, foi constatado que é necessário o estudo de alternativas metodológicas experimentais para a melhoria do ensino fundamental e médio. Além disso, é preciso inserir a experimentação na formação inicial do professor de Química, para que ele possa compreender o papel fundamental da experimentação no ensino de Química.

Entretanto, na prática atual, a opinião dos educadores sobre o uso de aulas experimentais no Ensino Fundamental está dividida principalmente por limitações relacionadas com a infra-estrutura das escolas e a formação dos professores. Dados que evidenciam estes aspectos foram obtidos em diversas ocasiões de interação com professores que lecionam Química no Ensino Médio, quando a autora desta tese atuou na coordenação de atividades experimentais em diversos eventos relacionados ao ensino de Química: I, II, III e IV SIMPEQ, 1º Fórum de Professores de Química do Ensino Médio e I EPPEQ.

Aspectos como segurança, material necessário, tempo de execução e um bom roteiro são aspectos importantes para a criação de uma atividade experimental didática

adequada e eficiente. Isto exige trabalho adicional do professor, que muitas vezes não possui tempo hábil para a elaboração destas aulas.

Outro aspecto que contribui significativamente para que aulas experimentais não sejam realizadas freqüentemente no Ensino Médio está relacionado à infra-estrutura da maioria das escolas públicas, que poucas vezes é adequada.

Visando amenizar estas limitações e considerando os principais pontos abordados pelos PCN's e pelos princípios das Diretrizes Curriculares para os Cursos de Graduação em Química, os estudos inseridos neste projeto envolveram o desenvolvimento de experimentos alternativos tendo como principais características a simplicidade e o baixo custo.

8.4. Uso de extratos antociânicos naturais no ensino de Química

O uso de espécies vegetais contendo antocianinas em aulas experimentais apresenta potencialidade didática para o ensino de importantes conceitos e procedimentos da Química Analítica, Química Orgânica e Físico-Química.

Vários autores têm aproveitado a propriedade de mudança de cor das antocianinas em função do pH para aplicações no ensino de Química.

Em 1978, Forster desenvolveu um dos primeiros experimentos, voltado para o ensino de Química no nível fundamental, envolvendo o uso de extratos de plantas contendo antocianinas. O experimento consistiu do uso de extrato de repolho roxo para medidas de pH (Forster 1978).

Mebane e Rybolt (1985) relataram o uso de diversos extratos vegetais, entre eles, maçã, repolho roxo, cebola roxa, cereja, pêssego, tomate, pêra, rabanete e nabo para a construção de escalas de cores em função do pH.

Na Universidade de Nebraska, Curtright e outros (1994 e 1996), propuseram o uso de extratos de uva, morango, cebola roxa, *cranberry*, *raspberry* e *blueberry* (murtilo) para a demonstração de importantes conceitos químicos, tais como, absorção de luz por compostos orgânicos, equilíbrio químico e pK_a . Eles também utilizou alguns destes extratos para a ilustração da técnica de cromatografia em papel.

Kanda e colaboradores (1995) relataram o uso de feijão preto, uva, cebola roxa, azaléia e outros vegetais típicos do Japão, para a demonstração da reversibilidade de equilíbrio químico para alunos do ensino fundamental.

No Brasil, alguns estudos nesta área também têm sido desenvolvidos. Extratos de várias flores e de feijão preto foram utilizados em aula, para a determinação do ponto final em titulações de neutralização na Universidade Federal de São Carlos (Couto *et al.* 1998, Soares e Cavalheiro 2001), enquanto que o extrato de maria-preta foi utilizado para a demonstração da Lei de Beer e da reversibilidade de equilíbrio químico (Ramos *et al.* 2000).

Extratos de repolho roxo foram aplicados em atividades educacionais para determinar a acidez de diversas substâncias de uso doméstico e num estudo teórico dos princípios responsáveis pelas mudanças de cores (GEPEC 1995, Gouveia-Matos 1999).

Diversos trabalhos também foram apresentados em congressos científicos nacionais, abordando o uso de extratos vegetais contendo antocianinas para o ensino de Química, tanto no nível médio como no superior (Teixeira *et al.* 1995, Ramos 2000, Calafati *et al.* 1988, Rossi e Pinheiro 1999, Soares *et al.* 2000, Bernardino *et al.* 2000, Lopes *et al.* 2001, Lopes e Rossi 2001).

Extratos naturais contendo antocianinas também podem ser utilizados no Ensino Superior quando, a partir de tópicos fundamentais, busca-se o aprofundamento conceitual e a abordagem de tópicos mais elaborados em atividades experimentais propostas com maior sofisticação. Neste caso, podem ser estudados temas envolvendo equilíbrio químico, indicadores de pH, determinação do ponto final de titulações, verificação da Lei de Lambert–Beer e espectros de absorção molecular, além de aspectos relacionados ao processo de extração e separação do composto de interesse. No decorrer das atividades experimentais realizadas nesta tese, foi observado que extratos antociânicos também podem ser utilizados para ilustrar, em termos qualitativos, a Lei de Fick. Isto está descrito detalhadamente no capítulo 10.

Capítulo 9

OBJETIVOS

Com relação aos aspectos didáticos, este trabalho foi realizado visando desenvolver as seguintes propostas:

- revisão bibliográfica dos aspectos históricos dos indicadores ácido-base;
- aplicação de experimentos utilizando extratos de antocianinas,^{*} em diferentes níveis de ensino: Médio, Técnico em Química e Superior em Química;
- avaliação do potencial didático dos experimentos, consultando a opinião de professores e alunos participantes das aulas de aplicação;
- avaliação do potencial didático de experimentos, utilizando antocianinas para a abordagem de conceitos de equilíbrio-químico, ácido-base e pH através de um trabalho de pesquisa de opinião, consultando professores de Ensino Médio de Campinas e região.

^{*} Foram utilizados extratos aquosos ou alcoólicos obtidos pelos procedimentos descritos no capítulo 5 desta tese. Os experimentos realizados foram fundamentados nas reações de equilíbrio-químico das antocianinas em meio aquoso.

CAPÍTULO 10

DESENVOLVIMENTO

Os experimentos descritos no tópico “*Avaliação da propriedade ácido-base das antocianinas*” do Capítulo 5 foram aplicados nos diferentes níveis de ensino: Médio, Técnico e Superior em Química, visando um estudo dos aspectos didáticos inseridos nestas atividades. A escolha das frutas utilizadas nestas aulas experimentais foi feita de acordo com a facilidade de obtenção das mesmas.

Este trabalho foi dividido em 3 frentes de estudos: uma relacionada ao Ensino Técnico em Química, outra ao Ensino Médio e outra ao Ensino Superior em Química. Esta divisão pareceu adequada, pois os conceitos envolvidos e os conhecimentos prévios dos alunos de cada frente eram distintos e foram abordados de formas diferentes.

Os experimentos foram avaliados pelos alunos e pelos professores envolvidos.

10.1. Aplicação dos experimentos nos diferentes níveis de ensino

Para a verificação da validade do trabalho realizado, em todas as aulas experimentais realizadas nos diferentes níveis de ensino, os alunos foram submetidos a testes e questionários para críticas e sugestões ao trabalho.

10.1.1. Ensino Técnico

As atividades foram desenvolvidas no 1º semestre de 2000 na Escola Técnica Estadual Conselheiro Antônio Prado (ETECAP), situada à avenida Cônego Antônio Roccato s/n, Jardim Santa Mônica - Campinas-SP. Foram testadas duas abordagens distintas, com turmas e professores diferentes.

A primeira abordagem foi aplicada de maneira tradicional. Inicialmente, os alunos participaram de uma aula teórica sobre o conceito de deslocamento e reversibilidade de equilíbrio químico e a complementação dos estudos sobre titulação ácido-base; depois, realizaram a aula experimental. A aplicação desta abordagem foi feita com 12 alunos do 4º ano (último ano) do Curso Técnico em Química, abrangendo 2 aulas de 50 min. A duração total da atividade, incluindo aula teórica, aula prática e avaliação, foi de aproximadamente 2,5 h, divididas em 2 dias de aula, conforme descrito a seguir:

1^o dia (aula teórica): envolveu a definição dos conceitos fundamentais relacionados a reversibilidade e deslocamento de equilíbrio químico e a revisão dos conceitos sobre titulação ácido-base. Foram apresentadas as reações de equilíbrio químico das antocianinas em meio aquoso e discutiu-se a extração destes pigmentos a partir de frutas. Esta aula foi realizada na véspera da prática e durou cerca de 30 min.

2^o dia (aula prática): no laboratório, utilizando cascas de uva, os alunos extraíram as antocianinas com água e aquecimento, caracterizaram visualmente as diferentes colorações apresentadas pelo extrato nos diferentes pHs e construíram uma escala de cores em função do pH, dando ênfase às reações de deslocamento de equilíbrio químico envolvidas. A seguir, utilizaram o extrato de uva como indicador ácido-base para a determinação da concentração de uma amostra sintética de HCl. Os resultados obtidos foram comparados com os obtidos com o uso de fenolftaleína. Todas as etapas do procedimento foram discutidas na aula teórica. Para a realização dos experimentos, os alunos foram divididos em 6 duplas e os experimentos foram realizados em duplicata. O experimento durou cerca de 2 h. Após o experimento, os alunos responderam um questionário de avaliação - **Quadro 1**.

Quadro 1. Questionário de avaliação - Ensino Técnico Abordagem Tradicional.

1. Defina volumetria de neutralização.
 2. O que é um indicador ácido-base? Por que ele é utilizado na volumetria de neutralização?
 3. Você sabia que é possível extrair indicadores ácido-base de vegetais?
 4. Na sua opinião, o uso de extrato de uva como indicador ácido-base é viável? Há perspectiva de aplicações analíticas para o indicador de extrato de uva? Justifique.
 5. A figura abaixo mostra o equilíbrio químico da antocianina, uma substância presente no extrato de uva que age como indicador ácido-base. Explique, com base no equilíbrio mostrado, como ocorre a mudança de cor da antocianina em função do pH.
- The diagram illustrates the chemical equilibrium of an anthocyanin molecule. On the left, the molecule is in its protonated form, labeled '(vermelho)'. It features a central oxygen atom bonded to two phenyl rings, each substituted with an 'O Açúcar' group. The rightmost ring has a hydroxyl group (-OH) and an 'R' group. On the right, the molecule is in its deprotonated form, labeled '(verde azulado)', where the hydroxyl group has been replaced by an oxygen atom with a negative charge, and a proton (H+) is released. The two forms are connected by a double-headed equilibrium arrow.
6. Na sua opinião, experimentos como o do indicador ácido-base de extrato de uva deveriam ser incorporados nas práticas comuns do laboratório de ensino? Por que?
 7. Durante o experimento com o extrato de uva você teve curiosidade de saber mais sobre indicadores de origem natural e suas aplicações?
 8. O experimento com o extrato de uva ajudou a entender melhor a teoria da titulação ácido-base? Justifique.

É importante ressaltar que ambas as aulas foram ministradas pela autora deste projeto, tendo o acompanhamento da professora Raquel Tassara Nogueira.

A segunda abordagem, “não tradicional”, tratou do tema equilíbrio químico e indicadores naturais de pH. Neste caso, o método aplicado envolveu a apresentação de um problema (questionamento), seguido pela resposta a este problema e um posterior experimento como meio de se confirmar ou ilustrar a resposta obtida.

A aplicação desta abordagem foi feita com 38 alunos do 2º ano do Curso Técnico em Química, abrangendo 3 aulas de 50 min, sendo destinados cerca de 30 min para cada aula teórica e 2 h para a aula prática, conforme descrito a seguir:

1º dia (aula teórica): foi feita uma introdução sobre os métodos de determinação de pH e uma proposta de uma pesquisa bibliográfica sobre o assunto. Os alunos tiveram que pesquisar um método para a determinação do pH de uma solução sem utilizar um indicador comercial ou um pHmetro.

2º dia (aula prática): antes do início da aula prática, foi feito um debate sobre os métodos pesquisados para então se constatar a existência dos indicadores naturais. Em seguida, no laboratório, os alunos obtiveram e caracterizaram visualmente as diferentes colorações apresentadas pelos indicadores naturais isolados da casca da uva e da amora nos diferentes valores de pH; construindo uma escala de cores em função do pH. Para a realização desta etapa, foi entregue aos alunos o procedimento descrito no **Quadro 2**. Os professores apenas supervisionaram as atividades, visando contribuir para o desenvolvimento da autoconfiança e da capacidade dos alunos para tomarem decisões.

3º dia (aula teórica): diante da confirmação da atuação do indicador, os alunos deveriam constatar o deslocamento e a reversibilidade do equilíbrio químico pela variação da coloração do indicador, de acordo com o pH do meio. Então, conceitos de equilíbrio químico deveriam ser aprofundados com base nos resultados obtidos.

O experimento foi realizado com a colaboração do professor Marco Antonio Torres Cezário e da aluna de iniciação científica, e estudante do curso de Química da UNICAMP, Juliana Terra.

Quadro 2. Material distribuído aos alunos do Ensino Técnico para o experimento.

<p style="text-align: center;"><u>Materiais</u></p> <p>28 tubos de ensaio, Suporte para os tubos, Béquer de 250 mL, Béquer de 100 mL, Pipetas Paster, Proveta graduada de 10 mL, Funil de vidro, Papel analítico (de filtro), Soluções tampões, Solução de HCl 0,01 mol/L, Solução de NaOH 0,2 mol/L, Água destilada e Amora.</p>	<p><u>Questão 3:</u> É possível criar uma escala de pH em função da coloração da solução? Se sim, monte esta escala na forma de Tabela.</p> <p><u>Questão 4:</u> O que é e como atua um indicador ácido-base? O extrato de amora pode ser considerado um indicador deste tipo?</p>
<p style="text-align: center;"><u>Roteiro</u></p> <p><u>Etapa I: Obtenção do Indicador: em solução e papel</u></p> <p>1) Amasse algumas amoras em um recipiente para a obtenção do suco. 2) Escorra o suco para um béquer e descarte as frutas. 3) Dilua o suco na proporção de 1:3 suco / água destilada.</p> <p><u>Questão 1:</u> Qual a coloração adquirida pela solução resultante?</p> <p>4) Recorte um papel de filtro limpo em 14 tiras e mergulhe-as, RAPIDAMENTE, no extrato. Deixe-as secando a temperatura ambiente.</p>	<p><u>Etapa III: Obtenção da escala de pH em função da mudança de cor do papel indicador</u></p> <p>1) Repita os itens 1 e 2 da Etapa II. 2) Mergulhe as tiras de papel de filtro impregnadas com o extrato nas soluções tampões de diferentes valores de pH, e anote as observações feitas na forma de Tabela.</p> <p><u>Questão 5:</u> É possível utilizar o papel impregnado com o extrato de amora como papel indicador de pH? Por que? <u>Questão 6:</u> Você sabia da possibilidade de se extrair indicadores ácido-base de vegetais, flores e frutas? Você tem conhecimento de outras espécies das quais pode se extrair indicadores? Quais? <u>Questão 7:</u> Quais as possíveis aplicações que você sugere para o extrato de amora e quais as vantagens de usá-lo como indicador?</p>
<p><u>Etapa II: Obtenção da escala de pH em função da mudança de cor da solução contendo o indicador</u></p> <p>1) Numere 14 tubos de ensaio (de 1 a 14). 2) No tubo 1 adicione 5 mL da solução tampão de pH = 1; no tubo 2, 5 mL da solução tampão de pH = 2 e assim sucessivamente.</p> <p><u>Questão 2:</u> Visivelmente é possível identificar qual é a solução mais ácida e qual é a mais básica? Em termos de pH, como se diferencia uma substância ácida de uma básica?</p> <p>3) Adicione 3 gotas do extrato obtido na Etapa I em cada tubo de ensaio. Anote o que você observou após 10 segundos da adição do extrato.</p>	<p><u>Etapa IV: Verificação da mudança de cor pela adição de base ou ácido</u></p> <p>1) Em um béquer adicione 1 mL do extrato de amora. Em seguida, acrescente 10 mL da solução de HCl 0,01M. Eleve o pH da solução através da adição de uma solução de NaOH até a obtenção de uma coloração próxima à obtida para o tubo 14 da Etapa II. Adicionando mais HCl, diminua novamente o pH da solução e anote as suas observações.</p> <p><u>Questão 8:</u> O que você pode afirmar a respeito da reversibilidade do equilíbrio químico envolvido no sistema observado? <u>Questão 9:</u> Você sabe dizer porquê o extrato de amora adquire diferentes colorações conforme o pH do meio?</p>

10.1.2. Ensino Médio

No Ensino Médio, foi aplicado um método que se iniciou por um experimento sobre o qual foi feito um questionamento para que os alunos obtivessem, posteriormente, uma resposta. Desta forma, após realizarem o experimento, os alunos propuseram questões que achavam importantes, sendo então estimulados a procurarem as respostas.

A aplicação dos experimentos foi realizada com 38 alunos do 2º ano do Ensino Médio na ETECAP e com 40 alunos do segundo ano da Escola Estadual Professor Aníbal de Freitas (EPAF), situada na Rua 1º de março nº 38, no bairro Guanabara em Campinas – SP.

Devido ao pequeno enfoque experimental nas aulas de Química do Ensino Médio, a abordagem do trabalho foi feita de forma um pouco diferente daquelas propostas para o curso técnico. Em ambas escolas, aplicou-se um questionário de avaliação geral, **Quadro 3**, antes das aulas experimentais.

Quadro 3. Questionário aplicado aos alunos do Ensino Médio antes da realização do experimento.

