

PATRÍCIA BELTRÃO LESSA CONSTANT

EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE ANTOCIANINAS DE
AÇAÍ (*Euterpe oleraea*, M.)

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Ciência e Tecnologia
de Alimentos, para obtenção do Título
de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2003

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

C757a
2003

Constant, Patrícia Beltrão Lessa, 1971-

Extração, caracterização e aplicação de antocianinas de
açaí (*Euterpre oleraea*, M.) / Patrícia Beltrão Lessa
Constant. – Viçosa : UFV, 2003.
183p. : il.

Orientador: Paulo César Stringheta

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa

1. Antocianina - Extração. 2. Antocianina - Identifica-
ção. 3. Antocianina - Aplicação. 4. Antocianina - Estabili-
dade. 5. Açaí - Antocianina. 6. Corantes em alimentos.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 19.ed. 664.07

CDD 20.ed. 664.07

PATRÍCIA BELTRÃO LESSA CONSTANT

EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE ANTOCIANINAS
DE AÇAÍ (*Euterpe oleraea*, M.)

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do Título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 17 de julho de 2003.

Dra. Jane Sélia dos Reis Coimbra
Conselheira

Dr. Juraci Alves de Oliveira
Conselheiro

Dr. Antônio de Albuquerque Figueiredo

Dr. Marcelo Henrique dos Santos

Dr. Paulo Cesar Stringheta
Orientador

Aos meus pais, José Maria e Rosa Maria,
Aos meus irmãos, Luciana, André, Felipe, Bernardo, Guilherme e
Daniel,
Ao meu companheiro Sandi,

DEDICO

A Deus

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus, luz que guia meus passos.

Ao professor Paulo César Stringheta pela orientação, pelo exemplo de competência e profissionalismo, pela convivência tão gratificante, pela amizade, pelos ensinamentos e pelo apoio incondicional.

Ao Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, ao CNPq, pela oportunidade e pelo apoio financeiro.

Ao Centro de Pesquisa Agroindustrial da Amazônia Oriental (CPATU – EMBRAPA), onde parte deste trabalho foi desenvolvida. Especialmente à Dra. Raimunda Fátima, que permitiu meu acesso ao laboratório de corantes naturais do Centro, e as funcionárias Ana Lúcia Nunes Fé, Solange Branches Villar e Benedita do Nascimento Araújo, que gentilmente me receberam e ajudaram.

À empresa Christian Hansen, que sempre atendeu prontamente às nossas solicitações, gentilmente cedendo parte da matéria-prima empregada como corante neste trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Pigmentos Naturais e Secagem/DTA, Lígia Santana e Valério Polleto, que me acompanharam de perto, facilitando a execução deste trabalho.

À professora Jane Sélia, pela preocupação, pelos ensinamentos e pela valiosa amizade.

Ao professor Juraci Alves de Oliveira, pela disponibilidade, pela ajuda e pelos conselhos oportunos.

À Geralda, Vânia e Sueli, pela boa vontade, pela convivência e pela grande ajuda.

Aos colegas do laboratório, Paulo César, Leonardo, Laura, Carmem, Lívia e Luiggi pela alegre convivência durante a execução deste trabalho.

À minha grande amiga Lucía pelo apoio, pela presença constante, pelo dia a dia compartilhado de forma tão descontraída e feliz e pela inestimável amizade.

A Delcio Sandi, pelo amor, pelo convívio, pelo encorajamento e paciência constante, pelo exemplo de força de vontade, competência e obstinação.

Ao meu tão amado pai, espelho e fonte do mais profundo orgulho para mim. À minha querida e valorosa mãe, amiga de todas as horas e fonte de carinho e incentivo eternos. Aos meus irmãos Luciana, André e Felipe que sempre acreditaram incondicionalmente na minha vitória. Aos ainda pequeninos irmãos Bernardo, Guilherme e Daniel por existirem e proporcionarem tanta alegria em minha vida. A Cláudia pelo carinho e conselhos oportunos.

Àqueles, que por ventura não tenham sido citados, mas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

RESUMO	viii
ABSTRACT	xi
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO DE LITERATURA	4
1. Antocianinas	5
2. Estrutura química das antocianinas	5
3. Transformações estruturais em meio aquoso	7
4. Estabilidade das antocianinas	9
5. Análise de antocianinas	11
5.1. Análise qualitativa	11
5.1.1. Extração	11
5.1.2. Purificação e identificação das antocianinas	12
5.1.2.1. Cromatografia em papel	13
5.1.2.2. Cromatografia em camada delgada	15
5.1.2.3. Cromatografia em coluna	17
5.1.2.4. Cromatografia líquida de alta eficiência	22
5.1.3. Identificação	26
5.2. Análise quantitativa	29
6. Fontes de antocianinas	30
CAPÍTULO 1 – AVALIAÇÃO DE DIFERENTES CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DA ANTOCIANINA DO AÇAÍ (<i>Euterpe oleracea</i> M)	32
1. INTRODUÇÃO	33
2. MATERIAL E MÉTODOS	35
2.1. Material	35
2.2. Métodos	35
2.2.1. Testes preliminares	35
2.2.2. Quantificação da antocianina do açaí	36
2.2.3. Determinação do solvente de extração	36
2.2.3.1. Etapa 1	37
2.2.3.2. Etapa 2	38
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
3.1. Testes preliminares	39
3.2. Determinação do solvente de extração	41
3.2.1. Etapa 1	41
3.2.2. Etapa 2	47
3.2.2.1. Quantificação das antocianinas	47
3.2.2.2. Determinação do solvente extrator	50
4. RESUMO E CONCLUSÕES	52
CAPÍTULO 2 – PURIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE DIFERENTES EXTRATOS ANTOCIÂNICOS DE AÇAÍ (<i>Euterpe oleracea</i> M)	55
1. INTRODUÇÃO	56
2. MATERIAL E MÉTODOS	59
2.1. Material	59
2.2. Métodos	60
2.2.1. Preparação dos extratos de antocianinas	60
2.2.2. Purificação do extrato	60
2.2.2.1. Cromatografia em papel	60

2.2.2.2. Cromatografia em coluna	61
2.2.3. Fluxograma dos processos de extração e purificação dos extratos	61
2.2.4. Caracterização espectrofotométrica e colorimétrica	62
2.2.5. Separação das antocianinas por cromatografia líquida de alta eficiência	62
2.2.6. Avaliação da estabilidade	63
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
3.1. Preparo do extrato	64
3.2. Avaliação dos extratos brutos obtidos por sistemas solventes distintos	65
3.2.1. Caracterização espectrofotométrica e colorimétrica	65
3.2.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	67
3.2.3. Estabilidade	69
3.4. Purificação e avaliação das diversas frações obtidas a partir do extrato obtido com etanol 70% acidificado a pH 2 com HCl	84
3.4.1. Cromatografia em papel	84
3.4.2. Cromatografia em coluna	85
3.4.3. Caracterização espectrofotométrica e colorimétrica	85
4.4. Cromatografia líquida de alta eficiência	88
3.4.5. Estabilidade	91
4. RESUMO E CONCLUSÕES	106
CAPÍTULO 3 – IDENTIFICAÇÃO DAS ANTOCIANINAS DO FRUTO AÇAÍ (<i>Euterpe oleracea</i> M)	108
1. INTRODUÇÃO	109
2. MATERIAL E MÉTODOS	110
2.1. Material	110
2.2. Métodos	111
2.2.1. Obtenção do extrato antociânico	111
2.2.2. Purificação do extrato antociânico	111
2.2.3. Identificação das frações purificadas	112
2.2.3.1. Hidrólise ácida das zonas purificadas	112
2.2.3.1.1. Identificação dos açúcares	112
2.2.3.1.2. Identificação das agliconas	113
2.2.3.2. Hidrólise alcalina das zonas purificadas	113
2.2.3.3. Hidrólise controlada	113
2.2.3.4. Reações específicas de antocianinas	114
2.2.3.5. Cromatografia líquida de alta eficiência	114
2.2.3.6. Análise por espectrofotometria no UV/visível	115
2.2.3.7. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear	115
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	115
3.1. Purificação do extrato antociânico	115
3.2. Identificação dos pigmentos purificados	119
3.2.1. Reações específicas das antocianinas	119
3.2.2. Características espectrais das antocianinas	122
3.2.3. Hidrólise controlada	123
3.2.4. Identificação das agliconas	124
3.2.5. Identificação dos açúcares	126
3.2.6. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear	126
3.2.6.1. Fração Z1	126

3.2.6.2. Fração Z2	132
4. RESUMO E CONCLUSÕES	137
CAPÍTULO 4 – FORMULAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE CORANTE DE AÇAÍ (<i>Euterpe oleracea</i> M.)	137
1. INTRODUÇÃO	138
2. MATERIAL E MÉTODOS	138
2.1. Material	138
2.2. Métodos	139
2.2.1. Obtenção do extrato antociânico	139
2.2.2. Obtenção do corante formulado	139
2.2.3. Efeito da secagem sobre o pigmento	141
2.2.4. Caracterização do corante formulado	142
2.2.5. Caracterização do corante em pó	142
2.2.6. Avaliação da estabilidade	142
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	143
3.1. Teor antociânico do extrato	143
3.2. Efeito da secagem sobre o pigmento	143
3.3. Caracterização do corante formulado em pó	144
3.4. Avaliação da estabilidade	145
3.4.1. Efeito da luz	145
3.4.2. Efeito do calor	149
4. RESUMO E CONCLUSÕES	153
CAPÍTULO 5 – APLICAÇÃO DO CORANTE DE AÇAÍ (<i>Euterpe oleracea</i> M.) EM SISTEMAS ALIMENTÍCIOS	154
1. INTRODUÇÃO	155
2. MATERIAL E MÉTODOS	157
2.1. Material	157
2.2. Métodos	158
2.2.1. Quantificação do teor antociânico dos corantes formulados	158
2.2.2. Caracterização colorimétrica dos corantes em pó	158
2.2.3. Aplicação dos corantes nos alimentos	159
2.2.3.1. Primeira etapa	159
2.2.3.1.1. Aplicação do pigmento em iogurte	159
2.2.3.1.2. Aplicação do pigmento em queijo tipo petit suisse	160
2.2.3.1.3. Aplicação do pigmento em bebida isotônica líquida	160
2.2.3.2. Segunda etapa	161
2.2.3.2.1. Aplicação dos corantes em iogurte	161
2.2.3.2.2. Aplicação dos corantes em bebida isotônica em pó	161
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	162
3.1. Soluções corantes	162
3.2. Primeira etapa	162
3.2.1. Aplicação do corante em iogurte	163
3.2.2. Aplicação do corante em queijo tipo petit suisse	164
3.2.3. Aplicação do corante em bebida isotônica	165
3.3. Segunda etapa	167
3.3.1. Aplicação do corante em iogurte	167
3.3.2. Aplicação do corante em bebida isotônica em pó	170
4. RESUMO E CONCLUSÕES	173
CONCLUSÃO GERAL	174
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	176

RESUMO

CONSTANT, Patrícia Beltrão Lessa. D.S. Universidade Federal de Viçosa, julho de 2003. **Extração, caracterização e aplicação de antocianinas de açaí (*Euterpe oleracea*, M.)**. Orientador: Paulo César Stringheta. Conselheiros: Jane Sélia dos Reis Coimbra e Juraci Alves de Oliveira.

As antocianinas provavelmente são os mais conhecidos pigmentos naturais. O grande interesse pelas antocianinas, como ingredientes alimentícios, tem sido recentemente reacendido como resultado das contínuas restrições legais aos corantes artificiais. Apesar das dificuldades associadas ao seu emprego, uma vez que são sensíveis a diversos fatores inerentes aos alimentos e sofrem degradação com relativa facilidade, é considerado importante estudar novas fontes de antocianinas e técnicas de estabilização com o intuito de viabilizar o seu emprego como ingrediente. O açaí (*Euterpe oleracea* M), é uma fonte promissora, uma vez que é encontrado em abundância no Norte do Brasil e apresenta um alto teor de antocianinas. Apesar de ser consumido há décadas é pouco estudado principalmente no tocante a seu conteúdo corante. Assim no presente trabalho o açaí foi avaliado como uma potencial matriz antociânica, foram estabelecidas condições ótimas para extração do pigmento, determinadas a estabilidade do extrato antociânico, o seu conteúdo e sua composição, formulado um corante a base do pigmento de açaí e analisada sua de estabilidade e aplicações em sistemas alimentícios distintos. O teor de antocianina quantificado no fruto fresco foi em torno de 100 mg por 100 g de frutos (base úmida), ou 500 mg por 100 g de polpa, o que confirma que o fruto do açaizeiro é uma fonte que contém apreciável quantidade de material corante. Para a determinação das condições de extração foram avaliados primeiramente o tipo de solvente extrator (etanol ou água), o pH do meio (2 ou 3,5) e o tipo de ácido empregado (ácido clorídrico, ácido cítrico ou ácido tartárico). No caso do açaí, o sistema tradicionalmente empregado na extração antociânica, etanol 70 % (v/v) acidificado com HCl a pH 2, foi também o mais eficiente em termos de quantidade de antocianinas extraída. Avaliou-se também o efeito da adição SO₂, em diferentes concentrações, sobre os solventes água ou etanol 70 % (v/v) e em presença e ausência de HCl. O solvente água acrescido de 4000 ppm de SO₂ e o etanol 70 % (v/v) com 1000 ppm de SO₂ foram os solventes que mostraram o melhor

desempenho em relação ao teor de pigmento extraído. A temperatura influenciou a extração das antocianinas do açaí, sendo que o processo extrativo ocorreu de forma lenta sob refrigeração. À temperatura ambiente (31 ± 1 °C) a extração foi conduzida por 48 horas ao abrigo de luz. Como a extração pode ser acelerada com o uso de temperaturas mais elevadas, a 60 °C obteve-se maior rendimento com pouca degradação de pigmento. Na purificação das frações antociânicas, foram empregadas diferentes técnicas cromatográficas e na determinação das estruturas, foram utilizadas análises químicas e físicas de cromatografia em papel, cromatografia líquida de alto desempenho, cromatografia a gás, espectrofotometria UV/visível e espectroscopia de ressonância magnética nuclear. A composição antociânica do açaí é formada por uma mistura de antocianinas relativamente simples, com dois tipos de antocianinas aparecendo em maior proporção e que foram identificadas como cianidina-3-glicosídeo e cianidina-3-rutinosídeo. Observou-se que dependendo do solvente empregado na extração é possível alterar não apenas o perfil como também a estabilidade do extrato antociânico final. As matérias-primas do corante formulado utilizadas como veículo e estabilizantes ao mesmo tempo, foram maltodextrina e β -ciclodextrina. Como métodos de secagem, foram utilizados atomização por “spray drier” e liofilização. A secagem por “spray-drier” leva a pequena perda do pigmento antociânico, não sendo praticamente presença de corante degradado no produto em pó. Isso é vantajoso pois a armazenagem do produto na forma de pó é mais conveniente que na forma líquida. Aparentemente a desidratação das formulações não contribuiu para a formação de complexos entre a antocianina e o carboidrato veículo. Nas condições de análise, todas as formulações apresentaram desempenho semelhante no que diz respeito à estabilidade do pigmento frente à luz e ao calor. Na etapa de aplicação do corante os sistemas avaliados foram iogurte, queijo tipo petit suisse, bebida isotônica líquida e bebida isotônica em pó. Além do açaí, usou-se como testemunhas corante formulado com capim gordura (*Mellinis minutiflora*, Pal de Beauv) e antocianina comercial de uva. Entre os alimentos testados, o único que não se mostrou apropriado foi a bebida isotônica na forma líquida, em que o corante sofreu rápida degradação. A formulação feita nesse trabalho utilizando maltodextrina e antocianina de

açaí mostrou-se mais eficiente que a formulação comercial de enocianina, com menor alteração nas coordenadas colorimétricas ao longo do tempo.

ABSTRACT

CONSTANT, Patrícia Beltrão Lessa. D.S. Universidade Federal de Viçosa, July 2003. **Extraction, characterization and application of açai (*Euterpe oleracea*, M.) anthocyanins**. Adviser: Paulo Cesar Stringheta. Committee members: Jane Celia dos Reis Coimbra and Juraci Alves de Oliveira.

Anthocyanins are probably the best-known natural pigments. A great interest in anthocyanins as food ingredients has recently rekindled as a result of continuous legal restrictions against artificial ingredients. In spite of the difficulties associated to their use, since they are sensitive to several food-inherent factors and undergo degradation relatively easily, new sources of anthocyanins and new stabilization techniques should be studied in order to make viable their use as ingredients. Açai (*Euterpe oleracea* M) is a promising source since it is abundantly found in Northern Brazil and presents high anthocyanin content. Despite being consumed for decades, it has been little studied, especially as a colorant. Thus in this work, Açai was evaluated as a potential anthocyanin matrix; optimal conditions for pigment extraction were established; the stability, content and composition of the anthocyanin extract was established and a colorant was formulated based on Açai pigment and its stability and applications in distinct food systems were analyzed. Anthocyanin content quantified in the fresh fruit was around 100 mg per 100 g of fruit (wet basis) or 500 mg per 100 g pulp, confirming that the Açai tree fruit contains an appreciable amount of colorant material. To determine the extraction conditions, type of extracting solvent (ethanol or water), medium's pH (2 or 3.5) and type of acid used (hydrochloric acid, citric acid or tartaric acid) were firstly evaluated. For Açai, the system traditionally employed in anthocyanin extraction, ethanol 70 % (v/v) acidified with HCl at pH 2, was also the most efficient for the amount of anthocyanins extracted. The effect of adding different concentrations of SO₂ to the solvents water or 70 % ethanol, (v/v), with and without HCl, was determined. Water with 4000 ppm of SO₂ and ethanol 70 % (v/v) with 1000 ppm of SO₂ had the best performance regarding content of pigment extracted. The temperature influenced Açai anthocyanin extraction, with the extraction occurring slowly under refrigeration. Under ambient temperature (31± 1 °C), the extraction was conducted for 48 hours in the absence of light. Extraction may

be accelerated by higher temperatures thus at 60 °C a higher yield was obtained with little pigment degradation. Different chromatographic techniques were applied to purify the anthocyanin fractions. The chemical structures were determined by paper chromatography, high performance liquid chromatography, gas chromatography, UV visible spectroscopy and nuclear magnetic resonance. The anthocyanin composition in Açaí consists of a relatively simple mixture, with the two major ones being identified as: cyanidin 3-glucoside and cyanidin 3-ruthenoside. Depending on the solvent used for extraction, it is possible to alter not only the profile but also the stability of the final anthocyanin extract. The raw materials of the formulated colorant, utilized as a medium and stabilizers at the same time, were maltodextrine and β -cyclodextrine. For drying, spray drier atomization and lyophilization were used. Spray drying leads to a small loss of anthocyanin pigments, practically without the presence of the degraded colorant in the powdered product. This is advantageous since powdered product storage is more convenient than in the liquid form. Apparently, dehydration of the formulations did not contribute to the formation of complexes between the anthocyanins and the carbohydrate medium. Under the analysis conditions, all the formulations had a similar performance regarding stability of the pigment under light and heat. For colorant application, the systems evaluated were: yogurt, petit Suisse cheese, liquid isotonic beverage, and powdered isotonic beverage. Besides Açaí, colorants formulated with molasses grass (*Melinis minutiflora*, Pal de Beauv) and commercial grape anthocyanin were used as controls. Among the tested foods, the only one that did not show to be appropriate was the liquid isotonic beverage, in which the colorant underwent rapid degradation. The formulation made in this work using maltodextrine and Açaí anthocyanin showed to be more efficient than the enocyanin commercial formulation, with smaller alteration in the colorimetric coordinates along time.

INTRODUÇÃO

É fato conhecido que a cor é um atributo que influencia de forma decisiva na preferência do consumidor, ao adquirir determinado alimento. Considerando que a manutenção da cor original no produto processado e armazenado é importante, a adição de corantes artificiais tornou-se prática usual e necessária, devido a sua maior estabilidade. Para os vários tipos de pigmentos naturais esta manutenção é, muitas vezes, difícil pelas possibilidades de transformação que estes podem sofrer (BOBBIO e BOBBIO, 1992).

O número de corantes artificiais, comprovadamente inócuos à saúde, é, entretanto, pequeno, podendo ser reduzido de acordo com novas pesquisas sobre sua toxidez. Assim, o interesse por corantes naturais vem crescendo a cada dia, e muitos estudos sobre fontes, extração e estabilidade têm sido efetuados com o intuito de permitir a sua utilização em detrimento dos artificiais (BOBBIO e BOBBIO, 1992).

A substituição dos corantes artificiais pelos naturais está sujeita a dificuldades, em virtude de questões relacionadas à estabilidade, principalmente nas condições de processamento e armazenamento dos alimentos. Impulsionados pelos consumidores, cada vez mais exigentes, os pontos problemáticos têm sido intensamente analisados e diversas propostas para solucioná-los vêm surgindo e desvendando um futuro promissor quanto ao emprego dessa matéria-prima.

As antocianinas provavelmente são os mais conhecidos dos pigmentos naturais. Onipresentes no reino vegetal, eles são responsáveis por grande parte das cores laranja, vermelho, azul, violeta e magenta das plantas. Sua grande evidência em termos visuais atraiu os esforços de muitos pesquisadores nos últimos 75 anos no sentido de conhecer suas características para posterior utilização. Como corantes, na realidade, seu uso vem desde a antiguidade, quando os Romanos empregavam frutas altamente coloridas para acentuar a cor dos vinhos (FRANCIS, 1999).

Antocianinas são consideradas inofensivas à saúde. Horowitz e Gentili (1969) citados em FRANCIS (1982) atestaram que os flavonóides são inócuos e são metabolizados pela flora intestinal a dióxido de carbono e a vários ácidos

aromáticos, não sendo absolutamente prejudiciais à saúde (MINIATI e MAZZA, 1993).

O grande interesse pelas antocianinas, como ingredientes alimentícios, tem sido recentemente reacendido como resultado das contínuas restrições legais aos corantes artificiais, principalmente aqueles do tipo azo. O emprego das antocianinas apresenta as seguintes vantagens: têm sido consumidas pelos homens e animais por inúmeras gerações sem, aparentemente, nenhum efeito adverso à saúde; apresentam um colorido vivo, principalmente na região do vermelho; e elas são hidrossolúveis, simplificando sua incorporação em sistemas alimentícios aquosos. Como desvantagens pode-se, resumidamente, dizer que o poder tintorial e a estabilidade das antocianinas nos alimentos são geralmente menores quando comparados aos corantes sintéticos (FRANCIS, 1982).

Segundo CHRISTIAN HANSEN (19--), o sucesso para o emprego de corantes naturais reside em saber como controlar e processar a matéria-prima na extração, purificação e formulação, para gerar soluções fáceis de se usar na indústria alimentícia, já que os corantes naturais podem apresentar poder de tingimento semelhante aos dos corantes sintéticos, dependendo da forma como estes forem obtidos e manipulados. Desta forma, apesar das dificuldades inerentes ao seu emprego, é importante estudar novas fontes de antocianinas e técnicas de estabilização com o intuito de viabilizar o seu emprego em alimentos.

Devido à larga distribuição das antocianinas no reino vegetal e da sua cor expressiva, não é surpresa que muitas plantas tenham sido sugeridas como fontes em potencial. Porém, apesar do grande número de potenciais fontes, apenas duas, uvas e repolho roxo, têm tido sucesso comercial. Mais recentemente, “elderberry”, “aronia (choke-baga)” e “black carrot” tiveram algum êxito (FRANCIS, 1999). Nesse sentido, a descoberta de novas fontes, que sejam viáveis economicamente, é imprescindível.

O açaí, fruto tipicamente tropical, surge como uma promissora opção, uma vez que é encontrado em abundância no Norte do Brasil e apresenta um alto teor de antocianinas, mesmo na entressafra. Além destes fatores, o açaí, possui um grande apelo mercadológico, sendo considerado um fruto muito

nutritivo (ROGEZ, 2000) e que se encontra em evidência, sendo amplamente consumido pelos adeptos da alimentação natural.

Para melhor aproveitar o potencial dos corantes naturais são imprescindíveis maiores estudos na busca de soluções para questões como novas fontes e estabilidade. Assim, a obtenção de um produto final de fácil manuseio, armazenagem e principalmente de maior estabilidade, assume importância notória.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Antocianinas

As antocianinas são pigmentos solúveis em água, intensamente coloridos e amplamente distribuídos na natureza. Elas são responsáveis pela maioria das cores azul, violeta e as tonalidades da cor vermelha que aparecem em muitas flores, frutos, algumas folhas, caules e raízes de plantas. O termo antocianina é derivado das palavras gregas: “anthos”, flor e “kianos”, azul, as quais foram unidas por Marquart em 1835 para designar os pigmentos azuis das flores (MARKAKIS, 1982).

Apesar da larga distribuição, as antocianinas ainda apresentam uso restrito como corantes alimentícios devido a problemas relacionados com estabilidade e dificuldades na sua purificação. Muitas pesquisas têm sido efetuadas com o intuito de superar tais dificuldades e muitos avanços foram conseguidos, mostrando que o emprego de antocianinas em diversos sistemas alimentícios é possível (MAZZA, 1987).

2. Estrutura química das antocianinas

As antocianinas representam juntamente com os carotenóides a maior classe de substâncias coloridas do reino vegetal. Elas se encontram amplamente distribuídas em flores, frutos e demais plantas superiores, sendo consumidas pelo homem desde tempos remotos (GONNET, 1998).

As antocianinas fazem parte de um grande grupo de compostos orgânicos denominado flavonóides e apresentam a estrutura química básica - $C_6-C_3-C_6$ -. Diferentemente dos outros flavonóides, as antocianinas são capazes de absorver fortemente luz na região do visível, conferindo uma infinidade de cores entre laranja, vermelho, púrpura e azul, dependendo do meio em que se encontrem (BROUILLARD, 1982).

Quimicamente pode-se definir antocianinas como glicosídeos de antocianidinas. As antocianidinas (agliconas) são polidroxi e/ou polimetoxi derivados do 2-fenilbenzopirílium ou, cátion flavílium (Figura 1).

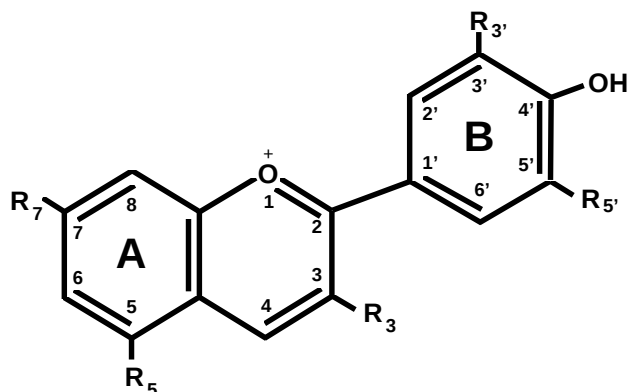


Figura 1 – Cátion flavílium.

As diversas formas antociânicas encontradas diferem entre si pelo número de grupos hidroxilícos e metoxilícos presentes na aglicona, pela natureza, número e sítio de ligação dos açúcares e pelo número e natureza de ácidos alifáticos e/ou aromáticos ligados à molécula de açúcar (ELBE e SCHWARTZ, 1996). Os açúcares mais comumente encontrados ligados a antocianidina são glicose, arabinose, galactose e ramnose. Di e trissacarídeos também podem ocorrer. Em muitos casos os resíduos de açúcar são acilados por ácido *p*-cumárico, cafeíco, ferrúlico, malônico, *p*-hidroxibenzóico, oxálico, málico, succínico e acético (MAZZA e MINIATI, 1993).

As antocianidinas que ocorrem como agliconas nas antocianinas naturais são mostradas na Tabela 1. Entre estas, as mais comuns são: pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, malvidina e petunidina (TIMBERLAKE e BRIDLE, 1975). As antocianidinas são menos estáveis e solúveis que as correspondentes antocianinas e não são encontradas livres nas plantas.

Tabela 1 – Antocianidinas de maior ocorrência.

Nome	Grupos substituintes							Cor
	3	5	6	7	3'	4'	5'	
Apigenidina (Ap)	H	OH	H	OH	H	OH	H	Laranja
Aurantidinina (Au)	OH	OH	OH	OH	H	OH	H	Laranja
Capesinidina (Cp)	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OMe	Violeta
Cianidina (Cy)	OH	OH	H	OH	OH	OH	H	Vermelho alaranjado
Delfinidina (Dp)	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH	Violeta
Europinidina (Eu)	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OH	Violeta
Hirsutinidina (Hs)	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	OMe	Violeta
6-Hidroxicianidina (6 OHCy)	OH	OH	OH	OH	OH	H	-	Vermelho
Luteonidina (Lt)	H	OH	H	OH	OH	OH	H	Laranja
Malvidina (Mv)	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OMe	Violeta
5-Metilcianidina (5-MCy)	OH	OMe	H	OH	OH	H	-	Vermelho alaranjado
Pelargonidina (Pg)	OH	OH	H	OH	H	OH	H	Laranja
Peonidina (Pn)	OH	OH	H	OH	OMe	OH	H	Vermelho alaranjado
Petunidina (Pt)	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OH	Violeta
Pulchelidina (Pl)	OH	OMe	H	OH	OH	OH	OH	Violeta
Rosi	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	H	Vermelho
Tricetinidina (Tr)	H	OH	H	OH	OH	OH	OH	Vermelho

Fonte: MAZZA e MINIATI (1993).

Uma vez que as antocianidinas são menos estáveis e solúveis em água que as antocianinas, entende-se que a glicosilação confere solubilidade e estabilidade ao pigmento (HARBONE, 1979). A glicosilação se dá normalmente em C-3 e quando há um segundo açúcar presente, ele normalmente se encontra ligado em C-5. Embora menos freqüentemente, têm sido encontradas estruturas com glicosilação em C-7, C-3' e C-5'.

A metoxilação ocorre usualmente em C-3' e C-5' e até o momento, não foi encontrada nenhuma antocianina natural que possuísse todos os sítios C-5, C-7 e C-4' metoxilados ou hidroxilados ao mesmo tempo. Sem dúvida, um grupamento hidroxila livre é essencial para a formação da estrutura quinoidal que é responsável pela pigmentação de flores e frutas e é gerada pela perda de um hidrogênio ácido do cátion flavilium (BROUILLARD, 1982).

3. Transformações estruturais em meio aquoso

Dependendo do grau de acidez ou alcalinidade, as antocianinas, devido à alta reatividade da aglicona, adotam diferentes estruturas químicas em meio aquoso. Cada uma destas estruturas apresenta, na região do visível,

um espectro de absorção característico (BROUILLARD e DUBOIS, 1976). Em meio ácido, a 25 °C, quatro estruturas coexistem em equilíbrio: o cátion fláviliu (AH^+), a base quinoidal (A), a pseudo base ou carbinol (B) e a chalcona (C). As estruturas responsáveis pela coloração das antocianinas são o cátion fláviliu e a base quinoidal, sendo o carbinol e a chalcona incolores (Figura 2).

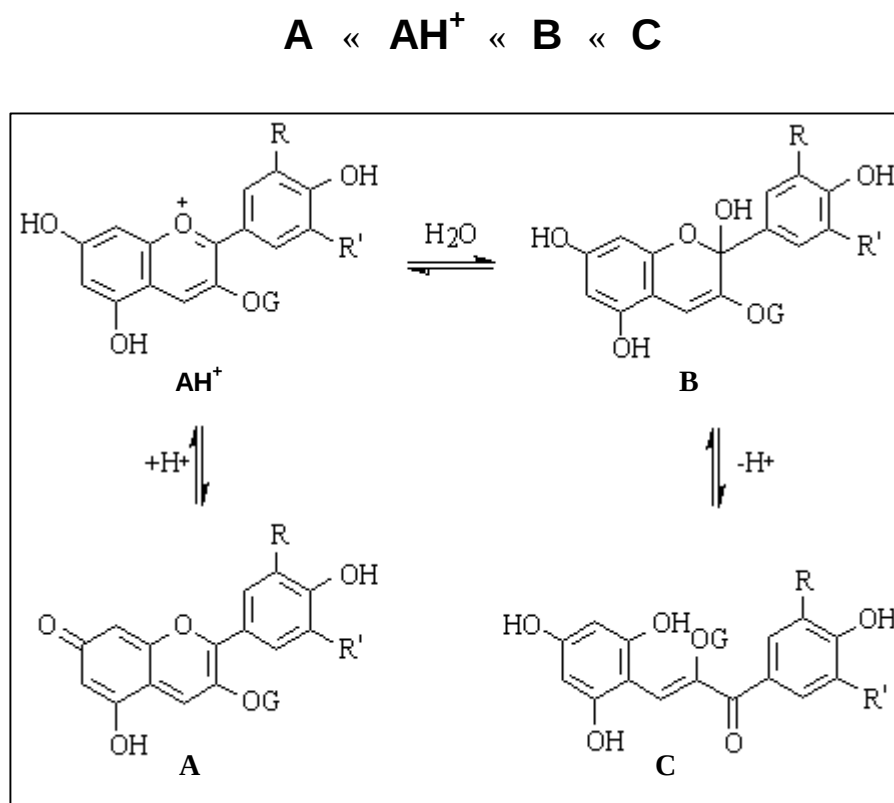


Figura 2 – Transformações estruturais das antocianinas em água.

Soluções de antocianinas apresentam uma coloração vermelha mais intensa em pH abaixo de 3,0. Aumentado o pH para a faixa de 4,0 a 5,0, a coloração vermelha tende a desaparecer. Aumentos adicionais de pH levam as antocianinas a apresentarem uma coloração azulada. Após estocagem ou aquecimento, tornam-se amareladas (MAZZA e BROUILLAR, 1987).

A cor apresentada pela solução está relacionada com as estruturas químicas assumidas pelas antocianinas em distintos pH. Em valores abaixo de 3,0, a forma AH^+ prevalece. Com o aumento do pH ocorre competição entre a reação de adição de água ou desprotonação do cátion fláviliu. A

desprotonação leva a formação da base quinoidal A, que apresenta coloração azul. A adição de água leva a formação da pseudo base C que se encontra em equilíbrio com a forma chalcona C, ambas incolores (AMIC et al., 1999).

A estrutura antociânica assumida com o aumento do pH depende essencialmente da estrutura da antocianina. Para a malvidina 3-glicosídeo, à medida que o pH aumenta, há o aumento da concentração, pelo ataque nucleofílico da água ao cátion flavilium, da estrutura do carbinol B que existe em equilíbrio com a forma chalcona C. Em torno de pH 4,5 a forma catiônica desaparece e acima de pH 5,5 apenas a forma carbinol está presente e nenhuma coloração é percebida (MAZZA e BROUILLARD, 1987).

A maioria das antocianinas naturais tende a existir em soluções levemente ácidas predominantemente como as formas incolores carbinol ou chalcona. Desta forma, é de interesse, para o propósito de aplicação em alimentos, encontrar antocianinas em que a forma catiônica prevaleça nestas condições de pH, uma vez que a maioria dos alimentos se encontra nesta faixa de pH (AMIC et al., 1999).

4. Estabilidade das antocianinas

É bem conhecido que a cor das soluções de antocianinas depende de uma série de fatores como concentração, tipo de solvente, temperatura, pH, estrutura do pigmento, presença de substâncias capazes de reagir reversível ou irreversivelmente com a antocianina, etc.

O pH é certamente o fator mais importante no que diz respeito à coloração das antocianinas. Antocianinas são estáveis e se encontram na forma colorida como cátion flavilium apenas em soluções bastante ácidas (GONNET, 1998). A proteção do cátion flavilium contra a hidratação é absolutamente necessária para manter a coloração das soluções. Uma maneira de reter esta coloração seria pela remoção da água do meio promovendo o deslocamento do equilíbrio hidratação/desidratação para direção da forma colorida AH^+ (LEWIS et al., 1995).

Se a coloração das antocianinas fosse considerada apenas em função do pH, poder-se-ia concluir que as flores e frutas não deveriam ser coloridas uma vez que o pH natural dos vegetais é geralmente próximo da neutralidade.

Nestas condições de pH, as antocianinas não se encontrariam sob a forma colorida se não houvesse algum fator estabilizante (GOTO e KONDO, 1991). Este fator é conhecido como copigmentação, que, em resumo, consiste na ligação entre o pigmento e outra molécula denominada de co-pigmento (flavonóides não antociânicos, compostos fenólicos em geral, ácido alifáticos, etc) envolvendo mecanismos químicos de copigmentação inter ou intra molecular e auto associação (GONNET, 1998). Segundo MAZZA e BROUILARD (1987), o mecanismo de associação entre o copigmento e a antocianina envolve ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre as moléculas.

A cor das antocianinas também é influenciada pelo tipo de estrutura química da molécula. A presença do grupamento hidroxila em C-5 e C-4 promovem a estabilização das formas coloridas pelo impedimento da reação de hidratação. A hidroxilação em C-7 e C-4 também tende a estabilizar a molécula, enquanto a metilação destas hidroxilas tem efeito inverso (MAZZA e MINIATI, 1993). A glicosilação também afeta a estabilidade do pigmento, sendo a antocianidina muito menos estável que a correspondente antocianina. Antocianinas contendo dois ou mais grupos acilas aromáticos são estáveis em meio neutro, possivelmente, segundo MAZZA e MINIATI (1993), como resultado da ligação de hidrogênio entre o grupo hidroxil fenólico das antocianinas e os ácidos aromáticos. BROUILLARD (1982), por sua vez, sugeriu a possibilidade de uma ligação hidrofóbica entre o anel pirilium e os radicais aromáticos dos grupos acila.

As antocianinas são destruídas pelo calor durante o processamento e estocagem dos alimentos. O mecanismo, apesar de não ter sido totalmente elucidado, parece estar relacionado com a quebra do anel heterocíclico da pseudo base com formação da chalcona (MARKAKIS, 1982). BROUILARD (1982) observou que as reações de equilíbrio entre as estruturas antociânicas (Figura 2) são endotérmicas da esquerda para direita e que o aumento da temperatura irá favorecer a ruptura do anel e formação da chalcona.

A luz exerce efeito duplo sob as antocianinas: favorece sua biossíntese, mas acelera sua degradação. O oxigênio também apresenta efeito deletério sob as antocianinas, acelerando sua degradação (MARKAKIS, 1982). Segundo CONCEIÇÃO (1997) e POEI-LANGSTON et al. (1981), o ácido

ascórbico acelera a degradação do pigmento, tanto em presença quanto em ausência de oxigênio.

Alguns autores consideram que a presença de açúcares também promove a degradação mais rápida da antocianina (MARKAKIS, 1982). As antocianinas reagem com íons de bissulfito ou com dióxido de enxofre, sofrendo descoloração em um processo reversível, causada possivelmente pela adição desses compostos nas posições 2 ou 4 das antocianinas (JURD, 1964). As antocianinas são também facilmente descoloridas por reações enzimáticas, sendo hidrolisadas ou oxidadas por antocianases ou catecolases com formação de produtos sem cor (BOBBIO e BOBBIO, 1992).

5. Análise de antocianinas

A análise antociânica de um produto é composta de duas partes básicas: qualificação e quantificação. A grande variedade de grupamentos químicos que podem se encontrar ligados ao cátion flavilium contribui para que se tenha diversas estruturas de antocianinas possíveis, tornando a análise qualitativa bastante complexa (JACKMAN et. al., 1987).

5.1. Análise qualitativa

5.1.1. Extração

Para se efetuar as análises, seja qualitativa ou quantitativa, o primeiro passo é a adequada extração do pigmento. Segundo FRANCIS (1982), na maioria das frutas e demais vegetais, os pigmentos se encontram localizados em células próximas à superfície. Uma vez que o pigmento está dissolvido na seiva das células, a sua extração geralmente envolve o uso de solventes ácidos, os quais desnaturam a membrana das células do tecido e simultaneamente dissolvem os pigmentos (JACKMAN et al., 1987).

O método universal empregado para obter o extrato bruto consiste em tratar a matéria-prima com metanol acidificado com 1% (v/v) de HCl. No entanto, em se tratando de alimentos, o emprego de etanol deve ser preferido

devido à maior toxidez do metanol, embora a extração com metanol seja mais eficiente (FRANCIS, 1982).

O grau de extração das antocianinas depende de uma série de fatores, entre eles da relação volume de solvente/ massa de matéria-prima, do tipo de solvente empregado (etanol, metanol, água) e tipo de ácido (ácido clorídrico, ácido cítrico, tartárico, fórmico, acético, propiônico). Segundo METIVIER et al. (1980) em um experimento com uva, o metanol mostrou-se mais eficiente que o etanol e água respectivamente. O ácido clorídrico foi o que levou a melhores resultados, sendo, no entanto, muitas vezes evitado devido a sua alta corrosividade.

Uma vez efetuada a extração é recomendado promover a concentração do extrato bruto. A solução deve ser concentrada sob vácuo, sem permitir que a temperatura atinja valores superiores à 40 °C, de forma a minimizar a degradação térmica do pigmento (FRANCIS, 1982).

5.1.2. Purificação e identificação das antocianinas

A purificação do extrato antociânico é necessária, uma vez que os sistemas solventes comumente usados para extração não são específicos para as antocianinas. Quantidade considerável de material indesejável, como polifenóis, pectina, carboidratos e outros pigmentos são extraídos juntamente com as antocianinas, em maior ou menor quantidade dependendo da matéria-prima empregada (JACKMAN e SMITH, 1996).

A purificação de antocianinas tem sido efetuada principalmente por técnicas cromatográficas, especialmente cromatografia em papel. (HARBONE, 1958 citado por JACKMAN et al., 1987; FRANCIS, 1982). Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) também tem sido empregada, sendo, no entanto, mais para fins analíticos do que como técnica preparativa. Além dessas, usa-se também cromatografia em camada delgada e em coluna aberta (MARKHAM, 1975; JACKMAN et al., 1987; STRINGHETA, 1991).

Além das técnicas cromatográficas, outros métodos têm sido investigados, mas com sucesso limitado. Notável exceção foi conseguida com o emprego de eletroforese em papel na separação das antocianinas de cereja (MARKAKIS, 1960) e na separação das antocianinas do “cranberry” dos

flavonóides não antociânicos (CANSFIELD e FRANCIS, 1970). FULEKI e FRANCIS (1968) utilizaram a precipitação com acetato de chumbo como coadjuvante do processo de purificação. Recentemente o uso de técnicas como cromatografia em contra corrente (COSTA, 2000) e eletroforese capilar foram relatados (FOUCAULT e CHEVOLOT, 1998), sendo esta última útil na separação para fins de identificação.

Além das técnicas de separação propriamente ditas, o emprego de procedimentos como filtração (papel, lã de vidro, nylon), centrifugação e extração líquido-líquido também podem fazer parte do processo de purificação dos extratos antociânicos.

5.1.2.1. Cromatografia em papel

Apesar de ser uma técnica antiga e dos avanços na área de cromatografia, a cromatografia em papel continua a ser bastante empregada no processo de purificação das antocianinas. Sua finalidade é tanto na separação das antocianinas individuais como na realização da análise qualitativa das mesmas em função dos fatores de retenção (R_f) e cores apresentadas (TIMBERLAKE e BRIDLE, 1967; COLLINS et al., 1993; MAZZA e MINIATI, 1993, JACKMAN e SMITH, 1996).

Os sistemas de solventes empregados para tal são múltiplos e a sua escolha vai depender do tipo de amostra. A Tabela 2 lista os solventes normalmente empregados. Costuma-se utilizar papel Whatman 3 para técnicas preparativas e Whatman 1 para técnicas analíticas.

Em se tratando de amostras com baixo teor de açúcar e de produtos de degradação, a amostra pode ser desenvolvida em BAW (butanol: ácido acético: água). Caso contrário HCl 0,1 % (v/v) deve ser empregado como primeira fase móvel (FRANCIS, 1982).

Tabela 2 – Seleção de solventes para cromatografia de antocianinas

Abreviação	Composição e particularidades
BAW	n-Butanol:ácido acético glacial: água (4:1:5). Fase superior. Três dias para obter dados de R_f
BacW	n-butanol:ácido acético glacial: água (6:1:2). Fase superior
BEW	n-butanol: 95% etanol: água (4:2:2,2)
BuHCL	n-Butanol: ácido clorídrico 2N (1:1). Fase superior. Equilíbrio da fase fixa por 24 horas antes da corrida em cuba contendo a fase líquida.
BuN	n-Butanol: hidróxido de amônio 2% (1:1). O papel deve ser submerso em solução aquosa saturada de ácido bórico e seco antes da corrida
BBPW	n-Butanol: benzeno: piridina: água (5:1:3:3)
Forestal	Ácido acético glacial: ácido clorídrico concentrado: água (30:3:10)
Formic	Ácido fórmico: ácido clorídrico concentrado: água (5:2:3)
HOAc-HCl	Água: ácido acético glacial: ácido clorídrico 12N (82:15:3)
Phenol	Fenol: água(4:1)
15%HOAc	Ácido acético glacial: água (15:85)
50%HOAc	Ácido acético glacial: água (50:50)
PrN	n-Propanol: hidróxido de amônio concentrado (7:3)
TAW	Tolueno: ácido acético glacial: água (4:1:5)
1% HCl	Ácido clorídrico concentrado: água (3:97)
BBFW	1-Butanol: benzeno: ácido fórmico: água (100:19:10:25)
BFW	1-Butanol: ácido fórmico:água (100:25:60)
Reagente de açúcar	Ácido o-fitalico (16,6g) e 91 mL de anilina dissolvida em 480 mL de 1-butanol, 480 mL de éter etílico e 40 mL de água
MAW	Metanol: ácido acético: água (90:5:5)

Uma seqüência típica para uma mistura relativamente simples é: BAW $\Rightarrow$ 1% (v/v) HCl em água $\Rightarrow$ BAW ou, 1% (v/v) HCl em água $\Rightarrow$ BAW $\Rightarrow$ 1% (v/v) HCl em água.

As bandas selecionadas com o pigmento isolado devem ser cortadas e a eluição pode ser feita com MAW. O eluato de cada banda deve ser concentrado e recromatografado, geralmente papel Whatman 3 e desenvolvida em outro solvente. É aconselhável alternar os solventes aquosos e orgânicos para obter melhor separação (FRANCIS, 1982).

Para misturas mais complexas e difíceis de purificar pode ser necessário uso de vários passos cromatográficos adicionais como por exemplo, com BuHCl, HOAc (15 % v/v), BFW, entre outros. Três corridas geralmente são suficientes para obter antocianinas livre de açúcares e agliconas, no entanto para a purificação mais completa, talvez cinco ou seis corridas sejam necessárias.

Um ponto relevante é que se a última corrida for efetuada utilizando HCl, o eluato conterá arabinose como artefato. Desta forma recomenda-se que se faça uma corrida adicional em BAW ou HOAc (15 % v/v). O emprego de

15% (v/v) HOAc geralmente é restrito ao caso de desejar eliminar a arbinose pois ele gera bandas difusas (FRANCIS, 1982).

HARBORNE (1967) revisou a relação existente entre estrutura e mobilidade cromatográfica das antocianinas e determinou que um grande número de grupamentos hidroxila confere um baixo Rf para amostras de antocianinas desenvolvidas em solventes alcoólicos e aquosos, e que um grande número de metoxilas na molécula apresenta efeito inverso. Foi sugerido também a existência de uma relação direta entre o valor de Rf e o número de unidades de açúcares ligados ao pigmento, independente da natureza da aglicona. O autor publicou uma extensa lista de dados de Rf desenvolvidos com os solventes BAW, BuHCl, HOAc-HCl e HCl 1 % (v/v).

Vários trabalhos envolvendo purificação de antocianinas, têm sido publicados citando o uso da cromatografia em papel como os de WILLIAMS et al. (1981), CARRENO-DIAZ e GRAU (1977), BUKMIRE e FRANCIS (1976) e KUSKOSKI (2000) entre outros.

5.1.2.2. Cromatografia em camada delgada

O comportamento das antocianinas em cromatografia em camada delgada (CCD) é diretamente comparável ao em cromatografia em papel (CP). A CCD tem a vantagem de, usualmente, requerer menor tempo de desenvolvimento e apresentar melhor resolução. Isto também se aplica para as agliconas. Os solventes são os mesmos empregados na CP. A Tabela 3 lista os valores de Rf das seis antocianidinas mais comuns em CP e CCD.

Tabela 3 – Rf das antocianinas mais comuns em PC e CCD

Antocianidina	Rf ´ 100			
	Forestal		BAW	
	CP ^a	CCD ^b	CP ^a	CCD ^b
Pelargonidina	68	61	80	82
Cianidina	49	45	68	68
Peonidina	63	63	70	71
Delfinidina	32	30	41	42
Petunidina	46	43	52	52
Malvidina	60	58	58	56

^a Dados de HARBORNER (1967); ^b Celulose microcristalina. Fonte: adaptado de STRACK e WRAY (1989).

MABRY et al. (1970), descreve o uso da CCD no isolamento, na purificação e identificação preliminar de flavonóides. Poliamida é considerada o melhor adsorvente em CCD para os flavonóides de uma forma geral.

Para antocianinas, particularmente, é mais recomendado o emprego de celulose ou sílica. A celulose e a celulose microcristalina têm sido utilizadas na maior parte dos trabalhos realizados, apesar da sílica ser também recomendada. Neste último caso, deve-se ter cuidado com traços de metais que podem estar presentes na sílica que retardariam o movimento de alguns pigmentos, como as cianidinas e delfinidinas pela formação de complexos (MARKHAM, 1975; FRANCIS, 1982).

De acordo com SHRIKHANDE (1976), citado por PAZMIÑO-DURÁN (1997), a CCD pode ser usada para separar malvidina de peonidina, mistura de difícil resolução em papel. Esta técnica tem sido empregada na detecção de adulteração de vinhos de *Vitis vinifera* com variedades de uvas híbridas.

Vários trabalhos citados por MARKHAM (1975) relatam o emprego da CCD com diferentes tipos de sistemas de solvente e adsorventes, como por exemplo: o uso de celulose em cromatografia bidimensional com os solventes “formic” e MAW ou “forestal” e solução de ácido acético 60% (v/v) na separação de antocianidinas; a separação das antocianinas de *Euphorbia pulcherrima* em sílica-celulose usando acetona-HCl 0,5N (1:3), Bu HCl, água-HCl-ácido fórmico (8:4:1); entre outros.

ASEN et al. (1986) utilizaram a CCD como técnica preparativa na purificação de antocianinas de flores, após o emprego da pré-purificação em coluna aberta com sephadex[®] LH-20. MULICK (1969) usou a CCD na purificação/separação de antocianinas de uva. NYBON (1968) empregou CCD com celulose microcristalina na purificação das antocianinas de “black rasperris”.

A cromatografia em camada delgada é também muito usada na identificação de antocianinas. TAKEDA (1986a, 1986b), após purificação do extrato antociânico de algumas plantas por meio de CP, utilizou CCD e CLAE para identificação das antocianinas puras. TORRE e BARRITT (1977) analisaram por CCD e densitometria 16 espécies e três cultivares de “blackberries” identificando a cianidina 3-glicosídeo como a fração antociânica principal.

A CCD tem substituído a CP em alguns casos e tem seu uso recomendado para análise qualitativa e na purificação em pequena escala. É muito utilizada em conjunto com a cromatografia em papel, muitas vezes de forma complementar (MARKHAM, 1975). A cromatografia em camada delgada tem as vantagens de maior rapidez e maior poder de resolução que a de papel. No entanto, a quantidade a ser purificada é menor e ao contrário da CP, o seu uso como técnica preparativa é restrito.

5.1.2.3. Cromatografia em coluna

A necessidade de acelerar a separação e purificação de grandes quantidades de antocianinas levou ao uso de várias técnicas cromatográficas em colunas abertas (JACKMAN et al., 1987). Geralmente a cromatografia em coluna não oferece a mesma resolução obtida em papel ou em placas. É muito usada para fins preparativos, sendo considerada a técnica mais útil para purificação em grandes quantidades dos flavonóides do extrato bruto.

Os adsorventes normalmente empregados incluem sílica gel, celulose, alumina, poliamida, Sephadex e resinas de troca iônica. A sílica gel tem sido tradicionalmente empregada para separação de isoflavonas, flavononas, flavonas e flavonóis (MARKHAM, 1975). Para antocianinas têm sido utilizadas preferencialmente resinas de troca iônica e poliamidas.

Entre as poliamidas, a resina polivinilpirolidona (PVP) foi usada em diversos trabalhos. O seu emprego deve-se a sua capacidade de formar ligações de hidrogênio com as hidroxilas do anel aromático, pela presença do oxigênio do grupamento amídico. A eluição dos compostos fenólicos depende da capacidade do solvente em substituir o fenol nos sítios de ligação da resina, que no caso de solventes hidrofílicos, significa formar ligações de hidrogênio mais fortes com o composto. A afinidade do grupamento fenólico pela fase estacionária, por sua vez, depende fortemente do número de ligações possíveis de serem formadas.

MAZZA e BROUILLARD (1987) utilizaram coluna de PVP para purificar cianidina 3,5-diglicosídeo e obtiveram um produto com pureza de 98%. CHEYNIER et al. (1994) e SARNI et al. (1995) purificaram o extrato de antocianinas de uva por meio da cromatografia em coluna de PVP, eliminando

os açúcares e impurezas pela lavagem com água e eluindo as antocianinas com etanol/água/ácido clorídrico (70:29:1, v/v).

Resina de troca iônica é formada por uma matriz polimérica inerte apresentando ligações covalentes com grupos trocadores iônicos. Resinas trocadoras de cátions têm sido amplamente empregadas nos procedimentos de pré-purificação de flavonóides. Neste processo, os flavonóides ficam presos à coluna enquanto as impurezas, a maioria hidrossolúvel e sem cargas, são lavadas com água. Os flavonóides são subseqüentemente eluídos em álcool acidificado (MARKHAM, 1975).

FOSSSEN et al. (1998) combinaram várias técnicas para isolamento das frações antociânicas principais da batata doce e arroz: extração líquido-líquido com acetato de etila, cromatografia com coluna Amberlite AXD-7 e cromatografia de exclusão com coluna Sephadex LH-20.

FRANCIS (1985) descreve a preparação da coluna de troca iônica CG-50 na qual purificou o extrato antociânico do suco de “cranberry” para isolamento de enocianina, utilizada como adulterante. O eluente usado foi metanol acidificado com 0,1% (v/v) de HCl.

SHEWFEL e AHMED (1978) purificaram os extratos antociânicos do repolho roxo e “blueberries” em coluna CG-50 usando como eluente solução etanólica acidificada com 1% de HCl, para avaliação do desempenho de cada corante em refrigerantes.

BASSA e FRANCIS (1987) usaram coluna CG-50 (100-200 mesh, 20×5,5 cm) para eliminar impurezas do extrato antociânico de batatas doce para posterior teste de estabilidade em sistemas modelos.

FULEKI e FRANCIS (1968b) estudaram o desempenho do acetato de chumbo e das resinas de troca iônica, PVP e poliamida na purificação do extrato antociânico e verificaram que o acetato de chumbo não teve a capacidade de precipitar todos os tipos de antocianinas presentes, o que levou a um produto com proporções alteradas dos pigmentos individuais. A poliamida e a PVP apresentaram tempo de eluição muito longo e um eluato muito diluído. O uso da coluna de troca iônica levou a maior eficiência na purificação da antocianina. Entre as resinas testadas, a Amberlite CG-50 foi a recomendada. A tabela 4 mostra o desempenho dos métodos de purificação avaliados.

Além das colunas mencionadas, o uso de outras também tem sido relatado. LEWIS e WALKER (1995) empregaram coluna de C18 com eluente metanol 60% para purificar extrato metanólico de antocianinas de várias fontes.

LEE (1991), utilizou cromatografia de exclusão molecular com Sephadex LH-20 (10×60 cm) para avaliar as mudanças quantitativas dos pigmentos da fruta “lychee” durante o armazenamento a frio devido a polimerização das antocianinas livres. Para tal ele passou o extrato duas vezes na coluna usando ácido fórmico 10% como eluente com um fluxo de 24mL/h.

