

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA**

**LUÍSA FARIA MONTEIRO MAZZINI**

**AVALIAÇÃO ESPECTROQUÍMICA DO AMBIENTE QUÍMICO DE  
ANTOCIANINAS NATURAIS**

**VIÇOSA – MINAS GERAIS**

**2020**

**LUÍSA FARIA MONTEIRO MAZZINI**

**AVALIAÇÃO ESPECTROQUÍMICA DO AMBIENTE QUÍMICO DE  
ANTOCIANINAS NATURAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Maria Eliana Lopes R. de Queiroz

Coorientadores: André Fernando de Oliveira  
Cristiane Aparecida Almeida

**VIÇOSA – MINAS GERAIS**

**2020**

T

M477a  
2020

Mazzini, Luísa Faria Monteiro, 1994-  
Avaliação espectroquímica do ambiente químico de antocianinas naturais / Luísa Faria Monteiro Mazzini. - Viçosa, MG, 2020.  
119 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndices.

Orientador: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.112-119.

1. Delfinidina. 2. Alumínio. 3. Espectrofotometria. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Química. Programa de Pós-Graduação em Agroquímica. II. Título.

CDD 22. ed. 547.869

**LUÍSA FARIA MONTEIRO MAZZINI**

**AVALIAÇÃO ESPECTROQUÍMICA DO AMBIENTE QUÍMICO DE  
ANTOCIANINAS NATURAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 21 de fevereiro de 2020

Assentimento:

  
Luísa Faria Monteiro Mazzini  
Autora

  
Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz  
Orientadora

*Aos meus pais, Argeu e Suely, pelo amor incondicional e por serem os grandes incentivadores dos meus sonhos; e à minha querida irmã, Sarah, pela amizade e por ser a minha grande inspiração nessa longa jornada.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a minha querida orientadora, Prof. Maria Eliana, por todo o carinho, aprendizado e dedicação ao longo desses dois anos.

Ao meu coorientador Prof André Fernando, pela orientação, amizade, aprendizado e por ser uma grande inspiração.

À minha coorientadora, Cristiane, por toda dedicação, amizade e apoio para realização deste trabalho.

Ao Prof. Antônio Augusto e à Prof. Renata, por todos os ensinamentos, amizade e apoio em todas as horas.

Aos órgãos de fomento, CNPq, CAPES e FAPEMIG.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À Universidade Federal de Viçosa e ao seu Departamento de Química pela oportunidade de realização do trabalho.

Aos professores e funcionários do Departamento de Química que com seu carinho e dedicação também fizeram parte dessa conquista!

## **AGRADECIMENTOS PESSOAIS**

Agradeço primeiramente a Deus, pela oportunidade dessa vida maravilhosa e por ser meu porto seguro nas horas difíceis.

Aos meus pais, Argeu e Suely, que com todo amor e dedicação fazem com que meus sonhos se tornem realidade, sendo os responsáveis por essa conquista.

À minha querida irmã, Sarah, pelo amor, amizade e por ser a minha grande inspiração de todos os dias.

Ao Lucas, por todo amor, companheirismo e amizade;

Ao Caio, pela amizade de sempre;

Aos meus familiares, por todo apoio, dedicação e pelas orações;

Ao grupo de pesquisa LaQuA, por todos os momentos compartilhados, pela amizade e por todo o carinho, em especial, a Mariana por ser uma grande amiga para todas as horas;

À equipe QUI 112 pelos momentos compartilhados e amizade, em especial, a minha grande amiga Giovana por todo apoio e carinho;

Aos meus amigos de viçosa, Gabriela, Ariany, Bárbara, Yan e Marcelo, por todos os momentos vividos, pela amizade e por sempre vibrarem com as minhas conquistas.

*“A humildade é o primeiro degrau para a sabedoria”*

**São Tomás de Aquino**

*“A simplicidade é o último degrau de sofisticação”*

**Leonardo da Vinci**

## RESUMO

MAZZINI, Luísa Faria Monteiro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2020. **Avaliação espectroquímica do ambiente químico de antocianinas naturais.** Orientador: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz. Coorientadores: André Fernando de Oliveira e Cristiane Aparecida Almeida.

As antocianinas são um grupo de pigmentos pertencentes a classe dos flavonóides, que garantem coloração às plantas. Esse tipo de pigmento está presente nas sépalas de hortênsia e na casca da berinjela. Os diferentes tipos de cores adquiridas pelas sépalas de hortênsia são causados pela mesma antocianina, mas dependem do tipo de solo em que a hortênsia é plantada. A fim de entender esse comportamento das antocianinas presentes nas hortênsias, foram realizados diversos estudos com o extrato líquido obtido das sépalas, visando comprovar os fatores que afetam o comportamento da mesma, além de verificar se a presença de metais no solo, como o alumínio, afeta na coloração das sépalas. Foi observada uma semelhança entre os espectros de reflectância difusa das sépalas azuis *in natura* com o espectro do complexo alumínio-antocianina, corroborando a participação do alumínio na formação da cor azul das sépalas. Além do alumínio, foram estudados outros metais, como: cálcio, cádmio, chumbo entre outros, sendo que somente o ferro (II) e o ferro (III) se complexaram com a antocianina do extrato com alteração do espectro de absorção na região do ultravioleta e visível. Devido ao curto período de floração das hortênsias e relatos de que a mesma antocianina presente nas sépalas de hortênsias também é a antocianina responsável pela coloração na berinjela, foram estudadas também as antocianinas extraídas da casca de berinjela. O extrato de berinjela foi caracterizado por espectroscopia no infravermelho, sendo obtidos os espectros com ferro (II), ferro (III) e alumínio. Além disso, os teores de ferro e alumínio na amostra liofilizada foram determinados. Foi possível confirmar similaridade entre as antocianinas dos extratos de hortênsia e berinjela, sendo que a baixa concentração de alumínio e ferro no extrato de berinjela não interferiram nos resultados. Foi realizada a deconvolução dos espectros em diferentes valores de pH utilizando o algoritmo MCR/ALS, a fim de estimar a quantidade de espécies químicas associadas ao sistema da antocianina presentes no meio. Foi possível observar a presença de diferentes espécies em solução para as duas fontes, como o cátion flavílico, a pseudobase carbinol e as chalconas. Os estudos cinéticos com o extrato de berinjela

demonstraram que o modelo de pseudo primeira ordem foi adequado para descrever o mecanismo cinético entre as antocianinas e o pH da solução.

Palavras-chave: Delfinidina. Alumínio. Espectrofotometria. Espectroscopia de Reflectância Difusa. Complexos metálicos. MCR/ALS.

## ABSTRACT

MAZZINI, Luísa Faria Monteiro. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2020. **Spectro-chemical evaluation of the chemical environment of natural anthocyanins.** Adviser: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz. Co-Advisers: André Fernando de Oliveira and Cristiane Aparecida Almeida.

Anthocyanins are a group of pigments belonging to the flavonoid class, which guarantee color to plants. This type of pigment is present in hydrangea sepals and eggplant skin. The different types of hydrangea sepals are caused by the same anthocyanin, but it depends on the type of soil that the hydrangea is planted. In order to understand the behavior of anthocyanins in hydrangeas, studies were carried out with the liquid extract obtained from the sepals, in order to prove the factors that affect your behavior, in addition to checking whether the presence of metals in the soil, such as aluminum, affects the color of the sepals. Initially, the sepals were characterized by diffuse reflectance, where it was possible to obtain the absorption spectra of the sepals and compare them with the spectrum obtained for the aluminum-anthocyanin complex, thus finding a similarity between the spectrum of this complex with the spectrum of blue colored sepals, indicating that aluminum does play a role in the formation of blue sepals. In addition to aluminum, other metals were studied, such as: calcium, cadmium, lead, among others, with only iron (II) and iron (III) form complex with the anthocyanin in the extract with alteration of the absorption spectrum in the ultraviolet and visible region. Due to the short flowering period of the hydrangeas and reports that the same anthocyanin present in the hydrangea sepals is also the anthocyanin responsible for the coloring in the eggplant, it was decided to continue the studies using the anthocyanins extracted from the eggplant peel. The eggplant extract was characterized by infrared spectroscopy, with spectra obtained with iron (II), iron (III) and aluminum. In addition, the levels of iron and aluminum in the lyophilized sample were determined. It was possible to confirm similarity between the anthocyanins of the hydrangea and eggplant extracts, and the low concentration of aluminum and iron in the eggplant extract did not interfere in the results. The deconvolution of the spectra at different pH values was performed using the MCR / ALS algorithm, in order to estimate the amount of chemical species associated with the anthocyanin system present in the medium. It was possible to observe the presence of different species in solution for the two sources, such as the flavylic cation, the carbinol and the chalcones. Kinetic studies with eggplant extract demonstrated that

the first order model was adequate to describe the kinetic mechanism between anthocyanins and the pH of the solution.

Keywords: Delphinidin. Aluminum. Spectrophotometry. Diffuse Reflectance Spectroscopy. Metal Complexes. MCR/ALS.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Espectro eletromagnético na região do visível de 380 à 780 nm.....	22
<b>Figura 2:</b> Estrutura química dos principais tipos de flavonoides . .....	24
<b>Figura 3:</b> Estrutura do cátion flavílico.....	24
<b>Figura 4:</b> Possíveis estruturas das antocianinas em função do pH do meio. Equilíbrios ácido-base de Bronsted e Processos Redox.....	27
<b>Figura 5:</b> Representação de uma célula vegetal .....	33
<b>Figura 6:</b> Localização das pétalas verdadeiras e das sépalas da hortênsia .....	34
<b>Figura 7:</b> Estrutura da delfinidina-3-glicosídeo .....	34
<b>Figura 8:</b> Relação entre a concentração de alumínio no vacúolo com as respectivas colorações das sépalas de hortênsia.....	35
<b>Figura 9:</b> Curva de distribuição de espécies do sistema alumínio para formação dos hidroxocomplexos. ....	36
<b>Figura 10:</b> Estrutura dos copigmentos utilizados.. .....	37
<b>Figura 11:</b> Estrutura dos copigmentos que formaram a coloração azul quando na presença de alumínio e do extrato de antocianina.....	38
<b>Figura 12:</b> Estrutura do isômero trans da nasunina . .....	39
<b>Figura 13:</b> Diagrama Esquemático do processo de digestão da amostra liofilizada da casca de berinjela para quantificação dos teores de ferro e alumínio. ....	48
<b>Figura 14:</b> Espectro das antocianinas presentes no extrato aquoso de hortênsias em pH ~1,64. Volume de extrato utilizado: 3,0 mL.....	53
<b>Figura 15:</b> Espectros de reflectância difusa de diferentes sépalas de hortênsia <i>in natura</i> . (—) sépalas rosas; (—) sépalas azuis.....	54
<b>Figura 16:</b> Espectro de absorção das sépalas de hortênsia obtidos dos dados de reflectância difusa a partir da função Kubelka-Munk. (—) sépalas rosas; (—) sépalas azuis.....	55
<b>Figura 17:</b> Espectros de absorção das sépalas de hortênsia <i>in natura</i> e do extrato líquido da hortênsia. (—) Extrato líquido; (—) sépalas rosas; (—) sépalas azuis.....	56
<b>Figura 18:</b> Estudo da extração de antocianinas presentes nas sépalas de hortênsia em pH ~1,64: (—) extração utilizando solução aquosa em banho de ultrassom; (—) solução aquosa em chapa de aquecimento; (—) extração utilizando solução de acetonitrila 50% (v/v) em banho de ultrassom.....	56

<b>Figura 19:</b> Espectro da formação do complexo alumínio-antocianina para diferentes concentrações de alumínio (2 mmol L <sup>-1</sup> à 60 mmol L <sup>-1</sup> ). Comprimento de onda inicial de 524 nm. Volume de extrato: 3 mL.....	58
<b>Figura 20:</b> Variação da absorbância em função da concentração de alumínio obtida no comprimento de onda máximo em 565 nm para o estudo da formação do complexo alumínio-antocianina. pH da solução em 2,30; volume de extrato: 3 mL. ....	59
<b>Figura 21:</b> Comparação dos espectros da ( — ) sépala azul in natura e do ( — ) complexo alumínio-antocianina.. ....	59
<b>Figura 22:</b> Espectros das soluções com diferentes volumes de extrato para formação do complexo alumínio-antocianina com concentração fixa de alumínio de 20,0 mmol L <sup>-1</sup> .....	60
<b>Figura 23:</b> Influência do volume de extrato de hortênsia sobre solução de alumínio. (A) Deslocamento do comprimento de onda de máxima absorbância na região do Visível. (B) Variação da absorbância em 524 nm. Concentração de alumínio de 20 mmol L <sup>-1</sup> .....	61
<b>Figura 24:</b> Espectros do extrato de hortênsia em presença presença de metais. ( — ) Antocianina pura; ( — ) Metal com antocianina; ( — ) metal puro; ( — ) metal puro + antocianina pura. ....	63
<b>Figura 25:</b> Espectro obtido para o extrato de hortênsia em diferentes condições. (A) Espectro do extrato para diferentes valores de pH, (B) Espectro do extrato para diferentes valores de pH e concentrações de alumínio e (C) Espectro do extrato para diferentes valores de pH e concentrações de sulfito. ( — ) pH 3,5; ( — ) pH 4,0; ( — ) pH 5,0; ( — ) pH 6,0; ( — ) pH 7,5 e ( — ) pH 9,5.....	64
<b>Figura 26:</b> (A) Espectro da solução de antocianinas das espécies estimadas pelo MCR/ALS para diferentes valores de pH. (B) Concentração relativa estimada pelo MCR para as espécies de antocianina em função do pH da solução. ( — ) Espécie A. ( — ) Espécie B.....	65
<b>Figura 27:</b> (A) Espectro da solução de antocianinas das espécies estimadas pelo MCR/ALS para diferentes valores de pH em presença de sulfito. (B) Concentração relativa estimada pelo MCR para as espécies de antocianina em função do pH da solução e presença de sulfito. ( — ) Espécie A. ( — ) Espécie B.....	66
<b>Figura 28:</b> (A) Espectro da solução de antocianinas das espécies estimadas pelo MCR/ALS para diferentes valores de pH em presença de alumínio. (B) Concentração relativa estimada pelo MCR para as diferentes espécies de antocianina em função do pH da solução e presença de alumínio. ( — ) Espécie B. ( — ) Espécie C.....	67

<b>Figura 29:</b> (A) Espectro da solução de antocianinas das espécies estimadas pelo MCR/ALS para diferentes valores de pH em presença de sulfito para a matriz de dados aumentados. (B) Concentração relativa estimada pelo MCR para as diferentes espécies de antocianina em função do pH da solução e presença de sulfito na matriz de dados aumentados. (—) Espécie A. (—) Espécie B. ....	68
<b>Figura 30:</b> (A) Espectro da solução de antocianinas das espécies estimadas pelo MCR/ALS para diferentes valores de pH em presença de alumínio para a matriz de dados aumentados. (B) Concentração relativa estimada pelo MCR para as diferentes espécies de a antocianina em função do pH da solução e presença de alumínio na matriz de dados aumentados. (—) Espécie A. (—) Espécie B. (—) Espécie D. ....	69
<b>Figura 31:</b> (A) Espectro da solução de antocianinas das espécies estimadas pelo MCR/ALS para diferentes valores de pH em presença de alumínio e sulfito para a matriz de dados aumentados. (B) Concentração relativa estimada pelo MCR para as diferentes espécies de antocianina em função do pH da solução e presença de alumínio e sulfito na matriz de dados aumentados. (—) Espécie A. (—) Espécie B. (—) Espécie C. (—) Espécie D. ....	70
<b>Figura 32:</b> Espectro do extrato de berinjela na região do UV-visível em meio aquoso em pH 1,64. Extrato obtido em água deionizada em ultrassom. Volume de extrato: 3 mL. ....	74
<b>Figura 33:</b> Espectros dos extratos obtidos da extração de antocianinas presentes na caca de berinjela em banho de ultrassom empregando os solventes: (—) água em ultrassom, (—) etanol, (—) metanol, (—) acetonitrila, (—) acetona; (—) água quente na ausência de sonicação. Todas as soluções em pH em torno de 1,64. ....	75
<b>Figura 34:</b> Titulação potenciométrica realizada com NaOH 0,5 mol L <sup>-1</sup> e 0,2 mol L <sup>-1</sup> sobre o extrato de berinjela. ....	77
<b>Figura 35:</b> Coloração adquirida pelo extrato ao longo da titulação em função do pH do meio. (A) pH até 3,5 (B) pH 3,5 até 4,5; (C) pH 4,5 até 6,0; (D) pH acima de 7,5. ....	78
<b>Figura 36:</b> Espectros de infravermelho obtidos na faixa de 400 a 4000 cm <sup>-1</sup> . (A) Espectro do extrato obtido a partir da casca de berinjela. (B) Espectro da amostra liofilizada. ....	78
<b>Figura 37:</b> Curvas analíticas do ferro total e do alumínio respectivamente. (A) Concentração de ferro variando de 1,0 a 10,0 mg L <sup>-1</sup> ; (B) Concentração de alumínio variando de 1,0 a 20,0 mg L <sup>-1</sup> . ....	79
<b>Figura 38:</b> Espectros de formação do complexo alumínio-antocianina em meio ácido (Concentrações de alumínio variando de 0,4 mmol L <sup>-1</sup> à 20 mmol L <sup>-1</sup> ). Volume de extrato: 3 mL; pH da amostra em 1,65. ....	82

<b>Figura 39:</b> Comparação entre os espectros do complexo alumínio-antocianina (—) Extrato de hortênsia; (—) Extrato de berinjela. ....	82
<b>Figura 40:</b> Variação da absorvância em função da concentração de alumínio para estudo da formação do complexo alumínio-antocianina. (—) 288 nm; (—) 362 nm. pH da solução em 1,64; volume de extrato: 3,0 mL. ....	83
<b>Figura 41:</b> Variação da absorvância em função da concentração de alumínio obtida no comprimento de onda máximo em 575 nm para estudo da formação do complexo alumínio-antocianina. pH da solução em 1,64; volume de extrato: 3,0 mL. ....	83
<b>Figura 42:</b> Coloração do extrato de berinjela em diferentes concentrações de alumínio (0,4 mmol L <sup>-1</sup> a 4 mmol L <sup>-1</sup> ), sendo este aumento, da esquerda para a direita. (A) 0,4 mmol L <sup>-1</sup> ; (B) 0,6 mmol L <sup>-1</sup> ; (C) 1,0 mmol L <sup>-1</sup> ; (D) 2,0 mmol L <sup>-1</sup> ; (E) 4,0 mmol L <sup>-1</sup> . ....	84
<b>Figura 43:</b> Espectros de formação do complexo ferro (II) - antocianina (Concentrações de ferro (II) de 0,4 mmol L <sup>-1</sup> a 32 mmol L <sup>-1</sup> ). pH da solução em 1,76; Volume de extrato: 3 mL. ....	85
<b>Figura 44:</b> Variação da absorvância em função da concentração de ferro (II) obtida no comprimento de onda máximo em 550 nm para estudo da formação do complexo ferro (II) - antocianina. pH da solução em 1,64; volume de extrato: 3,0 mL. ....	85
<b>Figura 45:</b> Coloração do extrato de berinjela em diferentes concentrações de ferro (II) (0,4 mmol L <sup>-1</sup> a 32 mmol L <sup>-1</sup> ), sendo este aumento, da esquerda para a direita. (A) 0,4 mmol L <sup>-1</sup> ; (B) 10 mmol L <sup>-1</sup> ; (C) 18 mmol L <sup>-1</sup> ; (D) 26 mmol L <sup>-1</sup> . ....	86
<b>Figura 46:</b> Estudo da formação do complexo ferro (III) – antocianina acompanhado da queda da absorvância em 550 nm. (A) comportamento espectral do extrato de berinjela na presença de 0,4 mmol L <sup>-1</sup> de Ferro (III). (B) Diminuição da absorvância ao longo do tempo no comprimento de onda máximo em 550 nm. pH da solução 3,2; volume de extrato: 3,0 mL. ....	88
<b>Figura 48:</b> Mudança da coloração sofrida pelo extrato de berinjela ao se adicionar 8 mmol L <sup>-1</sup> de ferro (III) em solução ao longo do tempo. ....	89
<b>Figura 49:</b> Estudo do comportamento do extrato na presença de ácido ascórbico (A) Espectro do extrato de antocianina e em comparação com o espectro do extrato na presença de diferentes concentrações de ácido ascórbico (0,5 mmol L <sup>-1</sup> à 100 mmol L <sup>-1</sup> ). (B) variação da absorvância em função da concentração de ácido ascórbico. Volume de extrato: 3,0 mL. ....	89
<b>Figura 50:</b> Estudo do comportamento do extrato na presença de hidrazina (A) Espectro do extrato de antocianina e espectro do extrato na presença de diferentes concentrações de hidrazina (0,5 mmol L <sup>-1</sup> a 100 mmol L <sup>-1</sup> ). (B) variação da absorvância em função da concentração de hidrazina. Volume de extrato: 3,0 mL. ....	90

<b>Figura 51:</b> Espectro do extrato em diferentes concentrações de sulfito (0,1 mmol L <sup>-1</sup> a 5 mmol L <sup>-1</sup> ).	91
<b>Figura 52:</b> Variação da absorbância do extrato na presença no comprimento de máxima absorbância em 524 nm do extrato de berinjela em diferentes concentrações de sulfito (0,1 mmol L <sup>-1</sup> à 5 mmol L <sup>-1</sup> ).	92
<b>Figura 53:</b> Coloração da solução contendo o extrato puro e na presença de diferentes concentrações de sulfito (0,1 mmol L <sup>-1</sup> a 5 mmol L <sup>-1</sup> ), sendo este aumento representado da esquerda para a direita.	92
<b>Figura 54:</b> Representação da reação entre o sulfito e o formol para a formação do aduto sulfônico.	93
<b>Figura 55:</b> Espectro do extrato de berinjela em diferentes valores de pH do meio (2 à 11); (—) pH 2; (—) pH 3; (—) pH 4; (—) pH 5; (—) pH 6; (—) pH 7; (—) pH 8; (—) pH 9; (—) pH 10; (—) pH 11.	93
<b>Figura 56:</b> Espectros recuperados pelo MCR/ALS a partir dos estudos cinéticos em valores de pH variando 5 a 11, para as matrizes de dados individuais.	95
<b>Figura 57:</b> Espectros recuperados e da concentração relativa ao longo do tempo dos dados obtidos pelo MCR a partir de todos os valores de pH em seus pontos finais para a matriz de dados aumentados. (—) Espécie A. (—) Espécie B. (—) Espécie C. (—) Espécie D.	96
<b>Figura 58:</b> Variação das absorbâncias máximas ao longo do tempo para cada estudo de pH. Para os valores de pH 2, 3, 4, 5 e 6, considerou o $\lambda_{max}$ em 524 nm; para o pH 7 considerou o $\lambda_{max}$ em 597 nm; para os pH 8, 9 e 10 considerou o $\lambda_{max}$ em (—) 463 nm (—) 597 nm; para o pH 11 considerou o $\lambda_{max}$ em 363 nm.	98
<b>Figura 59:</b> Estudo do comportamento do extrato em diferentes valores de pH (A) Modelo ExpDec aplicado aos dados experimentais do pH 5. (B) Gráfico de resíduos para o estudo do pH 5. Volume de extrato 3 mL.	101
<b>Figura 60:</b> Estudo do comportamento do extrato em diferentes valores de pH (A) Modelo ExpDec aplicado aos dados experimentais do pH 10. (B) Gráfico de resíduos para o estudo do pH 10 obtido do modelo ExpDec para (—) 597 nm; (—) 463 nm.	101
<b>Figura 61:</b> Gaussiana formado a partir dos valores da constante de velocidade encontrados para o extrato em função do pH do meio.	102
<b>Figura 62:</b> Comparação entre os espectros de (—) Hortênsia e (—) berinjela extraídos nas mesmas condições experimentais: água deionizada em meio ácido.	104

<b>Figura 63:</b> Comparação entre os extratos dos complexos formados entre as antocianinas da hortênsia e berinjela com o alumínio e da sépala de hortênsia in natura de coloração azul. (—) Complexo antocianina-alumínio da casca de berinjela; (—) complexo antocianina-alumínio da hortênsia; (—) sépalas de hortênsia de coloração azul <i>in natura</i> .....	105
<b>Figura 64:</b> Estrutura proposta para o complexo alumínio-antocianina. ....	106
<b>Figura 65:</b> Espectros do estudo da influência do tampão sobre o extrato de berinjela em pH 3, 6 e 9, comparados com o extrato ajustado com soluções de NaOH e HCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> . (A) Espectros do extrato em pH 3 ajustado com ( — ) tampão acetato; ( — ) tampão citrato; ( — ) solução de NaOH. (B) Espectro do extrato em pH 6 ajustado com ( — ) tampão citrato; ( — ) tampão fosfato; ( — ) solução de NaOH. (C) Espectros do extrato em pH 9 ajustado ( — ) tampão carbonato; ( — ) tampão amônio; ( — ) tampão borato; ( — ) solução de NaOH.....	110

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Nomes e grupos substituintes das antocianidinas mais encontradas na natureza.....	25
<b>Tabela 2:</b> Nome das principais antocianinas e seus respectivos comprimentos de onda de máxima absorbância na região do visível na espectrofotometria de absorção molecular.....	30
<b>Tabela 3:</b> Modos de extração das antocianinas em diferentes matrizes, utilizando diferentes tipos de solventes.....	32
<b>Tabela 4:</b> Reagentes utilizados neste trabalho, sua marca e pureza. ....	44
<b>Tabela 5:</b> Instrumentação utilizada ao longo do trabalho.....	45
<b>Tabela 6:</b> Soluções padrão utilizadas no estudo do pH. ....	49
<b>Tabela 7:</b> Solventes utilizados no estudo da extração da antocianina das sépalas de hortênsia com seus respectivos valores de absorbância, e os valores de porcentagem de eficiência relativa de extração.....	57
<b>Tabela 8:</b> Solventes utilizados no estudo da extração da antocianina da casca de berinjela com seus respectivos valores de absorbância, e os valores de porcentagem de eficiência relativa de extração.....	76
<b>Tabela 9:</b> Parâmetros obtidos para as curvas analíticas de Alumínio e de Ferro total. ....	80
<b>Tabela 10:</b> Valores de absorbância para o ferro e alumínio de cada umas das triplicatas com suas respectivas massas. ....	80
<b>Tabela 11:</b> Parâmetros obtidos no ajuste do modelo ExpDec aos dados experimentais do extrato em diferentes valores de pH. ....	100

# SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	21
1.1. Sensação de cor.....	22
1.2. Corantes sintéticos e naturais.....	23
1.3. Flavonóides e antocianinas .....	23
1.3.1. Fatores que influenciam a estabilidade das antocianinas .....	25
1.3.2. Comportamento das antocianinas frente a variação de pH .....	26
1.3.3. Influência da copigmentação e da ligação com íons metálicos sobre as antocianinas .....	27
1.3.4. Comportamento das antocianinas frente a presença de luz, oxigênio e ao calor ...	28
1.3.5. Estabilidade das antocianinas frente a presença de ácido ascórbico e sulfito .....	29
1.4. Técnicas utilizadas para determinação e quantificação de antocianinas .....	29
1.5. Métodos de extração de antocianinas .....	32
1.6. Localização das antocianinas nas plantas .....	33
1.7. Hortênsias .....	33
1.8. Berinjela.....	39
JUSTIFICATIVA DO TRABALHO.....	41
OBJETIVOS.....	42
Objetivo geral .....	42
Objetivos específicos .....	42
CAPÍTULO 2 .....	43
MATERIAL E MÉTODOS.....	44
2.1. Reagentes e soluções .....	44
2.2. Equipamentos.....	45
2.3. Obtenção das amostras.....	46
2.4. Extração das antocianinas da casca de berinjela e hortênsia .....	46
2.5. Liofilização do extrato de berinjela .....	47
2.6. Titulação Potenciométrica .....	47
2.7. Espectroscopia no Infravermelho para o extrato de berinjela.....	47
2.8. Quantificação dos teores de ferro e alumínio presentes na matriz de berinjela.....	48
2.9. Estudo do comportamento das antocianinas em função do pH do meio .....	48
2.10. Formação do complexo alumínio-antocianina.....	49
2.11. Estudo da complexação das antocianinas com metais.....	49
2.12. Estudo do comportamento do extrato frente a presença de agentes redutores .....	49
2.13. Reflectância difusa.....	50

2.14. Modelos cinéticos .....	50
CAPÍTULO 3 .....	52
1 Introdução.....	53
2 Resultados e Discussão .....	53
2.1. Comportamento espectral do extrato de antocianina extraído de hortênsia .....	53
2.2. Caracterização das sépalas de hortênsia usando reflectância difusa.....	54
2.3. Estudo da extração das antocianinas presentes na hortênsia .....	56
2.4. Estudo da formação do complexo alumínio-antocianina.....	57
2.5. Estudo do comportamento do extrato de hortênsia em presença de outros metais.....	61
2.6. Estudo das espécies de antocianinas em diferentes valores de pH .....	63
2.7. Determinação qualitativa das espécies de antocianinas nos extratos de hortênsia para os dados individuais em diferentes valores de pH, para a matriz de dados aumentados, obtidos pelo MCR/ALS .....	67
Conclusões Parciais .....	71
CAPÍTULO 4 .....	72
1 Introdução.....	73
2 Resultados e discussão .....	74
2.1. Comportamento espectral do extrato de berinjela .....	74
2.2. Otimização da extração.....	74
2.3. Titulação Potenciométrica .....	76
2.4. Espectroscopia no Infravermelho .....	78
2.5. Determinação dos teores de ferro e alumínio na amostra: .....	79
2.6. Avaliação do rendimento de extração das antocianinas a partir do processo de liofilização .....	81
2.7. Estudo de formação do complexo de Alumínio-antocianina.....	81
2.8. Estudo de formação do complexo de Ferro (II) - antocianina .....	84
2.9. Estudo de formação do complexo de Ferro (III) - antocianina.....	87
2.10. Estudo do comportamento do extrato em presença de agente redutores .....	89
2.11. Estudo das espécies de antocianinas em função do pH do meio obtidas pelo método MCR.....	93
2.12. Comportamento cinético.....	97
2.13. Modelo cinético para o estudo do pH .....	99
Conclusões Parciais .....	103
COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS NA ANÁLISE DE ANTOCIANINAS PROVENIENTES DE HORTÊNSIAS <i>VERSUS</i> ANTOCIANINAS PROVENIENTES DE BERINJELAS .....	104
Conclusão Geral .....	107

Perspectivas Futuras .....	108
Apêndice .....	109
Referências Bibliográficas .....	112

# **CAPÍTULO 1**

---

## **INTRODUÇÃO, JUSTIFICATIVA DO TRABALHO E OBJETIVOS**

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1. Sensação de cor

A cor é uma impressão sensorial do observador, sendo resultante da interação entre a fonte de luz, o objeto e o sistema visual humano (X-RITE, 2004). Quando a luz refletida pelo objeto chega até o observador, uma pequena faixa do espectro eletromagnético é detectada pelo olho humano, compreendendo comprimentos de onda na região do visível que vão de 380 nm à 780 nm (MARTINS, SUCUPIRA e SUAREZ, 2015), como está representado na Figura 1.

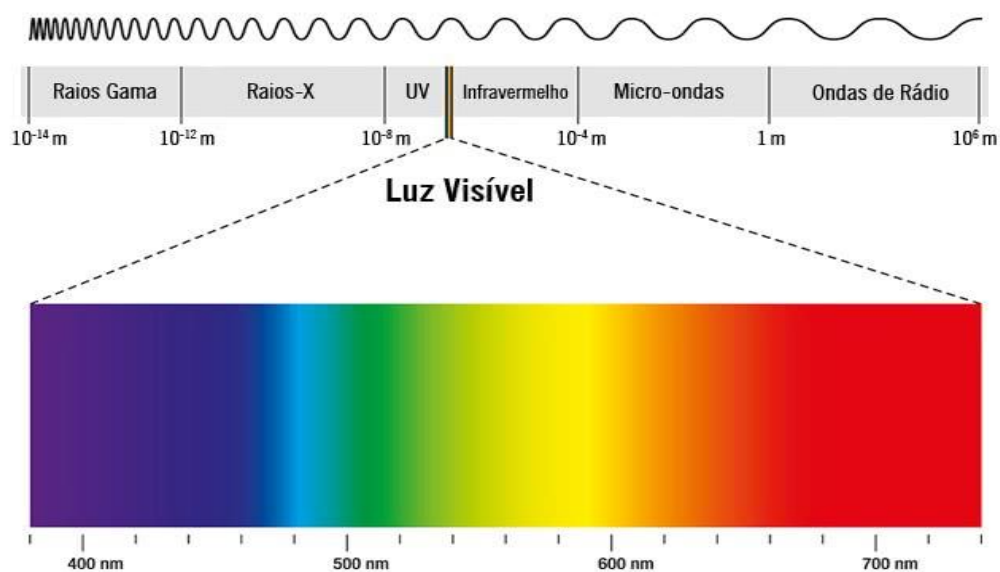


Figura 1: Espectro eletromagnético na região do visível de 380 à 780 nm (CARVALHO, 2020).