- 1) Como é possível detectar a modificação de um material?
- 2) Como é possível constatar a modificação de um material em contato com outro?
- 3) Como estas modificações podem ser explicadas?
- 4) Estas modificações são “definitivas”?
- 5) O que há em comum entre o vinagre, o suco de limão e o meio estomacal (interior do estômago)?
- 6) O que há em comum entre a soda cáustica, a banana verde e o leite de magnésia?
- 7) O que difere os materiais da questão 5 e os da questão 6?
- 8) O que você sabe sobre pH?

Na EPAF, devido à impossibilidade do uso do laboratório, o experimento foi realizado de forma demonstrativa na própria sala de aula. Os materiais necessários (extratos indicadores de pH e soluções) para a aula demonstrativa foram preparados pela aluna de iniciação científica Juliana Terra e organizados em forma de um “kit” de demonstração. As atividades realizadas estão descritas a seguir.

1º dia (aula demonstrativa): foi feita uma demonstração para se verificar a eficiência dos indicadores naturais. Os alunos foram organizados num círculo, na própria sala de aula, de modo que todos pudessem visualizar a atividade. Durante a demonstração, os alunos observaram as diferentes colorações apresentadas pelos indicadores naturais em diferentes soluções. Em seguida foram questionados quanto ao motivo da mudança de cor das soluções.

2^o dia (aula teórica/demonstrativa): nesta aula foi feita uma exposição das definições e dos conceitos fundamentais relacionados à diferenciação das substâncias em classes (ácida, básica e neutra), pH e métodos de determinação de pH. Em seguida, foram apresentados aos alunos os indicadores sintéticos normalmente utilizados em análises químicas, como a fenolftaleína. Foi proposta a determinação do pH de alguns produtos facilmente encontrados em uma residência, como vinagre, amaciante de roupas, alvejante, leite de magnésia.

Os procedimentos utilizados nas aulas demonstrativas estão descritos no

Quadro 4.

Quadro 4. Procedimento utilizado para a demonstração do experimento aos alunos do Ensino Médio da EEPAF

<p><u>Materiais</u></p> <p>Copos plásticos transparentes, conta gotas, papel de filtro, soluções de HCl, soluções de NaOH, água, amora, sabonete, vinagre, leite de magnésia e suco de limão</p> <p><u>Roteiro</u></p> <p>Obs: Como a análise será feita apenas qualitativamente, o volume dos reagentes será aproximado e determinado de forma visual.</p> <p><u>Etapa I: Verificação da mudança de cor da solução conforme o meio usando o extrato de amora</u></p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Numere 7 copos plásticos (de 1 a 7). 2) No copo 1, adicione 3 mL da solução A. No copo 2, adicione 3 mL da solução B e assim sucessivamente, até que no copo 7 haja 3 mL da solução G. 3) Adicione 3 gotas do extrato de amora em cada copo. <p><u>Questão 1:</u> O que aconteceu com a cor do extrato após a adição das diferentes soluções?</p> <p><u>Questão 2:</u> Como você explicaria tal mudança?</p> <p><u>Etapa II: Verificação da mudança de cor pela adição de base ou ácido</u></p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Em um copo plástico adicione 1mL do extrato de amora. Em seguida, acrescente 3 mL de suco de limão. Adicione solução de NaOH estoque até a obtenção de uma coloração esverdeada. Adicione mais suco de limão. 	<p><u>Questão 3:</u> O que você pode afirmar a respeito das mudanças do sistema observado? Estas modificações são "definitivas"?</p> <p><u>Questão 4:</u> É possível criar uma escala que relacione o meio ácido ou básico em função da coloração da solução? De maneira geral, como esta escala varia?</p> <p><u>Etapa III: Obtenção e teste do extrato de amora</u></p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Amasse algumas amoras em um recipiente para a obtenção do suco. 2) Escorra o suco para um outro copo e descarte as frutas. 3) Dilua o suco na proporção de 1:3 suco / água. 4) Recorte um papel de filtro limpo em 6 tiras e mergulhe-as, RAPIDAMENTE, no extrato de amora obtido. Deixe-as secando a temperatura ambiente. 5) Numere 6 copos limpos (de 1 a 6). 6) Em copos diferentes adicione 3 mL de: vinagre (copo 1), leite de magnésia (copo 2), suco de limão (copo 3), sabonete (copo 4), da solução desconhecida H (copo 5) e da solução desconhecida I (copo 6). 7) Mergulhe uma tira de papel de filtro impregnada com o extrato em cada uma das soluções. <p><u>Questão 5:</u> O que aconteceu com a coloração do papel de filtro impregnado com o extrato de amora, quando este foi adicionado a cada uma das soluções acima?</p> <p><u>Questão 6:</u> Você acha que é possível relacionar a cor apresentada pelo papel e a acidez do meio? Se sim, como você classificaria as soluções desconhecidas H e I?</p>
---	---

3^o dia (aula teórica): neste dia, diante da confirmação da atuação do indicador, alguns conceitos abordados nas aulas anteriores foram aprofundados.

Na ETECAP, os alunos do Ensino Médio puderam usar o laboratório para a realização dos experimentos, como descrito a seguir:

1^o dia (aula prática): no laboratório, neste dia, foi realizada uma experiência para se verificar a atuação dos indicadores naturais. Os alunos obtiveram e caracterizaram visualmente as diferentes colorações apresentadas pelos indicadores naturais nos diferentes pHs, utilizando o procedimento descrito no **Quadro 5**. Em seguida, foram questionados quanto ao motivo da mudança de cor das soluções.

Nos demais dias de aula, foi aplicada a mesma proposta da EEPAF.

Estes experimentos foram realizados com a colaboração da professora responsável pela disciplina de Química da EEPAF, Aloísia Laura Moretto, e na ETECAP com o professor Marco Antonio Torres Cezário da ETECAP e a estudante Juliana Terra.

Quadro 5. Material distribuído aos alunos do Ensino Médio da ETECAP para o experimento.

<u>Materiais</u>	
<p>13 tubos de ensaio, suporte para os tubos, béquer de 250 mL, béquer de 100 mL, pipetas Pasteur, proveta graduada de 10 mL, funil de vidro, papel analítico (de filtro), chapa de aquecimento (ou bico de Bunsen), soluções de HCl, soluções de NaOH, água destilada, uva, leite, vinagre, sabonete e suco de limão.</p> <p style="text-align: center;"><u>Roteiro</u></p> <p><u>Etapa I: Verificação da mudança de cor da solução conforme o meio usando o extrato de uva</u></p> <p>1) Numere 7 tubos de ensaio (de 1 a 7). 2) No tubo 1, adicione 5 mL da solução A. No tubo 2, adicione 5 mL da solução B e assim sucessivamente, até que no tubo 7 haja 5 mL da solução G. 3) Adicione 5 gotas do extrato de uva em cada tubo de ensaio. Anote o que você observou, 10 segundos depois da adição do extrato.</p> <p><u>Questão 1:</u> O que aconteceu com a cor do extrato com a adição das diferentes soluções?</p> <p><u>Questão 2:</u> Como você explicaria tal mudança?</p> <p><u>Etapa II: Verificação da mudança de cor pela adição de base ou ácido</u></p> <p>1) Em um béquer adicione 1mL do extrato de uva. Em seguida, acrescente 10 mL da solução de HCl estoque. Adicione solução de NaOH estoque até a obtenção de uma coloração próxima à do tubo 7 na Etapa I. Adicione mais HCl e anote as suas observações.</p> <p><u>Questão 3:</u> O que você pode afirmar a respeito das mudanças do sistema observado? Estas modificações são "definitivas"?</p>	<p><u>Questão 4:</u> É possível criar uma escala que relacione o meio ácido ou básico em função da coloração da solução? De maneira geral, como esta escala varia?</p> <p><u>Etapa III: Obtenção e teste do extrato de uva</u></p> <p>1) Aqueça cascas de uva em água em uma proporção aproximada de 1:3 casca/água (m/V) por 20 minutos. Cuidado para não deixar ferver, mantenha a temperatura por volta de 60 °C. Acima de 70 °C pode haver decomposição das antocianinas, substâncias presentes na casca da fruta que são responsáveis por sua coloração.</p> <p>2) Espere a solução esfriar um pouco e então filtre em um papel de filtro (coador de café). Conserve o extrato (filtrado) em um frasco.</p> <p>3) Recorte um papel de filtro limpo em 6 tiras e mergulhe-as, RAPIDAMENTE, no extrato de uva obtido. Deixe-as secando a temperatura ambiente.</p> <p>4) Numere 6 tubos de ensaio (de 1 a 6).</p> <p>5) Em tubos de ensaio diferentes adicione 3 mL de: vinagre (tubo 1), sabonete (tubo 2), leite (tubo 3), suco de limão (tubo 4), da solução desconhecida H (tubo 5) e da solução desconhecida I (tubo 6).</p> <p>6) Mergulhe uma tira de papel de filtro impregnada com o extrato em cada uma das soluções.</p> <p><u>Questão 5:</u> O que aconteceu com a coloração do papel de filtro impregnado com o extrato de uva, quando este foi adicionado a cada uma das soluções acima?</p> <p><u>Questão 6:</u> Você acha que é possível relacionar a cor apresentada pelo papel e a acidez do meio? Se sim, como você classificaria as soluções desconhecidas H e I?</p>

10.1.3. Ensino Superior

A aplicação dos experimentos foi realizada durante uma aula prática da disciplina de Química Geral Experimental (QG 109) no 1^o semestre de 2003 com 73 alunos ingressantes no curso de Química da UNICAMP, em Campinas-SP.

O experimento foi intitulado “*Extração de corantes e o conceito da cor*” e abordou os seguintes aspectos: extração da antocianina, efeito do pH na cor do extrato e obtenção dos espectros de absorção nas regiões ácida e básica. A duração total do experimento, incluindo exposição teórica e realização das atividades experimentais foi de aproximadamente 4 h. A fruta utilizada no desenvolvimento destes experimentos foi o jambolão. Previamente à aula, um questionário prévio (**Quadro 6**) de avaliação foi entregue aos alunos e o roteiro experimental foi disponibilizado no *site* da disciplina (<http://pcserver.iqm.unicamp.br/%7Emgo/cursos/qg109/>) - **Quadro 7**.

Quadro 6. Questionário prévio de avaliação dos conhecimentos gerais dos alunos.

<p>Prezado estudante de QG109, Solicitamos sua colaboração para um estudo que faz parte de um trabalho de doutorado do IQ-UNICAMP. Basta responder o questionário abaixo que envolve aspectos que serão abordados em um experimento de QG109, do dia 12 de maio. O questionário é anônimo e não tem nenhuma relação com a avaliação da disciplina. Por favor, envie suas respostas antes de realizar o experimento. Muito obrigada!</p> <p>Doutoranda Daniela B. Lopes Terci Profa. Dra Adriana Vitorino Rossi</p> <p>1. Para que servem as aulas de laboratório de Química? a. Não sei avaliar. b. Para seguir roteiros e escrever relatórios. c. Para ilustrar e exemplificar a teoria. d. Para aprender conceitos e procedimentos da Química.</p> <p>2. O que você acha do uso de materiais naturais em aulas laboratório? a. Interessante. b. Inadequado. c. Indiferente.</p>	<p>3. Para a realização de uma aula experimental você acha que: a. Não tem condições de avaliar o que é necessário. b. Não é necessário material e equipamentos específicos para uma aula experimental. c. Um laboratório deve possuir os materiais e equipamentos fundamentais. d. Um laboratório deve possuir reagentes e equipamentos caros e modernos.</p> <p>4. Visualmente é possível identificar se uma solução é ácida ou básica? a. Não sei avaliar. b. Não é possível fazer esta identificação visual. c. Sim, pelo uso de indicadores de pH. d. Sim, pela diferença de cor das soluções ácidas e básicas.</p> <p>5. Em termos de pH, como se diferencia uma substância ácida de uma alcalina? a. Para substâncias ácidas, pH > 7. Para substâncias alcalinas, pH < 7. b. Para substâncias ácidas, pH < 7. Para substâncias alcalinas, pH > 7. c. Não sei avaliar.</p>	<p>6. É possível criar uma escala de pH em função da coloração da solução? a. Não sei avaliar. b. Não, pois a cor de uma solução não depende do seu pH e sim de sua estrutura. c. Sim, utilizando-se diferentes soluções coloridas. d. Sim, utilizando-se indicadores de pH e soluções de pHs conhecidos.</p> <p>7. É possível detectar visualmente situações de equilíbrio químico? a. Não sei avaliar. b. Não, pois equilíbrio químico está relacionado apenas com cálculos matemáticos. c. Sim, se a reação envolver mudanças algum aspecto visual. d. Sim e isto é válido para qualquer reação.</p> <p>8. A cor dos materiais relaciona-se com sua interação com a luz? a. Não, não faço ideia do que é responsável pela cor dos materiais. b. Não a cor dos materiais não é resultado de sua interação com a luz. c. Sim, a cor de um material é dada pela luz refletida por esse material. d. Sim, a cor de um material é dada pela luz absorvida por esse material.</p>
--	--	--

Quadro 7. Procedimento disponibilizado previamente à aula experimental.**A. EXTRAÇÃO DO CORANTE**

Pese um béquer de 50 mL limpo e seco. Retire a polpa do jambolão com a ajuda de uma espátula. Descarte a semente e coloque a polpa no béquer de 50 mL. Amasse a polpa com a ponta de uma bagueta de forma a fragmentá-la o máximo possível e pese novamente o bequer, determinando a massa de polpa.

A extração do corante da polpa do jambolão será feita através de sua imersão em etanol comercial 99,3%. Utilize um volume de etanol correspondente a três vezes a massa de polpa de jambolão que foi pesada.

Adicione o volume de etanol calculado sobre a polpa, no bequer de 50 mL e aqueça a mistura na chapa de aquecimento até cerca de 50 °C. Mantenha a mistura nesta temperatura por cerca de 40 min, sob agitação magnética. Use um termômetro para controlar a temperatura e tome cuidado para que a temperatura não passe de 50 °C.

Após os 40 min de aquecimento, filtre a solução em um funil analítico e recolha o filtrado em um erlenmeyer de 125 mL.

B. EFEITO DO pH NA COR DO EXTRATO

Com o auxílio de uma proveta de 10 mL, adicione, separadamente, 5 mL de cada uma das 5 soluções tampão (pH 2, 5, 7, 9 e 11) em 5 tubos de ensaio. Em seguida, adicione a cada um dos tubos 1,0 mL do extrato filtrado de jambolão.

Agite os tubos para homogeneizar as soluções e anote a cor obtida em cada um dos tubos.

Em um outro tubo de ensaio, coloque 2,0 mL de água destilada e meça o pH da água com uma tira de papel de pH. Em seguida adicione 10-12 gotas do extrato de jambolão e compare a cor obtida com as cores obtidas nos tubos, nos cinco pHs diferentes. É possível identificar a faixa de pH da água destilada usando o extrato como indicador?

Repita o item acima adicionando 5-7 gotas do produto de limpeza VEJA, aos 2 mL de água destilada. É possível concluir se o produto de limpeza é ácido ou básico, usando o extrato de jambolão como indicador?

Repita o item 3, usando vinagre no lugar da água destilada. É possível determinar o pH aproximado do vinagre, usando o extrato como indicador? Compare com o pH medido com um papel de pH.

Obs.: Anote a composição indicada no rótulo do produto de limpeza.

C. OBTENÇÃO DO ESPECTRO DE ABSORÇÃO DO EXTRATO DE JAMBOLÃO

Todos os grupos deverão obter o espectro de absorção das soluções nos pH 2 e 11. Cada grupo deverá obter também o espectro de uma solução em um pH intermediário de acordo com a tabela abaixo:

Para obter o espectro, preencha a cubeta com a solução até $\frac{3}{4}$ de seu volume, usando uma pipeta de Pasteur. Inicialmente, acerte o zero do instrumento usando uma cubeta com água destilada. Em seguida, insira a cubeta contendo a solução no espectrofotômetro e meça o valor da absorbância na faixa de 400 a 700 nm, fazendo leituras de 20 nm em 20 nm.

Obs.: Para obter o espectro da solução em pH 2, dilua previamente esta solução à metade de sua concentração, misturando 1,5 mL do extrato com 1,5 mL de solução tampão pH 2.

RELATÓRIO

Descreva as variações de cor dos extratos nos vários pH usados e discuta esta variação com base na protonação ou desprotonação da molécula de antocianina.

Desenhe os espectros obtidos na folha de papel milimetrado fornecida. Compare a posição dos máximos das bandas de absorção nos extremos de pH (2 e 10) com o espectro obtido no pH intermediário e comente a diferença entre eles em função do pH, com base na discussão do item acima.

Identifique os máximos de absorção nos espectros obtidos e associe a posição destes máximos com as cores observadas, usando o conceito de cor complementar.

Com base nas informações contidas no rótulo do produto de limpeza usado, escreva a reação química principal responsável pelo pH observado neste produto.

REFERÊNCIAS

Terci, D.B. L., Rossi, A.V.; "Indicadores naturais de pH: usar papel ou solução?"; Química Nova; 25 (4); 684; 2002.

Skoog D.A., West D.M., Holler F.J.; "Fundamentals of Analytical Chemistry"; cap. 22-24; 7th edition; Harcourt College Publisher; 1997.

Oehlweiler O.A.; "Teoria e Prática da Análise Quantitativa e Inorgânica"; vol. 3; cap. 23; Ed. Univ. de Barsília; 1968.

Vogel, A.I.; "Vogel's textbook of quantitative inorganic analysis including elementary instrumental analysis"; cap. 18; 4th ed.; Longman Scientific and Technical; 1986.