Tabela 4 – Desempenho característicos de alguns métodos de purificação de antocianinas

Desempenho característico	Acetato de chumbo básico	Poliamida^a	Troca iônica^b
Recuperação de antocianina			
Total	92-98 %	92 %	89 %
Individual	Boa	Boa	Boa
Perfil de purificação			
Fração aquosa	Pouca	Alguma	Alguma
Extrato antociânico	Concentrado	Diluido	Concentrado
Antocianina retida	Muito pouca	Alguma	Alguma
Degradação da Antocianina	Pouca	Nenhuma	Nenhuma
Pureza de extrato antociânico			
Açúcares	Nenhum	Nenhum	Nenhum
Antocianinas degradadas	Todas	Alguma	Traços
Flavonóides	Presente	Presente	Presente

Fonte: adaptado de FULEKI e FRANCIS (1968b).

BAKKER e TIMBERLAKE (1997) isolaram, identificaram e caracterizaram novas antocianinas, denominadas vitisinas, presentes em alguns vinhos. Na etapa de purificação usaram primeiramente coluna de Sephadex LH-20 preparada com solução aquosa de ácido fórmico 3% (v/v). As vitisinas foram eluídas e cromatografadas novamente em mine-coluna ODS (Sep-Park C18, água, Milipore), a qual foi lavada várias vezes com solução aquosa de ácido fórmico 3 % (v/v) e eluída com solução metanólica com ácido fórmico a 3 % (v/v). O eluato foi seco à temperatura ambiente sob pressão reduzida em dissecador. Para purificação de frações individuais foi utilizada

CLAE, em escala semipreparativa com uma coluna Spherisorb ODS 5m (8 mm x 100 mm), fluxo de 2 mL/min e detecção em 520 nm.

A enocianina, nome genérico dado ao extrato pigmentado de uva, é muito complexa e formada por um grande número de antocianinas diferentes. Vários estudos foram conduzidos para caracterização de tal extrato (MAZZA e MINIATI, 1993). O extrato comercial de enocianina é ainda mais complexo devido à polimerização das antocianinas individuais além de diversos tipos de impurezas, uma vez que tal extrato é oriundo das cascas que são resíduos da indústria de vinhos e sucos. Espera-se, portanto que este extrato contenha constituintes celulares de tecidos das membranas da casca e de leveduras usadas na fermentação que por sua vez, constituem excelente substrato para o crescimento de novas leveduras. No extrato bruto concentrado não é observado crescimento microbiano devido à alta concentração de compostos fenólicos que agem como inibidores. No entanto, quando estes pigmentos são diluídos isso pode ocorrer.

LIN e HILTON (1980) consideraram que uma possível solução para tal problema seria eliminar as impurezas, utilizadas como substrato. Estudaram então diferentes métodos para purificação deste extrato, avaliando a eficiência do processo por meio da detecção da capacidade de crescimento de leveduras. Primeiramente testaram vários tipos de resinas na cromatografia em coluna: troca iônica (Duolite, Amberlite, Bio-Rex 70 e DEAE celulose com tampão NaCl 0,5 e 1 M como eluentes); adsorção (Cellex N-1 celulose com tampão citrato de sódio 0,1M pH 3,5 e citrato de sódio/metanol 1:1 como eluentes, sílica gel e alumina com tampão citrato de sódio com 50 % de etanol como eluente, alumina com tampão citrato de sódio com 50 % de metanol como eluente); exclusão molecular (Bio gel A, Bio gel P, Sephadex G10, G15, G25, G50 e G75 com eluição sob pressão hidráulica de 30 cm com água ultrapura). Além da cromatografia empregaram ultrafiltração e diálise. Após a purificação com cada método, foram incubadas pequenas frações do extrato em sistemas modelos compostos de água deionizada, ácido tartárico 0,72 %, sacarose 12 % e pigmento 0,04 % e determinado o crescimento de leveduras em cada um. A tabela 5 mostra os resultados obtidos.

Tabela 5 – Crescimento de levedura em bebidas coloridas com pigmentos de uva purificados por diversos métodos.

Período de incubação: 28 dias	
Método de purificação	Contagem de leveduras (10 ⁶ células/mL)
Extrato bruto não purificado	> 100
Resina catiônica forte	> 19
Resina catiônica fraca	>25
Resina aniônica	> 100
Resina quelante (Chelex 100)	> 100
Resina quelante (Amberlites XE-318)	> 100
Resina quelante cúprica	> 100
DEAE celulose	> 100
Alumina	> 100
Sílica gel	70
Diálise (retenção de massa molar 6000 daltons)	2,7
Diálise (retenção de massa molar 2000 daltons)	2,2
Ultrafiltração (retenção de massa molar 10000 daltons)	0,9
Ultrafiltração (retenção de massa molar 50000 daltons)	3,2
Ultrafiltração+ resina catiônica forte	0,5

Fonte: adaptado de LIN e HILTON (1980).

Segundo os autores, esperava-se que as resinas de troca iônica fossem eficientes na eliminação de todos os tipos de contaminantes do extrato bruto de maneira a inibir o crescimento de leveduras das bebidas em que se empregou o pigmento, o que não foi exatamente observado. O mesmo ocorreu com a cromatografia de adsorção. Melhores resultados foram observados para o caso da diálise e ultrafiltração, principalmente para membrana com retenção de massas molares de 10000 daltons. O melhor resultado foi encontrado quando se combinou a ultrafiltração com a resina catiônica. Por meio da cromatografia de exclusão foi confirmada a polimerização de grande parte dos pigmentos.

Comercialmente, a purificação do extrato bruto da enocianina (antocianinas da uva) é feita por meio de leito com resina de troca iônica que, além de eliminar as impurezas, permite algum fracionamento do eluato. A primeira fração do eluato é mais vermelha que a fração azulada eluída mais lentamente no leito devido ao alto peso molecular das substâncias que a compõe. É um procedimento eficiente, porém caro (FRANCIS, 1999).

Pelo relatado deduz-se que a cromatografia em coluna é muito útil para pré-purificar o extrato, permitindo a obtenção de quantidades razoáveis de

antocianinas de forma rápida mas, geralmente, não é muito eficiente no fracionamento de antocianinas individuais.

5.1.2.4. Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é o mais novo e importante membro de uma família de técnicas de separação (COLLINS, 1993). A CLAE é, atualmente, muito empregada, tanto para separação quanto para quantificação de compostos fenólicos. Vários suportes e fases móveis encontram-se disponíveis para análises de antocianinas, proantocianinas, flavononas, flavonoóis, flavonas e ácidos fenólicos. O desenvolvimento de colunas de fase reversa contribuiu de forma significativa para o sucesso do uso da CLAE na separação de diferentes classes de compostos fenólicos (SHAHIDI e NACZK, 1995).

Esta técnica foi utilizada pioneiramente na análise antociânica por Wulf e Shubiak em 1975 e difundiu-se com o advento da coluna de fase reversa, quando deste então se tornou bastante utilizada. O suporte de maior uso é sílica ligada quimicamente a grupos octila e octadecila (STRACH e WRAY, 1989).

A cromatografia líquida de fase reversa é, com certeza, o método mais empregado para separação das antocianinas. Uma vez que têm sido desenvolvidos distintos métodos de análises para uma necessidade específica, é impossível descrever um procedimento padrão simples. No entanto, certas condições são comumente seguidas. A detecção é normalmente efetuada usando um feixe de diodo na região UV/Visível, o qual permite a obtenção do espectro de absorção total do extrato “on-line”. O espectro UV/Visível pode dar informações sobre a natureza da aglicona, tipo e número de açúcares e possível acilação (HONG e WROLSTAD, 1990 citado por COSTA, 2000). Os detectores simples UV/Visível podem, seletivamente, determinar antocianinas na região de máxima absorção no visível, entre 520 nm e 546 nm, onde nenhum outro composto fenólico apresenta absorção. As colunas C18 são as mais empregadas, mas o uso de colunas de poliestireno também tem sido relatado (GIUSTI et al., 1998).

A separação dos diversos compostos fenólicos, com estruturas similares, constituintes do extrato antociânico é mais efetiva ao se usar eluição em gradiente com metanol e/ou acetonitrila acidificado com ácido fórmico, acético ou trifluoracético (COSTA et al., 2000).

A polaridade das antocianidinas é talvez o fator que mais influencia no tempo de retenção na coluna. Usualmente a ordem de eluição é inicialmente delfinidina, seguida de cianidina, petunidina, pelargonidina, peonidina e finalmente malvidina. A retenção, portanto, diminui com o aumento da polaridade o que, no presente caso, significa aumento do número de grupos hidroxilas no núcleo flavilium. A presença de açúcares aumenta a retenção das antocianinas, com os diglicosídeos geralmente eluindo antes dos monoglicosídeos. A acilação também aumenta o tempo de retenção das antocianinas quando comparadas com as similares não aciladas (COSTA et al., 2000).

O emprego da CLAE geralmente requer o preparo da amostra com a utilização de alguma outra técnica de pré-purificação. NAYRAYAN e VENKATARAMAN (2000), para caracterizar antocianinas em culturas de células de cenoura, empregaram a cromatografia em coluna com resina trocadora de cátion DOWEX 50 W-4X, para eliminação de impurezas, seguida da cromatografia de exclusão molecular com resina Sephadex LH-20, para separar possíveis polímeros derivados das antocianinas. Duas frações foram recolhidas e levadas para análise em CLAE com coluna C18. Os açúcares foram identificados por cromatografia de papel. Os espectros de massa e ressonância magnética nuclear foram obtidos para determinação da estrutura das antocianinas isoladas.

A CLAE tem sido muito usada para análise qualitativa de antocianinas e várias metodologias vêm sendo aplicadas. Normalmente, para caracterização da composição antociânica, costuma-se usar padrões obtidos de fontes cuja composição já é conhecida e comparar o seu espectro e tempos de retenção com os resultados obtidos do extrato da nova fonte cromatografada em condições idênticas. Além disso, é costume empregar outras técnicas cromatográficas em conjunto com a CLAE, seja para pré-purificação, para preparo e isolamento de padrões, ou para confirmar a identidade de certas antocianinas por meio dos respectivos Rf. Dificilmente a CLAE é utilizada como

única técnica na análise de antocianinas, seja qualitativa ou quantitativa (GAO e MAZZA, 1995; ANDERSEN, 1987; BAKKER e TIMBERLARKE, 1997).

Para fins de determinação de estrutura química de frações antociânicas não elucidadas, muitas vezes se faz necessário o uso da CLAE em conjunto com espectrometria de massa e espectroscopia de ressonância magnética nuclear, visto que a utilização de técnicas cromatográficas e reações químicas específicas não é suficiente para identificar estruturas mais complexas. Alguns autores citam o emprego de tais técnicas em conjunto (SANTOS et al., 1996; TORSKANGER POLL et al., 1999; SLIMESTAD e ANDERSEN, 1998).

O perfil antociânico de alguns produtos derivados de frutas vermelhas é usado para verificar a autenticidade e controlar a qualidade desses produtos. Apesar do fato da caracterização antociânica de diversas fontes ser muito executada e de haver diversas formas de análise disponíveis, não há um método padrão estabelecido para este fim. CAMIRE e CLYDESDALE (1979) conseguiram identificar as quatro antocianinas presentes em maior quantidade no suco comercial de “cranberry” empregando CLAE. As condições foram as seguintes: coluna C18, fluxo 0,3 mL/min, pressão de 950 psi, fase móvel MAW (37:10:53) e detector UV/Visível em 280 nm. O suco sofreu pré-purificação em coluna tocadora de cátions, resina Amberlite CG-50. Os autores usaram como padrão as antocianinas do extrato de “cranberry” isoladas por meio de cromatografia em papel. Cada antocianina padrão foi cromatografada separadamente e em conjunto. A completa separação das quatro antocianinas do suco levou cerca de 1 hora e 40 minutos. Os autores consideraram que, embora a pré-purificação por troca iônica seja necessária, o procedimento por eles empregado é uma técnica qualitativa rápida e que pode ser usada como ferramenta no controle de qualidade de tais sucos.

BRIDLE e GARCIA-VIGUERA (1996), desenvolveram uma técnica considerada rápida para detecção de adulteração de vinho com pigmentos antociânicos de “elderberry”. A adição de pigmentos ao vinho é ilegal, e baseado no perfil antociânico do produto é possível verificar se houve adulteração ou não. Os autores isolaram as principais frações antociânicas do “elderberry” por meio de CCD e as usaram como padrão na CLAE, cujas condições foram: coluna de fase reversa, gradiente linear dos solventes A (água acidificada com 0,6 % de HCl) e B (metanol) com detector de diodos.

Muitas vezes não é possível separar as antocianinas do “elderberry” que não se encontram naturalmente no vinho das que se encontram. No entanto nas condições de trabalho em questão, foi possível detectar um pico anormal no espectro do vinho adulterado.

Antocianinas e outros flavonóides de pétalas da flor *Monarda fistulosa* foram separadas empregando-se CLAE com coluna de fase reversa e detector de diodos. O extrato de antocianinas foi obtido por maceração das pétalas em MAW por 24 horas e foi pré-purificado em CP com o mesmo solvente. Este extrato foi submetido à filtração gélica em Sephadex LH 20 e as frações obtidas levadas a cromatografia. Foi empregado um complexo sistema de gradiente para eluição com os solventes A (ácido fórmico-água, 5:95 v/v) e B (metanol). A detecção na faixa de 280 a 510 nm indicou a presença de 16 picos discretos, incluindo cinco de pigmentos antociânicos. As principais antocianinas bem como a presença de acilação pode ser estabelecida com base no tempo de retenção e pelo espectro UV/Visível. A total caracterização necessitou do auxílio de outras técnicas como CCD, CP e eletroforese em papel.

Observa-se que as metodologias existentes para CLAE são variadas e que dependem fundamentalmente do caso estudado. Normalmente na avaliação de um extrato novo alguma metodologia existente para uma situação similar é testada, fazendo-se as adaptações necessárias, como alteração de gradiente de eluição, fluxo, sistema de solvente, etc.

A CLAE, como técnica analítica, é eficaz como coadjuvante na identificação de antocianinas de muitas fontes naturais. Em contraste, como técnica preparativa, não tem sido ainda substancialmente explorada. Em vista das vantagens apresentadas por esta técnica, o interesse para utilizá-la também em escala preparativa vêm crescendo, o que tem motivado o desenvolvimento de trabalhos nesta linha. Por exemplo, FROYTLOG et al. (1998) avaliaram algumas metodologias para purificação preparativa de extrato de antocianina de “blackcurrant”. Foram testadas duas colunas distintas sendo a pureza dos eluatos confirmada por meio de CLAE analítica e CCD. Foram isolados 6 pigmentos, sendo que a coluna com resina toyopearl HW-40F gel levou a melhor separação das quatro frações principais das duas outras que apareciam em menor proporção. PHIPPEN e SIMON (1998), utilizaram CLAE preparativa para isolar antocianinas de manjeriço de distintas variedades

objetivando usar esta fonte para obtenção de corante para alimentos. OSZMIANSKI e SAPIS (1988) fizeram uso de CLAE semipreparativa com uma coluna C-18, numa das etapas de isolamento das antocianinas do fruto “chokeberry”.

FIORINI (1995) utilizou CLAE preparativa para purificação das antocianinas de extratos obtidos de morango, “elderberry”, berinjela e rabanete. As condições cromatográficas foram otimizadas para cada caso, de forma a se conseguir purificações eficientes em menor tempo. Foram utilizadas duas colunas Spherisorb (fase reversa) de diferentes diâmetros, para CLAE analítica e preparativa. Os autores concluíram que a CLAE preparativa pode ser um método eficiente para isolar antocianinas puras, desde monoglicosídeos a estruturas mais complexas como di e tri glicosídeos acilados.

5.1.3. Identificação

As antocianinas que compõe o extrato bruto são normalmente identificadas por meio de CP, CCD, espectroscopia no UV/visível e reações de hidrólise controlada e oxidação. CLAE também tem sido cada vez mais empregada (MAZZA e MINIATI, 1993). Quando se trata de um pigmento ainda não identificado e com estrutura química mais complexa, a utilização de espectroscopia de ressonância magnética nuclear e espectrometria de massa são essenciais (FRANCIS, 1982).

Os espectros de absorção de antocianinas e agliconas na região do visível e UV são muito importantes na sua caracterização estrutural. HARBONE (1967) publicou as características espectrais de todas as antocianidinas conhecidas e de várias antocianinas. Em solução ácida, antocianinas e agliconas mostram absorbância intensa na região compreendida entre os comprimentos de onda de 465 a 550 nm (Banda I) e uma absorbância muito menos intensa na região entre 270 e 280 nm (Banda II). Os espectros são bastante característicos para identificação desses pigmentos, quando puros (BOBBIO e BOBBIO, 1992).

O comprimento de onda máximo de absorção (λ_{max}) na faixa do visível de uma antocianina está diretamente relacionado com o seu padrão de hidroxilação. O aumento da oxidação no anel B desloca o máximo da

absorbância da banda I para comprimentos de ondas maiores. A glicosilação das antocianidinas na posição 3 geralmente tem efeito hipsocrômico nos espectros visível, sendo que a natureza do açúcar não parece ter influência. A determinação da relação entre a absorção máxima no visível e no UV e a razão da absorção na região de 440 nm pela absorção máxima no visível podem também fornecer informações a cerca da posição da glicosilação. Antocianinas, cuja aglicona possui um grupamento o-dihidroxil livre, em presença de AlCl_3 , apresentam um deslocamento batocrômico de 15-35 nm, o que permite distinguir os derivados de cianidina e delphinidina dos derivados de pelargonidina, peonidina, petunidina e malvidina. Os espectros de antocianinas aciladas apresentam um pico de absorção na região de 310 a 335 nm (JACKMAN et al., 1987). A posição dos picos máximos de absorção bem como a sua intensidade variam bastante de acordo com o solvente e o pH do meio. A Tabela 6 mostra valores espectroscópicos de algumas antocianinas e agliconas.

Tabela 6 – Absorbâncias máximas de algumas antocianinas e antocianidinas.

Composto*	λ_{max} UV (nm)	λ_{max} visível (nm)	AlCl₃
Apigenidina	277	476	476
Apigenidina-5-glicosídeo	273	477	477
Pelargonidina	270	520	520
Pelargonidina-3-glicosídeo	270	506	506
Pelargonidina-3-maltosídeo	272	504	504
Pelargonidina—3,5-diglicosídeo	269	535	504
Cianidina	277	523	553
Cianidina-3-glicosídeo	274	524	542
Cianidina-3,5-diglicosídeo	274	523	542
Peonidina	273		541
Peonidina-3-glicosídeo	273	532	532
Peonidina-3-maltosídeo	270	520	520
Delfinidina	277	546	569
Delfinidina-3-glicosídeo	276	534	556
Petunidina	276	543	557
Petunidina-3-glicosídeo	276	534	548
Malvidina	275	542	542
Malvidina-3-glicosídeo	276	534	534
Malvidina-3-maltosídeo	272	530	530

* Solvente MeOH/HO₃⁺.

Adaptado de BOBBIO e BOBBIO (1992).

As técnicas cromatográficas tradicionais em papel e em placas são ainda extensivamente empregadas na identificação preliminar de antocianinas. CLAE tem sido cada vez mais comum, mas seu emprego requer o uso de padrões. No caso da CP e CCD, pode-se dispensar tais padrões uma vez que existe uma grande lista na literatura dos R_f das antocianinas conhecidas (HARBORNE, 1967).

Como regra geral, quanto maior o número de grupos hidroxila presentes na antocianina menor o R_f tanto em meio aquoso quanto alcoólico. A metilação promove efeito inverso, no entanto, o aumento do R_f provocado pela metilação é menos intenso que a diminuição promovida pela hidroxilação. Geralmente, a glicosilação, em solventes aquosos, promove um aumento no R_f e diminuição em solventes alcoólicos (JACKMAN et al., 1987).

Os métodos tradicionais para caracterização das antocianinas incluem hidrólise alcalina, ácida e enzimática e testes de oxidação controlada, prévios à caracterização dos produtos por técnicas cromatográficas. A hidrólise ácida leva a formação da antocianidina e seus açúcares que podem ser separados e

identificados por CP, CCD ou CLAE, por meio do uso de padrões ou pelos seus Rf (FRANCIS, 1982).

A hidrólise controlada fornece informação útil na confirmação das estruturas das antocianinas. Os açúcares são hidrolisados e o curso da hidrólise pode ser seguido pela identificação cromatográfica das antocianinas intermediárias. Antocianinas simples como a cianidina-3-glicosídeo (Cn-3G) apresentarão somente dois picos no cromatograma, correspondentes à antocianina original e a antocianidina. Porém, uma antocianina complexa como Cn-3GG-5G apresentará seis picos: Cn-GG-5G, Cn-3GG, Cn-3G-5G, Cn-3G, Cn-5G e Cn (FRANCIS, 1982).

A hidrólise alcalina é empregada para determinação de grupamentos acila que nessas condições são liberados da molécula podendo ser extraídos do meio e posteriormente identificados por cromatografia. Os testes de oxidação controlada fornecem informação sobre o tipo de açúcar unido a aglicona no carbono 3 (JACKMAN e SMITH, 1996).

5.2. Análise quantitativa

A análise quantitativa de antocianinas se encontra bem elucidada em grande número de publicações (FULEKI, 1967; FULEKI e FRANCIS, 1968a, b; FRANCIS, 1982; WROLSTAD, 1992). Tais métodos podem ser agrupados de acordo com o tipo e objetivo da análise: determinação da concentração total de antocianinas do produto com ou sem interferentes e quantificação de pigmentos separadamente.

Em se tratando de frutas frescas ou sucos, pode-se considerar que existem poucos interferentes e a absorção devido às antocianinas será observada na faixa de 565 a 550 nm. Conforme FULEKI e FRANCIS (1968a), considerando o teor antociânico em termos de cianidina, utiliza-se $E_{1\%}^{1\text{cm}} 535$ 98,2, tendo-se como solvente uma solução etanol:HCL 1,5 N (85:15) a pH 1.

A análise de antocianinas em matérias-primas com compostos interferentes pode ser efetuada utilizando-se o método diferencial de pH que consiste em efetuar leitura espectrofotométrica do extrato em tampão a pH 1 e 4,5 respectivamente. Uma vez que em pH 4,5 a antocianina praticamente não

apresenta coloração, a subtração da leitura a pH 1 da leitura a pH 4,5, representará a fração real de antocianina (FULEKI e FRANCIS, 1968b).

6. Fontes de antocianinas

Antocianinas são encontradas em grande número de espécies de plantas, algumas das quais já foram experimentadas como fonte industrial em potencial. Os sub-produtos das indústrias de suco de uva e de vinho já são empregadas na preparação comercial de antocianinas, a enocianina, que é, provavelmente a antocianina mais antiga disponível comercialmente (MARKAKIS, 1982).

Outras plantas têm sido estudadas e muitos dados já são disponíveis no que diz respeito à composição da fração antociânica destes vegetais. Algumas frutas como uva, "blueberries", framboesa, amora, ameixa, cerejas e maçãs, foram estudadas extensivamente. Além de frutas, alguns cereais, legumes e tubérculos têm sido alvo de estudo, como o repolho roxo, berinjela, feijão. Diversas flores e sementes também foram pesquisadas como o girassol, "rosele", inflorescência do capim gordura, etc.

No entanto, poucos dos vegetais estudados, são empregados comercialmente como fonte de antocianinas. A escolha da matéria-prima a ser usada é naturalmente determinada pelos aspectos econômicos, técnicos e legais que apresentam. Além desses, outros problemas devem ser definitivamente resolvidos, como identificação, determinação quantitativa e estabilização da cor durante o armazenamento de alimentos (BOBBIO, 1992)

Esforços têm sido feitos no sentido de encontrar outras fontes de antocianinas que, além de estáveis, sejam viáveis economicamente. É interessante explorar culturas nativas com produção intensiva e, neste enfoque, o fruto do açazeiro pode significar uma fonte em potencial.

O açáí é um fruto proveniente do açazeiro (*Euterpe oleracea* M) palmeira muito comum nas várzeas e margens dos rios da região amazônica. Os frutos que aparecem em cachos são de coloração violácea, quase negra quando maduros. De forma arredondada ou ovóide, apresentam polpa comestível e um caniço duro. São produzidos durante boa parte do ano, porém com maior intensidade nos meses de julho a dezembro (ROGEZ, 2000).

O açaí é "a fruta da moda" no sudeste brasileiro e grande quantidade do "vinho" - como é chamada a polpa do açaí diluída em água - está sendo destinada às capitais daquela região, para ser consumido como energético pelos adeptos da alimentação natural que cultuam a boa forma física. O "vinho" de açaí é muito popular em toda a Amazônia, principalmente em Belém, onde faz parte da dieta básica da população.

Segundo QUADROS (2002), Belém é a maior consumidora nacional de açaí, demandando cerca de 200 000 L/dia, no período de safra. De acordo com norma do Ministério da Agricultura, a bebida obtida a partir do fruto é denominada genericamente de açaí e pode ser classificada em três tipos: o popular, que possui de 8% a 11% de sólidos totais; o médio, que é o que mais se consome em Belém, que têm de 11,1% a 15% de sólidos totais; e o especial, ou açaí papa, que tem mais de 15% de sólidos totais.

A composição média do açaí é mostrada na Tabela 7.

Tabela 7 – Composição média do açaí.

Composição	Teor (g/100g)
Proteínas	13
Lipídios totais	48
Açúcares totais	1,5
Açúcares redutores (glicose)	1,5
Fibras	34,0
Potássio	0,932
Fósforo	0,124
Cálcio	0,286
Magnésio	0,174
Antocianina	0,400

Fonte: ROGEZ (2000).

Segundo OZELA (1999) o teor de antocianinas do açaí varia sensivelmente entre os frutos da safra e os frutos da entre safra sendo respectivamente 926,1 mg/100g a 356,7 mg/100 g de polpa. Observa-se que mesmo na entressafra o teor de antocianinas é elevado, sendo substancialmente mais elevado que o teor da maioria dos cultivares de uva.

A extração de antocianinas do açaí parece ser alternativa viável, não apenas em termos tecnológicos, como mercadológicos e econômicos.

**CAPÍTULO 1 – AVALIAÇÃO DE DIFERENTES CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO
DA ANTOCIANINA DO AÇAÍ (*Euterpe oleracea* M)**

1. INTRODUÇÃO

Existe considerável interesse na utilização de pigmentos naturais como corantes em alimentos. A substituição dos corantes artificiais ainda apresenta dificuldades em virtude de questões relacionadas à estabilidade. O sucesso para o emprego de corantes naturais reside em saber como controlar e processar a matéria-prima nas etapas de extração, purificação e formulação do corante (CHRISTIAN HANSEN 19--).

A mais antiga preparação comercial de antocianinas e ainda mais relevantemente comercializada é a enocianina, que é o extrato obtido de cascas de uvas vermelhas. Os processos de extração das antocianinas de uvas são variados tanto no que diz respeito à matéria-prima quanto ao método utilizado (GUIMARÃES et al., 1984). No entanto, o método comercial mais comumente empregado envolve o tratamento das cascas em água contendo 3000 ppm de dióxido de enxofre por um período que varia de 48 a 72 horas e posterior dessulfitação e concentração (FRANCIS, 1996).

A taxa e o grau de extração das antocianinas dependem de uma série de fatores. Primeiro, a fonte em questão. Diferentes conformações físicas irão influenciar na metodologia empregada em tal processo.

As antocianinas podem ser extraídas dos vegetais de forma relativamente fácil. Durante a extração, certos fatores como o tempo de maceração, maior área e tempo de contato entre o líquido de extração e o produto ou tratamentos que causem a destruição das células da epiderme da casca aumentam o rendimento da extração.

Por outro lado, um período de maceração excessivamente longo e em temperaturas elevadas pode causar uma queda no rendimento da extração pela degradação do pigmento.

Na realidade, a escolha do método de extração de uma das muitas fontes disponíveis depende largamente do propósito de tal extração, bem como da natureza antociânica da matéria-prima. O conhecimento dos fatores que influenciam na estrutura e estabilidade das antocianinas é vital. Se o pigmento extraído for submetido a análises qualitativa e quantitativa, é desejável que o método escolhido mantenha a antocianina na forma original encontrada no vegetal. Por outro lado, se o pigmento extraído for usado como ingrediente

alimentício o rendimento, o poder tintorial e a estabilidade são os pontos mais relevantes. Nesse caso os procedimentos posteriores também devem ser considerados, de acordo com o objetivo da extração, além do baixo custo.

Antocianinas apresentam baixa estabilidade em soluções neutras ou alcalinas. Desta forma, os processos de extração geralmente envolvem o uso de solventes acidificados que, além de romperem as células das membranas das plantas, simultaneamente dissolvem os pigmentos solúveis em água. O método tradicional de extração de antocianinas envolve a maceração da matéria-prima em meio alcoólico acidificado com um ácido mineral, geralmente HCl numa concentração máxima de 1 %. O metanol tem se mostrado o mais eficiente, no entanto, devido a sua toxicidade, o etanol tem sido preferencialmente utilizado, embora seja menos eficiente e mais difícil de evaporar que o metanol (JACKMAN e SMITH, 1996).

A acidificação com HCl tem sido empregada nos processos de extração, no entanto ácidos minerais podem alterar a forma nativa do pigmento pela quebra de associações com metais, copigmentos, etc. Neste caso é recomendável utilizar ácidos orgânicos mais fracos como ácido cítrico, tartárico, acético, etc. Costuma-se empregar também solventes orgânicos isentos de ácidos como acetona, propilenoglicol e n-butanol (STRACK e WRAY, 1989).

A extração utilizando SO₂ em meio aquoso ou alcoólico permite, geralmente, um maior rendimento em termos de concentração de pigmento, uma maior pureza do extrato, maior intensidade da coloração além da obtenção de um produto mais estável quando comparado àqueles extraídos apenas com água morna (PALAMIDIS e MARKAKIS, 1975).

O extrato antociânico obtido por qualquer procedimento é muito diluído e requer uma etapa de concentração anterior a purificação ou utilização. Na concentração podem ser utilizadas diferentes técnicas como ultrafiltração ou resinas adsorventes (BRIDLE e TIMBERLAKE, 1997) mas usualmente empregada é a concentração a vácuo em baixas temperaturas (aproximadamente 38 °C).

O presente trabalho teve como objetivo testar diferentes condições de extração das antocianinas do fruto açaí para caracterizar as condições satisfatórias viáveis de serem empregadas bem como, quantificar o teor antociânico do açaí.

Para tal, algumas condições foram selecionadas como a condição do fruto (inteiro ou despolpado), o tipo de solvente (aquoso ou alcoólico), o tipo de ácido, a adição de SO₂ e também a temperatura da solução extratora.

Uma vez que o número de parâmetros foram muitos, estes foram analisados separadamente, sendo em cada etapa determinado o mais eficiente em termos da quantidade de antocianina extraída.

Inicialmente foram avaliados o tipo de solvente, o pH e o tipo de ácido conjuntamente. Após esta etapa, as condições do sistema de maior eficiência extrativa foram fixadas e foi variada a temperatura de extração (25 °C, 50 °C, 60 °C e 70 °C) conjuntamente com a condição do fruto (inteiro ou despolpado).

2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Pigmentos Naturais e Secagem da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa– MG e no Centro de Pesquisa Agroindustrial da Amazônia Oriental (CPATU) - EMBRAPA, situado em Belém-PA.

2.1. Material

A matéria-prima empregada como fonte de antocianina foi o fruto do açaizeiro fresco e congelado adquirido no mercado de Belém do Pará. Os frutos foram colhidos no período de safra nos meses de setembro de 2000 e de 2001.

2.2. Métodos

2.2.1. Testes preliminares

Foram conduzidos testes preliminares para caracterização do açaí quanto ao teor antociânico total, tanto do fruto inteiro quanto do despolpado e, neste último, o teor de antocianinas da polpa e da semente. Foram também avaliados o tempo adequado de extração e o número de reextrações necessárias para adequada quantificação antociânica do açaí.

A matéria prima nesta etapa do trabalho foi adquirida em Belém, resfriada e enviada para Viçosa, onde permaneceu congelada à $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento do uso.

Cerca de 100 g de frutos foram pesados em duplicata e deixados em repouso em ausência de luz por 24 h sob refrigeração com 100 mL de etanol 70 % (v/v) acidificado com HCl a pH 2. Outra fração foi despulpada. 10 g da polpa foi conduzida à extração das antocianinas sob as mesmas condições em 100 mL de solução extratora. Neste caso as sementes provenientes do despolpe também foram utilizadas para a extração.

Após 24 h, as amostras foram filtradas e submetidas a nova extração nas mesmas quantidades de solventes. O teor antociânico foi determinado segundo metodologia de FULEKI e FRANCIS (1968a). Uma pequena alíquota de cada extrato foi diluída em etanol:HCl 1,5 N (85:15), deixada em repouso em ausência de luz por 2 h e levada à leitura espectrofotométrica da absorbância em 535 nm.

2.2.2. Quantificação da antocianina do açaí

Para quantificação do teor antociânico no fruto fresco inteiro adquirido do comércio de Belém, foi pesado cerca de 55 g de frutos para a extração com etanol 70 % acidificado com HCl a pH 2 numa relação 1:4 (m/v). O material ficou em maceração por 48 h, em ausência de luz, uma parcela sob refrigeração ($8 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) e outra a temperatura ambiente ($31 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$). O extrato foi filtrado em papel Whatman 1, sendo a matéria-prima submetida a reextração. Do líquido retirou-se uma alíquota que foi levada para leitura da absorbância a 535 nm em espectrofotômetro.

2.2.3. Determinação do solvente de extração

Uma vez que os parâmetros testados foram muitos, os mesmos foram avaliados por partes. Primeiramente efetuou-se alguns testes com o fruto congelado e em seguida com o fruto fresco.

2.2.3.1. Etapa 1

Nesta etapa empregou-se como matéria-prima frutos congelados. Quatro bateladas de testes foram efetuadas. O primeiro passo foi avaliar o tipo de solvente, o pH do meio e o tipo de ácido empregado. O Quadro 1 mostra os tratamentos.

Quadro 1 – Delineamento experimental para avaliação da eficiência dos sistemas extratores estudados.

pH	Tipo de ácido	Sistema solvente	
		Etanol 70 %	Água
2	HCl	2 Repetições	2 Repetições
	Ác. cítrico	2 Repetições	2 Repetições
	Ác. tartárico	2 Repetições	2 Repetições
3	HCl	2 Repetições	2 Repetições
	Ác. cítrico	2 Repetições	2 Repetições
	Ác. tartárico	2 Repetições	2 Repetições
3,5	HCl	2 Repetições	2 Repetições
	Ác. cítrico	2 Repetições	2 Repetições
	Ác. tartárico	2 Repetições	2 Repetições

Para a extração cerca de 30 g de fruto inteiro congelado foi macerado em 180 mL de solvente por 48 horas ao abrigo de luz a temperatura ambiente (28 ± 1 °C). Após esse tempo foi retirada uma alíquota de 1 mL de cada tratamento que foi diluída em 10 mL de etanol: HCl 1,5N (85:15) e para ser efetuada leitura da absorbância em espectrofotômetro a 535 nm.

Em seguida foi avaliado o poder extrativo da água adicionada de SO₂. O procedimento para a extração foi o como discutido anteriormente. As concentrações de SO₂ testadas foram de 4000, 2000 1000 e 500 ppm de SO₂.

No terceiro conjunto de testes avaliou-se conjuntamente os tipos de solventes e as concentrações de SO₂. O Quadro 2 mostra o esquema utilizado.

Quadro 2 - Esquema para avaliação da eficiência de sistemas extratores.

Sistema solvente				
Etanol 70 %			H ₂ O	
Acidificado (pH 2)		-		
HCl	HCL+ SO ₂ (1000 ppm)	SO ₂ (1000 ppm)	SO ₂ (1000 ppm)	SO ₂ (4000 ppm)
2 rep.	2 rep.	2 rep.	2 rep.	2 rep.

Na quarta e última batelada de testes foi observado o efeito da temperatura na extração. Para tanto, a extração foi efetuada com etanol 70 % acidificado com HCl a pH 2. Cerca de 50 g de frutos foi pesada e procedeu-se a extração com 180 mL de solvente em banhos com as temperaturas de para 50 °C, 60 °C e 70 °C. A cada 5 minutos, durante o período de 2 horas, uma alíquota de 1 mL era retirada, diluída 25 mL de etanol: HCL 1,5 N (85:15) e levada a leitura da absorbância em 535 nm em espectrofotômetro Hitachi U – 2001 para quantificação do teor antociânico e qualificação da cor em colorímetro Colorquest XE com leitura direta de absorbância das coordenadas “L”, “a” e “b”, empregando a escala Hunter-Lab.

Os experimentos foram conduzidos utilizando delineamento inteiramente casualizado. As análises estatísticas foram efetuadas pelo programa SAS. Realizou-se a análise de variância para verificar a existência de diferenças significativas entre os tratamentos e o teste Tukey ao nível de confiança de 95 % para analisar as diferenças entre as médias.

2.2.3.2. Etapa 2

Nesta etapa do trabalho, utilizou-se como matéria-prima o fruto fresco inteiro, cujo teor antociânico foi determinado. A extração foi feita sob refrigeração à temperatura de 8 ± 1 °C por 72 horas utilizando como solvente extrator etanol 70 % acidificado com HCl a pH 2. A quantificação foi efetuada de acordo com a metodologia de FULEKI e FRANCIS (1968a).

Uma vez que tradicionalmente emprega-se como solução extratora etanol a 70 % acidificado com HCl a pH 2, manteve-se fixo o pH e o tipo de ácido e variou-se o teor de água, testando-se etanol a 30 %, 50 %, 70 % e 90 % respectivamente. Para a extração cerca de 30 g de frutos inteiros foram

macerados em 180 mL de solvente por 48 horas ao abrigo de luz a temperatura ambiente (31 ± 1 °C). Após este intervalo de tempo, uma alíquota de 1 ml foi diluída em 25 mL de etanol: HCl 1,5 N (85:15) e levada para leitura espectrofotométrica a 535 nm.

Paralelamente outros parâmetros foram avaliados a semelhança da metodologia discutida na etapa 1. O Quadro 3 mostra os tratamentos avaliados.

Quadro 3 - Esquema para avaliação da eficiência de alguns sistemas extratores

Sistema solvente				
Etanol 70 %			H ₂ O	
HCl pH 2	Ác. Cítrico pH 2	SO ₂ (1000 ppm)	SO ₂ (1000 ppm)	SO ₂ (4000 ppm)

Obs.: toda a avaliação foi realizada em 4 repetições.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Testes preliminares

O rendimento em polpa para o fruto açaí correspondeu em média a 20 % do peso total do fruto. O Quadro 4 mostra os resultados médios, de três repetições, da quantificação da antocianina da polpa e semente do açaí. Cada extração ocorreu em um período de 24 horas.

Quadro 4 – Teor de antocianinas do açaí.

Amostra	Antocianinas (mg)				Antocianinas (mg/100g)
	1 ^a extração	2 ^a extração	3 ^a extração	Total	
Polpa (20,78 g)	18,58 (70,22 %)	5,84 (22,07 %)	2,04 (7,71 %)	26,46	127,33
Semente (81,55 g)	3,55	-	-	3,55	4,35

O teor de antocianinas encontrado para a polpa foi muito aquém daquele citado em literatura. Segundo OZELA (1999), o teor de antocianinas encontrado na safra e entressafra em matéria-prima adquirida no comércio de

Belém em 1999, foi respectivamente 926,1 mg/100g de polpa e 356,7 mg/100 g de polpa,.

É interessante chamar a atenção neste momento para alguns pontos observados. Quando o teor antociânico do açaí é mencionado na literatura os dados não são claros, principalmente dada a terminologia empregada. Costuma-se fazer referência ao teor de antocianinas por 100 g de açaí, sendo tal termo as vezes usado como sinônimo do fruto propriamente dito, outras vezes, como a bebida comercializada na região norte do Brasil, a qual recebe esta denominação. Uma vez que a fração do fruto que possui antocianina (polpa) é bem pequena, quando se faz referência ao teor de pigmento em relação à polpa, esse valor será bem superior ao teor de pigmento em relação ao fruto inteiro.

É importante, portanto, ficar claro se o teor antociânico é referente à polpa ou ao fruto como um todo. E se for em relação a polpa, uma vez que comercialmente ela é obtida com a adição de água, é importante também que se faça referência ao teor de umidade da mesma ou se dê o resultado em peso de matéria seca.

A polpa mencionada neste trabalho se trata da película (mesocarpo) retirada por abrasão sem a adição de água. De qualquer forma o teor antociânico encontrado foi bem abaixo daquele citado na literatura. Por esta razão foi feita a extração com o fruto inteiro, de forma a se verificar se a perda estava ocorrendo no momento do despolpe ou se a matéria-prima é que apresentava um baixo teor mesmo. O Quadro 5 mostra os resultados obtidos.

Quadro 5 – Teor de antocianinas do açaí.

Amostra	Antocianina (mg/100 g)
Polpa (19,84 g)	127,86
Fruto inteiro (60,1 g)	27,00

Neste caso a extração foi feita em uma única etapa com duração de 48 horas. O resultado obtido para polpa , com uma única extração por 48 horas foi semelhante ao obtido para o caso de 3 extrações consecutivas de 24 horas cada.

HEVEZ (2000), encontrou 44 mg como teor médio de antocianina por 100 g de fruto inteiro. O conseguido neste experimento foi apenas 61 % deste valor. Este experimento foi exaustivamente repetido sempre se chegando a um valor médio de antocianinas em torno do citado no Quadro 5. Possivelmente pelo fato do açaí ser bastante lábil e sofrer degradação rápida após a colheita (HEVEZ, 2000; MELO et al., 1988), acredita-se que grande parte da antocianina tenha se degradado no período que se deu entre a colheita, o transporte do fruto até ser congelado (4 dias) e a extração do pigmento.

Com isso, decidiu-se optar pelo trabalho com o fruto in natura, recém colhido para quantificação do teor antociânico, bem como para obtenção do extrato para caracterização estrutural de suas frações e para uso na formulação e aplicação em alimentos.

Apesar dos contratempos alguns resultados são interessantes e merecem ser destacados. Primeiramente no que diz respeito à condição do fruto. Pelo que pode ser observado, a extração das antocianinas deve ser efetuada com o fruto inteiro. Ao se despolar, além de expor o pigmento à ação das enzimas presentes e que aceleram a sua degradação, incorpora-se mais lipídios ao extrato que se a extração fosse efetuada com o fruto inteiro, uma vez que o mesmo é rico em gordura. A polpa do açaí se trata de uma película fina situada na extremidade da semente, desta forma a extração do pigmento da polpa é fácil mesmo com o fruto intacto.

Outro resultado observado é quanto ao tempo e número de extrações necessárias. Uma única extração por 48 horas mostrou o mesmo rendimento que 3 extrações consecutivas de 24 horas cada na relação 1:4 de polpa para solvente. Portanto, pode-se optar por este período e uma única etapa de extração para se obter o extrato antociânico de açaí.

3.2. Determinação do solvente de extração

3.2.1. Etapa 1

Apesar de ter sido verificado que o teor antociânico total determinado para o fruto congelado havia sido menor que aquele citado na literatura (HERVEZ, 2000) para o fruto fresco, optou-se por trabalhar com o fruto

congelado, uma vez que os tratamentos para determinação do sistema solvente extrator mais eficiente foi comparativo.

O Quadro 6 mostra os resultados obtidos na avaliação de diferentes tipos de solventes, pH do meio e diferentes tipos de ácido.

Quadro 6 – Conteúdo de antocianinas em frutos congelados de açaí, originado com a extração com diferentes solventes extratores, pH e tipos de ácidos.

Solvente Extrator	Antocianina (mg/100 g) [*]
Etanol-HCl - pH 2	26,335 A
Etanol-ácido cítrico – pH 2	20,565 A B
Etanol-ácido cítrico – pH 3	20,375 A B
Etanol-HCl – pH 3	19,730 A B
Etanol-ácido cítrico – pH 3,5	19,530 A B
Etanol-ácido tartárico – pH 3,5	19,100 B
Etanol-ácido tartárico – pH 3	18,650 B
Etanol-HCl – pH 3,5	17,420 B C
Etanol-ácido tartárico – pH 2	17,010 B C D
H ₂ O-ácido cítrico – pH2	13,985 C D E
H ₂ O-ácido cítrico – pH 3	11,180 C D E
H ₂ O-HCl – pH 3	11,160 C D E
H ₂ O-HCl – pH 3,5	11,070 C D E
H ₂ O-ácido tartárico – pH 2	10,630 C D E
H ₂ O-ácido tartárico – pH 3,5	10,140 D E
H ₂ O-ácido cítrico – pH 3,5	8,535 E
H ₂ O-HCl – pH 2	8,485 E
H ₂ O-ácido tartárico – pH 3	8,410 E

^{*} Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 1 % de significância.

O solvente etanol 70 % acidificado com HCl a pH 2, apresentou maior poder extrator. Em etanol, o ácido cítrico mostrou o mesmo desempenho nos três pH testados. O ácido tartárico foi, entre os três ácidos, o de menor eficiência. A água acidificada apresentou sempre menor poder extrator que o etanol 70 %.

O Quadro 7 mostra os resultados obtidos para a água como solvente extrator e variou-se o teor de SO₂.

Quadro7 - Conteúdo de antocianinas dos frutos congelados de açaí, com extração em água com diferentes teores de SO₂.

Solvente extrator (ppm de SO₂ em água)	Antocianina (mg/100g)*
4000	34,70 A
2000	29,23 A B
1000	24,83 A B
500	17,24 B

* Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de confiança de 95 % de probabilidade.

O maior e o menor teor de SO₂ levaram respectivamente ao maior e menor poder extrator de antocianinas. Os valores intermediários não apresentaram diferenças significativas entre si. Uma vez que o incremento no teor antociânico não é tão sensível com o aumento no teor de SO₂, pode-se sugerir o uso de quantidades intermediárias, no caso 1000 ppm.

O Quadro 8 mostra os resultados da avaliação conjunta para os tipos de solvente e concentração de SO₂.

Quadro 8 - Conteúdo de antocianinas em 100 g do peso dos frutos congelados de açaí, com diferentes tipos de solventes e teores de SO₂.

Solvente extrator	Antocianina (mg/100 g)*
H ₂ O/SO ₂ (4000 ppm)	34,70 A
Etanol 70 %/SO ₂ (1000 ppm)	34,30 A
Etanol 70 %/HCl (pH 2)	26,34 A B
H ₂ O/SO ₂ (1000 ppm)	24,86 A B
Etanol 70 %/HCl (pH 2)/SO ₂ (1000ppm)	21,48 B

* Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de confiança de 95 % de probabilidade.

De acordo com o Quadro 8, a solução aquosa com 4000 ppm de SO₂ e a solução etanólica com 1000 ppm de SO₂ apresentaram maior poder extrator. A solução etanólica acidificada com HCl apresentou o mesmo desempenho que a solução aquosa com 1000 ppm de SO₂, sendo a menos eficiente a solução etanólica acidificada a pH 2 com HCl e contendo 1000 ppm de SO₂.

Uma vez que o etanol é de fácil remoção, permitindo a concentração do extrato, a solução etanólica sulfitada seria a indicada para se efetuar a extração do pigmento do açaí.

A Figura 1 mostra os resultados obtidos, em termos de teor antociânico, para a extração com etanol 70% acidificado com HCl a pH 2, em diferentes temperaturas, ao longo de 2 horas.

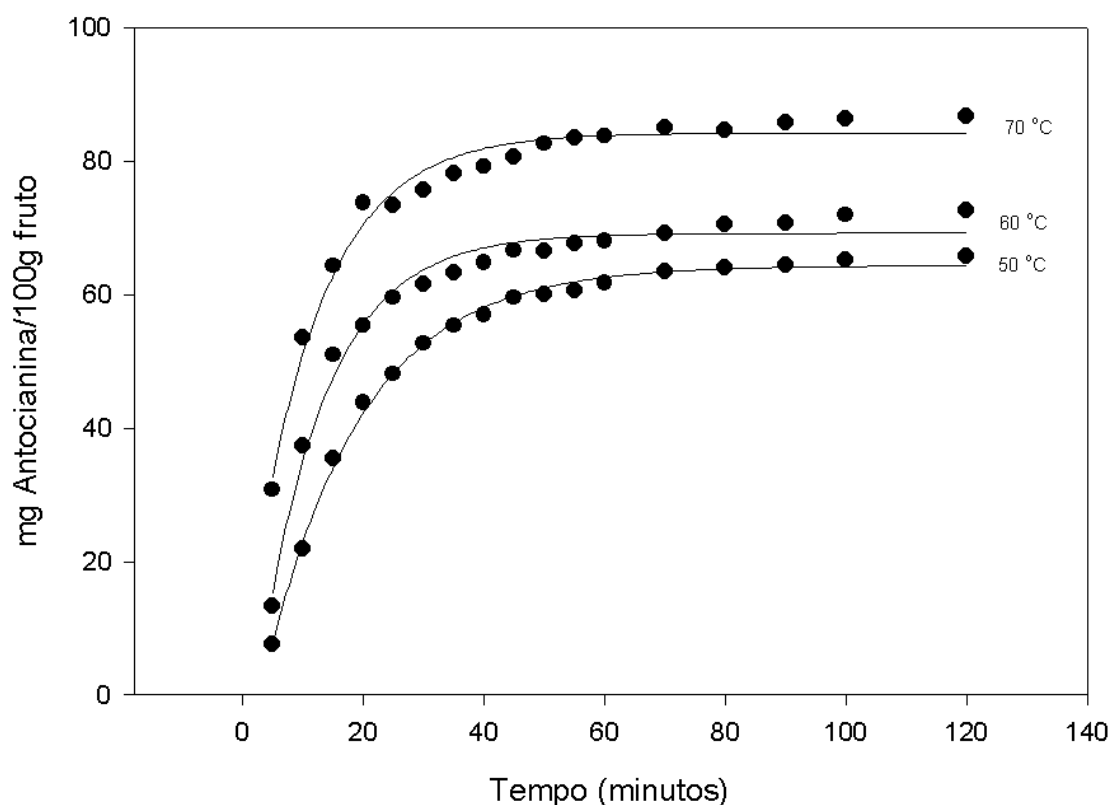


Figura 1 – Teor de antocianinas de açaí extraídas com etanol 70 % acidificado com HCl a pH 2, ao longo do tempo, em diferentes temperaturas.

Pode ser observado que a extração acontece de forma exponencial ao longo do tempo e que para cada temperatura avaliada a partir de um certo tempo o incremento de pigmento extraído é pequeno. Isto sugere que a extração pode ser efetuada com aquecimento por um período inicial mas, de acordo com resultados observados em etapas anteriores deste trabalho, deve continuar sem aquecimento por mais algum tempo para que se obtenha maior rendimento. No presente caso, pode ser observado que em todas as temperaturas a partir de 20 minutos, praticamente não houve aumento, considerável na extração de antocianina que justifique o risco da degradação do pigmento pelo efeito da temperatura mais elevada.

Apesar da exposição à temperatura acima de 40 °C não ser recomendada no trabalho com antocianinas (FRANCIS, 1999), pode ser

observado pela Figura 2 que a relação entre a absorbância a 535 nm (comprimento de máxima absorção) e 410 nm não sofre variação sensível, o que indicaria que não está ocorrendo degradação significativa do pigmento. Os valores observados para 60 °C são bem próximos aos de 70 °C, assim como para os de 50 °C a partir de 20 minutos de extração.

Segundo JACKMAN et al. (1987) um aumento na absorção na região de 400 a 440 nm usualmente reflete o acúmulo de produtos de degradação com coloração marrom, enquanto a diminuição no comprimento de máxima absorção na região visível do espectro reflete a perda de pigmento. Este fenômeno tem sido usado para acompanhar a degradação em extratos pelo cálculo da relação da absorção nas duas regiões citadas. Esta relação pode ser um bom índice da degradação antociânica com o propósito de controle de qualidade.

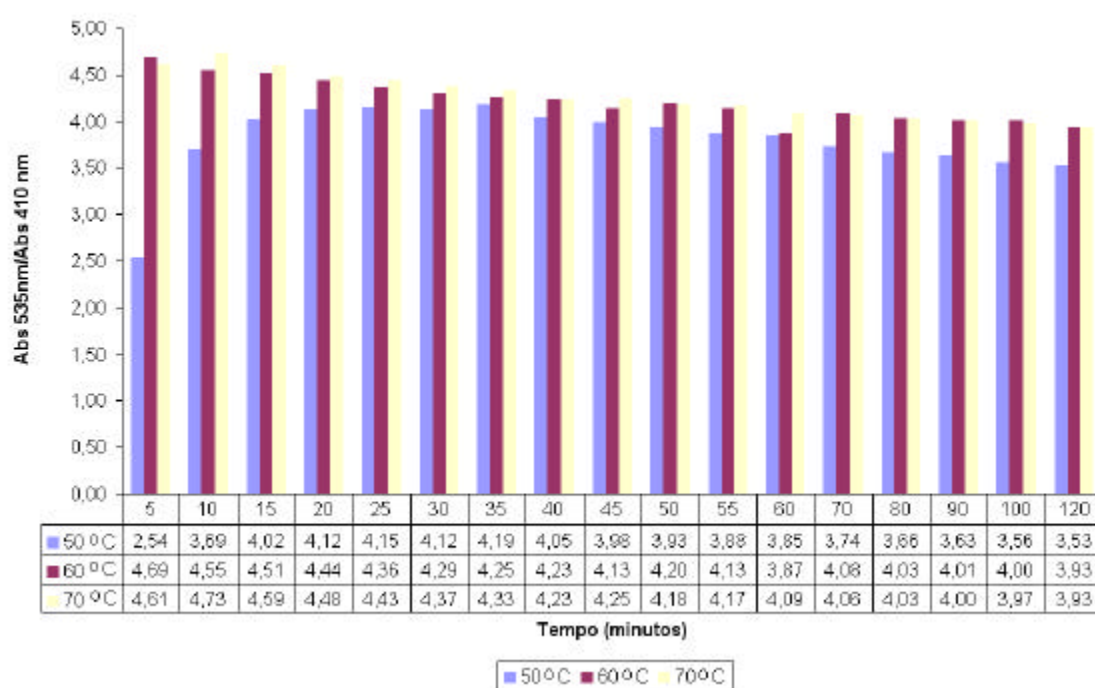


Figura 2 - Relação entre a absorbância em 535 nm e 410 nm ao longo do tempo para diferentes temperaturas de extração.

A não ser para as amostras à temperatura de 50 °C que apresentaram inicialmente um aumento na razão abs 535/abs 410, as amostras nas temperaturas de 60 e 70 °C não mostraram aparente variação. Na verdade, pelos resultados, não é possível determinar se está ocorrendo degradação ao longo da extração.

Segundo FRANCIS (1982) a avaliação colorimétrica através dos valores triestímulus têm mostrado uma correlação muito melhor com as respostas visuais humanas. Em se tratando de coordenadas colorimétricas o desejado durante a extração é que se observe um aumento da saturação da cor (coordenada c) com um mínimo de variação na tonalidade (coordenada h), o que refletiria um aumento no conteúdo de antocianina sem variação da sua forma original, ou seja, sem aumento no conteúdo de produtos de degradação com coloração marrons que alterariam a tonalidade do extrato. As Figuras 3 e 4 mostram os resultados obtidos para as coordenadas “c” (croma) e “h” (tonalidade) para os três tratamentos ao longo do tempo.