O olho humano se comporta como detector graças a presença de células nervosas que são sensíveis à luz, conhecidas como cones e bastonetes (HELENE e HELENE, 2011). Os cones são responsáveis por garantir a sensação de cor para o observador, pois são capazes de detectar três regiões diferentes do espectro visível, por isso existem três tipos de cones diferentes: os cones vermelhos, verdes e azuis (MEHRI, 2017; MUSTAFI, ENGEL e PALCZEWSKI, 2009). Graças à combinação da intensidade desses cones, ocorre a formação de impulsos elétricos, que chegam até o cérebro dando a sensação de cor (CONWAY, CHATTERJEE, *et al.*, 2010). Já os bastonetes não apresentam essa capacidade de distinguir essas regiões no visível, mas são muito importantes para que o olho humano possa enxergar com pouca luminosidade (MARTINS, SUCUPIRA e SUAREZ, 2015).

## 1.2. Corantes sintéticos e naturais

Os corantes são aditivos que conferem, intensificam ou restauram a cor de alimentos e bebidas (CONSTANT, STRINGHETA e SANDI, 2002). Por isso são substâncias amplamente utilizadas pelas indústrias, pois, seu uso está diretamente ligado com a aceitação do consumidor (DOWNHAM e COLLINS, 2000).

Essas substâncias estão divididas em duas classes principais: os corantes sintéticos e os corantes naturais (CONSTANT, STRINGHETA e SANDI, 2002). Os corantes sintéticos são substâncias artificiais que apresentam como características: alta estabilidade frente a fatores como a luz, pH, presença de oxigênio e ao calor, ampla gama de cores, alto poder de tingimento, além de baixo custo de produção (CONSTANT, STRINGHETA e SANDI, 2002). Mesmo com todas essas vantagens, alguns corantes pertencentes à classe dos corantes azo, como o azul brilhante, amarelo crepúsculo e tartrazina têm apresentado alergia em algumas pessoas (GUARATINI e ZANONI, 2000; LAU, MCLEAN, *et al.*, 2006; MARMITT, PIROTTA e STÜLP, 2010). Dessa maneira, o número de aditivos sintéticos utilizados pela indústria tem diminuído com o passar dos anos e a procura por corantes naturais tem aumentado expressivamente (PAZMIÑO-DURÁN, GIUSTI, *et al.*, 2001).

Dentre os corantes naturais mais utilizados pela indústria, tem-se o urucum, antocianinas, betalaínas, curcumina, entre outros (CONSTANT, STRINGHETA e SANDI, 2002). Essa classe de corantes tem proporcionado coloração mais clara e aspecto natural ao produto, além disso, devido a sua atividade antioxidante tem tido alta aceitabilidade do consumidor (CONSTANT, STRINGHETA e SANDI, 2002). Os principais grupos dessa classe de corantes encontrados na natureza são os carotenoides e os flavonóides (BOBBIO & BOBBIO, 1992 *apud* (CONSTANT, STRINGHETA e SANDI, 2002)), sendo os flavonóides o enfoque deste trabalho.

## 1.3. Flavonóides e antocianinas

Os flavonóides são uma classe de pigmentos que apresentam como estrutura fundamental uma molécula formada por quinze átomos de carbono organizados na forma C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, ou seja, dois anéis benzênicos e um grupo pirano (KAMMERER, 2016). Essa classe de pigmentos está dividida em seis grupos principais que se diferenciam pelo estado de oxidação do anel de pirano (IKAN, 1991). A estrutura química dos principais flavonóides está representada na Figura 2:

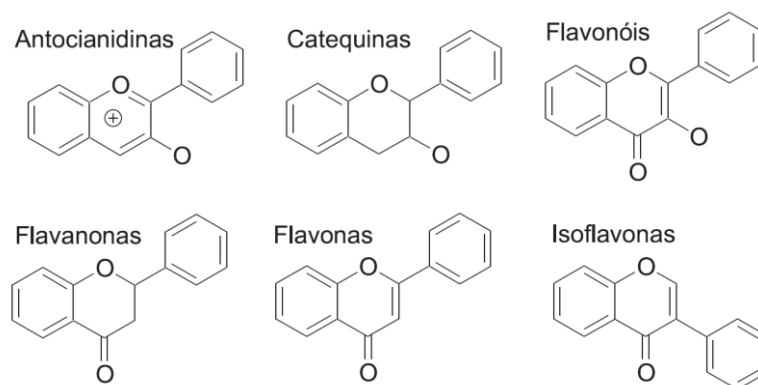


Figura 2: Estrutura química dos principais tipos de flavonoides (MOLNÁR-PERL e ZS.FÜZFAI, 2005).

Dentre os seis grupos de flavonoides, destacam-se as antocianidinas, nas quais derivam-se as antocianinas (MARÇO e POPPI, 2008). As antocianinas apresentam como estrutura fundamental o cátion flavílico (Figura 3) e se diferenciam das antocianidinas por apresentar açúcares ligados aos grupos hidroxila de suas moléculas (MARÇO e POPPI, 2008), sendo que, as antocianidinas mais encontradas na natureza são: pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina e malvidina, que receberam esses nomes devido a matriz que elas foram isoladas primeiramente (HARBORNE, 1982). A diferença entre cada uma das antocianidinas está representada na Tabela 1.

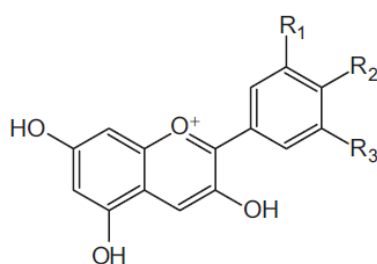


Figura 3: Estrutura do cátion flavílico (KAMMERER, 2016).

Tabela 1: Nomes e grupos substituintes das antocianidinas mais encontradas na natureza (KAMMERER, 2016).

Antocianidina	Substituição		
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Pelargonidina	H	OH	H
Cianidina	OH	OH	H
Delfinidina	OH	OH	OH
Peonidina	OCH <sub>3</sub>	OH	H
Petunidina	OCH <sub>3</sub>	OH	OH
Malvidina	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>

As antocianinas são responsáveis por garantir coloração azul, rosa, vermelha, roxa em flores, frutos, caules e raízes (KAMMERER, 2016), sendo que a diferença entre uma antocianina e outra está no número de hidroxilas, no grau de metilação desses grupos, além da natureza, da quantidade de açúcares ligados, e da posição de ligação desses açúcares (MAZZA e BROUILLARD, 1987).

### 1.3.1. Fatores que influenciam a estabilidade das antocianinas

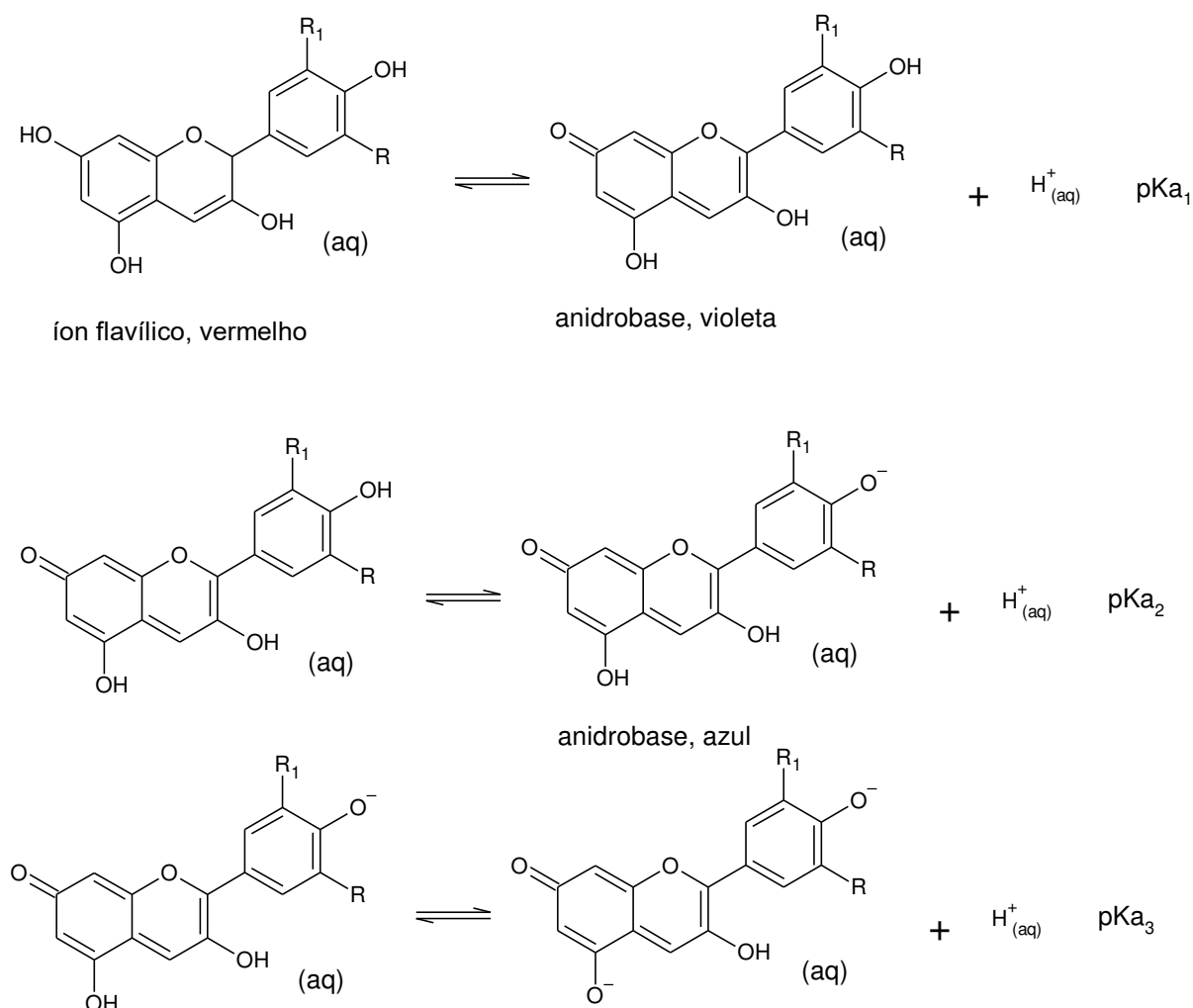
Vários fatores afetam a estabilidade das antocianinas quando em solução aquosa, principalmente quando esse grupo de pigmentos é submetido a variações de pH, à presença de oxigênio, de luz e quando submetidas a altas temperaturas (LOPES, XAVIER, *et al.*, 2007). Esses fatores fazem com que ocorra uma diminuição ou modificação da coloração desses pigmentos, podendo acarretar na formação de precipitados ao final do processo (LOPES, XAVIER, *et al.*, 2007).

Segundo LOPES *et al.* (2007), a estabilidade das antocianinas aumenta quando esses pigmentos se encontram em um meio ácido onde há a predominância do cátion flavílico em solução. Além disso, outros fatores que influenciam na estabilidade das antocianinas são: a co-

pigmentação, a presença de íons metálicos como ferro e alumínio e a concentração desses pigmentos em solução (KAMMERER, 2016).

### 1.3.2. Comportamento das antocianinas frente a variação de pH

As antocianinas apresentam alta solubilidade em água e quando em solução, apresentam diferentes estruturas em equilíbrio em função do pH do meio, podendo ser usadas como indicadores ácido-base (MEBANE e RYBOLT, 1985; TERCI e ROSSI, 2002). Para valores de pH menores que 2 predomina-se em solução o cátion flavílico de coloração avermelhada (KAMMERER, 2016; MARÇO e POPPI, 2008), já para valores de pH em torno de 6, predomina-se a pseudobase carbinol incolor (MARÇO e POPPI, 2008; TERCI e ROSSI, 2002), e para valores de pH acima de 6 podem haver em solução tanto as anidrobases de coloração violeta quanto as de coloração azul (TERCI e ROSSI, 2002). Para valores de pH acima de 9, ocorre a quebra do anel de pirano e a formação das chalconas de coloração amarela (MARÇO e POPPI, 2008; TERCI e ROSSI, 2002). As diferentes estruturas em função do pH podem ser visualizadas na Figura 4.



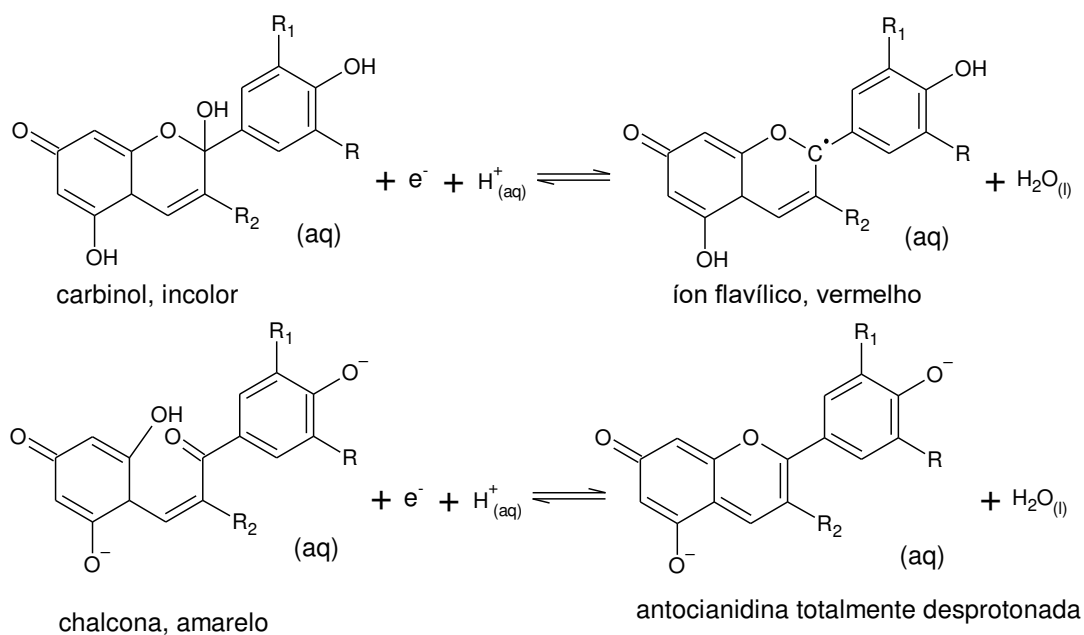


Figura 4: Possíveis estruturas das antocianinas em função do pH do meio. Equilíbrios ácido-base de Bronsted e Processos Redox (baseado em TERCI e ROSSI, 2002).

Como apresentado na Figura 4, o chamado íon flavínico, é na verdade um radical bastante estável (NAKAGAWA e MAEDA, 2017).

### 1.3.3. Influência da copigmentação e da ligação com íons metálicos sobre as antocianinas

A copigmentação é a interação das antocianinas com outros tipos de moléculas como aminoácidos, ácidos orgânicos, flavonoides e alcaloides (MAZZA e BROUILLARD, 1987). Essa interação produz um aumento da absorbância e deslocamentos batocrômicos do comprimento de onda máximo (MAZZA e BROUILLARD, 1987)

Devido a essas características, existem muitos estudos que comprovam que a copigmentação protege as antocianinas da degradação (LOPES, XAVIER, *et al.*, 2007), como foi relatado por STRINCHETA (1991), em que o aumento da concentração de ácido tânico causou diminuição da degradação das antocianinas. Esse mesmo fato foi relatado para antocianinas presentes no milho, em que a adição do copigmento C-glicosil flavona aumentou a intensidade da coloração dos extratos, causando deslocamentos batocrômicos de cerca de 10 à 13 nm (CHATHAM, HOWARD e JUVIK, 2020).

Além da copigmentação, as antocianinas com mais de um grupo hidroxila em sua estrutura, como a cianidina, petunidina e delphinidina, podem formar complexos com íons

metálicos, como o ferro (II), ferro (III), alumínio, cobre e magnésio (KAMMERER, 2016). A formação desses complexos estabiliza as antocianinas, acarretando deslocamentos batocrômicos do espectro de absorção (KAMMERER, 2016).

Esses complexos entre as antocianinas e os íons metálicos podem ser evidenciados a partir da coloração presente em diversos tipos de plantas como a cor azul desenvolvida pelas sépalas de hortênsia, como relatado na literatura, é provocada pela formação do complexo entre a delfinidina e o íon alumínio (YOSHIDA, MORI e KONDO, 2009).

#### **1.3.4. Comportamento das antocianinas frente a presença de luz, oxigênio e ao calor**

A luz pode afetar as antocianinas de maneiras diferentes, sendo de extrema importância para a produção e acúmulo desse tipo de pigmento nos tecidos da planta, além de causar degradação de extratos que contém esses pigmentos (KAMMERER, 2016). Este último fato foi comprovado em diversos estudos, como por exemplo, quando as antocianinas presentes no capim limão foram submetidas à luz, observando degradação (STRINGHETA, 1991). ASKAR *et al.* (2015) comparou extratos de antocianina de *Rosella* colocadas tanto no escuro quanto na luz em diferentes valores de pH, e observou que os extratos que foram submetidos à luz sofreram maior degradação. Além disso, nesse mesmo estudo, comparou-se os extratos submetidos à luz, e observou-se que para aqueles de maior valor de pH, houve uma maior degradação em relação aos extratos de menor valor de pH. DIRBY *et al.* (2001) comprovou que a quantidade de antocianina do repolho roxo degrada na presença de luz, chegando nas mesmas conclusões de ASKAR *et al.* (2015) sobre o efeito do pH.

Além da luz, um outro fator que afeta a estabilidade das antocianinas é a presença de oxigênio no meio, mesmo na ausência de luz e para qualquer valor de pH (LOPES, XAVIER, *et al.*, 2007). DARAVINGAS e CAIN (1968) comprovaram que as antocianinas presentes no suco de framboesa sofriam degradação por causa da presença de oxigênio, enquanto que na presença de nitrogênio tinham maior estabilidade.

A temperatura também é um dos fatores que provocam degradação desse tipo de pigmento (LOPES, XAVIER, *et al.*, 2007; KAMMERER, 2016). STRINGHETA (1991) comprovou que as antocianinas sofriam degradação quando submetidas a temperaturas superiores a 25 °C. Esse fato também foi comprovado nos estudos de BUCKOW *et al.* (2010), em que as antocianinas presentes no suco de mirtilo foram submetidas à altas temperaturas, sendo que quanto maior o valor da temperatura, menor era o tempo de meia vida das antocianinas, caindo de 180 minutos em 80 °C para 10 minutos em 115 °C.

### 1.3.5. Estabilidade das antocianinas frente a presença de ácido ascórbico e sulfito

O efeito do ácido ascórbico sobre a estabilidade das antocianinas apresenta um comportamento contraditório, pois em alguns casos ocorre a degradação desses pigmentos e em outros casos, o ácido ascórbico é utilizado para proteger as antocianinas, ou seja, utilizado como um estabilizante (KAMMERER, 2016).

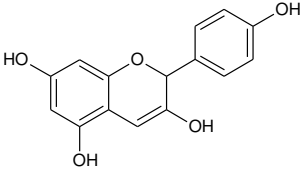
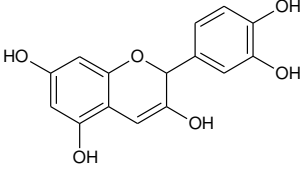
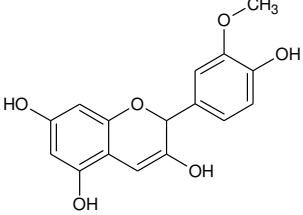
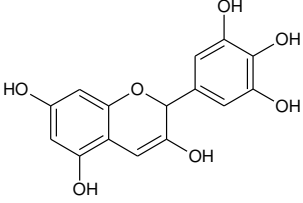
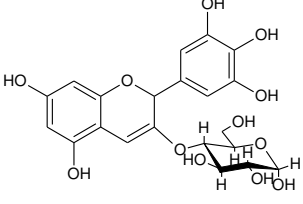
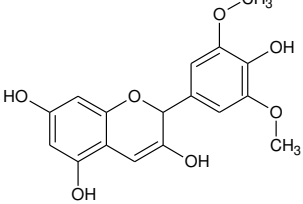
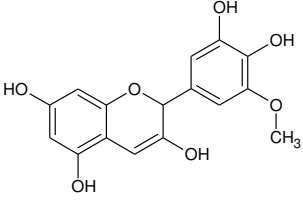
Esse mesmo efeito contraditório foi observado por SADILOVA *et al.* (2009), em que a oxidação do ácido ascórbico causou descoloração da cor das antocianinas e para alguns casos, o ácido ascórbico teve efeito de proteção contra a degradação das antocianinas, graças a associação dele com íons metálicos, impedindo sua oxidação.

As antocianinas também sofrem forte degradação quando colocadas na presença de sulfito (KAMMERER, 2016). O efeito de descoloramento desses pigmentos é causado por uma reação de adição nucleofílica do sulfito sobre o carbono 4 do anel benzênico da antocianina, resultando em produtos derivados do ácido sulfônico incolor (KAMMERER, 2016). Graças a essa reação, existem estudos que tem comprovado que as antocianinas substituídas no carbono quatro do anel benzênico, como as visitinas, apresentam uma maior resistência a ação do sulfito e a perda de cor (DELGADO-VARGAS, JIMÉNEZ e PAREDES-LÓPEZ, 2000).

## 1.4. Técnicas utilizadas para determinação e quantificação de antocianinas

A espectrofotometria UV-VIS é uma das técnicas mais utilizadas para a determinação de antocianinas, pois são substâncias que absorvem fortemente na região do visível, apresentando comprimentos de onda de máxima absorbância ( $\lambda_{\max}$ ) em torno de 500-550 nm (HARBONE, 1958), como mostrado na Tabela 2.

Tabela 2: Nome das principais antocianinas e seus respectivos comprimentos de onda de máxima absorvância na região do visível na espectrofotometria de absorção molecular (FULEKI e FRANCIS, 1968).

Antocianina	Comprimento de onda de máxima absorvância ( $\lambda_{\max}$ )	Estrutura das antocianinas
Pelargonidina	504,5 nm	
Cianidina	510,5 nm	
Peonidina	511 nm	
Delfinidina	522,5 nm	
Delfinidina 3-glicosídeo	543 nm	
Malvidina	520 nm	
Petunidina	549 nm	

Essa técnica é uma ferramenta útil para a determinação de antocianinas, pois esse tipo de substância apresenta diferentes perfis espectrais dependendo do pH do meio, da ligação com íons metálicos e com outros tipos de ligantes (LOPES, XAVIER, *et al.*, 2007). Além disso, o número de grupos oxigenados como os grupos hidroxila e metoxila e suas posições na molécula, além dos tipos de açúcares ligados, também influenciam no perfil espectral desses compostos, causando deslocamentos do comprimento de onda de máxima absorção (MARÇO e POPPI, 2008). Isso pode ser observado na Tabela 2, em que a delphinidina pura apresenta um  $\lambda_{\text{max}}$  de 522,5 nm, e ao adicionar uma molécula de glicose em sua estrutura, ocorre um deslocamento batocrômico do comprimento de onda de máxima absorção para 543 nm.

A espectrofotometria UV-VIS pode ser uma técnica utilizada sozinha para análises quantitativas ou uma técnica auxiliar acoplada à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (MARÇO e POPPI, 2008). A HPLC é muito útil para a determinação e quantificação das antocianinas, pois é uma técnica rápida e capaz de determinar componentes fenólicos presentes nas plantas (HARBONE, 1958). Além da espectrometria UV-VIS, pode estar acoplada à HPLC, outras técnicas de detecção, como a espectrometria de massas (MS), que é capaz de confirmar a identidade dos picos do cromatograma através de seus espectros de massas, fornecendo a sua estrutura química. Além disso, a espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (NMR) também pode ser utilizada para auxiliar na elucidação estrutural desses compostos (MARÇO e POPPI, 2008).

Além dos métodos de detecção e quantificação utilizados para as antocianinas, a técnica escolhida para purificar e separar misturas complexas contendo essas substâncias é de extrema importância (MARÇO e POPPI, 2008). As técnicas de separação mais utilizadas são: a cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, a cromatografia contracorrente e a eletroforese capilar (ESCRIBANO-BAILÓN, SANTOS-BUELGA e RIVAS-GONZALO, 2004; MOLNÁR-PERL e ZS.FÜZFAI, 2005; SALAS, DUEÑAS, *et al.*, 2005), embora essa última não seja uma boa técnica do ponto de vista preparativo. Além dessas técnicas, a mais utilizada atualmente para purificar extratos brutos de antocianina é a extração em fase sólida, utilizando cartuchos C<sub>18</sub> e Sephadex® em soluções de metanol (MOLNÁR-PERL e ZS.FÜZFAI, 2005; COSTA, HORTON e MARGOLIS, 2000; ESCRIBANO-BAILÓN, SANTOS-BUELGA e RIVAS-GONZALO, 2004).

### 1.5. Métodos de extração de antocianinas

A extração das antocianinas pode ser feita empregando diferentes métodos de preparação de amostra, combinando diferentes solventes e fases extratoras (FERARSA, ZHANGB, *et al.*, 2018; CAPELLO, LEANDRO, *et al.*, 2019; YONG, WANG, *et al.*, 2019; TOYAMA-KATO, YOSHIDA, *et al.*, 2003; TODARO, CIMINO, *et al.*, 2009). Dentre os solventes mais utilizados na literatura, tem-se o etanol, metanol, água, que geralmente são colocados em meio ácido, como por exemplo o ácido clorídrico, para a extração do cátion flavílico de coloração avermelhada (STRACK e WRAY, 1989).

Na Tabela 3 são mostrados alguns trabalhos reportados na literatura que descrevem como foi realizada a extração das antocianinas.

Tabela 3: Modos de extração das antocianinas em diferentes matrizes, utilizando diferentes tipos de solventes.

Matriz	Solvente	Modo de extração	Referências
Batata de polpa roxa	Etanol	As batatas foram pesadas e diferentes massas foram colocadas na presença de etanol em meio levemente ácido (ácido acético 7% (v/v)). Foram misturadas por 15 min e deixadas em repouso por 24 horas, e posteriormente filtradas com filtro a vácuo e centrifugadas para posterior análise.	(HEINONEN, FARAHMANDAZAD, <i>et al.</i> , 2016)
Sépalas de hortênsia	Metanol	As sépalas frescas foram colocadas na presença de uma solução 1% metanol-ácido clorídrico. Posteriormente, foram precipitadas com solução de etanol e purificadas utilizando a extração em fase sólida com coluna de Sephadex e uma solução de 50%(v/v) de etanol como eluente.	(TAKEDA, KUBOTA e YAGIOKA, 1985)
Casca de uva	Metanol	Cerca de dois gramas de tecido de pele de uva foram colocados na presença de 10 mL de metanol contendo 0,1% (v/v) de ácido clorídrico e deixados no escuro a 4 °C por 24 horas. Após centrifugar por cerca de 10 min, foi adicionada solução tampão em pH 1 e 4,5 sobre 1 mL de sobrenadante.	(YU, ZHU, <i>et al.</i> , 2020)
Casca de berinjela	Água deionizada	1 g de casca de berinjela foi colocada na presença de 60 mL de uma solução de água deionizada acidificada com ácido clorídrico 37% (v/v), sendo mantido sobre agitação por cerca de 80 min, na ausência de luz à 35 °C.	(CAPELLO, LEANDRO, <i>et al.</i> , 2019)

### 1.6. Localização das antocianinas nas plantas

As antocianinas estão localizadas em uma região da célula vegetal conhecida como vacúolo (KAMMERER, 2016). Essa organela, presente no citoplasma (Figura 5), apresenta um formato ovulado e é constituída basicamente por uma membrana que envolve e protege um líquido chamado suco celular. Esse tipo de organela pode apresentar as seguintes funções: armazenamento, controle do pH, controle osmótico e digestão de certas substâncias (RAVEN, EVERT e EICHHORN, 2007).

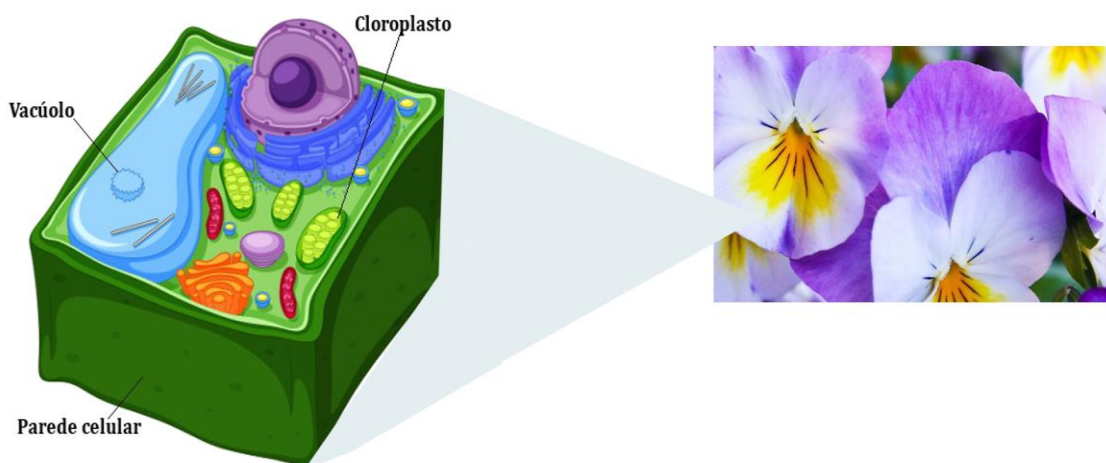


Figura 5: Representação de uma célula vegetal. *Adaptado* SANTOS (2020).

Os vacúolos de armazenamento nas células vegetais jovens são pequenos e numerosos, sendo que ao longo do tempo, quando a célula vegetal cresce, eles se tornam maiores e se fundem em um único vacúolo, podendo ocupar cerca de 80% da célula (SHITAN e YAZAKI, 2019).

O suco celular, contido dentro do vacúolo, é constituído basicamente por sais, açúcares, proteínas e pigmentos como as antocianinas, que garantem coloração a flores e frutos. Esse líquido apresenta um caráter ácido, acarretando muitas vezes, no acúmulo dos pigmentos na forma do cátion flavílico de coloração vermelha (RAVEN, EVERT e EICHHORN, 2007).

### 1.7. Hortênsias

A hortênsia (*Hydrangea macrophylla*) é uma planta de origem asiática, de clima ameno, que floresce entre setembro e janeiro, sendo que suas flores são modificações foliares do tipo bráctea, ou seja, falsas pétalas, mais conhecidas como sépalas (Figura 6) (RAVEN, EVERT e EICHHORN, 2007; DURÁN-ESPINOSA, 1999). Plantas dessa espécie apresentam um comportamento particular e bastante interessante devido às diferentes colorações adquiridas por suas sépalas que podem variar do roxo ao vermelho, rosa ou azul (ALLEN, 1943 *Apud*

(SCHREIBER, JONES, *et al.*, 2011; YOSHIDA, MORI e KONDO, 2009; YOSHIDA, TOYAMA-KATO, *et al.*, 2003)) e que são causadas pela mesma antocianina, a delfinidina-3-glicosídeo (LAWRENCE, PRICE, *et al.*, 1938), na qual está representada na Figura 7.



Figura 6: Localização das pétalas verdadeiras e das sépalas da hortênsia. *Adaptado* NICHOLS (2020).

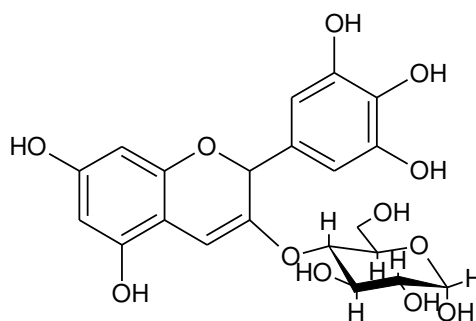


Figura 7: Estrutura da delfinidina-3-glicosídeo.