Skoog D.A., Holler, F.J., Nieman T.A.; "Princípios de Análise Instrumental"; cap. 13; 5a ed.; Bookman; 2002.

No início da aula, o professor responsável pela atividade, Dr. Marcelo Gazarolli de Oliveira, fez uma apresentação sobre o uso das antocianinas como indicador natural ácido-base, apresentando as reações de equilíbrio químico e as diferentes formas coloridas destes pigmentos em função do pH. Esta apresentação foi feita em paralelo como o uso de um indicador convencional e largamente utilizado, a fenolftaleína. A seguir, utilizando-se as antocianinas como exemplo, foi introduzido o conceito de cor, dando ênfase aos espectros de absorção e ao funcionamento de um espectrofotômetro. Posteriormente, os alunos realizaram as atividades experimentais tais como descritas no **Quadro 7**.

Ao término da aula experimental os alunos responderam a um outro questionário de avaliação - **Quadro 8**.

10.2. Avaliação dos experimentos por professores

Além da avaliação específica de cada professor, que aceitou colaborar com este estudo permitindo que esta proposta didática fosse aplicada em suas aulas, também foi realizado um estudo de avaliação dos experimentos somente com professores que atuam em diferentes níveis de ensino.

Este estudo foi feito pela autora desta tese, durante o II Simpósio de Profissionais do Ensino de Química (SIMPEQ)*, realizado no Instituto de Química da UNICAMP em 9 e 10 de novembro de 2002. A atividade completa, incluindo uma introdução prévia, parte prática e avaliação, durou 90 min. Os experimentos desenvolvidos utilizando-se extratos de frutas contendo antocianinas foram avaliados por 38 professores do Ensino Médio, dos quais 3 também ministram aulas no Ensino Superior.

No início da apresentação, foram discutidos alguns estudos sobre o uso de extratos naturais contendo antocianinas no Ensino Médio. Depois, os professores realizaram as atividades experimentais indicadas no **Quadro 9**. Após a atividade, os

* Trata-se de um evento destinado principalmente a professores do Ensino Médio da região de Campinas. É organizado, desde 2000, com a colaboração de docentes e estudantes do Instituto de Química da UNICAMP, sob a coordenação da Profa. Dra. Adriana Vitorino Rossi.

professores responderam a um questionário (**Quadro 10**), para se verificar a validade da proposta experimental.

Quadro 8. Questionário aplicado após a aula prática.

Prezado estudante de QG109,

Novamente solicitamos sua colaboração para um estudo que faz parte de um trabalho de doutorado do IQ-UNICAMP. Basta responder o questionário abaixo que envolve aspectos relacionados com o experimento de QG109, do dia 12 de maio. O questionário é anônimo e não tem nenhum vínculo com a avaliação da disciplina.

Muito obrigada!

Doutoranda Daniela Brotto Lopes Terci

Profa. Dra Adriana Vitorino Rossi

1. Sobre indicadores naturais:

- Você não sabia da existência.
- Você sabia da existência, mas não sabia como extrai-los.
- Você sabia da existência e sabia como extrai-los.
- Você sabia da existência e sabia como extrai-los, mas não sabia de suas aplicações.

2. Na sua opinião, o uso de extrato de jambolão como indicador de pH é viável?

- Não sei avaliar.
- Não, pois a coloração da solução não traz informações sobre pH.
- Sim, pois apresenta variações de cor em função da acidez do meio.

3. Por que o extrato de jambolão muda de cor conforme o pH do meio?

- Não é possível responder já que o pH não é afetado pela cor das substâncias.
- Isto acontece porque em pH diferentes ocorrem reações químicas irreversíveis, que destroem a estrutura das substâncias do extrato de jambolão.
- Isto acontece porque substâncias do extrato de jambolão participam de equilíbrios que envolvem modificações estruturais em diferentes pHs e diferentes estruturas apresentam coloração diferente.

4. É possível determinar o pH de soluções coloridas usando indicadores visuais?

- Não sei avaliar.
- Não, pois a cor da solução interfere na coloração final da solução após a adição do indicador de pH.
- Sim, pois a cor da solução varia com a adição de indicadores de pH.

5. Os espectros do extrato de jambolão obtidos em meio ácido e meio básico são diferentes?

- Não sei avaliar.
- Não, pois a coloração do extrato de jambolão não influencia no espectro de absorção.
- Sim, pois o extrato de jambolão apresenta coloração diferente em meio básico e ácido.

6. Experimentos como este, realizado com produtos naturais, deveriam ser incorporados nas aulas de laboratório de ensino de graduação?

- Não sei avaliar.
- Não, pois não contribui para o aprendizado da Química em termo científicos.
- Indiferente
- Sim, pois são interessantes.
- Sim, pois utilizam materiais simples e do conhecimento do aluno e isto facilita a organização da aula e estimula os alunos.

7. O uso de produtos naturais em experimentos é:

- Inadequado.
- Pouco ilustrativo e pouco interessante.
- Menos ilustrativo que os experimentos convencionais.
- Indiferente.
- Muito ilustrativo e interessante.

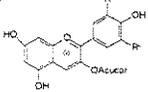
8. Você acha que este experimento pode ser adaptado para ser usado em outras disciplinas da Química?

- Não, pois é inadequado para o ensino de aspectos científicos.
- Não, é adequado apenas para as abordagens de conceitos de Química Geral.
- Sim, pois envolve aspectos da Química Orgânica, Química Analítica e Físico-Química.

9. Pensando em aulas práticas de Química no Ensino Médio:

- Não é preciso ter aula de laboratório no Ensino Médio.
- Os experimentos de graduação não podem ser aproveitados
- Os experimentos de graduação podem ser aproveitados diretamente.
- Os experimentos de graduação podem ser aproveitados com adaptações.

Quadro 9. Atividades experimentais realizadas pelos professores.

 <p>Extratos naturais: estudo de equilíbrio químico e determinação de pH</p>	<p>2. Obtenção de papel indicador ácido-base Deixar secar o papel de filtro utilizado na filtração dos extratos no procedimento de obtenção de soluções indicadoras. Recortar estes papéis em tiras de ~ 0,3 x 4,0 cm. Observar e anotar a coloração dos papéis de filtro impregnados com os extratos após a imersão das tiras em soluções básicas e ácidas.</p>
<p>Daniela Brotto Lopes Terci Instituto de Química – UNICAMP dblopes@iqm.unicamp.br</p>	<p>3. Construção de uma escala de pH utilizando o extrato natural Preparar soluções tampão com pHs variando de 1 a 14. Em tubos de ensaio adicionar 3 mL (~60 gotas) da solução tampão e 1 mL (~20 gotas) do extrato natural. Observar e anotar a coloração resultante após 30 segundos.</p>
<p><u>Introdução</u></p>	<p>4. Determinação do pH de produtos de uso doméstico Em tubos de ensaio adicionar 3 mL (~60 gotas) de soluções de uso doméstico (produtos de limpeza, vinagre, leite de magnésia, etc) e 1 mL (~20 gotas) do extrato natural. Observar e anotar a coloração resultante após 30 segundos.</p>
<p>As antocianinas - Figura 1 - são os principais pigmentos naturais responsáveis pela coloração avermelhada de flores e frutos. Estes compostos apresentam a propriedade de indicador ácido-base e são facilmente extraídos com solventes polares, tais como água e etanol.</p>	<p>5. Determinação da acidez e/ou basicidade de produtos de uso doméstico Com o auxílio de uma pipeta Pasteur ou conta-gotas, pingar uma gota da solução a ser testada sobre o papel indicador de pH. Observar a coloração resultante.</p>
 <p>Figura 1. Estrutura fundamental das antocianinas.</p>	<p>6. Estudo de reversibilidade de equilíbrio químico Preparar uma solução de pH 1, com ácido clorídrico. Adicionar 20 mL desta solução e 1 mL de extrato em um béquer. Elevar o pH da solução até 14, acrescentando-se soluções de NaOH e KOH, com um conta-gotas. Ao obter pH 14, acrescentar HCl para baixar o pH da solução novamente para 1. O procedimento de abaixar e elevar o pH de uma mesma solução contendo o extrato pode ser repetido por várias vezes, para a demonstração do conceito de reversibilidade de equilíbrio químico.</p>
<p>A diversidade dos conceitos envolvidos no estudo destas espécies, desde os procedimentos de extração até a explicação da mudança de cor dos extratos vegetais, representa a integração de conceitos e procedimentos das várias áreas da Química. Isto justifica o crescente interesse na elaboração de atividades didáticas experimentais com estes compostos, visando a aplicação pedagógica para o ensino de Química.</p>	<p><u>Referências</u> 1. Terci, D. B. L.; Rossi, A. V.; Quim. Nova 2002, 25(4), 684-688. 2. Terci, D. B. L.; Rossi, A. V.; Chagas, A. P. Livro de Resumos da 24ª RA SBQ2001, vol. 1, ED 57.</p>
<p><u>Parte experimental</u></p>	
<p>1. Obtenção de soluções indicadoras de pH Estas soluções podem ser obtidas por dois procedimentos diferentes. Para a escolha do procedimento devem ser levados em consideração aspectos como, disponibilidade de materiais e reagentes e tempo disponível.</p>	
<p>Procedimento 1. Imergir cascas de fruta em etanol na proporção 1:3 (m/V) e deixar em repouso por 24 horas, à temperatura ambiente. Materiais: béquer, espátulas, álcool comercial, funil, papel de filtro.</p>	
<p>Procedimento 2. Aquecer cascas de fruta em água na proporção 1:3 (m/V) por 30 min., a 60 °C. Materiais: béquer, espátulas, termômetro, funil, papel de filtro. Após a realização dos procedimentos 1 ou 2, filtrar o extrato e, assim a solução indicadora estará pronta.</p>	

Quadro 10. Questionário de avaliação dos professores participantes das atividades experimentais.

Instituição de Ensino: () pública () particular () outros: _____

1. Na sua opinião, atividades experimentais são importantes para o ensino/aprendizagem da Química?
() sim () não Comente: _____

2. O uso de extratos naturais apresenta aplicações didáticas? Se sim, quais os conceitos químicos que podem ser trabalhados? () sim () não Comente: _____

3. Considerando a infra-estrutura da escola onde você trabalha, as atividades experimentais realizadas aqui, utilizando extratos naturais, podem ser aplicadas?
() sim () não Comente: _____

4. As propostas dos Parâmetros Curriculares Nacionais para o Ensino Médio (PCNEM), além da ampla discussão sobre temas inter e transdisciplinares, enfatizam a abordagem dos conceitos químicos de forma contextualizada. Na sua opinião, as atividades didáticas com extratos naturais estão de acordo com as propostas dos PCNEM? () sim () não Comente: _____

Comentários e/ou sugestões: _____

Os resultados desta avaliação serão disponibilizados na homepage do II SIMPEQ.
Sua opinião é muito importante!
<http://gpquae.iqm.unicamp.br/simpeq.htm>

CAPÍTULO 11

RESULTADOS E DISCUSSÃO

11.1. Aplicação dos experimentos nos diferentes níveis de ensino

11.1.1. Ensino Técnico

Com a aplicação dos experimentos realizados na forma tradicional, pretendeu-se complementar a teoria sobre titulações ácido-base e explorar o conceito de equilíbrio químico em uma abordagem qualitativa, que propicia maior compreensão de aspectos relevantes associados a reações químicas. Tratou-se de uma proposta diferente das abordagens comumente encontradas nos livros didáticos, geralmente aplicadas na sala de aula, as quais tendem a enfatizar os aspectos quantitativos (matemáticos) relacionados a este conceito.

Os resultados obtidos pelos alunos visando a determinação da concentração de HCl numa solução aquosa, bem como as mudanças de cores das soluções em diferentes valores de pH, foram anotados em um quadro no laboratório, para que todos os alunos, individualmente, pudessem analisá-los e responder ao questionário de avaliação descrito no **Quadro 6** do capítulo 10.

Com uma aula teórica introdutória sobre o funcionamento e uso de indicadores ácido-base e uma aula prática, visando a concretização dos conceitos, os alunos avaliaram os experimentos realizados pelo preenchimento do questionário citado anteriormente. Os comentários da seqüência resultaram da leitura das respostas dos alunos ao questionário e da observação de seus comportamentos durante as aulas teóricas e práticas.

Na aula teórica, discutiu-se sobre indicadores explorando-se o conceito de equilíbrio químico, que é fundamental para a compreensão do funcionamento do indicador de pH. Acrescentou-se como exemplo, além dos indicadores convencionais, tais como fenolftaleína e vermelho de metila, entre outros, o uso de indicadores obtidos a partir de flores e frutos que contêm antocianinas em sua composição. Foi observado um grande questionamento dos alunos, quando se citou a possibilidade de obtenção de indicadores a partir de vegetais em relação à facilidade de obtenção, custo e interesse sobre a real funcionalidade destes extratos como indicadores e como isto aconteceria. Durante a aula, apresentou-se a fórmula estrutural genérica da antocianina, bem como os equilíbrios químicos envolvidos nas mudanças de cores da solução na qual ela se encontra.

Na primeira etapa da aula prática, que consistiu da obtenção do extrato de uva, observou-se um grande interesse dos alunos por estarem “produzindo” o indicador a ser utilizado nas titulações e não apenas estarem usando um reagente “pronto”. Alguns alunos tiveram a iniciativa de levar outros vegetais (maçã vermelha e tomate) para realizar testes à parte. Nenhum aluno conhecia a possibilidade de extrair indicador ácido-base de um vegetal e nem sabia explicar porque um indicador mudava de cor no decorrer de uma titulação.

Na segunda etapa da aula prática, que envolveu o estudo da mudança da cor da solução contendo o extrato de uva em função do pH do meio, observou-se grande interesse dos alunos em comparar as cores das soluções obtidas com as cores descritas na **Figura 3** (página 9), que representa os equilíbrios químicos das antocianinas em função do pH. Após o experimento, os alunos conseguiram explicar o funcionamento de um indicador ácido-base.

Na última etapa da aula, que consistiu na utilização do extrato de uva como indicador ácido-base para a determinação da concentração de uma amostra sintética de HCl, os alunos concluíram que é possível utilizar o extrato de uva como indicador ácido-base, porque não houve diferença entre os resultados da determinação utilizando fenolftaleína ou extrato de uva, como apresentado na **Tabela 42**.

Tabela 42. Resultados obtidos nos experimentos de determinação da concentração de HCl de uma amostra sintética utilizando fenolftaleína ou extrato de uva como indicadores.

Grupo	Concentração média, uso de fenolftaleína / mol L ⁻¹	Concentração média, uso de extrato de uva / mol L ⁻¹	Erro relativo / %
1	0,1042	0,1050	0,8
2	0,1050	0,1042	0,8
3	0,1050	0,1045	0,5
4	0,1050	0,1048	0,2
5	0,1045	0,1048	0,3
6	0,1050	0,1048	0,2

No primeiro dia da aplicação dos experimentos realizados numa abordagem não tradicional, o professor responsável reviu com os alunos alguns conceitos envolvendo pH e métodos para sua determinação. Em seguida, o professor sugeriu aos alunos uma pesquisa sobre a existência de produtos naturais que atuassem como indicador; estipulando um prazo de 15 dias para que a mesma fosse concluída.

Decorridos os 15 dias, um debate sobre a atuação dos indicadores naturais foi realizado, em sala de aula, entre os alunos e a então graduanda Juliana Terra. Em seguida, com base no procedimento proposto - **Quadro 1** - os alunos, divididos em trios, obtiveram, no laboratório, o indicador natural a partir de amora e verificaram a atuação do extrato como indicador ácido-base em solução e impregnado em papel de filtro. Também foi feito o estudo da mudança de cor da solução contendo o extrato indicador em função do pH do meio, numa tentativa de ilustração do deslocamento do equilíbrio químico. Durante a realização do experimento, foram feitas algumas questões aos alunos - **Quadro 1** - visando estimular sua atenção para os resultados que estavam sendo obtidos.

No último dia, foram necessários cerca de 40 min numa aula teórica sobre alguns conceitos envolvidos no experimento, como equilíbrio químico, indicadores ácido-base e pH, além de uma discussão sobre a utilização dos indicadores.

Pela observação do comportamento dos alunos nas aulas teóricas e práticas e segundo seus próprios comentários, foi possível fazer algumas constatações.

Como o trabalho foi realizado durante o horário de aula do professor Cezário, foi necessário adequá-lo de acordo com sua metodologia de trabalho. No primeiro dia de aula, por exemplo, quando se iniciou a aplicação do trabalho, a sugestão da pesquisa foi feita pelo próprio professor. A idéia inicial era que os alunos pesquisassem um método para a determinação do pH de uma solução sem utilizar um indicador comercial ou um pHmetro e, então, como resultado da pesquisa, descobrissem a existência dos indicadores naturais. Porém, o professor propôs aos alunos uma pesquisa relacionada à existência de produtos naturais que atuam como indicador de pH. Ou seja, o método que deveria ser aplicado no Ensino Técnico e que constituía na apresentação de um problema (questionamento), seguida pela resposta a este problema e um posterior experimento como meio de se confirmar ou ilustrar a resposta obtida não foi totalmente cumprido, uma vez que o professor revelou de início a resposta do problema.

Com relação à parte experimental, foi verificado que os estudantes já possuíam um conhecimento sobre a atuação de algumas espécies vegetais como indicador, mas desconheciam esta propriedade na amora. Alguns alunos levaram outros vegetais que julgavam apresentar esta propriedade, como berinjela, jabuticaba e algumas flores.