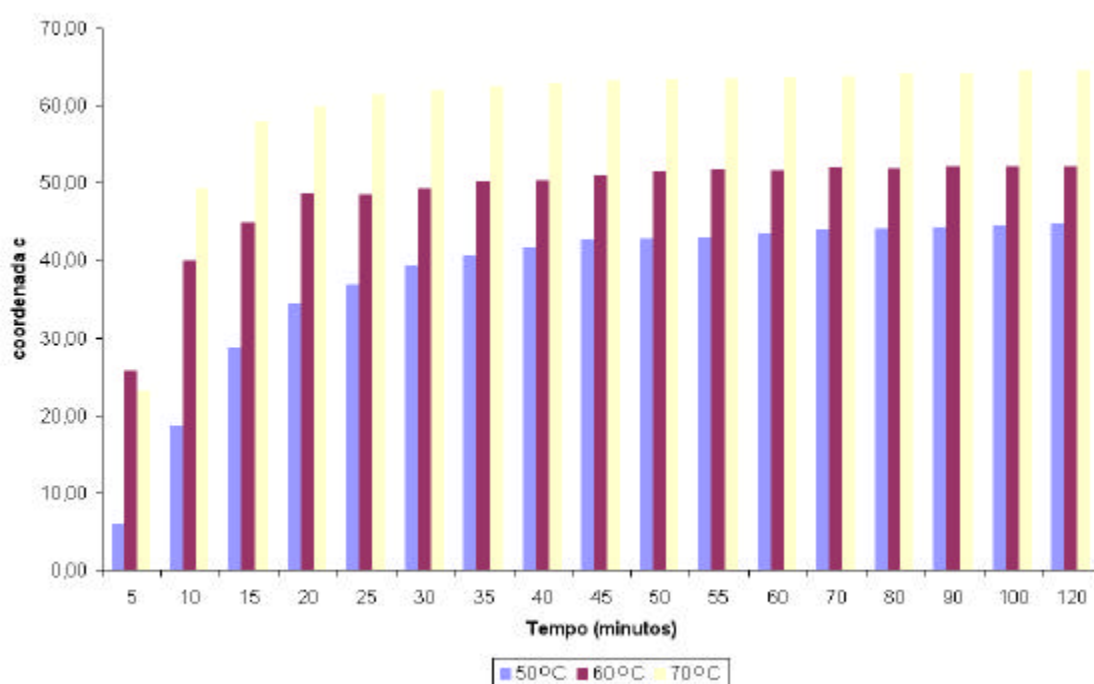


Figura 3 – Comportamento da coordenada “c” (croma) ao longo do tempo nas diferentes temperaturas de extração.

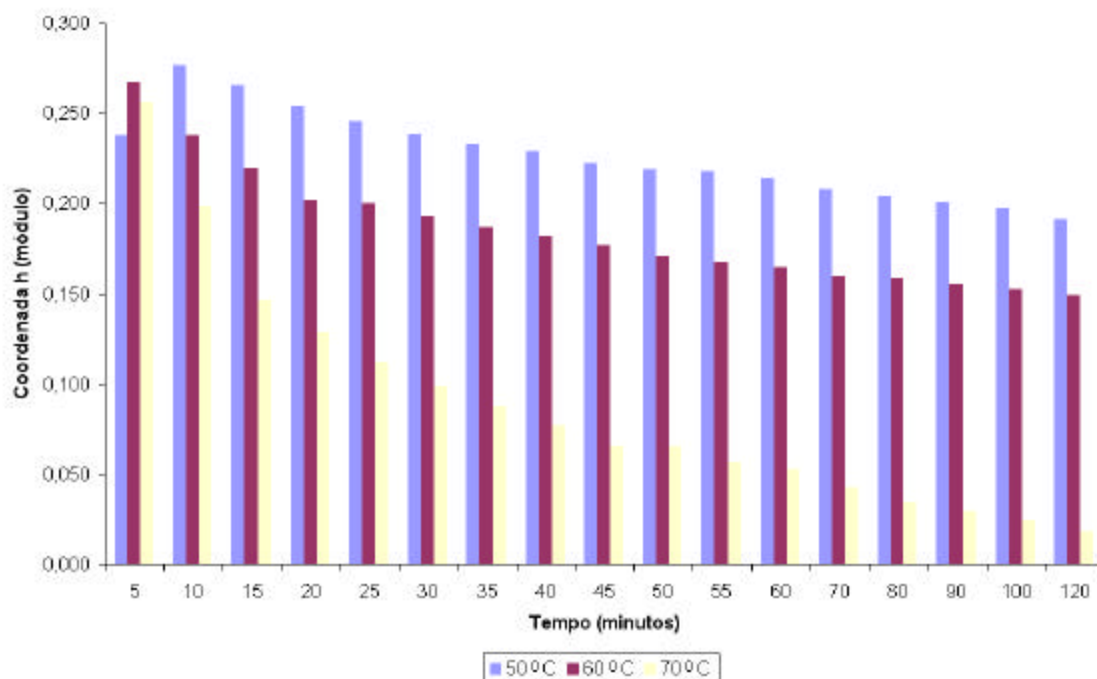


Figura 4 – Comportamento da coordenada “h” (tonalidade) ao longo do tempo nas diferentes temperaturas de extração.

A temperatura de extração de 70 °C foi a que promoveu um maior aumento da coordenada “c” , mas ao mesmo tempo foi a que apresentou uma maior variação da coordenada “h”. Conforme mencionado, uma maior variação na tonalidade pode ser um indicativo de degradação do pigmento antociânico. As temperaturas de 50 °C e 60 °C por sua vez proporcionaram uma menor variação da tonalidade, e uma vez que a 60 °C houve uma maior extração do pigmento, esta é a temperatura recomendada para a extração da antocianina do açaí.

3.2.2. Etapa 2

3.2.2.1. Quantificação das antocianinas

Primeiramente foi efetuada a quantificação do teor antociânico conforme sugere a literatura procedendo-se a extração sob refrigeração, a temperatura de $8 \pm 1^\circ\text{C}$. Os resultados obtidos são mostrados no Quadro 9.

Quadro 9 – Quantificação da antocianina no fruto fresco do açaí, extração por 72 h, sob refrigeração (8 ± 1 °C).

Repetição	mg antocianina/100 g de fruto					Total
	1 ^a extração	2 ^a extração	3 ^a extração	4 ^a extração	5 ^a extração	
1	50,48 (71,88 %)	10,18	3,64	2,66	3,26	70,22
2	48,96 (72,65 %)	8,97	3,40	3,09	2,97	67,39
3	45,35 (61,11 %)	9,11	7,30	4,56	7,89	74,21
4	54,26 (59,71 %)	11,17	8,84	6,61	9,99	90,87
5	55,62 (61,94 %)	11,73	8,57	4,48	9,40	89,8
6	46,91 (52,74 %)	12,70	9,70	7,27	12,35	88,93
Média						80,24

Nas condições estudadas, mais de 50 % do conteúdo de pigmento foi conseguido na primeira extração. Pode ser observado que há uma variabilidade entre as extrações e que o processo sob refrigeração se dá lentamente. Isso pode ser confirmado observando os dados do Quadro 10, em que a extração foi efetuada a temperatura de 31 ± 1 °C.

Quadro 10 - Quantificação da antocianina no fruto fresco do açaí, extração por 48 h, a temperatura ambiente (31 ± 1 °C).

Repetição	1 ^a extração (mg/100mL)	2 ^a extração (mg/100mL)	3 ^a extração (mg/100mL)	Total (mg/100mL)
1	94,38 (94,82 %)	4,12	1,03	99,53
2	100,00 (94,32 %)	4,91	1,11	106,02
3	98,89 (94,87 %)	3,76	1,52	104,17
Média				103,24 $\pm$ 3,34

Praticamente todo o pigmento foi obtido na primeira extração (em média 94, 67 %). Além disso, o conteúdo antociânico foi maior neste caso. Tal fato pode ser devido a variação inerente do fruto, já que as análises foram feitas em dias diferentes com matérias-primas distintas. No entanto, no decorrer deste trabalho, ao se avaliar a eficiência do solvente extrator, pode-se observar que o conteúdo antociânico do fruto fresco (em que a extração se deu à temperatura ambiente) foi em torno de 100 mg/100g de fruto.

Uma vez que a porcentagem de polpa do açaí é em torno de 20 % do peso total do fruto, e é nela que efetivamente se encontra a antocianina, pode-se expressar o conteúdo antociânico apenas em relação à polpa e valor encontrado foi, em média, 500 mg de antocianina/100 g de polpa.

O que se tem observado, nos poucos trabalhos publicados na área, é a total falta de concordância nos valores antociânicos encontrados para o fruto açaí. Na realidade, há também o problema da falta de padronização de tais resultados. Como foi mencionado no item 3.1, alguns resultados são expressos em termos de conteúdo de antocianinas por 100g de polpa, sem maiores explicações sobre tal polpa, ou seja, se foi obtida apenas pela retirada do mesocarpo ou se foi adicionado água e qual a umidade da mesma.

OZELA (1999), obteve 926,1 mg e 356,7 mg de antocianina por 100 g de polpa (vinho), respectivamente, no período de safra e entressafra. No entanto, nenhum dado sobre a umidade de tal vinho foi mencionado. BOBBIO et al. (2000), obtiveram 50 ± 5 mg de antocianina por 100 g de fruto, que seria equivalente a 263 mg por 100 g de polpa. IADEROZA et al. (1991), encontraram 336 mg de antocianina por 100 g de frutos. Já ROGÉZ (2000), encontrou 44 mg de antocianina por 100 g de frutos.

Observa-se que há uma variação apreciável entre estes valores, o que pode ser atribuído a alguns fatores. Primeiro, a variabilidade inerente do fruto, segundo, e talvez mais marcante, as condições do fruto analisado. Uma vez que o açaí é bastante perecível e que o conteúdo antociânico muito susceptível a degradação, questões como tempo de colheita e início da extração são de grande importância. Desta forma, poderão ocorrer variações significativas nesse sentido de acordo com o procedimento adotado, ou seja, se a determinação foi efetuada imediatamente após a colheita ou em algumas horas depois, se o fruto foi conservado sob refrigeração ou não, a forma como foi transportado e manuseado, etc.

O Quadro 11 mostra alguns dados que servem como exemplo ao que foi relatado. Uma determinada fração do fruto adquirido no comércio local de Belém foi submetido a extração imediata sob refrigeração. Uma outra fração foi branqueada (95 °C por 60 segundos) e submetida à extração. Uma porção tanto do fruto branqueado quanto do não branqueado foram guardados por 24 horas sob refrigeração quando, então, foi iniciada a extração do pigmento.

Quadro 11 – Concentração de antocianinas de frutos de açaí frescos e refrigerados.

Amostra	Antocianina (mg/100 g)
Fresca branqueada	53,26
Fresca não branqueada	60,74
Refrigerada branqueada*	15,04
Refrigerada não branqueada*	31,84

* Mantida sob refrigeração por 24 horas antes da extração

É interessante observar que o branqueamento não ajudou na conservação do pigmento pela inativação enzimática, o que sugere que outros fatores que não a ação de enzimas sejam responsáveis pela rápida degradação das antocianinas do açaí. Observa-se também que há uma rápida degradação do pigmento no fruto armazenado por 24 horas antes da extração, mesmo sob refrigeração. Tal fato pode, possivelmente, explicar as diferenças observadas no teor antociânico do açaí nos diversos trabalhos já citados.

Outro ponto relevante é que pelo fato do pigmento do açaí se degradar tão rapidamente, a utilização comercial do fruto para produção da corante só é viável com a implantação da unidade industrial próxima aos locais de plantio. O tempo entre a colheita e o processamento do fruto deve ser o menor possível.

3.2.2.2. Determinação do solvente extrator

O Quadro 12 mostra os resultados obtidos para a extração da antocianina do fruto fresco foi efetuada com etanol acidificado a pH 2 com diferentes teores alcoólicos.

Quadro 12 - Conteúdo de antocianinas em frutos frescos de açaí, com extração em diferentes teores de etanol.

Solvente extrator	Antocianina (mg/100g)*
Etanol 70 %-HCl – pH 2	89,08 A
Etanol 90 %-HCl – pH 2	87,99 A
Etanol 60 %-HCl – pH 2	79,37 A B
Etanol 50 %-HCl – pH 2	68,38 B
Etanol 30 %-HCl – pH 2	51,34 B

* Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de confiança de 95 % de probabilidade.

Apesar da extração com etanol 70 % ter sido ligeiramente superior não foi estatisticamente diferente da extração com etanol 90 %. Desta forma, se o extrato vier a ser concentrado em evaporador rotatório a vácuo, uma vez que a temperatura não deve ser superior a 40 °C, a utilização de etanol a 90 % é recomendada devido à facilidade de concentração. Solventes com maiores teores de água apresentaram menor poder extrator.

O Quadro 13 mostra os resultados para a extração antociânica do açaí fresco com diferentes solventes extratores, a semelhança do procedimento usado para o fruto congelado.

Quadro 13 - Conteúdo de antocianinas em frutos frescos de açaí, com diferentes tipos de solventes e teores de SO₂.

Solvente extrator	Antocianina (mg/100g)*
H ₂ O/ SO ₂ (4000 ppm)	96,250 A
Etanol/ SO ₂ (1000 ppm)	90,943 A
Etanol/HCl (pH 2)	80,250 B
H ₂ O/ SO ₂ (1000 ppm)	74,015 B
Etanol/ácido cítrico (pH 2)	51,109 C

* Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de confiança de 95 % de probabilidade.

Os resultados seguiram tendência semelhante de extração a obtida com o fruto congelado, mas com teores de pigmento significativamente superiores. A solução aquosa com 4000 ppm de SO₂ juntamente com a solução etanólica com 1000 ppm de SO₂ apresentaram maior poder extrator. A solução etanólica acidificada com HCl apresentou o mesmo desempenho que a solução aquosa com 1000 ppm de SO₂, sendo a menos eficiente a solução etanólica acidificada a pH 2 com ácido cítrico.

4. RESUMO E CONCLUSÕES

Os ensaios efetuados nos testes preliminares mostraram o quanto o fruto do açaí é lábil e como a degradação do pigmento se dá de forma rápida, após a colheita. O teor de antocianinas no fruto obtido em Belém e transportado para Viçosa foi bem aquém do determinado no fruto fresco. Neste trabalho, o teor de antocianina encontrado para o fruto fresco foi em torno de 100 mg por 100 g de frutos (base úmida), ou 500 mg por 100 g de polpa, o que confirma que o fruto do açaizeiro é uma fonte que contém apreciável quantidade de material corante.

Apesar do fruto congelado ter grande parte do seu teor de antocianinas degradados, os resultados quanto ao solvente extrator adequado foram semelhantes ao observado quando se efetuou o mesmo procedimento com o fruto fresco.

A solução aquosa sulfitada com 4000 ppm de SO_2 e etanol 70 % com 1000 ppm de SO_2 foram os solventes que mostraram o melhor desempenho em relação ao teor de pigmento extraído. A solução tradicionalmente utilizada para este fim, que é etanol 70 % acidificada a pH 2 com HCl foi a segunda mais eficiente, juntamente com água com 1000 ppm de SO_2 .

Quanto ao tipo de ácido empregado, o HCl foi o mais eficiente, seguido do ácido cítrico e, por último, o ácido tartárico.

Recomenda-se que a extração seja efetuada com o fruto inteiro, uma vez que todo pigmento encontra-se localizado na superfície do fruto sob a forma de uma fina película. Não há necessidade de despolpar o fruto, o que além de expor o pigmento à ação de enzimas e outros fatores deteriorantes, incorpora mais lipídio, que se encontra logo abaixo da película de pigmento, ao extrato.

A extração da antocianina do açaí é fortemente influenciada pela temperatura. Sob refrigeração (8 ± 1 °C) se dá de forma bastante lenta. A temperatura ambiente (31 ± 1 °C) pode ser conduzida por 48 horas ao abrigo de luz para se obter rendimento satisfatório. Pode-se acelerar a extração pelo emprego de temperaturas mais elevadas. Das temperaturas testadas, 60 °C mostrou desempenho satisfatório no que diz respeito a rendimento com menor degradação do pigmento. A extração pode ser conduzida a 60 °C por

20 minutos e em seguida a temperatura ambiente por mais 24 horas para ser conseguido melhor rendimento.

**CAPÍTULO 2 – PURIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE
DIFERENTES EXTRATOS ANTOCIÂNICOS DE AÇAÍ
(*EUTERPE OLERACEA* M)**

1. INTRODUÇÃO

A purificação das antocianinas tem sido feita tradicionalmente por cromatografia. No entanto, é muito raro, partindo-se de um extrato bruto, conseguir uma separação eficiente das antocianinas individuais por meio de uma única técnica cromatográfica. Uma das razões deste fato é que tais extratos obtidos de plantas, normalmente, contêm vários flavonóides, leucoantocianinas, açúcares e outros, que interferem na separação (JACKMAN e SMITH, 1996). Em se tratando de produtos processados e ou estocados tem-se, ainda, produtos de degradação e, por vezes, compostos poliméricos formados ao longo de tempo.

Além disso, mesmo desconsiderando os compostos não antociânicos, cerca de 400 tipos de antocianinas já foram isoladas e identificadas de fontes naturais. Elas apresentam variação estrutural limitada, tendo comportamento cromatográfico semelhantes, o que dificulta a sua separação em uma única técnica (FROYTLOG et al., 1998).

Normalmente, quando se deseja isolar e identificar antocianinas de uma dada fonte, emprega-se várias técnicas em conjunto. O emprego de coluna aberta é, muitas vezes, o primeiro passo, mas pode-se também iniciar com cromatografia em papel. Usa-se, também, cromatografia de exclusão para separar as antocianinas livres das formas polimerizados comuns em extratos armazenados ou produtos processados, assim com fracionar as diferentes antocianinas de acordo com seu peso molecular. A pureza das antocianinas pode ser confirmada com o uso da CLAE quando se usa anteriormente CP ou CCD, ou vice-versa (STRACK e WRAY, 1989).

As dificuldades de purificação não constituem um grande problema nas análises qualitativas, visto que repetidas eluições, recromatografias e o emprego de diferentes técnicas em conjunto, conseguem remover as impurezas e separar cada fração satisfatoriamente. Em se tratando de análises quantitativas, recomenda-se que sejam empregados, no máximo, três passos, visto que cada manipulação pode introduzir erros (FRANCIS, 1982).

Em se tratando de características que um método de purificação deve possuir, é importante também levar em consideração o que é desejado em tal procedimento. Além disso, é interessante que ao mesmo tempo em que as

impurezas sejam removidas, seja produzido um extrato concentrado de forma a facilitar a subsequente separação.

Na prática, não existe um método de purificação ideal. Quase sempre é necessário usar pelo menos dois métodos distintos. Na realidade, quando se fala em purificação de antocianinas, é preciso ter em mente o objetivo desta purificação (eliminação de compostos interferentes apenas, ou fracionamento das antocianinas individuais) para então escolher o(s) método(s) mais adequado(s). Em se tratando de estudos analíticos, sejam qualitativos ou quantitativos, é possível usar desde a cromatografia em papel (CP) até a mais recente cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

A CP possui a vantagem de ser relativamente mais barata que as demais técnicas, permite bons níveis de separação em quantidades razoáveis, permite a identificação das frações separadas pelos respectivos R_f s e não requer infra-estrutura sofisticada. Como desvantagem, requer geralmente maior tempo de desenvolvimento, que tende a aumentar, visto que várias corridas com sistemas de solventes distintos são necessárias para se conseguir purificação mais apurada (FRANCIS, 1982).

A cromatografia em camada delgada (CCD) oferece as mesmas possibilidades que a CP, apresentando sobre esta a vantagem de oferecer maior poder de resolução associada ao menor tempo de desenvolvimento. No entanto, além de ser relativamente mais cara, não permite a obtenção de grandes quantidades de produto purificado.

A cromatografia em coluna é uma das técnicas preparativas mais empregadas atualmente. Na realidade, seu uso geralmente se restringe a eliminação de impurezas, não encontrando muito emprego no fracionamento das distintas antocianinas. Ela faz parte do processo de purificação como uma das primeiras etapas e é muito usada comercialmente para eliminar substâncias estranhas presentes no extrato do pigmento (FRANCIS, 1999).

A purificação de antocianinas para fins analíticos tem sido tradicionalmente conduzida por CP e CCD. No entanto, uma separação mais rápida e eficiente de misturas complexas pode ser conseguida pela cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa. Esta técnica é, normalmente, não destrutiva, permitindo a separação dos componentes da amostra e a sua imediata coleta para análises subsequentes. Com apropriada

seleção do eluente, tipo e tamanho da coluna e condições de desenvolvimento, a CLAE pode ser usada para resolver e quantificar microgramas de antocianinas sem precisar necessariamente de purificações preliminares da amostra. A maior desvantagem desta técnica, em relação as demais, é seu alto custo e operacionalização mais complexa fazendo-se necessário um treinamento do operador.

Uma limitação da CLAE, até pouco tempo, é que ela só era utilizada para fins analíticos, não sendo possível obter razoáveis quantidades de produto purificado. No entanto, conforme mencionado anteriormente, as vantagens oferecidas por esta técnica tem impulsionado o seu uso para fins preparativos. Os trabalhos desenvolvidos até então revelam que, na maioria dos casos, uma única corrida em cromatografia preparativa não é suficiente para proporcionar o isolamento de todas as antocianinas do extrato, principalmente para aquelas que ocorrem em menor proporção. Dependendo do objetivo, no entanto, a purificação fornecida por esta técnica já é suficiente, como é o caso do preparo dos extratos para emprego como corantes (FROYTLOG et al., 1998).

É costume utilizar uma técnica em conjunto com outra para confirmar a pureza dos produtos. A CLAE é muito usada para confirmar os resultados obtidos pela CP e vice-versa.

A escolha do método a ser utilizado depende do objetivo desejado e também da infra-estrutura disponível. No presente, caso em que se deseja avaliar a estabilidade de extratos obtidos por diferentes solventes e em diferentes estados de pureza, bem como as frações antociânicas do açaí, utilizou-se cromatografia de coluna com resina trocadora de cátion e cromatografia de papel.

Adicionalmente, foi escolhido o uso da cromatografia líquida de alta eficiência para caracterizar as substâncias presentes nos extratos bruto e purificado por CP e CC, o que pode permitir fazer algumas inferências sobre a estabilidade que eles possam apresentar devido à influência dessas substâncias. A CLAE, neste caso, parece ideal, pois permite uma boa resolução em curto período de tempo e uma visão geral dos flavonóides antociânicos e não antociânicos presentes.

A composição do corante de antocianina reflete a composição da matéria-prima. Atualmente, são conhecidas cerca de 275 tipos de antocianinas.

Além disso, plantas com antocianinas contêm também, invariavelmente, flavonóides não antociânicos que exercem papel importante na estabilização das antocianinas. A distribuição dos flavonóides é mais ampla que das antocianinas. Embora o número de flavonóides seja grande (cerca de 5000), o perfil de pigmento da planta é geralmente característica de cada família (FRANCIS, 1999).

A estrutura química da antocianina é um fator determinante da sua estabilidade. Além disso, o perfil geral do extrato obtido ao se extrair o pigmento de uma da fonte também é extremamente importante no que diz respeito à estabilidade do corante final, uma vez que várias substâncias nativas podem agir como estabilizantes naturais ou agentes aceleradores de degradação.

Conforme mencionado, o perfil de pigmento da planta é característico de cada família. No entanto, quando se efetua a extração do pigmento, a depender do método utilizado, os perfis de compostos obtidos juntamente com as antocianinas podem ser bastantes distintos e isso terá influência marcante sobre a estabilidade final do corante.

Outro objetivo desse trabalho, além da purificação do extrato antociânico do açaí (*Euterpe oleracea* M), foi avaliar a estabilidade de extratos obtidos com sistemas solventes diferentes, bem como dos extratos em diferentes graus de pureza.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Pigmentos Naturais e Secagem da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG e no Centro de Pesquisa Agroindustrial da Amazônia Oriental (CPATU) - EMBRAPA, situado em Belém-PA.

2.1. Material

A matéria-prima empregada como fonte de antocianina foi o fruto do açaizeiro fresco adquirido no mercado de Belém, Pará. Os frutos foram colhidos no período de safra no mês de setembro de 2001.

2.2. Métodos

2.2.1. Preparação dos extratos de antocianinas

Um quilograma e meio de açaí fresco foi macerado em 2,4 L de etanol 70% acidificado com HCl a pH 2, durante 48 horas à temperatura ambiente (31 ± 1 °C) ao abrigo de luz. Após este tempo o extrato foi filtrado em papel Whatman 1, por meio de um funil de Büchner. O extrato assim obtido foi imediatamente concentrado, sob pressão reduzida, à temperatura de 39 ± 1 °C até se obter um volume final correspondente a 20 % do volume original. Esse procedimento foi repetido sistematicamente até que se conseguisse um volume final de extrato bruto concentrado de 2 L.

Parte do extrato foi imediatamente armazenado ao abrigo de luz à temperatura de -18 °C para posterior uso nas etapas seguintes do trabalho. Outra parte, antes de ser armazenada nas mesmas condições, foi submetida à extração líquido-líquido do material lipídico, arrastado durante o processo de extração do pigmento. Para tal, utilizou-se funil de separação e éter etílico: éter de petróleo (1:1) para lavagem do extrato.

Paralelamente, foi efetuada a extração das antocianinas do açaí fresco utilizando-se, como solvente, etanol 70 % com 1000 ppm de SO₂ e água com 4000 ppm de SO₂. O procedimento foi semelhante ao descrito acima. Antes da concentração, no entanto, os extratos foram acidificados com HCl, a pH 2, para promover a dessulfitação.

2.2.2. Purificação do extrato

A purificação foi efetuada com o extrato obtido com a solução etanólica 70 % acidificada a pH 2 com HCl. Para tal, foram utilizadas duas técnicas: cromatografia em coluna e cromatografia em papel.

2.2.2.1. Cromatografia em papel

O extrato mencionado no item 2.2.2. foi purificado por cromatografia descendente, em papel Whatman 3, e os cromatogramas desenvolvidos com

HCl 1 %, por um período aproximado de 10 horas. Após a secagem do papel, ao abrigo de luz, a região central com a coloração mais intensa, foi cortada e eluída em metanol e, após concentrada em evaporador rotatório a 38 ± 1 °C, sendo novamente cromatografada em papel Whatman 1. Os cromatogramas foram desenvolvidos em BFW (n-butanol: ácido fórmico: água, 15:2,5:2,4), por 96 horas. As zonas principais obtidas foram eluídas separadamente em metanol e concentradas sob pressão reduzida, a 38 ± 1 °C. A pureza das frações obtidas foi determinada por CLAE.

2.2.2.2. Cromatografia em coluna

Foi utilizada coluna (1,5 × 10 cm) com resina trocadora de cátion amberlite CG-50, mantida sob hidratação por 24 h, sendo em seguida, lavada várias vezes, antes do empacotamento. Foram adicionados, à coluna, 4 mL de extrato antociânico (extrato etanólico 70 % (v/v) acidificado a pH 2 com HCl e lavado com éter). Após o espalhamento do extrato pela coluna, foi adicionada água ultrapura para lavagem. Após recolher-se 50 mL de água, adicionou-se metanol: 0,25 % (v/v) HCl concentrado. O pigmento eluído foi recolhido e armazenado a -18 °C até sua utilização.

2.2.3. Fluxograma dos processos de extração e purificação dos extratos

A Figura 1 mostra o fluxograma de procedimento de extração e purificação da antocianina do açaí.

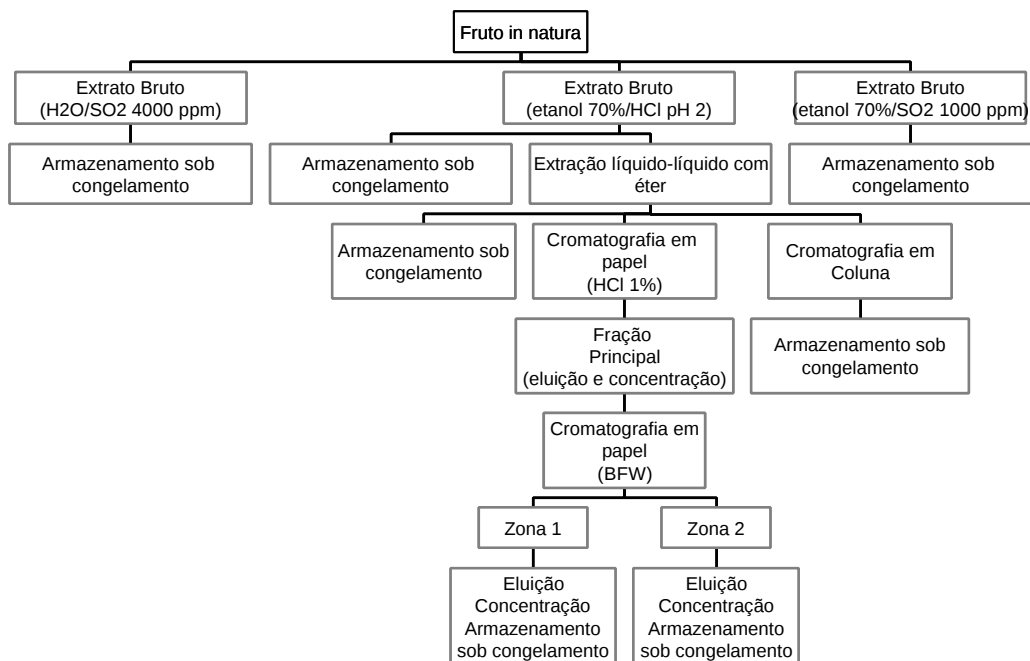


Figura 1 – Fluxograma de procedimento de extração e purificação da antocianina do açaí.

2.2.4. Caracterização espectrofotométrica e colorimétrica

Cada extrato obtido no item 2.2.1. foi submetido à caracterização espectrofotométrica e colorimétrica. Quantidade de cada extrato foi diluída em solução etanol: HCl 1,5 N (85:15) de forma a se obter leitura em torno de 1 no comprimento de onda máximo de absorbância. Foi efetuada a determinação da cor, em um colorímetro (Colorquest XE do sistema Hunter), com leitura direta por absorbância das coordenadas “a”, “b” e “L” e o espectro de absorção na região de 700 a 400 nm em espectrofotômetro Hitachi U – 2001.

2.2.5. Separação das antocianinas por cromatografia líquida de alta eficiência

A partir do extrato bruto obtido no item 2.2.1. foram testadas várias metodologias buscando atingir a separação por CLAE com boa resolução cromatográfica. Foram avaliados o regime isocrático com diferentes sistemas de fase móvel para definição daquele a se utilizar no decorrer deste trabalho.

A condição selecionada foi eluição por gradiente de fase móvel formada pelos sistemas solventes: A) água com 0,5 % (v/v) de ácido fosfórico

e B) metanol, em eluição linear de A/B (95/5) até (40/60), 1 % (v/v)/min. Foi utilizado cromatógrafo Shimadzu modelo LC-10 AD, com duas bombas e sistema de injeção manual, de 50 µL de amostra e coluna de fase reversa Lichospher 100 RP-18 (25 cm × 4,0 mm).

Os extratos obtidos no item 2.2.1. e as frações purificadas a partir do extrato etanólico 70 % acidificado a pH 2 com HCl foram concentradas em evaporador rotatório, à temperatura de 38 ± 1 °C, ao abrigo de luz, e, então redissolvidas em solução aquosa a 0,5 % (v/v) de ácido fosfórico, filtradas em membrana Millipore Nylon (S & S Filters), com diâmetro de poro de 0,2 µm, sendo imediatamente injetadas no sistema CLAE.

2.2.6. Avaliação da estabilidade

A estabilidade foi avaliada em duas etapas. Na primeira foi estudada a estabilidade de extratos brutos oriundos de sistemas solventes distintos: etanol 70 % acidificado a pH 2 com HCl, H₂O com 4000 ppm de SO₂ e etanol 70 % com 1000 ppm de SO₂.

Na segunda etapa, avaliou-se a estabilidade do extrato obtido com etanol 70% (v/v) acidificado a pH 2 com HCl, em diversas etapas de purificação, desde o extrato bruto até as frações puras isoladas.

Nos dois casos o procedimento foi o mesmo. Frações do pigmento foram diluídas em tampão citrato/fosfato a pH 2 e 3,5. Em cada pH foram diluídas quantidades de corante suficientes para a obtenção de absorbância inicial entre 0,800 e 1,000 no comprimento de máxima absorção ($\lambda = 530$).

As soluções de antocianinas a pH 2,0 e 3,5 foram acondicionadas em frascos de vidros hermeticamente fechados. Uma parte das amostras foi colocada em um suporte, em fila dupla, posicionados entre duas lâmpadas fluorescentes de 40 W, 2.500 lux, correspondente à luz do dia, guardando distância de 10 cm entre si, em ambiente com temperatura controlada de 25 ± 1 °C. A parte restante dos frascos permaneceu na mesma temperatura em ausência de luz. Periodicamente, de acordo com a velocidade de degradação do pigmento, foi determinado o espectro de absorção (350 a 650 nm) e a absorbância no λ máximo (530 nm) utilizando espectrofotômetro UV-Visível

Hitachi U-2001 e efetuada a caracterização colorimétrica por meio de colorímetro Color Queste XE do sistema Hunter, até que se obtivesse leitura correspondente a aproximadamente 50 % do valor inicial.

O delineamento experimental foi do tipo inteiramente casualizado em parcelas subdivididas. Na avaliação da estabilidade de cada extrato e do pigmento purificado de *Euterpes oleracea* M., as medidas de absorbância dos sistemas de soluções tamponadas foram usadas para construir gráficos do logaritmo neperiano da razão absorbância/absorbância inicial ($\ln A/A_0$) versus o tempo, obtendo-se através da inclinação da reta o valor de k . A partir dos valores obtidos de k , foram calculados os valores do tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) por meio da relação $t_{1/2} = -\ln 0,5/k$, sendo usado como parâmetros para estimar a estabilidade ante a ação da luz (PERIN, 1998).

Nos experimentos realizados sob o efeito da luz, foram utilizadas diferentes relações para avaliar a estabilidade. Por meio das relações $t_{1/2}$ luz/ $t_{1/2}$ escuro ($t_{1/2L}/t_{1/2E}$), foram determinados o efeito da luz, o efeito de pH por meio do quociente entre $t_{1/2}(\text{pH } 2,0)/t_{1/2}(\text{pH } 3,5)$ e a influência da purificação mediante relação $t_{1/2}(\text{extrato pH } 2,0)/t_{1/2}(\text{pigmento purificado, pH } 2,0)$. Além de dos parâmetros colorimétricos “L”, “a”, “b” e “c”.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Preparo do extrato

O açaí é um fruto de cor negra e o extrato obtido com etanol 70 % (v/v) acidificado a pH 2 com HCl apresentava cor vermelho escuro. Quando extraído com SO_2 , seja com água ou etanol, apresentava cor parda que após a dessulfitação tornava-se vermelho escuro. A Figura 2 mostra uma série de fotos com as várias etapas da obtenção do extrato antociânico de açaí com etanol acidificado com HCl a pH 2.

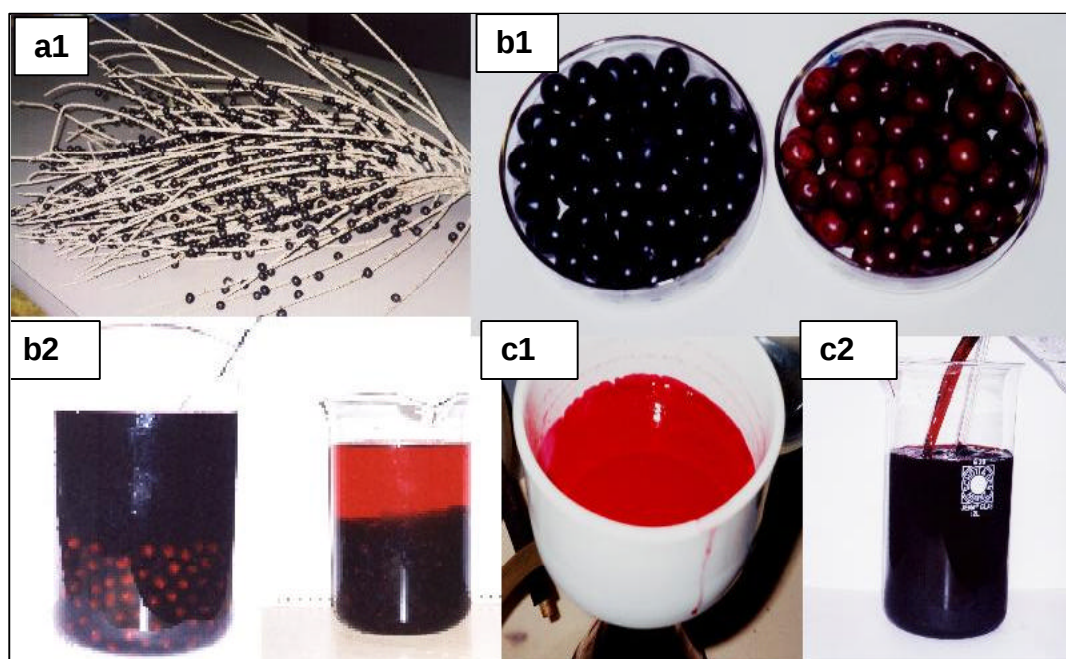


Figura 2 – (a) Cacho de açaí recém colhido; (b1) açaí fresco antes da extração; (b2) açaí após extração; (c1) extrato e fruto após 48 h extração; (c2) extrato e fruto após 5 minutos de extração; (d) cor característica do extrato sendo filtrado e (e) extrato após filtração.

3.2. Avaliação dos extratos brutos obtidos por sistemas solventes distintos

3.2.1. Caracterização espectrofotométrica e colorimétrica

Os espectros de absorção UV-Vis e as coordenadas colorimétricas dos extratos brutos obtidos no item 2.2.1. são mostrados na Figura 3 e Quadro 1, respectivamente.

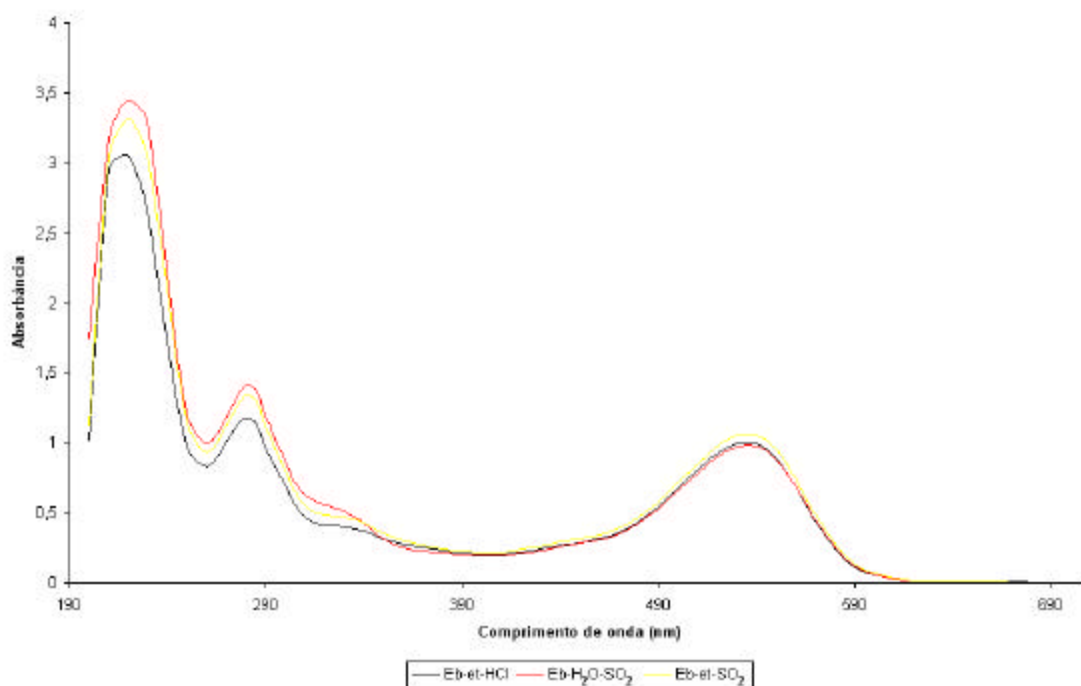


Figura 3 – Espectros de absorção dos extratos obtidos por sistemas extratores distintos.

Quadro 1 – Coordenadas colorimétricas dos extratos brutos obtidos por sistemas extratores distintos.

Amostra	L	a	b	c	h
Eb-et-HCl	64,79	56,14	-8,93	56,85	-0,158
Eb-et-SO ₂	64,53	56,58	-8,78	57,26	-0,154
Eb-H ₂ O-SO ₂	63,94	57,21	-9,01	57,91	-0,156

Observa-se no Quadro 1, que a cor dos extratos são similares, uma vez que suas coordenadas colorimétricas apresentaram valores semelhantes. De fato o espectro de absorção na região do visível, que determina a cor da substância, é semelhante para os três extratos em avaliação (Figura 3).

É interessante observar que na região UV há ligeira diferença entre os extratos quanto à intensidade de absorção no comprimento de máxima absorção (280 nm). O extrato do sistema água/SO₂ apresentou maior intensidade de absorção seguido do obtido com etanol/SO₂ e etanol/HCl. A absorção nesta região deve-se à presença de antocianinas e flavonóides não antociânicos em geral. Desta forma, pode-se sugerir que o extrato com maior intensidade apresentará maior quantidade de flavonóides não antociânicos

associados às antocianinas. Tal fato pode influenciar de forma positiva ou não na estabilidade dos pigmentos.

3.2.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Por meio da Figura 4 observa-se que a 280 nm os perfis cromatográficos das amostras são bastante semelhantes, enquanto que a 520 nm, apesar do número de picos serem semelhantes para as três amostras há diferenças quanto ao perfil em geral. Existem dois picos principais e na amostra Eb-et-HCl, o pico 1 é ligeiramente superior ao pico 2, indicando que proporcionalmente o pigmento 1 representa uma maior fração do extrato. Já para as amostras Eb-et-SO₂ e Eb-H₂O-SO₂ o pico 2 é sensivelmente maior que o 1. Dessa forma, verifica-se que o SO₂ influencia no perfil antociânico do extrato obtido, extraíndo seletivamente mais um tipo de antocianina que outro.

O perfil antociânico, bem como o perfil de componentes não antociânicos extraídos junto com os pigmentos têm influência importante na estabilidade do extrato corante final.

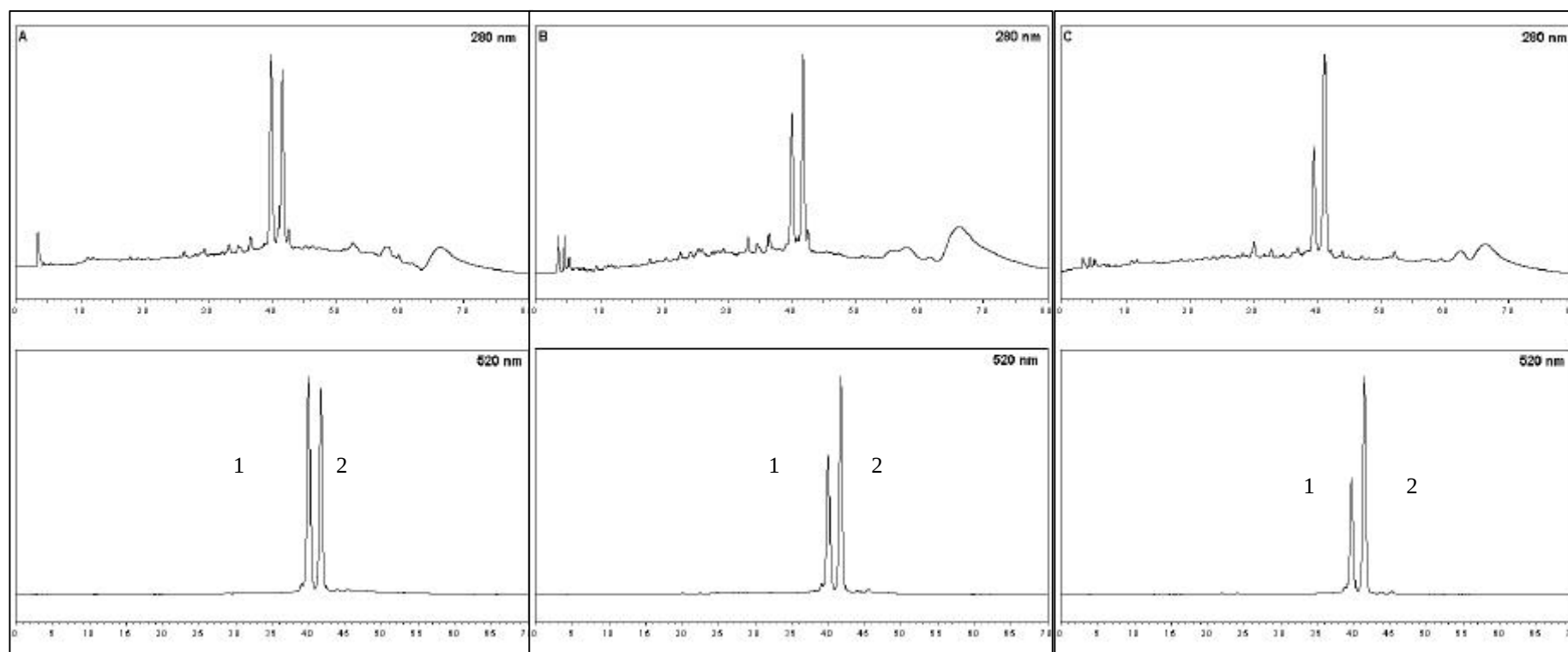


Figura 4 – Perfil cromatográfico das antocianinas do açai extraídas com sistemas de solventes distintos. A: etanol 70 % acidificado com HCl a pH 2; B: etanol 70 % contendo 1000 ppm de SO_2 e C: água contendo 4000 ppm de SO_2 .

3.2.3. Estabilidade

As Figuras 5 e 6 mostram a representação gráfica do comportamento dos extratos armazenados ao longo do tempo, em ausência de luz, à temperatura ambiente (25 ± 1 °C). Através dos coeficientes angulares das curvas foi determinada a velocidade de degradação (k) de cada extrato e seus respectivos tempos de meia vida ($t_{1/2}$), que são mostrados no Quadro 2.

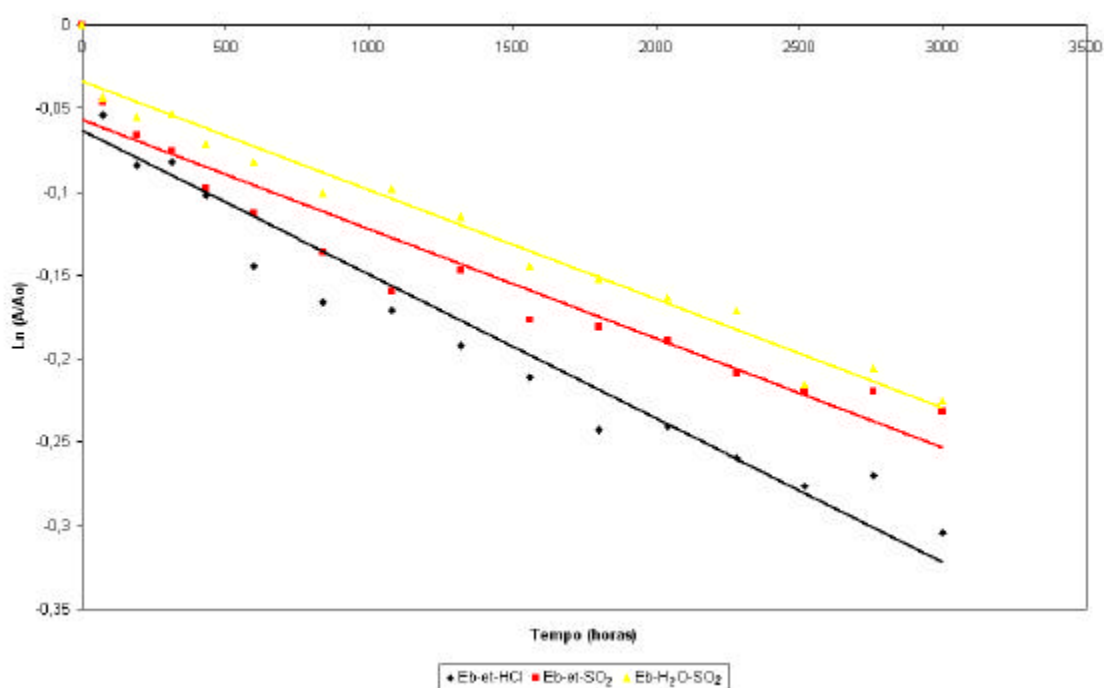


Figura 5 – Curvas de degradação dos extratos antociânicos ao longo do tempo, em ausência de luz, em pH 2, à temperatura ambiente (25 ± 1 °C).

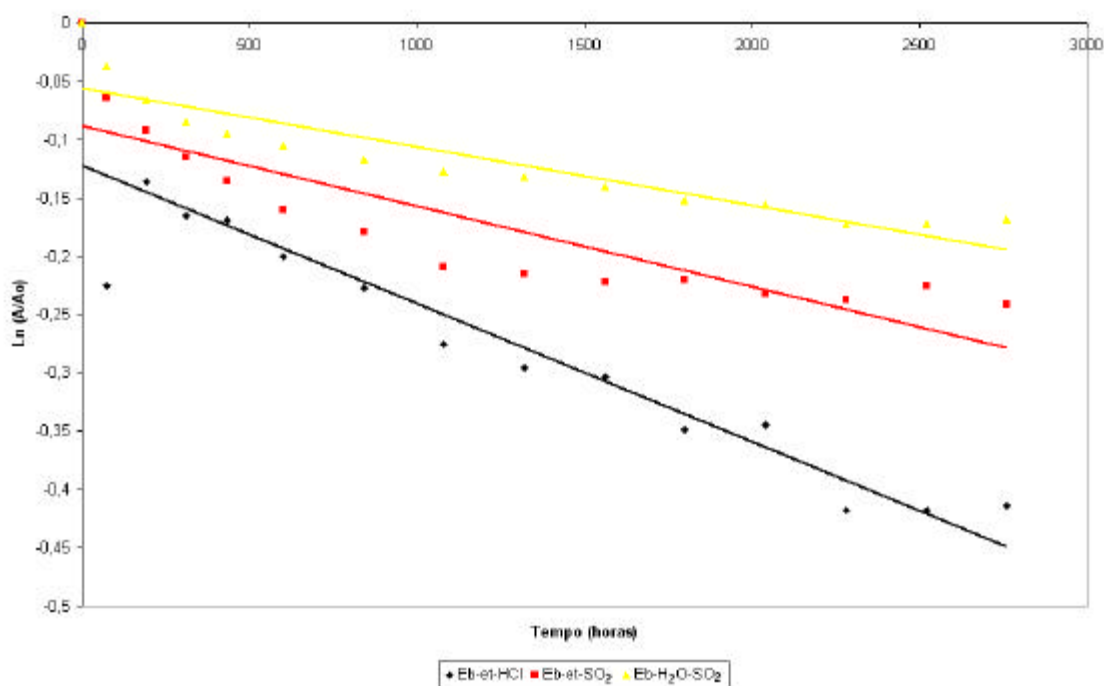


Figura 6 – Curvas de degradação dos extratos antociânicos ao longo do tempo, em ausência de luz, em pH 3,5, à temperatura ambiente (25 ± 1 °C).

Quadro 2 – Valores das constantes de degradação k (h^{-1}) e do tempo de meia vida $t_{1/2}$ (h) para os extratos obtidos com diferentes solventes, armazenados em ausência de luz, à temperatura ambiente (25 ± 1 °C).

Extratos	pH 2		pH 3,5	
	k (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)	k (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)
Eb-et-HCl	$8,623 \times 10^{-5}$	8038,353	$1,184 \times 10^{-4}$	5854,284
Eb-et-SO ₂	$6,575 \times 10^{-5}$	10542,160	$6,904 \times 10^{-5}$	10039,790
Eb-H ₂ O-SO ₂	$6,525 \times 10^{-5}$	10622,950	$5,008 \times 10^{-5}$	13840,800

Avaliando-se a estabilidade das antocianinas extraídas do açaí com os distintos sistemas solventes podemos observar que as amostras extraídas com SO₂ apresentaram tempo de meia vida superior ao obtido com HCl, em ambos pH.

As antocianinas são deficientes em elétrons, por isso são muito reativas, e podem sofrer reações durante o processamento e ou armazenamento (OTT, 1992). A cor e a estrutura das antocianinas variam com o pH, entretanto, o pH não influencia só na cor das antocianinas, mas também afeta a sua estabilidade (MAZZA e MIATI, 1993). Em pH abaixo de 3 há

predominância da estrutura protonada, que é responsável pela coloração vermelha é mais estável. À medida que o pH aumenta, há o deslocamento do equilíbrio para a forma de base quinoidal, que é menos estável.

Avaliando-se o pH, é possível observar que o extrato obtido com etanol 70 % acidificado com HCl a pH 2 apresentou tempo de meia vida menor em pH 3,5.

No entanto, não se verificou o mesmo resultado para a amostra obtida com etanol 70 % com 1000 ppm de SO₂, que apresentou praticamente o mesmo tempo de meia vida nos dois pH. Este fato pode ter ocorrido, possivelmente pela presença de agentes estabilizantes que ajudaram a manter a antocianina praticamente sem sofrer degradação ao longo do tempo nos dois pH testados.

A amostra obtida com água sulfitada (1000 ppm), por sua vez, mostrou maior estabilidade em pH 3,5, embora a diferença também não seja significativa. Tais resultados devem-se, possivelmente, aos mesmos motivos já mencionados, ou seja, a condição de armazenamento isenta de fatores promotores de degradação, o que pode ter neutralizado a influência do pH na estabilidade do pigmento. Além disso, no caso específico do uso de sulfito, o complexo formado com a antocianina é mais estável em pH mais elevado. Apesar do corante ter sido dessulfitado, pequenas frações de sulfito permanecem, o que pode ter ajudado na estabilização do pigmento em pH mais elevado.

Uma vez que, para o estudo da cinética de degradação das antocianinas, foram utilizadas as medidas de absorbância no comprimento de onda de máxima absorção do espectro visível (tomando-se o comprimento de onda de 514 nm para a avaliação), durante o período de estocagem sob efeito de luz, sem levar em consideração o espectro visível de absorção como um todo, foram estudados alguns parâmetros colorimétricos que podem mostrar de forma mais exata a degradação dos pigmentos, por levarem em consideração todo o espectro visível. Segundo FRANCIS (1982) a avaliação colorimétrica através dos valores triestímulus apresentam uma correlação muito melhor com as respostas visuais humanas.

As Figuras 7, 8, 9 e 10 apresentam os gráficos do comportamento da coordenada "c*" e "h*" obtidos a partir das coordenadas "a*" e "b*" (escala

Cielab), para os pH 2 e 3,5, respectivamente, para os extratos armazenados em ausência de luz. Cada leitura corresponde aos tempos mostrados nas Figuras 5 e 6.

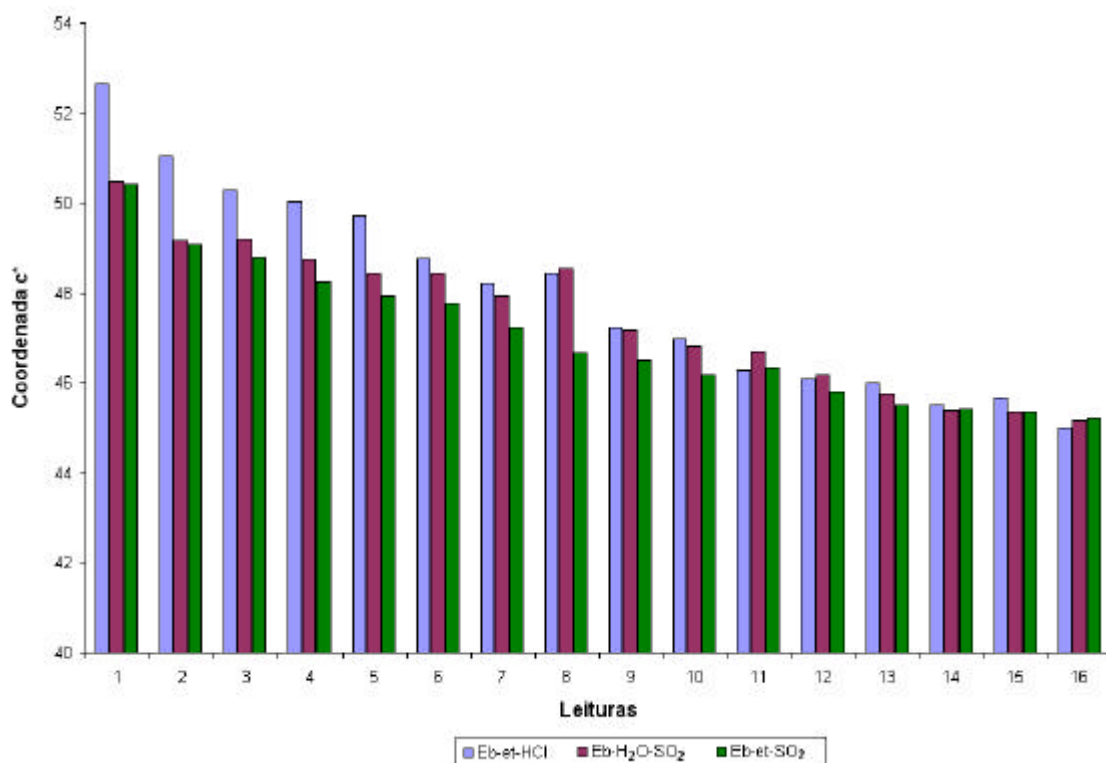


Figura 7 – Comportamento de “c*” (cromaticidade) dos extratos antociânicos ao longo do tempo, em ausência de luz, em pH 2, à temperatura ambiente (25 ± 1 °C).