Essas diferentes colorações adquiridas pelas sépalas de hortênsia estão diretamente ligadas com as características do solo em que ela está plantada (ALLEN, 1943 *Apud* (SCHREIBER, JONES, *et al.*, 2011; YOSHIDA, MORI e KONDO, 2009; YOSHIDA, TOYAMA-KATO, *et al.*, 2003)), sendo que em solos básicos predominam-se as hortênsias de coloração rosa ou vermelha e em solos ácidos predomina-se as hortênsias de coloração azul (CHENERY, 1937 *Apud* (YOSHIDA, MORI e KONDO, 2009; YOSHIDA, TOYAMA-KATO, *et al.*, 2003; TAKEDA, KARIUDA e ITOI, 1985; KONDO, TOYAMA-KATOB e YOSHIDAB, 2005)).

Existem diversos estudos que afirmam que essa coloração é função do pH do solo. Considera-se que, devido à predominância de íons alumínio livres em solos muito ácidos (ALLEN, 1943 *Apud* (SCHREIBER, JONES, *et al.*, 2011; YOSHIDA, MORI e KONDO, 2009; YOSHIDA, TOYAMA-KATO, *et al.*, 2003; KONDO, TOYAMA-KATOB e YOSHIDAB, 2005)), eles sejam absorvidos pela planta e se complexe com a delphinidina presente no vacúolo (MA, RYAN e DELHAIZE, 2001). Já em solos básicos, o alumínio se encontra na forma de hidroxocomplexos ou precipitado, não estando disponível para ser absorvido pela planta e ocorrendo o acúmulo de delphinidina na forma de cátion flavílico de coloração vermelha (ALLEN, 1943 *Apud* (SCHREIBER, JONES, *et al.*, 2011; YOSHIDA, MORI e KONDO, 2009; YOSHIDA, TOYAMA-KATO, *et al.*, 2003)) (Figura 8).

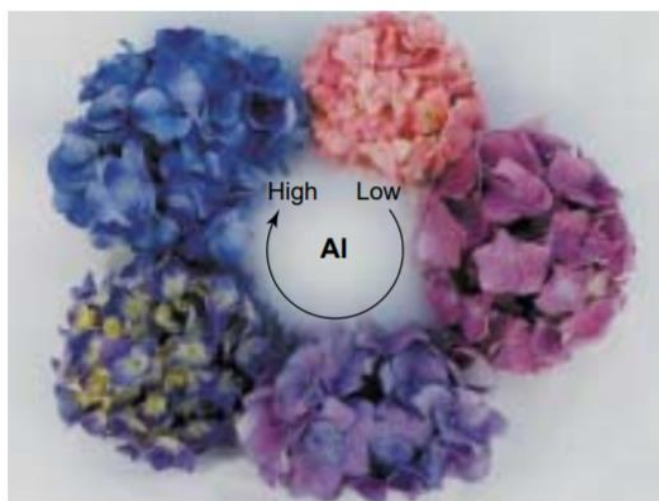


Figura 8: Relação entre a concentração de alumínio no vacúolo com as respectivas colorações das sépalas de hortênsia (MA, RYAN e DELHAIZE, 2001).

Esse fato pode ser evidenciado pelas equações de formação dos hidroxocomplexos e pela própria curva de distribuição de espécies do sistema alumínio, Figura 9.

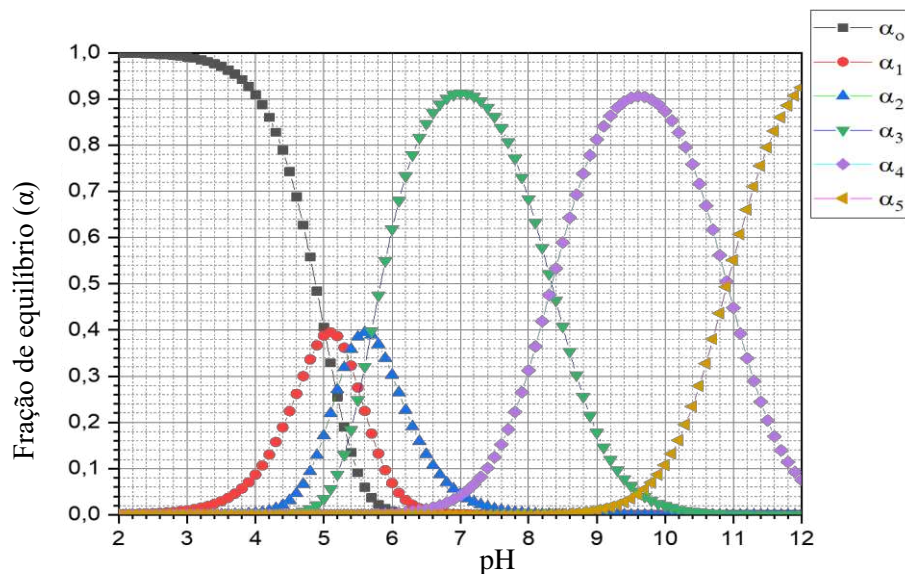
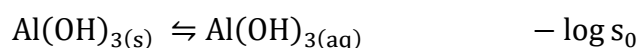
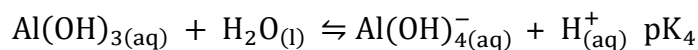
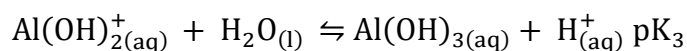
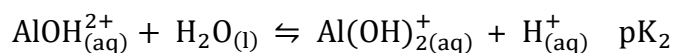
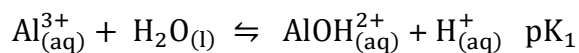


Figura 9: Curva de distribuição de espécies do sistema alumínio para formação dos hidroxocomplexos.



Como pode ser observado pela curva de distribuição de espécies, para valores de pH menores que 4 ocorre a predominância do  $\alpha_0$  em solução, que corresponde ao íon alumínio livre ( $\text{Al}^{3+}$ ). Desse modo, em valores de pH menor que 4 o alumínio está disponível para ser absorvido e complexado com a delphinidina, acarretando então, sépalas de coloração azuis. Já para valores de pH maiores que 4, há maior tendência a formação de hidroxocomplexos com o alumínio, o que não favorece a sua absorção pela planta, resultando em sépalas de coloração vermelha.

Nos estudos de SCHREIBER *et al.* (2011), foram medidas as quantidades de alumínio presentes em sépalas de hortênsia de coloração rosa, roxa e azul para verificar se o alumínio influencia realmente na formação da coloração azul. Os autores constataram que em sépalas rosas a concentração de alumínio é menor do que nas sépalas roxas, que é menor do que nas

sépalas azuis, confirmando a influência desse metal nas diferentes cores apresentadas pelas sépalas.

Além do alumínio, outros fatores podem influenciar na formação da coloração azul, como outros metais, outros ligantes e fatores como o clima ou a própria variedade do vegetal (YOSHIDA, MORI e KONDO, 2009; KONDO, TOYAMA-KATOB e YOSHIDAB, 2005; TAKEDA, KUBOTA e YAGIOKA, 1985). Um outro aspecto interessante, é que os extratos obtidos a partir das sépalas de hortênsia apresentam cores bem diferentes dos originais, na própria planta (YOSHIDA, MORI e KONDO, 2009; TAKEDA, KUBOTA e YAGIOKA, 1985; TAKEDA, KARIUDA e ITOI, 1985). Em vários trabalhos têm tentado, sem grande sucesso, reproduzir as cores originais em soluções aquosas ou em outros solventes, em diferentes condições químicas (TOYAMA-KATO, YOSHIDA, *et al.*, 2003; TAKEDA, YAMASHITA, *et al.*, 1990; TAKEDA, KUBOTA e YAGIOKA, 1985; TAKEDA, KARIUDA e ITOI, 1985).

TAKEDA *et al.* (1985) e TAKEDA *et al.* (1990), tentaram reproduzir em solução aquosa a coloração azul, e comprovaram que somente o pH ácido e a presença de alumínio complexado com a delphinidina não são fatores capazes de fornecer essa cor. Além disso testaram a presença de copigmentos, como os derivados do ácido cumárico e do ácido caféico, com o alumínio e a delphinidina em meio ácido, obtendo a coloração azul para alguns dos copigmentos utilizados. Os copigmentos utilizados para esse estudo estão representados na Figura 10.

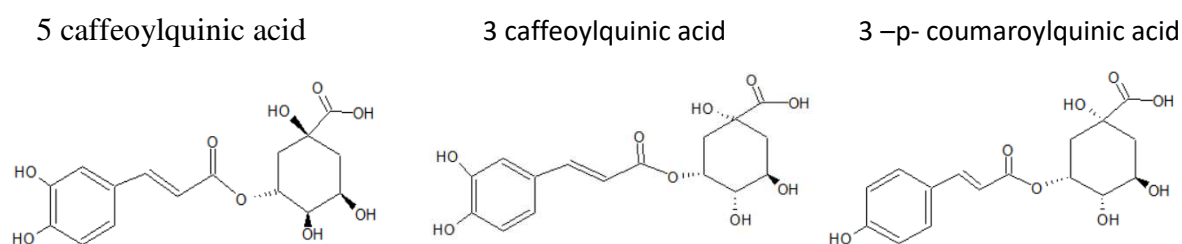


Figura 10: Estrutura dos copigmentos utilizados (TAKEDA, KUBOTA e YAGIOKA, 1985).

Já KONDO *et al.* (2005) sintetizaram vários copigmentos e colocaram na presença de alumínio e delphinidina com o objetivo de encontrar a melhor estrutura e os grupos funcionais necessários para o desenvolvimento da coloração azul. Comparando cada um deles, foi possível encontrar a estrutura essencial do copigmento, sendo que os principais copigmentos que garantiram a coloração azul estão representados na Figura 11. Como observado na Figura 11, o

grupo funcional detectado como importante foi o anel benzênico localizado na posição 5 do anel. Além disso, analisando a estrutura dos copigmentos dos estudos anteriores, foi possível constatar que o copigmento ácido 3 -cafeoilquinico se assemelha muito com o copigmento 2 dos estudos de KONDO *et al.* (2005).

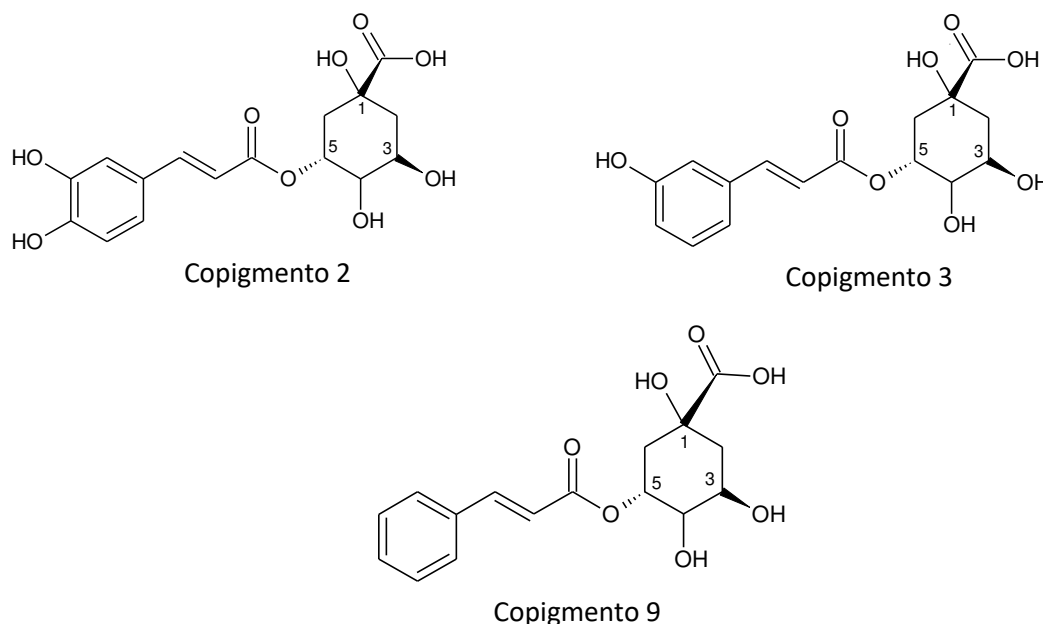
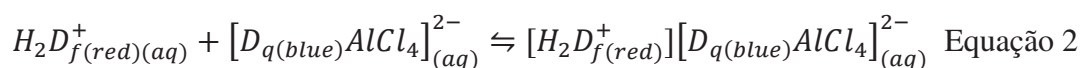
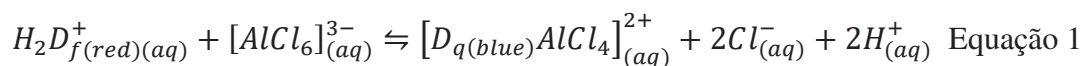


Figura 11: Estrutura dos copigmentos que formaram a coloração azul quando na presença de alumínio e do extrato de antocianina (KONDO *et al.* 2005).

Nos estudos de SCHREIBER *et al.* (2010) foi proposto um modelo de complexação entre o alumínio e a delfinidina para explicar a formação da coloração azul das sépalas de hortênsia (Equações 1 e 2). Segundo os autores, a coloração azul é causada pela transformação da delfinidina, cátion flavílico, em sua base quinoidal de coloração azul. Na primeira etapa do modelo, a delfinidina em solução de etanol, se liga ao alumínio se transformando no ânion base quinoidal. Posteriormente, o ânion se liga a outra molécula de delfinidina, para a formação de um complexo de coloração azul. O alumínio seria, então, utilizado somente para converter a delfinidina em ânion base quinoidal e para estabilizar essa espécie formada. Contudo, essa proposta da formação do cloro-complexo de alumínio pode ser equivocada, devido aos baixos valores das constantes e baixa concentração de cloreto no meio. Além disso, não há formação de um par-iônico. (SCHREIBER, SWINK e GODSEY, 2010).



### 1.8. Berinjela

Assim como nas hortênsias, a casca da berinjela também é fonte de antocianina, principalmente de derivados da delphinidina (NIÑO-MEDINA, URÍAS-ORONA, *et al.*, 2017). SAKAMURA *et al.* (1963) relatou em seus estudos a estrutura da maior antocianina encontrada na casca da berinjela conhecida como nasunina, que corresponde a delphinidina ligada a moléculas de glicose e a derivados do ácido cumárico. Além disso, estudos revelaram que a nasunina se encontra na forma de estereoisômeros cis e trans, sendo a estrutura trans (Figura 12) a forma mais estável da molécula (ICHYANAGI, KASHIWADA, *et al.*, 2005).

Além da nasunina, existem outras antocianinas presentes na casca de berinjela dependendo do tipo e da espécie analisada (SAKAMURA, WATANABE e OBATA, 1963).por WU & PRIOR (2005) nas berinjelas dos mercados dos Estados Unidos. SADILOVA *et al.* (2006) também identificou três tipos de antocianinas derivadas da delphinidina, sendo uma delas, a delphinidina 3-glicosídeo.

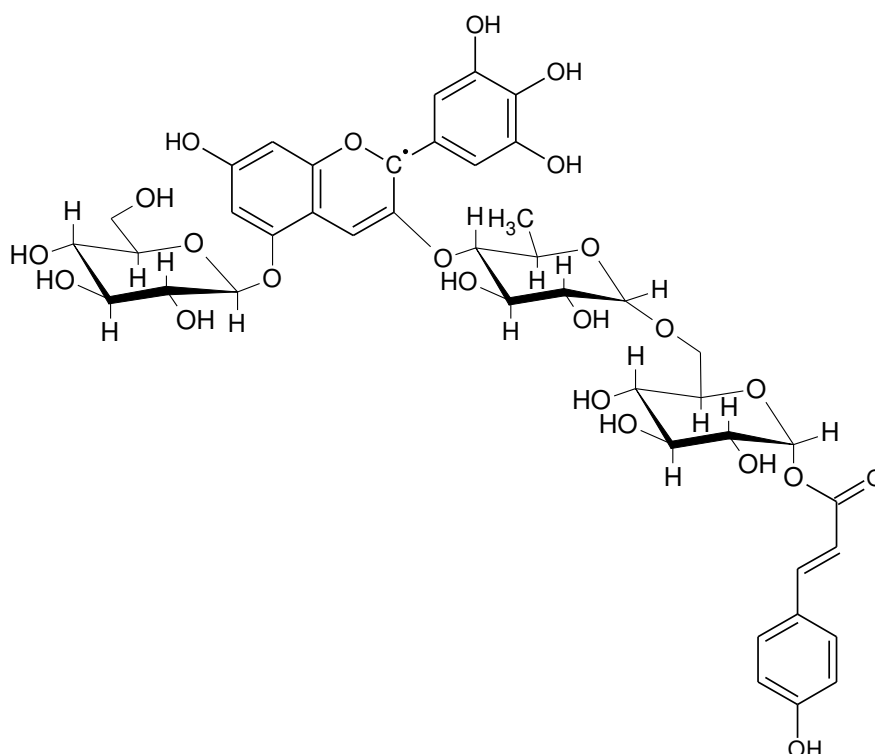


Figura 12: Estrutura da nasunina (baseado em NIÑO-MEDINA, URÍAS-ORONA, *et al.*, 2017).

## JUSTIFICATIVA DO TRABALHO

As antocianinas são um grupo de pigmentos, pertencentes a classe dos flavonóides, que garantem colorações que vão do roxo à rosa, azul ao vermelho em flores, frutos, caules e raízes de diferentes tipos de plantas. Na hortênsia, a antocianina delphinidina está vinculada à cor das sépalas, podendo variar, aparentemente, de acordo com a presença ou não de alumínio. Por isso a diferença nas colorações observadas é vinculada às características do solo em que é plantada, como o pH, que permite a presença maior ou menor do cátion metálico.

Nesse trabalho procurou-se compreender o comportamento da antocianina presente nas sépalas de hortênsia em diferentes condições de pH, em relação aos equilíbrios e à cinética de degradação, assim como ao comportamento espectrofotométrico do extrato de hortênsia na presença de metais, com o intuito de explicar a coloração azul, assim como avaliar a possibilidade do uso do extrato na determinação de metais tóxicos. Além do pH e concentração de metais, a presença de agentes redutores para aumentar a estabilidade da antocianina também é importante. Para compreender a cor das sépalas, o uso da espectrofotometria de reflectância difusa foi escolhida para compensar efeitos de coloração *in natura*.

Devido à baixa disponibilidade de hortênsia em decorrência do tempo de floração curto e ao próprio clima da região, procurou-se outras matrizes que pudessem fornecer esse mesmo tipo de antocianina para a continuação do trabalho, encontrando na casca da berinjela uma fonte de delphinidina. Ao iniciar os estudos com a casca da berinjela, verificou-se comportamentos diferentes quando submetidas as mesmas condições experimentais para o extrato de hortênsia. Sendo assim, o objetivo do trabalho foi verificar o comportamento das antocianinas presentes no extrato de berinjela e o de hortênsia em diferentes condições experimentais e compará-los.

## OBJETIVOS

### Objetivo geral

- Avaliar a influência do ambiente químico sobre o comportamento químico e espectroquímico do extrato de pseudo-flores de Hortênsia (*Hydrangea macrophylla*), e do extrato de casca de berinjela (*Solanum melongena*)

### Objetivos específicos

- Avaliar o comportamento dos extratos de hortênsia e de berinjela em diferentes valores de pH, íons metálicos e agentes redutores por espectrofotometria molecular;

- Otimizar as condições de extração das antocianinas nestas matrizes, visando sua estabilidade química;

- Estudar o equilíbrio químico e a cinética de complexação das antocianinas por íons metálicos tais como alumínio, ferro (II) e ferro (III);

- Estudar a estabilidade dos extratos das amostras contendo antocianinas em ambientes com a presença de redutores químicos;

- Investigar o efeito da variação de pH, de alumínio e sulfito na presença de antocianinas com o auxílio do método de resolução de curvas MCR;

- Para as antocianinas estudadas, determinar o número, o perfil espectral, as concentrações relativas e identificar as espécies presentes.

# **CAPÍTULO 2**

---

## **MATERIAL E MÉTODOS**

## MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico (Vetec / Sigma-Aldrich), sem purificação adicional. A água utilizada foi do tipo 1, obtida pelo sistema Milli-Q® (Millipore, Bedford, MA, EUA). Os reagentes e solventes utilizados para a realização deste trabalho estão listados na Tabela 4.

Tabela 4: Reagentes utilizados neste trabalho, sua marca e pureza.

Reagente	Fórmula Molecular	Marca	Pureza (%)	CAS
Acetato de sódio	CH <sub>3</sub> COONa	Merck	99,0	127-09-3
Acetona	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O	CRQ	99,5	67-64-1
Acetonitrila	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> N	CRQ	99,9	75-05-8
Ácido ascórbico	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	Merck	99,7	50-81-7
Ácido clorídrico	HCl	Vetec	37,0	7647-01-0
Ácido nítrico	HNO <sub>3</sub>	Vetec	70,0	7697-37-2
Tetraborato de sódio decahidratado	Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ·8H <sub>2</sub> O	Vetec	99,5	1303-96-4
Carbonato de sódio anidro	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Vetec	99,5	497-19-8
Citrato de sódio anidro	Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	Isofar	99,0	68-04-2
Cloreto de alumínio	AlCl <sub>3</sub>	Merck	97,0	7446-70-0
Cloreto de cromo (III) Hexahidratado	CrCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	Vetec	99,0	10025-73-7
Cloreto de ferro (III) hexahidratado	FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	Vetec	99,0	10025-77-1
Etanol	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	LS Chemicals	98,0	
Fosfato de sódio dibásico anidro	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Vetec	99,0	10101-89-0
Hidróxido de sódio	NaOH	Vetec	99,0	9003-01-4
Metanol	CH <sub>3</sub> OH	Alphatec		57-56-1
Nitrato de cálcio tetrahidratado	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	Vetec	99,0	13477-34-4
Nitrato de chumbo (II)	Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Dinâminca	99,0	10099-74-8
Peróxido de hidrogênio	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Vetec	30,0 à 60,0	772284-1

Sulfato de cobre (II) anidro	$\text{CuSO}_4$	Vetec	97,0	7758-99-8
Sulfato de hidrazina	$(\text{NH}_2)_2 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4$	Vetec	99,0	10034-93-2
Sulfato de níquel (II) hexahidratado	$\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Vetec	98,0	13478-00-7
Sulfato de zinco heptahidratado	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Dinâmica	99,0	7446-20-0
Sulfato ferroso amoniacal hexahidratado	$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2 (\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Synth	99,5	778385-9
Sulfito de sódio anidro	$\text{Na}_2\text{SO}_3$	Synth	99,0	7757-83-7

## 2.2. Equipamentos

Os equipamentos utilizados para a realização das análises e obtenção dos resultados encontram-se descritos na Tabela 5.

Tabela 5: Instrumentação utilizada ao longo do trabalho.

<b>Equipamento</b>	<b>Marca</b>	<b>Modelo</b>
Balança Analítica	Acculab	ALC-210.4
pHmetro	Mettler Toledo	FiveEasy Plus
Espectrofotômetro de Absorção Molecular UV/vis	Thermo Scientific	Evaluation Array
Banho Ultrassom	Quimis	Q335D
Espectrofotômetro de Infravermelho (FT-IR)	Varian	660-IR
Espectrômetro de absorção atômica	Agilent	240FS
Liofilizador	Terroni Equipamentos	LS3000
Espectrômetro de reflectância difusa	GBC	Sintra 20

### 2.3. Obtenção das amostras

As amostras de berinjela e de hortênsia foram obtidas nos mercados localizados no município de Viçosa, sendo armazenados em geladeira até o momento de sua utilização.

### 2.4. Extração das antocianinas da casca de berinjela e hortênsia

Para a extração das antocianinas presentes na casca de berinjela foi realizado o seguinte procedimento: as cascas de berinjela foram removidas com o auxílio de um descascador manual e cortadas em pequenos pedaços de cerca de 5 mm de largura. Após isso, foram preparadas 100,0 mL de soluções aquosas de metanol, etanol, acetonitrila e acetona 50% (v/v), sendo o pH ajustado para valores próximos de 1,64 com o auxílio de uma solução 0,1 mol L<sup>-1</sup> de ácido clorídrico. Foi utilizado também como solvente para esse estudo, água deionizada ajustando previamente para próximo do valor de pH estudado de 1,64. Em béqueres, foram adicionados 10,0 ± 0,1 g de casca de berinjela e foram acrescentados 100,0 mL da solução dos solventes estudados. Em seguida, os béqueres foram colocados em banho ultrassom por cerca de 4 h para a realização da extração. A fim de comparação, realizou-se a extração da casca de berinjela em água deionizada com valor de pH previamente ajustado para 1,64, em chapa aquecedora em uma temperatura de cerca de 80 °C pelo mesmo período de tempo. Após o fim da extração, filtrou-se cada uma das soluções utilizando um filtro a vácuo e transferiram-se as soluções para balões volumétricos de 100,0 mL, completando o volume com água deionizada. O processo de extração foi realizado de acordo com alguns procedimentos descritos na literatura (FERARSA et al., 2018; SAKAMURA et al., 1963; CAPELLO et al., 2019; YONG et al., 2019).

A extração das antocianinas presentes na hortênsia foi realizada utilizando as sépalas *in natura*, misturando sépalas tanto de coloração rosa, quanto de coloração azul, a fim de homogeneizar a amostra, obtendo-se assim, um extrato de coloração vermelha. Para essa extração, foi preparada 100,0 mL de uma solução aquosa de acetonitrila 50% (v/v), sendo o pH ajustado para valores próximos de 1,64 com o auxílio de uma solução 0,1 mol L<sup>-1</sup> de ácido clorídrico, sendo utilizado também, água deionizada nesse mesmo valor de pH. O procedimento realizado para a extração foi similar ao da berinjela, utilizando a mesma massa de amostra, o mesmo volume de solvente e o mesmo tempo de extração, e banho ultrassom para extração usando os solventes água deionizada e acetonitrila. A fim de comparação dos diferentes modos de extração, foi realizado um experimento em paralelo utilizando água deionizada no mesmo valor de pH, em chapa aquecedora a uma temperatura de 80 °C.

Os extratos obtidos com água deionizada e as soluções aquosas dos solventes, acetonitrila, etanol, metanol e acetona foram avaliados por espectroscopia de absorção molecular para verificar a eficiência relativa de cada extração.

## 2.5. Liofilização do extrato de berinjela

Pesou-se cerca de  $100,0 \pm 0,1$  g de casca de berinjela e preparou-se uma solução de 500 mL de água sendo o pH da solução ajustada para valores próximos a 1,64, usando uma solução de ácido clorídrico  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ . Após permanecer por 4 h em banho ultrassom, a solução foi filtrada para retirar as cascas, sendo o filtrado transferido para um balão de 500,0 mL e seu volume completado. Posteriormente, o extrato obtido, foi armazenado em freezer em uma temperatura de cerca de  $-4 \text{ }^\circ\text{C}$  por 24 horas e, posteriormente, submetido ao processo de liofilização.

Para obtenção do extrato liofilizado, foram necessários três ciclos do processo de liofilização com duração de 24 h cada ciclo, sendo estes realizados em dias alternados, ou seja, um ciclo de 24 h e posterior descanso da amostra em freezer a  $-4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Uma massa do extrato liofilizado foi então pesada.

## 2.6. Titulação Potenciométrica

Para a realização da titulação potenciométrica, inicialmente, preparou-se o extrato de berinjela, adicionando-se 3,0 mL de extrato, em um balão volumétrico de 10,0 mL, sendo o seu volume completado com água deionizada. Após isso, seu conteúdo foi transferido para um béquer e juntamente com um eletrodo combinado de pH conectado a um pHmetro Mettler Toledo, avaliou-se o comportamento do extrato frente à variação de pH com o auxílio de soluções de hidróxido de sódio. As alíquotas de solução de hidróxido de sódio  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  foram adicionadas até pH 3,5, e partir desse valor de pH, adicionou-se alíquotas da solução de hidróxido de sódio  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$  com o auxílio de uma micropipeta de volume variável 100-1000  $\mu\text{L}$ .

## 2.7. Espectroscopia no Infravermelho para o extrato de berinjela

Foram obtidos espectros de FT-IR tanto do extrato líquido quanto da amostra liofilizada em um equipamento VARIAN 660-IR com acessório de reflectância total atenuada PIKE GladiATR na região de 200 a  $4000 \text{ cm}^{-1}$ .

## 2.8. Quantificação dos teores de ferro e alumínio presentes na matriz de berinjela

Para a determinação de ferro e alumínio nos extratos liofilizados da casca de berinjela, adicionou-se em um béquer, 200,0 mg da amostra liofilizada, 2,0 mL de ácido nítrico concentrado e 2,0 mL de uma solução de peróxido de hidrogênio 30% (v/v). A digestão foi realizada em chapa aquecedora por cerca de 30 minutos em uma temperatura próxima a 40 °C. Após esse tempo, esperou a amostra esfriar em temperatura ambiente e transferiu quantitativamente seu conteúdo para um balão de 25,0 mL, completando-se o volume com água deionizada. Os extratos obtidos foram armazenados em geladeira e analisados por espectrometria de absorção atômica.

Esse procedimento experimental pode ser evidenciado no diagrama esquemático representado na Figura 13.

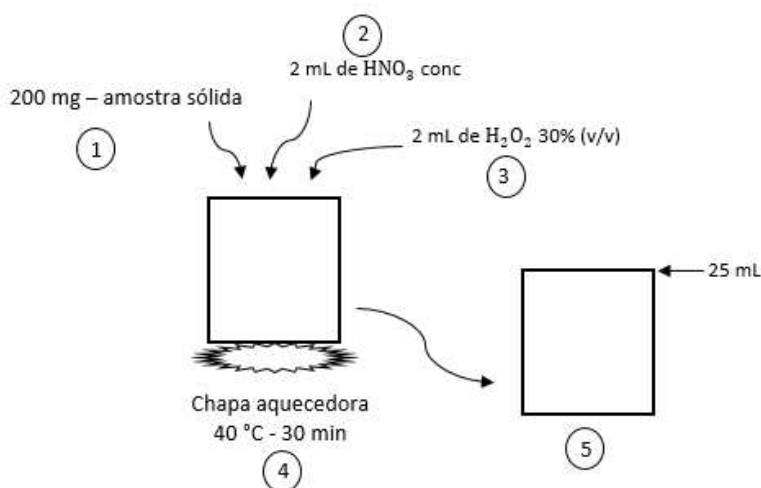


Figura 13: Diagrama Esquemático do processo de digestão da amostra liofilizada da casca de berinjela para quantificação dos teores de ferro e alumínio.

## 2.9. Estudo do comportamento das antocianinas em função do pH do meio

Espectros do extrato de berinjela em função do pH do meio e do tempo foram obtidos na região do UV-Visível usando uma cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico. Já os espectros do extrato de hortênsia em função do pH foram obtidos na região do ultravioleta.

As soluções tampão utilizadas para o estudo do extrato de berinjela em função do pH são mostradas na Tabela 6.

Tabela 6: Soluções tampão utilizadas no estudo do comportamento das antocianinas em função do pH do meio.

Tampão	Concentração	Faixa de pH
Fosfato	0,20 mol L <sup>-1</sup>	2,00
Acetato	0,18 mol L <sup>-1</sup>	3,50 - 5,50
Citrato	0,20 mol L <sup>-1</sup>	6,50
Carbonato	0,20 mol L <sup>-1</sup>	9,50 - 11,00

Para o estudo do extrato de hortênsia em função do pH foram utilizadas soluções de hidróxido de sódio 0,5 mol L<sup>-1</sup> e 0,2 mol L<sup>-1</sup>.

### 2.10. Formação do complexo alumínio-antocianina

Foram adicionados sobre 20,0 mmol L<sup>-1</sup> de alumínio, volumes crescentes do extrato de hortênsia, variando de 0,75 mL à 7,50 mL, transferindo para um balão de 10,0 mL e completando seu volume com água deionizada. O espectro na região do UV-visível foi obtido para cada solução usando uma cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico.

### 2.11. Estudo da complexação das antocianinas com metais

Foram adicionadas em 3,0 mL de extrato de hortênsia, diferentes volumes dos metais (20,0 mmol L<sup>-1</sup>): cálcio, cádmio, cobre (II), cromo (III), chumbo, níquel, zinco, ferro (II) e ferro (III), transferindo para um balão de 10,0 mL e completando seu volume com água deionizada. Espectros foram obtidos na região do UV-Visível para cada solução estudada.