Num primeiro momento, os alunos se mostraram interessados em “produzir” seu próprio indicador. Entretanto, as mudanças de cor do extrato de amora não ocorrem de forma brusca, mas de forma gradual, muitas vezes é impossível ao olho humano diferenciar a coloração em dois pHs muito próximos. Esta constatação fez com que muitos alunos questionassem a adequação do uso do extrato de amora como indicador de pH, chegando alguns até a negar esta adequação.

O que mais atraiu a atenção dos alunos foi verificar a reversibilidade do equilíbrio químico estabelecido. À medida que solução de NaOH era adicionada ao extrato, observava-se uma alteração de cor do vermelho até amarelo. Neste ponto, a adição da solução de HCl propiciava o retorno da cor vermelho inicial. Esta variação de cor instigou os alunos a tentarem responder o que estava ocorrendo, com base em seus conhecimentos prévios de equilíbrio químico.

Após a realização da atividade, foi solicitado ao professor Cezário que respondesse um questionário de avaliação sobre a aplicação didática dos indicadores naturais, **Quadro 11**. Segundo ele, os resultados seriam mais satisfatórios com outra abordagem, pois, “*no ensino técnico, a pesquisa não é um fator tão relevante*”. O professor também citou a dificuldade de obter as soluções tampão para o experimento.

10.1.2. Ensino Médio

Antes da realização do experimento, foi solicitado que os alunos respondessem um questionário – **Quadro 2** - visando investigar seus conceitos sobre ácido, base, reações químicas e pH.

Os procedimentos adotados na aplicação do projeto precisaram ser adequados à infra-estrutura de cada escola. Na ETECAP, o experimento proposto foi realizado pelos próprios alunos, em laboratório, utilizando as vidrarias disponíveis e as soluções fornecidas. Na EEPAF, apesar da existência de um laboratório químico bem equipado mas não utilizado para fins didáticos, o experimento foi realizado de forma demonstrativa. A então graduanda Juliana Terra realizou o experimento e os alunos “atuaram” como espectadores. Esta situação foi imposta pela própria direção da escola

que mantém o laboratório fechado, com receio de roubo e depredação por parte dos alunos.

Quadro 11. Questionário respondido pelo professor.

<p><u>Qual a importância, para você, das atividades experimentais no processo ensino/aprendizagem de Química?</u></p> <p>Toda atividade que possibilite a complementação da teoria ou vice-versa é de suma importância no processo de aprendizagem pois possibilita uma maior integração de conceitos e possibilita ainda uma maior vivência com situações reais além de estimular a pesquisa e o desenvolvimento de habilidades motoras e raciocínio lógico-formal.</p>	<p><u>Os resultados obtidos com a atividade foram satisfatórios? Quais mudanças deveriam ser feitas para que se obtivesse melhores resultados?</u></p> <p>Sim, principalmente para os alunos do Ensino Médio. Eventuais modificações com respeito ao experimento aplicado para os alunos do Ensino Técnico devem estar relacionadas à abordagem aplicada pois ela envolveu um certo grau de dificuldade, já que, para a mesma, foi necessário uma pesquisa bibliográfica e discussão prévia a respeito do procedimento.</p>
<p><u>O uso de indicadores naturais apresenta, na sua opinião, aplicações didáticas? Em que você baseou a sua resposta?</u></p> <p>Sim. A viabilidade da utilização dos indicadores naturais, na minha concepção, pode ser estendida a pelo menos três situações:</p> <ul style="list-style-type: none"> - a questão econômica e a dificuldade, principalmente para algumas escolas da rede estadual e municipal de ensino, no sentido de conseguir-se os indicadores tradicionais de custo geralmente elevado. - a produção/extração destes indicadores não restringe a prática experimental apenas na utilização dos mesmos mas também a própria extração pode funcionar como uma aula prática para conhecimento de um processo físico-químico de separação, o significado do termo tingimento, corante, etc. - a sua utilização propriamente dita nos processos ácido/base e também confecção de outras escalas de pH, bem como sua facilidade de manuseio. 	<p><u>Como você caracteriza o interesse e a motivação dos alunos na realização da atividade?</u></p> <p>Em termos do Ensino Médio o interesse se mostrou muito maior devido ao fato dos mesmos estarem aprendendo na teoria a grande maioria dos tópicos abordados, fato que no Ensino Técnico talvez tenha se mostrado um pouco menos desafiador, devido ao próprio estágio em que os alunos se encontram.</p>
<p><u>Quais os tópicos de Química que você poderia abordar com a realização da atividade apresentada?</u></p> <p>Equilíbrio iônico A/B, Produto iônico da água, Extração com solvente, Técnicas de separação (filtração), Ressonância e funções orgânicas (quando possível) e Aspectos biológicos relacionados com Botânica</p>	<p><u>Cite os pontos problemáticos da proposta.</u></p> <p>Talvez para escolas que não possuam uma mínima infraestrutura a implantação da metodologia provavelmente poderia ser comprometida no que tange à confecção dos tampões e conseqüentemente da escala de pH, em nível do Ensino Médio. No caso do Ensino Técnico observamos que a proposta envolvendo um maior desafio para os alunos talvez fuja um pouco da própria proposta do modelo das bases tecnológicas em que o Ensino Técnico está fundamentado e o estímulo à pesquisa normalmente não ocorre.</p> <p><u>Considerando todos os aspectos envolvidos, você pretende introduzir a atividade com indicadores naturais em suas aulas? Explique.</u></p> <p>Sim, particularmente no Ensino Médio onde a receptividade para com o experimento bem como sua organização e sequenciamento são bastante didáticos.</p>

Outra diferença relevante entre os métodos aplicados nestas escolas foi o material utilizado. Na ETECAP, o indicador foi obtido a partir da casca da uva e foram utilizadas vidrarias de laboratório, de uso freqüente dos alunos, como proveta e erlenmeyer. Por outro lado, na EEPAF, utilizou-se amora como fonte de obtenção do indicador, além de terem sido usados materiais alternativos como copos plásticos, frascos de vidro e conta-gotas no lugar do material de laboratório.

Em ambas as escolas, dois dias de aulas foram suficientes para a realização das atividades, sendo, para a ETECAP, o equivalente a aproximadamente 100 min e para a EEPAF cerca de 90 min, uma vez que nesta escola o experimento foi demonstrativo.

O primeiro dia consistiu na verificação da propriedade de indicador de pH dos extratos obtidos a partir das frutas (amora ou uva), tanto na forma de solução como impregnado em papel de filtro. Os alunos também verificaram a mudança de cor do indicador pela adição de base ou ácido (variação do pH do meio), constatando a reversibilidade e o deslocamento do equilíbrio químico. Para estimular o interesse dos alunos, alguns produtos de uso doméstico, como vinagre, limão, leite e sabonete foram “analisados” a partir do papel impregnado com o indicador para mostrar uma forma de determinação de pH. O procedimento experimental realizado pelos alunos da ETECAP está no **Quadro 3**, enquanto o procedimento para os alunos da EEPAF está no **Quadro 8**. Durante o experimento, os alunos responderam um questionário, incluído nos referidos procedimentos experimentais que foram distribuídos.

No segundo dia de aula, foi feita uma exposição das definições e conceitos fundamentais relacionados à classificação das substâncias em ácidas, básicas e neutras, pH e métodos para sua determinação. Também foram introduzidos alguns tópicos de equilíbrio químico para posteriormente realizar-se um debate sobre a utilização didática dos indicadores naturais.

Antes da realização do experimento, os alunos responderam a um questionário para se investigar quais eram seus conceitos sobre ácido, base, reações químicas e pH, **Quadro 2**. Considerou-se necessária esta investigação para saber se os alunos tinham os conceitos fundamentais para o entendimento do experimento a ser realizado.

Os alunos de todas as turmas de Ensino Médio envolvidas no projeto (cerca de 40 alunos por turma) mostraram, de maneira geral, ter algum conhecimento prévio sobre ácidos e bases e as possíveis formas de identificar a ocorrência de reações químicas, **Figura 54**. Porém, estes alunos mostraram desconhecer o significado de pH. Assim, tomou-se o cuidado de introduzir os conceitos de pH e apresentar informações sobre indicadores ácido-base na aula teórica.

Os procedimentos adotados em cada escola de Ensino Médio foram diferentes em virtude da infra-estrutura disponível. As observações feitas durante a realização das aulas teóricas e práticas e os comentários dos próprios alunos serão expostas separadamente por escola.

Na EEPAF, durante toda a exposição do experimento, os alunos se mostraram atentos e interessados, o que, segundo a professora Moretto, foi um comportamento

muito diferente do comum, para aquelas turmas. A utilização de substâncias e materiais conhecidos na atividade experimental gerou muito interesse.

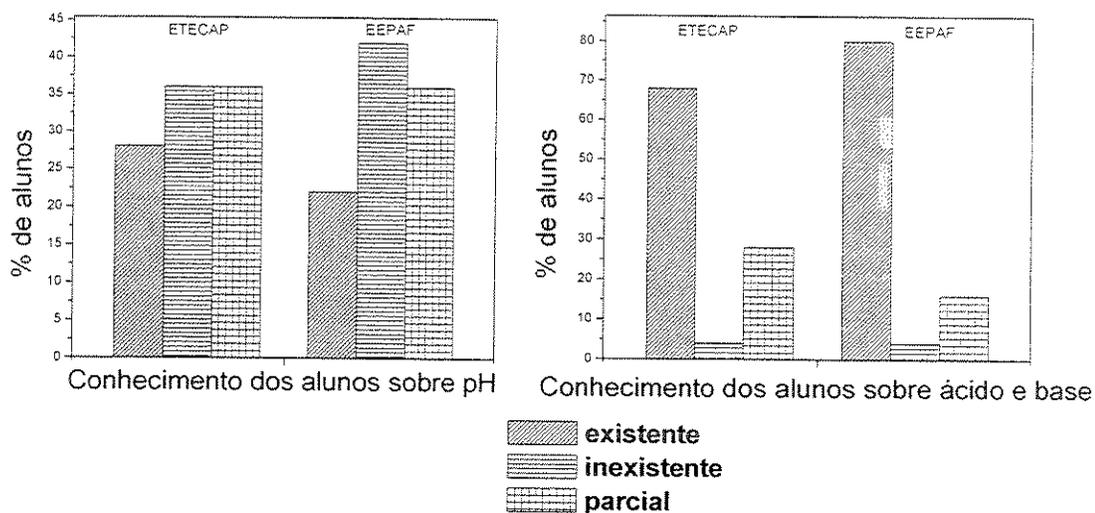


Figura 54. Conhecimentos prévios dos estudantes sobre alguns temas relacionados com a proposta didática.

Ao verificarem que a solução de NaOH proporcionou ao extrato de amora uma coloração diferente daquela observada com o suco de limão, os alunos começaram a indagar sobre as soluções incolores desconhecidas que foram usadas, concluindo que algumas eram ácidas e outras básicas.

A demonstração da variação da coloração do meio contendo o extrato pela adição de base ou ácido e a constatação de que as mudanças não eram definitivas foi o que mais estimulou a curiosidade dos alunos.

Com a demonstração experimental, o aprendizado e o interesse sobre pH e métodos para determiná-lo, assim como os conceitos fundamentais sobre equilíbrio químico, introduzidos na aula teórica, foram alcançados. Isto foi comprovado, posteriormente, em um debate entre os alunos e a então graduanda Juliana Terra que acompanhou as atividades na escola, além dos trabalhos dos alunos solicitados pela professora Moretto.

O debate sobre a utilização didática dos indicadores naturais revelou que os alunos gostariam que mais atividades experimentais lhes fossem apresentadas, pois, segundo eles, estas atividades servem para esclarecer muitos conceitos estudados apenas de forma teórica, com os livros didáticos.

Segundo as respostas da professora Moretto ao questionário de avaliação da atividade, **Quadro 12**, a proposta desenvolvida foi “*um excelente método para atrair a atenção dos alunos para a Química, disciplina geralmente “detestada” pelos alunos, e introduzir de uma maneira mais interessante diversos conceitos, principalmente os relacionados ao equilíbrio químico*”. As turmas envolvidas, segundo a professora, são formadas por alunos, em geral, desinteressados e com sérios problemas de comportamento. A atividade permitiu o estabelecimento de um melhor relacionamento entre o professor e os estudantes, facilitando o processo ensino/aprendizagem. A professora aprovou a proposta e aplicou-a em outras escolas onde lecionava.

Quadro 12. Questionário respondido pela professora.

<p><u>Qual a importância, para você, das atividades experimentais no processo ensino/aprendizagem de Química?</u></p>	<p><u>Os resultados obtidos com a atividade foram satisfatórios? Quais mudanças deveriam ser feitas para que se obtivesse melhores resultados?</u></p>
<p>Em essencial, o contato com situações experimentais torna a aula muito mais interessante, desperta a curiosidade dos alunos, instiga os mesmos a formularem hipóteses sobre os fatos observados; é um processo mais dinâmico, os alunos participam mais.</p>	<p>Acredito que sim, mas seria melhor responder esta questão daqui a algum tempo, para avaliara a assimilação e compreensão dos conceitos; seria interessante que os alunos pudessem realizar a atividade <u>Como você caracteriza o interesse e a motivação dos alunos na realização da atividade?</u></p>
<p><u>O uso de indicadores naturais apresenta, na sua opinião, aplicações didáticas? Em que você baseou a sua resposta?</u></p>	<p>Através dos questionamentos do tipo: “o que acontece se misturar X com Y, qual é o caráter da mistura? Pode usar outras coisas, dá para saber se o pH do sabonete dove é neutro?”</p>
<p>Sim, conceitos de acidez e basicidade, de equilíbrio químico são trabalhados de uma maneira mais agradável. Um grupo de alunos após a realização das atividades em sala “reproduziram o experimento” usando o suco de repolho roxo e uma aluna tentou fazer com a água de beterraba, mas o resultado não foi tao satisfatório como o repolho.</p>	<p><u>Cite os pontos problemáticos da proposta.</u> _____</p>
<p><u>Quais os tópicos de Química que você poderia abordar com a realização da atividade apresentada?</u></p>	<p><u>Considerando todos os aspectos envolvidos, você pretende introduzir a atividade com indicadores naturais em suas aulas? Explique.</u></p>
<p>Completando a questão acima, medidas de pH das soluções (as quais foram feitas por comparação entre o papel indicador universal e o suco de amora).</p>	<p>Sim, é um experimento simples, não oferece perigo aos alunos, pode ser realizado no próprio espaço da sala de aula.</p>

Os alunos do Ensino Médio da ETECAP, no decorrer de toda a realização do experimento, demonstraram grande interesse pela atividade e fizeram diversas perguntas que acharam pertinentes. Na primeira etapa do experimento, eles ficaram “maravilhados” com as colorações que as soluções, inicialmente incolores, foram obtendo ao se adicionar o extrato de uva. Então, queriam saber que soluções incolores eram aquelas e o que as fazia mudar de cor.

Ao verificarem que a adição de HCl ao extrato de uva propiciou uma coloração avermelhada e a adição de NaOH gerou uma coloração verde-amarelada, os próprios alunos concluíram que as soluções incolores eram ácidas ou básicas, conforme a cor que o extrato adquiriu em contato com elas.

A constatação de que a modificação das cores não era definitiva foi alvo de maior curiosidade por parte dos alunos, que queriam saber o porquê e até quando isto ocorria.

Ao preparem seus próprios extratos e verificarem as modificações das cores com materiais “comuns” como leite, sabonete e vinagre, os alunos discutiram entre si a causa de tal mudança.

Diante de tanto interesse na parte experimental, é de se imaginar que o mesmo ocorreu na parte teórica, quando as dúvidas (ou parte delas) foram solucionadas.

Um pequeno número de alunos manifestou achar mais interessante haver uma aula teórica antes da experimental para explicações do que ocorreria no laboratório. Esta colocação gerou um certo debate entre os alunos que acharam que não saber o que estava ocorrendo os estimulava a procurar explicações para o que observavam. Para estes alunos, só foi possível fazer esta afirmação porque o procedimento fornecido estava claro, facilitando sua execução.

Para o professor Cezário, a atividade aplicada no Ensino Médio obteve um resultado muito bom, devido aos alunos estarem aprendendo na teoria a maioria dos tópicos abordados.

11.1.3. Ensino Superior

Este estudo visou a avaliação geral que os alunos possuem em relação a aulas experimentais, além da avaliação específica da proposta desta tese, que consiste na utilização de extratos antociânicos em experimentos didáticos.

Embora 73 alunos tenham participado da aula experimental, somente 86% colaboraram voluntariamente respondendo a um questionário de avaliação prévio, envolvendo questões conceituais sobre pH, equilíbrio químico e cor, além de algumas questões sobre aulas de laboratório, 62% responderam ao questionário de avaliação após a realização da aula experimental.

Com relação à funcionalidade das aulas de laboratório, é interessante notar que 54% dos alunos responderam que estas aulas servem para aprender conceitos e procedimentos da Química. Entretanto, um percentual bastante significativo, 43%, respondeu que as aulas de laboratório servem para exemplificar e ilustrar a teoria. Isto reflete a característica indutivo-positivista comum em muitas instituições de ensino, que coloca a teoria num patamar de valorização elevado e a prática como mera aplicação da teoria (Chalmers 1993, Rosa 2002). Esta posição impede que os alunos percebam que as teorias surgiram das observações e não o contrário. Este comportamento cria a idéia de que a experimentação/observação serve apenas para ilustrar uma teoria previamente estabelecida e desvinculada da prática.