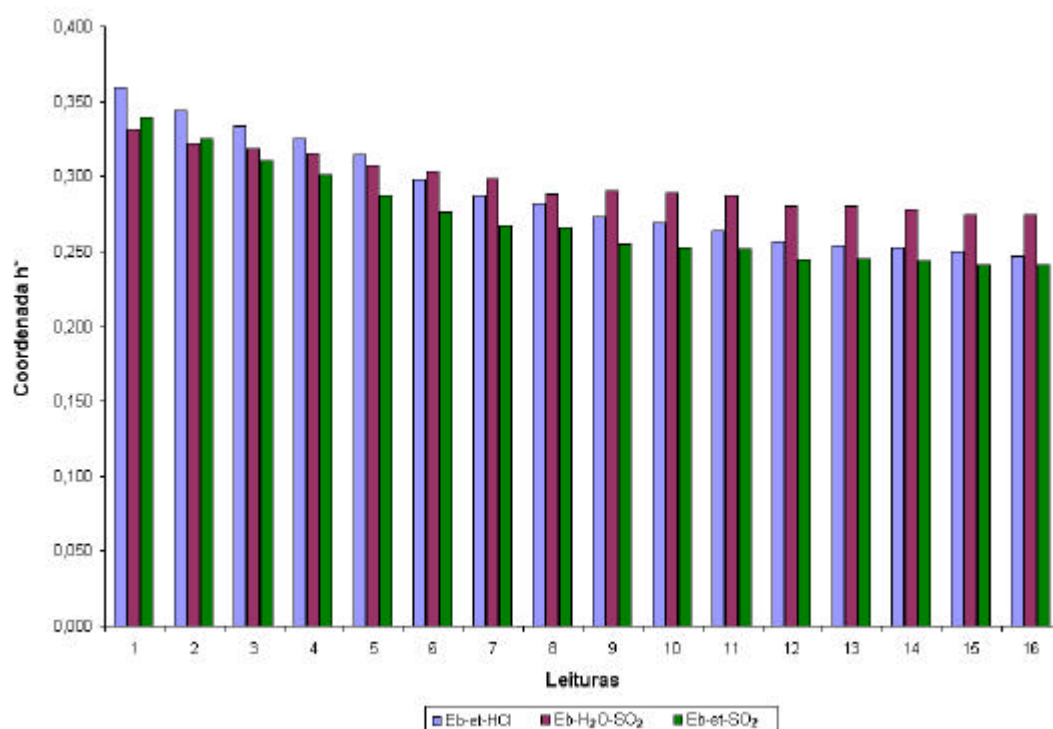


Figura 8 – Comportamento de “h*” (tonalidade) dos extratos antociânicos ao longo do tempo, em ausência de luz, em pH 2, à temperatura ambiente (25 ± 1 °C).

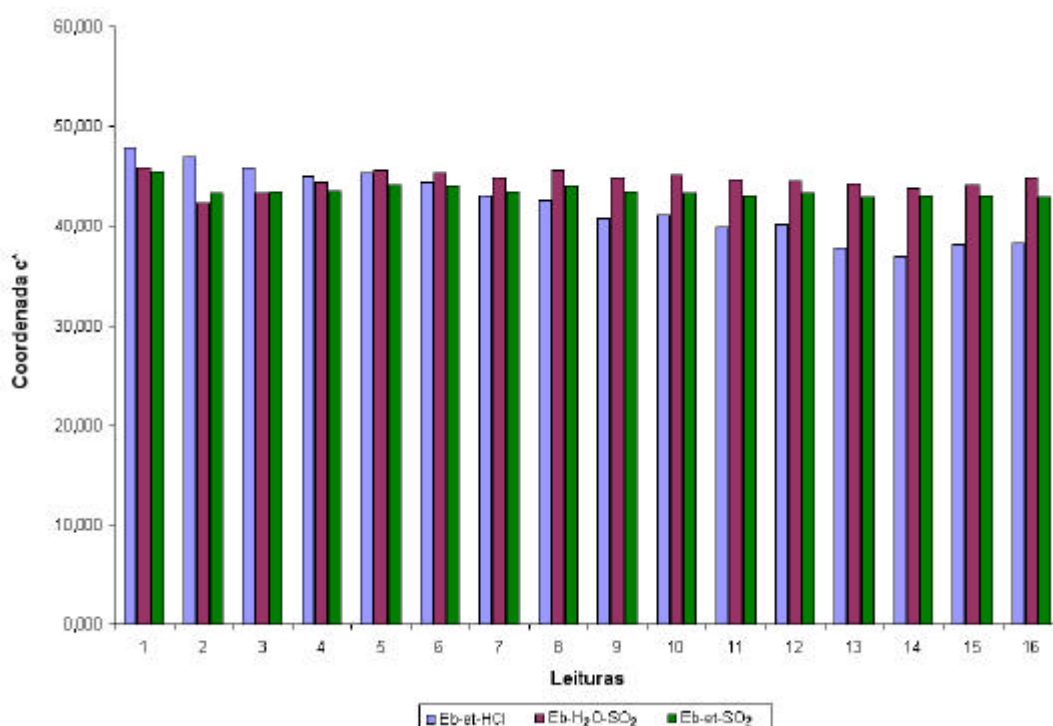


Figura 9 – Comportamento de “c*” (cromaticidade) dos extratos antociânicos ao longo do tempo, em ausência de luz, em pH 3,5, à temperatura ambiente (25 ± 1 °C).

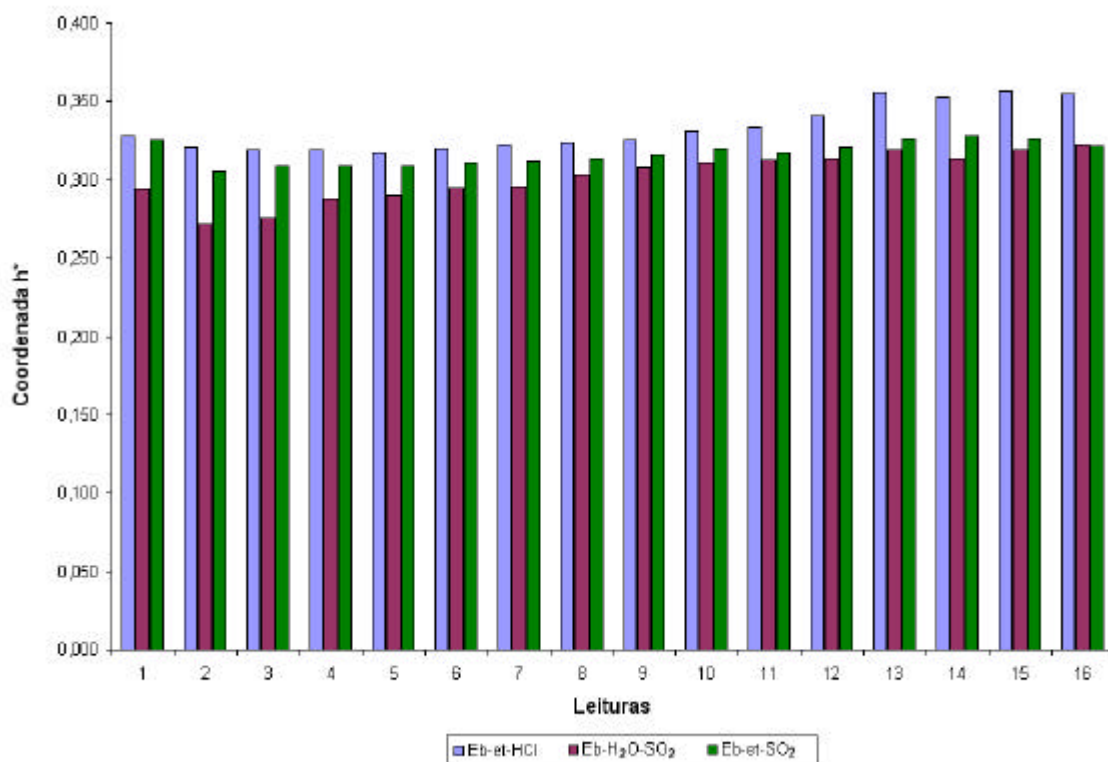


Figura 10 – Comportamento de “h*” (tonalidade) dos extratos antociânicos ao longo do tempo, em ausência de luz, em pH 3,5, à temperatura ambiente (25 ± 1 °C).

A tendência de degradação observada pela avaliação da velocidade de degradação (k) e do tempo de meia vida ($t_{1/2}$) no Quadro 2 repete-se com os parâmetros colorimétricos estudados.

Todas as amostras mostraram uma variação pequena das coordenadas colorimétricas ao longo do tempo, para ambos os pH. Avaliando-se a coordenada “c*” verifica-se que, tanto em pH 2 como em pH 3,5, a amostra Eb-et-HCl apresentou maior variação e sua cor tornou-se ao longo do tempo menos saturada. O mesmo aconteceu com a coordenada “h”.

Em pH 2 a amostra Eb-et-SO₂ foi a que apresentou menor variação da coordenada “c*”. Quanto à tonalidade (“h”) a amostra Eb-H₂O-SO₂ foi a que apresentou a menor variação. Em pH 3,5 a amostra Eb-H₂O-SO₂ apresentou a menor variação das coordenadas c* e h*.

Comparação entre amostras ou amostra e padrão pode ser definida como diferenças de cor expressas em termos de ΔL^* , Δa^* , Δb^* , e ΔE^* . ΔE^* é dado pela Equação 1 e é muito útil para expressar a mudança da coloração

devido ao “enfraquecimento” provocado pelo tempo, a ação da atmosfera e fatores destrutivos (HUNTER, 19--).

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (1)$$

O Quadro 3 mostra alguns parâmetros calculados a partir das coordenadas colorimétricas que expressam melhor as variações sofridas por amostras quanto à sua cor.

Quadro 3 – Parâmetros colorimétricos de degradação para os extratos obtidos com diferentes solventes, armazenados em ausência de luz, à temperatura ambiente (25 ± 1 °C).

Parâmetros Colorimétricos	Eb-et-HCl		Eb-et-SO ₂		Eb-H ₂ O-SO ₂	
	pH 2	pH 3,5	pH 2	pH 3,5	pH 2	pH 3,5
Δa^*	-5,66	-9,47	-3,62	-2,41	-4,24	-1,26
Δb^*	-7,54	-2,11	5,98	-0,99	-4,19	0,94
ΔL^*	0,01	3,84	-1,15	0,18	0,39	-1,10
ΔE^*	9,43	10,47	7,08	2,61	5,98	1,91

Todas as amostras nos dois valores de pH, apresentaram Δa^* negativo, que significa a perda da cor vermelha. As amostras Eb-et-HCl e Eb-et-SO₂, em pH 3,5, apresentaram Δb^* negativo, que significa ganho da cor azul, enquanto a amostra Eb-H₂O-SO₂ apresentou ligeira perda dessa cor (Δb^* positivo). Com exceção da Eb-et-SO₂ e Eb-H₂O-SO₂ em pH 3,5 todas as amostras apresentaram ΔL^* positivo, ou seja, tornaram-se mais luminosas.

Quanto a mudança geral de cor sofrida pelas amostras é interessante observar ΔE^* . A amostra Eb-et-HCl apresentou maior variação em ambos os pH. Os resultados estão de acordo com o do Quadro 2 em que essa amostra teve o menor tempo de meia vida. A amostra Eb-H₂O-SO₂ em pH 2 e 3,5 foi a que apresentou maior tempo de meia vida e sofreu menor variação geral de cor.

Diversos autores estudaram o efeito da luz e do pH sobre as antocianinas, sendo sempre observada uma relação entre esses efeitos e a decomposição dos pigmentos antociânicos (MESCHTER, 1953; FRANCIS, 1989; MARKAKIS, 1982; MAZZA e BROUILLARD, 1987; STRINGHETA, 1991).

As Figura 11 e 12 mostram a representação gráfica do comportamento dos extratos armazenados ao longo do tempo, em presença de luz, à temperatura ambiente (25 ± 1 °C).

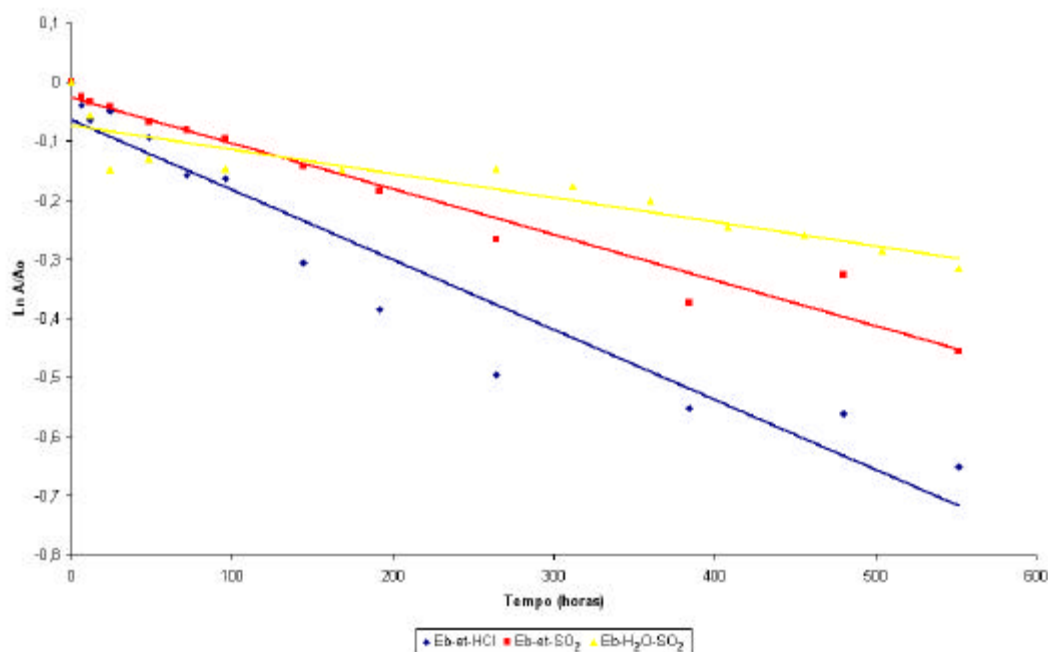


Figura 11 – Curvas de degradação dos extratos antociânicos ao longo do tempo, em presença de luz, em pH 2, à temperatura ambiente (25 ± 1 °C).

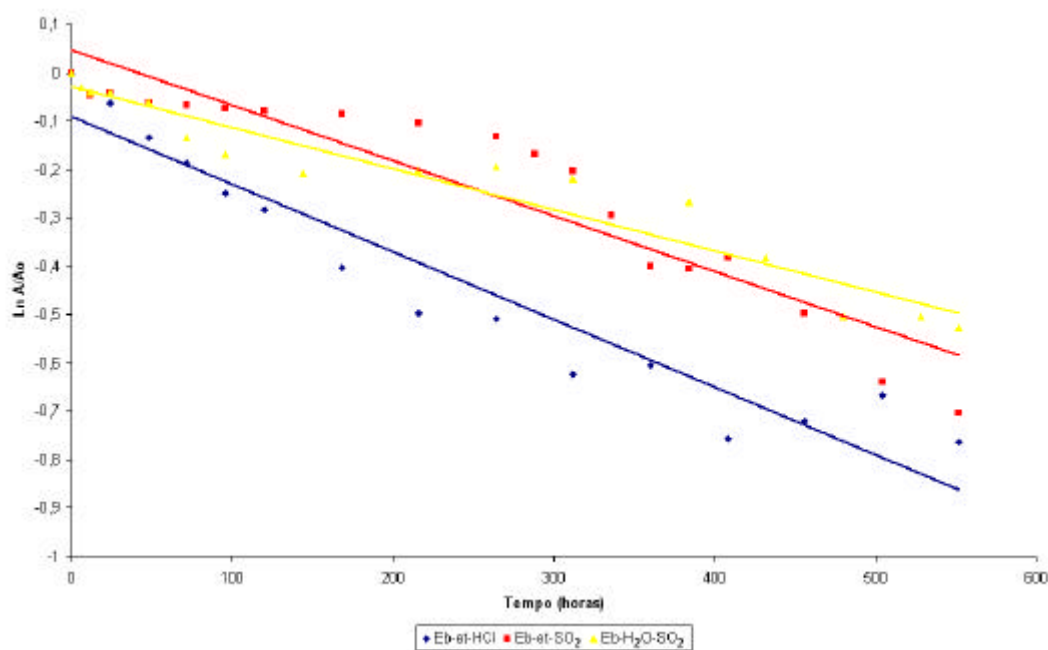


Figura 12 – Curvas de degradação dos extratos antociânicos ao longo do tempo, em presença de luz, em pH 3,5, à temperatura ambiente (25 ± 1 °C).

Através dos coeficientes angulares das curvas foi determinada a velocidade de degradação de cada extrato e seus respectivos tempos de meia vida. O Quadro 4 apresenta esses dados e também a relação entre esses valores para os extratos armazenados em presença e ausência de luz e entre os extratos nos pH 2 e 3,5.

Quadro 4 – Valores das constantes de degradação k (h^{-1}) e do tempo de meia vida $t_{1/2}$ (h) para os extratos obtidos com diferentes solventes armazenados em presença e ausência de luz, à temperatura ambiente (25 ± 1 °C), em pH 2,0 e pH 3,0.

Eb-et-HCl			Eb-et-SO ₂		Eb-H ₂ O-SO ₂	
pH 2,0						
Luz	t _{1/2} (L)	K(L)	t _{1/2} (L)	K(L)	t _{1/2} (L)	K(L)
	585,428	1,184×10 ⁻³	895,076	7,744×10 ⁻⁴	1704,740	4,070×10 ⁻⁴
Escuro	t _{1/2} (E)	K(E)	t _{1/2} (E)	K(E)	t _{1/2} (E)	K(E)
	8038,353	8,623×10 ⁻⁵	10542,160	6,575×10 ⁻⁵	10622,950	6,525×10 ⁻⁵
Luz /	t _{1/2} (L)/ t _{1/2} (E)	K(L)/ K(E)	t _{1/2} (L)/ t _{1/2} (E)	K(L)/ K(E)	t _{1/2} (L)/ t _{1/2} (E)	K(L)/ K(E)
Escuro	0,0728	13,7301	0,0849	11,7779	0,1605	6,2375
pH 3,5						
Luz	t _{1/2} (L)	K(L)	t _{1/2} (L)	K(L)	t _{1/2} (L)	K(L)
	496,168	1,397×10 ⁻³	607,491	1,141×10 ⁻³	814,413	8,511×10 ⁻⁴
Escuro	t _{1/2} (E)	k(E)	t _{1/2} (E)	K(E)	t _{1/2} (E)	k (E)
	5854,284	1,184×10 ⁻⁴	10039,790	6,904×10 ⁻⁵	13840,800	5,008×10 ⁻⁵
Luz /	T _{1/2} (L)/t _{1/2} (E)	K(L)/ K(E)	t _{1/2} (L)/ t _{1/2} (E)	K(L)/ K(E)	t _{1/2} (L)/ t _{1/2} (E)	K(L)/ K(E)
Escuro	0,0847	11,7990	0,0605	16,5266	0,0588	16,9948
pH 3,5/pH 2,0						
Luz	t _{1/2} (3,5)/ 1/2(2)	k(pH3,5)/ (pH2)	t _{1/2} (3,5)/t _{1/2} (2)	k(pH3,5)/ (pH2)	t _{1/2} (3,5)/ 1/2(2)	k(pH3,5)/k(pH2)
	0,8475	1,1790	0,6787	1,4734	0,4777	2,0911
Escuro	t _{1/2} (3,5)/ t _{1/2} (2)	k(pH3,5)/ (pH2)	t _{1/2} (3,5)/ 1/2(2)	k(pH3,5)/ (pH2)	t _{1/2} (3,5)/ 1/2(2)	k(pH3,5)/ (pH2)
	0,7283	1,3731	0,9523	1,0500	1,3029	0,7675

Os valores encontrados para $t_{1/2}$ mostram claramente a influência marcante da luz na constante de velocidade da reação, quando comparados àqueles colocadas ao abrigo da luz. Os valores de $t_{1/2}$ para as antocianinas do

extrato sob efeito de luz ($t_{1/2L}$) são muito menores que os valores apresentados pelos pigmentos ao abrigo de luz ($t_{1/2E}$). Os dados dos quocientes $t_{1/2L}/t_{1/2E}$, sempre menores que 1 para todos os sistemas, evidenciam o forte efeito da luz sobre a velocidade de reação. Esses resultados comprovam a elevada sensibilidade das antocianinas, quando submetidas à luz, o que leva tais pigmentos a uma intensa degradação fotoquímica.

Os valores obtidos pela relação entre $t_{1/2}$ na presença de luz em pH 2,0 e $t_{1/2}$ em pH 3,5 ($t_{1/2LpH3,5}/t_{1/2LpH2,0}$) foram inferiores a 1, indicando que a estabilidade dos extratos é maior em pH 2,0 que em pH 3,5. Tais resultados estão de acordo com os dados da literatura em que a estabilidade decresce acentuadamente com o aumento do pH (STRINGHETA, 1991; PERIN, 1998). No escuro, para o extrato Eb-H₂O-SO₂, o resultado foi, no entanto, ligeiramente superior a 1, não sendo observado portanto o efeito deletério do aumento do pH sobre as antocianinas presentes. Conforme já mencionado, tal comportamento deve-se à condição de armazenamento, em ausência de agentes aceleradores de degradação, e à possível complexação do SO₂ com o pigmento.

Em todas as condições de armazenamento, a amostra Eb-H₂O-SO₂ apresentou maior tempo de meia vida seguida das amostras Eb-et-SO₂ e Eb-et-HCl. Tal resultado evidencia que a forma de obtenção do extrato pode influenciar na estabilidade final do pigmento.

BOBBIO et al. (1999) estudaram a estabilidade das antocianinas da polpa do açaí concluindo que o extrato bruto apresentou boa estabilidade em presença de luz a pH 2 com $k = 2,3 \times 10^{-3}$ e $t_{(1/2)} = 301,3$ horas, e a pH 3,0 com $k = 3,5 \times 10^{-3}$ e $t_{(1/2)} = 198$ horas. Em ambos os casos, em ausência de luz, após 350 horas não se observou praticamente perda de cor. Os resultados encontrados nesse trabalho, para todos os extratos, foram superiores aos de BOBBIO e colaboradores (1999), indicando que a velocidade de degradação e tempo de meia vida são parâmetros extremamente relativos e dependentes de muitos fatores, entre eles a forma como o pigmento foi obtido, manipulado e armazenado.

As Figuras 13, 14, 15 e 16 apresentam os gráficos do comportamento das coordenadas “c*” e “h*”, em pH 2 e 3,5, para os extratos armazenados em presença de luz.

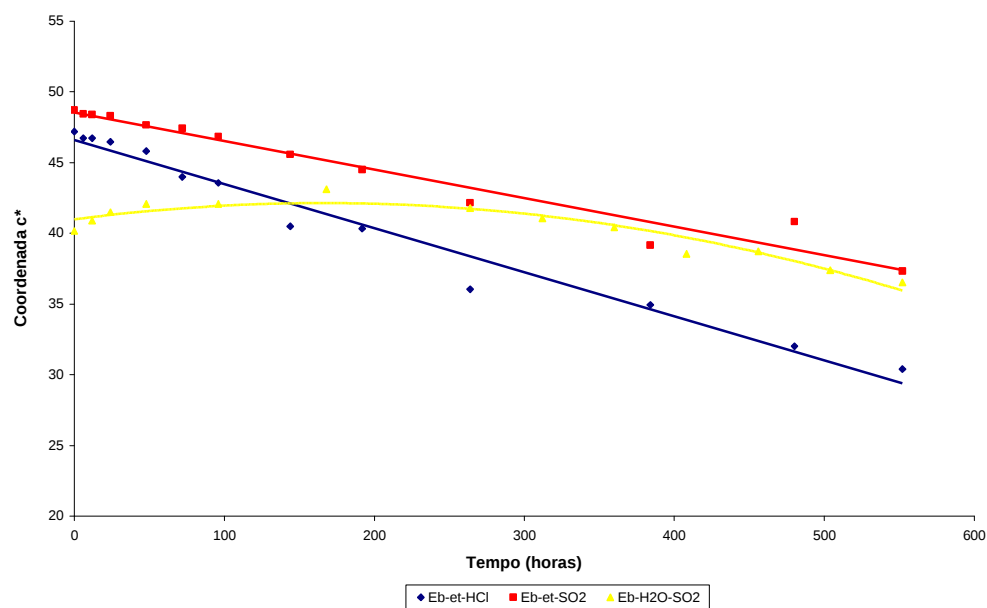


Figura 13 – Comportamento de “c*” (cromaticidade) dos extratos antociânicos ao longo do tempo, em presença de luz, em pH 2, à temperatura ambiente (25 ± 1 °C).

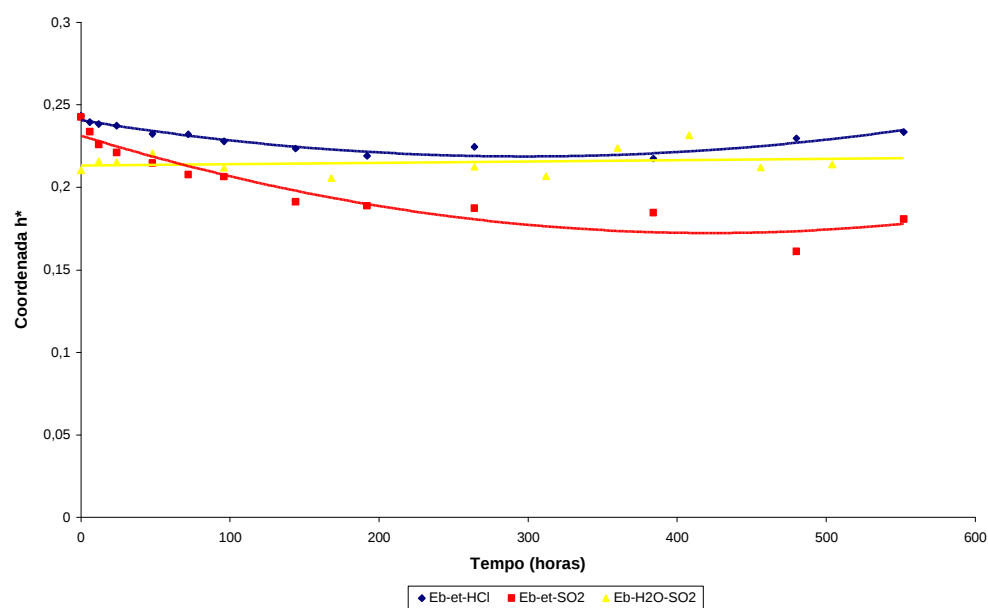


Figura 14 – Comportamento de “ h^* ” (tonalidade) dos extratos antociânicos ao longo do tempo, em presença de luz, em pH 2, à temperatura ambiente (25 ± 1 °C).

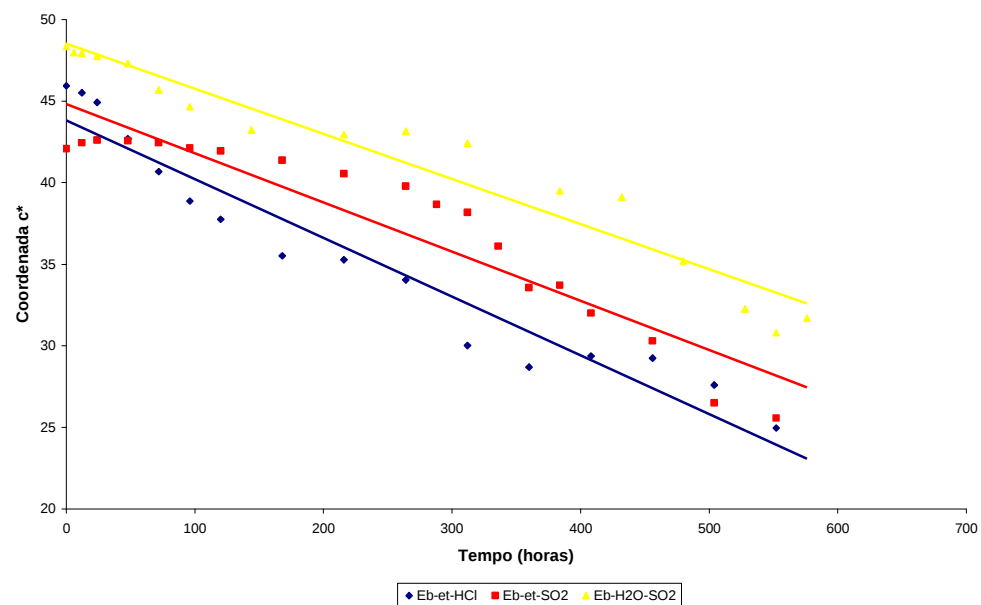


Figura 15 – Comportamento de “c*” (cromaticidade) dos extratos antociânicos ao longo do tempo, em presença de luz, em pH 3,5, à temperatura ambiente (25 ± 1 °C).

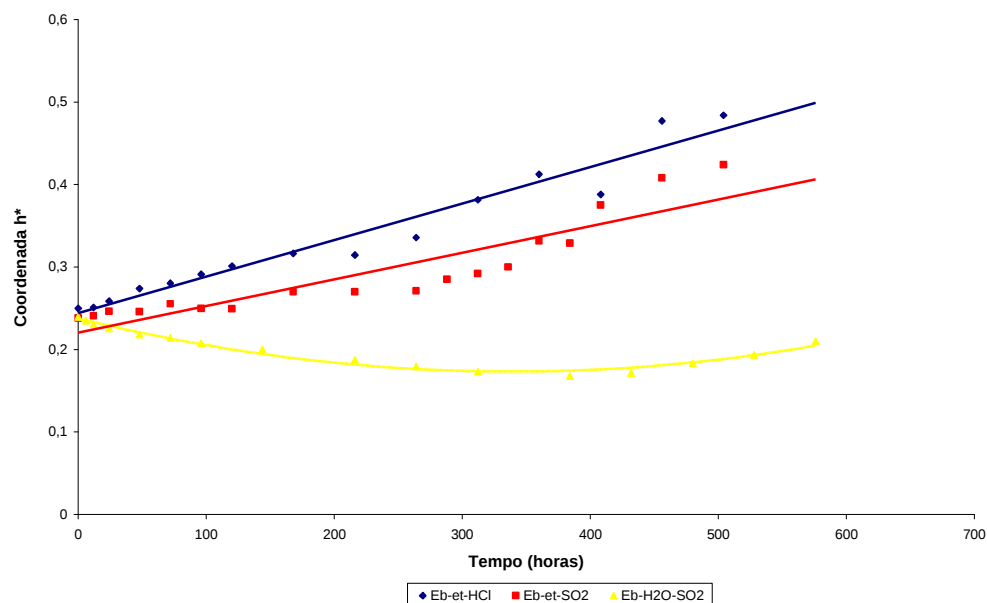


Figura 16 – Comportamento de “h*” (tonalidade) dos extratos antociânicos ao longo do tempo, em presença de luz, em pH 2, à temperatura ambiente (25 ± 1 °C).

É possível verificar a mesma tendência de degradação tanto pelos resultados colorimétricos como pelos dados do Quadro 4.

Avaliando-se a coordenada “c*” em pH 2 e pH 3,5, verifica-se que a amostra Eb-et-HCl apresentou maior variação e sua cor tornou-se ao longo do tempo menos saturada. Quanto à coordenada “h*”, em pH 2 a amostra apresentou pouca variação ao longo do tempo.

A amostra Eb-et-SO₂ apresentou variação intermediária em ambos os pH para coordenada “c*”, com tendência de diminuição em ambos os pH, porém de forma mais acentuada em pH 3,5.

A amostra Eb-H₂O-SO₂ mostrou a menor variação em ambos os pH para a coordenada “c*”. A coordenada “h*”, por sua vez, não variou sensivelmente no período avaliado.

Ao longo do tempo, em um processo degradativo, a antocianina pode sofrer duas mudanças básicas quanto à sua coloração: pode tornar-se gradativamente menos intensa pela perda de saturação e ou mudar de tonalidade pela formação de compostos de degradação com cores diferentes da original. Desta forma, é importante considerar tanto as variações de “c*” quanto de “h*” e, de acordo com as características de composição de cada extrato, ele apresentará a tendência para maior ou menor variação de uma ou outra coordenada colorimétrica.

O Quadro 5 mostra alguns parâmetros calculados a partir das coordenadas colorimétricas que expressam também as variações sofridas por amostras quanto a sua cor.

Quadro 5 – Parâmetros colorimétricos de degradação para os extratos obtidos com diferentes solventes, armazenados em presença de luz, à temperatura ambiente (25 ± 1 °C).

Parâmetros Colorimétricos	Eb-et-HCl		Eb-et-SO ₂		EB-H ₂ O-SO ₂	
	pH 2	pH 3,5	pH 2	pH 3,5	pH 2	pH 3,5
Δa^*	-16,07	-24,92	-10,44	-19,18	-11,33	-9,01
Δb^*	-5,34	1,92	-5,74	3,58	-3,46	-2,71
ΔL^*	8,80	17,75	3,42	19,40	-0,03	10,38
ΔE^*	19,08	30,66	12,40	27,52	11,85	14,01

Todas as amostras, em ambos valores de pH, apresentaram Δa^* negativo, que significa a perda da cor vermelha. As amostras Eb-et-HCl, Eb-et-SO₂ em pH 3,5 apresentaram Δb^* positivo, que significa perda da cor azul. Em pH 2 as amostras apresentaram Δb^* negativo. O mesmo aconteceu para a amostra Eb-H₂O-SO₂ em ambos os pH. As amostras tornaram-se mais luminosas, ΔL^* positivo, com exceção da amostra Eb-H₂O-SO₂ em pH 2 com ΔL^* ligeiramente negativo, que pelo baixo valor pode ser desconsiderado.

A amostra Eb-et-HCl apresentou maior variação em ΔE^* em ambos os pH. Os resultados estão de acordo com os do Quadro 4 em que essa amostra teve o menor tempo de meia vida. A amostra Eb-H₂O-SO₂ em pH 2 e 3,5, foi a que apresentou maior tempo de meia vida e também a menor variação em ΔE^* .

Pelos resultados apresentados de cinética e colorimetria verifica-se que, entre os três sistemas extratores, aquele formado por água e SO₂ levou ao melhor desempenho em relação a estabilidade final do extrato, seguido pelo etanol 70 % e SO₂ e, finalmente, etanol 70 % acidificado a pH 2 com HCl. Possivelmente, substâncias mais solúveis em água, originalmente presentes no fruto do açaí, são extraídas em maior quantidade nesta última, o que favorece a estabilidade do pigmento. Além disso o perfil antociânico varia de acordo com o solvente empregado, como visto nos cromatogramas das amostras (Figura 4). As amostras que apresentaram maior estabilidade continham maior proporção da fração representada pelo pico 1 do que a mostrada pelo extrato Eb-et-HCl.

O dióxido de enxofre, comumente utilizado como conservante pela indústria de alimentos, tem sido referenciado como agente estabilizador de antocianinas de algumas frutas, quando empregado em baixas concentrações, sendo tal efeito evidenciado em presença de ácido ascórbico ou rutina como co-pigmento (Adams, 1973, citado por JACKMAN et al., 1987). O uso de sulfito na extração de antocianinas é uma prática que vem sendo citada por alguns autores. De forma geral, a extração de antocianinas é favorecida pela adição de sulfito no solvente água ou álcool. Além de maior rendimento, é possível obter um extrato com menor teor de impurezas, uma vez que o sulfito em água é mais seletivo, extraindo basicamente antocianina, ao contrário do álcool acidificado, normalmente empregado para tal fim, que costuma arrastar também frações de clorofila e carotenóides eventualmente presentes. Alguns autores relatam ainda que antocianinas obtidas com solventes sulfitados possuem maior estabilidade quando empregadas em bebidas carbonatadas que os extratos obtidos da forma usual (SHEWFELT e AHMED, 1978).

3.4. Purificação e avaliação das diversas frações obtidas a partir do extrato obtido com etanol 70 % acidificado a pH 2 com HCl.

3.4.1. Cromatografia em papel

O extrato bruto lavado com éter, após ser cromatografado em papel Whatman 3 , em HCl 1 % apresentou uma única banda central de coloração vermelho intenso (A) e uma calda com coloração vermelho bem claro. Após o tratamento do cromatograma com NH_3 , verificou-se que não havia nenhuma zona amarela, indicando a possível presença de flavonóides não antociânicos.

A recromatografia em papel Whatman 1 da fração A, e o desenvolvimento em BFW forneceu duas zonas distintas mais fortes, Z1 e Z2, e duas mais fracas localizadas a parte superior do papel (Figura 17). A exposição do cromatograma ao NH_3 confirmou a inexistência de bandas amarelas.

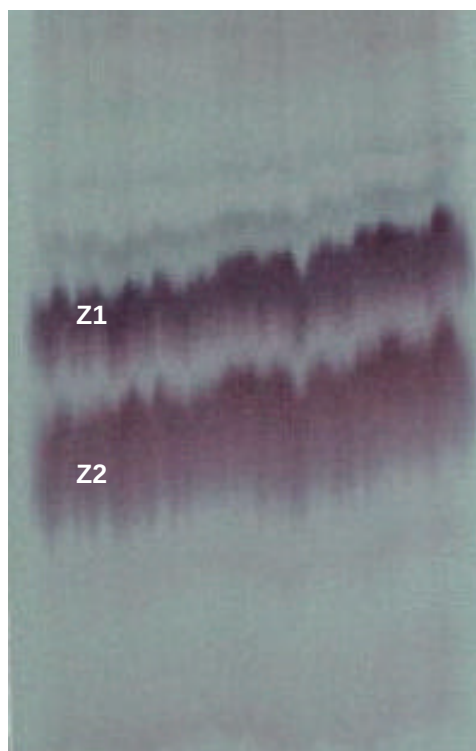


Figura 17 – Cromatograma da fração A em papel Whatman 1 desenvolvidos em BFW (n-butanol: ácido fórmico: água, 15:2,5:2,4).

3.4.2. Cromatografia em coluna

O extrato bruto, lavado com éter, ao ser cromatografado em coluna com resina amberlite CG-50 (trocadora de cátions), formou uma única banda de cor vermelho intenso. Inicialmente, a fração antociânica fixou-se à resina, o que não impediu a eluição de parte dos pigmentos com as sucessivas lavagens, possivelmente pela saturação da coluna ou pela presença de produtos de degradação que não se fixaram à resina. Após a lavagem com 50 mL de água, verificou-se que não havia traços de pigmento no eluente, que foi comprovado pela análise espectrofotométrica a 535 nm.

Ao se adicionar o metanol acidificado o pigmento foi aluído na forma de uma banda larga.

3.4.3. Caracterização espectrofotométrica e colorimétrica

A Figura 18 e o Quadro 6 mostram, respectivamente, os espectros de absorção UV-Vis e características espectrais do extrato bruto e das frações em diferentes etapas de purificação de acordo com o mencionado no item 2.2.1.

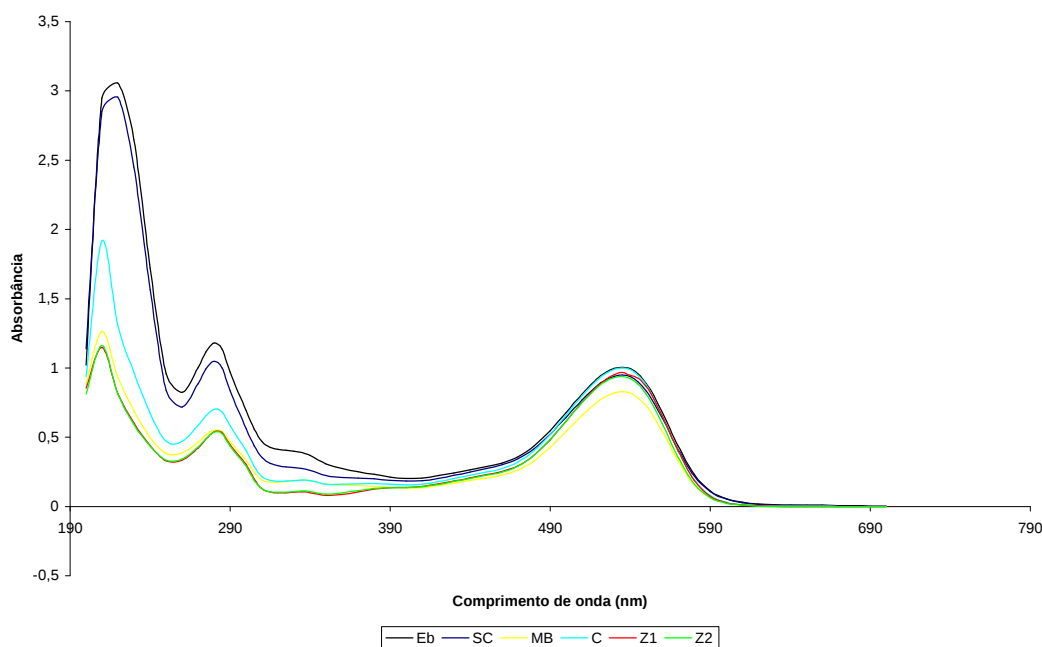


Figura 18 - Espectros de absorção dos extratos obtidos com etanol 70 % acidificado com HCl a pH 2,0, em diferentes fases de purificação.

Todos os extratos foram diluídos em etanol:HCl 1,5 N (85:15) de forma a se obter absorbância próximo de 1. Desta forma, se obteve extratos diluídos com pequenas variações nas concentrações de antocianinas . As amostras em

ordem decrescente de concentração de antocianinas são: Eb, C, SC, Z1, Z2 e MB, conforme pode ser observado na Figura 18 (intensidade de absorção no comprimento de onda 535 nm).

A amostra Eb (extrato bruto, rico em impurezas representadas pelos ácidos, açúcares e demais compostos de degradação presentes no fruto de açaí e extraídos junto às antocianinas), seguida da amostra SC (extrato bruto sem a fração lipídica) apresentaram maior absorção na região UV. Esse fato era esperado, uma vez que tais amostras devem possuir maiores quantidades de outros compostos (flavonóides não antociânicos) que as amostras que sofreram algum tipo de purificação e que absorvem nessa região também.

As amostras MB e C (amostras purificadas por cromatografia de papel com HCl 1 % e coluna de troca iônica, respectivamente), são frações pigmentadas livres da maior parte das impurezas, mas contendo flavonóides não antociânicos que podem estar complexados com as antocianinas tal como no extrato bruto Eb e SC. Comparativamente com os extratos sem purificação, as amostras MB e C, apresentaram menor absorção na região do UV, o que vem a confirmar a eficiência do processo de purificação.

As amostras Z1 e Z2 (frações purificadas por cromatografia de papel em BFW obtidas a partir da amostra MB), consideradas antocianinas puras, mostraram menor absorção na região do UV e apesar de estarem mais concentradas que a amostra MB, mostraram aproximadamente a mesma absorção em 280 nm (pico de máxima absorção no UV), o que mostra uma menor quantidade de componentes não antociânicos dessas em relação à amostra MB.

Pode-se observar nos espectros (Figura 18) que a forte absorção na região do UV diminui após as etapas de purificação. A eficiência da separação das frações por cromatografia de papel pode ser também constatada no Quadro 6 pela diminuição das razões $A_{\text{máx UV}}/A_{\text{máx Vis}}$ e $A_{410}/A_{\text{máx Vis}}$ do extrato bruto (Eb) em relação às zonas purificadas (Z1 e Z2).

Quadro 6 – Características espectrais do extrato bruto e das frações purificadas obtidos com sistema extrator etanol 70% acidificado com HCl a pH 2,0 e diluídas em solução etanol:HCl 1,5 N (85:15).

Características	EB	SC	C	MB	Z1	Z2
λ máx. visível (nm)	535	535	535	535	535	535
λ máx. UV (nm)	280	280	280	280	280	280
$A_{410}/A_{\text{máx. Vis}}$	0,203	0,196	0,160	0,163	0,150	0,151
$A_{\text{máx. UV}}/A_{\text{máx. Vis}}$	1,171	1,107	0,700	0,665	0,557	0,571

A razão $A_{410}/A_{\text{máx. Vis}}$ está relacionada com o teor de componentes degradados no extrato. Os chamados compostos marrons, oriundos da degradação antociânica, absorvem na região de 400 a 430 nm. Dessa forma quanto maior a quantidades desses compostos, maior será a razão citada. Pode-se observar que EB apresenta valor maior que SC, MB, C, Z2 e Z1, respectivamente.

A razão $A_{\text{máx. UV}}/A_{\text{máx. Vis}}$ é uma relação que nos fornece idéia do grau de purificação de um extrato. A tendência, quando se purifica um extrato, é que haja progressivamente uma diminuição na intensidade da absorção na região do UV comparativamente à absorção na região do visível. É possível constatar que EB, SC, C, MB, Z2 e Z1 apresentaram respectivamente valores menores da razão $A_{\text{máx. UV}}/A_{\text{máx. Vis}}$, o que confirma o aumento do grau de purificação das amostras.

As coordenadas colorimétricas do extrato bruto e em distintas etapas de purificação obtidos no item 2.2.1 são mostrados Quadro 7.

Quadro 7 – Coordenadas colorimétricas do extrato bruto e das frações purificadas obtidos com sistema extrator etanol 70% acidificado com HCl a pH 2,0 e diluídas em solução etanol:HCl 1,5 N (85:15).

Amostra	L	a	b	c	h
EB	64,79	56,14	-8,93	56,85	-0,158
SC	58,98	55,27	-8,93	55,90	-0,150
MB	62,96	52,31	-10,35	53,32	-0,195
C	66,14	57,20	-10,86	58,22	-0,188
Z1	61,31	56,44	-10,26	57,36	-0,180
Z2	60,35	57,47	-11,36	58,58	-0,195

As amostras apresentam valores das coordenadas colorimétricas bastantes próximos. De fato, o espectro de absorção na região do visível, que determina a cor da substância, é semelhante para as amostras em avaliação (Figura 18). As variações nos valores das coordenadas colorimétricas, em

parte, deve-se às diferenças de concentração das antocianinas das amostras. É importante ressaltar que apesar das frações Z1 e Z2 apresentarem concentração menor que EB, SC e C, o valor da coordenada “a*” foi maior, ou seja, a cor vermelha foi mais intensa.

3.4.4. Cromatografia líquida de alto desempenho

As Figuras 19 e 20 apresentam o perfil cromatográfico dos extratos nos diversos estágios de purificação, nos comprimentos de onda de 280 e 520 nm, respectivamente.

Em 520 nm (Figura 20), pode-se verificar o perfil cromatográfico das antocianinas presentes. Conforme mencionado anteriormente, na cromatografia em papel, é possível observar claramente que quase a totalidade do pigmento presente no extrato antociânico de açaí é formado por duas antocianinas apenas.

Em 280 nm (Figura 19) é possível verificar a purificação gradativa sofrida pelas amostras. EB, SC e MB possuem perfil semelhante, sendo que a última apresenta quantidade menor de picos, pela pré-purificação sofrida e eliminação de compostos não antociânicos bem como de produtos de degradação. A amostra C apresenta, em sequência, menos picos, mostrando que a coluna trocadora de cátion foi mais eficiente na purificação que a cromatografia em papel com HCl realizada no extrato bruto EB.

Analisando ainda a Figura 19 é possível constatar que as amostras Z1 e Z2 tratam-se das frações antociânicas purificadas do extrato bruto do açaí.

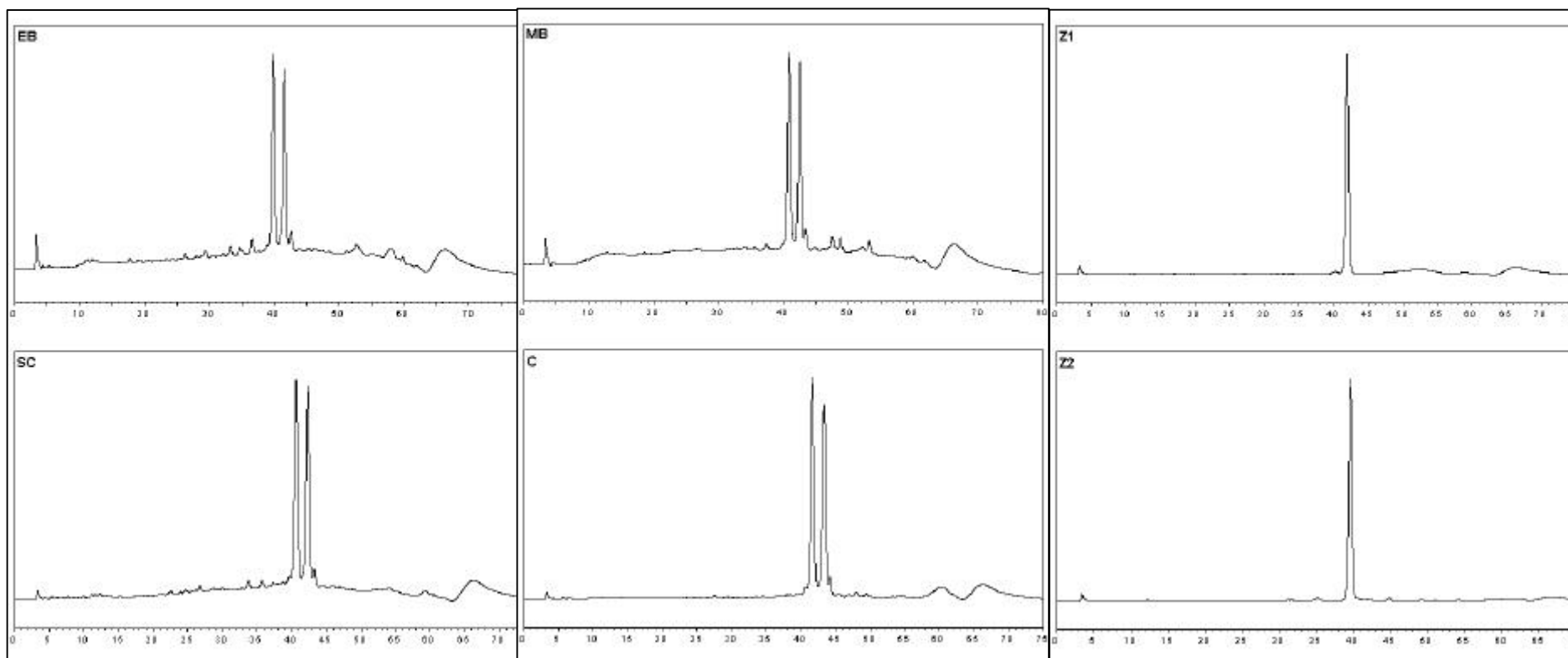


Figura 19 – Perfil cromatográfico dos extratos de antocianina de açaí em diferentes estágios de purificação a 280 nm.

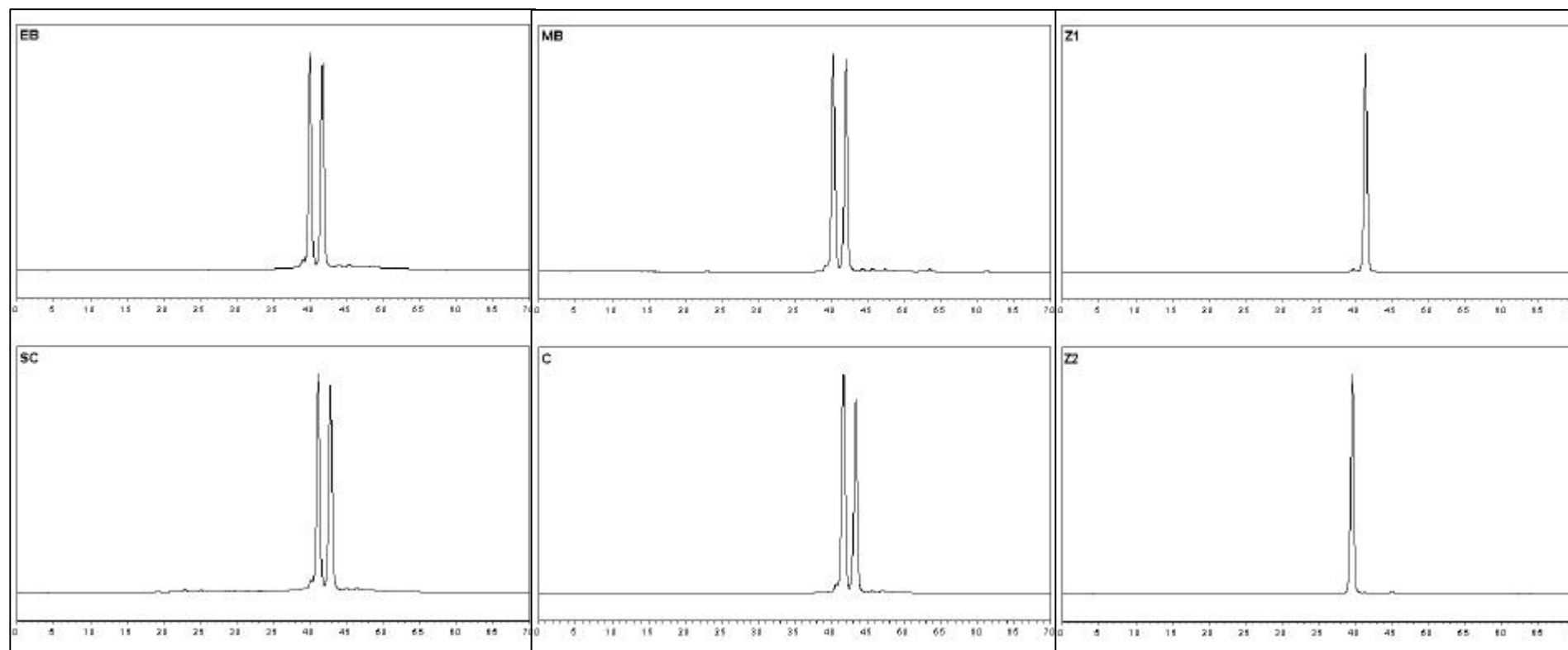


Figura 20 - Perfil cromatográfico dos extratos de antocianina de açaí em diferentes estágios de purificação a 520 nm.

3.4.5. Estabilidade

As Figuras 21 e 22 mostram a representação gráfica do comportamento dos extratos armazenados ao longo do tempo, em ausência de luz, à temperatura ambiente (25 ± 1 °C). Através dos coeficientes angulares das curvas foi determinada a velocidade de degradação de cada extrato e seus respectivos tempos de meia vida, que são mostrados no Quadro 8.