### 2.12. Estudo do comportamento dos extratos frente a presença de agentes redutores

Foram adicionadas em 3,0 mL de extrato de berinjela diferentes volumes dos agentes redutores sulfito, hidrazina e ácido ascórbico sendo o volume de cada solução completado para 25,0 mL com água deionizada. As soluções foram analisadas por espectrofotometria na região do UV-Visível. Com o extrato de hortênsia, foi realizado o mesmo procedimento descrito para o extrato de berinjela com o agente redutor sulfito, sendo que as soluções foram analisadas por espectrofotometria na região do ultravioleta.

### 2.13. Reflectância difusa

Foram obtidos espectros de reflectância difusa na faixa de 380 nm à 780 nm, tanto para as sépalas de hortênsias rosas quanto azuis em um espectrofotômetro de duplo feixe da marca GBC, modelo CINTRA 20.

Para ambos os estudos, pegou-se sépalas de hortênsia de partes diferentes do buquê a fim de buscar uma média dos valores espectrais encontrados, sendo obtidos 5 espectros para cada coloração. Por fim, esses valores de reflectância difusa foram convertidos em absorbância a partir da função Kubelka-Munk, como mostrado na Equação 3 ( (KUBELKA, 1948).

$$F = \frac{(1 - R)^2}{2R} \quad \text{Equação 3}$$

Onde F é o valor de absorbância e R é o valor de reflectância.

### 2.14. Tratamento dos dados

Todos os dados foram tratados em planilhas eletrônicas Microsoft Excel (2003-2010) e software OriginPro 8.0 (LabOrigin) e Matlab (2016a).

O mecanismo cinético nos diferentes estudos foi avaliado pela aplicação dos modelos de pseudo primeira ordem, em sua forma não linear, com o auxílio do OriginPro 8.0 (LabOrigin).

O ajuste do modelo cinético de primeira ordem foi avaliado utilizando o modelo de regressão não-linear disponível no software Origin 2019 (função ExpDec) (Equação 4).

$$\hat{A} = A_o e^{-kt} + B \quad \text{Equação 4}$$

Onde  $k$  é a constante cinética;  $B$ , um termo de ajuste de offset e  $A_o$ , a estimativa da absorbância inicial no comprimento de onda estudado.

A sobreposição dos espectros foi resolvida utilizando um método de deconvolução MCR-ALS com e pré-tratamento (derivação e integração numéricas) para descrever o comportamento cinético.

As informações sobre as espécies foram adquiridas a partir decomposição do valor singular (SVD) para as matrizes de dados individuais e aumentadas (utilizando o pacote MCR-ALS/Matlab). Foram realizadas estimativas de 2 a 4 componentes nos espectros usando os métodos PURE, análise de fatores evolutivos (EFA) e decomposição dos valores singulares (SVD) (JAUMOT, JUAN e TAULER, 2015).

# **CAPÍTULO 3**

---

## **HORTÊNSIAS**

## 1 Introdução

Inicialmente, a fim de verificar e explicar o comportamento das antocianinas em hortênsias provenientes de solos ácidos e solos básicos, buscou-se estudar o comportamento dessas antocianinas em solução, em diferentes condições experimentais, além de caracterizar os extratos obtidos. Para isso, estudou-se a melhor forma e tipo de extração, o comportamento dos extratos na presença de diferentes cátions metálicos, redutores e em diferentes valores de pH do meio, além de avaliar seu comportamento cinético. Como técnicas de caracterização, foram realizados a reflectância difusa das sépalas *in natura* e espectroscopia no UV-visível. Além disso, para identificar e correlacionar as espécies de antocianinas presentes nos extratos, foi utilizada a Resolução de Curvas Multivariadas com Mínimos Quadrados Alternantes (MCR/ALS). Os resultados obtidos nesses estudos foram utilizados posteriormente no estudo das antocianinas extraídas da casca de berinjela.

## 2 Resultados e Discussão

### 2.1. Comportamento espectral do extrato de antocianina extraído de hortênsia

O comportamento espectral das antocianinas presentes na hortênsia pode ser evidenciado na Figura 14.

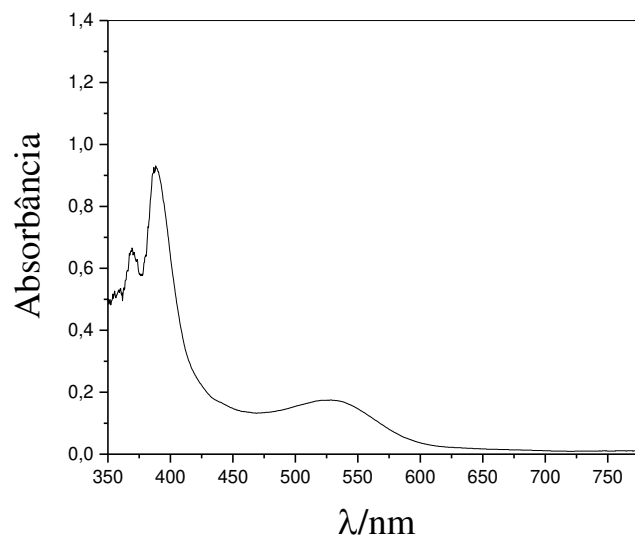


Figura 14: Espectro das antocianinas presentes no extrato aquoso de hortênsias em pH ~1,64. Volume de extrato utilizado: 3,0 mL.

O espectro do extrato de hortênsia apresenta máxima absorvância próximo a 400 nm e em 524 nm na região do visível. Esse máximo observado em 524 nm é comparável com aqueles reportados nos estudos de TAKEDA *et al.* (1985) em que o comprimento de onda máximo para o extrato de hortênsia foi em 528 nm e por FULEKI & FRANCIS (1968) em que o comprimento de onda máximo foi em 522,5 nm.

## 2.2. Caracterização das sépalas de hortênsia usando reflectância difusa

Os espectros reflectância difusa das sépalas *in natura* de hortênsia são apresentados na Figura 15.

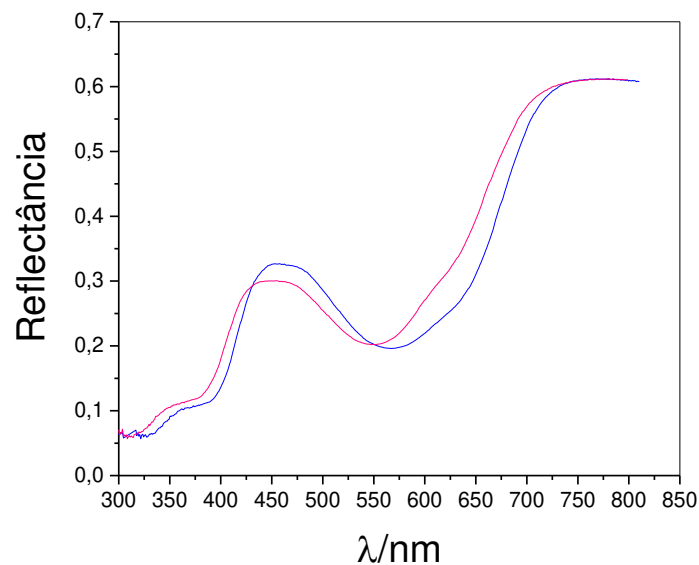


Figura 15: Espectros de reflectância difusa de diferentes sépalas de hortênsia *in natura*. (—) sépalas rosas; (—) sépalas azuis.

O espectro de reflectância difusa das sépalas de hortênsia confirmam que em torno de 550 nm ocorre um menor valor de reflectância, indicando que nesse comprimento de onda houve uma maior absorção da radiação. Com isso, ao utilizar a função Kubelka-Munk, pode-se converter reflectância em absorvância, Equação 1 (item 2.13 de material e métodos).

A partir da Equação 1, foi possível obter o espectro de absorção das sépalas rosa e azul *in natura*. Esses espectros foram obtidos a partir das médias das absorvâncias encontradas pela função Kubelka-Munk para cada uma das colorações. O comportamento espectral das duas colorações é mostrado na Figura 16.

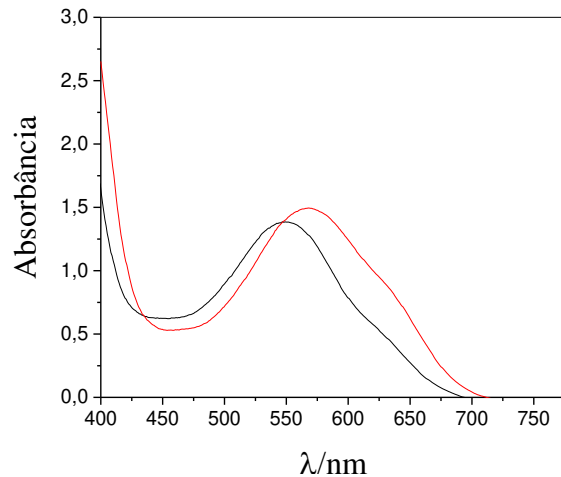


Figura 16: Espectro de absorção das sépalas de hortênsia obtidos dos dados de reflectância difusa a partir da função Kubelka-Munk. (—) sépalas rosas; (—) sépalas azuis.

O espectro de absorção das sépalas rosas apresentou comportamento muito similar ao espectro das sépalas azuis, havendo um pequeno deslocamento batocrômico de 25 nm em todo o espectro. Dessa maneira, o comprimento de onda com absorbâncias máximas para as sépalas rosas foi em 550 nm, já para as sépalas azuis foi em 575 nm.

Uma vez que a sensação de cor está associada com o comportamento de todo espectro e da seletividade de cores na retina (nos bastonetes e cones), foi possível simular o comportamento e assim comprovar a relação entre os espectros obtidos e as sensações de cor observadas. Em todo caso, o deslocamento da absorbância para maiores comprimentos de onda tende a aumentar a sensação da cor azul, pois os comprimentos de onda, associados a essa sensação, estão sendo menos absorvidos pelas sépalas.

Ao comparar os espectros das sépalas *in natura* com o espectro do extrato líquido de hortênsia, de coloração vermelha, foi observado um deslocamento de cerca de 25 nm no sentido hipsocrômico, afastando-se assim, da sensação de cor azul. O comprimento de onda máximo foi cerca de 525 nm (Figura 17). Este resultado sugere que a sensação da cor azul das sépalas pode também estar associado a filtros ópticos formados por paredes celulares existentes na sépala, mas ausentes no extrato. Ou seja, na sépala, as antocianinas estão dentro de células e as paredes celulares e outras organelas coloridas (devido à presença de clorofilas) podem agir como um filtro, diminuindo a transmissão de “tons vermelhos”, e assim, favorecendo a sensação da cor azul.

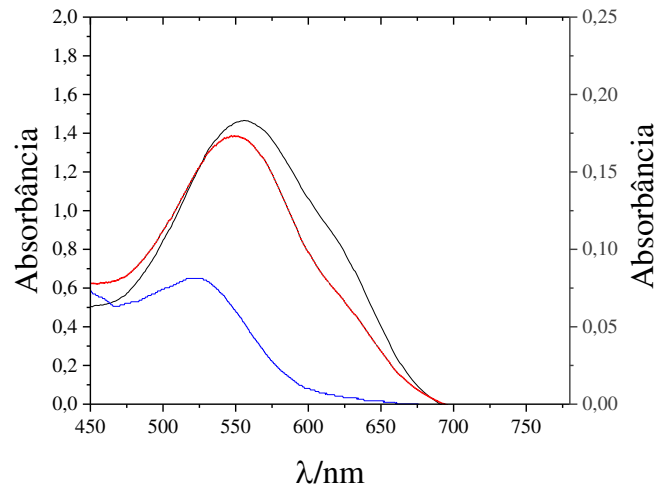


Figura 17: Espectros de absorção das sépalas de hortênsia in natura e do extrato líquido da hortênsia. (—) Extrato líquido; (—) sépalas rosas; (—) sépalas azuis.

### 2.3. Estudo da extração das antocianinas presentes na hortênsia

A Figura 18 apresenta o espectro do extrato de antocianina presentes nas sépalas de hortênsia extraídas em três condições diferentes. A primeira, usando solução de 50% (v/v) de acetonitrila em meio ácido submetida ao ultrassom; a segunda, a partir de uma solução aquosa ácida em ultrassom, e a terceira em uma solução aquosa ácida em chapa aquecedora.

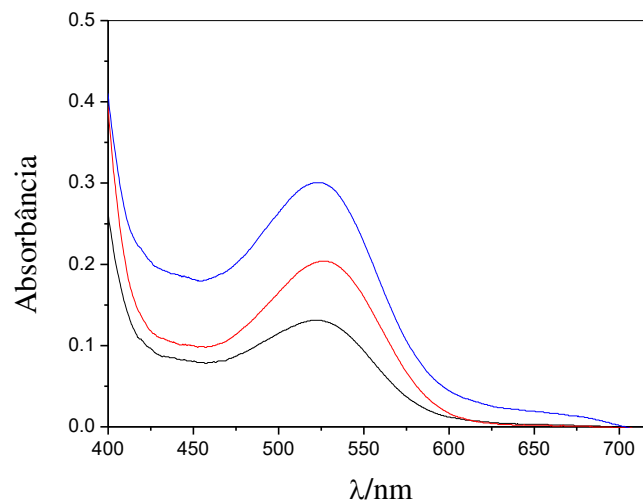


Figura 18: Estudo da extração de antocianinas presentes nas sépalas de hortênsia em pH ~1,64: (—) extração utilizando solução aquosa em banho de ultrassom; (—) solução aquosa em chapa de aquecimento; (—) extração utilizando solução aquosa de acetonitrila 50% (v/v) em banho ultrassom.

É possível observar que os extratos de antocianina obtidos dos solventes em estudo apresentaram comprimento de onda de máxima absorbância ( $A$ ) em 524 nm. A eficiência de extração relativa ( $\%E_R$ ) foi calculada a partir das absorbâncias das antocianinas no máximo de

absorção, usando o extrato obtido em solução aquosa ácida sob ação de banho ultrassom como referência ( $A_{\text{referência}}$ ) (Equação 5).

$$\%E_R = \frac{A}{A_{\text{referência}}} \cdot 100 \quad \text{Equação 5}$$

Onde  $A$  é a Absorbância máxima das antocianinas extraídas de cada solvente em estudo.

Sendo assim, obteve-se as seguintes porcentagens de eficiência relativa para os solventes em estudo conforme apresentado na Tabela 7.

Tabela 7: Solventes utilizados no estudo da extração da antocianina das sépalas de hortênsia com seus respectivos valores de absorbância, e os valores de porcentagem de eficiência relativa de extração.

Solvente	Absorbância	$\%E_R$
Água em banho ultrassom	0,384	100,0%
Água em aquecimento	0,212	55,2%
Acetonitrila	0,140	36,4%

A eficiência relativa da extração das antocianinas das sépalas de hortênsia usando apenas água em aquecimento ou acetonitrila em ultrassom é muito menor do que usando água em ultrassom. Esse resultado sugere a ruptura das células pelo ultrassom e menor afinidade das antocianinas pela acetonitrila do que pela água.

#### 2.4. Estudo da formação do complexo alumínio-antocianina

Para o estudo de formação do complexo alumínio-antocianina, foram adicionados em 3,0 mL de extrato, diferentes volumes de solução de alumínio, de maneira a haver concentrações analíticas de alumínio entre 2,0 mmol L<sup>-1</sup> a 60,0 mmol L<sup>-1</sup> (Figura 19).

O espectro do extrato de antocianina para a concentração mais baixa de alumínio (2,0 mmol L<sup>-1</sup>) apresentou comprimento de onda de máxima absorbância em torno de 524 nm. Com o aumento da concentração de alumínio no meio observa-se a diminuição da absorbância nesse comprimento de onda e o aumento da absorbância em 575 nm, devido ao aumento da concentração no equilíbrio de uma nova espécie em solução, que pode ser atribuído ao complexo alumínio-antocianina.

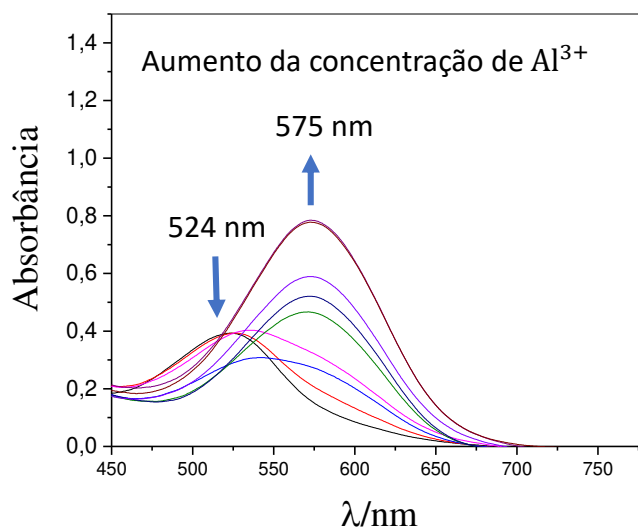


Figura 19: Espectro da formação do complexo alumínio-antocianina para diferentes concentrações de alumínio ( $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$  à  $60,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ). Comprimento de onda inicial de 524 nm. Volume de extrato: 3,0 mL.

O aumento da absorbância em 575 nm em função da concentração analítica de alumínio (Figura 20) mostra que acima de  $24,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de alumínio, a concentração do complexo se mantém constante. Isso significa que, se praticamente toda antocianina foi consumida para a formação do complexo e se sua estequiometria é de 1:3, então sua concentração no meio é igual àquela do alumínio, e assim, no extrato será igual a  $240,0 \text{ mmol L}^{-1}$ . O método aqui usado para determinar a estequiometria do complexo (ou a concentração do ligante) é chamado de método das variações contínuas, ou método de Job (JOB, 1928, *apud* (PAULA, ALMEIDA e CASSELLA, 2010; BOSQUE-SENDRA, ALMANSA-LÓPEZ e GARCÍA-CAMPAÑA, 2003)).

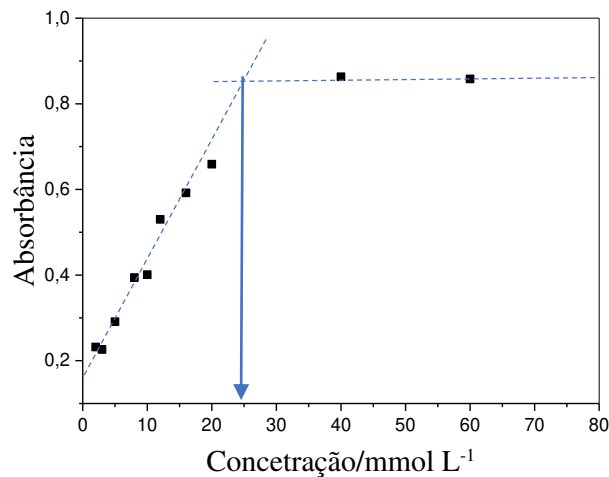


Figura 20: Variação da absorvância em função da concentração de alumínio obtida no comprimento de onda máximo em 575 nm para o estudo da formação do complexo alumínio-antocianina. pH da solução em 2,30; volume de extrato: 3,0 mL.

A partir do espectro obtido para a formação total do complexo alumínio-antocianina, foi possível notar uma semelhança com o espectro obtido para a sépala azul *in natura*, pois apresentaram comprimentos de onda máximo muito próximos, sendo que das sépalas *in natura* foi de 573 nm e do complexo alumínio-antocianina foi de 575 nm, como na Figura 21.

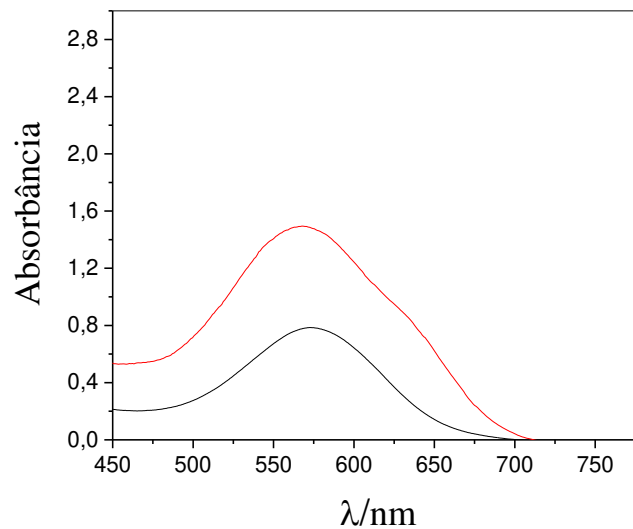


Figura 21: Comparação dos espectros da (—) sépala azul *in natura* e do (—) complexo alumínio-antocianina.

Como pode-se observar na Figura 22, os espectros do complexo alumínio-antocianina e aquele obtido para a sépala azul *in natura* apresentam comportamento similares, reforçando a hipótese da participação do complexo alumínio-antocianina na formação da coloração azul de sépalas de hortênsia.

Na Figura 22 é apresentado o resultado do estudo onde houve a adição de diferentes volumes de extrato de hortênsia em uma concentração de alumínio de  $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$  para um volume total de  $10,0 \text{ mL}$ , havendo, portanto, uma variação de  $6,0$  a  $48,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de antocianina.

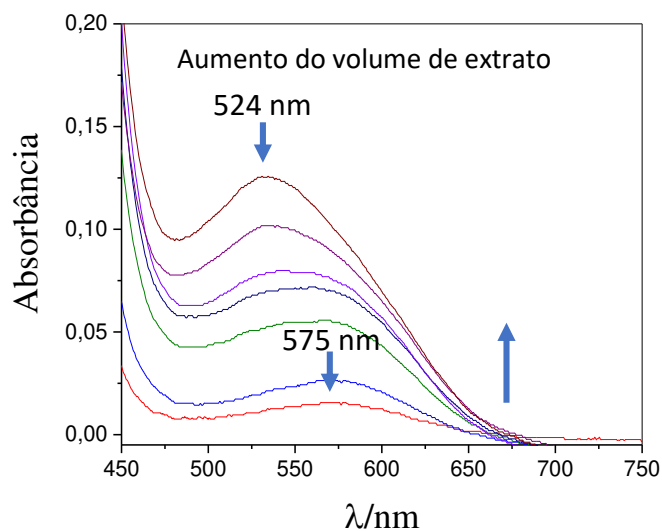


Figura 22: Espectros das soluções com diferentes volumes de extrato para formação do complexo alumínio-antocianina com concentração fixa de alumínio de  $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$ .

Neste caso, a alteração do espectro é menos acentuada, mas é possível observar o deslocamento hipsocrômico do máximo de absorvância para o máximo de absorção da antocianina livre (não complexada). A variação do máximo, portanto, não é devido a formação de diferentes espécies, mas sim da convolução dos espectros da antocianina livre e do espectro do complexo alumínio-antocianina. Novamente, a mudança no comportamento da absorvância ocorre na concentração igual à de alumínio (considerando a concentração de antocianina no extrato igual  $240,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ).

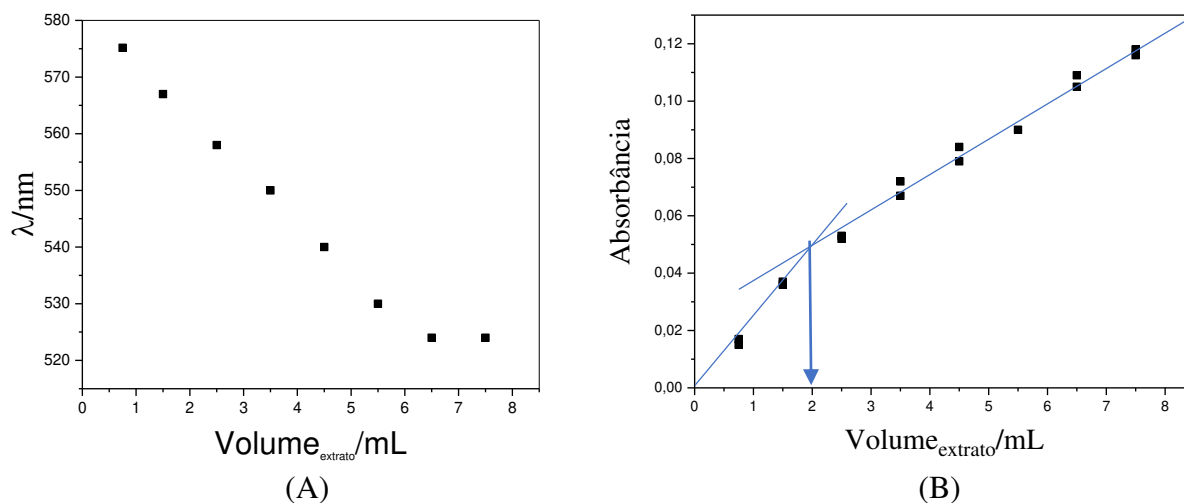
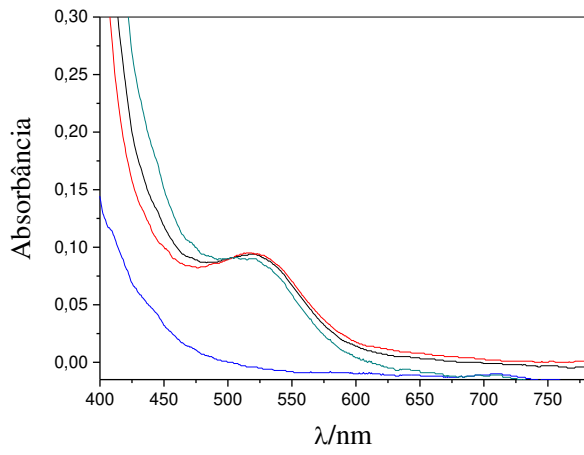


Figura 23: Influência do volume de extrato de hortênsia sobre solução de alumínio. (A) Deslocamento do comprimento de onda de máxima absorvância na região do Visível. (B) Variação da absorvância em 524 nm. Concentração de alumínio de  $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$ .

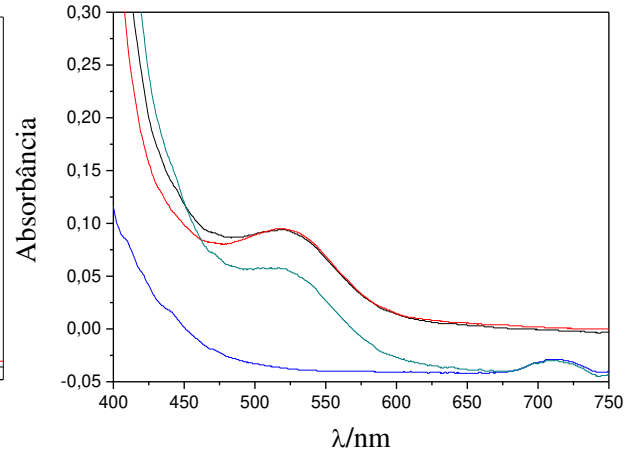
Além disso, foi observado que o complexo de antocianina- alumínio apresenta coloração verde e que para um volume maior que 2,5 mL de extrato (concentração analítica de antocianina igual a  $60,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ), há a total formação desse complexo e aumenta, portanto, a concentração de antocianina livre, Figura 23.

## 2.5. Estudo do comportamento do extrato de hortênsia em presença de outros metais

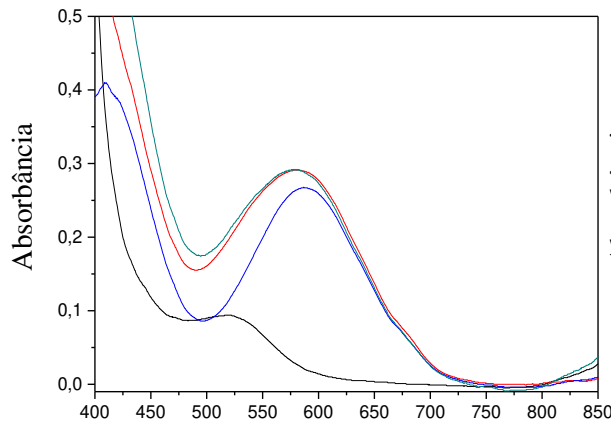
Para visualizar o comportamento espectrofotométrico do extrato de hortênsia na presença de outros metais, foram preparadas soluções formadas por  $24,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de antocianina e  $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$  dos seguintes metais: cálcio, cádmio, cobre, cromo, chumbo, níquel, zinco, ferro (II) e ferro (III), conforme mostrados na Figura 24. Para cada estudo foram obtidos os espectros da solução dos íons, do extrato de antocianina e da mistura da antocianina com cada um dos íons metálicos. Além disso, foi apresentado também o espectro convoluído formado pela soma dos espectros do íon e da solução de hortênsia.



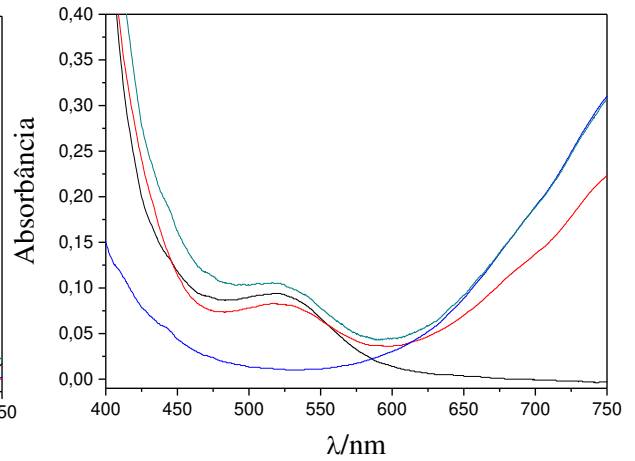
**(Cálcio)**



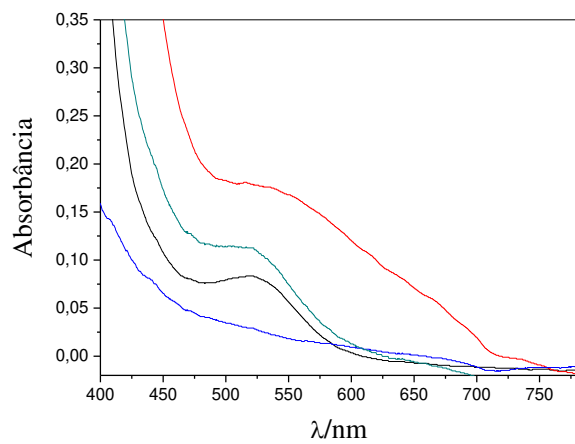
**(Cádmio)**



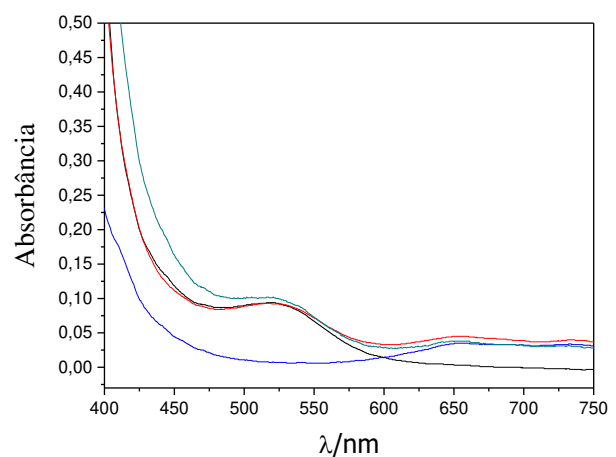
**(Cromo (III))**



**(Cobre (II))**



**(Ferro (II))**



**(Níquel)**

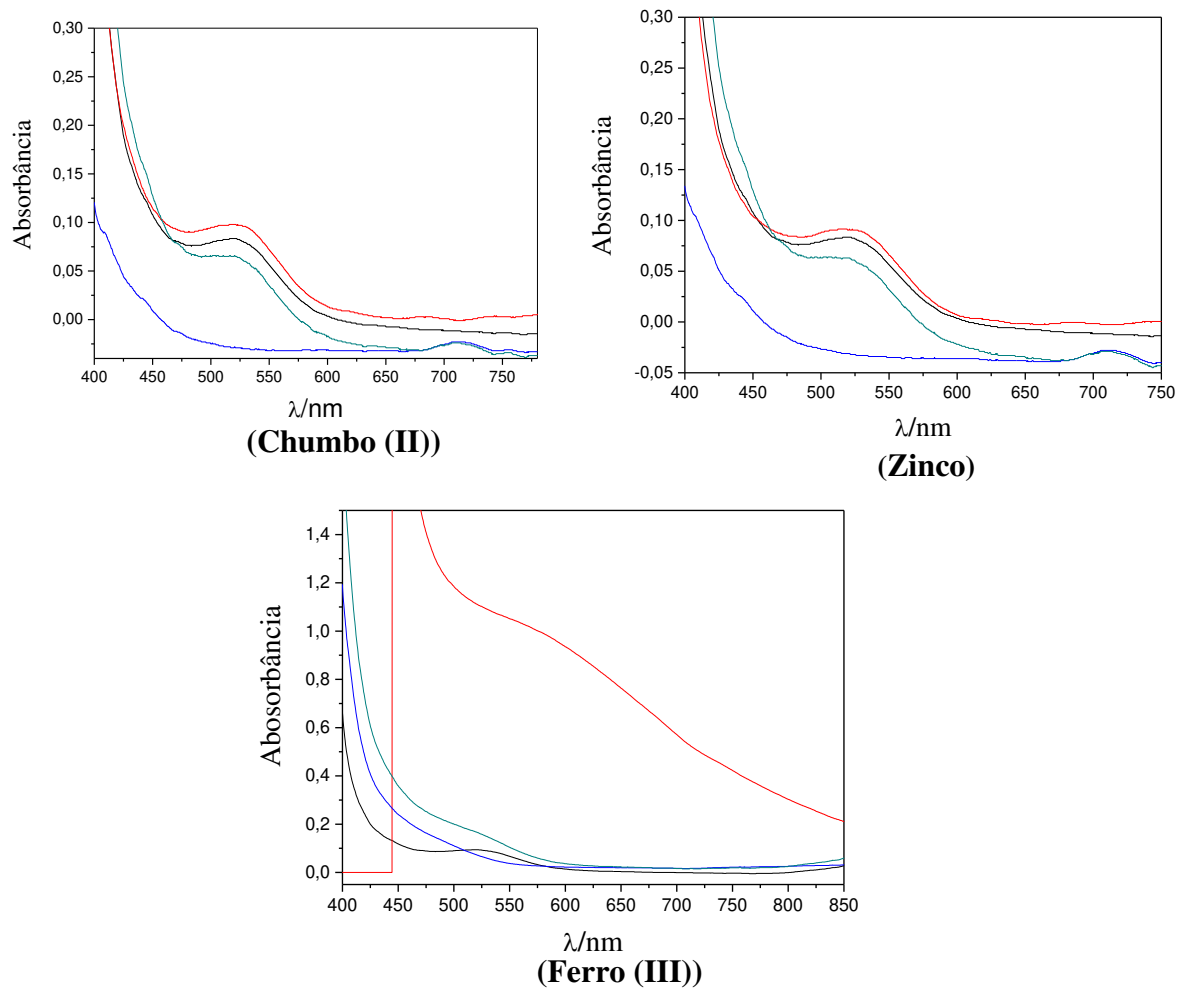


Figura 24: Espectros do extrato de hortênsia em presença de metais. (—) Antocianina pura; (—) Metal com antocianina; (—) metal puro; (—) metal puro + antocianina pura.