Com relação ao uso de materiais naturais em aulas de laboratório, foi constatado que 83% dos alunos acham interessante, 16% indiferente e apenas 1% acham inadequados. É importante ressaltar que o uso destes materiais não é habitual nos experimentos de graduação realizados no IQ-UNICAMP.

Quanto à realização de uma aula experimental 89% dos alunos responderam que é necessário ter um laboratório com materiais e equipamentos fundamentais, 8% afirmaram que é necessário ter reagentes e equipamentos caros e modernos e, apenas 2% concluíram que não é necessário material e equipamentos específicos para aulas experimentais.

Pela avaliação das questões referentes aos conceitos prévios dos alunos, relacionados aos assuntos a serem trabalhados na aula experimental, constatou-se que 97% dos alunos sabiam diferenciar substâncias ácidas e básicas em termos de pH e 3% não responderam ou não souberam avaliar. Um total de 82% dos alunos, apresentavam a noção de como criar uma escala de pH em função da cor. Entretanto, 13% não conseguiram relacionar pH em função da cor e 5% não se manifestaram ou não souberam avaliar.

Com relação a situações de reações envolvendo equilíbrio químico, 10% afirmaram que estas reações estão relacionadas apenas a cálculos matemáticos, 6% responderam que é possível detectar visualmente qualquer situação de equilíbrio e 8% não souberam avaliar. Estas respostas eram esperadas e podem ser justificadas pelo fato de que a maioria dos professores utiliza somente livros didáticos e aulas expositivas no ensino de Química, em particular para a abordagem do tema equilíbrio

químico, considerando somente os aspectos quantitativos, incluindo fórmulas e equações e desprezando os aspectos químicos qualitativos. Apesar das dificuldades encontradas por alunos e também professores, na compreensão deste assunto, 76% dos alunos responderam que é possível detectar situações de equilíbrio químico, se a reação envolver mudanças de cores.

A relação entre a cor apresentada por um material e interação com a luz é um assunto no qual 79% dos alunos demonstraram conhecimento adequado. Entretanto, 14% dos alunos apresentaram confusão entre os conceitos de luz refletida e luz absorvida e sua relação com a cor do material. Os demais alunos, 7%, não souberam relacionar a cor dos materiais e a interação com a luz.

De modo geral, o experimento realizado teve por objetivos a introdução de alguns conceitos químicos relacionados a pH, absorção e reflexão da luz e sua relação com a cor dos materiais, além da realização de procedimentos laboratoriais comuns, como a extração e a utilização de equipamento para medidas de absorção de luz. Vale ressaltar que, nesta aula, os alunos, pela primeira vez no curso, manipularam um instrumento eletrônico para medida química. Pela realização dos experimentos esperava-se que algumas imprecisões sobre os conceitos químicos envolvidos nesta atividade, detectadas na avaliação do questionário previamente respondido pelos alunos, fossem eliminadas.

Na primeira etapa do roteiro experimental, que consistiu da extração da antocianina, foram destacados os cuidados experimentais a serem seguidos, principalmente para o controle da temperatura. As indagações dos alunos sobre a razão para o controle da temperatura foram evidenciadas e os esclarecimentos foram feitos no decorrer da aula. Alguns grupos, que não tomaram este devido cuidado, puderam constatar experimentalmente que em temperaturas superiores a 60°C ocorre a degradação das antocianinas, evidenciada pelo aparecimento de uma coloração marrom. Isto gerou a discussão sobre a estabilidade de compostos orgânicos naturais em função da temperatura.

Na segunda etapa da aula, os alunos construíram um escala de pH utilizando soluções tampão e o extrato de jambolão obtido. De acordo com as respostas dadas pelos alunos ao questionário do **Quadro 8**, aplicado após a aula prática, para 95% dos estudantes era possível utilizar o extrato de jambolão como indicador de pH, visando a

determinação do pH de soluções aquosas. Entretanto, somente 24% dos alunos notaram o fato de que medidas de pH de soluções coloridas utilizando indicadores visuais não são confiáveis, pois a cor da solução interfere na coloração final da solução. Assim, este fato deveria ser melhor discutido na aula. Além de confirmar a aplicabilidade de extratos naturais como indicador de pH, esta atividade pode ter contribuído para aqueles alunos que não sabiam construir uma escala de pH em função das diferentes cores que um indicador ácido-base pode apresentar. Com relação ao prévio conhecimento de indicadores de pH naturais, apenas 16% dos alunos desconheciam sua existência, entretanto dos que já tinham alguns conhecimentos sobre indicadores naturais, 60% não sabia como obtê-los.

No decorrer da etapa de extração das antocianinas do jambolão, um grupo de alunos obteve um extrato “diferente” dos demais, cuja coloração era vermelho. Esta coloração é característica de soluções de pH entre 1 e 2. Ao adicionar lentamente este extrato “ácido” sobre um tubo de ensaio contendo solução básica (tampão pH 12) foi observado um gradiente de concentração de H^+ , evidenciada pelas diferentes cores apresentadas pelas antocianinas. Este acontecimento chamou atenção dos alunos e do professor responsável, que aproveitou o experimento “desenvolvido” pelo grupo para explicar o conceito de difusão de líquidos, numa abordagem qualitativa.

Posteriormente à aula, este experimento foi refeito, utilizando-se algumas gotas de HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, na etapa de extração das antocianinas. Foi possível concluir que o simples experimento, utilizando extratos de frutas contendo antocianinas, também serve para a demonstração do conceito de difusão. Além disso, foi possível observar as variações de cores das antocianinas devido ao gradiente de pH formado, isto é, de concentração de íons hidrogênio conforme a **Figura 55**.

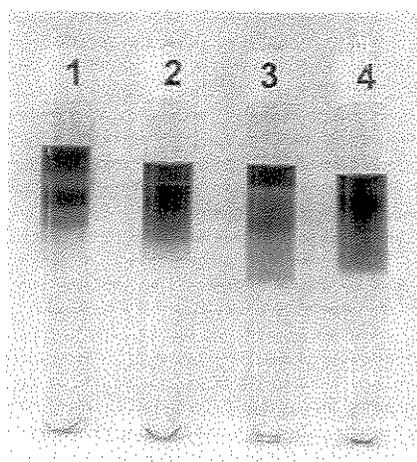


Figura 55. Experimento sobre conceito difusão de líquidos utilizando-se extrato de (1) jambolão, (2) uva, (3) jaboticaba e (4) amora.

Neste contexto, este experimento pode ser utilizado para a demonstração do conceito de difusão de líquidos, enfatizando tratar-se de um processo pelo qual espécies, íons ou moléculas, migram a partir de um meio mais concentrado para um meio mais diluído. A razão da migração ou da difusão é proporcional à diferença da concentração entre as regiões, bem como do coeficiente de difusão de cada espécie. O termo difusão é utilizado para o entendimento de muitas técnicas analíticas, como, por exemplo cromatografia, eletrogravimetria, coulometria e voltametria. Isso reforça a relevância da compreensão deste conceito.

Esta atividade gerou um trabalho intitulado *Abordagem qualitativa do conceito difusão de líquidos com o uso de extratos de frutas*, que foi apresentado no I Encontro Paulista de Pesquisa em Ensino de Química (<http://gpquae.iqm.unicamp.br/>, acessada em 26/10/2004; Terci *et al.* 2004).

Na terceira etapa da aula, que consistiu na obtenção dos espectros de absorção do extrato de jambolão em meios ácido e básico, 95% dos alunos perceberam que soluções de coloração diferentes (vermelha e azul) apresentavam espectros diferentes, ou seja, interagiam de forma diferente com a luz. Pelos experimentos, foi possível estabelecer o conceito de cor complementar, diferenciar os conceitos de cor absorvida e cor refletida e esclarecer sobre a cor dos materiais.

Com relação aos experimentos realizados, 95% dos alunos afirmaram que experimentos com produtos naturais deveriam ser incorporados as aulas de laboratório. Deste total, 33% justificaram a resposta pelo fato de serem experimentos interessantes,

enquanto que 67% justificaram pela utilização de materiais simples e do conhecimento do aluno, o que estimula e facilita a organização da aula. 87% dos alunos acharam que o experimento foi muito ilustrativo e interessante, 5% consideraram o experimento indiferente, outros 5% acharam o experimento pouco ilustrativo e interessante e 3% dos alunos consideraram o experimento inadequado. 82% indicaram que o experimento realizado pode ser adaptado para a abordagem de outros aspectos relacionados à Química Orgânica, Analítica ou Físico-Química, enquanto que 13% apontaram que o experimento é adequado apenas para ilustrar conceitos de Química Geral e 5% ressaltaram que este tipo de experimento não é adequado para o ensino de conceitos científicos.

Com relação ao uso deste experimento em aulas práticas de Química no Ensino Médio 80% afirmaram que o experimento pode ser reaproveitado, com algumas adaptações, 10% apontaram que não é preciso ter aula prática no ensino médio, 5% disseram que o experimento pode ser reaproveitado integralmente e 5% afirmaram que não podem ser aproveitados.

11.1.4. Considerações sobre as instituições de ensino e professores

Em virtude das modificações impostas pela legislação educacional vigente, a partir de 1998 a ETECAP passou a oferecer o Ensino Médio, além dos cursos técnicos de Química e Bioquímica. Com inúmeros serviços prestados à comunidade local e industrial, esta escola conta com 17 laboratórios, um laboratório piloto trabalhando em escala semi-industrial, um fluxo diário de 1300 pessoas, entre docentes, funcionários e alunos, além de mais de 3000 profissionais formados e atuantes no mercado de trabalho.

A professora Raquel Tassara Nogueira é formada em Química pela UNICAMP, tem mestrado em Química Orgânica e no período da realização deste projeto desenvolvia seu projeto de doutorado nesta mesma área, já concluído, no IQ-UNICAMP. Neste período, também lecionava a disciplina de Química Analítica Quantitativa para o Ensino Técnico na ETECAP.

O professor Marcos Antônio Torres Cezário é formado em Química pela UNICAMP, tem mestrado em Química Inorgânica pela UNICAMP e leciona Química

Analítica para o Ensino Técnico de Química e Bioquímica, e Química para o Ensino Médio da ETECAP. Desde o princípio o professor mostrou-se entusiasmado e deu total apoio para a aplicação do projeto em algumas de suas turmas. Porém, após a realização das atividades experimentais, o interesse e/ou a disponibilidade de colaboração do professor diminuíram. Isto foi notado pela dificuldade de obtenção das respostas do questionário e dos outros dados relacionados com o trabalho, necessários para a elaboração deste relatório.

A Escola Estadual Professor Aníbal de Freitas (EPAF) possui salas de computação e laboratório de ensino de Química e Física, equipados para fins didáticos, mas que, por decisão da direção da escola, que teme roubos e depredações por parte dos alunos, não são usados. Esta escola já foi considerada escola padrão na década de 90, mas suas condições atuais são decadentes.

Durante a aplicação deste projeto, foram observadas cenas problemáticas para qualquer ambiente escolar, como um princípio de incêndio numa sala de aula provocado por alunos que atearam fogo num cesto de lixo. Os problemas de comportamento por parte dos alunos têm, como consequência, as atitudes drásticas tomadas pela direção da escola, como o fechamento dos laboratórios de ensino.

A professora Aloísia Laura Moretto é graduada em Química pela UNICAMP, tem mestrado e doutorado em Química Analítica pela UNICAMP e leciona Química para algumas turmas das diferentes séries do Ensino Médio da EPAF, além de outras escolas, inclusive de nível superior. Apesar de não mostrar muita confiança no interesse dos alunos pelo projeto a ser aplicado, a professora deu total apoio para a realização do mesmo. Após a conclusão do projeto, a professora não só mudou de opinião como voltou a confiar na eficiência da experimentação para o sucesso do processo ensino/aprendizagem.

A UNICAMP é uma autarquia, autônoma em política educacional, mas subordinada ao Governo do Estado de São Paulo no que se refere a sua manutenção para operação. Possui um complexo de ensino e pesquisa implantado numa área de quase 3 milhões de m², repleto de edifícios, parques e gramados. Dentro deste universo situa-se o Instituto de Química, que já formou mais de 1300 bacharéis e onde mais de 1300 teses de mestrado e doutorado já foram defendidas. (<http://www.iqm.unicamp.br/apresent.html> acessada em 03/11/2004)

O professor doutor Marcelo Ganzarolli de Oliveira é formado em Bacharelado em Química Tecnológica pela UNICAMP, tem mestrado em Química e doutorado em Ciências, ambos pela UNICAMP e Pós-doutorado pela Universidade Southampton – Inglaterra. É livre docente desta instituição, atuando no Instituto de Química no Departamento de Físico-Química.

Após ter tomado conhecimento deste trabalho, pelo artigo publicado na revista Química Nova, o professor mostrou-se interessado e apoiou a inserção de alguns experimentos desenvolvidos no decorrer deste projeto no programa da disciplina Química Geral Experimental, no primeiro período letivo de 2003.

11.2. Avaliação dos experimentos por professores

Os professores participantes desta avaliação trabalham em instituições públicas e/ou particulares pertencentes às Diretorias de Ensino de Campinas Regiões Leste e Oeste. A **Figura 56** apresenta a distribuição destes professores em função do tipo de instituição em que trabalham.

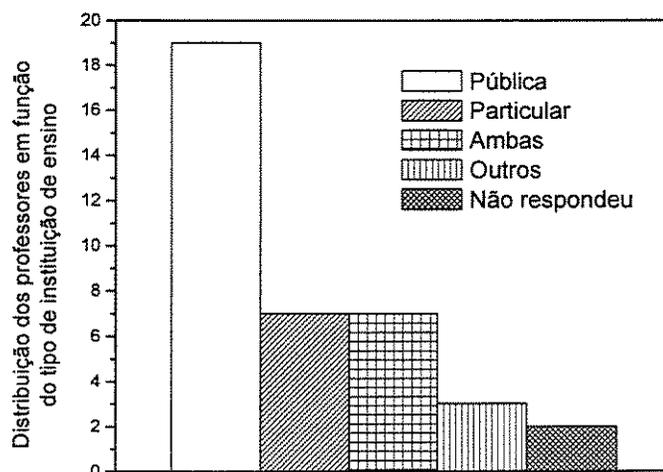


Figura 56. Distribuição dos professores em função do tipo de instituição de trabalho.

Previamente às atividades experimentais, foram feitos alguns comentários sobre estudos que têm sido desenvolvidos no Ensino Médio com a utilização de extratos naturais contendo antocianinas (Terci e Rossi 2002, Ramos 2000, Soares e Cavalheiro 2001).

Posteriormente, os professores realizaram as atividades experimentais descritas no **Quadro 9**, sendo que os itens 1 e 2 foram realizados de forma demonstrativa pela autora desta tese e os demais foram feitos pelos professores. Ao término das atividades, os professores responderam um questionário de avaliação - **Quadro 10**.

Após a leitura dos questionários respondidos, foi possível verificar que todos os professores consideram que as atividades experimentais são importantes para o processo ensino/aprendizagem de Química, porque este tipo de atividade possui diversas características favoráveis a este processo, como, por exemplo:

- facilita a compreensão e assimilação de conceitos;
- desperta e/ou estimula o interesse do aluno;
- induz o aluno a obter suas próprias conclusões;
- contribui para uma aprendizagem significativa.

Todos os professores também afirmaram que o uso de extratos naturais contendo antocianinas apresenta aplicações didáticas válidas e reconheceram que diversos conceitos químicos podem ser abordados de maneira mais atrativa.

Dentre os conceitos químicos abordados no Ensino Médio, os professores citaram que o uso destes extratos pode servir para o ensino de separação de misturas, equilíbrio químico (reversibilidade e deslocamento), conceito ácido-base, reações de neutralização, preparo de soluções, indicadores e volumetria.

Além destes tópicos, de acordo com a opinião dos professores que também atuam no Ensino Superior, estes extratos naturais também podem ser usados para o ensino de cromatografia e processos de extração de compostos orgânicos.

Considerando-se a infra-estrutura das escolas em que trabalham, para 97% dos professores a aplicação deste tipo de experimento é possível, sendo que, deste total, 13% já aplicaram experimentos similares utilizando outras espécies vegetais, tais como repolho roxo, feijão preto, azaléia e berinjela. Segundo a opinião destes professores, estas atividades podem se adequar à infra-estrutura da maioria das escolas, pois envolvem o uso de materiais de fácil acesso, não necessitam de recursos laboratoriais tais

como reagentes e equipamentos sofisticados. Além disso, as vidrarias e papéis de filtro que são utilizados no decorrer do experimento podem ser substituídos por materiais alternativos domésticos como copos e coadores descartáveis de café. Além disso, também foram enfatizados a simplicidade, o baixo custo e a possibilidade de aplicação do experimento na própria sala de aula, de modo demonstrativo.

Um total de 89,4 % dos professores apresentam opinião favorável quanto à adequação do uso de extratos naturais às propostas do PCNEM. Notou-se que a maioria considerou que os experimentos estão adequados porque utilizam materiais do cotidiano do aluno, são contextualizados e podem ser inseridos como um tema inter e transdisciplinar.

De modo geral, os comentários e/ou sugestões dos professores com relação aos experimentos foram muito positivos. Foram enfatizadas as principais características desta proposta experimental, ressaltando a simplicidade e a viabilidade de sua aplicação. Além disso, um dos aspectos mais atrativos, segundo os professores, é referente ao aspecto visual, o que desperta e estimula o interesse dos alunos. Segundo eles, outras atividades experimentais similares devem ser desenvolvidas e avaliadas para aprimorar o processo de ensino/aprendizagem de Química.