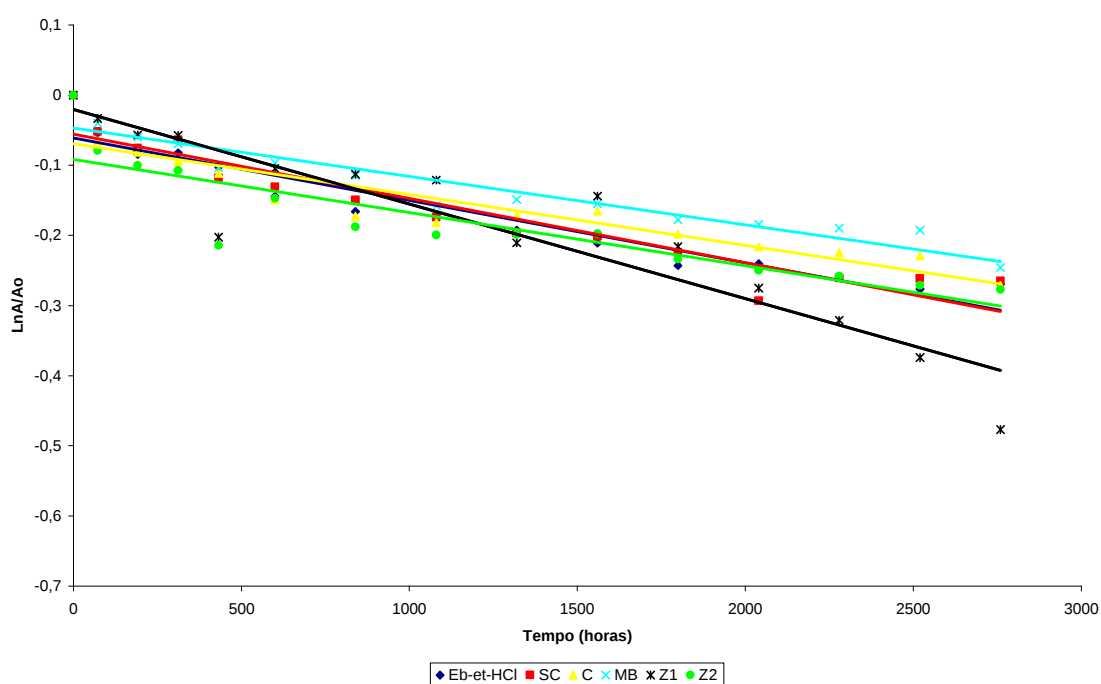


Figura 21 – Curvas de degradação dos extratos antociânicos em ausência de luz, em pH 2, à temperatura ambiente (25 ± 1 °C).

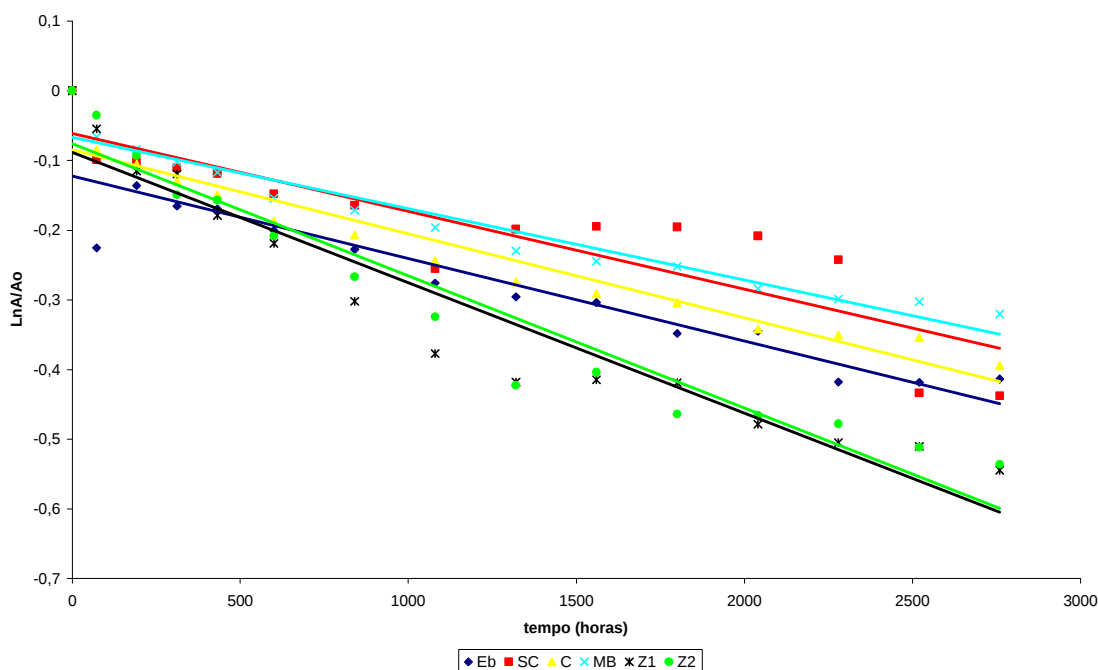


Figura 22 – Curvas de degradação dos extratos antociânicos em ausência de luz, em pH 3,5, à temperatura ambiente (25 ± 1 °C).

Quadro 8 – Valores das constantes de degradação k (h^{-1}) e do tempo de meia vida $t_{1/2}$ (h) para os extratos obtidos com diferentes solventes, armazenados em ausência de luz à temperatura ambiente (25 ± 1 °C).

Extrato	pH 2		pH 3,5	
	k (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)	k (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)
EB	$8,623 \times 10^{-5}$	8038,353	$1,184 \times 10^{-4}$	5854,284
SC	$8,623 \times 10^{-5}$	8038,353	$1,118 \times 10^{-4}$	6199,885
C	$7,239 \times 10^{-5}$	9575,179	$1,093 \times 10^{-4}$	6341,694
MB	$6,875 \times 10^{-5}$	10082,140	$9,365 \times 10^{-5}$	7401,465
Z1	$1,347 \times 10^{-4}$	5145,859	$1,771 \times 10^{-4}$	3913,875
Z2	$7,563 \times 10^{-5}$	9164,977	$1,796 \times 10^{-4}$	3859,394

Avaliando-se a estabilidade das antocianinas extraídas do açaí em diferentes etapas de purificação pode-se observar que as amostras acondicionadas em pH 3,5 apresentaram menores tempos de meia vida que aquelas em pH 2.

Em pH 2, observou-se que as amostras Eb e SC apresentaram o mesmo tempo de meia vida na condição de armazenamento em ausência de luz. A diferença entre os dois extratos é que, na amostra SC, todo o material lipídico do meio foi eliminado, e isso inclui também as clorofilas. Sabe-se que

as clorofilas são fotossensores e que, por isso, podem acelerar a degradação antociânica. Uma vez que a amostra se encontra em ausência de luz e em pH que favorece a sua estabilização, o efeito da retirada do material lipídico não resultou em alteração significativa. Já em pH 3,5, que é uma condição não tão favorável, verificou-se que a amostra SC teve um tempo de meia vida ligeiramente superior à EB.

As amostras C e MB, obtidas a partir da amostra SC, se encontravam num estágio superior de pureza. Em ambos os pH essas amostras apresentaram uma maior estabilidade que SC. Possivelmente, com a purificação parcial foram eliminados componentes não antociânicos que favoreceriam a degradação do pigmento, como o próprio pigmento já degradado, açúcares, vitamina C, entre outros. Comparando as amostras C e MB, a última mostrou maior tempo de meia vida.

Em pH 3,5 observou-se que as frações puras Z1 e Z2 apresentaram tempo de meia vida menor que as demais amostras, condizente com dados de literatura para os quais o aumento no grau de pureza dos pigmentos leva a diminuição da sua estabilidade (STRINGHETA, 1991; KUSKOSKI, 2000). Em pH 2 o mesmo resultado não foi observado e a fração purificada Z2 mostrou tempo de meia vida superior às amostras EB, SC e C. Talvez, no extrato, a presença de impurezas em maior proporção possa ter sido responsável pelo decréscimo na estabilidade, inibindo o efeito protetor dos flavonóides não antociânicos. Além disso, todas as amostras se encontravam em condições favoráveis, sem nenhum fator acelerador de degradação, fazendo com que os resultados, em geral, fossem próximos uns dos outros.

Ao examinar os resultados obtidos na ausência de luz, o efeito do pH tornou-se aparente. Em pH 3,5, que é uma situação de pouca estabilidade para as antocianinas, os efeitos da presença de impurezas ou de compostos protetores (ex. flavonóides não antociânicos) pode ser observado. No entanto, em pH 2, os resultados foram ambíguos, uma vez que a fração pura Z2 mostrou estabilidade superior que amostras teoricamente mais estáveis, indicando que o efeito do pH é expressivo e se evidencia na ausência de outros fatores destrutivos.

As Figuras 23, 24, 25 e 26 apresentam os gráficos do comportamento das coordenadas “c*” e “h*”, para os pH 2 e 3,5, respectivamente, para os extratos armazenados em ausência de luz.

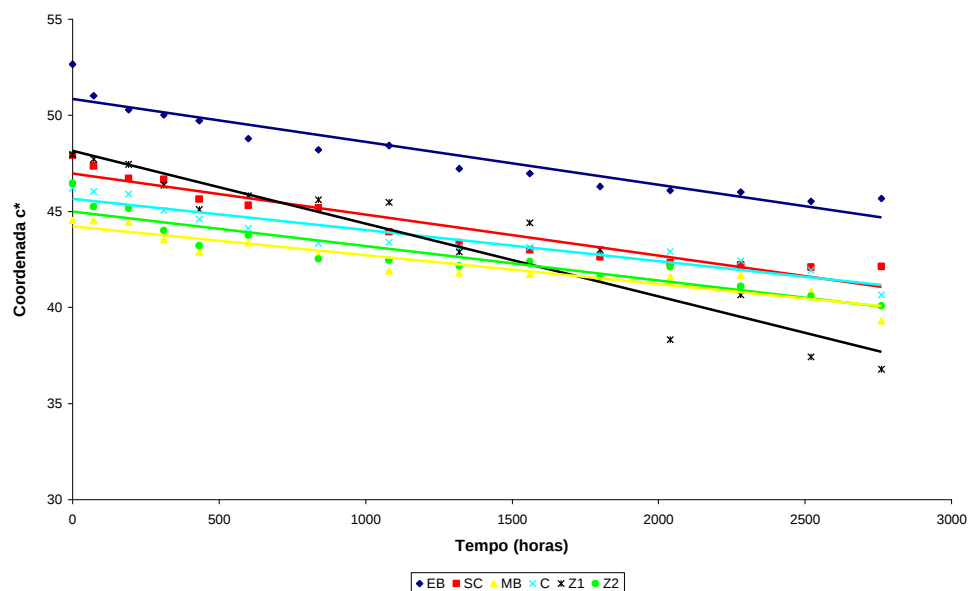


Figura 23 – Comportamento de “c*” (cromaticidade) dos extratos antociânicos ao longo do tempo, em ausência de luz, em pH 2, à temperatura ambiente (25 ± 1 °C).

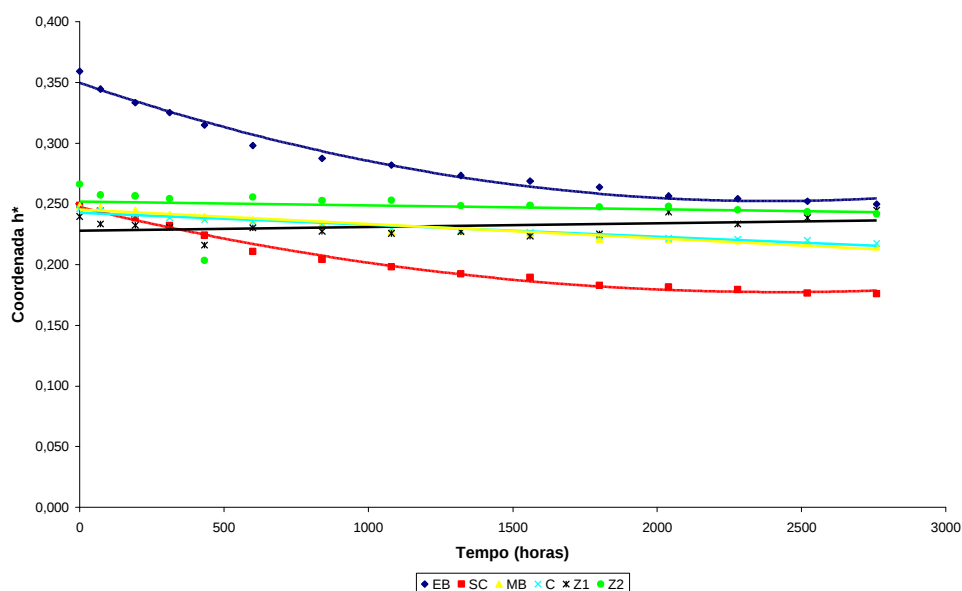


Figura 24 – Comportamento de “h*” (tonalidade) dos extratos antociânicos ao longo do tempo, em ausência de luz, em pH 2, à temperatura ambiente (25 ± 1 °C).

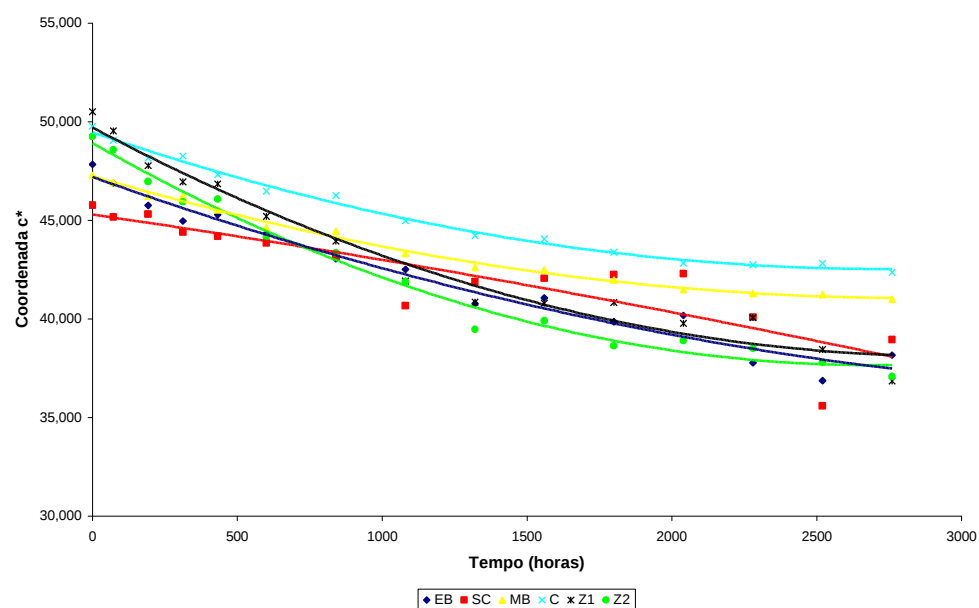


Figura 25 – Comportamento de “c*” (cromaticidade) dos extratos antociânicos ao longo do tempo, em ausência de luz, em pH 3,5, à temperatura ambiente (25 ± 1 °C).

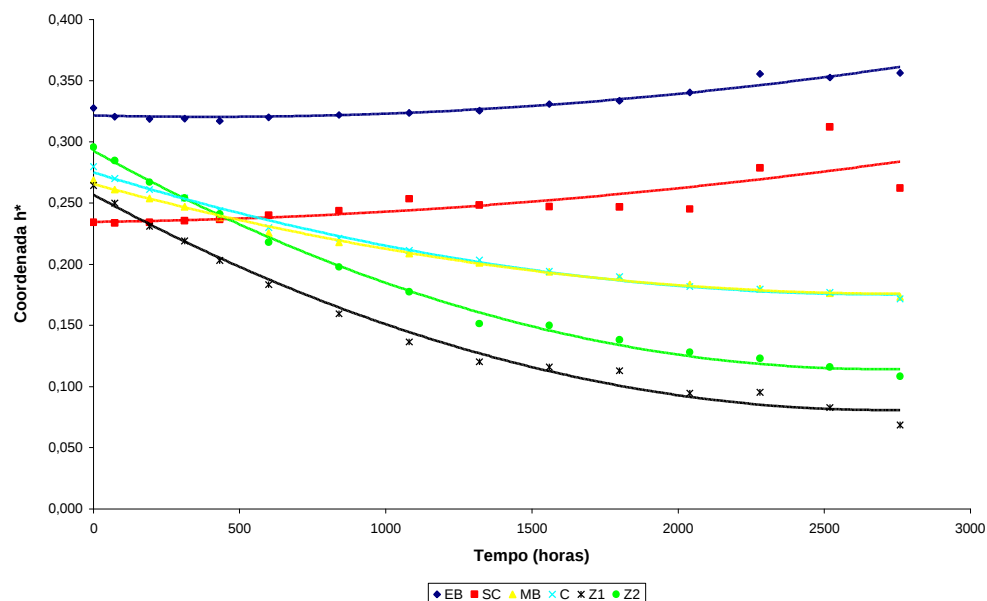


Figura 26 – Comportamento de “h*” (tonalidade) dos extratos antociânicos ao longo do tempo, em ausência de luz, em pH 3,5, à temperatura ambiente (25 ± 1 °C).

É possível verificar que a tendência geral observada quando se determinou a velocidade de degradação (k) e o tempo de meia vida ($t_{1/2}$) mostrados no Quadro 8 foi a mesma apresentada pelos resultados colorimétricos.

Foi observada, para todas as amostras, variação pequena das coordenadas colorimétricas ao longo do tempo em ambos os pH. Para a coordenada c, em pH 2, foi verificada maior variação nas amostras MB, C, Z2, EB, SC e Z1 e em pH 3,5, nas amostras MB, C, SC, EB, Z1 e Z2, em

concordância com os resultados obtidos para os tempos de meia vida de cada amostra.

Quanto à coordenada “h*” não foi observada uma relação direta com os resultados encontrados para o tempo de meia vida e velocidade de degradação. Em pH 2, as amostras Z1, Z2, MB e C apresentaram comportamento considerado constante ao longo do tempo. As amostras EB e SC sofreram ligeira variação. Em pH 3,5, as amostras MB e C mostraram as menores variações, com ligeira queda, Z1 e Z2 apresentaram variação intermediária de queda e, EB e SC, maiores variações, com aumento ao longo do tempo.

Esperava-se uma relação direta entre a velocidade de degradação do pigmento (e tempo de meia vida) com a coordenada “c*”, e não com a coordenada “h*”. Isso porque a primeira está relacionada com a saturação da cor que por sua vez refletirá na intensidade de absorção no comprimento de onda de máxima absorção. A coordenada “h*” se relaciona com a tonalidade da cor e conseqüentemente com o comprimento de máxima absorção que com a intensidade do mesmo. Ou seja, a mudança na coordenada “h*” refletirá na alteração gradativa do comprimento de onda de máxima absorção do pigmento e, uma vez que velocidade de degradação do pigmento é determinada comparando a absorção em um comprimento de onda fixo (o de máxima absorção no tempo zero), essa coordenada colorimétrica aparentemente não influencia diretamente seus valores.

Vale ressaltar que em pH 2, as amostras EB e SC, MB e C e, Z1 e Z2 apresentaram tendência de comportamento similar para as coordenadas “c*” e “h*”. Tais amostras guardam entre si semelhanças quanto ao grau de pureza. EB e SC são extratos brutos, sendo SC sem a fração lipídica. MB e C são amostras parcialmente puras em que além das impurezas, parte dos flavonóides não antociânicos foram eliminados. Finalmente, Z1 e Z2 são frações antociânicas puras.

O Quadro 9 mostra alguns parâmetros, calculados a partir da coordenadas colorimétricas, que expressam também variações das amostras quanto a sua cor.

Quadro 9 – Parâmetros colorimétricos de degradação para os extratos obtidos com diferentes solventes armazenados em ausência de luz à temperatura ambiente (25 ± 1 °C).

Amostras		Parâmetros colorimétricos			
		DL*	Da*	Db*	DE*
EB	pH 2	0,01	-5,66	-7,54	9,43
	pH 3,5	3,84	-9,47	-2,11	10,43
SC	pH 2	0,72	-4,97	-4,42	6,69
	pH 3,5	2,43	-7,05	-0,20	7,46
MB	pH 2	2,12	-4,77	-2,58	5,82
	pH 3,5	2,61	-5,23	-5,44	7,99
C	pH 2	2,04	-5,12	-2,47	6,04
	pH 3,5	2,55	-6,12	-6,41	9,23
Z1	pH 2	4,65	-10,87	-2,61	12,10
	pH 3,5	2,82	-12,00	-10,63	16,28
Z2	pH 2	3,56	-5,90	-2,63	7,38
	pH 3,5	1,99	-10,23	-10,34	14,68

Todas as amostras apresentaram Δa^* e Δb^* negativos, significando a perda da cor vermelha e ganho da cor azul e, ΔL^* positivo, ou seja tornaram-se mais luminosas. Todas as amostras apresentaram, para ΔE^* , maior variação em pH 3,5 que em pH 2, confirmando a sua menor estabilidade em tal condição.

As Figuras 27 e 28 mostram a representação gráfica do comportamento dos extratos armazenados ao longo do tempo, em presença de luz à temperatura ambiente (25 ± 1 °C).

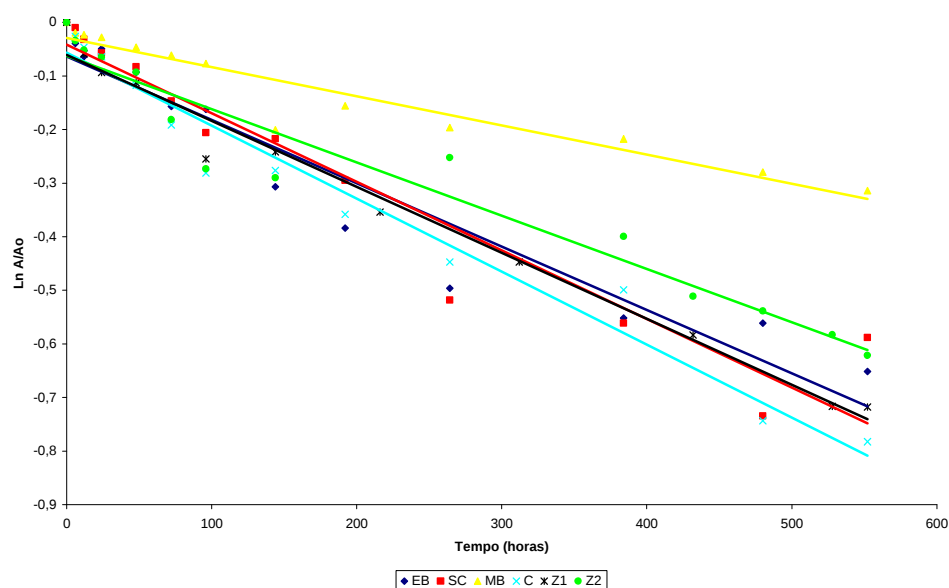


Figura 27 – Curvas de degradação dos extratos antociânicos ao longo do tempo, em presença de luz, em pH 2, à temperatura ambiente (25 ± 1 °C).

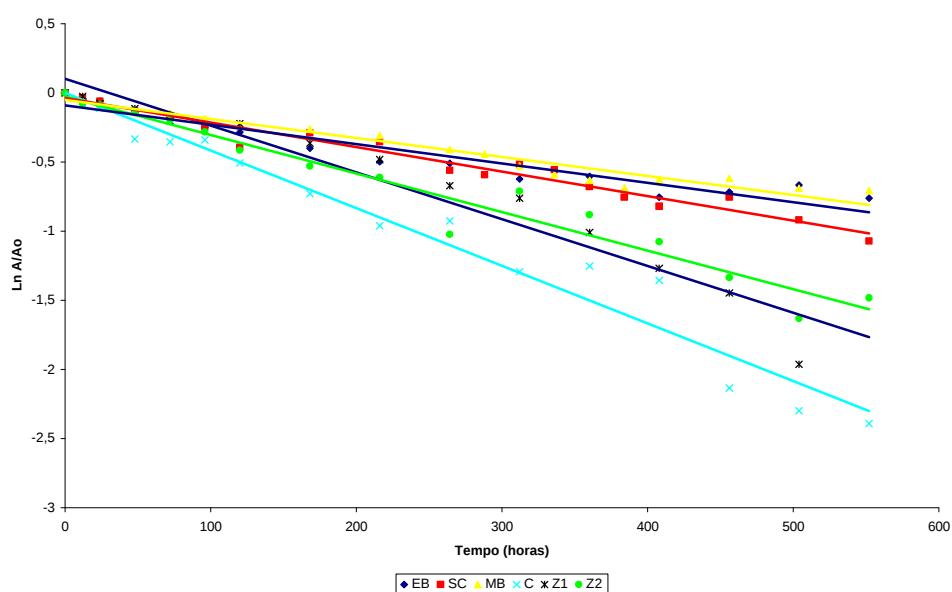


Figura 28 – Curvas de degradação dos extratos antociânicos ao longo do tempo, em presença de luz, em pH 3,5, à temperatura ambiente (25 ± 1 °C).

Através dos coeficientes angulares das curvas foi determinada a velocidade de degradação de cada extrato e seus respectivos tempos de meia vida, bem como as relações entre os tempos de meia vida e as velocidades de

degradação para os extratos armazenados em presença e ausência de luz nos pH 2 e 3,5. Estes resultados são apresentados no Quadro 10.

Quadro 10 – Valores das constantes de degradação k (h^{-1}) e do tempo de meia vida $t_{1/2}$ (h) para os extratos obtidos com diferentes solventes armazenados em presença e ausência de luz, à temperatura ambiente (25 ± 1 °C).

	EB		SC		MB		C		Z1		Z2	
pH 2,0												
Luz	t _{1/2} (L)	k(L)	t _{1/2} (L)	K(L)	t _{1/2} (L)	K(L)	t _{1/2} (L)	K(L)	t _{1/2} (L)	K(L)	t _{1/2} (L)	K(L)
	585,428	1,184×10 ⁻³	541,099	1,281×10 ⁻³	1275,809	5,433×10 ⁻⁴	509,667	1,360×10 ⁻³	562,619	1,232×10 ⁻³	704,991	9,832×10 ⁻⁴
Escuro	T _{1/2} (E)	K(E)	t _{1/2} (E)	K(E)	t _{1/2} (E)	k(E)	t _{1/2} (E)	K(E)	t _{1/2} (E)	K(E)	t _{1/2} (E)	K(E)
	8038,353	8,623×10 ⁻⁵	8038,353	8,623×10 ⁻⁵	10082,141	6,875×10 ⁻⁵	9575,179	7,239×10 ⁻⁵	5145,859	1,347×10 ⁻⁴	9164,977	7,563×10 ⁻⁵
Luz / Escuro	t _{1/2} (L)/ t _{1/2} (E)	K(L)/ K(E)	t _{1/2} (L)/ t _{1/2} (E)	K(L)/ K(E)	t _{1/2} (L)/ t _{1/2} (E)	K(L)/ K(E)	t _{1/2} (L)/ t _{1/2} (E)	K(L)/ K(E)	t _{1/2} (L)/ t _{1/2} (E)	K(L)/ K(E)	t _{1/2} (L)/ t _{1/2} (E)	K(L)/ K(E)
	0,0728	13,7301	0,0673	14,8556	0,1265	7,9025	0,0532	18,7871	0,1093	9,1462	0,0769	13,0001
pH 3,5												
Luz	t _{1/2} (L)	K(L)	t _{1/2} (L)	k(L)	t _{1/2} (L)	k(L)	t _{1/2} (L)	k(L)	t _{1/2} (L)	K(L)	t _{1/2} (L)	K(L)
	496,168	1,397×10 ⁻³	390,946	1,773×10 ⁻³	505,209	1,372×10 ⁻³	174,100	3,981×10 ⁻³	204,891	3,383×10 ⁻³	248,796	2,786×10 ⁻³
Escuro	T _{1/2} (E)	K(E)	t _{1/2} (E)	k(E)	t _{1/2} (E)	K(E)	t _{1/2} (E)	K(E)	t _{1/2} (E)	k (E)	t _{1/2} (E)	k (E)
	5854,284	1,184×10 ⁻⁴	6199,885	1,118×10 ⁻⁴	7401,465	9,365×10 ⁻⁵	6341,694	1,093×10 ⁻⁴	3913,874	1,771×10 ⁻⁴	3859,394	1,796×10 ⁻⁴
Luz / Escuro	t _{1/2} (L)/ t _{1/2} (E)	K(L)/ K(E)	t _{1/2} (L)/ t _{1/2} (E)	K(L)/ K(E)	t _{1/2} (L)/ t _{1/2} (E)	K(L)/ K(E)	t _{1/2} (L)/ t _{1/2} (E)	K(L)/ K(E)	t _{1/2} (L)/ t _{1/2} (E)	K(L)/ K(E)	t _{1/2} (L)/ t _{1/2} (E)	K(L)/ K(E)
	0,0847	11,7990	0,0631	15,8587	0,0683	14,6503	0,0274	36,4227	0,0523	19,1022	0,0645	15,5122
pH 3,5/pH 2,0												
Luz	t _{1/2} (3,5)/ t _{1/2} (2)	k(pH3,5)/ K(pH2)	t _{1/2} (3,5)/ t _{1/2} (2)	k(pH3,5)/ k(pH2)	T _{1/2} (3,5)/ t _{1/2} (2)	k(pH3,5)/ k(pH2)	t _{1/2} (3,5)/ t _{1/2} (2)	k(pH3,5)/ k(pH2)	t _{1/2} (3,5)/ t _{1/2} (2)	k(pH3,5)/ k(pH2)	t _{1/2} (3,5)/ t _{1/2} (2)	k(pH3,5)/ k(pH2)
	0,8475	1,1790	0,7225	1,3841	0,3960	2,5253	0,3416	2,9272	0,3642	2,7459	0,3529	2,8336
Escuro	t _{1/2} (3,5)/ t _{1/2} (2)	k(pH3,5)/ k(pH2)	t _{1/2} (3,5)/ t _{1/2} (2)	k(pH3,5)/ k(pH2)	T _{1/2} (3,5)/ t _{1/2} (2)	k(pH3,5)/ k(pH2)	t _{1/2} (3,5)/ t _{1/2} (2)	k(pH3,5)/ k(pH2)	t _{1/2} (3,5)/ t _{1/2} (2)	k(pH3,5)/ k(pH2)	t _{1/2} (3,5)/ t _{1/2} (2)	k(pH3,5)/ k(pH2)
	0,7283	1,3731	0,7713	1,2965	0,7341	1,3622	0,6623	1,5099	0,7606	1,3148	0,4211	2,3747

Os valores encontrados para $t_{1/2}$ explicam claramente a influência da luz sobre a constante de velocidade da reação, que são inferiores aos obtidos para a condição com abrigo da luz.

Os resultados no Quadro 10 mostram que, tanto em pH 2,0 e pH 3,5, a luz afeta a velocidade de degradação e o tempo de meia vida, já que os valores de $t_{1/2}$ para as antocianinas do extrato sob efeito de luz ($t_{1/2L}$) são muito menores que os valores obtidos ao abrigo de luz ($t_{1/2E}$). Em adição, as relações $t_{1/2LUZ}/t_{1/2ESCURO}$, com quocientes sempre menores que 1 para todos os sistemas, evidenciam o forte efeito da luz na velocidade de reação. Esses resultados comprovam a elevada sensibilidade das antocianinas, na presença de luz, o que leva tais pigmentos a uma intensa degradação fotoquímica.

Os valores para a relação $t_{1/2}$ na presença de luz em pH 3,5 e $t_{1/2}$ em pH 2,0 ($t_{1/2LpH3,5}/t_{1/2LpH2,0}$) foram inferiores a 1, indicando que a estabilidade dos extratos é maior em pH 2 que em pH 3,5. Esses resultados estão de acordo com os encontrados na literatura, para os quais a estabilidade decresce acentuadamente com o aumento do pH.

Comparando a estabilidade das frações na condição de incidência de luz verificou-se, em pH 2, o maior tempo de meia vida para a amostra MB, seguido pelas amostras Z2, EB, Z1, SC e C. Tal resultado parece contraditório uma vez que se espera que à medida que se purifique um extrato ele gradativamente se torne menos estável, no entanto as frações puras Z2 e Z1 tiveram tempo de meia vida superior aos extratos SC e C.

Em pH 3,5 MB mostrou maior tempo de meia vida seguido das amostras EB, SC, Z2, Z1 e C, de acordo com o esperado. A amostra C, mais uma vez obteve pior desempenho frente as demais.

As Figuras 29 e 30 apresentam, respectivamente, os gráficos do comportamento das coordenadas “c*” e “h*”, para o pH 2 e as figuras 31 e 32 as mesmas grandezas para pH 3,5. Os extratos foram armazenados em presença de luz.

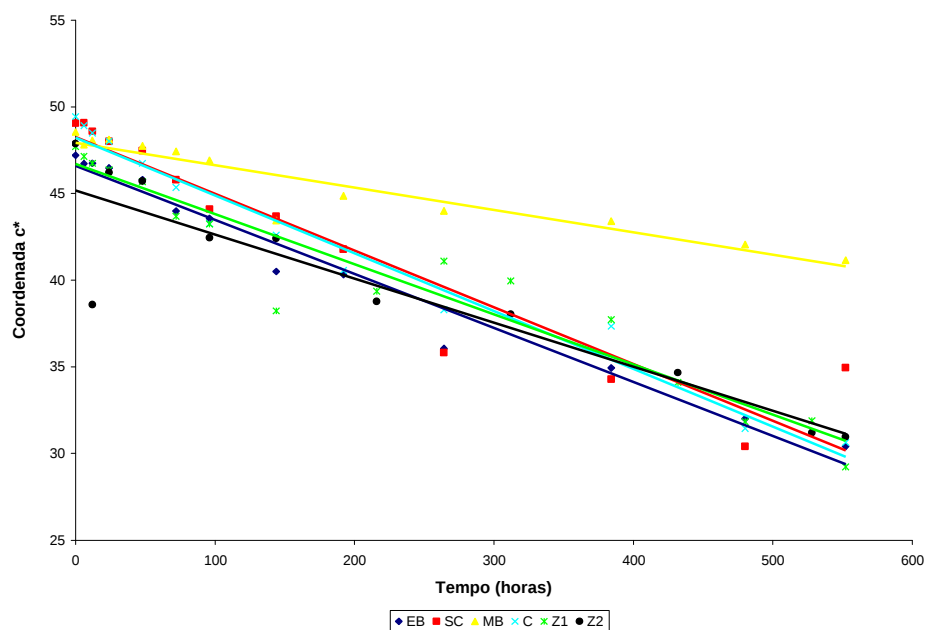


Figura 29 – Comportamento de “ c^* ” (cromaticidade) dos extratos antociânicos ao longo do tempo, em presença de luz, em pH 2, à temperatura ambiente (25 ± 1 °C).

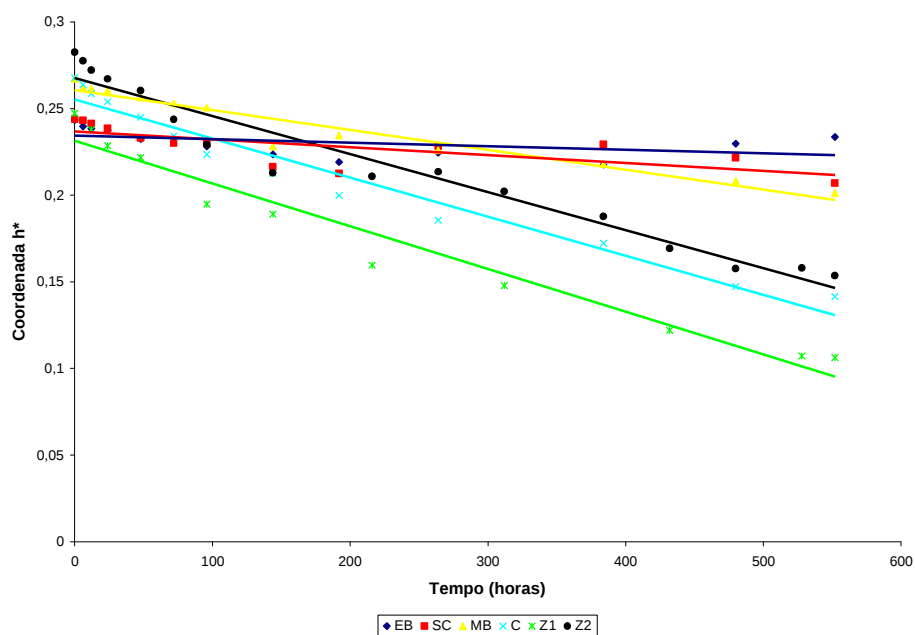


Figura 30 – Comportamento de “ h^* ” (tonalidade) dos extratos antociânicos ao longo do tempo, em presença de luz, em pH 2, à temperatura ambiente (25 ± 1 °C).

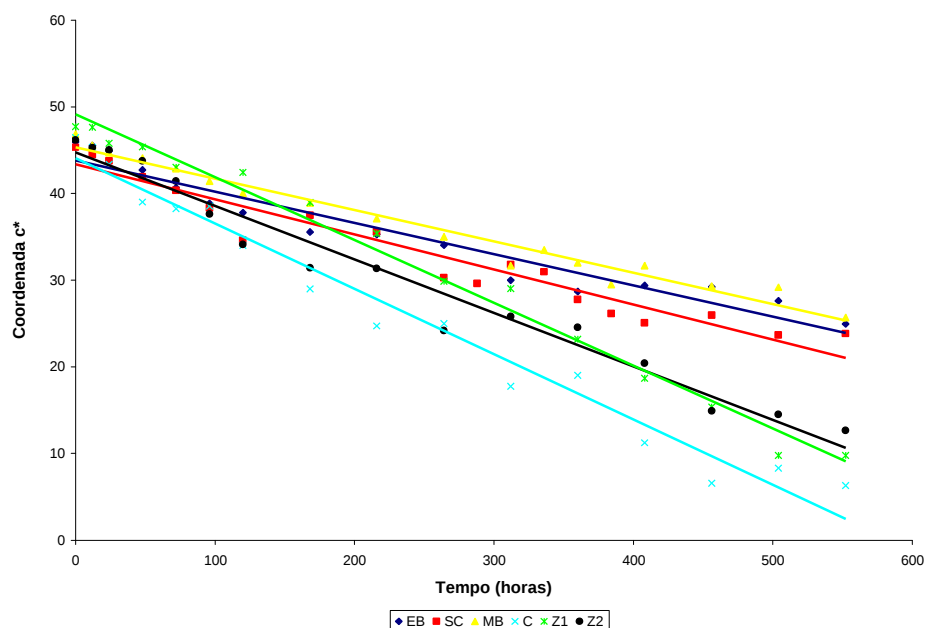


Figura 31 – Comportamento de “c*” (cromaticidade) dos extratos antociânicos ao longo do tempo, em presença de luz, em pH 3,5, à temperatura ambiente (25 ± 1 °C).

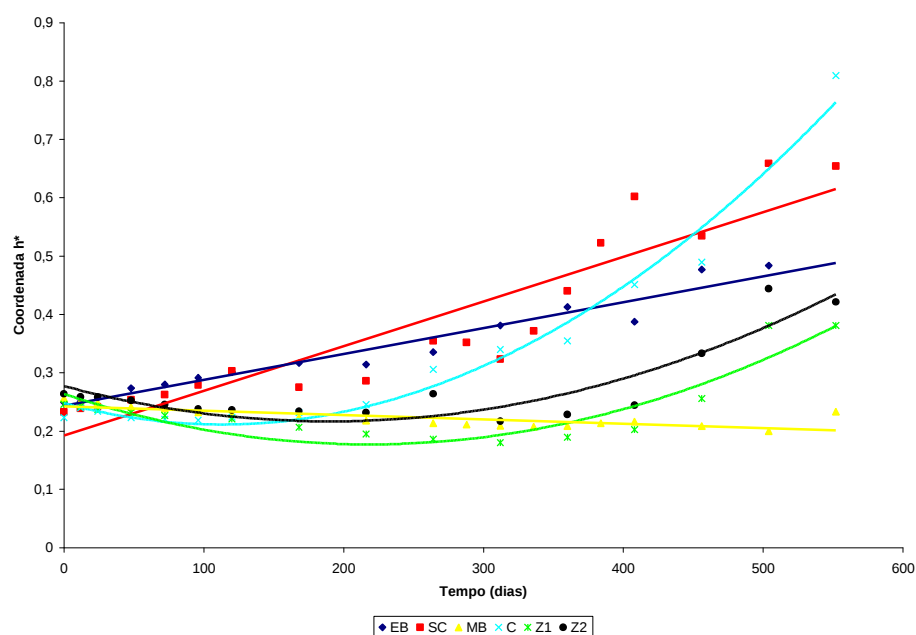


Figura 32 – Comportamento de “h*” (tonalidade) dos extratos antociânicos ao longo do tempo, em presença de luz, em pH 3,5, à temperatura ambiente (25 ± 1 °C).

Em valores de pH 2 e 3,5, para a coordenada “c*”, as amostras MB, Z2, Z1, EB, SC e C e , MB, EB, SC, Z2, Z1 e C respectivamente apresentaram as maiores variações, em ordem crescente. Houve neste caso uma concordância

parcial com os resultados obtidos para os tempos de meia vida de cada amostra. Em pH 2, o tempo de meia vida de EB foi superior ao de Z1.

Quanto à coordenada “h*”, assim como para as amostras armazenadas no escuro, em presença de luz não foi observada uma relação direta dos resultados com aqueles encontrados para o tempo de meia vida e velocidade de degradação. Em pH 2 as amostras EB e SC praticamente não sofreram variação. A amostra MB apresentou comportamento intermediário de queda seguida das demais amostras. Em pH 3,5, ao contrário, a coordenada “h*” em geral aumentou com o tempo e nas amostras C, SC, EB, Z1 e Z2 sua variação foi pequena. A amostra MB apresentou ligeiro queda.

O Quadro 11 mostra alguns parâmetros calculados a partir das coordenadas colorimétricas que expressam as variações sofridas pelas amostras quanto à cor.

Quadro 11 – Parâmetros colorimétricos de degradação para os extratos obtidos com diferentes solventes, ao longo do tempo, em presença de luz, à temperatura ambiente (25 ± 1 °C).

Amostras		Parâmetros colorimétricos			
		DL*	Da*	Db*	DE*
EB	pH2	8,74	-17,14	-4,93	19,86
	pH3,5	10,94	-22,08	-1,16	24,67
SC	pH2	9,18	-16,81	-5,38	19,89
	pH3,5	15,24	-27,83	-1,44	31,77
MB	pH2	5,96	-5,82	-3,38	8,99
	pH3,5	15,43	-19,60	-6,64	25,81
C	pH2	8,68	-16,32	-7,14	20,22
	pH3,5	23,02	-43,58	-9,07	50,11
Z1	pH2	11,02	-15,00	-6,86	19,83
	pH3,5	49,65	-35,45	-8,74	49,65
Z2	pH2	8,46	-14,41	-7,73	18,41
	pH3,5	22,13	-34,63	-7,32	41,74

Todas as amostras nos dois pH apresentaram Δa^* e Δb^* negativos e ΔL^* positivo significando a perda da cor vermelha, ganho da cor azul e de luminosidade, respectivamente.

Em pH 2 e pH 3,5 as amostras MB, Z2, Z1, EB, SC e C e MB, EB, SC, Z2, Z1 e C respectivamente apresentaram, valores crescentes de ΔE^* , ou seja, aumento na variação total da cor.

Conforme mencionado nesse trabalho, em um processo degradativo, a coloração da antocianina pode sofrer duas mudanças: tornar-se gradativamente menos intensa, pela perda de saturação, e ou mudar de tonalidade pela formação de compostos de degradação com cores diferentes da original. A forma como a cor da antocianina é alterada é função entre outros fatores, da composição do extrato e do pH do meio. Isso porque dependendo do pH, e mesmo da estrutura da antocianina, ela poderá adquirir preferencialmente uma das quatro estruturas químicas que coexistem em equilíbrio em meio aquoso, que por sua vez, possuem estabilidade diferentes (MAZZA e BROUILLARD, 1987) e levam a produtos de degradação distintos.

Em meio ácido, a 25°C, quatro estruturas coexistem em equilíbrio: o cátion flavílium (AH^+), a base quinoidal (A), a pseudobase ou carbinol (B) e a chalcona (C). As estruturas responsáveis pela coloração das antocininas são o cátion flavilium e a base quinoidal, sendo o carbinol e a chalcona incolores (BROUILLARD e DUBOIS, 1976). A tendência do equilíbrio se deslocar para uma ou outra forma depende do pH do meio e de características próprias do pigmento.

Em meio muito ácido, as antocianinas se encontram na forma protonada e de maior estabilidade. Já em meio de menor acidez e alcalino, as propriedades das antocianinas são mais distinguíveis (CABRITA et al., 2000). Dessa forma, os resultados observados para o pH 3,5 são mais representativos quanto à estabilidade dos extratos avaliados.

Fica evidenciado que as diversas reações dos pigmentos em meio aquoso, ao longo do tempo, são bastante complexas e dependentes de vários fatores, visto que pequenas mudanças nas condições de armazenamento e condição do extrato levaram a diferenças nos resultados obtidos.

4. RESUMO E CONCLUSÕES

A substituição de corantes sintéticos por naturais é limitada por alguns fatores como manutenção da cor e estabilidade, além do maior custo para obtenção do pigmento natural na forma apropriada. Quanto a toxidez, as antocianinas não apresentam problemas já que são usadas há gerações pelo homem ao consumir frutas e vegetais em geral. Uma vez encontrada uma fonte de antocianinas, viável em termos econômicos e tecnológicos, a sua estabilidade deverá ser avaliada.

Como regra geral, um extrato antociânico contém uma mistura de antocianinas com tonalidades e concentrações distintas. A separação das antocianinas é tarefa complexa não seria economicamente viável para uso comercial. Desta forma, após otimizar extração dos pigmentos do açaí (*Euterpe oleracea* M) em diferentes sistemas solventes, a estabilidade destes extratos foi avaliada frente à luz e ao pH. Foram também caracterizados em termos colorimétricos e espectrofotométricos.

O extrato antociânico do açaí é formado por uma mistura relativamente simples com dois tipos de antocianinas aparecendo em maior proporção. Entretanto, observou-se que, dependendo do sistema solvente empregado na extração, é possível alterar tanto o perfil, quanto à estabilidade do extrato antociânico final.

Quando diferentes sistemas extratores foram avaliados, os extratos originados dos testes com SO₂ apresentaram maior estabilidade frente a todos os fatores avaliados. O perfil cromatográfico desses extratos comparados aos originados sem SO₂ e em presença de ácido, mostrou que a única diferença marcante foi quanto à proporção das frações antociânicas principais extraídas. Nos obtidos com SO₂, a fração Z2 era a de maior proporção, ao contrário dos obtidos com etanol e HCl em que a fração Z1 foi a maior. É interessante observar que a fração pura Z2 apresentou maior estabilidade que Z1 durante. Em parte, a maior estabilidade dos extratos obtidos com SO₂ pode ser justificada dessa forma.

Ao avaliar a estabilidade, frente a luz e pH, do extrato bruto e purificado por diferentes métodos, a estabilidade das frações nas etapas de purificação, observou-se que, em geral, a amostra MB (extrato bruto purificado por

cromatografia em papel com HCl 1 %) apresentou melhor desempenho. Esse resultado de certa forma era esperado, uma vez que MB, ao contrário de EB e SC não apresentava as impurezas que poderiam acelerar sua degradação e possuía grande parte dos constituintes açai que podem ajudar na sua estabilização (flavonóides não antociânicos). A purificação por cromatografia de troca iônica, levou a um produto mais puro, em termos de pigmentos, mas ao menos estável, com provável eliminação dos compostos estabilizantes acima mencionados.

Reafirmando resultados de literatura, a luz e o pH, foram fatores relevantes para a estabilidade das antocianinas. Em pH mais elevados (acima de 3) a estabilidade diminuiu e a presença de luz é prejudicial para tais pigmentos.

A cromatografia em papel, a despeito das novas tecnologias, é ainda muito eficiente e levou a obtenção de produtos com pureza satisfatória, e em quantidades razoáveis, uma vez que é uma técnica preparativa. Talvez a maior vantagem da cromatografia em papel seja o baixo custo em relação as demais, não sendo necessária estruturas sofisticadas ou equipamentos de alto custo para sua condução. A maior desvantagem talvez seja o tempo para purificação completa de misturas complexas, que exigem várias corridas, normalmente demoradas.

A colorimetria foi uma ferramenta muito útil para avaliar a estabilidade dos pigmentos. Além de informar sobre a durabilidade do pigmento, esclarece como o extrato se encontra em termos qualitativos de cor.

CAPÍTULO 3 – IDENTIFICAÇÃO DAS ANTOCIANINAS DO FRUTO AÇAÍ (*EUTERPE OLERACEA* M)

1. INTRODUÇÃO

As antocianinas e antocianidinas mostram uma absorbância intensa na região compreendida entre os comprimentos de onda de 465 a 550 nm (banda I) e uma absorbância menos intensa na região entre 270 e 280 nm (banda II), sendo os espectros bastante característicos para a identificar esses pigmentos, quando puros (BOBBIO e BOBBIO, 1992).

Muita informação pode ser conseguida pela simples observação da cor do pigmento em meio aquoso ou no cromatograma em papel. A cor geralmente mudar do vermelho para o azulado (violeta), enquanto seguindo a ordem das estruturas perlagonidina, cianidina, peonidina, malvidina, petunidina e delphinidina. Além disso, antocianinas com açúcar na posição C-5, usualmente fluorescem sob luz ultravioleta.

Antocianinas puras (e antocianidinas), dissolvidas em metanol-HCl 0,01% (v/v), mostram usualmente absorção máxima na faixa de 270-280 nm e 500-550 nm, com o valor percentual da razão A_{Uvmax}/A_{vismax} entre 30 e 70, dependendo do modelo de substituição (STRACK e WRAY, 1989). Espectroscopia de UV/Visível, aliada ao uso de determinados reagentes, permite obter boas informações sobre a estrutura da antocianina em estudo.

Após a extração e purificação do pigmento, alguns métodos de natureza física e química são empregados na tarefa inicial de identificação. Tradicionalmente a caracterização antociânica envolve reações como hidrólise ácida (total e gradativa), hidrólise alcalina, hidrólise enzimática e hidrólise pelo emprego de peróxido e com subsequente emprego de técnicas cromatográficas na avaliação dos produtos hidrolisados.

Técnicas cromatográficas têm sido exaustivamente empregadas na identificação qualitativa das antocianinas. Desde as mais antigas, cromatografias em papel e placas, até as mais usuais cromatografia líquida de alta eficiência e gasosa (GIUSTI e WROLSTAD, 1996; MAZZA et al., 1999; PETRI et al., 1997; BERENTE et al., 2000; FROYTLOG et al., 1998; DU e FRANCIS, 1973).

No entanto, a elucidação completa da estrutura antociânica, principalmente aquelas mais complexas, não pode ser efetuada apenas por técnicas cromatográficas. A caracterização estrutural geralmente envolve a

identificação da aglicona, moléculas de açúcar e grupamentos acila presentes e suas posições na estrutura. Tal objetivo é conseguido pela combinação de técnicas como espectroscopia no infravermelho (IR), em ultravioleta/visível (UV/Vis), de dicronismo circular (CD), de ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massa (MS) (JACKMAN e SMITH, 1996).

A identificação completa da estrutura antociânica é possível usando técnicas de RMN uni ou bidimensional. No entanto, grande quantidade de extrato é necessário para conseguir boa resolução dos sinais de hidrogênio associados às moléculas de açúcares. Por isso quando há pequena quantidade de amostra disponível, a espectroscopia de massa é a técnica preferida para identificar a estrutura antociânica (JACKMAN e SMITH, 1996).

A composição antociânica da maioria das frutas, é relativamente simples. Segundo IADEROZA et al. (1991), no açaí existem duas frações antociânicas principais que foram identificadas por métodos químicos e físicos como cianidina-3-glicosídeo e cianidina-3-rutinosídeo. Contudo, BOBBIO et al. (2000) identificaram como frações antociânicas principais do açaí a cianidina-3-arabinosídeo e cianidina-3-arabinosil-arabinosídeo possivelmente acilada.

Uma vez que há discordância nos resultados, resolveu-se efetuar a análise qualitativa do perfil antociânico do açaí utilizando, além das técnicas tradicionais que foram empregadas nos trabalhos citados, a cromatografia líquida de alto desempenho e a espectroscopia de ressonância magnética nuclear.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no laboratório de pigmentos e secagem/DTA UFV e no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear de Alta Resolução (LAREMAR– UFMG)

2.1. Material

A matéria-prima empregada para obtenção do extrato antociânico foi o fruto fresco de açaí obtidos no mercado de Belém-PA.

2.2. Métodos

2.2.1. Obtenção do extrato antociânico

O açaí fresco foi macerado em etanol 70 %, acidificado com HCl a pH 2, durante 48 horas, a temperatura ambiente (em torno de 30 °C), ao abrigo de luz. Após este tempo, o extrato foi filtrado em papel Whatman 1, por meio de um funil de Büchner. O extrato assim obtido foi imediatamente concentrado sob pressão reduzida, à temperatura de 38 ± 1 °C até se obter um volume final correspondente a 20 % do volume original.

2.2.2. Purificação do extrato antociânico

O material concentrado no item 2.2.1. foi submetido à extração líquido-líquido do material lipídico arrastado durante o processo de extração do pigmento. Para tal, utilizou-se funil de separação e éter etílico: éter de petróleo (1:1) para lavagem do extrato.

O extrato mencionado foi purificado por cromatografia descendente em papel Whatman 3 e os cromatogramas desenvolvidos com HCl 1 %, por um período aproximado de 10 horas. Ao fim, o papel foi seco ao ar, ao abrigo de luz. A região central, com a coloração mais intensa, foi cortada e eluída em etanol e, depois de concentrada em evaporador rotatório a 38 ± 1 °C, foi novamente cromatografada em papel Whatman 1. Os cromatogramas foram desenvolvidos em BFW (n-butanol: ácido fórmico: água, 15:2,5:2,4), por 96 horas. As zonas principais obtidas foram eluídas separadamente em metanol e concentradas sob pressão reduzida a 38 ± 1 °C, sendo imediatamente armazenadas ao abrigo de luz, à temperatura de -18 °C para uso posterior. A pureza das frações obtidas foi confirmada por CLAE.

2.2.3. Identificação das frações purificadas

2.2.3.1. Hidrólise ácida das zonas purificadas

A aglicona e o açúcar podem ser identificados por técnicas cromatográficas após a hidrólise ácida da antocianina.

Cerca de 1 mg de pigmento, referente a cada uma das frações purificadas, foi transferido para um tubo de ensaio e dissolvido em 2 mL de metanol e 2 mL de HCl 2 mol/L. A solução foi levada a banho-maria a temperatura de 90 °C por 60 minutos e após o resfriamento, as agliconas foram extraídas com 2 mL de álcool isoamílico (FRANCIS, 1982).

2.2.3.1.1. Identificação dos açúcares

A solução aquosa que permaneceu depois da extração da aglicona, contendo os açúcares livres resultantes da hidrólise ácida, foi cromatografada em papel Whatman 1, empregando-se como padrões as soluções de glicose, ramnose, xilose, galactose e arabinose a 1% (v/v), desenvolvidos por 24 horas (descendente) com as seguintes fases móveis: BAW (butanol:ácido acético: água; 4:1:5) e BPW (butanol:piridina:água; 8:2:1).

Depois de secos, os cromatogramas foram revelados com p-anisidina (solução p-anisidina e ácido ftálico 0,1mol/L em etanol 96 % (v/v)), aquecidos a 105 °C por 3 minutos, sendo determinados os R_f dos açúcares e observadas as cores das manchas desenvolvidas.