Como pode-se perceber nos espectros obtidos para cada metal, dentre os cátions estudados, aqueles que tiveram uma mudança no espectro em relação à soma dos espectros “puros” foram o ferro (II) e ferro (III). Este resultado indica que a coloração das sépalas da hortênsia não é influenciada por metais considerados tóxicos (por exemplo, chumbo, cádmio). Por outro lado, a presença de ferro (II) ou ferro (III) pode influenciar a cor das sépalas. Para esse estudo, os valores de pH dos extratos estudados sem ou na presença dos metais se mantiveram em valores próximos de 3,0.

## 2.6. Estudo das espécies de antocianinas em diferentes valores de pH

Para investigar as diferentes espécies de antocianinas presentes em solução em função do valor de pH, presença de alumínio e presença de sulfito, foram construídos os espectros ao longo de todo comprimento de onda da região do ultravioleta, Figura 25.

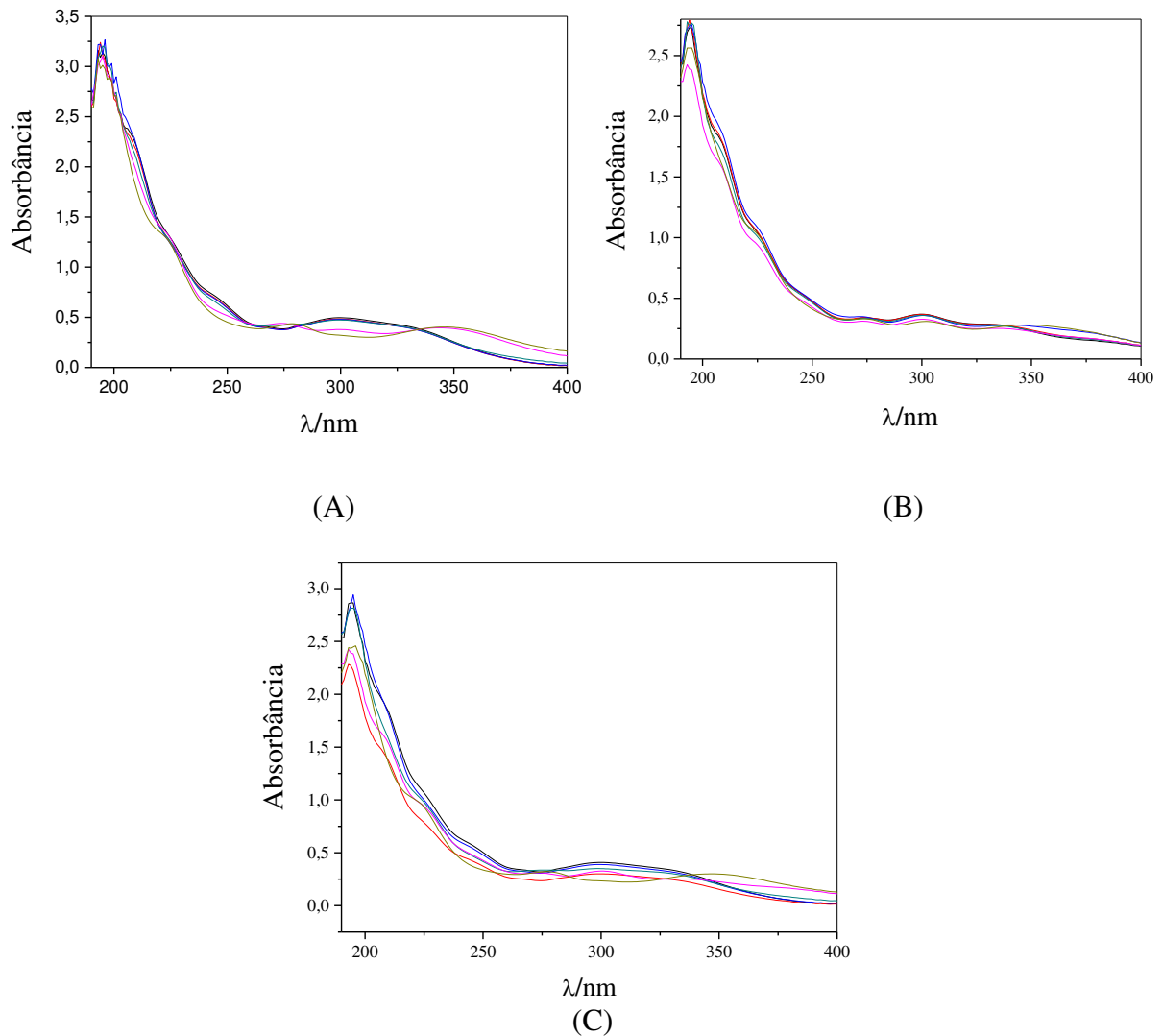


Figura 25: Espectro obtido para o extrato de hortênsia em diferentes condições. (A) Espectro do extrato para diferentes valores de pH, (B) Espectro do extrato para diferentes valores de pH e concentrações de alumínio e (C) Espectro do extrato para diferentes valores de pH e concentrações de sulfito. (—) pH 3,5; (—) pH 4,0; (—) pH 5,0; (—) pH 6,0; (—) pH 7,5 e (—) pH 9,5.

Os espectros apresentados na Figura 25 foram utilizados para identificar as espécies presentes em cada condição estudada utilizando a ferramenta MCR/ALS. Na Figura 26 são mostrados os resultados obtidos analisando as espécies presentes em diferentes valores de pH da solução.

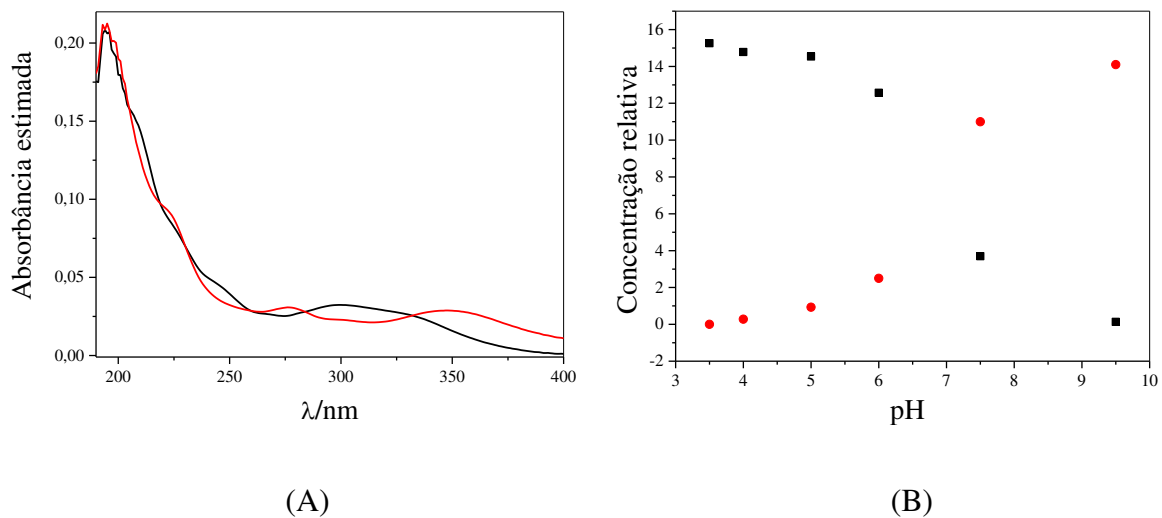


Figura 26: (A) Espectro da solução de antocianinas das espécies estimadas pelo MCR/ALS para diferentes valores de pH. (B) Concentração relativa estimada pelo MCR para as espécies de antocianina em função do pH da solução. (—) Espécie A. (—) Espécie B.

Para a matriz individual do pH (Figura 26), o algoritmo sugere a presença de duas componentes. Os perfis espectrais recuperados pelo MCR/ALS mostram um deslocamento de bandas de um máximo de absorvância de 300 nm para 350 nm. O gráfico de concentração relativa mostra uma espécie predominante em valores de pH abaixo de 7,0 e outra predominante em valores de pH acima de 7,0, compatível com um sistema ácido-base de Bronsted monoprotico, e assim, a concentração relativa é diretamente associada às frações de equilíbrio. Essas espécies podem ser atribuídas ao cátion flavílico predominante em valores de pH mais baixos ( $\text{pH} < 3$ ), sendo que devido ao aumento de pH das soluções ocorrem reações levando a formação de espécies incolores. Já em pH maiores ( $> 8,0$ ) tendem a formar as chalconas, que podem ser atribuídas a segunda espécie identificada pelo MCR/ALS.

Na Figura 27 são mostrados os resultados obtidos analisando as espécies presentes em diferentes valores de pH da solução na presença de sulfito.

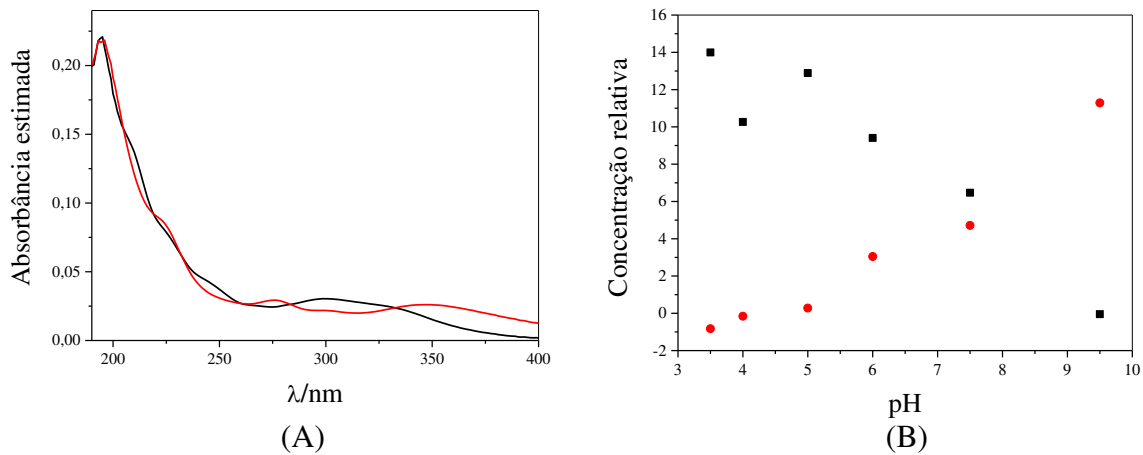


Figura 27: (A) Espectro da solução de antocianinas das espécies estimadas pelo MCR/ALS para diferentes valores de pH em presença de sulfito. (B) Concentração relativa estimada pelo MCR para as espécies de antocianina em função do pH da solução e presença de sulfito. (—) Espécie A. (—) Espécie B.

Para a matriz individual sulfito, Figura 27, o algoritmo sugere a presença de 2 componentes, uma espécie predominante em valores de pH abaixo de 8,0 e outra predominante em valores de pH acima de 8,0. Além disso, também foi observado pelos perfis espectrais recuperados pelo MCR/ALS um deslocamento de bandas de um máximo de absorvância de 300 nm para 350 nm, como observado para matriz pH, Figura 26.

Na Figura 28 são mostrados os resultados obtidos analisando as espécies presentes em diferentes valores de pH da solução na presença de alumínio.

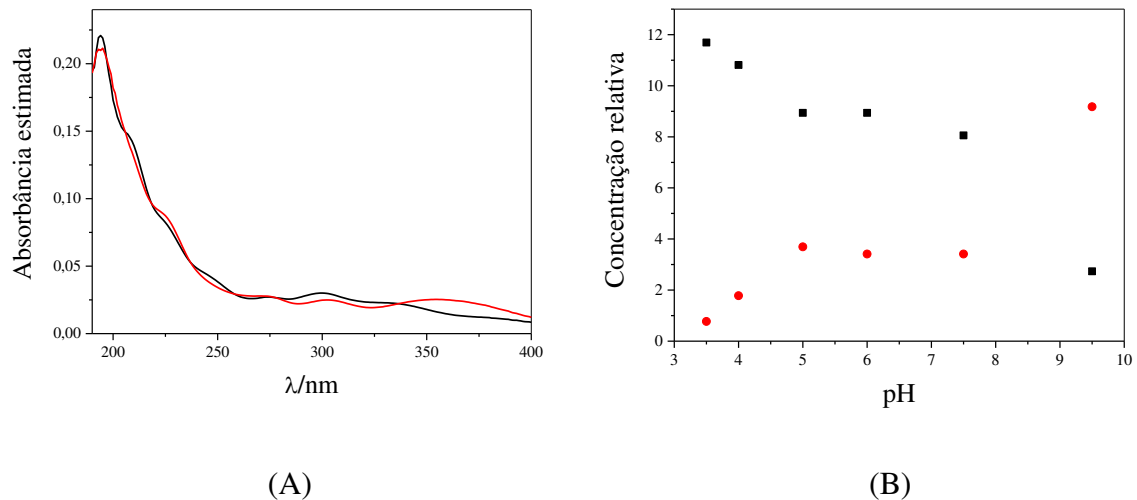


Figura 28: (A) Espectro da solução de antocianinas das espécies estimadas pelo MCR/ALS para diferentes valores de pH em presença de alumínio. (B) Concentração relativa estimada pelo MCR para as diferentes espécies de antocianina em função do pH da solução e presença de alumínio. (—) Espécie B. (—) Espécie C.

Para a matriz individual alumínio, Figura 28, o algoritmo sugere a presença de 2 componentes, uma espécie predominante em valores de pH abaixo de 8,5 e outra predominante em valores de pH acima de 8,5. Os perfis espectrais recuperados pelo MCR/ALS mostram um deslocamento de bandas de um máximo de absorvância de 300 nm para 365 nm. Essa diferença no máximo de 350 nm para 365 nm na presença de alumínio pode ser atribuída à presença de uma nova espécie, o complexo antocianina- alumínio.

### 2.7. Determinação qualitativa das espécies de antocianinas nos extratos de hortênsia para os dados individuais em diferentes valores de pH, para a matriz de dados aumentados, obtidos pelo MCR/ALS

As matrizes de dados aumentados, ou seja, matrizes organizadas umas sobre as outras, formando uma nova matriz, permitem análise simultânea da variedade entre as amostras com diferentes efeitos, de modo a resumir as informações dos dados referentes as variáveis estudadas e os perfis espectrais. Essa maneira de aumentar matrizes é muito útil para verificar as espécies identificadas na análise dos dados individuais (MARÇO, POPPI, *et al.*, 2011; MARÇO, VALDERRAMA, *et al.*, 2014; SOUZA, ZANIN, *et al.*, 2016).

Na Figura 29 são mostrados os resultados obtidos analisando as espécies presentes em diferentes valores de pH da solução em presença de sulfito para a matriz de dados aumentados.

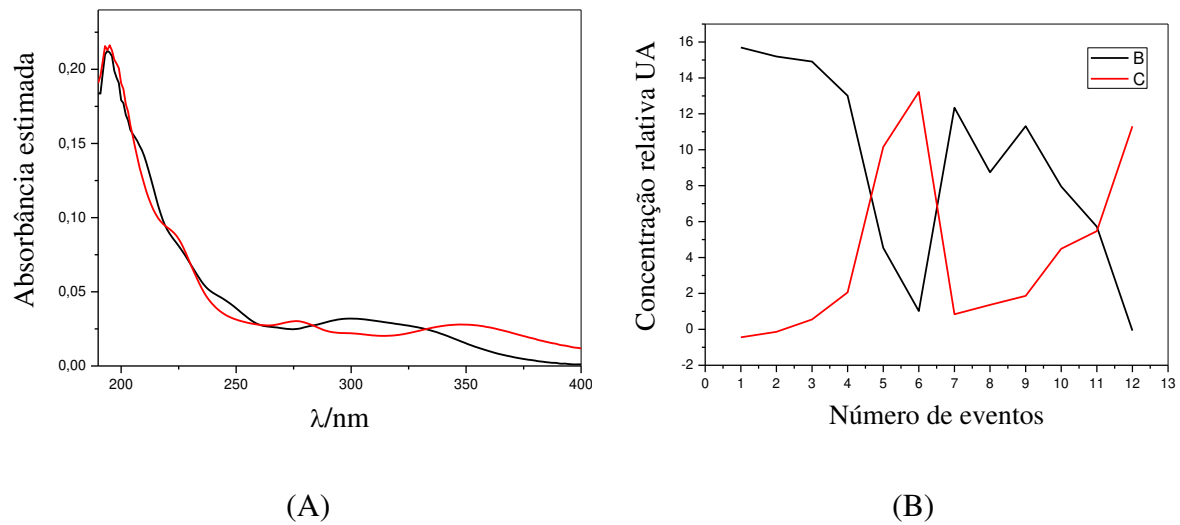


Figura 29: (A) Espectro da solução de antocianinas das espécies estimadas pelo MCR/ALS para diferentes valores de pH em presença de sulfito para a matriz de dados aumentados. (B) Concentração relativa estimada pelo MCR para as diferentes espécies de antocianina em função do pH da solução e presença de sulfito na matriz de dados aumentados. (—) Espécie A. (—) Espécie B.

Para a matriz de dados aumentados pH-sulfito, Figura 29, o algoritmo sugere a presença de 2 componentes. A espécie predominante em valores de pH abaixo de 6,0, (espécie A em preto), também predomina na presença de sulfito para essa mesma faixa de pH, surgindo uma nova espécie em solução em valores de pH acima de 6,0 (espécie B em vermelho). Vale ressaltar que a mesma espécie predominante em valores de pH mais altas (espécie B em vermelho), em presença de sulfito ela também predomina para a mesma faixa de pH.

Na Figura 30 são mostrados os resultados obtidos analisando as espécies presentes em diferentes valores de pH da solução em presença de alumínio para a matriz de dados aumentados.

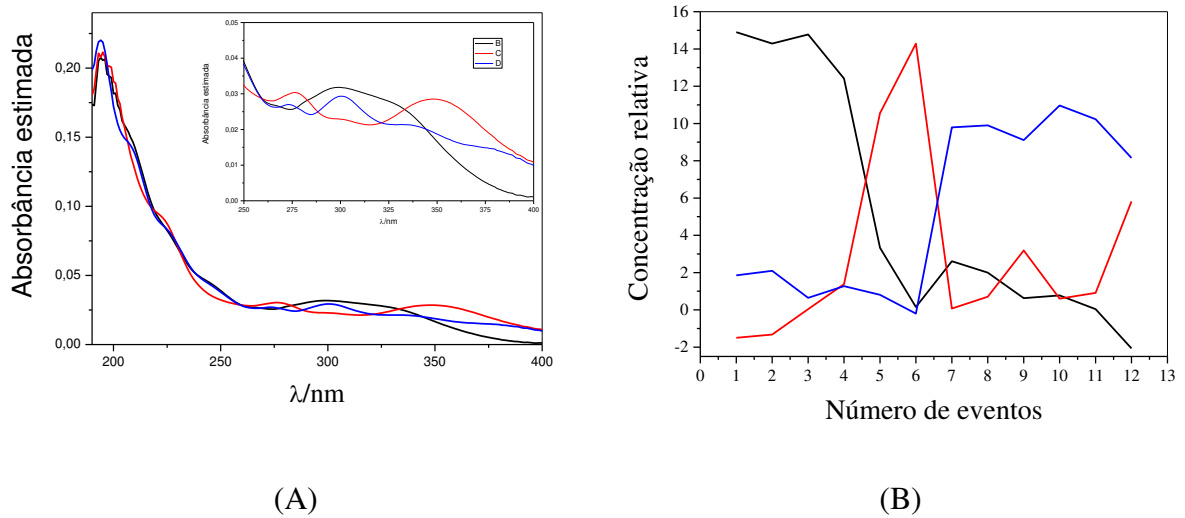


Figura 30: (A) Espectro da solução de antocianinas das espécies estimadas pelo MCR/ALS para diferentes valores de pH em presença de alumínio para a matriz de dados aumentados. (B) Concentração relativa estimada pelo MCR para as diferentes espécies de a antocianina em função do pH da solução e presença de alumínio na matriz de dados aumentados. (—) Espécie A. (—) Espécie B. (—) Espécie D.

Para a matriz de dados aumentados pH-alumínio, Figura 30, sugere a presença de 3 componentes. A espécie predominante em valores de pH abaixo de 8,0 (espécie A em preto), desaparece com a adição de alumínio. Com a adição de alumínio surge uma nova espécie em solução (espécie D em azul), que existe praticamente em todos os valores de pH. A espécie predominante em valores de pH mais elevados (espécie B em vermelho), em presença de alumínio ela quase não existe mais em solução.

A fim de verificar se as espécies identificadas nos efeitos do pH, presença de alumínio e presença de sulfito poderiam ser as mesmas, foi realizado a matriz de dados aumentados pH-sulfito-alumínio. Na Figura 31 são mostrados os resultados obtidos analisando as espécies presentes em diferentes valores de pH da solução em presença de alumínio e de sulfito para a matriz de dados aumentados.

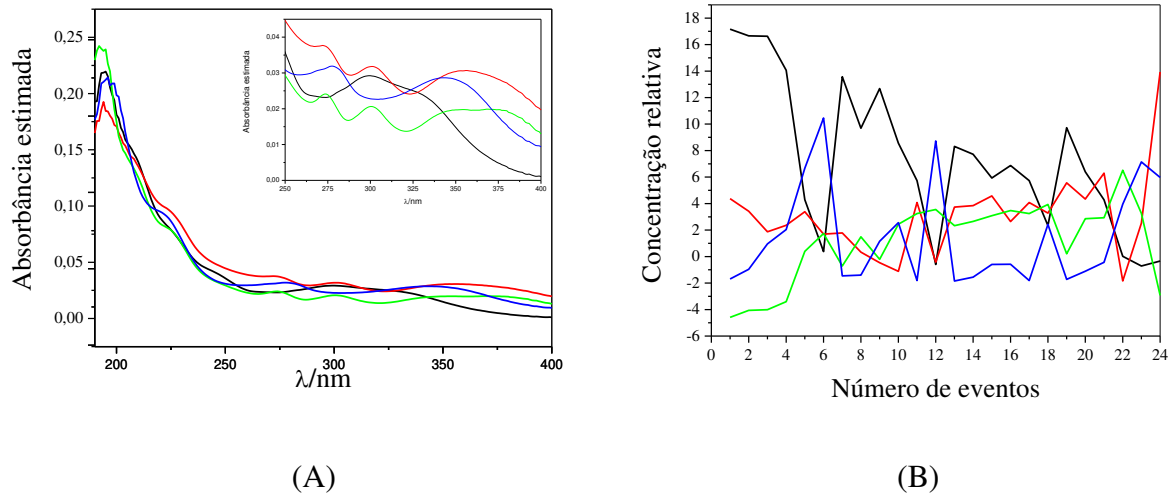


Figura 31: (A) Espectro da solução de antocianinas das espécies estimadas pelo MCR/ALS para diferentes valores de pH em presença de alumínio e sulfito para a matriz de dados aumentados. (B) Concentração relativa estimada pelo MCR para as diferentes espécies de antocianina em função do pH da solução e presença de alumínio e sulfito na matriz de dados aumentados. (—) Espécie A. (—) Espécie B. (—) Espécie C. (—) Espécie D.

Para a matriz de dados aumentados pH-alumínio-sulfito, Figura 31, o algoritmo sugere a presença de 4 componentes. A espécie predominante em valores de pH mais elevados (Espécie D em azul) em presença de alumínio, não foi identificada. Já a espécie A em preto, predominante em valores de pH menores, foi identificada nos três efeitos estudados, embora que em presença de alumínio ela exista em menor concentração relativa. No efeito da adição de sulfito foi identificada uma nova espécie (Espécie C em verde) que aparece também no efeito do alumínio, porém não foi identificada no efeito do pH. No efeito da adição de alumínio foi identificada a espécie B em vermelho, que aparece em quase toda faixa de pH estudado e não é observada no efeito do pH e efeito do sulfito. Esse fato sugere que com a adição de alumínio em valores de pH menores resultam na formação de uma nova espécie, que pode ser atribuído ao complexo de antocianina- alumínio.

## Conclusões Parciais

Observou-se um deslocamento batocrômico do espectro de reflectância das sépalas *in natura* rosas para as azuis, com máximos em 550 nm e 575 nm, respectivamente. Foi observado a formação do complexo alumínio-antocianina e obtida uma quantidade estequiométrica entre ambos. Observou-se que, além do complexo com alumínio, há formação de complexos de antocianina com íons ferro (II) e ferro (III), com espectros distintos da antocianina.

Para a extração das antocianinas nas sépalas de hortênsia, não foram observadas alterações na antocianina obtida, mas diferenças na extração relativa.

A partir das análises dos resultados obtidos pelo algoritmo MCR/ALS para a matriz de dados aumentados pH-sulfito-alumínio, foi possível observar a presença de quatro espécies em solução, podendo ser, o cátion flavílico, sua base conjugada, a chalcona, e o complexo alumínio-antocianina.

# **CAPÍTULO 4**

---

## **BERINJELA**

## 1 Introdução

A casca de berinjela pode ser uma fonte alternativa de delphinidina (SADILOVA, STINTZING e CARLE, 2006). Sendo assim, devido ao curto tempo de floração da hortênsia e sua baixa disponibilidade, utilizou-se o extrato da casca de berinjela para a continuação do trabalho. Nessa etapa, estudou o comportamento das antocianinas da casca de berinjela em diferentes condições experimentais, além de métodos de caracterização do extrato. Baseando-se nos resultados obtidos para o extrato de hortênsia, foi realizado estudos para escolha do melhor tipo de extração, estudo do comportamento do extrato na presença dos metais, como ferro (II), ferro (III) e alumínio, na presença de redutores como o sulfito, e em diferentes valores de pH do meio, além de avaliar seu comportamento cinético. Como técnicas de caracterização, foram realizadas análises do extrato líquido e do extrato liofilizado por espectroscopia no infravermelho, quantificação dos teores de ferro e alumínio na amostra liofilizada por espectrometria de absorção atômica e espectroscopia no UV-visível. Além disso, para identificar e correlacionar as espécies de antocianinas presentes no extrato para os diferentes valores de pH da solução, foi utilizada a Resolução de Curvas Multivariadas com Mínimos Quadrados Alternantes (MCR/ALS). Com a comprovação da presença da delphinidina na casca de berinjela, será possível avaliar métodos para a melhor extração e purificação para estudos futuros.

## 2 Resultados e discussão

### 2.1. Comportamento espectral do extrato de berinjela

O comportamento espectral do extrato de berinjela é mostrado na Figura 32.

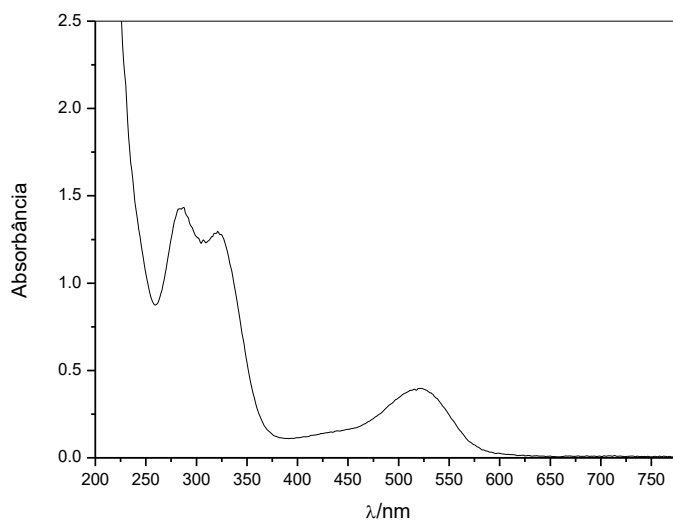


Figura 32: Espectro do extrato de berinjela na região do UV-visível em meio aquoso em pH 1,64. Extrato obtido em água deionizada em ultrassom. Volume de extrato: 3,0 mL.

O espectro do extrato de berinjela apresentou comprimentos de onda de máxima absorbância em 288 nm e 321 nm na região do ultravioleta, e 524 nm na região do visível. Esse máximo em 524 nm é comparável com o reportado nos estudos de SADILOVA *et al.* (2006) em que o comprimento de onda de máxima absorbância foi em 527 nm.

### 2.2. Otimização da extração

A Figura 33 mostra os espectros dos extratos de antocianinas presentes na casca da berinjela obtidos em diferentes solventes. Para esse estudo, utilizou-se os solventes: acetonitrila, água, acetona, metanol e etanol conforme descrito no item 2.4 do capítulo 2 (Materiais e Métodos).

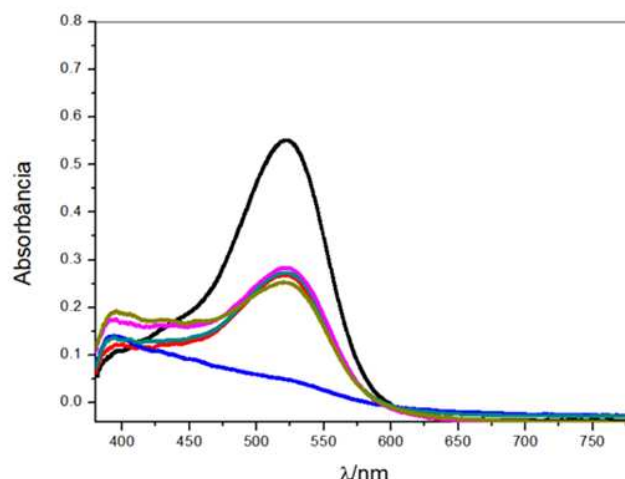


Figura 33: Espectros dos extratos obtidos da extração de antocianinas presentes na caca de berinjela em banho de ultrassom empregando os solventes: ( — ) água em ultrassom, ( — ) etanol, ( — ) metanol, ( — ) acetonitrila, ( — ) acetona; ( — ) água quente na ausência de sonicação. Todas as soluções em pH em torno de 1,64.