Um outro fator que confirma a importância da realização dos experimentos propostos neste projeto envolve as provas do Exame Nacional do Ensino Médio (ENEM)¹. Desde a sua criação em 1998, observou-se uma grande ênfase, na parte de Química, aos conceitos de pH, indicador ácido-base e equilíbrio químico, que foram assuntos abordados em todos os exames. No exame de 2000, houve uma questão especificamente relacionada a indicador natural de pH.

* Sistema de avaliação, criado pelo Ministério da Educação, para medir as competências e habilidades desenvolvidas pelos alunos ao término do ensino médio.

CAPÍTULO 12

CONCLUSÕES

Os extratos antociânicos obtidos a partir das espécies vegetais amora, jabuticaba, jambolão e uva apresentam potencialidade didática para a demonstração e/ou realização de aula prática para os seguintes estudos:

- comportamento de indicadores visuais e sua aplicação em titulações ácido-base, já que os pontos finais observados são próximos dos obtidos com uso de indicadores convencionais;
- determinação do pH de soluções aquosas e produtos de uso doméstico, utilizando-se os extratos em solução e/ou papéis de filtro impregnados com os extratos;
- reações envolvendo equilíbrio-químico, destacando-se os conceitos de reversibilidade e deslocamento;
- cores dos materiais em função da sua interação com a luz (obtenção de espectros de absorção na região do visível);
- procedimentos de extração;
- estudo de difusão de maneira qualitativa.

A avaliação geral de todos os questionários respondidos tanto pelos professores, quanto pelos alunos, permitiu constatar que a realização de atividades experimentais, seja para a confirmação ou para a introdução de um conceito, é fundamental para aprimorar o processo ensino/aprendizagem de Química e pode ocorrer com alternativas que não dependem de infra-estrutura laboratorial.

Além dos ótimos resultados obtidos nas aulas prática e teórica, os experimentos aplicados podem ser utilizados como um tema interdisciplinar atendendo às recomendações dos PCN's.

A versatilidade destes experimentos, que envolvem desde procedimentos de extração até a explicação da mudança de cor, passando por conceitos e procedimentos de Física, Química Analítica, Orgânica e Físico-Química, até conceitos de Biologia (classificação botânica) e geografia (tipo de clima e solo para o cultivo dessas espécies), oferece grande quantidade de informações e detalhes aos alunos de modo interessante e atraente, numa abordagem interdisciplinar.

As respostas voluntárias do questionário de avaliação dos experimentos realizados com professores no II SIMPEQ apontaram a concordância dos professores sobre a importância do uso de experimentos nas aulas de Química. Em suas manifestações, os professores aprovaram a adequação da atividade realizada por

favorecer a transposição didática de vários conceitos científicos. Outro aspecto positivo da atividade destacado pelos professores foi à facilidade em adequar o experimento à infra-estrutura da escola, uma vez que não requer materiais de difícil acesso nem procedimentos complicados ou de algum risco, o que amplia a possibilidade de aplicação nas aulas sem maiores dificuldades.

As informações obtidas nesta interação com os professores participantes do II SIMPEQ indicaram que a aplicação de experimentos utilizando pigmentos naturais pode facilitar a compreensão e assimilação de conceitos químicos, estimular o interesse do aluno, induzir o aluno a obter suas próprias conclusões e contribuir para uma aprendizagem significativa, o que está de acordo com as propostas do PCNEM.

CAPÍTULO 13

TRATAMIENTO DE RESÍDUOS

Todos os resíduos gerados durante os trabalhos experimentais foram descartados e/ou tratados corretamente de acordo com as normas da Comissão de Segurança do IQ-UNICAMP.

- soluções ácidas ou básicas sem íons tóxicos: descartadas na pia após neutralização;

- metanol: armazenado em frascos adequados e submetido à Comissão de Segurança para enviá-lo para incineração na empresa Eli Lilly do Brasil Ltda.;

- fenol: armazenado em frasco adequado e submetido à Comissão de Segurança para enviá-lo para incineração na empresa Eli Lilly do Brasil Ltda.;

- acetonitrila: foi armazenada em recipientes adequados e tratada pela Comissão de Segurança seguindo-se as recomendações descritas nas referências:

Prudent Practices for Disposal of Chemicals from Laboratories, Committee of Hazardous Substances in the Laboratory, Washington D.C., 1983.

Toxic and Hazardous Industrial Chemicals Safety Manual, Japan, 1982.

CAPÍTULO 14

CONCLUSÕES GERAIS

“O sábio age, mas não se apega a sua obra. Cumprida a obra, não exige reconhecimento. E, porque não pretende mérito, não fica abandonado.”

Lao Tsé

De modo geral os extratos de amora, jambolão, jabuticaba e uva apresentaram comportamentos semelhantes. Desta forma, para a escolha da espécie para a realização dos experimentos deve-se considerar o período sazonal e a disponibilidade local. Entretanto, este último fator não é limitante, pois frutas congeladas podem ser usadas para o preparo dos extratos.

Tendo em vista os resultados obtidos, é possível realizar a extração das antocianinas das espécies vegetais *Vitis vinifera* (uva) e *Syzygium cuminii* (jambolão), *Morus nigra* (amora) e *Myrciaria cauliflora* (jabuticaba) de uma maneira simples e eficiente, sem o uso de solventes tóxicos.

Pelas técnicas de espectrofotometria no ultravioleta e visível, cromatografia em papel e cromatografia líquida de alta eficiência, foi possível detectar e identificar as antocianinas contidas nos extratos.

A quantificação das antocianinas totais pelos métodos de Petri e colaboradores, Sondheimer e Kertsz e de Fuleki e Francis é reprodutível e apresenta boa precisão.

A purificação dos extratos utilizando extração em fase sólida mostrou-se adequada, pois é possível obter um extrato livre de açúcares, ácidos orgânicos e outros compostos fenólicos diferentes das antocianinas.

Com relação à estabilidade das antocianinas nos extratos brutos aquosos ou alcoólicos, concluiu-se que estes pigmentos são mais estáveis a baixos valores de pH, temperatura e tempo de estocagem.

Embora não tenha sido identificado o produto da reação entre antocianinas com cloro livre, constatou-se a adequação desta reação para a determinação de cloro livre em higienizadores. Com relação ao uso do extrato de jambolão como reagente analítico para esta finalidade, verificou-se que ambos extratos bruto e purificado apresentaram resultados semelhantes na comparação das figuras de mérito estudadas.

Além destes estudos analíticos, constatou-se que os extratos vegetais antociânicos podem ser utilizados favoravelmente para aplicações didáticas no processo de ensino-aprendizagem de importantes conceitos químicos:

- do comportamento de indicadores visuais e sua aplicação na determinação de pontos finais em titulações ácido-base;

- da determinação do pH de soluções aquosas e produtos de uso doméstico utilizando-se os extratos em solução e/ou papéis de filtro deles impregnados;
- de reações químicas, inclusive da determinação do pKa aparente.
- utilização em disciplina experimental de Química Geral ou Físico-Química de nível superior para abordagem da Lei de Fick de modo qualitativo;
- observação das diferentes cores correspondente às diferentes formas das antocianinas.

CAPÍTULO 15

PERSPECTIVAS

“Às vezes é preciso parar e olhar para longe, para podermos enxergar o que está diante de nós.”

John Kennedy

Os estudos analíticos realizados durante este projeto resultaram na padronização* dos extratos antociânicos de amora, jaboticaba, jambolão e uva.

Atualmente, têm-se notado o crescente interesse da produção e/ou utilização de extratos naturais padronizados por diversos seguimentos industriais, dentre os quais se destacam as indústrias farmacêuticas, cosméticas e alimentícias.

A utilização das antocianinas como corante alimentício em balas e confeitos, pó para refresco e sobremesa, iogurtes e bebidas lácteas poderia ser investigada. Neste caso, um estudo de um processo eficiente de desidratação dos extratos seria adequado, para evitar contaminações microbiológicas. Além disso, especificações físico-químicas dos extratos desidratados, tais como aspecto, cor, sabor, odor, pH, solubilidade além de identificação e quantificação de metais pesados deverão ser necessários para sua incorporação em alimentos industrializados.

Na área cosmética, nota-se a presença dos flavonóides em muitas formulações, principalmente na forma de extratos naturais (Arct *et al.* 2002). O crescente uso destes compostos está relacionado ao interesse no desenvolvimento de formulações contendo ingredientes naturais, e também pelos seus possíveis benefícios ao corpo humano, devido a suas propriedades antioxidantes e anti-radical livre (Dweck 2002, Costa *et al.* 2000, Saija 1995, Asgary *et al.*, 1999, Saskia 1998). Estas características tendem a despertar o interesse na sua utilização em cremes antienvelhecimento para pele. Neste caso, poderia ser realizada uma avaliação da estabilidade e da eficácia das antocianinas nestas formulações.

Recentes pesquisas médicas têm enfatizado que as antocianinas possuem propriedade antiinflamatória, antimutagênica e antialérgica (Lietti *et al.* 1976, Kamei *et al.* 1995, Karainova *et al.* 1990, Hollman *et al.* 1996). Assim, um estudo para avaliar a atividade biológica dos extratos antociânicos de amora, jaboticaba, jambolão e uva *in vivo* ou *in vitro* poderia ser realizado. O grupo de pesquisa GPQUAE, em colaboração com o grupo de pesquisa do Prof. Dr. Hiroshi Aoyama, do Instituto de Biologia da UNICAMP, iniciou um trabalho para avaliar a propriedade anticancerígena do extrato de jambolão. Este estudo está sendo realizado no projeto de mestrado de Daniella Dias Palombino.

* Extrato padronizado: aquele cujo princípio ativo foi identificado e quantificado.

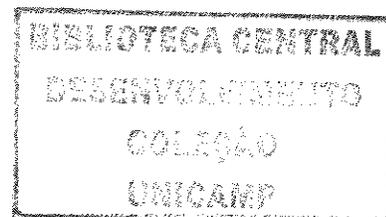
Com relação à reação das antocianinas com cloro livre, um estudo mais aprimorado para a determinação do produto de reação, utilizando, por exemplo, técnicas de infravermelho, ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas, poderia ser adequado.

O conjunto de atividades experimentais didáticas desenvolvido foi centrado na utilização dos extratos antociânicos para aulas de Química no nível médio, técnico e superior. Estes experimentos permitem explorar os conceitos mais gerais da Química, como equilíbrio químico, medidas de pH, utilização dos extratos para titulações ácido-base e obtenção de espectros de absorção UV-Vis. Entretanto, a utilização dos extratos antociânicos pode chegar ao estudo de evidências da ocorrência de reações químicas e análise de compostos oxidantes com medidas colorimétricas e espectrofotométricas, para abordagem de métodos de análise instrumental.

O aprimoramento desta proposta didática poderá resultar na elaboração de um tema de um projeto estruturador para o Ensino Médio ou até mesmo num livro paradidático, visando a abordagem de conceitos fundamentais da Química, desde processos de separação até aplicações instrumentais em Química Analítica de modo contextualizado.

CAPÍTULO 16

REFERÊNCIAS



- Abdel-All, E. S. M.; Hucl, P.; "Composition and stability of anthocyanins in blue-grained wheat", *J. Agri. Food Chem.* **2003**, 51, 2174.
- Alkema, S.; S. Seager; "The chemical pigments of plants", *J. Chem. Educ.* **1982**, 59, 183.
- Altria, K. D.; *Capillary Electrophoresis Guidebook: Principles, Operation, and Applications*, Humana Press: New York, 1996.
- Amaya, D. R.; Bobbio, P. A.; Bobbio, F. O.; *Curso sobre pigmentos naturais*, SBCTA - FEA/UNICAMP, Campinas, 1984.
- Arct, J.; Oborska, M.; Mojski, A.; Binkowwska B.; Swidzikowska, B.; "Common cosmetic hydrophilic ingredients as penetration modifiers of flavonoids", *Int. J. Cosm. Sci.* **2002**, 24, 357.
- Asgary, S.; Naderi, G. Sarrafzadegan, N.; Boshtam, G. M.; Rafie, M.; Arefian, A.; "Anti-oxidant effect of flavonoids on hemoglobin glycosylation", *Pharm. Acta. Helv.* **1999**, 73, 223.
- ASTM - Annual Book American Society for Testing and Materials, Philadelphia, 1995, Pa 19103, D 2022.
- Atkins, P.W.; *Physical Chemistry*, 5th ed., Oxford University Press:Oxford, 1994.
- Baccan, N.; Andrade, J. C.; Godinho, O. E. S.; Barone, J. S.; *Química Analítica Quantitativa Elementar*, 3^a ed., Edgard Blücher: São Paulo, 2001.
- Baldi, A.; Romani, A.; Mulinacci N.; "HPLC/MS Application to anthocyanins of *Vitis vinífera L.*", *J. Agr. Food Chem.* **1995**, 43, 2104.
- Bányai, E.; *Acid-base Indicators*. In *Indicators*; Bishop E., Pergamon Press, Oxford, 1972.

Barros Neto, B.; Scarminio, I. S.; Bruns, R. E.; "Planejamento e Otimização de Experimentos", Editora da Unicamp: Campinas, 1996.

Barry, D. M.; "Chem-is-tree", *J. Chem. Edu.* **1997**, 74, 1175.

Bate-Smith, E. C.; "Paper Chromatography of anthocyanins and relate substances in petal extracts", *Nature* **1948**, 161, 835.

Beltran, N.; Ciscato, C.; *Química* Ed. Cortez. São Paulo, 1991.

Berké, B.; Chèze, C.; Vercauteren, J.; Deffieux, G; "Bissulfite addition to anthocyanins: revisited structures of colourless adducts", *Tetra. Lett.* **1998**, 39, 577

Bernardino, A. M. R.; Pereira, A. S.; Araripe, D. R.; Souza, N. A.; Azevedo, R. V. D.; "Antocianinas - papel indicador de pH e estudo da estabilidade da solução de repolho roxo, *Livro de Resumos da 23ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Poços de Caldas, vol. 3., Brasil, 2000.

Birkoffer, I.; Kaiser, C.; Meyer-Stoll, A.; Suppan, F.; Z.; *Naturforsch.* **1962**, 17b, 352. *apud* Bányai 1972

Blatchley, E. R.; "Desinfection and antimicrobial processes", *Water Environm. Res.* **1994**, 66, 361.

Bockian, A.; Kepner, R.; Webb, A.; "Wine Production, Skin Pigments of Cabernet Sauvignon Grape and Related Progeny", *J. Agric. Food Chem.* **1955**, 3, 695.

Bridle, P.; García-Vigueira, F. A.; "Analysis of anthocyanins in strawberries and elderberries. A comparison of capillary zone electrophoresis and HPLC", *Food Chem.* **1997**, 59, 299.

Bridle, P.; Timberlake, C. F.; "Anthocyanins as natural food colours - selected aspects", *Food Chem.* **1996**, 58, 103.

Brouillard, R., Harborne, J. B., *The Flavonoids*, Champman and Hall: London, 1988.

Brouillard, R.; *Anthocyanins as Food Colors*, Academic Press: New York, 1982.

Brouillard, R.; Chahine, J-M. E. H.; "Chemistry of anthocyanin pigments. Kinetic and thermodynamic study of hydrogen sulfite addition to cyanin. Formation of a highly stable meisenheimer-type adduct derived from a 2-phenylbenzopyrylium salt", *J Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 5375.

Brouillard, R.; Dubois, J.; "Mechanism of the structural transformations of anthocyanins in acidic media", *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99, 1359.

Cabrita, L.; Fossen, T.; Andersen, O. M.; "Colour and stability of the six common anthocyanidin 3-glucosides in aqueous solutions", *Food Chem.* **2000**, 68, 101.

Calafati, S. A.; Souza, J. A.; Capelato, M. D; "Utilização do extrato de Jambolão como indicador ácido-base", *Resumos da 40ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência*, Goiânia, Brasil, 1988. Resumo 03-D2.6.

Caulcutt, R.; Boddy, R.; *Statistics for Analytical Chemists*, Chapman and Hall: London, 1983.

Chalmers, A.; *O que é ciência afinal?*, Editora Brasiliense: São Paulo, 1993.

Chandra, A.; Rana, J.; Li, Y.; "Separation, identification quantification, and method validation of anthocyanis in supplement raw materials by HPLC and HPLC-MS", *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, 3515.

Chen, H.; Zuo, Y. G.; Deng, Y. W.; "Separation and determination of flavonoids and other phenolic compounds in cranberry juice by high-performance liquid chromatography", *J. Chromatogr. A* **2001**, 913, 387.

Clapper, T. W.; Mark, H. F.; Othmer, D. F.; Overberger, C. G.; Seaborg, G. T.; Grayson, M.; Eckroth, D.; *Encyclopedia of Chemical Technology*, John Wiley & Sons: New York, 3rd edition, 1979.

Costa, C. T.; Horton, D.; Margolis, S. A.; "Analysis of anthocyanins in foods by liquid chromatography, liquid chromatography-mass spectrometry and capillary electrophoresis", *J. Chromatogr. A* **2000**, 881, 403.

Costa, C. T.; Nelson, B. C.; Margolis, S. A.; Horton, D.; "Separation of blackcurrant anthocyanins by capillary zone electrophoresis", *J. Chromatogr. A* **1998**, 799, 321.

Couto, A. B.; Ramos, L. A.; Cavaleiro, E. T. G.; "Aplicação de pigmentos de flores no ensino de Química", *Quím. Nova* **1998**, 21, 221.

CRC Handbook of Chemistry and Physics, Weast, R.C. ed.; CRC Press: Cleveland, 58th edition, 1977.

Curtright, D. R.; Ryneerson, J. A.; Markwell, J.; "Anthocyanins", *J. Chem. Edu.* **1996**, 73, 306.