Para confirmar os resultados da CP foi utilizada também a cromatografia líquida de alta eficiência. Foi utilizado um cromatógrafo Shimadzu modelo LC-10 AD, com sistema manual de injeção (looping de 20 µL) e detector por índice de refração. Utilizou-se uma coluna µBondapak amino NH₂ (10 cm × 8,0 mm x 10 µm) e pré-coluna Radial Pak contendo a mesma fase estacionária (Waters). Foi utilizada uma fase móvel composta por acetonitrila:água (75:25), com fluxo de 1 mL/min.

2.2.3.1.2. Identificação das agliconas

A solução contendo a aglicona separada dos açúcares, foi concentrada a vácuo, para eliminar parcialmente o resíduo de álcool iso-amílico e posteriormente submetido a CLAE e comparada com padrão de antocianidina de fonte previamente estudada (STRINGHETA, 1992).

As amostras e o padrão foram dissolvidos em solução aquosa a 0,5 % (v/v) de ácido fosfórico, filtradas em membrana Milipore de nylon (S & S Filters), com diâmetro de poro de 0,2 μm , sendo imediatamente injetadas no cromatógrafo.

Foi utilizado o mesmo cromatógrafo citado em 2.2.3.1.1. equipado com uma coluna Lichospher 100 RP-18 (25 cm $\times$ 4,0 mm), com partículas de 5 μm (Merck) e pré-coluna CLC G-ODS (Shimadzu).

Foram utilizados dois solventes ((A) 0,5 % (v/v) de ácido fosfórico e (B) metanol) com o seguinte gradiente linear (1%/min) de eluição: A/B (95/5) até (40/60).

2.2.3.2. Hidrólise alcalina das zonas purificadas

A hidrólise alcalina foi empregada para verificar se as antocianinas em estudo possuíam grupamentos acilas. Aproximadamente 1 mg de pigmento foi transferido para tubo de ensaio contendo 2 mL de metanol . Adicionou-se 1 mL de NaOH 2N, e após saturação do frasco com nitrogênio, o tubo foi fechado e deixado em repouso por 2 horas à temperatura ambiente. Decorrido esse período a solução foi acidificada com 1 mL de HCl 2N.

Os possíveis ácidos foram extraídos com éter etílico e cromatografados em papel Whatman 1 e desenvolvidos em BAW (butanol:ácido acético: água; 4:1:5), BuN (n-butanol:hidróxido de amônio 2 % (v/v); 1:1) e n-butanol:ácido fórmico (95:5).

2.2.3.3. Hidrólise controlada

A hidrólise controlada das frações purificadas foi efetuada segundo metodologia descrita por FRANCIS (1982). Aproximadamente 5 mg do

pigmento purificado foram dissolvidos em 2 mL de metanol e 1 mL de HCl 2 mol/L em tubos de ensaio que foram levados ao aquecimento a 90 °C em banho-maria. Alíquotas de cada solução foram retiradas em 0, 4, 8, 12, 18, 26, 36, 60 e 90 minutos de reação e analisadas por cromatografia em papel Whatman 1. Os cromatogramas foram desenvolvidos em BAW (6:1:2) e HCl 1 % (v/v).

A hidrólise controlada é um processo que ajuda na confirmação da estrutura da antocianina.

2.2.3.4. Reações específicas de antocianinas

As antocianinas se comportam como ácido-base, ou seja, a pH ácido apresentam colorações vermelho ou violeta e em pH alcalino, azulada. Com esta prova simples é possível diferenciar as antocianinas das betalaínas. Para efetuar esses testes, soluções metanólicas com pH 0,5, 3, 5, 7 e 9 foram preparadas com o auxílio de HCl concentrado e NaOH. Um ml de pigmento purificado foi dissolvido nas soluções metanólicas a diferentes pH e deixadas em repouso por duas horas quando se determinou o espectro de absorção na região de 700 a 400 nm em espectrofotômetro Hitachi U – 2001.

A reação da antocianina com cloreto de alumínio foi efetuada segundo metodologia descrita por JACKMAN et al. (1987), para verificar a presença de antocianinas que possuam grupamento *orto*-hidroxilados livre, ou seja, a existência de hidroxilas vicinais. Foi determinado o espectro de absorção na região do visível das frações puras e das frações adicionadas de pequena quantidade de $AlCl_3$.

2.2.3.5. Cromatografia líquida de alta eficiência

O perfil antociânico do extrato antociânico de açaí, bem como a pureza das frações foram confirmada pelo emprego da CLAE.

O extrato e cada fração foram separadamente dissolvidos em solução aquosa a 0,5 % (v/v) de ácido fosfórico, filtradas em membrana Filtro Millipore Nylon (S & S Filters), com diâmetro de poro de 0,2 μ m, e imediatamente injetadas no sistema CLAE.

Para a separação foi utilizado o mesmo procedimento descrito em 2.2.3.1.2.

2.2.3.6. Análise por espectrofotometria no UV/visível

Os espectros de ultravioleta foram obtidos em um espectrofotômetro modelo Hitachi/U-2001 de feixe duplo. O extrato bruto e as frações purificadas foram dissolvidas em metanol-HCl 0,01% (v/v) e seu espectro determinado na região de 700 a 300 nm.

2.2.3.7. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Os espectros de ressonância magnética nuclear a 400 MHz foram obtidos em espectrômetro Bruker-400 (LAREMAR – UFMG, MG) . As técnicas empregadas foram uni-(^1H , ^{13}C , DEPT-135) e bi-dimensionais (COSY, HMQC).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Purificação do extrato antociânico

O extrato bruto lavado com éter, após ser cromatografado em papel Whatman 3 , utilizando-se HCl 1 % (v/v), apresentou uma única banda central de coloração vermelha intensa (b1) e uma cauda com coloração vermelho claro. A recromatografia em papel Whatman 1 da fração b1, e o desenvolvimento em BFW forneceu duas zonas distintas mais fortes, Z1 e Z2, e duas mais fracas localizadas a parte superior do papel. As zonas Z1 e Z2, após a eluição tiveram sua pureza confirmada por CLAE.

Os espectros de absorção UV-Vis do extrato bruto e das frações purificadas Z1 e Z2 dissolvidas em metanol-HCl 0,01 % (v/v) são mostrados na Figura 1. Pode-se observar pelos espectros que a forte absorção na região do UV diminui após as etapas de purificação. A eficiência da separação das frações por cromatografia de papel pode ser também constatada no Quadro 1 pela diminuição das razões $A_{\text{máx UV}}/A_{\text{máx Vis}}$ e $A_{410\text{V}}/A_{\text{máx Vis}}$ do extrato bruto (EB) em relação as zonas purificadas (Z1 e Z2).

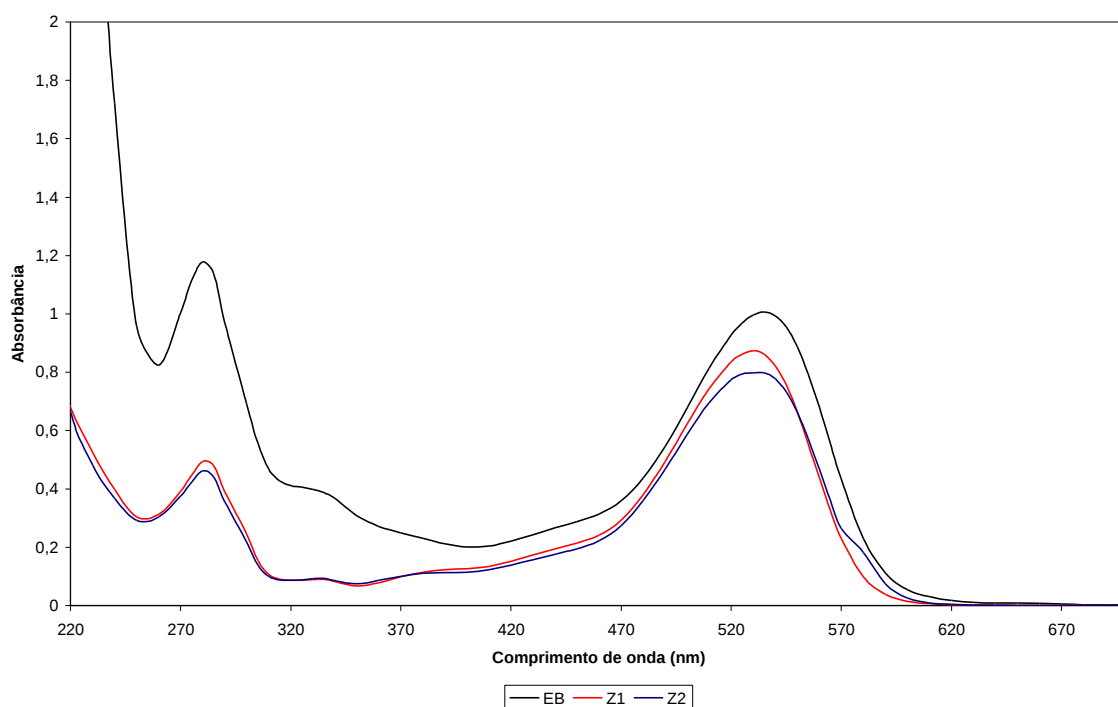


Figura 1 - Espectros de absorção UV-Vis do extrato bruto e das frações purificadas Z1 e Z2.

Quadro 1 – Características espectrais do extrato bruto (EB) e das frações purificadas (Z1 e Z2).

Características	EB	Z1	Z2
λ máx. visível (nm)	535	530	528
λ máx. UV (nm)	280	282	282
$A_{410}/A_{\text{máx. Vis}}$ %	20	22	22
$A_{\text{máx. UV}}/A_{\text{máx. Vis}}$ %	118	57	58

A razão $A_{410}/A_{\text{máx. Vis}}$ está relacionada com o teor de componentes degradados no extrato. Os chamados compostos marrons, oriundos da degradação antociânica, absorvem na região de 400 a 430 nm. Dessa forma quanto maior a quantidade desses compostos, maior será a citada razão. Pode-se observar que EB apresenta um valor maior que Z2 e Z1.

A razão $A_{\text{máx. UV}}/A_{\text{máx. Vis}}$ é uma relação que, além de ser importante para caracterizar o flavonóide como antocianina, dá idéia do grau de purificação de um extrato. A tendência quando se purifica um extrato é que haja progressivamente uma diminuição na intensidade da absorção na região do UV se comparado com a região do visível. É possível constatar que EB,

mais uma vez apresentou valor maior que Z2 e Z1, o que confirma o aumento do grau de purificação das amostras.

Os cromatogramas obtidos por CLAE (Figura 2) comprovam a eficiência da separação e purificação por meio da cromatografia em papel. Além disso, pelo perfil cromatográfico a 520 nm, é possível observar claramente que quase todo o pigmento presente no extrato antociânico de açai é formado apenas por duas antocianinas (arbitrariamente denominadas de Z1 e Z2).

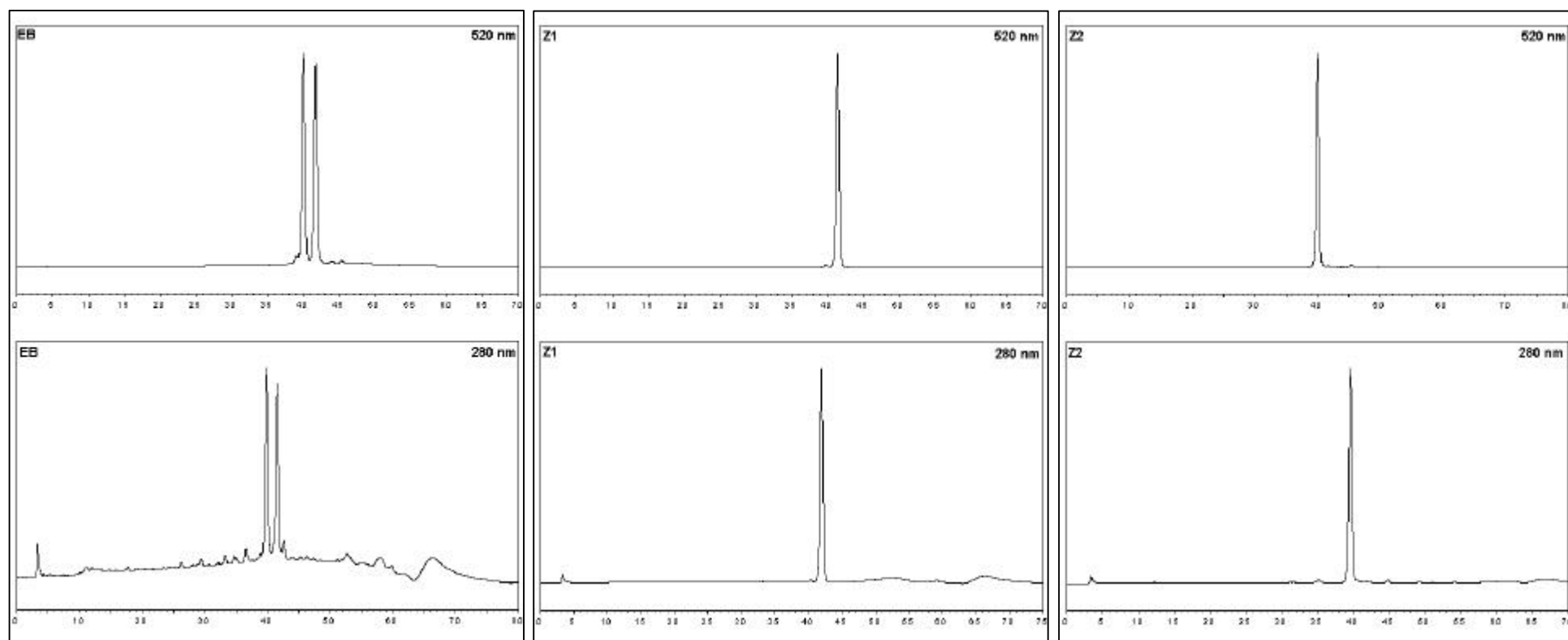


Figura 2 – Perfil cromatográfico dos extratos brutos e purificados de antocianina de açaí a 520 e 280 nm.

3.2. Identificação dos pigmentos purificados

O pigmento do açaí já foi identificado como sendo antocianina (BOBBIO et al., 2000; ROGEZ, 2000). Assim como no presente trabalho, alguns trabalhos constataram que o extrato bruto era formado por duas frações principais. No entanto, os trabalhos divergiram quanto à identificação das antocianinas. IADEROZA (1991) identificou as frações como cianidina-3-glicosídeo e cianidina 3-rutinosídeo, enquanto BOBBIO et al. (2000) identificou como cianidina 3-arabinosídeo e cianidina 3-arabinosil-arabinosídeo. Ambos os trabalhos utilizaram apenas reações químicas e técnicas cromatográficas.

Em vista desses resultados, foi decidido efetuar novos estudos na tentativa de elucidar a composição antociânica do açaí.

3.2.1. Reações específicas das antocianinas

Na reação de reconhecimento de antocianinas, ilustrada nos espectros de absorção (Figuras 3 e 4) indicou que as frações Z1 e Z2 possuem comportamento ácido-base, descartando-se assim a possibilidade de serem betalaínas, pigmentos nitrogenados de coloração vermelha e violeta de plantas, pertencentes à ordem centrosperma.

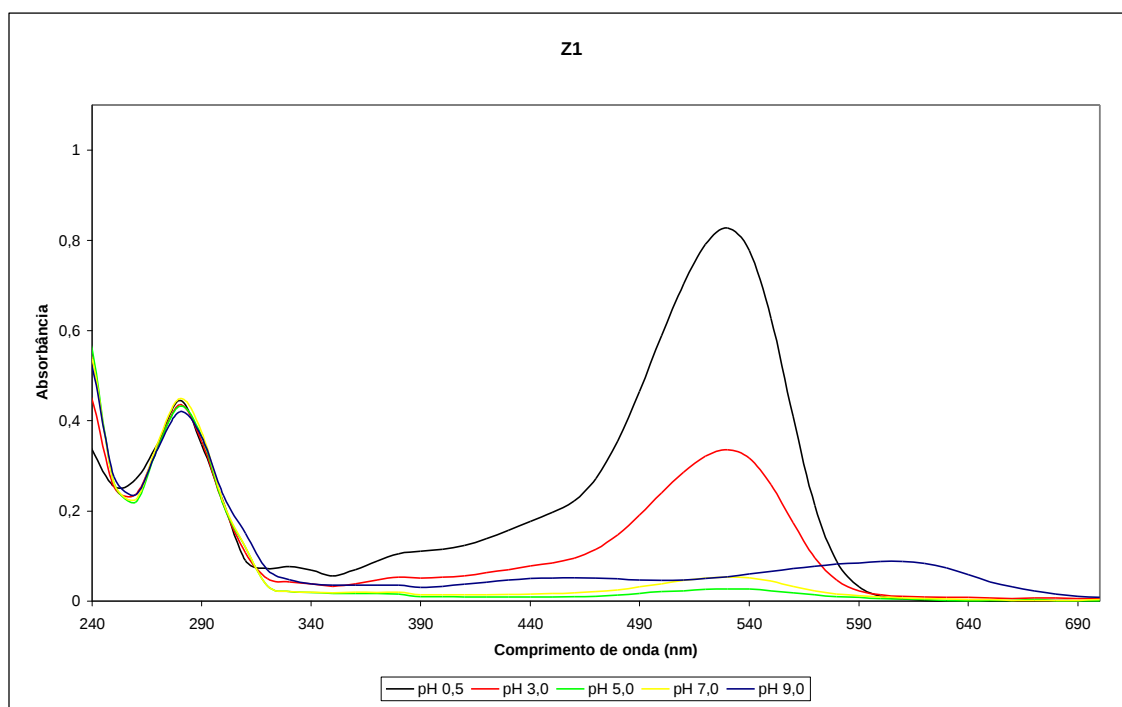


Figura 3 – Espectro de absorção UV/Visível da fração Z1 da antocianina a pH 0,5, 3, 5, 7, e 9.

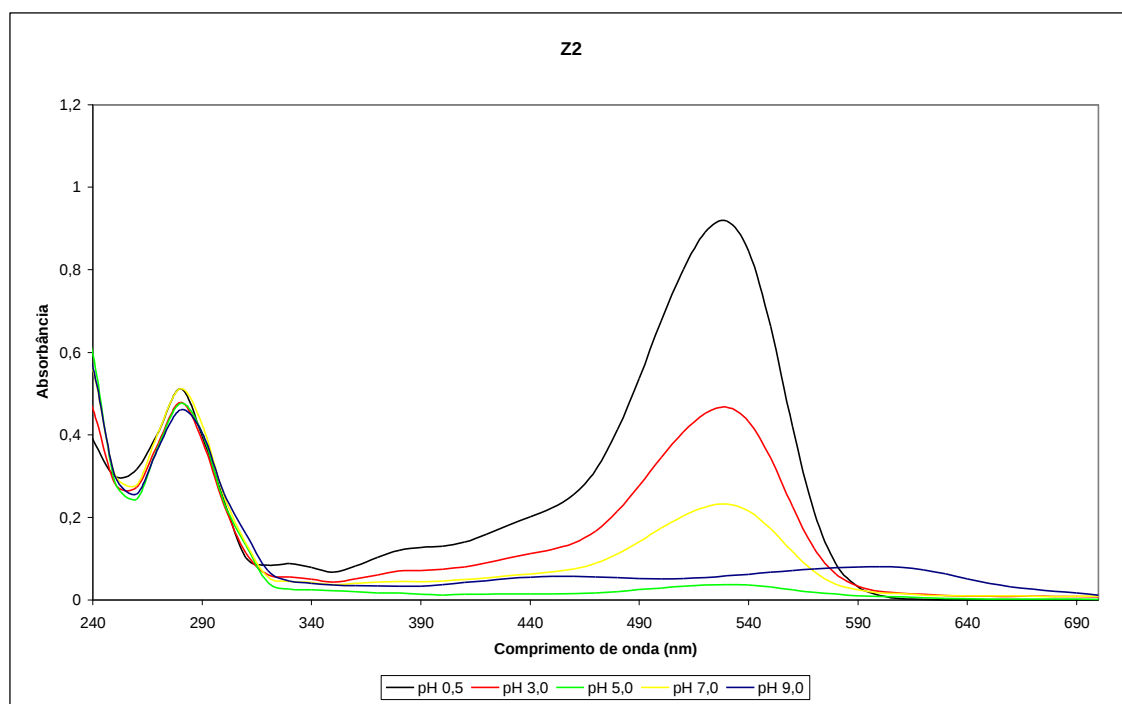


Figura 4 – Espectro de absorção UV/Visível da fração Z2 da antocianina a pH 0,5, 3, 5, 7, e 9.

As antocianinas que apresentam reação positiva com o cloreto de alumínio, com deslocamento batocrômico ($\Delta\lambda$ AlCl_3), dependendo do pH do

meio, possuem em sua estrutura grupos *orto*-hidroxilados, ou seja, hidroxilas vicinais no anel B, como é o caso das cianidinas e delphinidinas (FRANCIS, 1982). O extrato bruto de açaí apresentou reação positiva mudando sua coloração de vermelho escuro a violeta com a adição do AlCl_3 e mostrou deslocamento batocrômico (Figuras 5 e 6). Nas frações purificadas Z1 e Z2 foi observado o mesmo comportamento, indicando que ambas são cianidinas.

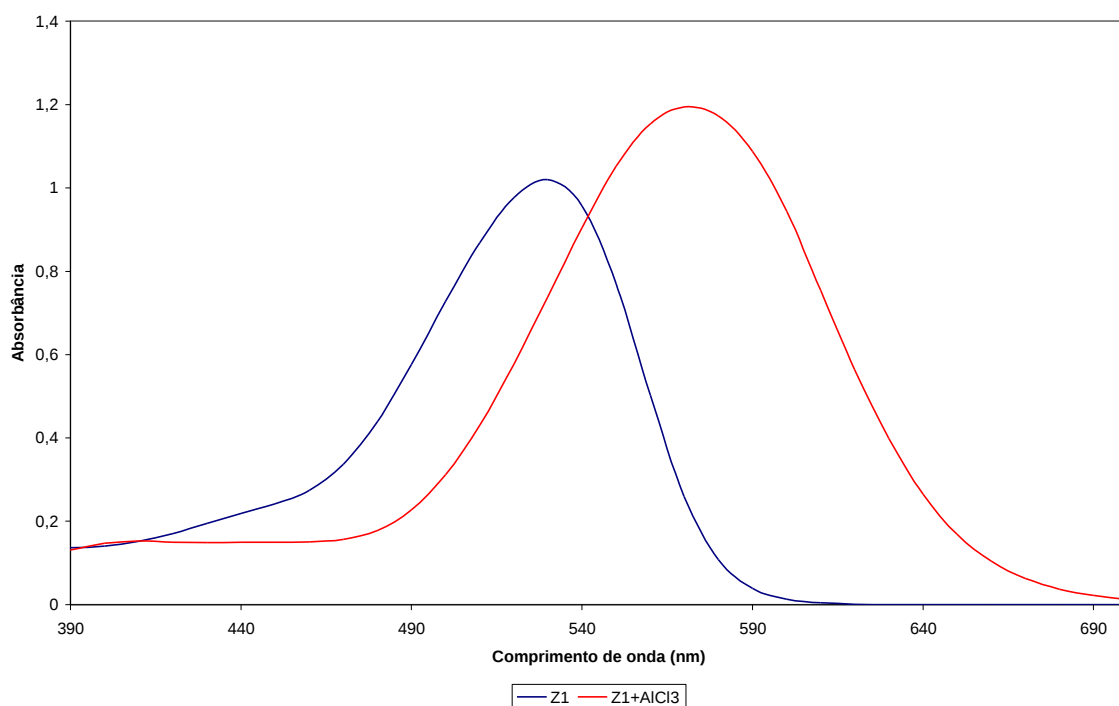


Figura 5 – Espectro de absorção UV/Visível da fração Z1 da antocianina em metanol-HCl 0,01 % (v/v), antes e após a adição de AlCl_3 .

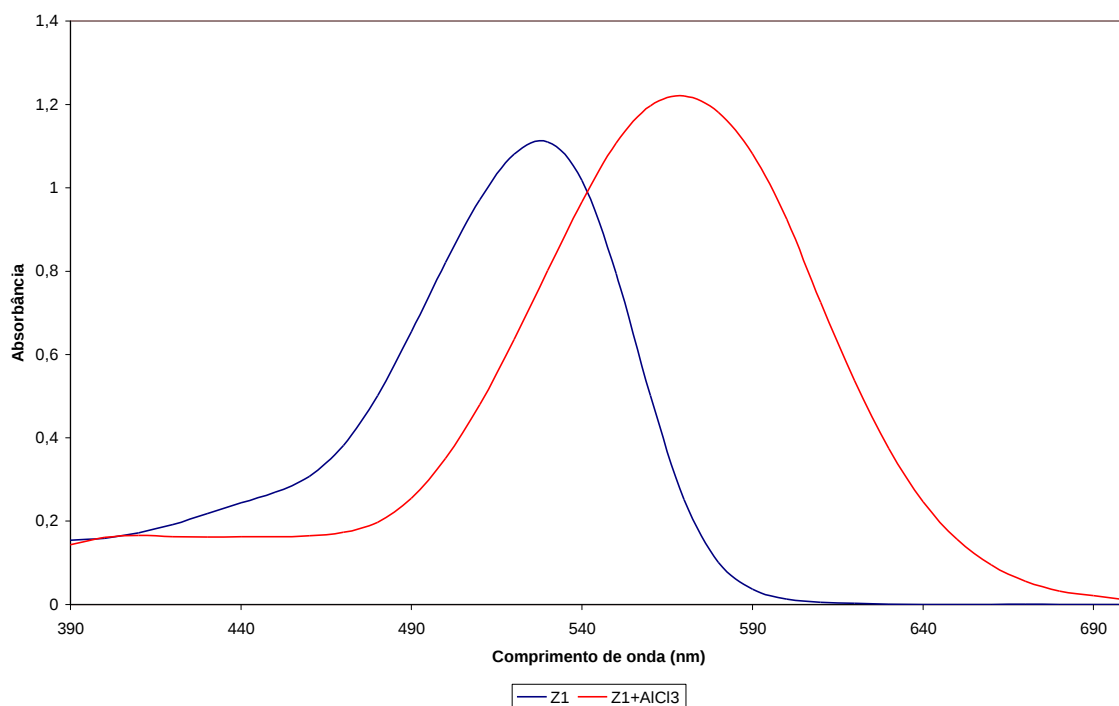


Figura 6 – Espectro de absorção UV/Visível da antocianina da fração Z2 em metanol-HCl 0,01 % (v/v) antes e depois da adição de AlCl_3 .

3.2.2. Características espectrais das antocianinas

As antocianinas apresentam normalmente, absorção máxima no visível, na faixa de 500-550 nm (FRANCIS, 1982), com valores de $A_{\text{maxUV}}/A_{\text{max Vis}} \%$ entre 30 e 70, para pigmentos puros dissolvidos em metanol-HCl 0,01 % (v/v). Os espectros obtidos do extrato bruto e das frações (Figura 1) e os resultados expostos no Quadro 2 foram característicos quanto à presença de antocianinas.

A confirmação da presença e ausência de ácidos aromáticos ou componentes acil na molécula de antocianina pode ser realizada por medidas espectrais (HARBONE, 1958). A presença de pico na região entre 310 e 335 nm é indicativo da presença de ácido (HARBONE, 1967). Os espectros UV/Vis do extrato bruto e das frações purificadas de açaí não apresentaram pico de absorção nessa faixa. As relações $A_{320}/A_{\text{max Vis}}$ (9,97 % a 10,90 %) e $A_{\text{maxUV}}/A_{\text{max Vis}}$ (57 % a 58,4 %) mostradas no Quadro 2 confirmam isso, conforme resultados também apresentados por CHOUNG et al. (2001).

A cromatografia de papel das soluções obtidas pela hidrólise alcalina das frações Z1 e Z2 também forneceram resultados negativos para presença

de compostos acil, indicando que as antocianinas em questão são simples, não aciladas.

Quadro 2 – Características espectrais do extrato bruto e das frações purificadas em metanol-HCl 0,01 % (v/v).

	Espectral				
	$A_{\max}$		$A_{\max UV}/A_{\max Vis} \%$	$A_{320}/A_{\max Vis} \%$	$A_{440}/A_{\max Vis} \%$
	λ_{530}	λ_{282}			
Z1	0,873	0,500	57,27	9,97	22,22
Z2	0,798	0,466	58,40	10,90	22,05

Nenhum dos pigmentos apresentou fluorescência quando expostos à luz ultra-violeta, sugerindo a ausência de substituintes na posição 5 (DRAETTA et al., 1985). A relação $A_{440}/A_{\max Vis}$ confirma isso, uma vez que antocianinas com glicosilação na posição C-5 apresenta valores para essa relação em torno da metade daquela encontrada para as antocianinas glicosiladas em C-3, no caso das cianidinas, em torno de 12% (STRACK e WRAY, 1989).

3.2.3. Hidrólise controlada

Nessa reação, o açúcar ligado sofre hidrólise de forma lenta aleatória. No caso de haver mais de um açúcar ligado, ou o açúcar ser di ou trissacarídeo, ocorre a formação de compostos intermediários que, ao serem cromatografados, apresentam distintos valores de Rf. Dessa forma, é possível chegar a algumas conclusões a cerca da estrutura do pigmento.

O cromatograma da fração Z1 apresentou, no tempo zero, apenas uma mancha correspondente à antocianina. Com o decorrer da hidrólise apareceram três manchas, correspondentes à antocianina e dois pigmentos intermediários. No final apresentou apenas uma mancha correspondente à antocianidina. Dessa forma, podemos concluir que o açúcar ligado trata-se de um dissacarídeo e os compostos apresentados no cromatograma seriam: antocianidina-3-diglicosídeo, antocianina-3-glicosídeo e antocianidina.

O cromatograma de Z2 apresentou, também no tempo zero, apenas uma mancha correspondente à antocianina. No entanto, os pigmentos cromatografados correspondentes às diversas etapas da hidrólise conduziram

à formação de apenas duas manchas e, ao final uma mancha. Podemos concluir, portanto, que se trata de uma antocianidina monoglicosídeo.

3.2.4. Identificação das agliconas

Os resultados do item 3.2.1. mostraram que a aglicona da fração Z1 e Z2 possuem hidroxilas vicinais, ou seja, possivelmente trata-se de cianidina, delfinidina ou petunidina. Trabalhos publicados na literatura (IADOREZA, 1991; BOOBIO et al, 2000) relataram que os pigmentos em questão tratam-se de cianidinas. Dessa forma, essa foi a primeira opção a ser investigada.

Usou-se como padrão a fração antociânica principal do capim gordura (*Melinis minutiflora* Pal de Beauv) identificada como cianidina (STRINGHETA, 1986).

Cada fração foi injetada no sistema CLAE separadamente e juntas. Os resultados são mostrados na Figura 7 e confirmam que a aglicona das frações Z1 e Z2 é a cianidina.

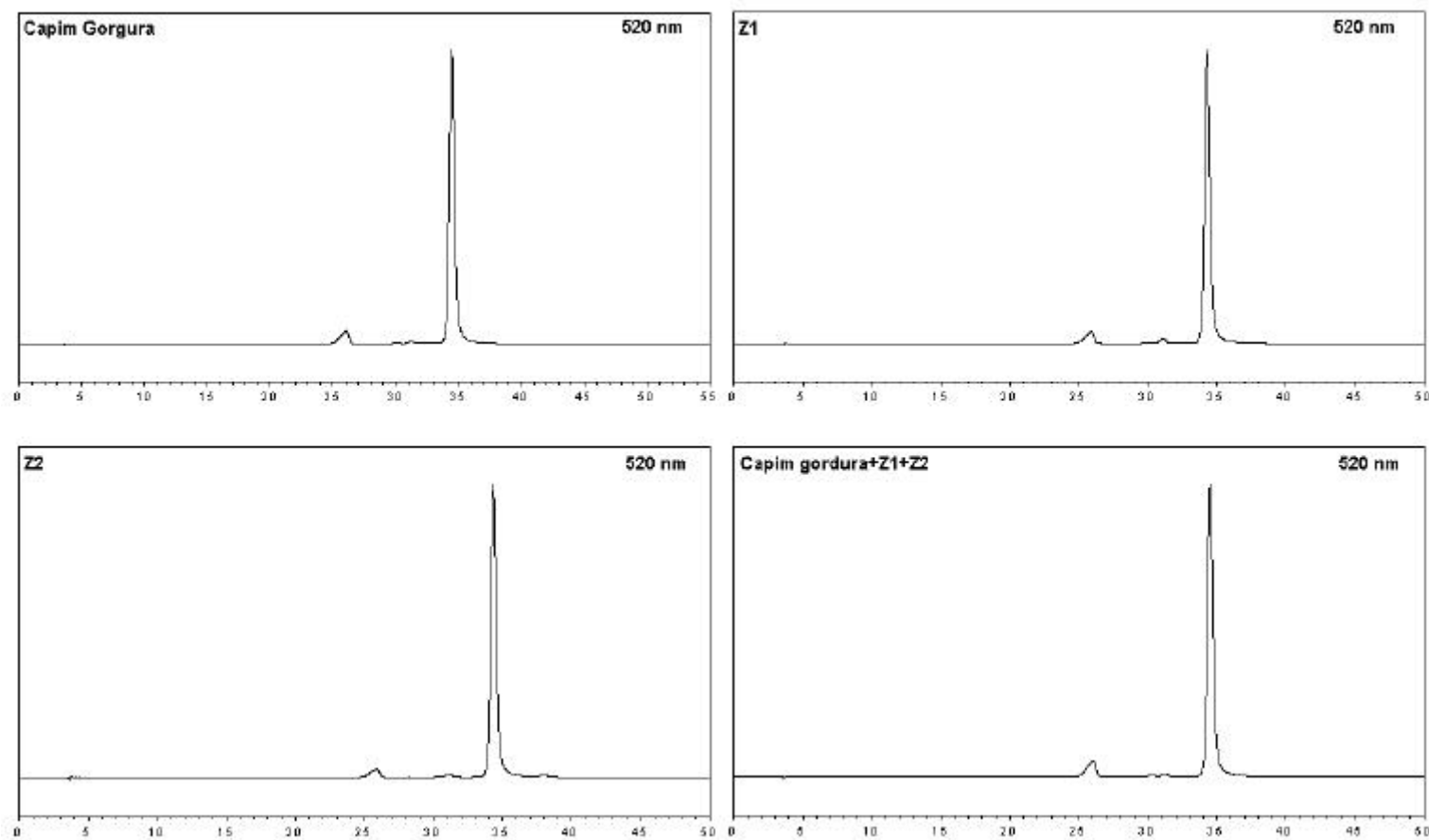


Figura 7 – Perfil cromatográfico, por CLAE, das antocianidinas das frações Z1 e Z2 do açaí e da fração principal do capim gordura.

3.2.5. Identificação dos açúcares

O Quadro 3 mostra os valores de Rf dos açúcares dos padrões e daqueles obtidos após hidrólise ácida das frações Z1 e Z2.

Quadro 3 – Valores de Rf das zonas purificadas Z1 e Z2.

Fase móvel	Rf ´ 100						Z1	Z2
	Arabinose	Xilose	Galactose	Glicose	Ramnose			
BPW	38	44	23	25	54	25	25	25
						54		
BAW	26	30	17	17	44	17	17	17
						44		

Os resultados mostram a presença de glicose para a fração Z2 e glicose e ramnose para a fração Z1, os quais foram confirmados por cromatografia líquida de alta eficiência.

3.2.6. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

3.2.6.1. Fração Z1

A análise do espectro de RMN de ^1H (Figura 8) evidenciou o caráter aromático e a presença de açúcares ligados ao núcleo antociânico. As análises dos espectros de RMN de ^{13}C (Figura 9) e DEPT 135 (Figura 10) indicaram ser vinte e cinco o número total de átomos de carbono, onde sete destes carbonos são quaternários (C), dezessete terciários (CH) e um secundário (CH_2).

O estabelecimento da correlação entre os carbonos e os hidrogênios a eles ligados foi feita pela análise do mapa de contornos HMQC (Figura 11).

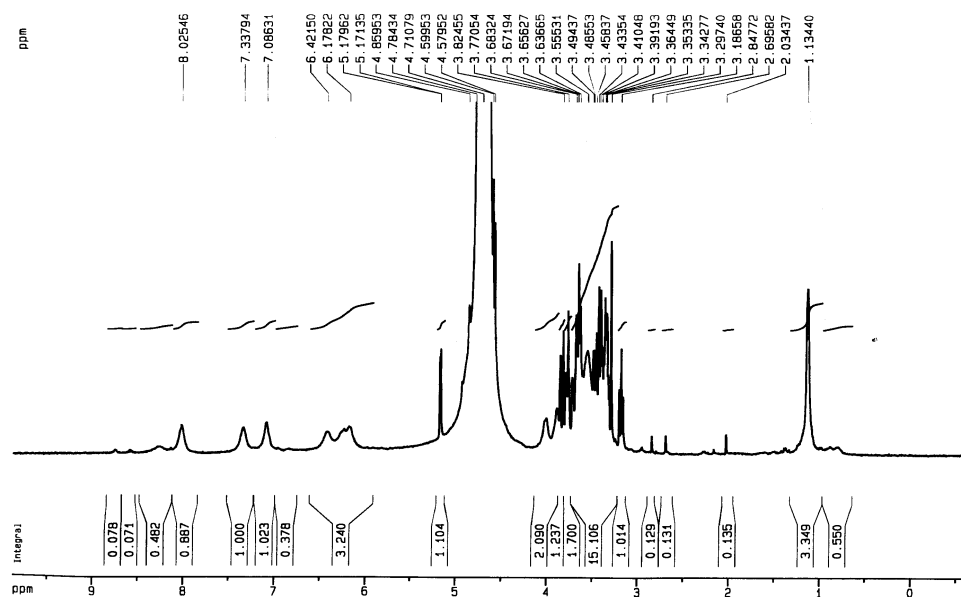


Figura 8 – Espectro de RMN a 400 MHz de Z1 [D₂O : TFA (9:1)].

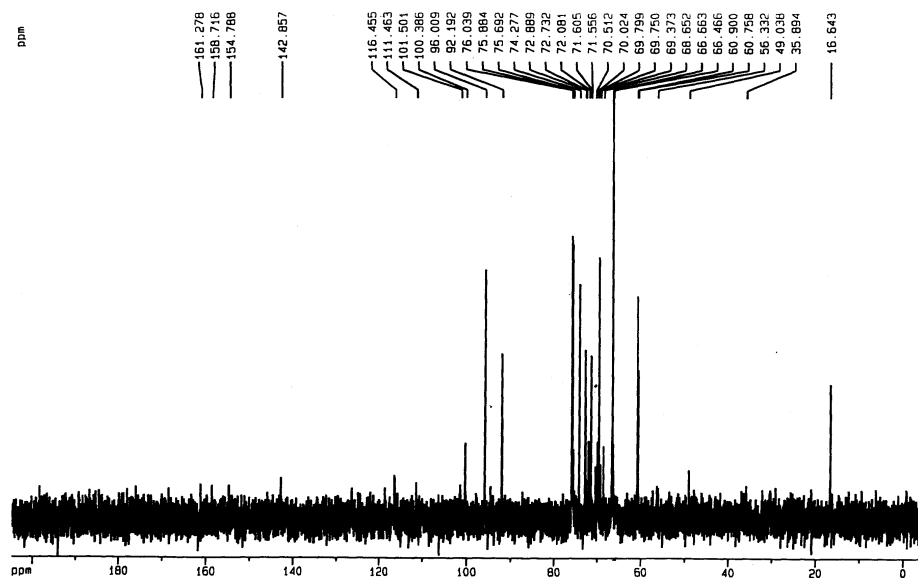


Figura 9 – Espectro de ¹³C a 100 MHz de Z1 [D₂O : TFA (9:1)].

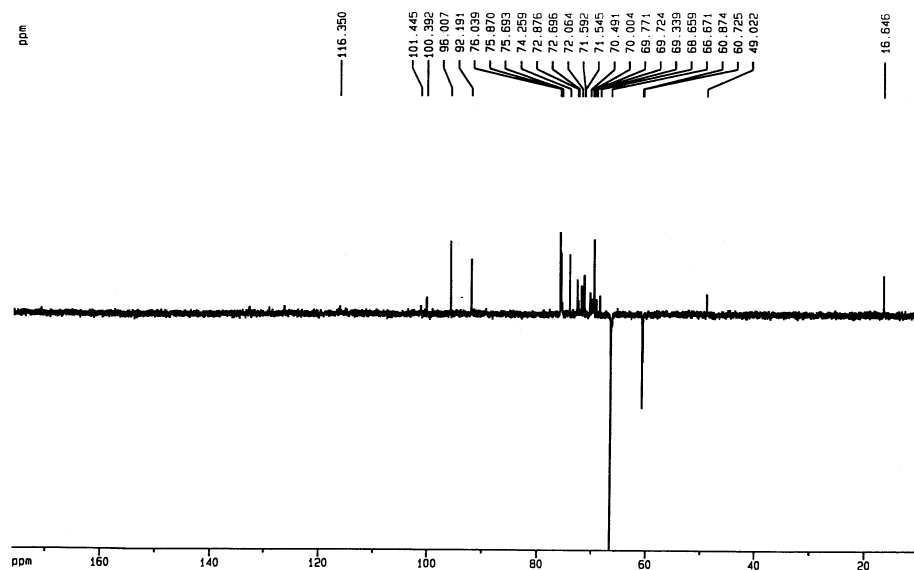


Figura 10 – Espectro de DEPT 135 a 100 MHz (^{13}C) de Z1 [D_2O : TFA (9:1)].

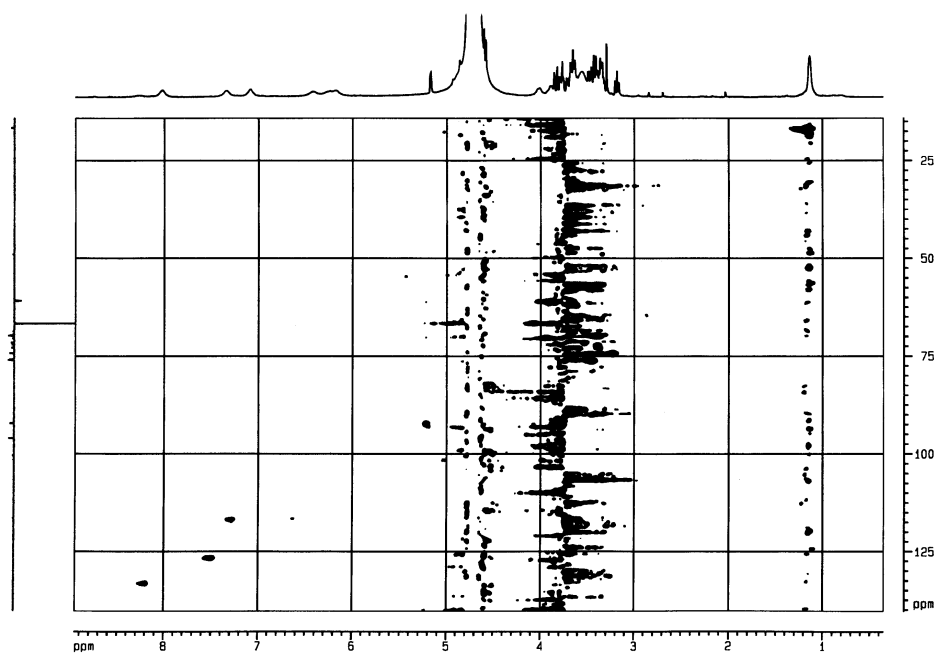


Figura 11 – Mapa de contornos HMQC a 400 MHz (^1H) de Z1 [D_2O : TFA (9:1)].

Assim, os sinais dos hidrogênios em δ 8,03 (sl), 6,18 (sl) e 6,24 (sl) apresentaram correlação com sinais de carbonos em δ 133,0, 96,0 e 92,2 relativos a C-4, C-6 e C-8, respectivamente, condizente com a subestrutura A (Figura 12).

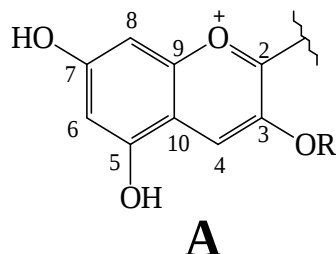


Figura 12 – Subestrutura A.

Observaram-se, ainda, sinais de hidrogênios em δ 7,09 (sl), 6,42 (sl) e 7,34 (sl), correlacionados com sinais de carbonos em δ 116,5, 116,4 e 126,4 atribuídos a C-2', C-5' e C-6', respectivamente, do anel B bissubstituído.

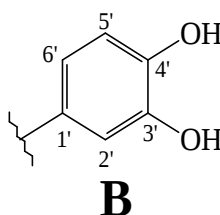


Figura 13 – Subestrutura B.

Outros sinais são relativos a hidrogênios metínicos e um metilênico de glicosídeos ligados ao núcleo antociânico. Os glicosídeos foram determinados principalmente pela correlação do hidrogênio em δ 1,13 (sl) com o carbono em δ 16,6 e do hidrogênio em δ 4,86 (s) com o carbono em δ 100,4, relativos a H-6'''/C-6''' e H-1'''/C-1''' do grupo α -ramnosila e pela correlação dos hidrogênios em δ 3,89-4,01 (m) com o carbono em δ 60,9, do hidrogênio em δ 3,19 (t, $J=8,5$ Hz) com o carbono em δ 69,8 e do hidrogênio em δ 5,18 (d, $J=3,3$ Hz) com o carbono em δ 101,4 relativos a H-6''/C-6'', H-4''/C-4'' e H-1''/C-1'' do grupo α -glicosila. A atribuição da configuração nos carbonos anoméricos destes glicosídeos foi baseada nas baixas constantes de acoplamento vicinais dos hidrogênios ($J_{1,2}$) (ODAKE,1992). Os outros sinais dos hidrogênios glicosídicos

apresentaram-se superpostos na região de d 3,30-3,89. O Quadro 4 mostra o resumo dos dados observados nos espectros.

Quadro 4 – Deslocamentos químicos (δ) de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) da fração Z1 [D_2O ; ref. 1,4-dioxano].

Aglicona	^{13}C	^1H
2	161,28	-
3	142,86	-
4	132,96	8,03 (sl)
5	157,91* ^{NO}	-
6	96,01	6,18 (sl)
7	168,54	-
8	92,19	6,24 (sl)
9	158,72	-
10	111,46	-
1'	118,69	-
2'	116,46	7,09 (sl)
3'	147,76* ^{NO}	-
4'	154,79	-
5'	116,37	6,42 (sl)
6'	126,43	7,34 (sl)
Açúcar A		
1''	101,45	5,18 (d, j=7,6)
2''	74,26	3,30-3,89
3''	75,87	3,30-3,89
4''	69,77	3,19 (t, j=8,5)
5''	76,04	3,30-3,89
6''	60,90	4,06 (m)
Açúcar B		
1'''	100,39	4,86 (s)
2'''	71,54	3,30-3,89
3'''	71,59	3,30-3,89
4'''	72,88	3,30-3,89
5'''	69,72	3,30-3,89
6'''	16,64	1,13 (s)

* não foi observado, valor correspondente esperado de acordo referência (LU e FOO, 2003).

Os carbonos C-5 e C-3' não foram observados no espectro de ^{13}C , possivelmente devido ao alto tempo de relaxação e/ou baixa concentração da amostra. No entanto, a análise geral (HPLC, UV/Vis, CP) dos dados permitiu identificar a fração **Z1** como sendo a cianidina 3- α -glicosídeo-(4 $\rightarrow$ 1)- α -ramosídeo, cuja a estrutura química é mostrada na Figura 14.

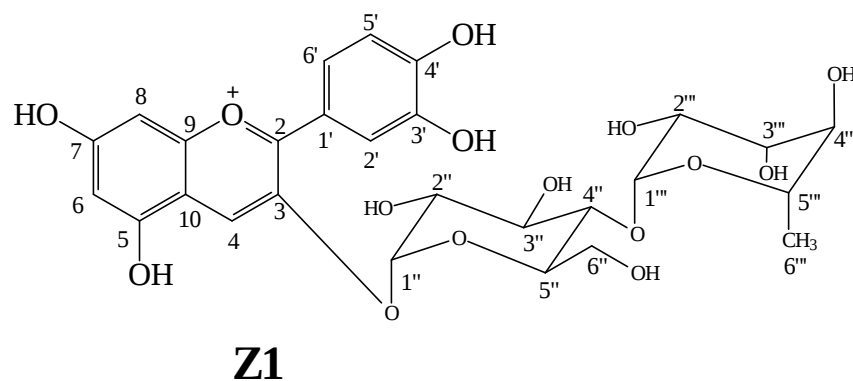


Figura 14 – Estrutura antociânica sugerida para a fração Z1.

3.2.6.2. Fração Z2

A análise do espectro de RMN de ^1H (Figura 15) evidenciou o caráter aromático e a presença de açúcar ligado ao núcleo antociânico. As análises dos espectros de RMN de ^{13}C (Figura 16) indicou ser vinte e um o número total de átomos de carbono, onde nove destes carbonos são quaternários (C), onze terciários (CH) e um secundário (CH_2).

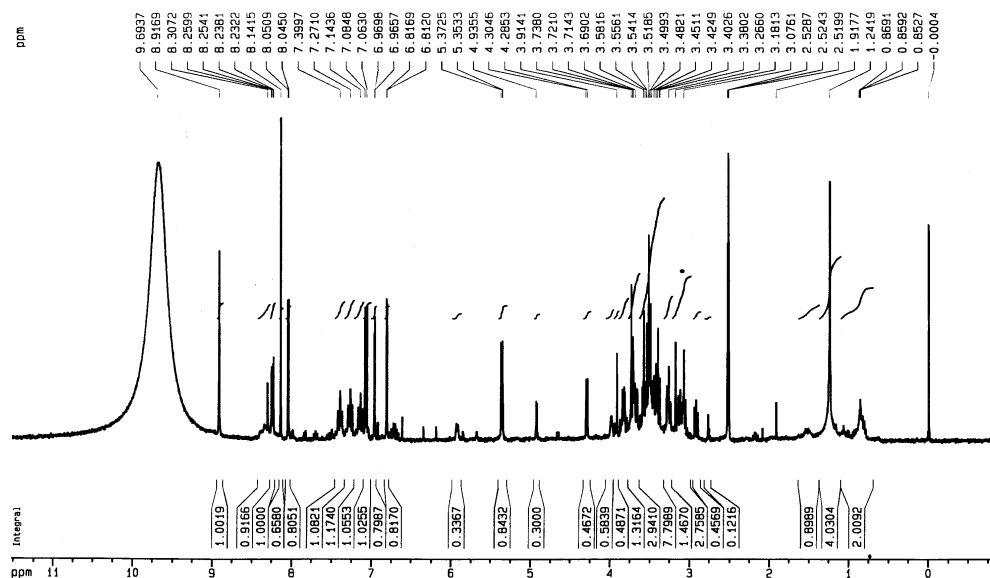


Figura 15 – Espectro de RMN a 400 MHz de Z2 [DMSO- d_6 : TFA (9:1)].

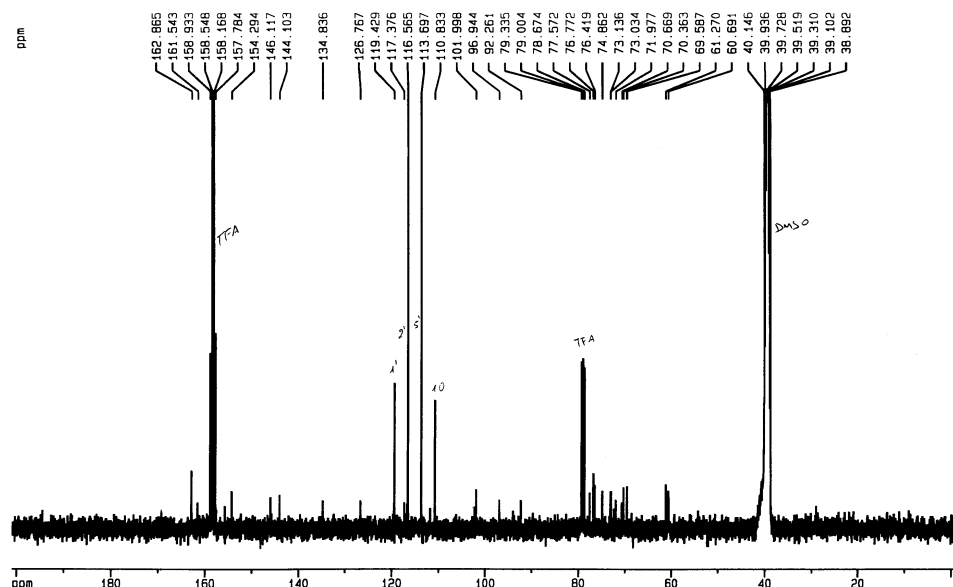


Figura 16 – Espectro de ^{13}C a 100 MHz de Z2 [DMSO- d_6 : TFA (9:1)].

O estabelecimento da correlação entre os carbonos e os hidrogênios a eles ligados foi feita pela comparação direta com os espectros da fração Z1, uma vez que fora previamente verificado por CLAE que se tratava do mesmo núcleo antociânico. Além disso, algumas interações entre hidrogênios escalarmente puderam confirmar as atribuições através da análise do mapa de contornos COSY (Figura 17). Assim, os sinais dos hidrogênios em δ 8,90 (s), 6,81 (d, $J=2,0$ Hz) e 6,97 (d, $J= 2,0$ Hz) apresentaram correlação com sinais de carbonos em δ 134,8, 96,9 e 92,3 relativos a C-4, C-6 e C-8, respectivamente, condizente com a subestrutura-**A** (Figura 18).

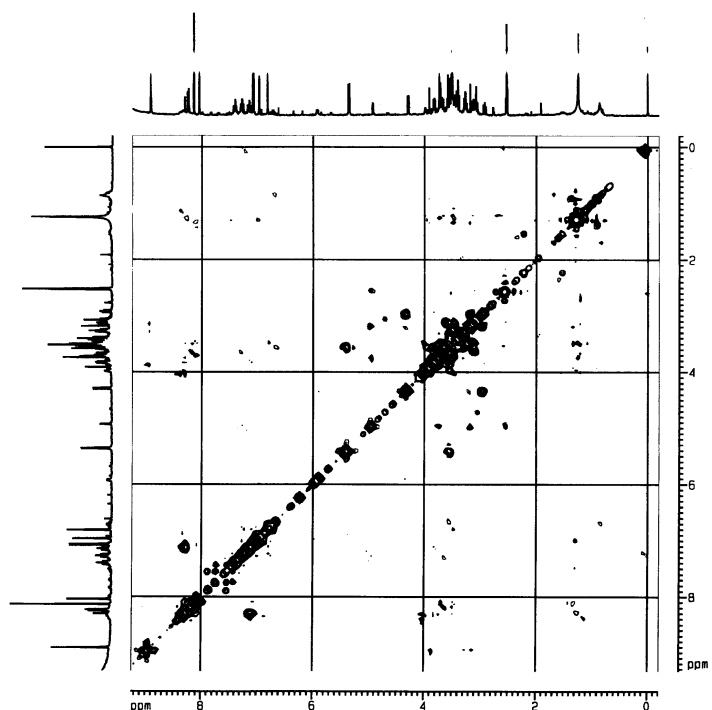


Figura 17 – Mapa de contornos COSY 45 a 400 MHz (^1H) de Z2 [DMSO- d_6 : TFA (9:1)].

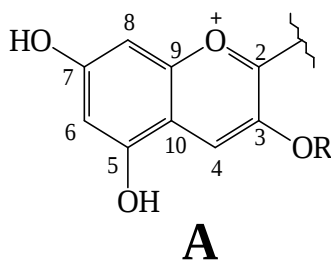


Figura 18 – Subestrutura A.

Observaram-se, ainda, sinais de hidrogênios em δ 8,05 (d, $J=2,3$ Hz), 7,07 (d, $J=8,7$ Hz) e 8,24 (dd, $J=8,7$ e 2,3 Hz) ligados a carbonos cujo sinais estão em δ 116,6, 113,7 e 126,8, atribuídos a C-2', C-5' e C-6', respectivamente, do anel-B bissubstituído (Figura 19).