É possível observar que os extratos de antocianina obtidos dos diferentes solventes em estudo apresentaram comprimento de onda de máxima absorvância em torno de 524 nm. Vale ressaltar que o extrato obtido com acetona apresentou uma absorvância muito abaixo dos outros extratos, indicando uma eficiência muito inferior aos demais solventes.

A eficiência de extração ( $%E_R$ ), entre os diferentes solventes foi calculada a partir das absorvâncias das antocianinas no máximo de absorção, usando o extrato obtido em água na presença de banho ultrassom como referência ( $A_{\text{referência}}$ ) (Equação 6).

$$%E_R = \frac{A}{A_{\text{referência}}} \cdot 100 \quad \text{Equação 6}$$

Onde  $A$  é a Absorvância máxima das antocianinas extraídas de cada solvente em estudo.

Sendo assim, obteve-se as seguintes porcentagens de eficiência relativa para os 6 solventes em estudo conforme apresentado na Tabela 8.

Além disso, é importante salientar que a extração da antocianina foi mais eficiente utilizando água em banho ultrassom, pois o valor da absorvância máxima em 524 nm foi o maior se comparado com as absorvâncias dos demais solventes nesse comprimento de onda.

Tabela 8: Solventes utilizados no estudo da extração da antocianina da casca de berinjela com seus respectivos valores de absorbância, e os valores de porcentagem de eficiência relativa de extração.

Solvente	Absorbância	% $E_R$
Água em banho ultrassom	0,550	100,0%
Água em aquecimento	0,267	48,5%
Etanol	0,282	51,2%
Metanol	0,272	49,5%
Acetona	0,047	8,5%
Acetonitrila	0,251	45,6%

Os dados de porcentagem de eficiência relativa apresentados na Tabela 8 mostram que é mais eficiente extrair as antocianinas da casca de berinjela utilizando água em banho ultrassom. É possível observar a afinidade da antocianina com outros solventes, que varia na ordem etanol > metanol > acetonitrila > acetona. O extrato de hortência também apresentou eficiências similares para solução aquosa em ultrassom, com aquecimento, e com acetonitrila em ultrassom.

### 2.3. Titulação Potenciométrica

A partir dessa titulação, obteve-se o seguinte comportamento do extrato frente a variação de pH do meio, como pode ser observado na Figura 34.

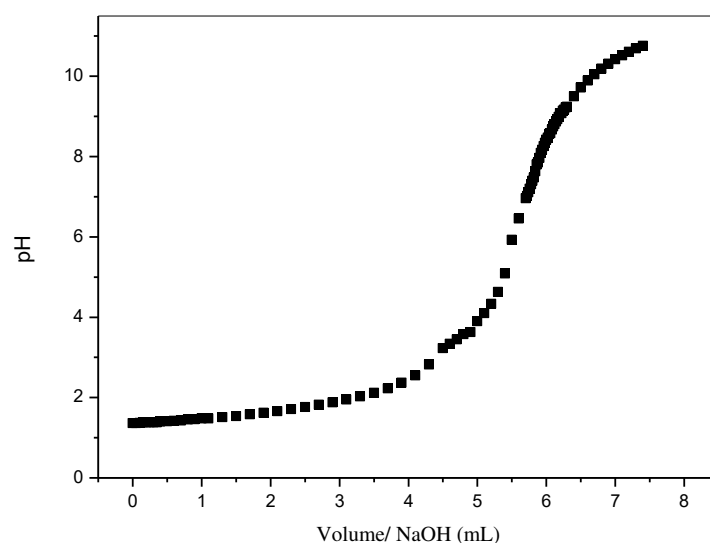


Figura 34: Titulação potenciométrica realizada com NaOH  $0,50 \text{ mol L}^{-1}$  e  $0,20 \text{ mol L}^{-1}$  sobre o extrato de berinjela.

Pode-se observar que quando o extrato é titulado com uma base forte, tem-se a presença de dois saltos potenciométricos. O primeiro salto potenciométrico pode ser evidenciado em um volume de equivalência em torno de 4,50 mL e o outro em um volume de equivalência de 5,40 mL. A partir dos volumes de equivalência e dos saltos potenciométricos, pode-se estimar dois valores de pKa para o extrato de berinjela. Mesmo apresentando dois saltos potenciométricos é possível estimar apenas um valor de pKa próximo a 3,62, que equivale ao pH na metade entre o primeiro volume de equivalência e o segundo volume de equivalência, pois o primeiro salto potenciométrico se encontra muito próximo a uma região pseudo tampão. Sendo assim, a partir da curva de titulação apresentada e do valor de pKa estimado, pode-se inferir que existem pelo menos três espécies de antocianinas em solução. A coloração do extrato ao longo da titulação, devido ao aumento do pH é mostrada na Figura 35.

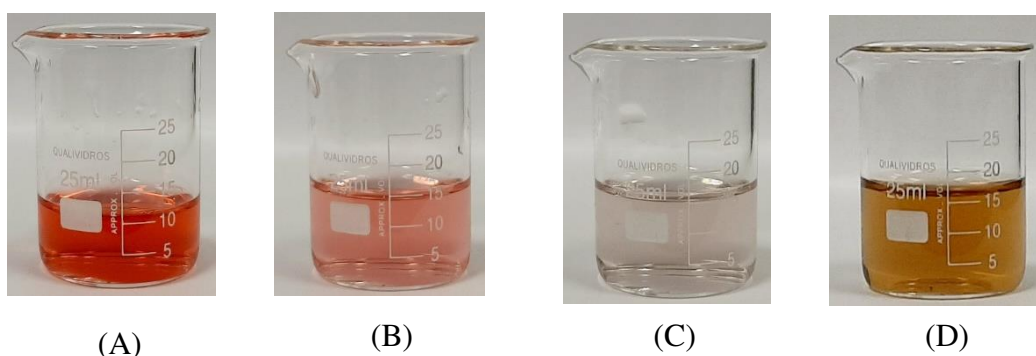


Figura 35: Coloração adquirida pelo extrato ao longo da titulação em função do pH do meio. (A) pH até 3,5 (B) pH 3,5 até 4,5; (C) pH 4,5 até 6,0; (D) pH acima de 7,5

#### 2.4. Espectroscopia no Infravermelho

Com o objetivo de caracterizar o extrato de berinjela, foram realizadas análises no infravermelho tanto do extrato líquido quanto do extrato sólido obtido no processo de liofilização. Os espectros de infravermelho das duas amostras estão representados na Figura 36.

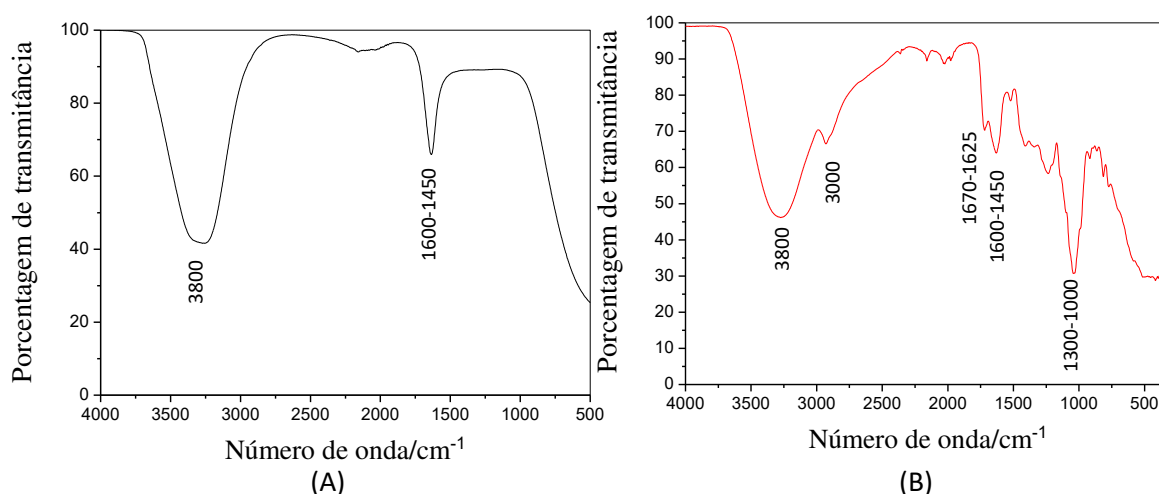


Figura 36: Espectros de infravermelho obtidos na faixa de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ . (A) Espectro do extrato obtido a partir da casca de berinjela. (B) Espectro do extrato liofilizado.

Tanto no espectro de infravermelho médio (FT-IR) do extrato (A) quanto da amostra liofilizada (B) foram observadas bandas características dos grupos hidroxila referentes ao estiramento O-H em torno de  $3800 \text{ cm}^{-1}$ . Além disso, no extrato liofilizado (B), foram observadas bandas características do estiramento C-H em torno de  $3000 \text{ cm}^{-1}$ , bandas características do estiramento C=C provenientes de grupos aromáticos que ocorrem entre  $1600$  e  $1450 \text{ cm}^{-1}$ , além de bandas características de grupos flavonoides no intervalo de  $1670$  e  $1625 \text{ cm}^{-1}$  e banda característica do estiramento C-O entre  $1300$  e  $1000 \text{ cm}^{-1}$  (BARBOSA, 2013; PAVIA, LAMPMAN, *et al.*, 2010).

Essa análise no FT-IR confirma a presença de grupos flavonóides responsáveis pela cor da casca da berinjela, como a antocianina delfinidina 3-glicosídeo. Esses dados estão de acordo com os relatados na literatura (WU e PRIOR, 2005; SAKAMURA, WATANABE e OBATA, 1963).

## 2.5. Determinação dos teores de ferro e alumínio na amostra

Para a determinação de ferro e alumínio na amostra liofilizada, primeiramente foi realizada a digestão dessa amostra segundo descrito no item 2.8 de material e métodos. A partir disso, a amostra foi analisada por espectrometria de absorção atômica para a determinação da concentração de alumínio e de ferro total através de curvas analíticas, cujos parâmetros são mostrados na Tabela 9, Equação 7 e Equação 8 e Figura 37. As curvas analíticas foram obtidas com soluções padrão de cada um dos metais num intervalo de concentração de 1 a 10 mg L<sup>-1</sup> para o ferro e de 1 a 20 mg L<sup>-1</sup> para o alumínio.

$$\text{Abs} = (0,0704 \pm 0,0012) \cdot C_{Fe(Total)} + (0,0143 \pm 0,0069) \quad \text{Equação 7}$$

$$\text{Abs} = (0,0033 \pm 3,4989 \times 10^{-5}) \cdot C_{Al} + (0,0012 \pm 3,7754 \times 10^{-4}) \quad \text{Equação 8}$$

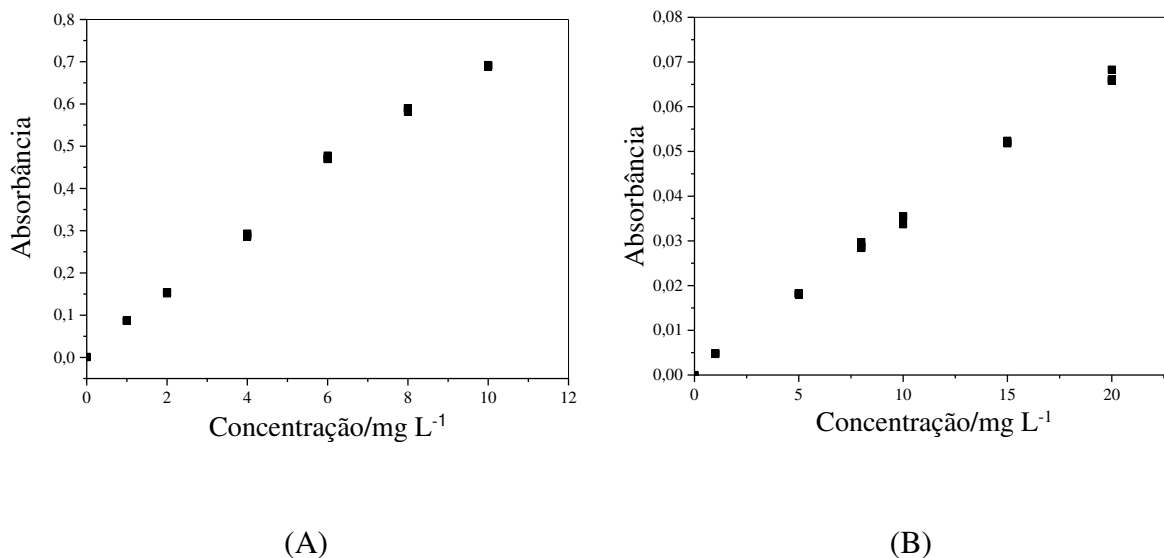


Figura 37: Curvas analíticas do ferro total e do alumínio respectivamente. (A) Concentração de ferro variando de 1,0 a 10,0 mg L<sup>-1</sup>; (B) Concentração de alumínio variando de 1,0 a 20,0 mg L<sup>-1</sup>.

Tabela 9: Parâmetros obtidos para as curvas analíticas de Alumínio e de Ferro total.

Parâmetros	Ferro	Alumínio
Coeficiente de determinação / $R^2$	0,994	0,998
LoD/ (mg L <sup>-1</sup> )	0,831	0,972
LoQ/ (mg L <sup>-1</sup> )	2,77	3,24
Desvio padrão dos resíduos	0,0195	0,0011
Sensibilidade analítica / (L.mg <sup>-1</sup> )	0,0703	0,0033
Faixa analítica/ (mg L <sup>-1</sup> )	2,77-10,0	3,24-20,0

As figuras de mérito para a determinação dos metais foram adequadas, apresentando baixo desvio padrão dos resíduos, além de bons valores para limite de detecção (LoD), limite de quantificação (LoQ) e sensibilidade analítica, sendo adequados para a quantificação de Alumínio e de Ferro total nas amostras. A partir das Equações 7 e 8 das curvas analítica foram determinadas as concentrações de Alumínio e de Ferro nas amostras. Os resultados são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10: Valores de absorvância para o ferro e alumínio de cada umas das triplicatas com suas respectivas massas.

Amostra	Massa /g	Absorvância		Concentração* / (mg L <sup>-1</sup> )	
		Ferro	Alumínio	Ferro	Alumínio
1	0,2005	0,052	0,024	< LoQ	6,90
		0,053	0,024	< LoQ	6,90
		0,052	0,022	< LoQ	6,30
2	0,2055	0,084	0,030	< LoQ	8,73
		0,084	0,036	< LoQ	10,54
		0,084	0,036	< LoQ	10,54
3	0,2096	0,116	0,036	< LoQ	10,54
		0,117	0,036	< LoQ	10,54
		0,115	0,036	< LoQ	10,54

\* valor na solução analisada.

Considerando os cálculos de diluição, (Apêndice 1), a concentração média no extrato obtida para o alumínio foi igual a  $(11,01 \pm 2,10) \times 10^{-2} \%$  (m/m) ou  $(4,08 \pm 0,78) \times 10^{-5}$  mol/g. Já o ferro, apresentou concentrações com valores abaixo do limite de quantificação.

Esses resultados revelaram o baixo teor de Al e de Fe na amostra, de modo que não influenciaria nos estudos do extrato de antocianina em presença desses metais.

## **2.6. Avaliação do rendimento de extração das antocianinas a partir do processo de liofilização**

Para avaliar a quantidade de antocianinas extraídas da casca de berinjela, foi feita uma extração como mencionado no item 2.5 de material e métodos. Resumidamente, extraiu-se as antocianinas de  $100 \pm \text{g}$  de casca de berinjela a partir de uma solução de 500 mL de água deionizada em meio ácido (pH em torno de 1,60) e colocada em banho de ultrassom por cerca de 4 horas. Posteriormente, o extrato líquido foi congelado a  $-4^\circ\text{C}$  e liofilizado por 72 horas em dias alternados. Por fim, pesou-se a massa do extrato sólido obtido ao final do processo de liofilização, obtendo uma massa de 2,972 g.

A partir dessa massa obtida e considerando que grande parte das antocianinas presentes na casca de berinjela foram extraídas, pode-se calcular a porcentagem de antocianina presente em  $100 \pm \text{g}$  de casca de berinjela, que é dada pela seguinte Equação 9:

$$\%(m/m) = \frac{\text{massa}_{\text{antocianina}}}{\text{massa}_{\text{amostra}}} \times 100\% \quad \text{Equação 9}$$

Em que  $m_{\text{antocianina}}$  é a massa de antocianina encontrada ao final do processo de liofilização e  $m_{\text{amostra}}$  é a massa de casca de berinjela usada para esse estudo.

Logo, considerando que a extração tenha sido seletiva, a porcentagem de antocianina presente na casca de berinjela é de cerca 2,97%.

## **2.7. Estudo de formação do complexo de Alumínio-antocianina.**

O comportamento espectrofotométrico do extrato de antocianina na presença de diferentes concentrações de alumínio é mostrado na Figura 38.

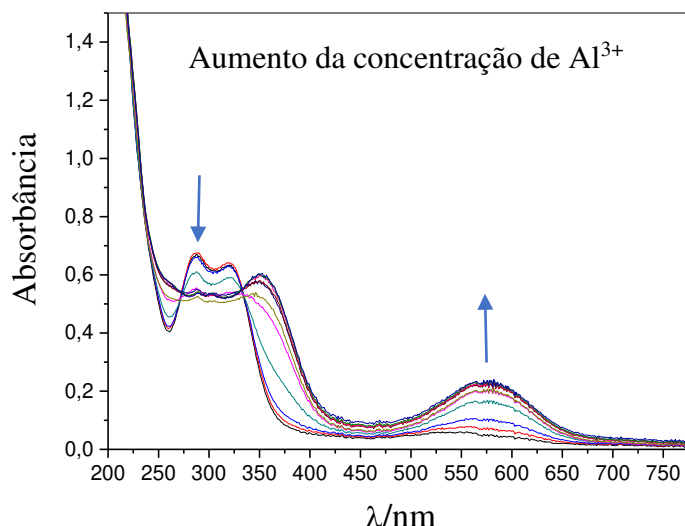


Figura 38: Espectros de formação do complexo alumínio-antocianina em meio ácido (Concentrações de alumínio variando de  $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$  a  $20 \text{ mmol L}^{-1}$ ). Volume de extrato: 3 mL; pH da amostra em 1,65.

O comportamento do espectro de antocianina no extrato de casca de berinjela na presença de alumínio na região do visível (Figura 39) foram bastante similares àquele observado para o extrato de hortênsia, apresentando comprimentos de onda máximo próximos, sendo que o da hortênsia foi em 575 nm e o da berinjela foi em 578 nm. Os espectros de absorção para ambos os complexos apresentaram uma diferença de 0,42 unidades de absorbância, conforme mostrado na Figura 39.

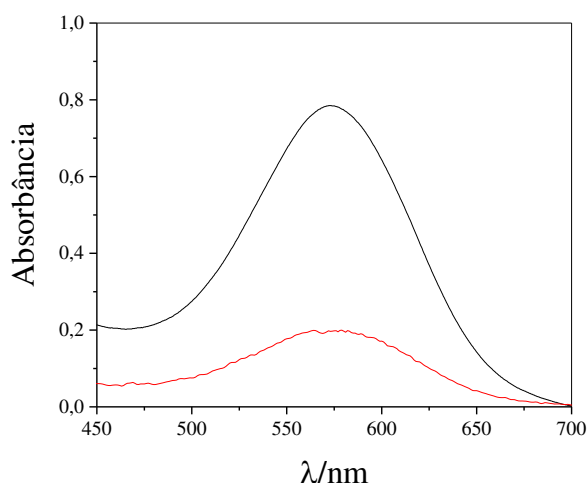


Figura 39: Comparação entre os espectros do complexo alumínio-antocianina (—) Extrato de hortênsia; (—) Extrato de berinjela.

Neste estudo, entretanto, foi avaliado o espectro na região do ultravioleta, sendo possível observar uma distinção mais nítida dos máximos de absorção da antocianina 'livre' (288 nm e 318 nm) e do complexo com alumínio (362 nm), conforme mostrado na Figura 40.

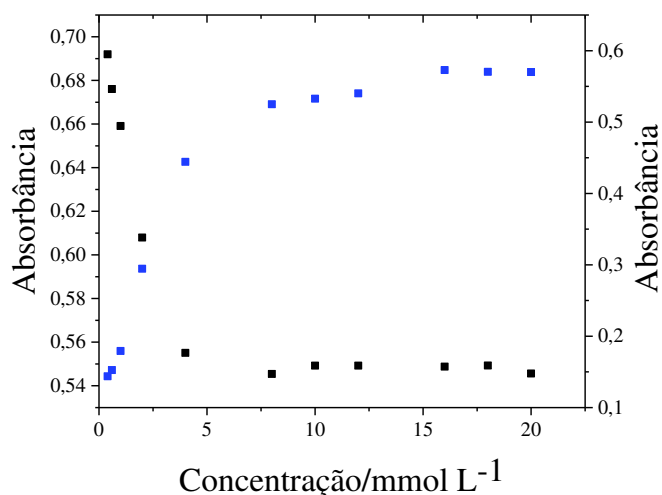


Figura 40: Variação da absorbância em função da concentração de alumínio para estudo da formação do complexo alumínio-antocianina. (—) 288 nm; (—) 362 nm. pH da solução em 1,64; volume de extrato: 3,0 mL.

A partir da variação de absorbância para os dois comprimentos de onda demonstrados na Figura 40, foi possível observar a formação do complexo alumínio-antocianina, em que para o comprimento de onda de 288 nm ocorreu a diminuição da absorbância com o aumento da concentração de alumínio no meio, e em 362 nm ocorreu o aumento da absorbância, indicando a formação do complexo. Essa formação também pode ser evidenciada na Figura 41 com a variação da absorbância na região do visível.

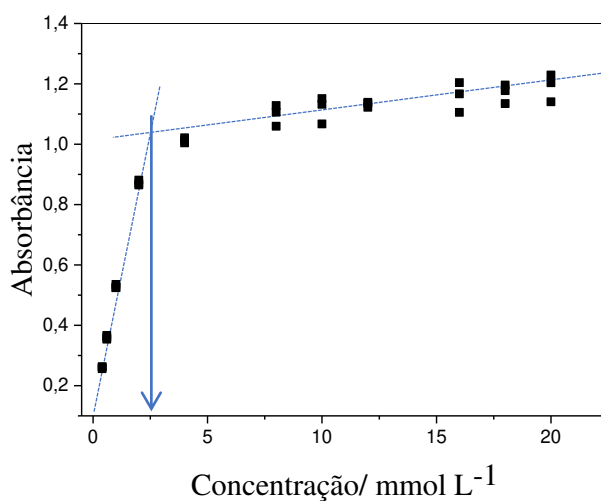


Figura 41: Variação da absorbância em função da concentração de alumínio obtida no comprimento de onda máximo em 575 nm para estudo da formação do complexo alumínio-antocianina. pH da solução em 1,64; volume de extrato: 3,0 mL.

A concentração estequiométrica do complexo alumínio-antocianina na solução na cubeta foi determinada para a concentração analítica de 2,5 mmol/L de alumínio, sendo assim, se sua estequiometria é de 1:3, logo, a concentração de antocianina no extrato é 25 mmol/L. Na Figura 42 são apresentadas as soluções obtidas em diferentes concentrações de alumínio. A mudança de coloração do extrato ocorreu de um vermelho intenso para um roxo intenso.



Figura 42: Coloração do extrato de berinjela em diferentes concentrações de alumínio ( $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$  a  $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ), sendo este aumento, da esquerda para a direita. (A)  $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ ; (B)  $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$ ; (C)  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ; (D)  $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ; (E)  $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$ .

### 2.8. Estudo de formação do complexo de Ferro (II) - antocianina

O comportamento espectrofotométrico do extrato de antocianina na presença de diferentes concentrações de Ferro (II) é mostrado na Figura 43.

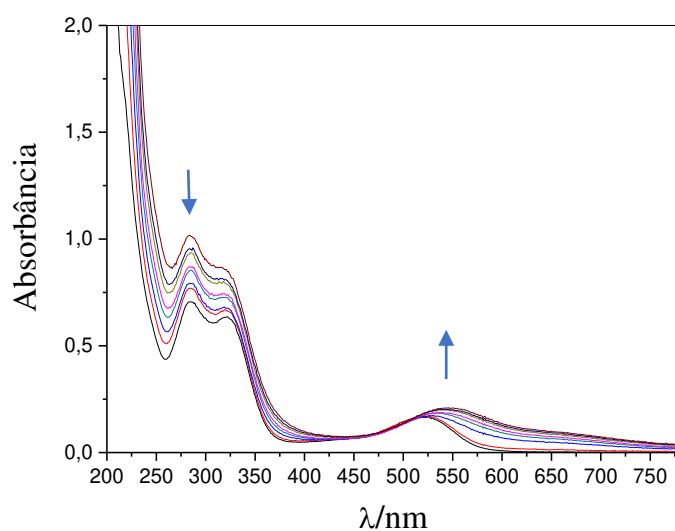


Figura 43: Espectros de formação do complexo ferro (II) - antocianina (Concentrações de ferro (II) de  $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$  a  $32 \text{ mmol L}^{-1}$ ). pH da solução em 1,76; Volume de extrato: 3,0 mL.

Neste estudo, assim como no estudo do alumínio, foi avaliado o espectro na região do ultravioleta e do visível, sendo possível observar uma queda na absorvância em 288 nm e o deslocamento do comprimento de onda máximo na região do visível de 524 nm para 550 nm para concentrações maiores de Ferro (II), indicando a formação do complexo. A variação da absorvância no comprimento de onda máximo para a formação do complexo está representada na Figura 44.

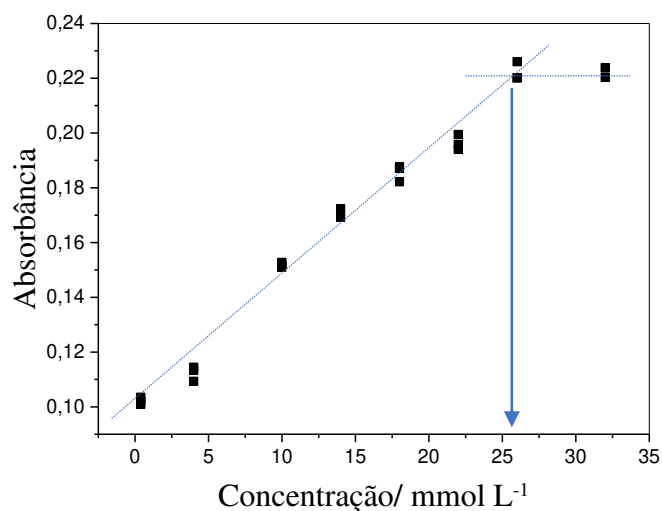


Figura 44: Variação da absorvância em função da concentração de ferro (II) obtida no comprimento de onda máximo em 550 nm para estudo da formação do complexo ferro (II) - antocianina. pH da solução em 1,64; volume de extrato: 3,0 mL.

A partir da Figura 44 foi possível verificar que a estequiometria do complexo ferro-antocianina foi de 26 mmol L<sup>-1</sup>, sendo que, se sua estequiometria é de 1:3, logo, a concentração de antocianina no extrato é 260 mmol/L. A mudança de coloração para formação do complexo ocorreu de um vermelho intenso para um roxo, conforme mostrado na Figura 45.



Figura 45: Coloração do extrato de berinjela em diferentes concentrações de ferro (II) (0,4 mmol L<sup>-1</sup> a 32 mmol L<sup>-1</sup>), sendo este aumento, da esquerda para a direita. (A) 0,4 mmol L<sup>-1</sup>; (B) 10 mmol L<sup>-1</sup>; (C) 18 mmol L<sup>-1</sup>; (D) 26 mmol L<sup>-1</sup>.

## 2.9. Estudo de formação do complexo de Ferro (III) - antocianina

No estudo do Ferro (III) com o extrato da casca de berinjela foi observado que a adição de ferro (III) sobre o extrato, provocou mudança na coloração da solução e também uma mudança no comprimento de onda máximo de absorção, que era de 524 nm passando para 550 nm, ocorrendo então um deslocamento batocrômico de 26 nm, indicando assim, a formação do complexo ferro (III) -antocianina de coloração roxo intenso. Após a formação do complexo de coloração roxo, observou-se uma queda brusca de absorbância ao longo do tempo acompanhada de um deslocamento hipsocrômico para comprimentos de onda próximos a 536 nm e de uma mudança na coloração da solução, que passou de um roxo intenso para um amarelo, indicando que houve uma mudança de espécie em solução. Esse comportamento é mostrado na Figura 46.

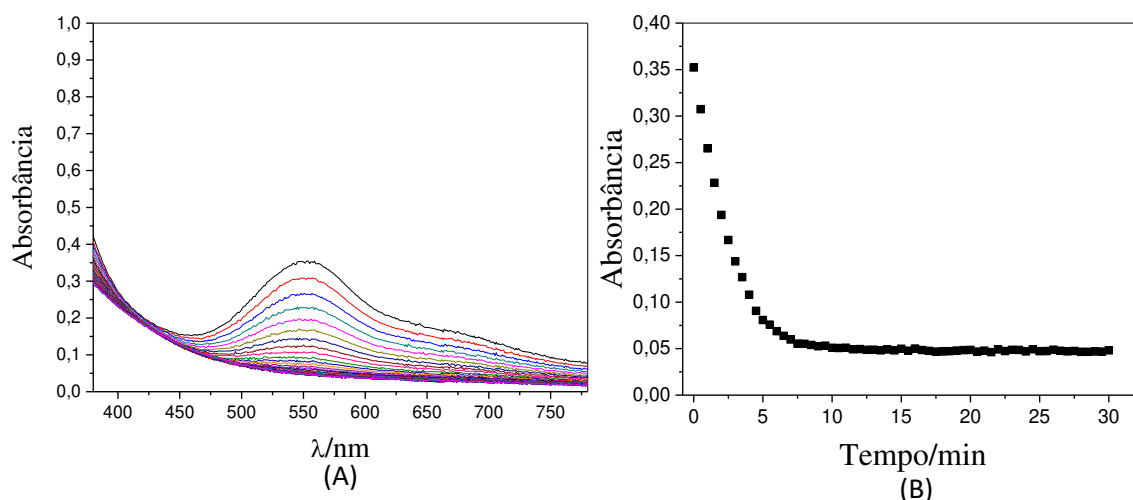


Figura 46: Estudo da formação do complexo Ferro (III) – antocianina acompanhado da queda da absorbância em 550 nm. (A) comportamento espectral do extrato de berinjela na presença de  $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$  de Ferro (III). (B) Diminuição da absorbância ao longo do tempo no comprimento de onda máximo em 550 nm. pH da solução 3,2; volume de extrato: 3,0 mL.

Para esse estudo, foram utilizadas concentrações de ferro (III) na faixa de  $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$  a  $12 \text{ mmol L}^{-1}$ , sendo observado que em maiores concentrações de ferro (III) houve um aumento na taxa de degradação da antocianina, tendendo a formar mais rapidamente a espécie mais estável, provavelmente uma espécie oxidada, como pode ser observado na Figura 47. A espécie oxidada, formada pela redução do ferro (III) a ferro (II), não parece ser complexada a esse último, mas sim uma espécie polimérica, sem uma banda definida na região do visível, similar ao comportamento dos polifenóis.