Curtright, D. R.; Ryneerson, J. A.; Markwell, J.; "Fruit anthocyanins", *J. Chem. Edu.* **1994**, 71, 682.

Dean F. M.; *Naturally Occurring Oxygen Ring Compounds*, Butter Worths: London, 1963.

Dolenc-Sturn, K.; Stampar, F.; Usenik, V.;E.; "Evaluating of some quality parameters of different apricot cultivars using HPLC method", *Acta Alimentari* **1999**, 28, 297.

Dubois, M Gilles, Hamilton, D. A.; J. K.; Rebers, P. A.; Smith, F.; "Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances", *Anal. Chem.* **1956**, 28, 350.

Dweck, A. C.; "Formulando com ingredientes naturais", *Cosmetic & Toiletries (edição em português)* **2002**, 14, 56.

Dychdala, G.R.; *Chlorine and chlorine compounds*. In: *Disinfection, sterilization and preservation*, Bloch, S. S., Ed., Lea & Febiger: Philadelphia, 4th edition, 1991.

Erwin, R.; Köthe, J.; Naumann, R.; Fisher, W.; Jäschke, U.; Mayer, W.D.; Wieland, G.; Newamn, E.; Wilson, C. M.; *Indicator Reagents*. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*; Elvers, B.; Wawkins, S.; Ravenscroft, M.; Schulz, G.; Eds.; VCH: New York, 5th edition, 1989.

Fernández-López, J. A.; Almela, L.; Muñoz, J. A.; Hidalgo, V.; Carrenõ, J.; "Dependence between colour and individual anthocyanin content in ripening grapes", *Food Res. Inter.* **1998**, 31, 667.

Figueiredo, P.; Elhabiri, M.; Toki, K.; Saito, N.; Dangles, O.; Brouillard, R.; "New aspects of anthocyanin complexation. Intramolecular copigmentation as a means for colour loss?", *Phytochem.* **1996**, 41, 301.

Flash, P.; "Temperature control for a small-scale kinetics equipment", *J. Chem. Edu.* **1994**, 71, A6.

Forster, M.; "Plant pigments as acid-base indicators - an exercise for the junior school", *J. Chem. Educ.* **1978**, 55, 107.

Fossen, T.; Cabrita, L.; Andersen, O. M.; "Colour and stability of pure anthocyanins influenced by pH including the alkaline region", *Food Chem.* **1998**, 63, 435.

Francis, F. J.; Harborne, J. B.; Barker, W. G.; "Anthocyanins in lowbush blueberry *vaccinium angustifolium*", *J. Food Sci.* **1966**, 31, 583.

Friedenthak, H.; *Z. Elektrochem.* **1904**, 10, 341. *apud* Oesper 1974.

Fuleki, T.; "Anthocyanins in red onion, *allium-cepa*", *J. Food Sci.* **1971**, 36, 101.

Fuleki, T.; Francis, F. J.; "The co-occurrence of monoglucosides and monogalactosides of cyanidin and peonidin in the American cranberry, *Vaccinium macrocarpo*", *Phytochem.* **1967**, 6, 1705.

Fuleki, T.; Francis, F. J.; "Quantitative methods for anthocyanins. Extraction and determination of total anthocyanin in cranberries", *J. Food Sci.* **1968a**, 33, 72.

- Fuleki, T.; Francis, F. J.; "Quantitative methods for anthocyanins. Determination of total anthocyanin and index degradation for cranberries juices", *J. Food Sci.* **1968b**, 33, 78.
- Geissman, T. A.; "Flower coloration", *J. Chem. Edu.* **1941**, 18, 108.
- Geissman, T. A.; Jurd, L.; "The anthocyanins of *Spirodela oligorrhiza*", *Arch. Biochem.* **1955**, 56, 259.
- GEPEC; "Extrato de Repolho Roxo como Indicador Universal de pH", *Quimica Nova na Escola* **1995**, 1, 33.
- Giusti, M. M.; Wrolstad, R. E.; *Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. In Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, Wrolstad, R. E.; Acree T. E.; An H., Decker E. A.; Penner M. H.; Reid D. S.; Schwartz S. J.; Shoemaker C. F.; Sporns, P.; Eds.; John Wiley & Sons: New York; 2002.
- Giusti, M.M.; Rodríguez-Saona, L. E.; Bagget, J. R.; Reed, G. L.; Durst, R. W.; Wrolstad, R. E.; "Anthocyanin pigment composition of red radish cultivars as potential food colorants", *J. Food Sci.* **1998**, 63, 219.
- Glassgen, W. E.; Seitz, J. W.; Metzger, J. W.; "High performance liquid chromatography electrospray mass-spectrometry and a tandem mass spectrometry of anthocyanins from plant tissues and cell-cultures of *daucus caarota* L.", *Biol. Mass Spectrom.* **1992**, 21, 271.
- Goiffon, J. P.; Brun, M.; Bourrier, M. J.; "High performance liquid chromatography of red fruit anthocyanins", *J. Chromatog.* **1991**, 537, 101.
- Goiffon, J. P.; Mouly, P. P.; Gaydou, E. M.; "Anthocyanin pigment determination in red fruit juices, concentrated juices and syrups using liquid chromatography", *Anal. Chim. Acta.* **1999**, 382, 39.
- Gouveia-Matos, J. A. M.; "Mudança nas cores dos extratos de flores e do repolho roxo", *Química Nova na Escola* **1999**, 10, 6.

Gross, J.; *Pigments in Fruits*; Academic Press: London, 1987.

Hantzsch, A.; *Chem. Ber.* **1907**, 40, 3017. *apud* Oesper 1974.

Harborne, J. B.; "The chromatographic identification of anthocyanins pigments", *J. Chromatogr.* **1958**, 1, 473.

Harborne, J. B.; *Comparative biochemistry of the flavonoids*, Academic Press: London, 1967.

Harborne, J. B.; *Introduction Ecological Biochemistry*; Academic Press: New York, 1977.

Harborne, J. B.; Mabry, T. J.; Mabry, H.; *The flavonoids*, Academic Press: New York, 1975.

Harborne, J. B.; *Phytochemical Methods – A guide to modern techniques plant analysis*; Chapman and Hall: New York, 2nd edition, 1984.

Harborne, J. B.; *Phytochemical Methods*; Chapman and Hall: London, 2nd edition, 1991.

Harborne, J. B.; *The Flavonoids: advanced in research since 1986*, Chapman and Hall: New York, 5th edition, 1994.

Harris, D. C.; *Análise Química Quantitativa, Livros Técnicos e Científicos*: Rio de Janeiro, 5^a ed., 2001.

Heines, V.; "The vegetables chamaleons", *J. Chem. Edu.* **1972**, 49, 605.

Heredia, F. J.; Francia-Aricha, E. M.; Rivas-Gonzalo, J. C.; Vicario, I. M.; Santos-Buelga, C.; "Chromatic characterization of anthocyanins from red grapes – pH effects", *Food Chem.* **1998**, 63, 491.

Hess, V. D.; Meyer, C.; "Dunnschichtchromatographie von anthocyanen", *Z. Naturforsch.* **1962**, 17b, 853.

- Hodson, D.; "Re-thinking old ways: towards a more critical approach to practical work in school science", *Stu. Sci. Edu.* **1993**, 22, 85.
- Hofstein, A. D.; V. N., Lunetta; "The laboratory in science education: foundations for the twenty-first century", *Sci. Edu.* **2004**, 88, 28.
- Holiman, P. C. H.; Hertog, M. G. L.; Katan, M. B.; "Analysis and health effects of flavonoids", *Food Chem.* **1996**, 57,43.
- Hoshiro, T; Matsumoto, V.; Goto, T.; "Self-association of some anthocyanins in neutral aqueous solution", *Phytochem.* **1981**, 20, 1971.
- Hrazdina, G.; "Oxidation of the anthocyanidin-3,5-diglucosides with H₂O₂: The structure of malvone", *Phytochem.* **1970**, 9, 1647.
- Hrazdina, G.; "Reactions of the anthocyanidin-3,5-diglucosides: Formation of 3,5-di-(O- β -D-glucosyl)-7-hydroxy coumarin ", *Phytochem.* **1971**, 10, 1125.
- <http://gpquae.iqm.unicamp.br/> (acessada, em 26/10/2004).
- <http://www.iqm.unicamp.br/apresent.html> (acessada, em 03/11/2004).
- Ikan, R.; *Natural Products - A laboratory guide*, Israel Universities Press: Jerusalem, 1969.
- ITAL - Instituto de Tecnologia de Alimentos. *Manual técnico de análise química de alimentos*. Campinas, 1990.
- Jackman, R. L.; Smith, J. L.; *Anthocyanins and betalains*. In *Natural Foods Colorantes*, G.A. Hendry; J. D. Houghton, ed., Blackie & Son: Glasgow, 2nd edition, 1996.
- Jackman, R. L.; Yada, R.Y.; Tung, M. A.; "A review: separation and chemical properties of anthocyanins used for their qualitative and quantitative analysis", *J. Food Biochem.* **1987**, 11, 279.

- Jain, M. C.; Seshadri, T. R.; "Anthocyanins of *Eugenia jambolana* fruits", *Indian J. Chem.* **1975**, 13, 20.
- Jaworski, A. W.; Lee, C. Y.; "Fractionation and HPLC determination of grape phenolics", *J. Agric. Food Chem.* **1987**, 35, 257.
- Jensen, W. B.; *The Lewis Acid-base Concepts*, John Wiley & Sons: New York, 1980.
- Jürg, W.; *Quantitative Chemistry. A Laboratory Text*, W. A. Benjamin, Inc.: New York, 1964.
- Kadar, A.; Robert, L.; Miskulin, M.; Tixier, J. M. "Influence of anthocyanoside treatment on the cholesterol induced atherosclerosis in the rabbit", *Paroi. Arteriel.* **1979**, 54, 187.
- Kamei, M.; Kojima, T.; Hasegawa, M.; Koide, T.; Umeda, T.; Yukawa, T.; Terabe, K.; "Suppression of tumor cell growth by anthocyanins in vitro", *Cancer Invest.* **1995**, 13, 590.
- Kanda, N.; Asano, T.; Itoh, T.; "Preparing chameleon balls from natural plants", *J. Chem. Edu.* **1995**, 72, 1131.
- Karaivanova, M.; Drenska, D.; Ovcharov, R.; "A modification of the toxic effects of platinum complexes with anthocyanins", *Eksp. Med. Morfol. Med. Morfol.* **1990**, 29, 19.
- Kermasha, S.; Goetghebeur, M.; Dumont, J.; "Determination of Phenolic Compound Profiles in Maple Products by High-Performance Liquid Chromatography", *J. Agric. Food Chem.* **1995**, 43, 708.
- Kraemer-Schaffhalter, A.; Fuchs, H.; Pfannhauser, W.; "Solid-phase extraction (SPE) – a comparison of 16 materials for the purification of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* var *Nero*", *J. Sci. Food Agric.* **1998**, 78, 435.
- Lee, H. S.; Coates, G. A.; "Quantitative study of free sugars and myo-inositol in citrus

- Lee, H. S.; Hong, V.; "Chromatographic analysis of anthocyanins", *J.Chromatogr.* **1992**, 624, 221.
- Lewis, W.; *Experiments and Observations on American Potashes. With an Easy Method of Determining their Respective Qualities*, London, 1767.
- Lietti, A.; Cristone, A.; Picci, M.; "Studies on vaccinium myrtillus anthocyanosides. 1. Vasoprotective and antiinflammatory", *Arzneim-Forsch.* **1976**, 26, 829.
- Lopes, D. B.; Chagas, A. P.; Rossi, A. V.;"Extratos de uva como indicador de pH: aspectos didáticos e analíticos", *Livro de Resumos da 24ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Poços de Caldas, Brasil, 2001. Resumo ED 057.
- Lopes, D. B.; Rossi, A. V.; "Indicadores naturais de pH: papel ou solução?", *Resumos da 24ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Poços de Caldas, Brasil, 2001. Resumo ED 058.
- Lu, Y.; Foo, Y.; "Unusual anthocyanin reaction with acetone leaning to pyranoanthocyanin formation", *Tet. Lett.* **2001**, 42, 1371.
- Luck, E.; *Z. Anal. Chem.* **1877**, 16, 332. *apud* Oesper 1974.
- Lunge, G.; *Chem. Ber.* **1878**, 11, 1944. *apud* Oesper 1974.
- Macheix, J-J.; Fleuriet, A.; Billot, J.; *Fruit Phenolics*, CRC Press: Boca Raton, 1990.
- Marquat, L. C.; *Die Fraben der Bluthen*, Bohn, **1835**. *apud* Ikan 1969.
- Mebane, R. C.; Rybolt; T. R.; "Edible acid-base indicators", *J. Chem. Edu.* **1985**, 62, 285.
- Merkel, W.; Bormann D.; Marria D.; Muscha W. R.; Hropot M.; "Piretamide (HO118). A new high ceiling salidiuretic"; *Eur. J. Med. Chem.* **1976**, 11, 399.
- Metivier, R. P.; Francis, F. J.; Clydesdade, F. M.; "Solvent extraction of anthocyanins from wine pomace", *J. Food Sci.* **1980**, 45, 1099.

Mian, E.; Curri, S.B.; Lietti, A.; "Anthocyanosides and microvessels wall – new findings on mechanism of action of their protective effect in syndromes due to abnormal capillary fragility", *Minerva Med.* **1977**, 68, 3565.

Moreira, M.A.; *Aprendizagem significativa*, Ed. UnB, Brasília, 1999.

Nybon, V. N.; *Fruchtsaft-Ind.* **1963**, 8, 205.

Odling, T. E.; Pflug, I., J.; "Sporicidal properties of chlorine compounds – applicability to cooling water for canned foods" *J. Milk Food Technol.* **1976**, 39, 7, 493.

Oesper, R. E.; "Indicators. A history perspective", *J. Chem. Edu.* **1964**, 41, 285.

Ordaz-Galindo, A.; Wesche-Ebeling, P.; Wrolstad, R. E.; "Purification and identification of Capulin (*Prunus serotina Ehrh*) anthocyanins", *Food Chem.* **1999**, 65, 201.

Oszmianski, J.; Lee, C. Y.; "Isolation and HPLC determination of phenolic compounds in red grapes", *Am. J. Enol. Vitic.* **1990**, 3, 204.

Parâmetros Curriculares Nacionais – PCN Ensino Médio, Ministério da Educação, Secretaria de Educação Média e Tecnológica, Brasília, 1999.

Pazminõ-Durán, E. A.; Giusti, M. M.; Wrolstad, R. E.; Gória, M. A. B.; "Anthocyanins from banana bracts (*Musa X Paradisiaca*) as potential food colorants", *Food Chem.* **2001**, 73, 327.

Petri, G.; Krawczyk, U.; Kéry, Á.; "Spectrophotometric and chromatographic investigation of bilberry anthocyanins for quantification purposes", *Microchem. J.* **1997**, 55, 12.

Ramos, L. A.; Lupetti, K. O.; Cavalheiro, E. T. G.; Fatibello-Filho, O.; "Utilização do extrato bruto de frutos de *Solanum Nigrum L* no ensino de química", *Ecl. Quim.* **2000**, 25, 229.

Ramos, L. A.; *Resumos da 23ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Poços de Caldas, Brasil, 2000.

Rancke-Madsen, E.; *The History of Indicators*. In *Indicators*, Bishop, E., Ed. Pergamon Press: Oxford, 1972.

Revilla, E.; Ryan, J-M; Martín Ortega, G.; "Comparison of several procedures used for the extraction of anthocyanin from red grapes", *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46, 4592.

Rheinboldt, H.; *Selecta Chimica* **1945**, 3, 1. Reimpresso in Rheinboldt, H.; *História da Balança*; Nova Stella e Edusp: São Paulo, 1988.

Ribereau-Gayon P.; *Recherche sur les anthocyanines des végétaux. Application au gene Vitis*. Librairie Générale de L'enseignement: Paris: 1959.

Robards, K.; Antolovich, M.; "Analytical chemistry of fruit bioflavonoids – A review", *Analyst* **1997**, 122, 11R.

Robinson, R.; *Chem. Ind.London* **1933**, 13, 737.

Rosa, M. I. F. T. S.; *Considerações iniciais sobre a construção da ciência Química e suas relações com processos de ensino-aprendizagem*, Texto utilizado em sala de aula, 15/03/2002, a ser submetido para publicação.

Rossi, A. V.; Pinheiro, T. A. L.; "Extrato de berinjela como indicador de pH: perspectivas de aplicação didática", *Resumos do 10º Encontro Nacional de Química Analítica*, Resumo E 1, Santa Maria, Brasil, 1999.

Saija A.; "Flavonoids as antioxidant agents: Importance of their interaction with biomembranes", *Free Radic. Biol. Med.* **1995**, 19, 481.

Sakamura, S.; Francis, F. J.; "The anthocyanins of the American cranberry", *J. Food Sci.* **1961**, 26, 318.