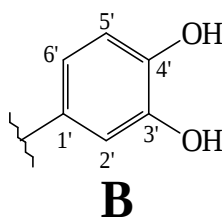


Figura 19 – Subestrutura B.

Outros sinais foram relativos a hidrogênios metínicos e um metilênico de glicosídeos ligados ao núcleo antociânico. O glicosídeo foi determinado principalmente pela detecção do sinal hidrogênio metínico em δ 5,36 (d, $J=7,7$ Hz), cujo carbono associado se encontra em δ 102,0. Os outros sinais dos hidrogênios glicosídicos apresentaram-se superpostos na região de δ 3,30-3,89 (m). O Quadro 5 mostra o resumo dos dados observados nos espectros.

Quadro 5 –Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H (400 MHz) e de ^{13}C (100 MHz) da fração Z2 [DMSO- d_6 :TFA (9:1);ref. TMS].

Aglicona	^{13}C	^1H
2	162,9	-
3	144,1	-
4	134,8	8,9 (sl)
5	155,8	-
6	96,9	6,81 (sl)
7	169,3	-
8	92,3	6,97 (sl)
9	161,5	-
10	110,8	-
1'	119,4	-
2'	116,6	8,05 (d, $j=2,3$)
3'	146,1	-
4'	154,3	-
5'	113,7	7,07 (d, $j=8,7$)
6'	126,8	8,24 (dd, $j=8,7$ e $2,3$)
Açúcar A		
1''	101,45	5,36 (d, $j=7,7$)
2''	74,26	3,06-3,98
3''	75,87	3,06-3,98
4''	69,77	3,06-3,98
5''	76,04	3,06-3,98
6''	60,90	3,06-3,98

A análise geral (CLAE, UV/Vis, CP) dos dados permitiu identificar a fração **Z2** como sendo a cianidina 3- β -glicosídeo, cuja estrutura química é mostrada na Figura 20.

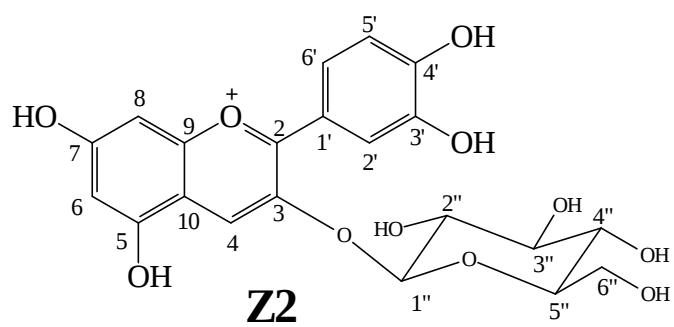


Figura 20 – Estrutura antociânica sugerida para a fração Z2.

4. RESUMO E CONCLUSÕES

O extrato de antocianinas do açaí (*Euterpe oleracea* M) é constituído de 2 frações principais distintas, denominados, arbitrariamente, de Z1 e Z2.

As frações Z1 e Z2 apresentaram comportamento ácido-base e a análise dos espectros UV/Vis confirmou que se tratava de antocianinas. A reação positiva com o cloreto de alumínio, com deslocamento batocrômico, mostrou que ambas as agliconas tratavam-se de cianidina. Tal resultado foi confirmado por CLAE, utilizando-se como padrão a aglicona da fração principal do capim gordura (*Melinis minutiflora* Pal de Beauv), previamente identificada como tal (STRINGHETA, 1991).

Os açúcares foram identificados, utilizando-se cromatografia em papel e por CLAE, como sendo glicose para a fração Z2 e glicose e ramnose para a fração Z1.

A ausência de pico de absorção em 310 nm foi indicativo de que ambas as frações não eram aciladas, o que foi confirmado pelo cromatograma em papel após a hidrólise alcalina, revelando a inexistência de ácidos nas moléculas.

Os resultados da RMN confirmaram que as frações Z1 e Z2 tratavam-se de cianidina-3-rutinosídeo e cianidina-3-glicosídeo, respectivamente.

CAPÍTULO 4 – FORMULAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE CORANTE DE AÇAÍ (*EUTERPE OLERACEA* M)

1. INTRODUÇÃO

Comercialmente, o corante de antocianinas é obtido principalmente a partir de cascas de uva, que são sub produtos da indústria de sucos e vinhos. O método consiste na extração com água sulfitada, dessulfitação, purificação parcial e concentração, seguida de atomização para obtenção de um pó hidrossolúvel (FRANCIS, 1999).

Vários trabalhos têm sugerido formas de aumentar a estabilidade do produto final. A copigmentação é uma das formas citadas (JACKMAN et al., 1987; WROLSTAD, 2000; MARKAKIS, 1982). PERIN (1999) estudou a estabilidade dos extratos bruto e purificado obtidos de berinjela (*Solanum melongena* L.) em função dos efeitos degradativos da luz e temperatura em diferentes níveis de pH, com a adição de ácido gálico, beta-ciclodextrina, ácido tânico e rutina, para atuar como copigmentos em três razões molares de copigmento/pigmento e verificou que os copigmentos apresentaram efeitos distintos nas diversas situações de armazenamento avaliadas.

Dada a importância e relevância de estudos com pigmentos naturais, o objetivo deste trabalho é desenvolver e estudar a estabilidade de formulações de corante de açaí, obtidas pelo uso de matérias-primas e métodos físicos diferentes. Foram avaliados o efeito do emprego da maltodextrina e da beta-ciclodextrina como agentes estabilizantes e o efeito da secagem da formulação como um agente promotor de uma maior interação pigmento agente estabilizante, pelos métodos de atomização por “spray drier” e liofilização.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Pigmentos Naturais e Secagem da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa– MG.

2.1. Material

As matérias-primas empregadas foram maltodextrina e β -ciclodextrina, como veículo e estabilizantes, e extrato concentrado de antocianina de açaí

como corante. O material utilizado para embalagem do produto foi PET/Al/PE(polietileno tereftalato+ alumínio+polietileno).

A beta-ciclodextrina usada neste trabalho encontrava-se sob forma de pó branco, finamente dividido e inodoro. A maltodextrina apresentou características similares, ou seja, pó branco de fácil dissolução com dextrose equivalente (DE) 20 e sabor levemente doce.

2.2. Métodos

2.2.1. Obtenção do extrato antociânico

O extrato antociânico usado nesta etapa foi obtido a partir do fruto do açaizeiro fresco, que foi macerado em etanol 70% acidificado com HCl a pH 2, durante 48 horas, a temperatura ambiente (em torno de 30 °C), ao abrigo de luz. Após este tempo o extrato foi filtrado em papel Whatman 1, por meio de um funil de Büchner. O extrato assim obtido foi imediatamente concentrado sob pressão reduzida à temperatura de 38 ± 1 °C até se obter um volume final correspondente a 20% do volume original.

O material concentrado foi submetido à extração líquido-líquido para remoção do material lipídico arrastado durante a extração do pigmento. Para tal, utilizou-se funil de separação e o solvente éter etílico: éter de petróleo (1:1) para lavagem do extrato. Esse extrato foi purificado por cromatografia descendente em papel Whatman 3 e os cromatogramas desenvolvidos com HCl 1% (v/v), por um período aproximado de 10 horas. O papel foi deixado secar ao ar, ao abrigo de luz. A região central, com a coloração mais intensa, foi cortada e eluída em etanol e, depois de concentrada em evaporador rotatório (38 ± 1 °C), foi determinado o teor de pigmentos de acordo com metodologia de FULEKI e FRANCIS (1968a). O restante do extrato foi imediatamente armazenada ao abrigo de luz, à -18 °C, para posterior uso.

2.2.2. Obtenção do corante formulado

A partir dos agentes veículos e estabilizantes, maltodextrina e beta-ciclodextrina, foram efetuadas duas formulações descritas no Quadro 1. O teor

de maltodextrina foi escolhido segundo sugestão da literatura (MAIN et al., 1978) e o da betaciclodextrina de acordo com a sua solubilidade em água, em torno de 1,8 mg/100 mL. A Figura 1 mostra o fluxograma de obtenção do corante de açaí.

Quadro 1 - Formulações empregadas.

Formulações		
Formulação	Concentração dos carboidratos	Relação extrato corante/carboidrato (v/p)
MD	30% maltodextrina DE 20	1:2
MDBeta	30% maltodextrina DE 20, 1,5% betaciclodextrina	1:2

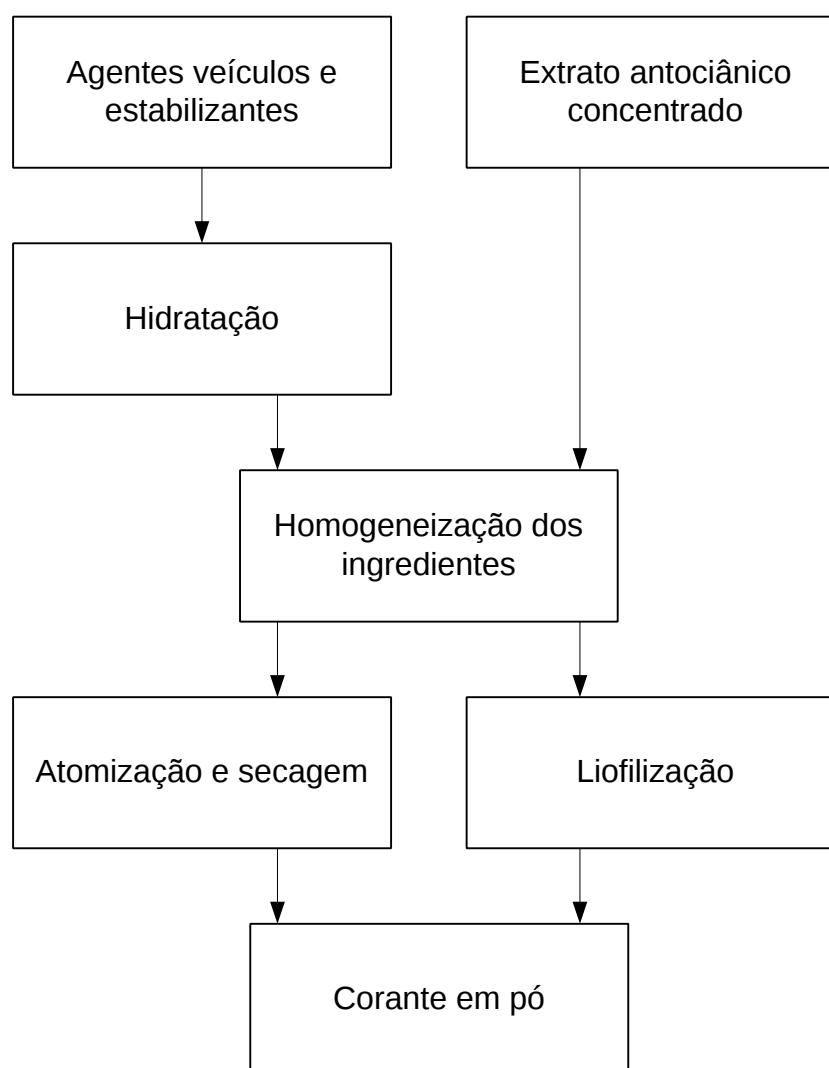


Figura 1 – Fluxograma de processamento do corante em pó.

O procedimento utilizado para o preparo das formulações foi: (1) hidratação dos agentes veículos/estabilizantes por 2 horas à temperatura ambiente. Para cada formulação foram dissolvidos 300 g de carboidrato para 1000 mL de água, exceto para beta-ciclodextrina, sendo dissolvidos 15 g em 1000 mL de água; (2) adição do extrato antociânico; (3) homogeneização da formulação em liquidificador por 1 minuto; (4) ajuste do pH das soluções para 1,5 com HCl.

Um terço da formulação foi armazenada sob refrigeração para uso como testemunha nos testes de estabilidade. Um terço foi submetido à atomização em “spray drier” e o restante à liofilização. As condições de secagem por atomização foram: vácuo de 30 mbar; temperatura do ar de entrada 170 ± 10 °C; temperatura do ar de saída de 90 ± 5 °C; e pressão manométrica positiva. A quantidade de emulsão atomizada para cada amostra foi em média de 150 mL, e o tempo de secagem variou de 15 a 20 minutos. O processo foi efetuado com três repetições para cada formulação.

As condições de secagem por liofilização foram: pressão 4,2 mm Hg; temperatura do condensador de -40 ± 5 °C. O tempo de processo foi de aproximadamente 7 horas. O material se encontrava congelado na forma de uma fina camada (5 mm) em placas de vidro com diâmetro de 10 cm.

Os produtos recolhidos na forma de pó foram acondicionado em sacos PET/Al/PE (polietilenotereftalato + alumínio + polietileno), fechados a vácuo e armazenados sob refrigeração, em temperatura de -18 °C.

2.2.3. Efeito da secagem sobre o pigmento

Para determinação de um possível efeito deletério da alta temperatura empregada no processo de secagem por atomização em “spray drier” sobre o pigmento, foram efetuadas análises espectrofotométricas e colorimétricas, tanto com os extratos formulados como com os corantes em pó, partindo-se de uma formulação básica de maltodextrina + extrato antociânico + água.

Do extrato formulado foi retirado um volume de 5 mL. Este material foi diluído até 50 mL com água destilada, de forma a se obter 1,5 g de sólidos totais. Um grama e meio de corante em pó foi pesado e diluído até 50 mL com água destilada. Ambas as soluções foram caracterizadas colorimetricamente

pela leitura direta de reflectância das coordenadas “L*”, “a*” e “b*”, empregando a escala Cielab em colorímetro (Color Quest XE de Hunter) e seu teor antociânico determinado segundo metodologia de FULEKI e FRANCIS (1968a).

2.2.4. Caracterização do corante formulado

O teor antociânico das formulações, antes da secagem, foi determinado segundo metodologia de FULEKI e FRANCIS (1968b). Alíquotas de formulados foram diluídas em tampão pH 1 e pH 4,5, sendo efetuada a leitura de absorbância em espectrofotômetro Hitachi U-20001.

2.2.5. Caracterização do corante em pó.

O teor antociânico das formulações, após da secagem, foi efetuada segundo metodologia de FULEKI e FRANCIS (1968b). O pó foi solubilizado em tampão pH 1 e pH 4,5, respectivamente e foi efetuada leitura em espectrofotômetro Hitachi U-2001.

A cor foi qualificada por meio da leitura direta de reflectância das coordenadas “L”, “a” e “b”, empregando a escala Cielab em colorímetro Color Quest XE de Hunter.

2.2.6. Avaliação da estabilidade

Cinco gramas do corante em pó foram diluídas em 250 mL de tampão citrato/fosfato a pH 3,5. No caso da testemunha (formulação na forma líquida que não foi submetida à secagem) utilizou-se 17 mL para 250 mL de tampão.

As soluções de antocianinas em pH 3,5 foram acondicionadas em frascos de vidros hermeticamente fechados. Parte das amostras foi colocada em um suporte em fila dupla, posicionados entre duas lâmpadas fluorescentes de 40 W, 2.500 lux, correspondente à luz do dia, guardando distância de 10 cm entre si, em ambiente com temperatura controlada em torno de 25 °C. O restante dos frascos foi levado a banho-maria em temperatura de 65 ± 1 °C, em ausência de luz.

Periodicamente, no intervalo de seis horas e seus múltiplos, as amostras eram recolhidas para determinação da cor (colorímetro Colorquest XE do sistema Hunter), com leitura direta por reflectância das coordenadas “L*” (luminosidade), “a*” (intensidade de vermelho e verde) e “b*” (intensidade de amarelo e azul). Para efetuar a leitura, empregou-se uma cubeta de quartzo com capacidade de 50 mL. Após cada leitura, as amostras eram descartadas. O intervalo de leitura entre as amostras expostas a condições diferentes de armazenagem era estabelecido de acordo com o comportamento delas diante de cada situação (para maior degradação, menor o intervalo). Cada uma das formulações submetida às condições citadas foi avaliada em três repetições.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Teor antociânico do extrato

Para efeito de formulação, foram analisados duas bateladas de extratos purificados de acordo com a metodologia citada no item 2.2.1. O Quadro 1 mostra os resultados obtidos quanto ao teor antociânico destes extratos.

Quadro 1 – Teor antociânico dos extratos utilizados para obtenção das formulações.

Extrato	Teor de antocianinas (mg/mL)
MB* 1	1,567
MB* 2	2,156

* O termo MB refere-se ao estado de purificação do extrato que comumente é denominado de mata-borrão.

3.2. Efeito da secagem sobre o pigmento

O Quadro 2 mostra os resultados de qualificação da cor e teor antociânico para o corante formulado e para o corante na forma de pó, obtido por secagem por “spray-drier” e ressuspendido em água.

Quadro 2 – Características colorimétricas e teor de antocianinas para os produtos formulados antes e após a secagem por “spray-drier”.

Amostras	L*	a*	b*	c*	h*	Antocianinas (mg/mL)
Extrato Formulado	24,26	13,06	2,99	13,40	-0,225	0,336
Corante em pó	22,80	7,89	0,91	7,94	-0,115	0,294

Cerca de 12,5% do pigmento foi perdido durante a secagem. Observou-se também, mudança no perfil colorimétrico, sendo que a amostra tornou-se menos saturada ao mesmo tempo em que apresentou pequena mudança na tonalidade, confirmando certa degradação do pigmento durante o processo de secagem.

3.2. Caracterização do corante formulado e em pó

Cada formulação foi obtida pela mistura de 15 mL de pigmento puro concentrado com 85 mL de solução aquosa com 30 % de sólidos solúveis (veículos). Uma vez que se partiu de duas bateladas de corantes concentrados, e com teores antociânicos distintos, as formulações finais apresentaram concentrações de pigmentos diferentes. O Quadro 3 mostra o teor de antocianinas para todas as formulações testadas, antes e após a desidratação.

Quadro 3 – Teor de antocianinas para as formulações antes e após a secagem.

Amostra	Teor de antocianina (mg/mL)		Índice de degradação (ID)
	Extrato formulado	Produto em pó ressuspensionado	
MD-A	0,336	0,294	1,02304
MD-L	0,336	0,329	1,00017
MDBeta-A	0,235	0,224	1,01144
MDBeta-L	0,235	0,234	1,00001

O índice de degradação (ID), é calculado pela razão entre o teor de antocianina calculado pelo método simples e o teor calculado pelo método diferencial de pH (FULEKI e FRANCIS, 1968b). Podemos observar que para todos os produtos em pó, esse valor é bem próximo de 1, que significa pouca presença de componentes degradados. Os valores de ID encontrados para as

formulações foram inferiores aos encontrados por MAIN ta al. (1978), para as mesmas condições de secagem (temperatura de entrada e saída do ar de secagem) e teor de sólidos solúveis, para os pigmentos de uva, significando que menos componentes degradados foram gerados na atomização do extrato de açaí.

3.3. Avaliação da estabilidade

3.3.1. Efeito da luz

Como já mencionado no capítulo II, item 3.2.3. deste trabalho, num processo degradativo, ao longo do tempo, a antocianina pode sofrer duas mudanças básicas quanto a sua coloração: tornar-se gradativamente menos intensa pela perda de saturação e ou mudar de tonalidade pela formação de compostos de degradação com cores diferentes da original. Desta forma, é importante considerar tanto as variações de “c” quanto de “h”. A forma como a antocianina alterará sua cor depende entre outros fatores da composição do extrato.

As Figuras 1 e 2 apresentam os gráficos do comportamento das coordenadas colorimétricas “c*” e “h*”, para as formulações e suas respectivas testemunhas solubilizadas em tampão citrato-fosfato pH 3,5, armazenados em presença de luz e temperatura de 25 ± 1 °C.

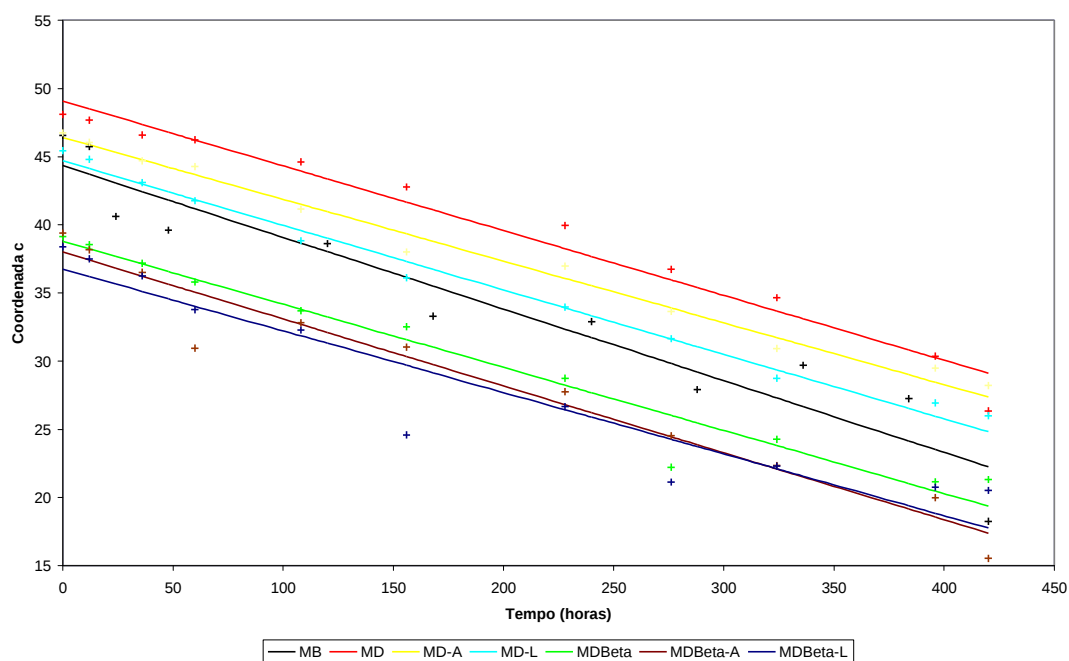


Figura 1 – Comportamento de “ c^* ” (cromaticidade) das formulações e testemunhas solubilizadas em tampão pH 3,5, ao longo do tempo, em presença de luz, à temperatura ambiente (em torno de 25 °C).

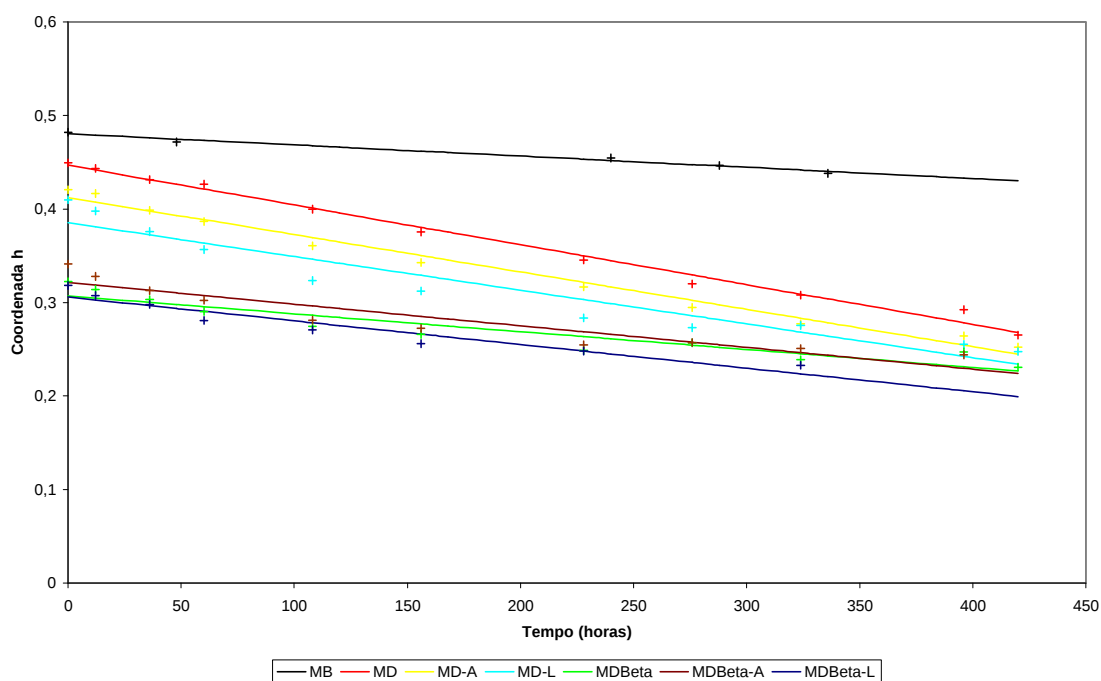


Figura 2 – Comportamento de “ h^* ” (tonalidade) das formulações e testemunhas solubilizadas em tampão pH 3,5, ao longo do tempo, em presença de luz, à temperatura ambiente (25 ± 1 °C).

Observando-se a Figura 1 pode-se constatar que as variações sofridas pelas amostras são bastante similares, quase não sendo percebida diferenças de comportamento quanto a cromaticidade. Pode-se destacar ligeira tendência de queda mais acentuada para a amostra MB (extrato puro concentrado, sem veículo dissolvido apenas em tampão), seguida pela amostra MDBeta-A (formulação atomizada, cujo veículo foi maltodextrina + beta-ciclodextrina).

Quando se observa a tonalidade das amostras (Figura 2), verifica-se que a amostra MB sofreu a menor variação de h^* ao longo do tempo, seguida da amostra MDBeta (extrato puro concentrado, adicionado de veículo maltodextrina e betaciclodextrina, e apenas dissolvido em tampão). As amostras MDBeta-A e MDBeta-L (formulação liofilizada, cujo veículo foi maltodextrina + beta-ciclodextrina) apresentaram comportamento similares, com variação intermediária. As amostras MD-L (formulação liofilizada, cujo veículo foi maltodextrina), MD-A (formulação atomizada, cujo veículo foi maltodextrina) e MD (extrato puro concentrado adicionado de veículo maltodextrina e apenas dissolvido em tampão) também apresentaram comportamentos similares com variação ligeiramente superiores às demais.

Tanto para a coordenada " c^* ", quanto para a coordenada " h^* ", a tendência de variação observada para as amostras ao longo do tempo sob o efeito da luz foi pequena e, de fato, nenhuma amostra se destacou quanto a apresentação de maior estabilidade. Ao contrário do que foi observado por ROSA et al. (2000), para outra fonte antociânica, o efeito benéfico da adição de maltodextrina e atomização, no presente, não foi verificado. Não houve diferenças estas formulações.

Tais resultados evidenciam que o calor ao qual o pigmento foi submetido durante a atomização por "spray-drier", se não o beneficia promovendo supostas ligações entre o pigmento e o carboidrato veículo, ao menos não o desestabiliza. A facilidade de manipulação e a faixa de aplicações para o corante na forma de pó são maiores que na forma líquida. Além disso, a antocianina é mais susceptível a degradação em meio aquoso, de forma que mantê-la sob armazenamento na forma de pó é muito mais vantajoso.

O Quadro 4 mostra alguns parâmetros calculados a partir da coordenadas colorimétricas, que expressam as variações das amostras quanto a sua cor.

Quadro 4 – Parâmetros colorimétricos das formulações armazenados em presença de luz.

Amostras	Parâmetros Colorimétricos					
	DL*	Da*	Db*	Dc'	Dh'	DE*
MB	-8,53	-20,84	-12,67	-24,31	-0,05	25,84
MD	7,64	-16,07	-13,64	-19,95	-0,18	22,43
MD-A	8,69	-15,85	-12,18	-19,03	-0,17	21,80
MD-L	10,79	-17,20	-11,08	-19,87	-0,15	23,13
MDBeta	9,55	-18,14	-7,17	-19,43	-0,08	21,72
MDBeta-A	13,93	-18,93	-8,55	-20,62	-0,10	25,01
MDBeta-L	11,26	-17,77	-6,87	-18,98	-0,11	23,13

ΔE^* é dado pela Equação 1 sendo muito útil para expressar a mudança da coloração devido ao “enfraquecimento” provocado pelo tempo, a ação da atmosfera e fatores destrutivos (HUNTER, 19__).

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (\text{Equação 1})$$

Todas as amostras apresentaram Δa^* e Δb^* negativo significando a perda da cor vermelha e ganho de coloração azulada, respectivamente. Com exceção da amostra MB, as demais apresentaram ΔL^* positivo, ou seja, tornaram-se mais luminosas. A amostra MB era constituída apenas de corante dissolvido em água. As outras eram constituídas por maltodextrina e algumas também beta-ciclodextrina. Fica evidenciado que as diferenças nos resultados de luminosidade devem-se a presença ou ausência do carboidrato em questão.

Avaliando o Quadro 4 é possível fazer outras observações acerca do comportamento das formulações. Antes, no entanto, deve-se abordar algumas suposições levantadas ao efetuar o delineamento desse experimento. Objetivou-se verificar o efeito da adição de certos carboidratos, empregados como veículos, na estabilização do pigmento em uma dada formulação. Paralelamente, procurou-se determinar se esse efeito era influenciado pela ação do calor, que poderia favorecer a formação de complexos mais estáveis ou ser deletério para o pigmento. Por fim, foi estudado se o processo de desidratação por liofilização, sem o emprego de calor, poderia favorecer também a formação de tais complexos.

As amostras MD-A e MD-L apresentaram comportamentos bastante similares, com constantes de variação bem próximas (principalmente “c*”), o que reforça a suposição de que o calor no processo de atomização não afetou significativamente a formulação. Comparando-se as amostras MD e MD-A verificou-se que, para ambas, tanto a variação da saturação quanto da tonalidade também permaneceram próximas, indicando que o calor, devido ao processo de desidratação, além de não ter sido prejudicial também não as beneficiou, ou seja, não promoveu complexação entre o agente veículo e o pigmento, suficientemente forte que se mantivesse nas condições de análise (formulação dissolvida em meio aquoso).

Ao comparar a amostra MD-A e MDBeta observou-se que a última apresentou maior variação na saturação e menor na tonalidade. Assim os resultados desse trabalho vão de encontro à teoria de DANGLES et al. (1992), segundo a qual a betaciclodextrina pode promover a inclusão da antocianina, principalmente na forma estrutural sem cor, levando a diminuição da intensidade percebida.

A amostra MB foi a que apresentou, embora discretamente, maior variação em ΔE^* , indicando um possível efeito benéfico dos veículos em estudo.

Há que se considerar que a avaliação da estabilidade de tais formulações foi conduzida em meio aquoso, onde as mesmas se encontravam diluídas. Este fato pode ter mascarado o comportamento das antocianinas, não sendo possível detectar o efeito das diferentes composições das formulações. Se tal avaliação tivesse sido efetuada com as amostras na forma de pó, talvez, diferenças maiores poderiam ter sido observadas.

3.3.2. Efeito do calor

As Figuras 3 e 4 apresentam os gráficos do comportamento das coordenadas colorimétricas c e h, para as formulações e suas respectivas testemunhas solubilizadas em tampão pH 3,5 e armazenados em ausência de luz, à temperatura de 65 ± 1 °C.

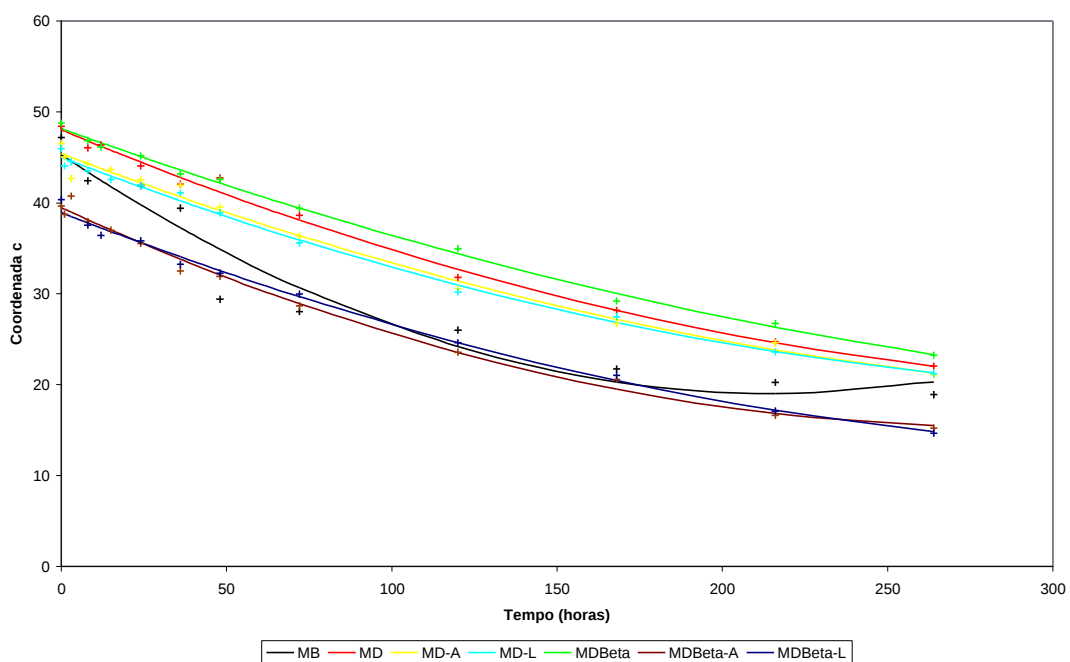


Figura 3 – Comportamento de “ c^* ” (cromaticidade) das formulações e testemunhas solubilizadas em tampão pH 3,5, ao longo do tempo, em ausência de luz, à temperatura de 65 ± 1 °C.

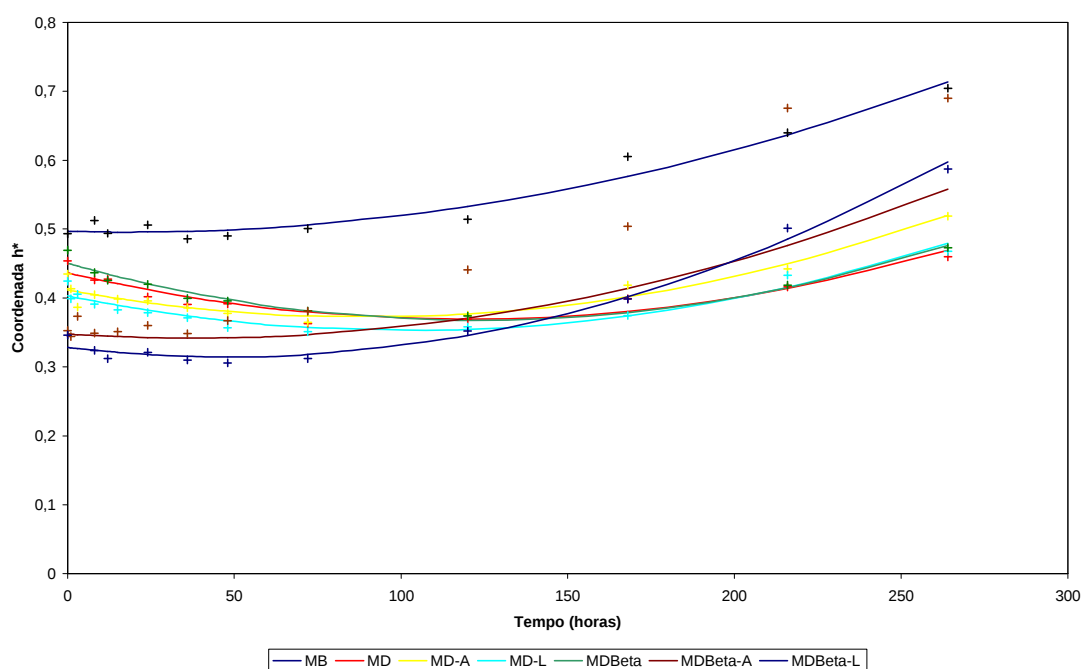


Figura 4 – Comportamento de “ h^* ” (tonalidade) das formulações e testemunhas solubilizadas em tampão pH 3,5, ao longo do tempo, em ausência de luz, à temperatura de 65 ± 1 °C.

Pela Figura 3 pode-se constata-se que nas amostras armazenadas sob temperaturas mais elevadas são similares. As amostras são degradadas de forma mais acelerada no início do armazenamento e têm sua velocidade de degradação diminuída ao longo do tempo.

A amostra MD foi a que apresentou maior variação para a coordenada “c*”, seguida por MB, Mbeta-A e então pelas outras amostras. Quanto à tonalidade as amostras MDBeta-A e MDBeta-L apresentaram maiores variações seguidas das amostras MB e MD-A. As demais amostras tiveram comportamentos similares com menores variações.

O Quadro 5 mostra alguns parâmetros, calculados a partir da coordenadas colorimétricas, que expressam as variações sofridas pelas amostras quanto a sua cor.

A amostra MDBeta-A apresentou maior variação total da cor (maior ΔE^*) seguida por MD, MB, MDBeta-L, MDBeta, MD-A e MD-L. Como as variações foram próximas, não foi possível explicitar um comportamento diferenciado.

Quadro 5 – Parâmetros colorimétricos das formulações armazenados à temperatura de 65 ± 1 °C.

Amostras	Parâmetros colorimétricos					
	DL*	Da*	Db*	Dc*	Dh*	DE*
MB	-6,75	-24,37	-8,03	-24,98	0,20	26,53
MD	10,29	-23,38	-11,39	-26,00	0,03	27,97
MD-A	9,54	-22,57	-8,83	-24,15	0,11	26,05
MD-L	10,12	-22,12	-8,75	-23,73	0,08	25,84
MDBeta	7,72	-23,83	-7,99	-24,89	0,03	26,29
MDBeta-A	13,56	-24,26	-4,87	-23,98	0,21	28,22
MDBeta-L	8,94	-24,40	-4,56	-24,12	0,27	26,38

LEWIS et al. (1995) estudaram o efeito de vários carboidratos (amilose, amilopectina, alfa-ciclodextrina, beta-ciclodextrina, pectina, polidextrose, sacarose, glicose, frutose e maltose) sobre a cor de algumas antocianinas. Verificando modificações nos espectros de absorção em relação a um controle em pH 2 e 4 e constataram que em pH 2 a alteração no espectro de absorção, causada por carboidratos, foi praticamente nula. Somente não foi nula para a beta-ciclodextrina que promoveu uma diminuição na intensidade de absorção

das antocianinas em relação aos controles sem carboidratos. Tal fato se deve, provavelmente, a inclusão do pigmento pela beta-ciclodextrina. A formação deste complexo confere maior estabilidade à antocianina mantendo os níveis de pigmento por períodos maiores, apesar de diminuir a intensidade da cor pois o complexo se dá entre a forma não colorida e o carboidrato.

4. RESUMO E CONCLUSÕES

A secagem por “spray-drier” da formulação promove pequena perda do pigmento antociânico. Não foi observada a presença significativa de corante degradado no produto em pó.

A desidratação das formulações não contribuiu para a formação de complexos entre a antocianina e o carboidrato em uso. Não foram observados efeitos benéficos ou deletérios do processo de secagem sobre o corante, o que é vantajoso, pois a armazenagem do pigmento na forma de pó é mais conveniente que na forma líquida, tanto por uma questão de volume ocupado como pelo fato da antocianina ser mais estável em ausência de água.

Nas condições de análise, nenhuma formulação apresentou desempenho destaque no que diz respeito à estabilidade do pigmento. Na luz e no calor, de forma geral, a testemunha (sem carboidrato e sem tratamento de desidratação) mostrou maiores alterações dos parâmetros colorimétricos. Deve-se ressaltar que os valores observados foram muito próximos, possivelmente, pelo fato das amostras se encontrarem diluídas em água. Assim estavam em situação desfavorável de estabilidade, nivelando a maior parte dos tratamentos a um mesmo comportamento.

No presente trabalho, na avaliação do efeito da presença de carboidratos sobre a estabilização do pigmento ao longo do tempo, não foi verificada a influência sensível de nenhum dos carboidratos estudado.

**CAPÍTULO 5 – APLICAÇÃO DO CORANTE DE AÇAÍ (*EUTERPE OLERACEA* M)
EM SISTEMAS ALIMENTÍCIOS**

1. INTRODUÇÃO

Ingredientes e aditivos são incorporados aos alimentos por diferentes razões. A forma de vida da sociedade moderna exige o desenvolvimento de diversos tipos de produtos alimentícios que venham atender às suas necessidades, tanto no sentido de quantidade produzida quanto no de qualidade. O suprimento adequado em tempo de vida útil torna irreal a oposição ao emprego dos mesmos.

A cor dos alimentos é um atributo que, conscientemente ou não, afeta a vida diária das pessoas. A aparência de um alimento pode ter efeito estimulante ou inibidor do apetite. Embora a alimentação seja necessária para sobrevivência, não se pode negar que é também fonte de prazer e satisfação. Por esta razão, o setor alimentício tem preocupação constante com as questões relacionadas à aplicação de cores e obtenção de alimentos com aparências extremamente atraentes aos olhos do consumidor (COLLINS e PLUMBLY, 1995; FREUND et al., 1988).

As principais razões pelos quais são adicionadas cores aos alimentos são: (1) restituir a aparência original do alimento cuja cor foi afetada durante a etapa de processamento, estocagem, embalagem ou distribuição, o que poderia comprometer sua aceitação no momento do consumo; (2) tornar o alimento visualmente mais atraente, ajudando a identificar o aroma normalmente associado a determinados produtos e conferir cor àqueles descoloridos; e (3) reforçar cores já presentes nos alimentos.

Apesar dos corantes sintéticos terem menor custo de produção e maior estabilidade, constatou-se que o número de aditivos sintéticos permitidos nos países desenvolvidos vem diminuindo a cada ano (PIMENTEL, 1995). Este aspecto associado à necessidade de substituir vários corantes artificiais fez com que a indústria de alimentos recorresse a uma série de pigmentos naturais, que vão desde parte comestíveis, sucos de vegetais, animais e insetos até substâncias extraídas e purificadas (CARVALHO, 1992).

Naturalmente, as antocianinas são encontradas em vacúolos de plantas e sua cor depende de muitos fatores como concentração, solvente, temperatura, pH, substituição no anel B e presença de copigmentos (BROUILLARD, 1982). O pH tem um grande efeito na cor das antocianinas

uma vez que as três estruturas que a água pode apresentar (H^+ , OH^- e H_2O) são altamente reativas para as antocianinas. Desta forma, a água exerce um importante papel, influenciando tanto na estabilidade quanto na reatividade, assim como nas propriedades espectrais das antocianinas em meio aquoso.

As antocianinas não apresentam grande estabilidade quando aplicadas como corantes naturais e isto é reflexo da sua estrutura química e das possíveis interações que elas podem sofrer com várias substâncias presentes no meio. Fatores como luz, temperatura, pH e oxigênio são determinantes no que diz respeito à sua estabilidade. Aliado a eles, algumas substâncias comumente presentes nos meios alimentícios também afetam as antocianinas como enzimas, ácido ascórbico, açúcares, metais e dióxido de enxofre.

Não obstante essas limitações, vários estudos têm sido conduzidos com o intuito de viabilizar seu emprego em diferentes sistemas alimentícios em detrimento do uso de corantes artificiais. Vários produtos são potencialmente capazes de serem coloridos com antocianinas tais como: geléias, gelatinas, sorvetes, etc.

BASSA e FRANCIS (1987) avaliaram a estabilidade da antocianina da batata doce em um sistema modelo líquido e concluíram que tal pigmento foi mais estável que a enocianina usada como testemunha, e que poderia ser aplicada sem problemas em bebidas. PALAMIDIS e MARKAKIS (1975), estudaram a estabilidade da antocianina de casca de uva em bebidas carbonatadas verificando a diferença de comportamento para o pigmento em diferentes condições de armazenamento ao longo do tempo. A luz e o calor aceleraram bastante a degradação do pigmento. SHEWFELT e AHMED (1978), empregaram formulações em pó, obtidas a partir de repolho roxo e “blueberries” em bebidas em pó e obtiveram resultados satisfatórios. STRINGHETA et al. (2000) avaliaram a estabilidade à luz e temperatura de um extrato bruto antociânico de casca de uva em solução isotônica e determinaram que o tempo de meia vida para o pigmento em solução isotônica exposta à luz foi de 26,1 dias e, para a mesma solução, à temperatura de 70 °C, foi de 7,7 dias.

Apesar dos muitos estudos, ainda é pequena a aplicação comercial de antocianina como corante em alimentos. Uma das primeiras aplicações das

antocianinas foi para intensificar a coloração de vinhos (FRANCIS, 1999). Hoje em dia, essa aplicação não é permitida legalmente.

Devido ao potencial promissor do uso do açaí como fonte de antocianina, neste trabalho é avaliado o emprego de uma formulação de corante, obtida a partir desse fruto, em diferentes produtos alimentícios. A formulação foi aplicada em queijo tipo petit suisse, iogurte e bebida isotônica. Paralelamente, foi utilizada uma formulação idêntica a anterior, mas com antocianina proveniente do capim gordura (*Melinis minutiflora*, Pal de Beauv), e uma formulação comercial cuja fonte antociânica é a uva, de forma estudar o desempenho tanto da fonte quanto da formulação empregada.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Pigmentos Naturais e Secagem da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa– MG.

2.1. Material

As matérias-primas empregadas como corante foram antocianinas em pó obtidas a partir das fontes açaí e capim gordura e antocianina em pó de casca de uva comercial. As duas primeiras foram elaboradas durante este trabalho conforme descrito no capítulo 4, e a segunda gentilmente cedida pela empresa Christian Hansen. O Quadro 1 mostra as especificações de tais corantes.

O iogurte natural foi formulado no laticínios da UFV. A bebida isotônica foi formulada durante a execução do trabalho, assim como o queijo tipo petit suisse.

Quadro 1 - Especificações dos corantes naturais empregados

Produto	Descrição do produto
AC-2-1250-WS-P*	Corante hidrossolúvel obtido pelo tratamento do pigmento, extraído a partir da de cascas de uva, ao qual é adicionado maltodextrina, e desidratado em equipamento tipo “spray drier”.
MD	Antocianina de açaí, tendo como veículo 30 % de maltodextrina DE 20, na proporção corante/veículo 1:4, desidratado em equipamento tipo “spray drier”.
C	Antocianina de capim gordura, tendo como veículo 30 % de maltodextrina DE 20, na proporção corante/veículo 1:4, desidratado em equipamento tipo “spray drier”.

* Marca comercial de corante hidrossolúvel de enocianina da empresa Christian Hansen.

2.2. Métodos

As formulações de corante em pó de açaí e capim gordura foram preparadas conforme descrito anteriormente no capítulo 4 deste trabalho.

2.2.1. Quantificação do teor antociânico dos corantes formulados

As formulações obtidas do açaí e do capim gordura foram caracterizadas quanto ao teor antociânico. O teor antociânico foi determinado segundo metodologia de FULEKI e FRANCIS (1968b), em que alíquotas de formulados e do pó foram diluídas em tampão pH 1 e 4,5, respectivamente. A leitura espectrofotométrica foi conduzida em espectrofotômetro Hitachi U-20001.

2.2.2. Caracterização colorimétrica dos corantes em pó

Pesou-se 1,5 g do corante em pó e diluiu-se até 50 mL com água destilada. As soluções foram caracterizadas colorimetricamente pela leitura direta de reflectância das coordenadas “L*”, “a*” e “b*”, empregando a escala Cielab em colorímetro (Color Quest XE de Hunter).

2.2.3. Aplicação do corante nos alimentos

A aplicação do corante formulado de açaí nos diversos sistemas alimentícios foi efetuada em duas etapas. Primeiro foi avaliada apenas a sua viabilidade em bebida isotônica líquida, iogurte e queijo tipo petit suisse.

Na segunda etapa, além de verificar a aplicabilidade da formulação em teste em alguns alimentos, foi comparado o desempenho da formulação e da fonte antociânica. No primeiro caso, utilizou-se uma formulação comercial, além da formulação de açaí. No segundo caso, aplicou-se também uma formulação idêntica cuja fonte antociânica era diferente (capim gordura).

2.2.3.1. Primeira etapa

Nessa etapa os alimentos empregados foram iogurte, queijo tipo petit suisse e bebida isotônica líquida.

2.2.3.1.1. Aplicação do pigmento em iogurte

O padrão de cor do iogurte foi determinado a partir de marcas comerciais de iogurte sabor morango. Para cada 600 mL de iogurte natural foram empregados 6 g de corante em pó. O corante foi dissolvido no iogurte por agitação e acondicionado em frascos de 200 mL. Após 2 horas em repouso, determinou-se a cor do iogurte em colorímetro (Colorquest II do sistema Hunter), com leitura por reflectância das coordenadas “L*” (luminosidade), “a*” (intensidade de vermelho e verde) e “b*” (intensidade de amarelo e azul).

Até 24 dias, a partir da primeira leitura, os mesmos parâmetros colorimétricos foram determinados periodicamente com as amostras mantidas sob refrigeração.

Além das leituras colorimétricas, o pH do produto foi medido no início e no final do experimento, o qual foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com três repetições.

2.2.3.1.2. Aplicação do pigmento em queijo tipo petit suisse

A massa do queijo tipo petit suisse foi formulada no laboratório de culturas lácticas do Departamento de Tecnologia de Alimentos. Imediatamente após a sua obtenção foram adicionados 8 g de corante em pó para 600 g de massa (pura sem saborizantes e com açúcar). Após a mistura em multiprocessador por 1 minuto, a massa foi acondicionada em embalagens apropriadas para esse produto.

Após 2 horas em repouso, determinou-se a cor do queijo em colorímetro (Colorquest II do sistema Hunter), com leitura por reflectância das coordenadas “L*” (luminosidade), “a*” (intensidade de vermelho e verde) e “b*” (intensidade de amarelo e azul).

O material foi mantido sob refrigeração, onde periodicamente era retirada uma amostra para leitura colorimétrica. Além das leituras colorimétricas, o pH do produto foi determinado no início e no final do experimento, qual foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com três repetições

2.2.3.1.3. Aplicação do pigmento em bebida isotônica líquida

A formulação da bebida isotônica foi elaborada em função da composição de bebidas isotônicas comerciais, resultando em uma solução com osmolaridade, pH e composição similar à comercial.

A concentração do corante em pó na bebida isotônica foi determinada em função dos parâmetros L*, a* e b*, obtidos de produto comercial sabor morango. Para cada 50 mL de bebida foi usado 0,40 g de corante em pó. A bebida isotônica foi distribuída em garrafas de vidro com capacidade para 20 mL. As garrafas foram pasteurizadas em banho-maria a 65 °C por 30 minutos, imediatamente resfriadas em banho de gelo e armazenadas a temperatura ambiente por períodos alternados de 12 horas sob iluminação de lâmpadas fluorescentes e em ausência de luz.

Amostras eram recolhidas periodicamente e as leituras efetuadas em colorímetro (Colorquest II do sistema Hunter), com leitura por reflectância das coordenadas “L*” (luminosidade), “a*” (intensidade de vermelho e verde) e “b*”

(intensidade de amarelo e azul). O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com três repetições.

2.2.3.2. Segunda etapa

Nessa etapa os alimentos empregados foram iogurte e bebida isotônica em pó.

2.2.3.2.1. Aplicação dos corantes em iogurte

Para 200 mL de iogurte foram adicionados, separadamente, 2 g de corante em pó de açaí e capim e 0,2 g de corante de uva (marca comercial).

Após 2 horas, foi efetuada leitura colorimétrica das amostras que foram imediatamente armazenadas sob refrigeração. Periodicamente, amostras eram recolhidas e levadas para leitura em colorímetro (Colorquest II do sistema Hunter), com leitura por reflectância das coordenadas “L*” (luminosidade), “a*” (intensidade de vermelho e verde) e “b*” (intensidade de amarelo e azul).

Cada tratamento foi realizado em três repetições, sendo que cada amostra de 200 mL foi fracionada, de forma a se obter 5 unidades, as quais forneceriam 5 leituras ao longo do tempo.

2.2.3.2.2. Aplicação dos corantes em bebida isotônica em pó

Assim como para a bebida na forma líquida, a formulação utilizada para a bebida isotônica em pó foi elaborada em função da composição de bebidas isotônicas comerciais, resultando em uma solução com osmolaridade, pH e composição similar à comercial.

Para cada tratamento foram preparados 5 saches, confeccionados com PET/Al/PE, para serem diluídos em 50 mL de água no momento do uso. Para o açaí e capim gordura foram empregados 4,0 g de corantes formulados por sache. Para o corante comercial de uva utilizaram-se 3,60 g.

Após a adição da bebida em pó, as embalagens foram fechadas a vácuo e armazenadas a temperatura ambiente (em torno de 28 °C). Periodicamente amostras eram recolhidas, diluídas em 50 mL de água, e

imediatamente, efetuadas as leituras em colorímetro (Colorquest II do sistema Hunter), com leitura por reflectância das coordenadas “L*” (luminosidade), “a*” (intensidade de vermelho e verde) e “b*” (intensidade de amarelo e azul). O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Soluções corantes

O Quadro 2 apresenta as características colorimétricas e o teor de antocianinas para os corantes ressuspensos em água destilada. O corante de capim gordura e o de açaí apresentam características semelhantes, tanto qualitativamente como quantitativamente. Já o corante de uva apresentou-se com tonalidade mais violeta e mais concentrado.

Quadro 2 – Características colorimétricas e teor de antocianinas para os corantes antociânicos.

Amostras	L*	a*	b*	c*	h*	g acy/100 g de pó
Açaí	24,26	13,06	2,90	13,38	0,219	0,10
Capim gordura	23,87	13,24	2,90	13,55	0,216	0,10
Uva	22,27	1,49	-1,19	1,91	-0,674	3,00

3.2. Primeira etapa

O Quadro 3 mostra a variação dos parâmetros de cor para os produtos avaliados nessa etapa do trabalho.

Quadro 3 – Parâmetros colorimétricos para os produtos coloridos com corante de açaí.

Amostra	Parâmetros colorimétricos*					
	DL*	Da*	Db*	Dc*	Dh*	DE*
Iogurte	1,565	0,785	0,21	0,80	0,02	1,76
Queijo	0,11	-0,11	0,35	-,001	-0,04	0,38
Bebida isotônica	-46,56	-11,75	1,25	-11,11	-0,16	48,03

* Os valores de Δ para cada parâmetro equivale a diferença entre primeira e última leitura no decorrer do experimento.

3.2.1. Aplicação do corante em iogurte

O corante foi facilmente incorporado ao iogurte. A Figura 1 apresenta o gráfico com as coordenadas colorimétricas a^* , b^* , c^* e h^* para o iogurte, acompanhadas ao longo do tempo de armazenamento.

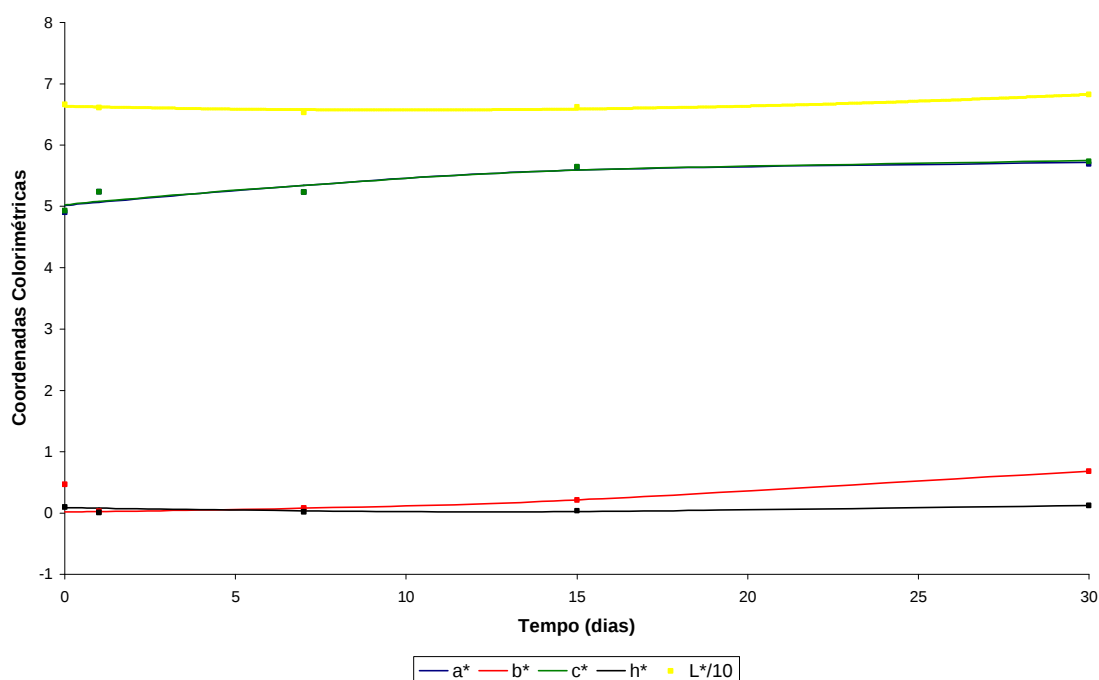


Figura 1 – Coordenadas colorimétricas ao longo do tempo para o iogurte com corante de açaí formulado em pó.