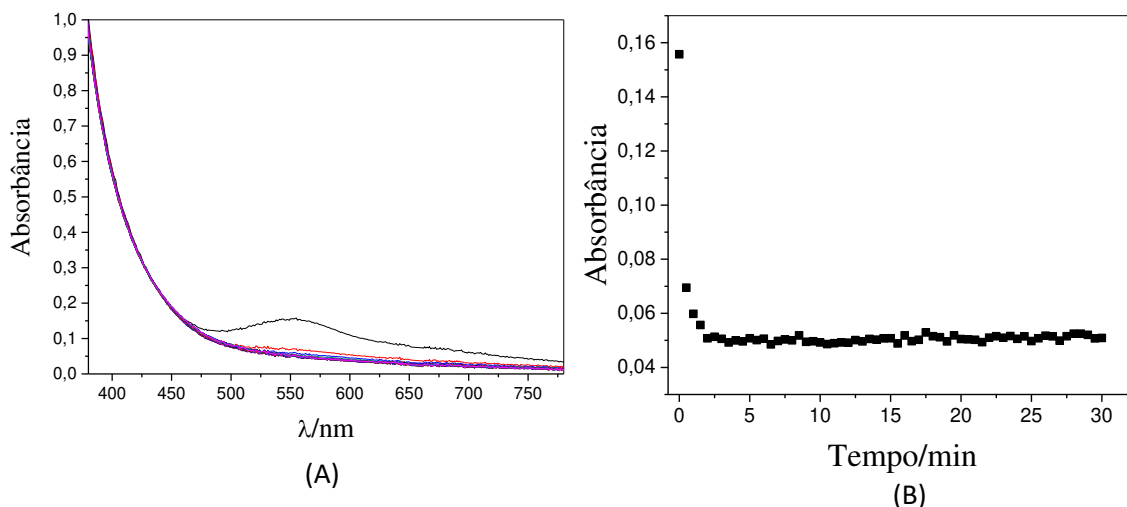


Figura 47: Estudo da formação do complexo Ferro (III) – antocianina acompanhado da queda da absorbância em 550 nm. (A) comportamento espectral do extrato de berinjela na presença de  $4 \text{ mmol L}^{-1}$  de Ferro (III). (B) Diminuição da absorbância ao longo do tempo no comprimento de onda máximo em 550 nm. pH da solução 3,2; volume de extrato: 3,0 mL.

Como pode-se perceber da Figura 46, houve uma queda na absorbância de 0,35 para valores próximos a 0,05 em apenas 5 minutos de estudo cinético para uma concentração de  $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$  de ferro (III). Ao adicionar maiores concentrações de ferro em solução, essa diminuição de absorbância se torna cada vez mais rápida como se pode observar na Figura 47 letra B em que para a concentração de ferro (III) de  $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$  a absorbância caiu de 0,16 para 0,05 em cerca de 1 minuto.

A mudança de coloração observada para o extrato de antocianina quanto se adiciona ferro (III) em solução é apresentada na Figura 48.



Figura 48: Mudança da coloração do extrato de berinjela ao se adicionar  $8 \text{ mmol L}^{-1}$  de ferro (III) em solução ao longo do tempo.

### 2.10. Estudo do comportamento do extrato em presença de agente redutores

Avaliou-se o comportamento do extrato de berinjela na presença de diferentes concentrações de hidrazina, ácido ascórbico e sulfito a fim de buscar estabilizantes que fossem capazes de aumentar a estabilidade do extrato por um período de tempo maior. O espectro do extrato de berinjela em diferentes concentrações de ácido ascórbico é apresentado na Figura 49.

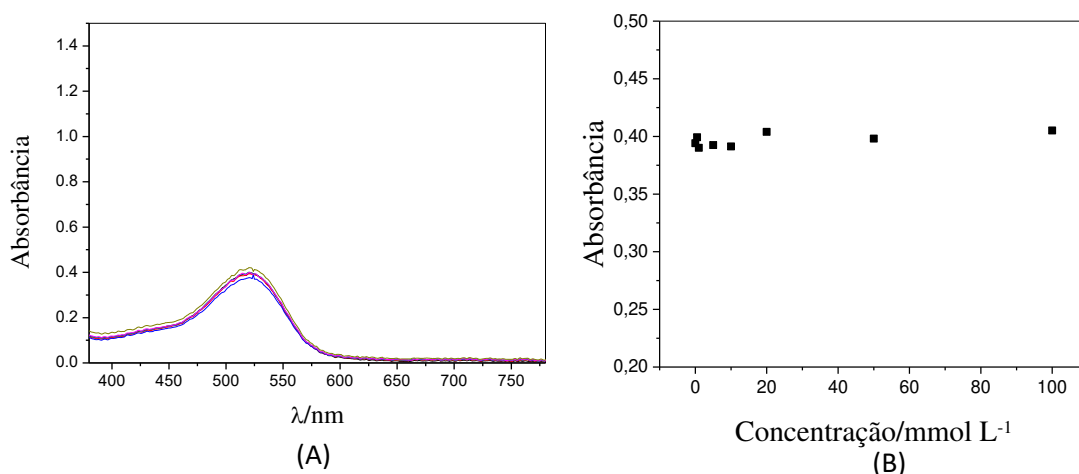


Figura 49: Estudo do comportamento do extrato na presença de ácido ascórbico. (A) Espectro do extrato de antocianina e em comparação com o espectro do extrato na presença de diferentes concentrações de ácido ascórbico ( $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$  a  $100,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ). (B) variação da absorbância em função da concentração de ácido ascórbico. Volume de extrato:  $3,0 \text{ mL}$ .

Ao comparar a absorvância no comprimento de onda máximo (524 nm) para uma solução contendo apenas o extrato e para soluções contendo o extrato na presença de diferentes concentrações de ácido ascórbico, variando de 0,5 mmol L<sup>-1</sup> a 100,0 mmol L<sup>-1</sup>, foi possível verificar que não há variação significativa da absorvância e do espectro nessas diferentes condições experimentais, com uma variação máxima de absorvância de cerca de 3,62% nesse comprimento de onda. Essas amostras contendo ácido ascórbico foram armazenadas em geladeira por 24 horas e após esse tempo realizou-se novas leituras, sendo possível observar o completo descoloramento do extrato e a queda da absorvância para valores próximos de zero em 524 nm, evidenciando que o ácido ascórbico afeta o comportamento do extrato de forma bastante lenta, ou seja, apresentando uma cinética de reação lenta. Dessa maneira, o ácido ascórbico pode ser utilizado como um estabilizante do extrato, impedindo a degradação das antocianinas e formação dos polifenóis. Esse efeito deve estar associado à eliminação de oxidantes no meio.

O espectro do extrato de berinjela em diferentes concentrações de hidrazina é mostrado na Figura 50.

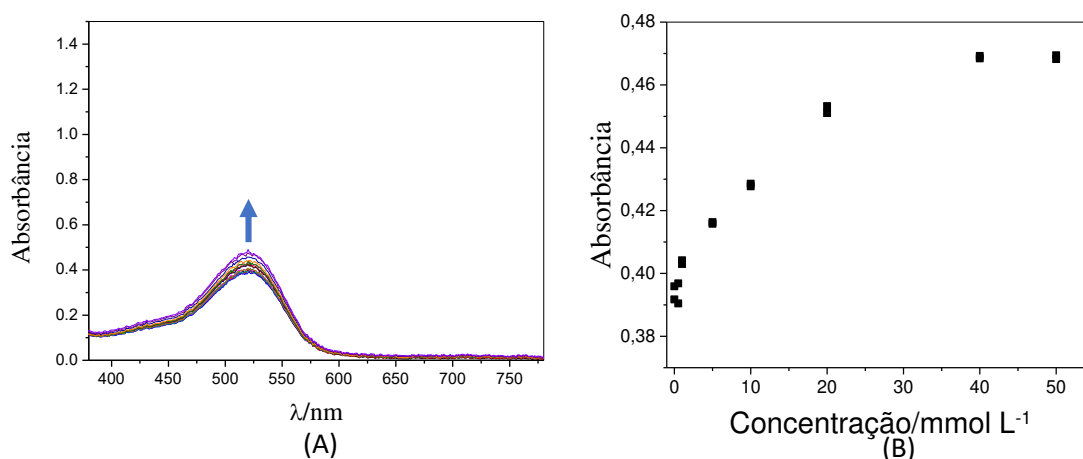


Figura 50: Estudo do comportamento do extrato na presença de hidrazina (A) Espectro do extrato de antocianina e espectro do extrato na presença de diferentes concentrações de hidrazina (0,5 mmol L<sup>-1</sup> a 100,0 mmol L<sup>-1</sup>). (B) variação da absorvância em função da concentração de hidrazina. Volume de extrato: 3,0 mL.

Como pode ser observado na Figura 50, os espectros da solução contendo apenas o extrato quando comparado com os espectros das soluções do extrato contendo diferentes concentrações de hidrazina (0,5 mmol L<sup>-1</sup> a 50,0 mmol L<sup>-1</sup>) foram semelhantes. Ao adicionar

hidrazina a solução do extrato, causou um aumento de absorbância, de modo que, quanto maior a concentração de hidrazina no meio, maior a absorbância no comprimento de onda máximo, variando de 0,392 para 0,469 para a solução contendo  $50,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de hidrazina. Esse valor corresponde a 16,52% do valor máximo de absorbância. Ao contrário do ácido ascórbico, um redutor pouco forte, a hidrazina é um redutor forte e pode ter reduzido algumas espécies oxidadas, talvez intermediários na formação de polifenóis, uma vez que a redução desses últimos é considerada irreversível.

Já no estudo com o sulfito, foi observado que quanto maior a concentração de sulfito no meio, maior a diminuição da absorbância no comprimento de onda máximo na região do visível. Esse comportamento é mostrado na Figura 51.

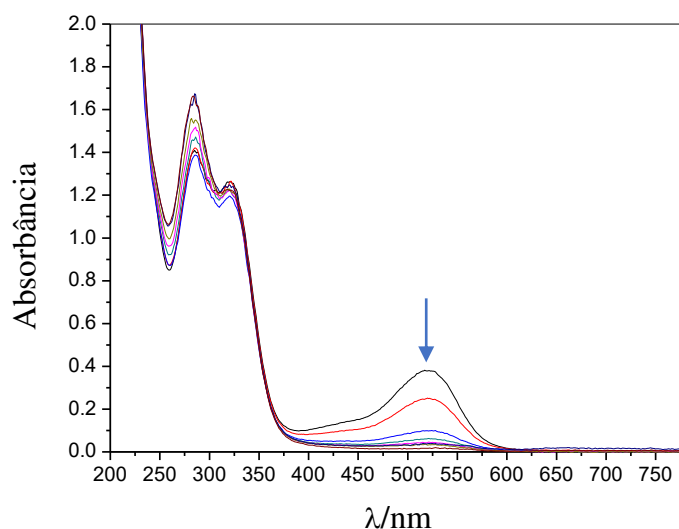


Figura 51: Espectro do extrato de berinjela na presença de diferentes concentrações de sulfito ( $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$  a  $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ).

Para o estudo do sulfito, é possível observar um decaimento da absorbância comparando a solução contendo somente o extrato puro e as soluções contendo o extrato na presença de diferentes concentrações de sulfito ( $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$  a  $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ). Nesse caso, a absorbância diminuiu de 0,377, no extrato puro, para 0,016 no extrato contendo  $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de sulfito, ou seja, uma diminuição de cerca de 95,73% do valor máximo.

A diminuição da absorbância com o aumento da concentração de sulfito em solução, no comprimento de onda máximo (524 nm), pode ser evidenciada na Figura 52.

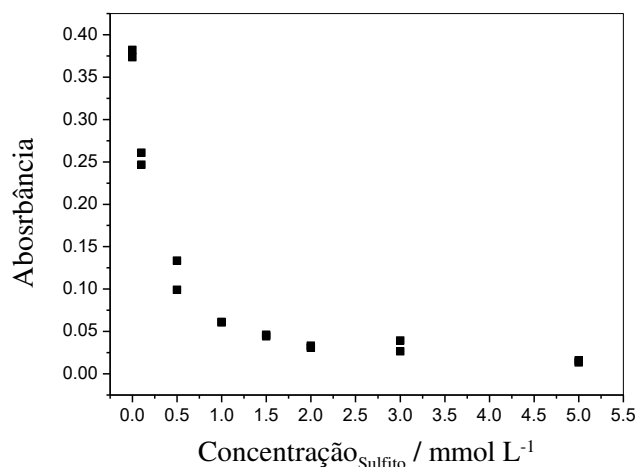


Figura 52: Variação da absorbância do extrato na presença no comprimento de máxima absorbância em 524 nm do extrato de berinjela em diferentes concentrações de sulfito (0,1 mmol L<sup>-1</sup> a 5,0 mmol L<sup>-1</sup>).

O decaimento da absorbância em função da concentração de sulfito em solução, pode ser visualizado pelo descoloramento da solução do extrato, que passa de uma coloração avermelhada para incolor quando se adiciona concentrações maiores de sulfito no meio (Figura 53).



Figura 53: Coloração da solução contendo o extrato puro e na presença de diferentes concentrações de sulfito (0,1 mmol L<sup>-1</sup> a 5,0 mmol L<sup>-1</sup>), sendo este aumento representado da esquerda para a direita.

Diferentemente dos dois redutores anteriormente estudados, a diminuição da banda característica das antocianinas sugere a formação do aduto sulfônico similar àquele formado entre o sulfito e o formol (Figura 54). Provavelmente, a ação do sulfito ocorreu sobre a cetona formada pela ruptura do anel pirano.

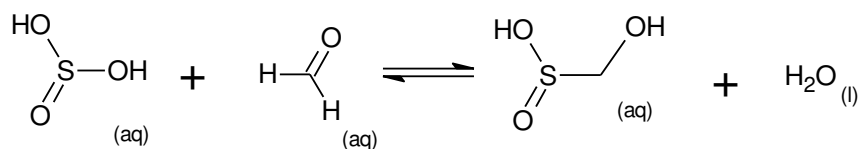


Figura 54: Representação da reação entre o sulfito e o formol para a formação do aduto sulfônico.

## 2.11. Estudo das espécies de antocianinas em função do pH do meio obtidas pelo método MCR

O comportamento das espécies de antocianina com a variação de pH do meio é apresentado na Figura 55.

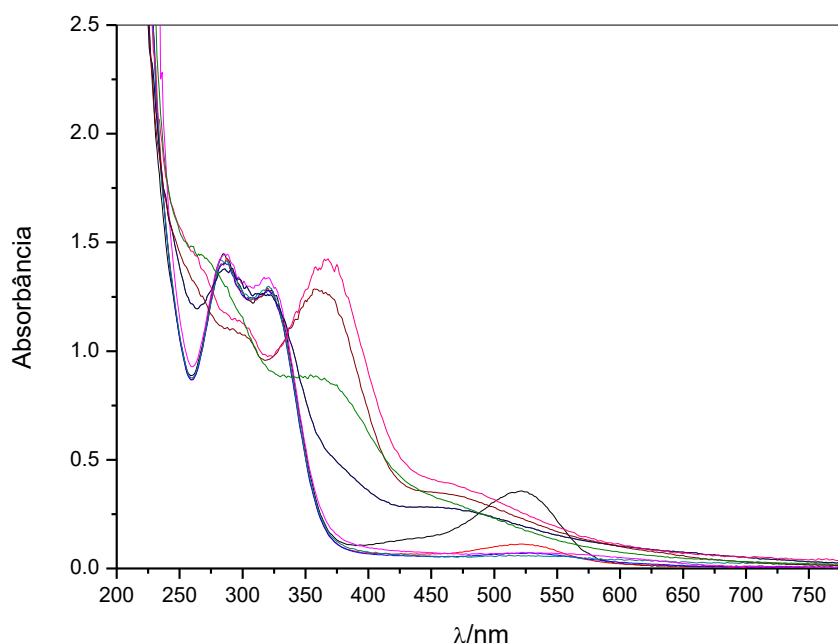


Figura 55: Espectro do extrato de berinjela em diferentes valores de pH do meio (2 à 11); (—) pH 2; (—) pH 3; (—) pH 4; (—) pH 5; (—) pH 6; (—) pH 7; (—) pH 8; (—) pH 9; (—) pH 10; (—) pH 11.

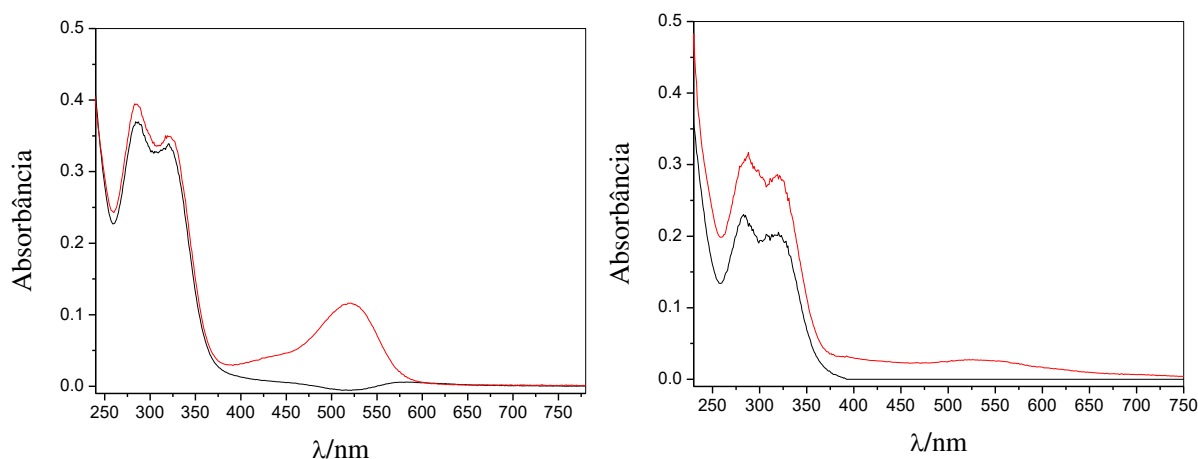
Ao analisar os espectros obtidos para o extrato de antocianina em diferentes valores de pH, foi possível observar uma mudança no comportamento espectral do extrato ao longo do aumento do pH do meio. Como pode-se perceber na Figura 55, com o aumento gradual do pH de 2 para 3, e logo depois para 4, ocorreu uma diminuição da absorvância em 524 nm, fazendo com que a coloração deixasse de ser avermelhada e passasse a ser incolor. Ao aumentar ainda mais o pH, ocorreu um deslocamento hipsocrômico do comprimento de onda máximo na região

do visível de 524 nm para cerca de 481 nm e a formação de uma nova banda em cerca de 363 nm.

A partir dessas observações, é possível afirmar que ao longo da variação de pH existem diferentes espécies de antocianina em solução, mas somente a avaliação e análise dos espectros não é suficiente para afirmar quantas espécies existem. Sendo assim, o uso de ferramentas quimiométricas para tratamento de dados como o método de resolução de curvas multivariadas (MCR), podem ser utilizadas para estimar o número de espécies em solução em função do pH do meio (MARÇO, POPPI, *et al.*, 2011; MARÇO, VALDERRAMA, *et al.*, 2014; SOUZA, ZANIN, *et al.*, 2016).

Para isso, aplicou-se o MCR nos estudos cinéticos obtidos para cada valor de pH (pH 5 a 11) separadamente, para os valores de pH 2; 3 e 4 juntos em seus respectivos pontos finais e para todos os valores de pH juntos em seus pontos finais, ou seja, uma matriz de dados aumentados. O MCR foi aplicado aos valores de pH 2, 3 e 4 juntos, pois não foi observado alteração no comportamento espectral desses três valores de pH ao longo do tempo. Os estudos cinéticos realizados para os valores de pH foram feitos em triplicata.

Os resultados obtidos do tratamento de dados para os espectros recuperados, podem ser evidenciados a seguir (Figura 56). Primeiramente foram mostrados os dados obtidos dos estudos cinéticos realizados para cada valor de pH separadamente (pH 5 a 11) e para os valores de pH 2, 3 e 4.



(A) pH 2,0; pH 3,0 e pH 4,0.

(B) pH 5,0

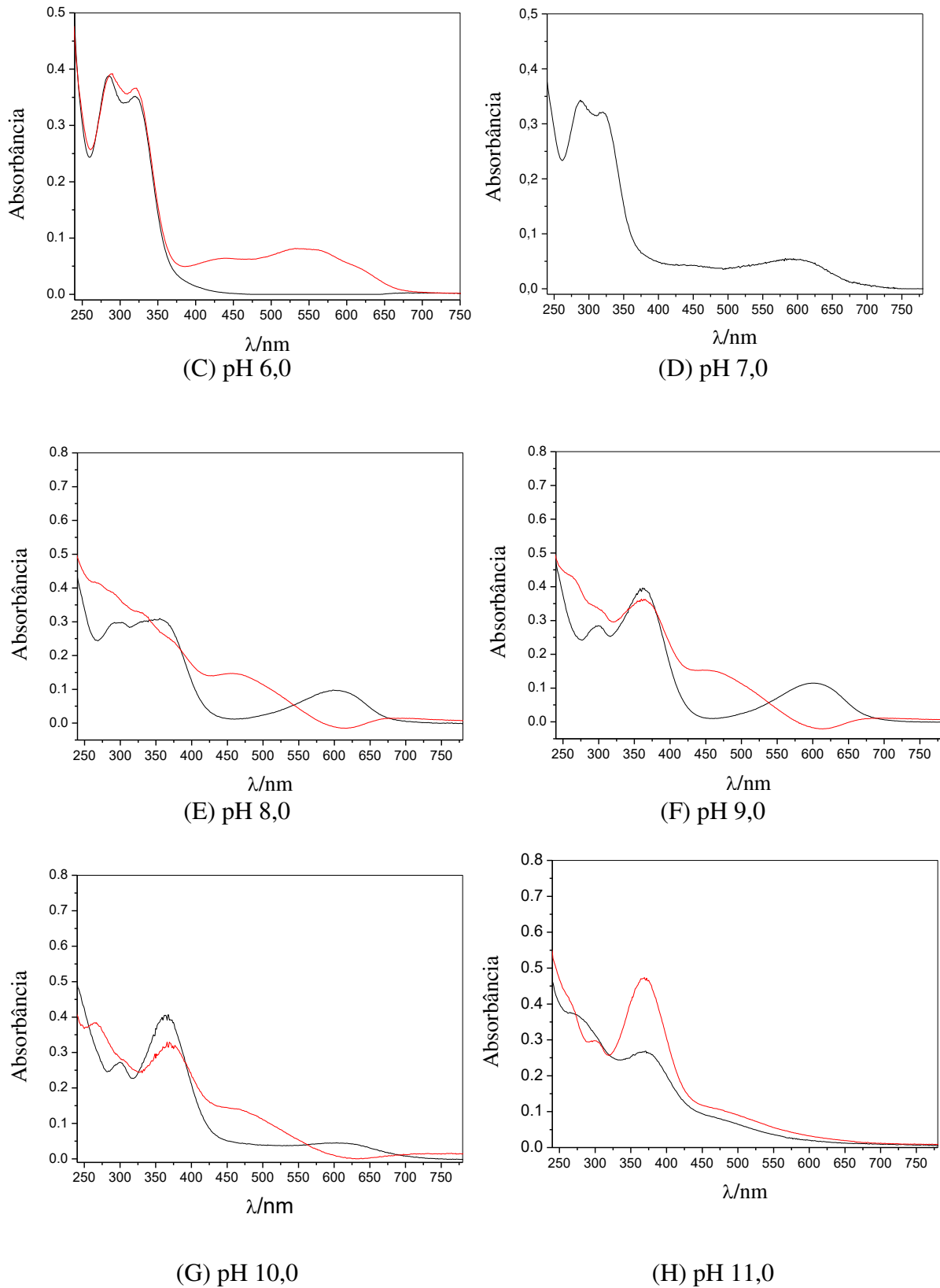


Figura 56: Espectros recuperados pelo MCR/ALS a partir dos estudos cinéticos em valores de pH variando 5 a 11, para as matrizes de dados individuais.

A partir dos gráficos representados na Figura 56, é possível observar que independente do pH avaliado, o método MCR/ALS identificou 2 componentes. Com exceção dos valores de pH 8,0 e 9,0 que apresentaram perfis espectrais semelhantes e para o pH 7 que foi observado apenas uma espécie, os outros valores de pH apresentaram perfis bem diferentes.

A fim de verificar se as espécies identificadas nos efeitos do pH poderiam ser as mesmas, foi realizado a matriz de dados aumentados com os diferentes valores de pH. Na Figura 57 são mostrados os resultados obtidos analisando as espécies presentes em diferentes valores de pH da solução para a matriz de dados aumentados.

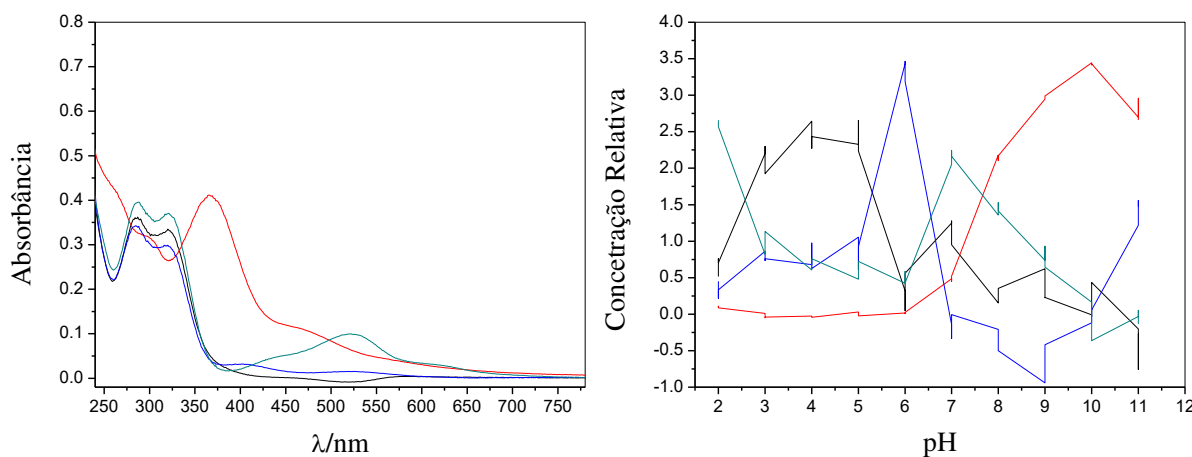


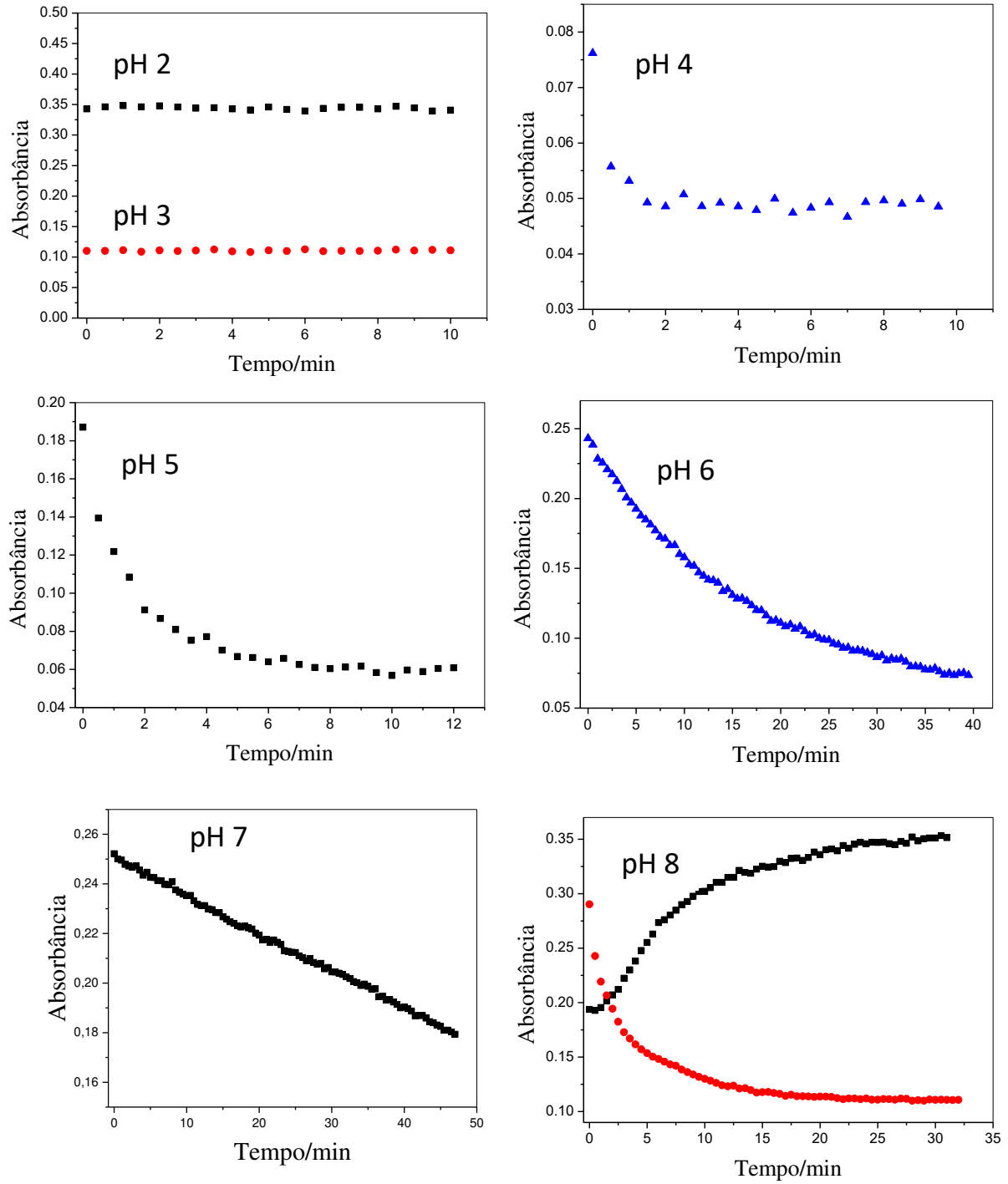
Figura 57: Espectros recuperados e da concentração relativa ao longo do tempo dos dados obtidos pelo MCR a partir de todos os valores de pH em seus pontos finais para a matriz de dados aumentados. (—) Espécie A. (—) Espécie B. (—) Espécie C. (—) Espécie D.

Os espectros recuperados pelo MCR/ALS para a matriz de dados aumentado, Figura 57, sugere quatro espécies de antocianinas em função do pH do meio. Sendo que a espécie representada pela coloração verde predomina em solução até pH 3, e reaparece em pH 7,0 novamente. Já a espécie de coloração preta predomina de pH 3 até pH 5,5. Já a espécie azul predomina do pH 5,5 a 7 e a espécie vermelha predomina em pH acima de 8.

A espécie representada pela coloração verde pode ser atribuída a antocianina na forma de cátion flavílico de coloração vermelha, a espécie de coloração azul deve ser a pseudobase carbinol incolor, e a espécie vermelha deve ser as chalconas de coloração amarelada (MARÇO e POPPI, 2008)

## 2.12. Comportamento cinético

O comportamento da variação da absorbância nos comprimentos de onda máximos ao longo do tempo para cada estudo de pH está evidenciado na Figura 58.