- Sandell, E. B.; West, T. S.; "Recommended nomenclature for titrimetric analysis", *Pure Appl. Chem.* **1969**, 18, 429.
- Saskia, A.; "Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids", *Biochem. Pharmacol.* **1998**, 56, 935.
- Scharrer, A.; Ober, M.; "Beta blocking treatment", *Klin. Monatsbl. Augenheikd.* **1981**, 178, 386.
- Schnetzler, R. P.; Aragão, R. R.; "Importância, sentido e contribuições de pesquisas para o ensino da química", *Química Nova na Escola* **1995**, 1, 27.
- Shrikhande, A. J.; Francis, F. J.; "Anthocyanin pigments of sour cherries", *J. Food Sci.* **1973**, 38, 649.
- Shui, G.; Leong, P.; "Separation and determination of organic acids and phenolic compounds in fruit juices and drinks by high-performance liquid chromatography", *J. Chromatogr. A* **2002**, 977, 89.
- Silva, S.; Tassara, H.; *Frutas no Brasil*, Empresa de Artes: São Paulo, 1996.
- Sistovaris, N.; Hamachi, Y.; Kuriki, T.; "Multifunctional substances – determination of pKa-values by various methods", *Fres. J. Anal. Chem.* **1991**, 340, 345.
- Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; *Fundamentals of Analytical Chemistry*, Saunders College Publishing: New York, 7th edition 1996.
- Soares, M. H. B.; Antunes, P. A.; Cavalheiro, E. T. G.; "Aplicação de extratos brutos de quaresmeira e azaléia e da casca do feijão preto em volumetria ácido-base. Um experimento de análise quantitativa", *Resumos da 23^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Poços de Caldas, Brasil, 2000. Resumo ED 078.
- Soares, M. H. F. B.; "Obtenção e Aplicação Didática de Pigmentos de Origem Vegetal: Equilíbrio Químico e Análise Instrumental", Dissertação de Mestrado, 2001.

Soares, M. H. F. B.; Cavalheiro, E. T. G.; "Aplicação de extratos brutos de quaresmeira e azaléia e da casca de feijão preto em volumetria ácido-base", *Quim. Nova* **2001**, 24, 408.

Soares, M. H. F. B.; Ramos, L. A.; Cavalheiro, E. T. G.; "Sulfite Determination in White Wines Using Crude Extract of Flowers", *J. Chem. Edu* **2002**, 79, 1111.

Solomons, T. W. G.; *Organic Chemistry*, 5th, John Wiley & Sons: New York, 1992.

Somers, T. C.; Evans, M. E.; "Wine quality: Correlations with colour density and anthocyanin equilibria in a group of young red wines", *J. Sci. Food Agric.* **1974**, 25, 1369.

Sondheimer, E.; Kertsz, Z. I.; "Colorimetric determination in Strawberries and strawberry products", *Anal. Chem.* **1948**, 20, 245.

Stringheta, P. C.; Bobbio, P. A.; *Biotec., Cienc. Desen.* **2000**, 14, 34.

Suárez, B; Picinelli, A.; Mangas, J. J.; "Solid-phase extraction and high-performance liquid chromatographic determination of polyphenols in apple musts and ciders", *J. Chromatogr. A* **1996**, 727, 203.

Süss, H. U.; *Bleaching*. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, W. Gerhartz; Y. S., Yamamoto; Campbele, F. T.; Pfefferkorn, R.; Rousaville, J. F. Eds.; VCH: New York, 1985, vol. A4.

Swain, T.; Hills, W.E.; "The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. The quantitative analysis of phenolic constituents", *J. Sci. Food Agric.* **1959**, 10, 63.

Szily, P.; *Orv. Hetil.* **1903**, 509. *apud* Oesper 1974.

Takamura, H.; Yamagami, A.; "Antioxidative activity of monoacylated anthocyanins isolated from Muscat Bailey a grape", *J. Agric. Food Chem.* **1994**, 42, 1612.

Tamura, H.; Hayashi, Y.; Sugisawa, H.; Kondo, T. "Structure determination of acylated anthocyanins in muscat bailey a grapes by homonuclear hartmann –

(HOHAHA) spectroscopy and liquid chromatography mass-spectrometry", *Phytochem. Anal.* **1994**, 5, 190.

Tanner, V. H.; Rentschler, H.; Senn, G.; *Mitt. (Klosterneuburg), Ser. A., Rebe Wein* **1963**, 13, 156.

Taras, M. J.; Greenberg, A. E.; Hoak, R. D.; Rand, M. C.; *Standard Methods for the examination of water and wastewater*, American Public Health Association: Washington D.C., 1971.

Teeling, C. G. V.; Cansfield, P. E.; Gallop, R. A.; *J. Chem. Sci.* **1971**, 9, 505.

Teixeira, C. M.; Queiroz, M. E. L. R.; Queiroz, J. H.; Neves, A. A.; Miranda, L. C. G.; Oliveira, T. T.; Nagem, T., *Livro de Resumos da 18ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Caxambu, Brasil, 1995.

Terci, D. B. L.; Rossi, A. V. Ganzarolli, M.; "Abordagem qualitativa do conceito de difusão de líquidos com o uso de extratos de frutas", *CD de Resumos do I EPPEQ*, Campinas, 2004.

Terci, D. B. L.; Rossi, A. V.; "Determinação colorimétrica de cloro livre com extrato de jambolão" Livro de Resumos do XLIII Congresso Brasileiro de Química, A02-070, 2003.

Terci, D. B. L.; Rossi, A. V.; "Determinação Espectrofotométrica de hipoclorito em água sanitária utilizando corante natural", Livro de Resumos do 11º Encontro Nacional de Química Analítica, EM-5, 2001.

Terci, D. B. L.; Rossi, A. V.; "Indicadores naturais de pH: usar papel ou solução?"; *Quim. Nova* **2002**, 23, 316.

Terra, J.; Histórico, Usos Oficiais e Avaliação da Redução de Escala da Análise Volumétrica para Fins Didáticos, Dissertação de Mestrado: Campinas/SP, 2004.

Tian, K.; Dasgupta, P. K., "Simultaneous flow-injection measurement of hydroxide, chloride, hypochlorite and chlorate in chlor-alkali cell effluents", *Talanta* **2000**, 52, 623.

Timberlake, C. F.; Henry, B.S., "Anthocyanins as natural food colorants" *Prog. Clin. Biol. Res.* **1988**, 280, 107.

Torskangerpoll, K.; Borve, K. J.; Andersen O. M.; Saethere, L.; "Color and substitution pattern in anthocyanidins. A combined quantum chemical–chemometrical study", *Spectrochim. Acta A* **1998**, 55, 761.

Trevisan, L. M.; Bobbio, F. O.; Bobbio, P. A.; "Carbohydrates, organic acids and anthocyanin of *Myrciaria jaboticaba*, Berg", *J. Food Sci* **1972**, 37, 818.

Tswett, M. S.; *Ber. Deut. Bot. Ges.* **1914a**, 32, 61.

Tswett, M. S.; *Biochem. Z.* **1914b**, 55, 225.

Varian - Chromatography & Spectroscopy Supplies, Canada, 2001/2002.

Vogel, A.I.; *Química Analítica Quantitativa*; Mestre Jou: São Paulo, 5ª edição, 1991.

Vogt, H.; Balej, J.; Bennet, J. E.; Wintzer, P.; Sheikh, S. A.; Gallone, P.; *Chlorine Oxides and Chlorine Oxygen Acids*. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, W. Gerhartz; Y. S., Yamamoto; Campbele, F. T.; Pfefferkorn, R.; Rousaville, J. F. Eds.; VCH: New York, 1985, vol. A6.

Walden, P.; *Chronologische Übersichtstabellen zur Geschichte der Chemie von den ältesten Zeiten bis zur Gegenwart*, Springer: Berlin, 1952.

Wang, H.; Cao, G.; Prior, R. L.; "Oxygen radical absorbing of anthocyanins", *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45, 3042.

Wang, P. L.; Francis, F. J.; "A new anthocyanin from *Viburnum trilobum*", *J. Hort. Sci.* **1972**, 7, 87.

Waters Corporation, *Food and Beverages*, Em *Waters Sourcebook of Chromatography*, Waters Corp:Milford, 1992.

Wilkinson, M.; Swwny, J. G.; Iacobucci, G. A.; " High-pressure liquid chromatography of anthocyanidins", *J. Chromatogr.* **1977**, 132, 349.

Wrolstad, R. E.; Cullbertson, J. D.; Cornwell, C. J.; Mattick, L. R.; "Detection of adulteration in blackberry juice concentrates and wines", *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1982**, 65, 1417.

Wrolstad, R. E.; Hong, V.; Boyles, M. J.; Durst, R. W.; *Use of anthocyanin pigment analysis for detection adulteration in fruit juices*. In: *Methods to detect Adulteration in Fruit Juice and Beverages*; Nagy S.; Wade, R. L.; ed., AgScience: Auburndale, 1995, Vol I.

Yamasaki, H.; Uefuji, H.; Sakihama, Y.; "Bleaching of red anthocyanin induced by superoxide radical", *Arch. Biochem. Biophys.* **1996**, 332, 183.

ANEXO 1

Equação para correção da absorvância devido ao espalhamento da luz

$$A = (A_{510 \text{ nm pH } 1,0} - A_{700 \text{ nm pH } 1,0}) - (A_{510 \text{ nm pH } 4,5} - A_{510 \text{ nm pH } 4,5}) \quad (1)$$

Equação da Lei de Beer:

$$A = \epsilon bc \quad \text{onde: } \epsilon = 26.900 \quad (2)$$

$b = 1 \text{ cm}$
 $c = \text{concentração em mol L}^{-1}$
 $A = \text{absorvância}$

De (2) temos:

$$c = (A \times MM \times 1000) / \epsilon b \quad \text{onde: } \epsilon = 26.900 \quad (3)$$

$b = 1 \text{ cm}$
 $c = \text{concentração em mg L}^{-1}$
 $A = \text{absorvância}$
 $MM = \text{massa molar da cianidina-3-glicosídeo (g mol}^{-1}\text{)}$

Equação da Lei de Diluição de Ostwald:

$$cV = c'V' \quad \text{onde: } V = \text{volume da alíquota (350 x 10}^{-6}\text{ mL)} \quad (4)$$

$V' = \text{volume do balão contendo a solução estoque diluída (5 x 10}^{-3}\text{ mL)}$
 $c = \text{concentração da alíquota (mg L}^{-1}\text{)}$
 $c' = \text{concentração da solução diluída (mg L}^{-1}\text{)}$

$$c' = m_x / V'' \quad \text{onde: } V'' = \text{volume do balão contendo a solução estoque (10 mL)} \quad (5)$$

$m_x = \text{de antocianina contida no balão da solução estoque (g)}$

$$m_t = (m_e \times m_x) / m_p \quad \text{onde: } m_e = \text{massa de extrato obtida após a extração (g)} \quad (6)$$

$m_p = \text{massa de extrato usada para o preparo da solução (g)}$
 $m_t = \text{massa total de antocianina (g)}$

$$c_t = (m_t \times 100) / m_c \quad \text{onde: } c_t = \text{concentração (mg de antocianina/100g de casca)} \quad (7)$$

$m_c = \text{massa de casca e/ou fruta usada para a extração (g)}$

Substituindo (6) em (7) temos:

$$c_t = (m_e \times m_x \times 100) / (m_p \times m_c) \quad (8)$$

Substituindo (5) em (4):

$$c = (m_x \times V') / (V'' \times V) \quad (9)$$

Substituindo (8) em (3):

$$(m_x \times V')/(V'' \times V) = (A \times MM \times 1000)/\epsilon b \quad (10)$$

Substituindo (10) em (8):

$$c_t = 100 \times m_e \times V'' \times V \times A \times MM \times 1000)/\epsilon b V'$$

Substituindo pelos valores usados temos:

$$C_{(mg/100g)} = (238,6 \times A \times m_e)/m_p \times m_c$$

ANEXO 2

Relatório de Pedido de Patente

Papel indicador de pH universal usando papel de filtro qualitativo impregnado com extratos alcóolicos de frutas contendo antocianinas

A presente patente de modelo de utilidade tem por objetivo um modelo de papel indicador de pH universal, para uso em laboratórios químicos e similares e ao qual foi dada original construção, com vistas a utilização de um conjunto de frutas facilmente encontradas no Brasil.

Papéis indicadores de pH são tiras de papel impregnadas com um ou mais corantes indicadores ácido-base que podem ser usados para a uma rápida obtenção de informação relacionada ao valor do pH de diversos tipos de amostras.

A maioria dos papéis indicadores de pH são obtidos a partir da impregnação de papéis apropriados com soluções de indicadores sintéticos e secos sob uma atmosfera inerte e condições constantes.

De acordo com o procedimento usual para a obtenção de papel indicador de pH é necessário sintetizar todos os indicadores utilizados na impregnação do papel e controlar a etapa de secagem.

Tendo em vista o trabalhoso processo de síntese dos indicadores sintéticos, e das etapas que o compreende, tais como, separação e purificação, bem como o controle da secagem; no propósito de superar essas dificuldades foi desenvolvido um papel indicador de pH universal pela impregnação de papel de filtro qualitativo com extratos vegetais de frutas facilmente encontradas em praticamente todas as regiões brasileiras contendo antocianinas, pigmentos da classe dos flavonóides, responsáveis pela coloração azul, vermelho, violeta, rosa e laranja de flores e frutas.

Inicialmente foram preparados extratos alcóolicos das quatro espécies vegetais que possuem pigmentos pertencentes à classe das antocianinas: *Morus nigra* (amora), *Myrciaria cauliflora* (jaboticaba), *Syzygium cuminii* (jambolão) e a *Vitis vinífera* (uva). Os extratos foram preparados pela imersão das cascas e/ou polpas destas espécies em etanol comercial por aproximadamente vinte e quatro horas numa proporção 1:3 (massa:volume). Podem ser utilizados outros solventes polares, tal como água, metanol, acetona e n-butanol, ou misturas destes solventes. Após este período os extratos foram filtrados obtendo-se as soluções alcóolicas de indicadores de pH naturais. Os extratos também podem ser preparados pelo aquecimento das cascas e/ou polpas utilizando-se água como solvente, a uma temperatura inferior a 200 °C.

Os papéis de filtro foram recortados na forma de quadrados de aproximadamente 0,5 x 0,5 cm, os quais foram imersos, por cerca de 30 segundos, em cada um dos extratos alcóolicos das frutas separadamente e secos ao ar (temperatura ambiente).

Os quadrados de papel de filtro impregnado com os diferentes extratos alcóolicos, foram fixados sobre uma tira de fita adesiva dupla face (0,5 x 4,0 cm), conforme ilustrado na **Figura 1**. Outros materiais a base de celulose ou polímeros com superfície adesiva, podem ser usados em substituição ao papel de filtro e a fita adesiva dupla face. Para conferir maior rigidez, adequada para manipulação, a tira adesiva contendo os quadrados de papel de filtro impregnados com os extratos, foi colada em um filme de policloreto de vinila (PVC), no entanto, podem ser usados outros suportes poliméricos ou de celulose podem ser usados para esta finalidade, entre eles: politereftalato de etileno (PET), poliestireno (PS), polipropileno (PP), polietileno (PE).

Na **Figura 1**, 1 mostra a fita adesiva dupla face sobre um filme de PVC, 2 mostra o quadrado de papel de filtro qualitativo impregnado com o extrato de amora, 3 ilustra o papel de filtro qualitativo impregnado com o extrato de jaboticaba, 4 traz o papel de filtro qualitativo impregnado com o extrato de jambolão e 5 representa o papel de filtro qualitativo impregnado com o extrato de uva.

Os papéis indicadores obtidos apresentaram uma nítida variação de cor em função do pH, que foi caracterizada de acordo com sistema de cores Pantone Matching System®. A escolha deste sistema foi devido a disponibilidade, entretanto outros sistema nacionais ou internacionais de cores podem ser usados (RBG, CMYK). A **Figura 2**, mostra a variação de cor em função do pH dos quatro pigmentos (antocianinas extraídas das frutas) impregnados no papel de filtro, bem como o código das cores do sistema Pantone Matching System®.

Neste trabalho utilizou-se as espécies vegetais *Morus nigra* (amora), *Myrciaria cauliflora* (jaboticaba), *Syzygium cuminii* (jambolão) e a *Vitis vinífera* (uva), no entanto existe a possibilidade da utilização de outras espécies vegetais que contenham antocianinas.

REIVINDICAÇÃO

“Papel indicador de pH universal usando papel de filtro qualitativo impregnado com extratos alcóolicos de frutas contendo antocianinas” compreendido por papel de filtro qualitativo impregnado com soluções indicadoras de pH, obtidas pela extração das antocianinas de frutas populamente brasileiras, caracterizado pelo fato de mudar de cor em função do pH. O papel indicador de pH desenvolvido é caracterizado pelo fato da utilização de papel de filtro qualitativo impregnado com extratos vegetais de *Morus nigra* (amora), *Myrciaria cauliflora* (jaboticaba), *Syzygium cuminii* (jambolão) e a *Vitis vinifera* (uva) fixados em uma fita adesiva dupla face, suportada em um filme de PVC, **Figura 1**. A faixa de medida de pH obtida com o uso deste papel é de uma unidade.

RESUMO

“Papel indicador de pH universal usando papel de filtro qualitativo impregnado com extratos alcóolicos de frutas contendo antocianinas” Patente de Modelo de Utilidade para um papel indicador de pH universal que é compreendido de uma fita adesiva dupla face suportada em um filme de plicloreto de vinila 1, para a fixação de papéis de filtro qualitativo impregnados com extratos alcóolicos de espécies encontradas na flora brasileira: *Morus nigra* (amora) 2, *Myrciaria cauliflora* (jaboticaba) 3, *Syzygium cuminii* (jambolão) 4 e a *Vitis vinifera* (uva) 5.



Fig. 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1925	214	214	234	683	228	683	511	242	260	2623	261	547	562
190	205	205	205	203	212	211	211	211	212	1905	211	5425	5777
Rod. red c	254	254	2602	2583	2602	2592	267	2602	2746	541	2728	5483	610
232	683	683	681	681	681	689	5145	628	5275	534	534	534	5285