Não foi observada variação sensível para as coordenadas colorimétricas ao longo do tempo, indicando que não houve degradação do pigmento. O Quadro 3 mostra de forma resumida a variação sofrida pelos parâmetros de cor.

O produto ficou levemente mais luminoso e com aumento da coloração vermelha, indicado pelo Δa^* . Ainda que tal aumento tenha sido discreto, pode à primeira vista parecer incoerente, uma vez que à medida que ocorre degradação do pigmento a cor vermelha tende a diminuir. Tal resultado pode ser justificado pela diferença de pH observada no produto ao longo do armazenamento. Inicialmente o pH do iogurte foi de 4,70 e ao final esse pH foi 4,01. Uma vez que a antocianina é afetada pelo pH e que em meio mais ácido a forma iônica, que confere a cor vermelha, tende a existir em maior

quantidade, é possível explicar essa aparente incoerência para a coordenada a^* .

Tais argumentos são confirmados pelos resultados para a coordenada b^* , que também teve ligeiro aumento, ou seja, a amostra tornou-se menos azul. A coloração azulada é característica da estrutura antociânica que prevalece em meios menos ácidos (alcalinos).

A tonalidade do produto não foi alterada e a saturação obteve ligeira queda, possivelmente devido à fração do pigmento que sofreu degradação.

A formulação de antocianina utilizada mostrou-se adequada para esse tipo de produto.

3.2.2. Aplicação do corante em queijo tipo petit suisse

A Figura 2 apresenta o gráfico com as coordenadas colorimétricas a^* , b^* , c^* e h^* para o queijo tipo petit suisse durante seu armazenamento.

As variações encontradas foram ainda menores que as observadas para o iogurte, mostrando o excelente desempenho do corante no queijo tipo petit suisse. O pH 4,70 do produto permaneceu inalterado durante todo o experimento. As variações observadas não podem ser atribuídas a alterações do pigmento ao longo do tempo pois sua grandeza é menor do que a observada ao se efetuar leitura em duplicata de uma mesma amostra.

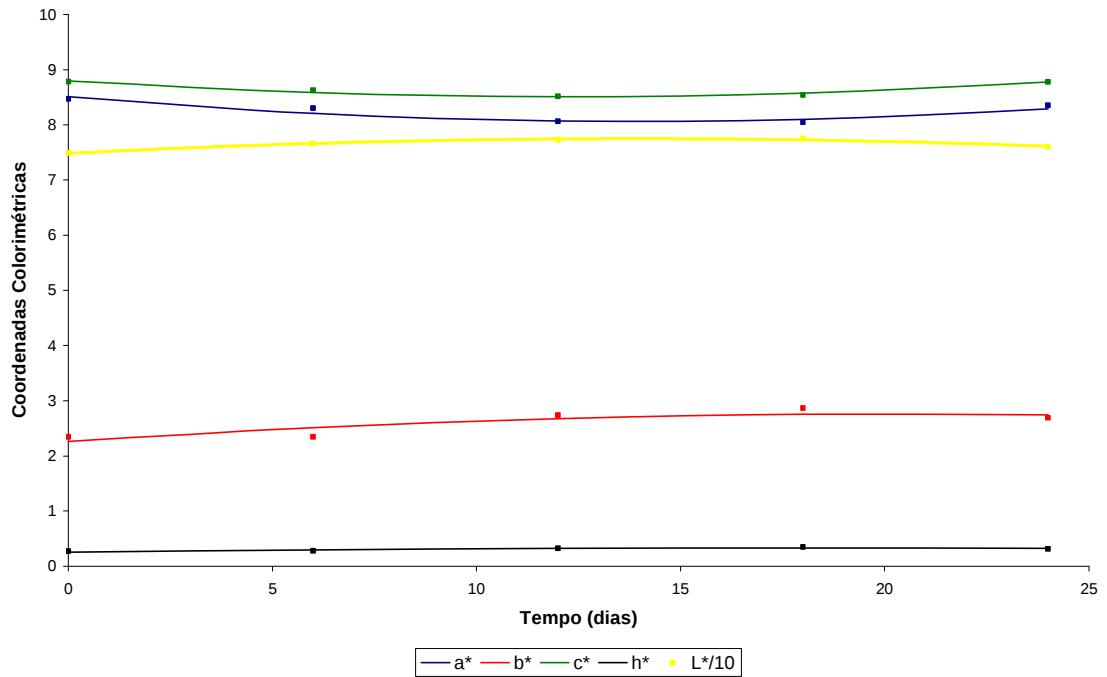


Figura 2 - Coordenadas colorimétricas, ao longo do tempo, para o queijo tipo petit suisse com corante de açaí formulado em pó.

3.2.3. Aplicação do corante em bebida isotônica

A Figura 3 apresenta o gráfico com as coordenadas colorimétricas a*, b*, c* e h* para a bebida isotônica. É possível observar sensível alteração das coordenadas a*, c* e L*, indicando que houve degradação do pigmento no período avaliado. O Quadro 3 mostra os resultados das variações nos parâmetros colorimétricos.

As variações observadas para as coordenadas L*, a* e c* são acentuadas, resultando em grande variação na coloração (ΔE^*). A degradação do pigmento ocorreu com perda da saturação da cor sem, no entanto, ser observada alteração significativa na tonalidade.

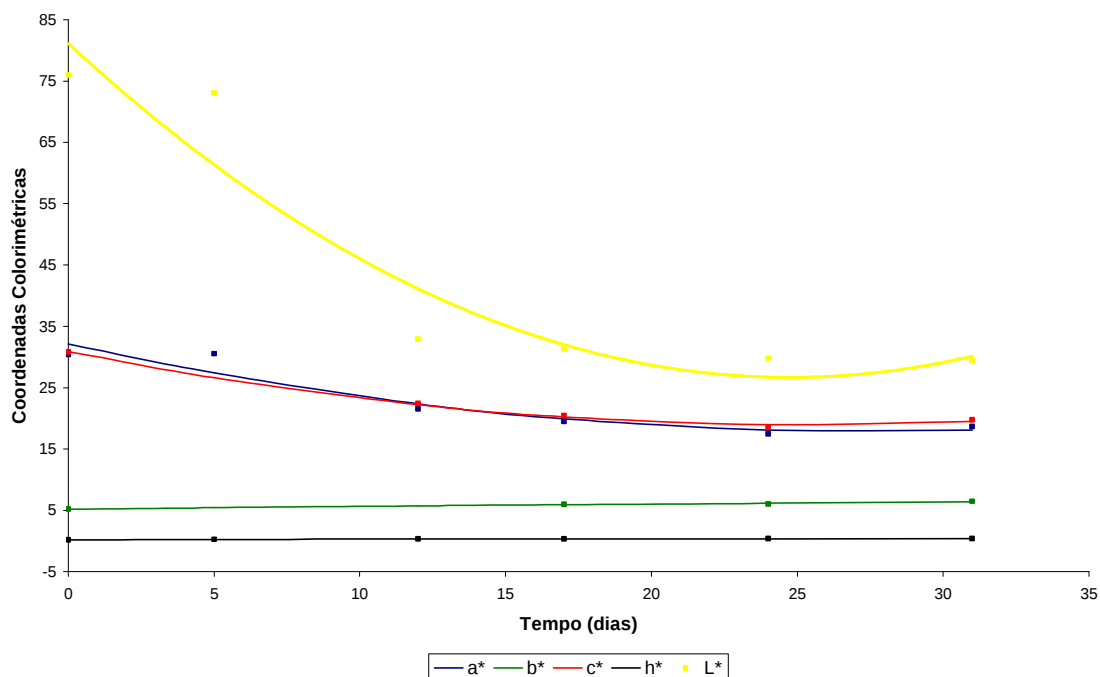


Figura 3 - Coordenadas colorimétricas, ao longo do tempo, para a bebida isotônica com corante de açaí formulado em pó.

Como mencionado anteriormente, num processo degradativo a antocianina pode sofrer duas mudanças básicas quanto a sua coloração: tornar-se gradativamente menos intensa pela perda de saturação e ou mudar de tonalidade pela formação de compostos de degradação com cores diferentes da original. Aparentemente ocorreu o primeiro caso no corante adicionado à bebida isotônica.

Segundo SKREDE (1985), dentre as coordenadas colorimétricas, a^* é a que melhor pode ser correlacionada com o teor antocianínico. Representando graficamente o logaritmo natural de a^*/a^*_0 em função do tempo, é possível estimar alguns parâmetros cinéticos de degradação da antocianina em termos de cor. Através do coeficiente angular da curva foi determinada a constante de velocidade de degradação de cada extrato e seus respectivos tempos de meia vida. O valor do tempo de meia vida foi de 36,16 dias e a constante de velocidade foi 0,02.

O tempo de meia vida foi baixo, tendo em vista o produto em questão. O armazenamento da bebida isotônica foi efetuado simulando a situação encontrada pelo produto, quando comercializado. O produto apresenta um tempo de prateleira superior ao tempo de meia vida determinado para o

pigmento, o que mostra que tal pigmento não é adequado para ser usado em bebida isotônica.

3.3. Segunda etapa

3.3.1. Aplicação do corante em iogurte

As Figuras 4, 5, 6 e 7 mostram os gráficos referentes ao comportamento das coordenadas colorimétricas a^* , b^* , c^* e h^* respectivamente, para o iogurte colorido com corante de açai, capim gordura e uva.

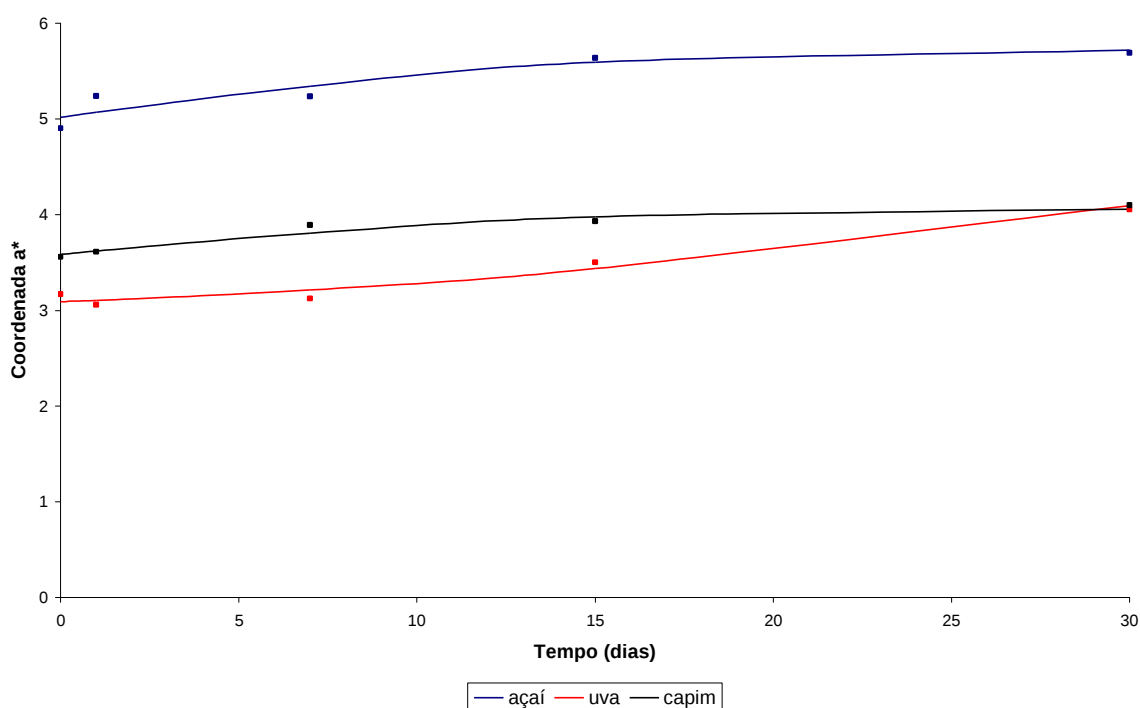


Figura 4 - Coordenada colorimétrica a^* , ao longo do tempo, para o iogurte com os corantes a base de antocianina.

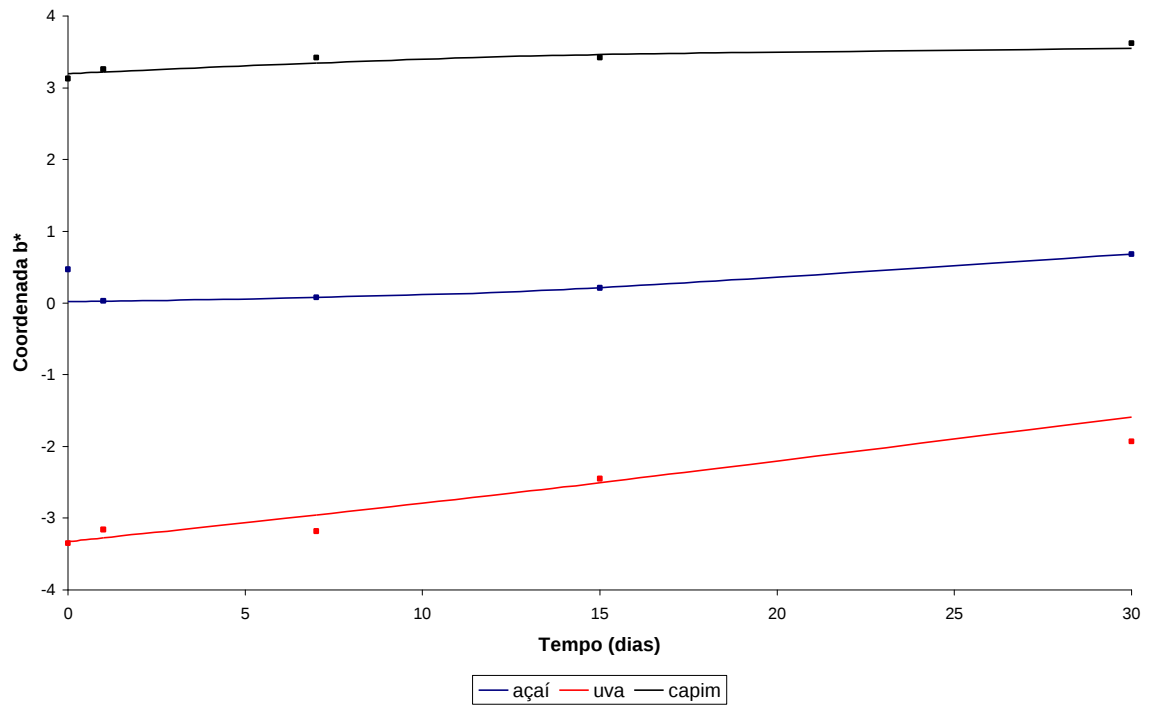


Figura 5 - Coordenada colorimétrica b^* , ao longo do tempo, para o iogurte com os corantes a base de antocianina.

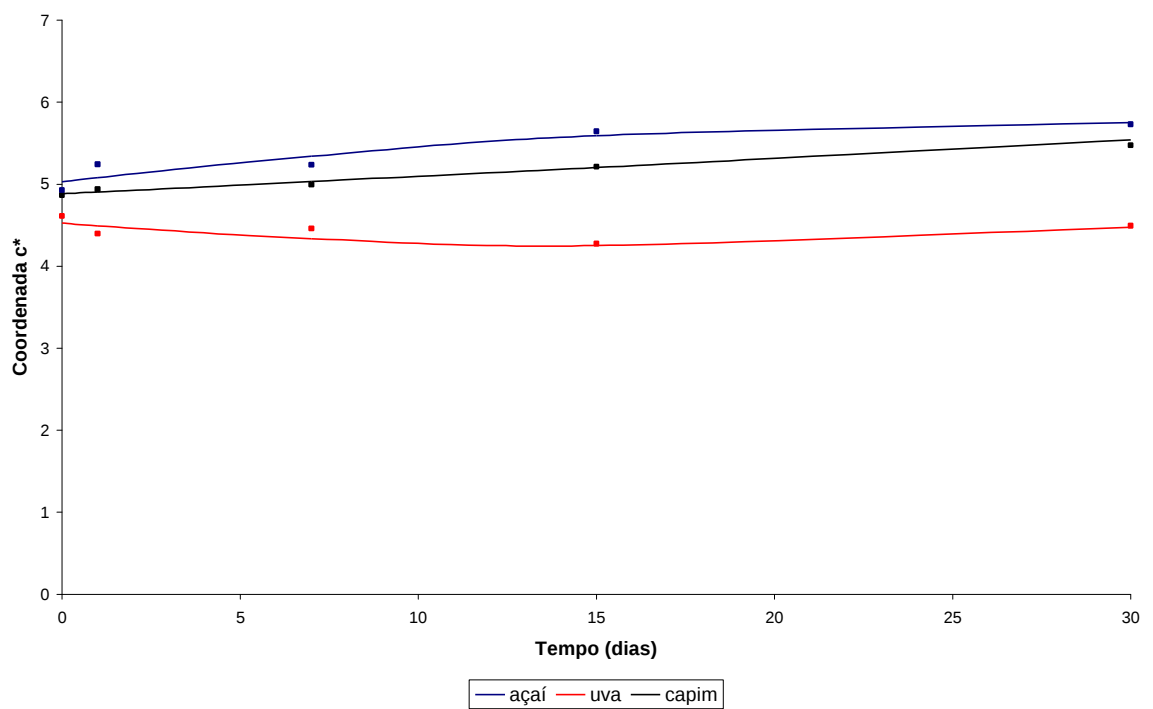


Figura 6 - Coordenada colorimétrica c^* , ao longo do tempo, para o iogurte com os corantes a base de antocianina.

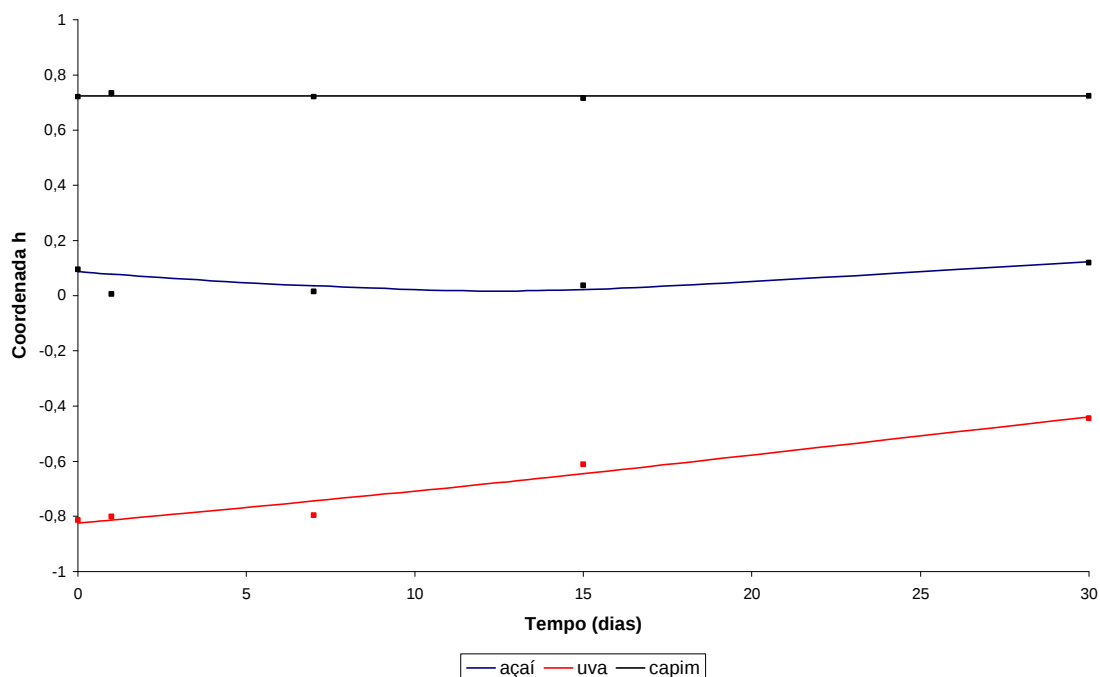


Figura 7 - Coordenada colorimétrica h^* , ao longo do tempo, para o iogurte com os corantes a base de antocianina.

As variações observadas para cada uma das coordenadas colorimétricas foram bastante discretas para os três corantes empregados. Os corantes formulados nesse trabalho (açaí e capim gordura) apresentaram um desempenho ligeiramente superior ao do corante de uva comercial. Esse fato pode ser confirmado analisando os dados do Quadro 6 que resume as variações sofridas por cada um.

Quadro 6 – Parâmetros colorimétricos do iogurte colorido com corante à base de antocianina.

Amostra	Parâmetros colorimétricos					
	DL*	Da*	Db*	Dc'	Dh'	DE*
Açaí	1,565	0,785	0,21	0,80	0,02	1,76
Capim gordura	3,13	0,54	0,49	0,61	0,00	1,92
Uva	1,76	0,89	1,42	-0,12	-0,37	3,54

De qualquer forma as três formulações mostraram-se apropriadas para uso em iogurte.

3.3.2. Aplicação do corante em bebida isotônica em pó

Uma vez que foi constatada a inadequabilidade do emprego da antocianina em bebidas isotônicas na forma líquida, foi analisada a viabilidade do uso em bebida isotônica na forma de pó. Paralelamente foi comparado o desempenho da formulação e do tipo de fonte.

As Figuras 8, 9 e 10 mostram os gráficos das coordenadas colorimétricas para o açaí, capim gordura e uva, respectivamente.

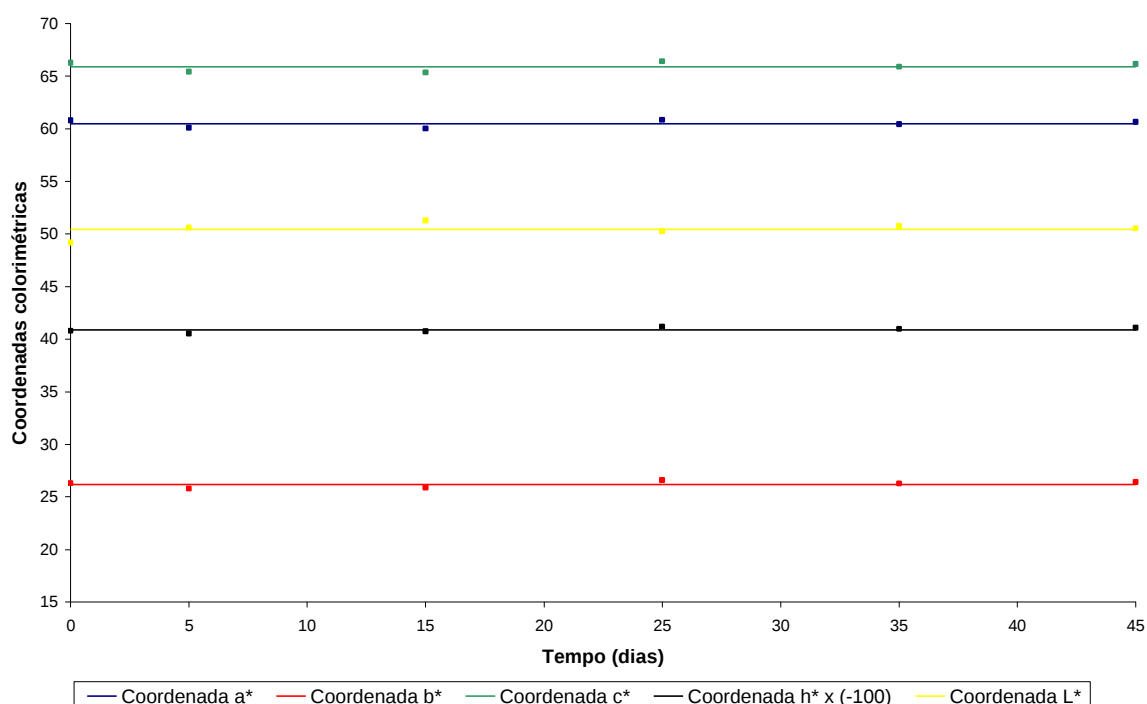


Figura 8 - Coordenadas colorimétricas ao longo do tempo para a bebida isotônica com corante de açaí formulado em pó.

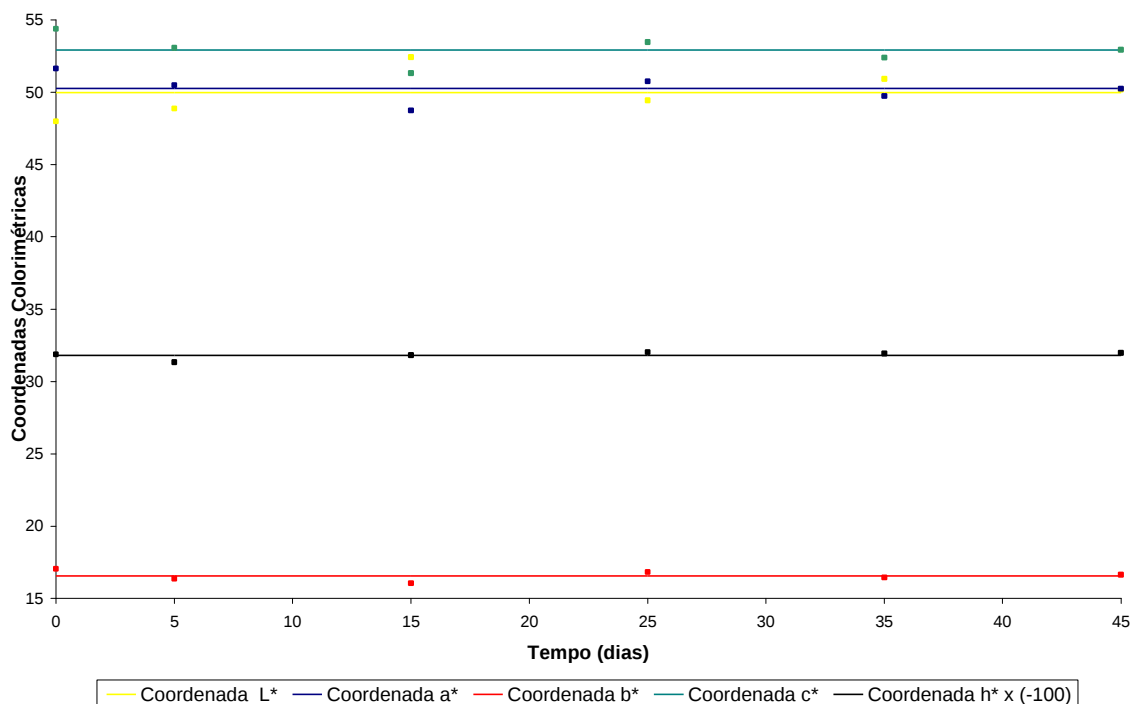


Figura 9 - Coordenadas colorimétricas ao longo do tempo para a bebida isotônica com corante de capim gordura formulado em pó.

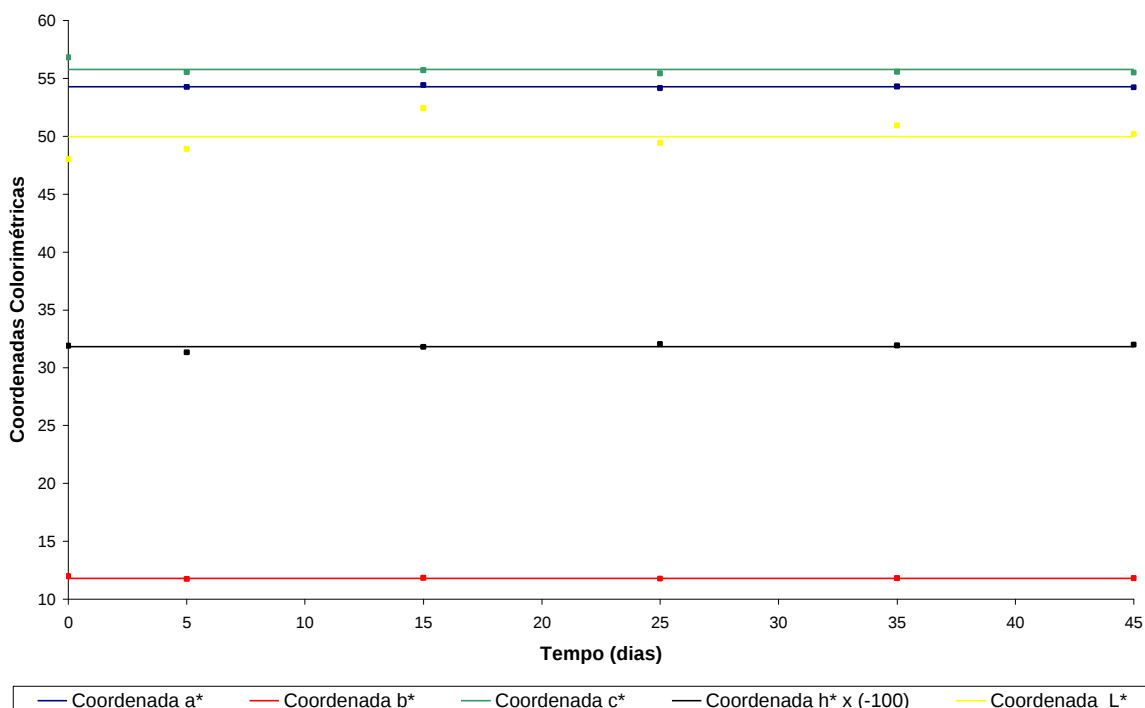


Figura 10 - Coordenadas colorimétricas ao longo do tempo para a bebida isotônica com corante de uva formulado em pó.

Verificou-se que os corantes mantiveram-se sem alterações ao longo do período de estudo. Tal resultado era de certa forma esperado, uma vez que os fatores que mais afetam as antocianinas não estavam presentes durante o armazenamento dos produtos, ou seja, água, luz e oxigênio.

Em ausência desses fatores é possível manter a antocianina inalterada por longos períodos, mesmo à temperatura ambiente. Dessa forma, fica claro que alimentos nessas condições (sucos em pós, condimentos desidratados, gelatinas, etc) são os mais apropriados para a utilização de tais pigmentos.

4. RESUMO E CONCLUSÕES

A formulação feita nesse trabalho utilizando maltodextrina e antocianina de açaí mostrou-se eficiente e quando comparada com uma formulação comercial de enocianina, apresentou nos alimentos avaliados, melhor desempenho, com menor alteração nas coordenadas colorimétricas ao longo do tempo.

O emprego do açaí como fonte de corante é viável, visto que formulação obtida com esse fruto bem como formulação com capim gordura apresentaram desempenho semelhante e satisfatório para a maioria dos alimentos estudados.

Entre os alimentos adicionados de formulações corantes a base de antocianinas, o único não apropriado para uso dessas foi a bebida isotônica na forma líquida. Tal produto apresenta todas as condições desfavoráveis para a manutenção da estabilidade do pigmento, ou seja, alto teor de água em uma faixa de pH não adequada (em torno de 3) e, o seu armazenamento é feito em embalagens que permitem o acesso de luz.

Já para o iogurte, o queijo tipo petit suisse e a bebida isotônica em pó observou-se resultado satisfatório, não ocorrendo variação de cor ao longo do armazenamento.

De qualquer forma fica claro que para o sucesso do emprego das antocianinas como corante é preciso ter sob controle variáveis como pH, temperatura de armazenamento e incidência de luz no meio.

CONCLUSÃO GERAL

O açaí (*Euterpe oleracea*, M) demonstrou possuir um teor elevado de antocianina o que o torna uma fonte potencial desse corante. No entanto cuidados devem ser tomados pois trata-se de um fruto muito lábil, e a extração do corante deve ser feita logo após a colheita do mesmo.

Entre os solventes testados para extração do pigmento, as misturas água/SO₂ e etanol/SO₂ levaram a uma maior quantidade extraída, seguidas da solução etanol:água (70:30) acidificada com HCl a pH 2. O ácido mais efetivo foi o HCl. Além do tipo de solvente, foi constatado que a temperatura e condição do fruto são relevantes no processo de extração. Recomenda-se que a extração seja efetuada com o fruto inteiro, uma vez que todo pigmento encontra-se localizado na superfície do fruto sob a forma de uma fina película, à temperatura ambiente, por 24 horas após aquecimento a 60 °C por 20 minutos.

O extrato antociânico do açaí é formado por uma mistura relativamente simples com dois tipos de antocianinas aparecendo em maior proporção. Por meio de análises químicas tradicionais e análise físicas envolvendo métodos espectrofotométricos, cromatográficos e RMN, identificou-se as duas frações principais das antocianinas do açaí como sendo cianidina-3-rutinosídeo e cianidina-3-glicosídeo.

Observou-se que dependendo do sistema solvente empregado na extração é possível alterar não apenas o perfil, como também a estabilidade do extrato antociânico final. Os extratos obtidos utilizando-se SO₂ apresentaram maior estabilidade frente aos fatores pH e luz.

Comparando-se os vários extratos com diferentes graus de purificação, verificou-se que a fração purificada parcialmente por cromatografia descendente de papel com fase móvel HCl 1 %, apresentou maior estabilidade frente aos fatores estudados. A purificação com cromatografia de troca iônica, por sua vez levou a um produto mais puro em termos de pigmentos, mas ao mesmo tempo menos estável.

A técnica de cromatografia em papel, apesar das novas tecnologias, pode ainda ser considerada muito eficiente. Foi possível obter

produtos com pureza satisfatória, e uma vez que é uma técnica preparativa, permitiu a separação de quantidades razoáveis de antocianinas.

Nas condições avaliadas no presente trabalho, nenhuma, entre as formulações corantes testadas, apresentou desempenho destaque no que diz respeito à estabilidade do pigmento, ou seja, tanto para maltodextrina quanto para maltodextrina/beta-ciclodextrina, os efeitos foram semelhantes. Pode-se constatar, no entanto, que o calor envolvido no processo de atomização por “spray-drier” não promove perda significativa de pigmento. Ao mesmo tempo, nenhum efeito benéfico foi observado, de acordo com hipótese de literatura.

Na etapa de aplicação, onde a formulação de antocianina de açaí foi adicionada em alguns alimentos, verificou-se que a única formulação não apropriada foi da bebida isotônica na forma líquida. Tal produto apresenta todas as condições desfavoráveis para a manutenção da estabilidade do pigmento, ou seja, alto teor de água em uma faixa de pH desfavorável (em torno de 3), e seu armazenamento é feito em embalagem que permite o acesso de luz.

A aplicação de corante à base de antocianina é recomendada apenas para alimentos ácidos, com pouca umidade e conservados ao abrigo de luz como os avaliados também nesse trabalho: iogurte, queijo tipo petti suisse e bebida isotônica em pó. De qualquer forma, por se tratar de um pigmento muito sensível, cuidados quanto a variações de pH, luz e temperatura devem ser tomados no armazenamento e distribuição dos produtos em questão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMIC, D., DAVIDOVIC-AMIC, D. e BESLO, D. Prediction of pK values, half-lives, and electronic spectra of flavylum salts from molecular structure. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* v.39, 1999, p.967-973.
- ANDERSEN, O. M. Anthocyanins in fruits of *Vaccinium uliginosum* L. (Bog Whortleberry). *Journal of Food Science.* v. 52, n. 3, p. 665-666, 1987.
- ASEN, S., STEWART, R. N., NORRIS, K. H. Co-pigmentation of anthocyanins in plants tissues and its effect of color. *Phytochemistry.* v.11, p. 1139-1144, 1972.
- BAKKER, J., TIMBERLAKE, C. F. Isolation, identification, and characterization of new color-stable anthocyanins occurring in some red wines. *J. Agric. Food Chem.* v. 45, p.35-43, 1997).
- BASSA, I. A., FRANCIS, F. J. Stability of anthocyanins from sweet potatoes in a model beverage. *Journal of Food Science.* v. 52, n. 6, p. 1753-1754, 1987.
- BERENTE, B., CARCÍA, D. de la C., REICHENBÄCHER, M., DANZER, K. Method development for the determination of anthocyanins in red wines by high-performance liquid chromatography and classification of germany red wines by means of multivariate statistical methods. *Journal of Chromatography A.* v. 871, p. 95-103, 2000.
- BOBBIO, F. O., BOBBIO, P. A. e SOUZA, S. C. Separation and identification of cinnamic acids by TLC. *Journal Chemical Education.* v.2, 1982, p.182.
- BOBBIO, F. O., FADELLI, S., OLIVEIRA, P. A., BOBBIO, P. A. Estudo da estabilidade das antocianinas da polpa de açaí (*Euterpe oleracea*). *Livro de Resumos do III SLACA.* p. 55, 1999.
- BOBBIO, F. O., DRUZIAN, J. I., ABRÃO, P. A., BOBBIO, P. A., FADELLI, S. Identificação e quantificação das antocianinas do fruto do açaizeiro (*Euterpe oleracea*) Mart. *Revista da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos.* v. 20, n. 3. p. 388-390. 2000.
- BOBBIO, P.A., BOBBIO, F. A. *Introdução à química de alimentos.* 2.ed., São Paulo: Varela, 1992. 234p.
- BRIDLE, P., TIMBERLAKE, C. F. Anthocyanins as natural food colours-selected aspects. *Food Chemistry.* v. 58, n. 1-2, p. 103-109, 1996.
- BRIDLE, P., GARCÍA-VIGUERA, C. A simple technique for the detection of red wine adulteration with elderberry pigments. *Food Chemistry.* v. 55, n. 2, p. 111-113, 1996.

- BROUILLAR, R. Chemical structure of anthocyanins. In: MARKAKIS, P., Anthocyanins as Food Colors. New York: Academic Press, 1982, p.1-39.
- BROUILLARD, R., DUBOIS, J. E. Mechanism of the structural transformations of anthocyanins in acidic media. Journal of the American Chemical Society. V.99, n.5, p.1359-1364. 1976.
- BUCKMIRE, R. E., FRANCIS, J. F. Anthocyanins and flavonoides or miracle fruit, *Synsepalum dulcificum*, Schum. Journal of Food Science. v. 41, p. 1363-1365, 1976.
- CABRITA, L., FOSSEN, T., ANDERSEN, O. M. Colour and stability of the six common anthocyanidin 3-glucosides in aqueous solutions. Food Chemistry. v. 68, p. 101-107, 2000.
- CAMIRE, A. L., CLYDESDALE, F. M. High pressure liquid chromatography of cranberry anthocyanins. Journal of Food Science. v. 44, p. 926-927, 1979.
- CANSFIEL, P. E., FRANCIS, F. J. Quantitative methods for anthocyanins. 5. Separation of cranberry phenolics by electrophoresis and chromatography. Journal of Food Science. v. 35, p.309-311, 1970.
- CARRENO-DIAZ, R., GRAU, N. Anthocyanin pigments in *Dioscorea tryphida* L. Journal of Food Science. v. 42, n. 3, p.615-617, 1977.
- CARVALHO, P.R. N. Potencialidades dos corantes naturais. Revista Brasileira de Corantes Naturais, v 1, n. 1, p.242-243, 1992.
- CHEYNIER, V., SOUQUET, J. M., KONTEK, A., MOUTOUNET, M. J. Sci. Food Agric. v. 66, p. 283-288, 1994.
- CHOUNG, M. G., BAEK, I. Y., KANG, S. T., HAN, W. Y., SHIN, D. C., MOON, H. P., KANG, K. H. Isolation, and determination of anthocyanins in seed coats of black soybean (*Glycine max* L. Merr). J. Agric. Food Chem. V. 49, p. 5848-5851, 2001.
- CHRISTIAN HANSEN. Micro-cap™ colours –Chr. Hansen corantes naturais únicos e concentrados. Valinhos, SP: [19--]. 6p.
- COLLINS, C. H., BRAGA, G. L., BONATO, S. Introdução a Métodos Cromatográficos. 5º ed. Campinas: editora Unicamp, 1993. 279p.
- COLLINS, P., PLUMBLY, J. Natural colors – stable future? Food Tech Europe, n.2, 1995.
- CONCEIÇÃO, M. P. J. Cinética da Degradação Térmica de Antocianinas em Suco de Acerola (*Malpighia glabra* L). Viçosa, MG: UFV, 1997. 59p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, 1997.

- COSTA, C. T., HORTON, D., MARGOLIS, S. A. Analysis of anthocyanins in food by liquid chromatography, liquid chromatography-mass spectrometry and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. v. 881, n. 2, p. 403-410, 2000.
- CHRISTIAN HANSEN. Micro-capTM colours –Chr. Hansen corantes naturais únicos e concentrados. Valinhos, SP: [19--]. 6p.
- DANGLES, O. STECKEL, C. WIGAND, M. C., BROUILLARD, R. Two very distinct types of anthocyanin complexation: copigmentation and inclusion. *Tetrahedron*. p.5227-5230, 1992.
- DAVIES, A. J., MAZZA, G. Separation and characterization of anthocyanins of *Monarda fistulosa* by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 40, n. 8, p. 1341-1345, 1992.
- DU, C. T. e FRANCIS, F. J. Anthocyanins of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) *Journal of Food Science*. v.38, n.5, 1973, p.810-812.
- DYRBY, M., WESTERGAARD, N., STAPELFELDT, H. Light and heat sensitivity of red cabbage extract in soft drink model systems. *Food Chemistry*. v. 72, p. 431-437. 2001.
- FIORINI, M. Preparative high-performance chromatography for the purification of natural anthocyanins. *Journal of Chromatography A*. v. 692, n. 1, p. 213-219, 1995.
- FOSEN, T., CABRITA, L., ANDERSEN, O. M. Colour and stability of pure anthocyanins influenced by pH including the alkaline region. *Food Chemistry*. v. 63, n. 4, p. 435-440, 1998.
- FOUCAULT, A. P., CHEVOLOT, L. Counter-current chromatography: instrumentation, solvent selection and some recent applications to natural product purification. *Journal of Chromatography A*. v. 808, n. 1, p. 3-22, 1998.
- FRANCIS, F. J. Anthocyanins as food colourants. *The world of ingredients*. n. 4, p. 16-18. 1996.
- FRANCIS, F. J. Analysis of anthocyanins in foods. In: MARKAKIS, P., *Anthocyanins as Food Colors*. New York: Academic Press, p. 181-207, 1982.
- FRANCIS, F. J. *Colorants*. Minnesota: Eagan Press, 1999. 145p. (Eagan Press Handbook Series).
- FRANCIS, F. J. Detection of enocyanin in cranberry juice cocktail by color and pigment profile. *Journal of Food Science*. v. 50, p. 1640-1661, 1985.

- FREUND, P. R., WASHAN, C. J., MAGGION, M. Natural color for use in foods. *Cereal Foods World*, v. 33, n. 7, p.553-559, 1988.
- FROYTLOG, C. SLIMESTAD, R, ANDERSEN, O. M. Combination of chromatographic techniques for the preparative isolation of anthocyanins – applied on blackcurrant (*Ribes nigrum*) fruits. *Journal of Chromatography A*. v. 825, n. 1, p. 89-95, 1998.
- FULEKI, T. e FRANCIS, F. J. Quantitative methods for anthocyanins. 1 Extraction and determination of total anthocyanin in crabberries. *Journal of Food Science*. v. 33, p.72-77, 1968a.
- FULEKI, T. e FRANCIS, F. J. Quantitative methods for anthocyanins. 2 Determination of total anthocyanin and degradation index for cranberries juices. *Journal of Food Science*. v. 3, p.78-83, 1968b.
- GAO, L., MAZZA, G. Characterization, quantification, and distribution of anthocyanins and colorless phenolics in sweet cherries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 43, n. 2, p. 343-346, 1995.
- GIUSTTI, M. M., RODRÍGUEZ-SAONA, L. E., BAGGETT, J. R., REED, G. L., DURST, R. W., WROLSTAD, R. E. Anthocyanin pigment composition of red radish cultivars as potential food colorants. *Journal of Food Science*. v. 63, n. 2, p. 219-224, 1998.
- GIUSTTI, M. M., W., WROLSTAD, R. E. Characterization of red radish Anthocyanin. *Journal of Food Science*. v. 61, n. 2, p. 322-236, 1996.
- GONNET, J. F. Colour effects of co-pigmentation of anthocyanins revisited-1. A colorimetric definition using the CIELAB scale. *Food Chemistry*, v.63, n.3, p.409-415, 1998.
- GOTO, T. e KONDO, T. Structure and molecular stacking of anthocyanins-flower color variation. *Angewandte Chemie*. v.30, n.1, 1991, p.17-33.
- GUIMARÃES, I. S. S., CARVALHO, M. P. M., SUNDFELD, E., PHILIP, T. Corantes para alimentos: antocianinas de cascas de uvas. *Boletim de Pesquisa. EMBRAPA-CTAA*. N. 11. 1984.
- HARBONE, J. B. Variation in and functional significance of phenolic conjugation in plants. In: *Biochemistry of Plant Phenolics*. New York: Plenum Press, 1979, p.457-474.
- HARBORNE, J. B. *Comparative Biochemistry of Flavonoids*. New York: Academic Press, 1967. 136p.
- IADEROZA, M., BALDINI, I. S. D., BOVI, M. L. A. Anthocyaninins from fruits of açai (*Euterpe oleracea*, Mart). *Trop. Sci*. v. 32. p 41-46. 1992.

- JACKMAN, R. L. e SMITH, J. L. Anthocyanins e betalains. In: HENDRY e HOUGHTON, Natural Food Colorants. 2.ed. Blackie Academic & Professional, Glasgow: Blackie Academic & Professional, p.280-296. 1996.
- JACKMAN, R. L., YADA, R. Y. e TUNG, M. A. Review: separation and chemical properties of anthocyanins used for their qualitative and quantitative analysis. Journal of Food Biochemistry. v.11, p.279-308, 1987.
- JACKMAN, R. L., YADA, R. Y., TUNG, M. A. e SPEERS, R. A. Anthocyanins as food colorants – a review. Journal of Food Biochemistry. v.11, p.201-247, 1987.
- JURD, L. Reactions involved in sulfite bleaching of anthocyanins. Journal of Food Science. V.29, n.1, 1964, p.16-19.
- KUSKOSKI, E. M. Extração, identificação estabilidade de pigmentos dos frutos de baguaçu (*Eugenia umbrelliflora*, Berg). Florianópolis, UFSC, 2000, 113p. Tese
- LEE, H. S. Quantitative changes in anthocyanin pigments of lychee fruit during refrigerated storage. Food Chemistry. v. 40, p. 263-270, 1991.
- LEWIS, C. E., WALKER, J. R. L., LANCASTER, J. E. Effect of polysaccharides on the colour of anthocyanins. Food Chemistry. v. 45, p. 315-319, 1995.
- LIN, R. I., HILTON, B. W. Purification of commercial grape pigment. Journal of Food Science. v. 45, p. 297-309, 1980.
- LU, Y., FOO, L. Y. Polyphenolic constituents of blackcurrant seed residue. Food Chemistry. v. 80 p. 71-76, 2003.
- MABRY, T. J., MARKHAM, K. R., THOMAS, M. B. The Systematic Identification of Flavonoids. New York: Springer-Verlag, 1970. 354p.
- MAIN, J. H., CLYDESDALE, F. M., FRANCIS, F. J. Spray drying anthocyanin concentrates for use as food colorants. Journal of Food Science. v.43, n.6, 1978, p.1693-1697.
- MARKAKIS, P. Anthocyanins as food additives. In: MARKAKIS, P., Anthocyanins as Food Colors. New York: Academic Press, 1982, p.245-253.
- MARKAKIS, P. Stability of anthocyanins in foods. In: MARKAKIS, P., Anthocyanins as Food Colors. New York: Academic Press, 1982, p.163-178.
- MARKAKIS, P. Zone electrophoresis of anthocyanins. Nature. v. 187, p 1092-1093, 1960.

- MARKHAM, K. R. Isolation techniques for flavonoides. In: HARBORNE, J. B., MABRY, T. J., MABRY, H. The Flavonoides. New York: Academic Press, p. 2-42, 1975.
- MAZZA, G. B. e BROUILLARD, R. Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products. Food Chemistry. v.25, n.X, 1987.
- MAZZA, G. e MINIATI, E. Anthocyanins in Fruits, Vegetables and Grains. Boca Raton: CRC Press, 1993. 362p.
- MAZZA, G., BROUILLARD, R. Color stability and structural transformations of cyaniding 3,5-diglucoside and four 3-deoxyanthocyanins in aqueous solutions. J. Agric. Food Chem. v. 35, n. 3, p. 422-426. 1987.
- MAZZA, G., BROUILLARD, R. Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products. Food Chemistry. v.25, p. 207-225, 1987.
- MELLO, C. F. M., BARBOSA, W. C., ALVES, S. M. Obtenção de açaí desidratado. Boletim de Pesquisa. EMBRAPA-CPATU n. 92. 1988.
- MESCHTER, E.E. Effects of carbohydrates and other factors on strawberry products. J. Agric. Food Chem., v.1, n.8, p.574-9, 1953.
- METIVIER, R. P., HEINONEM, M., FRANKEL, E. N. Antioxidant interactions of catechin, cyanidin, caffeic acid, quercetin and ellagic acid on human LDL oxidation. Food Chemistry. v. 61, n ½. P71-75. 1998.
- MULLICK, D. B. Thin layer chromatography of anthocyanins. Journal of chromatography. v. 39, p. 291-301, 1969.
- NARAYAN, M. S., VENKATARAMAN, L. V. Characterisation of anthocyanins derived from carrot (*Daucus carota*) cell culture. Food Chemistry. v. 70, p. 361-363, 2000.
- NYBOM, N. Cellulose thin layers for anthocyanins analysis, with especial reference to the anthocyanin of black raspberries. Journal of chromatography. v. 38, p. 328-387, 1968.
- Odake, K. Chemical structure of two anthocyanins from purple sweet potato (*Ipomoea batatas*). Phytochemistry v. 31, p. 2127-2130. 1992.
- OSZMIANSKI, J., SAPIS, J. C. Anthocyanins in fruits of *Aronia melanocarpa* (chokeberry). Journal of Food Science. v. 53, n. 4, 1988.
- OTT, D. B. Manual de Laboratorio de Ciencia de los Alimentos. Zaragoza: Editorial Acribia S.A.p. 1241-1242. 1992.
- OZELA, E. F. Extração e identificação da estrutura de um pigmento de frutos de bortalha (*Basella rubra* L). Viçosa, UFV, 1996, 59p. Tese

- OZELA, E. F., STRINGHETA, P.C., LIMA, A. A. S, FARIAS, M. I. T. S. estudo comparativo do teor de antocianinas presentes no açaí (*Euterpe oleracea* M), nos períodos de safra e entressafra. Livro de Programas e Resumos III Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos. Campinas, FEA, p.55, 1999.
- PALAMIDIS, N., MARKAKIS, P. Stability of grape anthocyanin in carbonated beverage. *Journal of Food Science*. v. 40, n. 5, p. 1047-1049, 1975.
- PAZMIÑO-DURAN, E. A., GIUSTI, M. M., WROLSTAD, R. E., GLÓRIA, M. B. Anthocyanins from banana bracts (*Musa X paradisiaca*) as potencial food colorants. *Food Chemistry*. v. 73, p. 327-332. 2001.
- PERIN, J. D. EFEITO DE DIFERENTES COPIGMENTOS SOBRE A ESTABILIDADE DE ANTOCIANINAS EXTRAÍDAS DE BERINJELA (*Solanum melongena* L.). 1998. 77p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, 1998.
- PETRI, G., KRAWCZYK, U., KÉRY, Á. Spectrophotometric and chromatographic investigation of bilberry anthocyanins for quantification purposes. *Microchemical Journal*. v. 55, n. 1, p. 12-23, 1997.
- PIMENTEL, F.A. Avaliação de métodos de obtenção e da estabilidade de pigmentos de sementes de urucum (*Bixa orellana* L). Viçosa, MG: UFV, 1995. 132p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, 1995.
- POEI-LANGSTON, M. S., WROLSTALD, R. E. Color degradation in an ascorbic acid-anthocyanin-flavonol model system. *Journal of Food Science*. V. 46. p. 12181222. 1981.
- QUADROS, M. Fruticultura – O açaí nosso de cada dia. *Agroamazônia*. Ano I, n. 7, p. 10-16. 2002.
- ROGEZ, H. Açaí: preparo, composição e melhoramento da conservação. Belém: UFPA, 2000. 311p.
- ROSA, L.C..C., STRINGHETA, P.C., SILVA, P.C. Obtenção e estabilidade de antocianina de capim gordura na forma de corante em pó. Livro de Resumos do XVII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. V. 2, p.27, 2000.
- SANTOS, P. J. C., BRILLOUET, J. M., CHEYNIER, V., MOUTOUNET, M. Detection and partial characterization of new anthocyanin-derived pigments in wine. *Journal Science and Food Agricultural*. v. 70, p. 204-208, 1996.
- SHAHIDI, F., NACZK, M. Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects, Applications. Lancaster: Technomic Publishing Company, Inc., 1995, 321p.
- SHEWFEL, R. L., AHMED, E. M. Enhancement of powdered sof drink mixes with antocccyanin extracts. *Journal of Food Science*. v. 43, p. 435-438,

1978.

- SKREDE, G. Color quality of blackcurrant syrups during storage evaluated by Hunter L', a', b' values. *Journal of Food Science*. v. 50, p. 514-525., 1985.
- SLIMESTAD, R., ANDERSEN, O. M. Cyanidin 3-(2-glucosylgalactoside) and other anthocyanins from fruits of *Cornus suecica*. *Phytochemistry*. v. 47, n. 9, p. 2163-2166, 1998.
- STRACK, D. e WRAY, V. Anthocyanins. In: *Methods in Plant Biochemistry*. New York, Academic Press, p. 325-356, 1989.
- STRINGHETA, P. C. Identificação da estrutura e estudo da estabilidade das antocianinas extraídas da inflorescência de capim gordura (*Melinis minutiflora*, Pal de Beauv). Campinas, UNICAMP, 1991, 138p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, 1991.
- TAKEDA, K., HARBORNE, J. B., SELF, R. Identification and distribution of malonated anthocyanins in plants of the compositae. *Phytochemistry*. v. 25, n. 6, p. 1337-1342, 1986b.
- TAKEDA, K., HARBORNE, J. B., SELF, R. Identification of malonated anthocyanins in the liliaceae and labiatae. *Phytochemistry*. v. 25, n. 9, p. 2191-2192, 1986a.
- TIMBERLAKE, C. F., BRIDLE, P. The anthocyanins. In: HARBORNE, J. B., MABRY, T. J., MABRY, H. *The Flavonoids*. New York, Academic Press, p. 216-266, 1975.
- TORRE, L. C., BARRITT, B. H. Quantitative evaluation of *Rubus* fruit anthocyanin pigments. *Journal of Food Science*. v.42, p. 488-491, 1977.
- TORSKANGERPOLL, K., FOEEN, T. ANDERSEN, O. M. Anthocyanin pigments of tulips. *Phytochemistry*. v. 52, p. 1687-1692, 1999.
- WROLSTAD, R. E. Anthocyanins. In: LAURO, G. J. e FRANCIS F. J. *Natural Food Colorants-Science and Technology*. New York: marcel Dekker, Inc., p. 237-252, 2000.
- VON ELBE, J. H. E., SCHWARTZ, S. J. Colorantes. In: FENNEMA, O. R., *Food Chemistry*. 3.d. New York: Marcel Dekker, 1996, p.651-722.