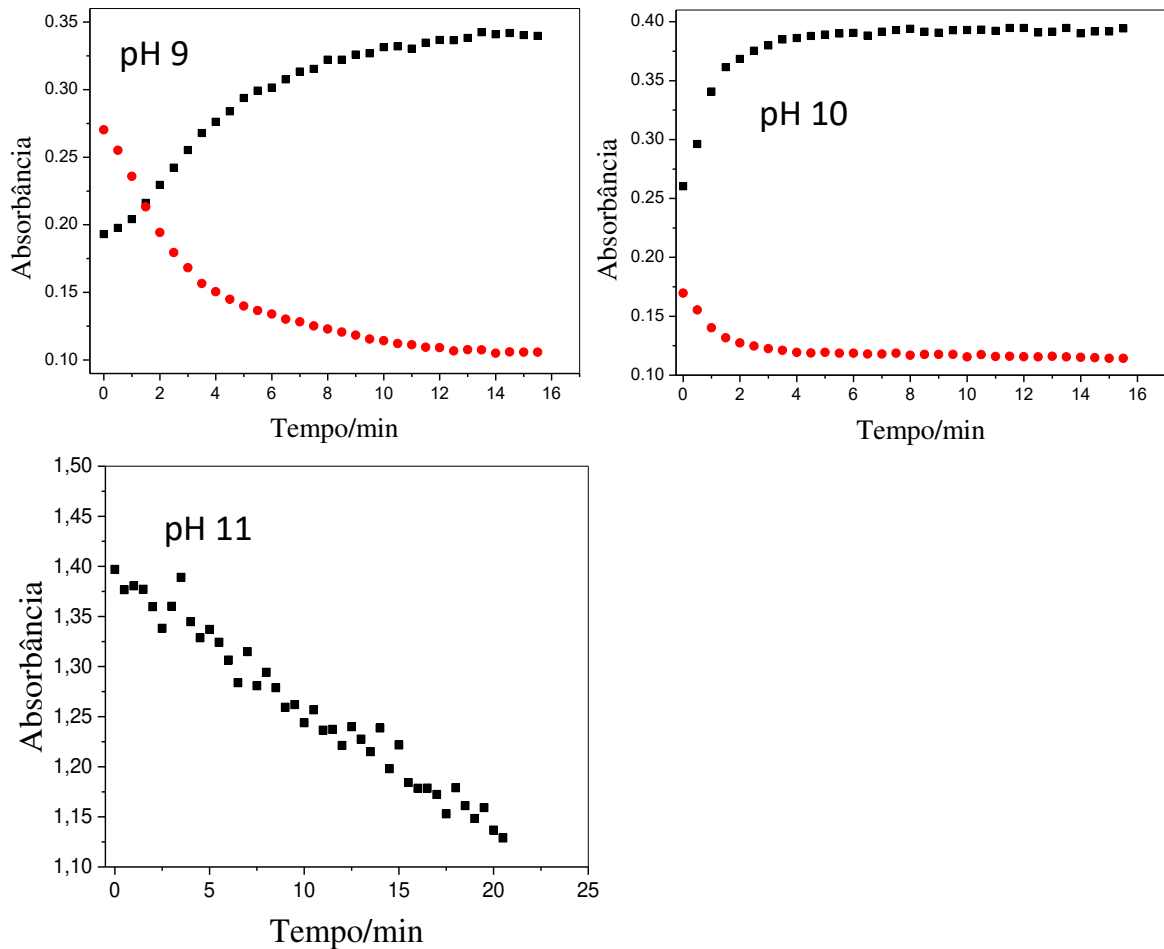


Figura 58: Variação das absorbâncias máximas ao longo do tempo para cada estudo de pH. Para os valores de pH 2, 3, 4, 5 e 6, considerou o  $\lambda_{max}$  em 524 nm; para o pH 7 considerou o  $\lambda_{max}$  em 597 nm; para os pH 8, 9 e 10 considerou o  $\lambda_{max}$  em ( — ) 463 nm ( — ) 597 nm; para o pH 11 considerou o  $\lambda_{max}$  em 363 nm.

A partir dos gráficos apresentados na Figura 58 foi possível observar o espectro de acordo com a variação das absorbâncias no comprimento de onda máximo ao longo do tempo para cada valor de pH. Nos valores de pH 2 e 3, a absorbância permanece constante em 524 nm durante todo o estudo cinético, sendo que ao comparar as absorbâncias nos dois valores de pH, pode-se concluir que houve uma diminuição de 0,35 no pH 2 para 0,12 em pH 3, indicando o início de uma mudança espectral. Já para o pH 4, houve uma diminuição da absorbância de 0,08 para 0,047 em 524 nm nos dois primeiros minutos, ficando estável nesse mesmo valor, comprovando que para o intervalo de pH de 2 a 4 existem mais de uma espécie de antocianina em solução. Já para os valores de pH 5 e 6, houve uma diminuição de absorbância em 524 nm

e uma mudança brusca de coloração passando de vermelha para uma coloração rosa clara, indicando ser uma região de transição entre uma espécie e outra.

No valor de pH 7, houve um deslocamento batocrômico do comprimento de onda máximo de 524 nm para 597 nm, ocorrendo uma diminuição dos valores de absorvância ao longo do tempo. Já para o pH 8, foi possível observar no estudo cinético, uma queda brusca da absorvância em 597 nm, e o aparecimento de uma nova banda em 463 nm, ocorrendo um aumento de absorvância nesse mesmo comprimento de onda, evidenciando assim, a presença de mais uma espécie em solução. Para o pH 9 e 10 ocorreu a diminuição cada vez mais rápida dos valores de absorvância em 597 nm, e o aumento dos valores em 463 nm. Por fim, no pH 11 ocorreu o desaparecimento da banda em 597 nm e a formação de uma nova banda em 363 nm, ocorrendo a diminuição da absorvância ao longo do tempo.

O estudo cinético, para os diferentes valores de pH, provou que o extrato de antocianina apresenta uma cinética de reação rápida devido a diminuição brusca de absorvância ao longo do tempo, com exceção do extrato em valores de pH mais ácidos ( $\text{pH} < 3$ ) em que quase não houve variação da absorvância. Quando a solução se encontra em valores de pH mais ácidos, tem-se a predominância do cátion flavílico em solução, por isso, nos diversos estudos envolvendo antocianinas em geral, a extração desses pigmentos é feita em meio ácido graças a estabilidade do cátion flavílico.

### **2.13. Modelo cinético para o estudo do pH**

Para descrever o mecanismo cinético no estudo com diferentes valores de pH da solução (Figura 58) ao longo do tempo, foram aplicados modelos cinéticos aos resultados obtidos. Esses modelos foram aplicados a partir do pH 4, pois o extrato nos valores de pH 2 e 3 não sofreram variação da absorvância ao longo do tempo.

Para todos os valores de pH foi aplicado o modelo ExpDec que se aproxima do modelo cinético de pseudo primeira ordem, sendo obtido assim, os seguintes parâmetros demonstrados na Tabela 11:

Tabela 11: Parâmetros obtidos no ajuste do modelo ExpDec aos dados experimentais do extrato em diferentes valores de pH da solução.

pH	2. $k /(\text{L min mol}^{-1})$	Coeficiente de determinação/ $R^2$	$S_{\text{res}}$
4	$0,407 \pm 0,042$	0,973	$1,0 \cdot 10^{-3}$
5	$1,518 \pm 0,082$	0,989	$3,2 \cdot 10^{-3}$
6	$17,15 \pm 0,221$	0,991	$17,4 \cdot 10^{-3}$
7	$378,54 \pm 87,41$	0,998	$7,42 \cdot 10^{-4}$
8 ( $\lambda = 463 \text{ nm}$ )	$8,54 \pm 0,252$	0,993	$3,92 \cdot 10^{-3}$
8 ( $\lambda = 597 \text{ nm}$ )	$3,79 \pm 0,155$	0,976	$5,22 \cdot 10^{-3}$
9 ( $\lambda = 463 \text{ nm}$ )	$5,61 \pm 0,252$	0,994	$1,09 \cdot 10^{-3}$
9 ( $\lambda = 597 \text{ nm}$ )	$3,42 \pm 0,095$	0,996	$2,84 \cdot 10^{-3}$
10 ( $\lambda = 463 \text{ nm}$ )	$1,15 \pm 0,0024$	0,992	$2,58 \cdot 10^{-3}$
10 ( $\lambda = 597 \text{ nm}$ )	$1,31 \pm 0,0016$	0,987	$1,23 \cdot 10^{-3}$
11	$73,31 \pm 53,00$	0,971	$1,28 \cdot 10^{-2}$

Esse modelo apresentou um bom ajuste aos dados cinéticos para todos os valores de pH, sendo que a qualidade do ajuste foi analisada através do desvio padrão dos resíduos e análise dos gráficos de resíduos. Para todas as condições experimentais estudadas o modelo foi adequado, demonstrando aleatoriedade na distribuição dos resíduos em torno do eixo zero, além de apresentarem baixos desvios padrões de resíduos. Isso pode ser verificado para o estudo do pH 5 e pH 10 (Figura 59 e 60).

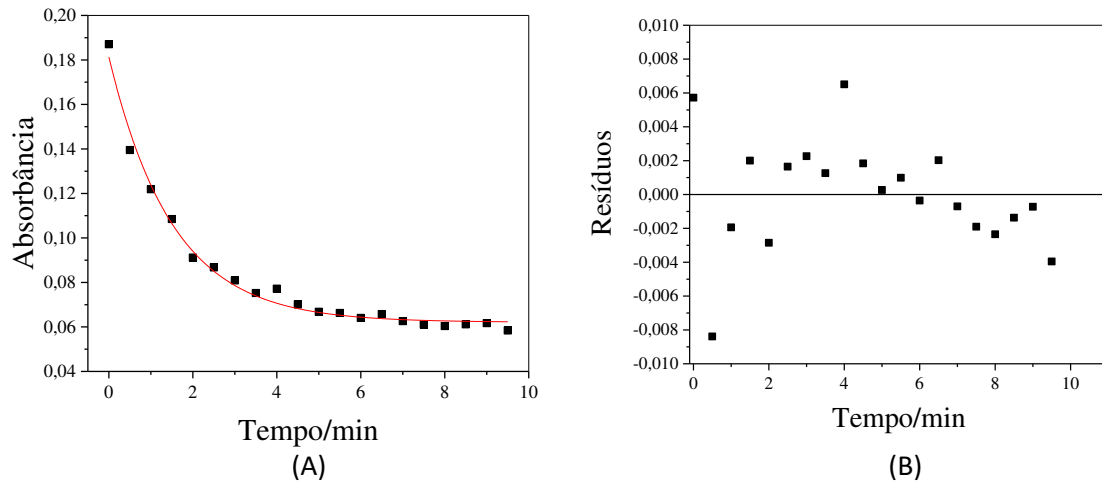


Figura 59: Estudo do comportamento do extrato em diferentes valores de pH. (A) Ajuste do modelo aos dados experimentais do pH 5. (B) Gráfico de resíduos para o estudo do pH 5.

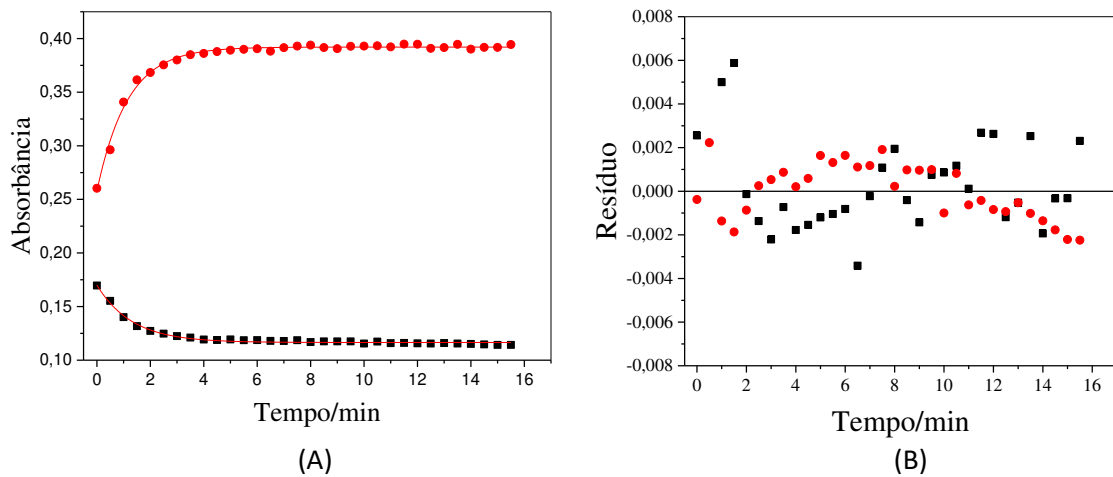


Figura 60: Estudo do comportamento do extrato em diferentes valores de pH. (A) Ajuste do modelo aos dados experimentais do pH 10. (B) Gráfico de resíduos para o estudo do pH 10. (—) 597 nm; (—) 463 nm.

A constante cinética de primeira ordem (Figura 61) mostra um aumento na taxa de degradação para valores próximos ao pH 7. O ajuste da gaussiana, apenas sugere a dependência do pH sobre a constante em mais de um sítio de reação, similar ao comportamento de algumas enzimas em relação ao pH, onde mais de um aminoácido do sítio ativo é influenciado pelo pH e assim, o perfil gaussiano é formado.

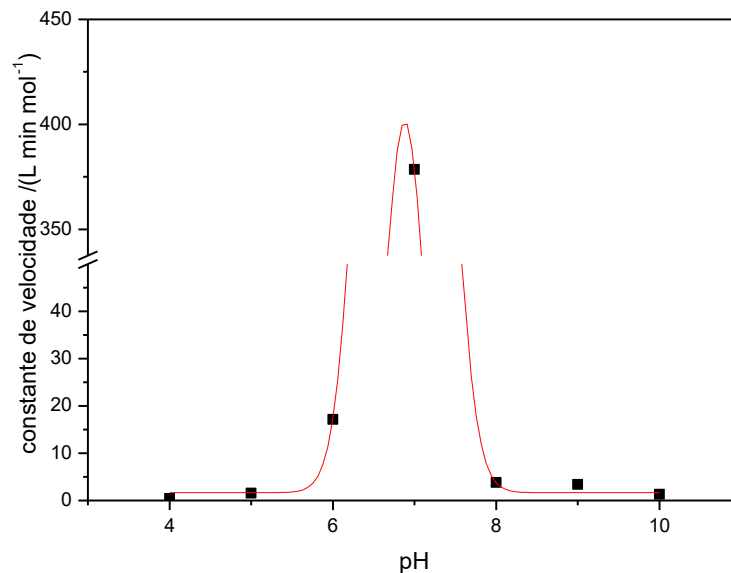


Figura 61: Gaussiana formado a partir dos valores da constante de velocidade encontrados para o extrato em função do pH do meio.

## Conclusões Parciais

Foi observada a formação do complexo alumínio-antocianina e obtida uma quantidade estequiométrica entre ambos. Observou-se, além do complexo com alumínio, a formação de complexos de antocianina com íons ferro (II) e ferro (III), obtendo também para esses estudos uma quantidade estequiométrica entre os metais e a antocianina.

Para os métodos de caracterização utilizados, foi possível confirmar que o pigmento presente na casca de berinjela é do grupo dos flavonóides. Além disso, foi possível encontrar os teores de ferro total e alumínio na amostra liofilizada, de forma que a quantidade encontrada não afetou os estudos realizados com esses metais.

A partir das análises dos resultados obtidos pelo algoritmo MCR/ALS para a matriz de dados aumentados do estudo do pH, foi possível observar a presença de quatro espécies em solução, sendo que dentre as espécies encontradas, pode-se ter o cátion flavílico, o carbinol incolor e as chalconas de coloração amarela.

## COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS NA ANÁLISE DE ANTOCIANINAS PROVENIENTES DE HORTÊNSIAS *VERSUS* ANTOCIANINAS PROVENIENTES DE BERINJELAS

A partir dos estudos realizados para as antocianinas presentes na casca de berinjela e nas sépalas de hortênsia, observou-se que as antocianinas nas duas matrizes são iguais, como sugere alguns autores (SCHREIBER, SWINK e GODSEY, 2010; YOSHIDA, MORI e KONDO, 2009; SADILOVA, STINTZING e CARLE, 2006; WU e PRIOR, 2005), ou pelo menos, muito similares, conforme mostrado na Figura 62. A distinção dos espectros pode estar associada às diferenças na concentração e/ou na presença de outras espécies absorventes, que se encontram em concentrações menores no meio. A diferença de concentração foi observada pelo método de Job, usualmente usado para a determinação da estequiometria do complexo mais estável, sendo utilizado neste trabalho para estimar as concentrações das antocianinas presentes nos extratos.

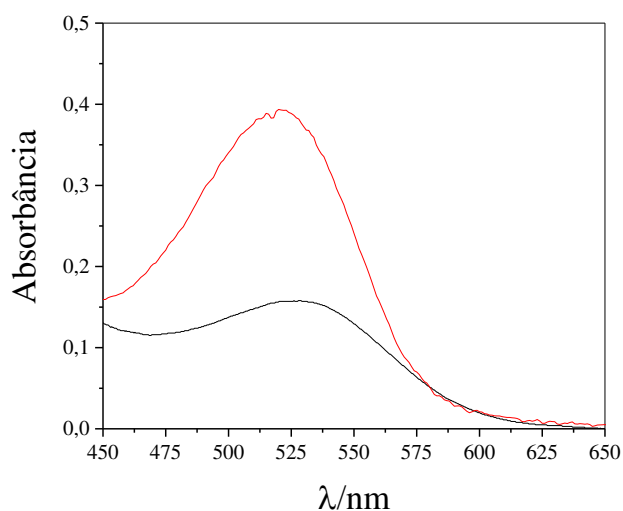


Figura 62: Comparação entre os espectros de ( — ) Hortênsia e ( — ) berinjela extraídos nas mesmas condições experimentais: água deionizada em meio ácido.

Além disso, ainda que o extrato de hortênsia e o extrato de berinjela apresentem um espectro similar, com o comprimento de onda máximo em 524 nm, a resolução espectral obtida com essa técnica não é suficiente para garantir que ambos os compostos são iguais.

Partindo do fato de que a mesma antocianina é a responsável por garantir coloração para essas duas matrizes, é importante destacar que tanto o extrato de berinjela quanto o extrato de hortênsia tiveram comportamentos espectrais parecidos quando colocados na presença de

alumínio. Entretanto, para as antocianinas da hortênsia ocorreu a formação de um complexo de coloração verde com comprimento de onda de máxima absorbância em 575 nm, já as antocianinas da casca de berinjela formaram um complexo de coloração roxa com comprimento de onda de máxima absorbância em 578 nm. Os espectros dos dois complexos formados e da sépala de hortênsia de coloração azul é apresentado na Figura 63. Esse último espectro foi obtido por espectrofotometria de reflectância difusa.

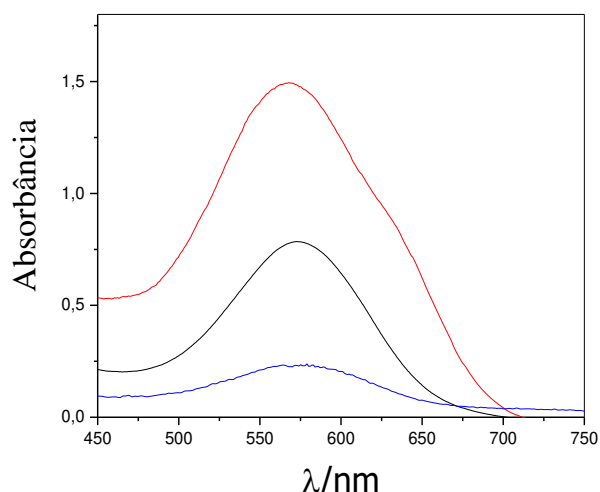


Figura 63: Comparação entre os extratos dos complexos formados entre as antocianinas da hortênsia e berinjela com o alumínio e da sépala de hortênsia in natura de coloração azul. ( — ) Complexo antocianina-alumínio da casca de berinjela; ( — ) complexo antocianina-alumínio da hortênsia; ( — ) sépalas de hortênsia de coloração azul *in natura*.

Mesmo apresentando comprimentos de onda de máxima absorbância semelhantes para os três espectros representados na Figura 63, as colorações observadas foram totalmente diferentes. Esse fato pode ser explicado a partir da teoria de Young-Helmholtz ou teoria tricrômica, na qual se baseia nos três tipos de cones existentes no sistema visual humano para garantir a percepção de cor pelo observador. Segundo essa teoria, quando a radiação refletida chega até a retina, cada um dos cones consegue detectar uma faixa do espectro visível, gerando impulsos elétricos de intensidades diferentes, sendo que a combinação dessas intensidades garante a sensação de cor pelo observador. Sendo assim, por mais que o comportamento espectral e o comprimento de onda máximo para os três espectros sejam semelhantes, a banda de cada um deles apresenta largura diferente, o que significa faixas diferentes do espectro visível detectadas pelos cones azul, verde e vermelho, gerando então, a sensação de cores diferentes.

Além disso, foi possível observar na Figura 63 que o espectro e o comprimento de onda máximo para o complexo alumínio-antocianina dos dois extratos em estudo foi semelhante ao espectro das sépalas de coloração azul, confirmando que o alumínio apresenta participação importante na formação da coloração azul de hortênsias. Sendo assim, partindo da hipótese de que a antocianina das sépalas de hortênsia seja a delphinidina, e sabendo que esse tipo de antocianina apresenta dois sítios de ligação em sua estrutura molecular e sabendo que o número de coordenação para o alumínio é igual a 6, foi possível propor uma estrutura para o complexo alumínio-antocianina na proporção de 1:3 de alumínio e delphinidina respectivamente, conforme mostrado na Figura 64.

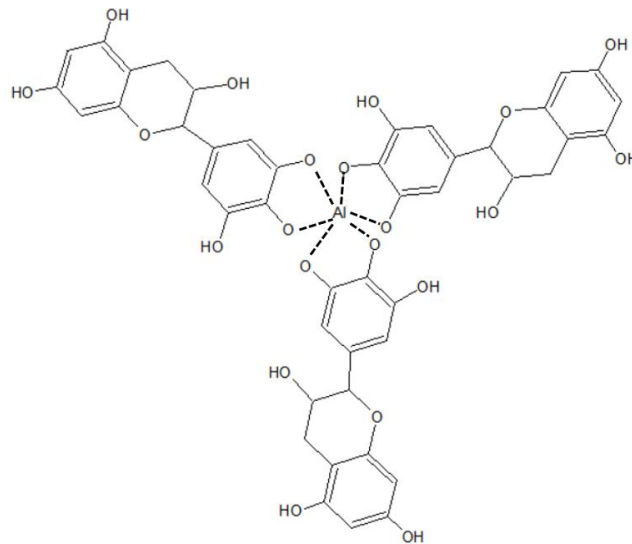


Figura 64: Estrutura proposta para o complexo alumínio-antocianina.

## Conclusão Geral

A partir dos resultados obtidos para o estudo do extrato de hortênsia e berinjela, foi possível observar um comportamento espectral parecido para os extratos, com comprimento de onda de máxima absorbância em 524 nm na região do visível. Mesmo assim, não é possível confirmar que a antocianina da hortênsia seja a mesma presente na casca de berinjela.

Além disso, comparando os espectros dos complexos alumínio-antocianina formados, tanto para o extrato de hortênsia quanto para o extrato de berinjela, foi observado um comportamento espectral parecido, com comprimentos de onda de máxima absorbância muito próximos. Ao sobrepor os espectros dos complexos formados para os dois extratos com o da sépala *in natura* de coloração azul, foi possível ver a semelhança no comportamento espectral, confirmando a participação do alumínio para a formação da cor azul.

A partir dos estudos realizados para o extrato das sépalas de hortênsia e da casca de berinjela, foi possível observar o comportamento espectroquímico das antocianinas presentes nesses dois extratos em diferentes condições experimentais e comparar os resultados observados para ambos os estudos.

## Perspectivas Futuras

Estudar de forma mais aprofundada o complexo ferro (II) - antocianina e ferro (III)-antocianina tanto para o extrato de hortênsia quanto para o extrato de berinjela, buscando compará-los.

Elucidar a estrutura da principal antocianina presente nas sépalas de hortênsia e na casca de berinjela por meio de técnicas de separação e caracterização como a cromatografia líquida de alta eficiência hifenada com a espectrometria de massas ou espectrometria de absorção molecular UV-vis, a fim de comprovar se a antocianina presente nessas duas matrizes é realmente a mesma. Além disso, é necessário encontrar a melhor forma de purificação do extrato de hortênsia e berinjela a fim de obter um extrato mais puro para estudos posteriores, impedindo a interferência de outras substâncias como açúcares, proteínas e outros tipos de flavonóides.

Explicar as diferentes colorações adquiridas pelas sépalas de hortênsia, buscando reproduzir a coloração azul em diferentes condições experimentais tanto com o extrato puro quanto com o extrato bruto, na presença somente d alumínio, na presença de alumínio e diferentes copigmentos como derivados do ácido cumárico e do ácido caféico, na presença de ferro (II) e ferro (III) sozinhos e com os copigmentos utilizados no estudo do alumínio, a fim de verificar se o ferro também influencia na formação da coloração azul de sépalas de hortênsia. A partir daí, comparar os espectros obtidos com o espectro da sépala *in natura* de coloração azul.

Por fim, estudar a estabilidade dos extratos de forma mais aprofundada, submetendo-os a diferentes condições experimentais, como na ausência de luz e na presença de luz, em diferentes valores de temperatura e na presença de oxigênio e nitrogênio (atmosfera inerte), para ver qual desses fatores influencia de forma direta a estabilidade das antocianinas.

## Apêndice 1

Com os valores de concentração encontrados, foi possível estimar uma concentração média de cada uma das triplicatas para o ferro e para o alumínio, encontrando uma massa de cada um desses metais para cada triplicata na solução final descrita no diagrama esquemático (Figura 14) como etapa 5, conforme mostrado no tópico 2.8 do Capítulo 2. A partir daí, calculou-se a concentração de cada uma das triplicatas na amostrado liofilizada (etapa 1) seguindo os cálculos demonstrados a seguir,

$$c_5(\text{metal}) = \frac{m_5(\text{metal})}{V_5} \rightarrow m_5(\text{metal}) = c_5(\text{metal}) \cdot V_5$$

$$m_5(\text{metal}) = m_4(\text{metal}) = m_1(\text{metal})$$

$$c_1(\text{metal}) = c_{\text{amostra}}(\text{metal}) = \frac{m_1(\text{metal})}{m_{\text{amostra}}} \cdot 100\%$$

A partir desses cálculos, encontrou-se a concentração de ferro e alumínio para cada uma das triplicatas, obtendo ao final do processo, uma média dessas concentrações.

## Apêndice 2

Para o estudo do extrato de berinjela em diferentes valores de pH, foi testado o efeito de diferentes tampões em pH 3, 6 e 9 sobre o extrato, e os resultados obtidos foram comparados com espectros do extrato nos mesmos valores de pH, mas ajustados com soluções de NaOH e HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 65.

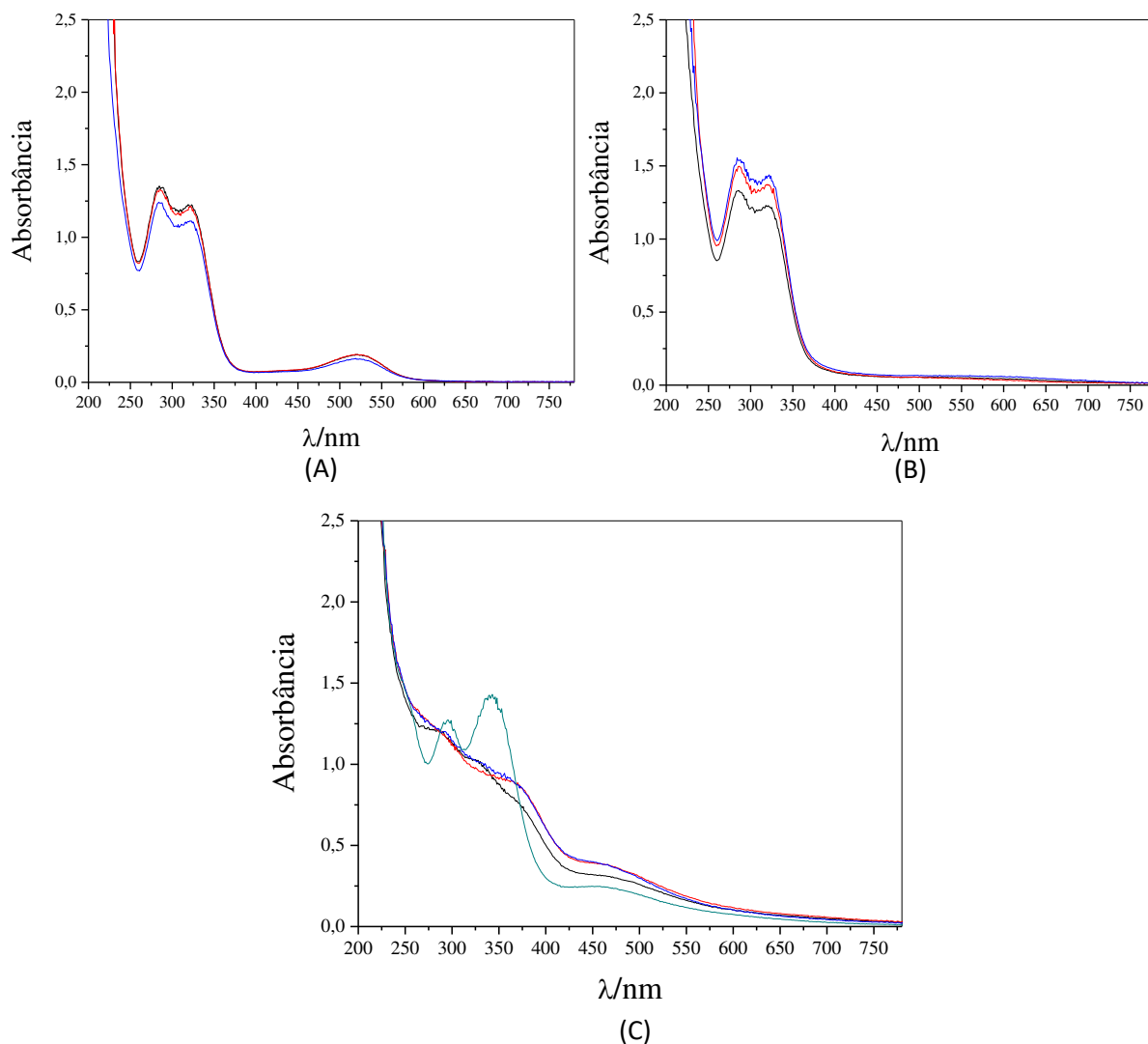


Figura 65: Espectros do estudo da influência do tampão sobre o extrato de berinjela em pH 3, 6 e 9, comparados com o extrato ajustado com soluções de NaOH e HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>. (A) Espectros do extrato em pH 3 ajustado com (—) tampão acetato; (—) tampão citrato; (—) solução de NaOH. (B) Espectro do extrato em pH 6 ajustado com (—) tampão citrato; (—) tampão fosfato; (—) solução de NaOH. (C) Espectros do extrato em pH 9 ajustado (—) tampão carbonato; (—) tampão amônio; (—) tampão borato; (—) solução de NaOH.

A partir dos espectros observados na Figura 65, pode-se afirmar que o único tampão em estudo que afetou o comportamento espectral do extrato, ou seja, que apresentou um comportamento diferente quando comparado com o espectro ajustado com solução de NaOH foi o tampão borato em pH 9, sendo que os outros tampões apresentaram comportamento espectral semelhante ao do extrato ajustado com NaOH, podendo ser usados no estudo do extrato em diferentes valores de pH.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, R. C. Influence of aluminum on the flower color of *Hydrangea macrophylla*. **Boyce Thompson Institute** **13**, p. 221-242, 1943.
- ASKAR, K. A.; ALSAWAD, Z. H.; KHALAF, M. N. Evaluation of the pH and thermal stabilities of rosella anthocyanin extracts under solar light. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, Basrah, v. 4, p. 262-268, set. 2015.
- BARBOSA, L. C. D. A. **Espectroscopia no infravermelho na caracterização de comportos orgânicos**. 1. ed. Viçosa: UFV, 2013. 189 p.
- BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. A. **Introdução à química de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Varela, 1992. 234 p.
- BOSQUE-SENDRA, J. M.; ALMANSA-LÓPEZ, E.; GARCÍA-CAMPAÑA, A. M. Data Analysis in the determination of stoichiometries and stability constants of complexes. **Analytical Sciences**, v. 19, p. 1431-1439, out. 2003.
- BUCKOW, R.; KASTELL, A.; TEREFE, N. S.; VERSTEEG, C. Pressure and Temperature Effects on Degradation Kinetics and Storage Stability of Total Anthocyanins in Blueberry Juice. **Journal of Agricultural and food Chemistry**, v. 58, p. 10076–10084, ago. 2010.
- CAPELLO, C.; LEANDRO, G. C.; CAMPOS, C. E. M.; HOTZA, D.; CARCIOFE, B. A. M.; VALENCIA, G. A. Adsorption and desorption of eggplant peel anthocyanins on a synthetic. **Journal of Food Engineering**, v. 262, p. 162-169, jun. 2019.
- CARVALHO, T. Espectro Eletromagnético. Disponível em: < <http://www.infoescola.com/fisica/espectro-eletromagnetico/>>. Acesso: 3 Jan, 2020.
- CHATHAM, L. A.; HOWARD, J. E.; JUVIK, J. A. A natural colorant system from corn: Flavone-anthocyanin copigmentation for altered hues and improved shelf life. **Food Chemistry**, v. 310, abr. 2020. Disponível on-line. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125734>.
- CHERENERY, E. M. The problem of the blue hydrangea. **J. R. Hort. Soc**, p. 604-620, 1937.
- CONSTANT, P. B. L.; STRINGHETA, P. C.; SANDI, D. Corantes Alimentícios, v. 20, p. 2003-2020, JUL/DEZ 2002.

- CONWAY, B. R.; CHATTERJEE, S.; FIELD, G. D.; HORWITZ, G. D.; JOHNSON, E. N.; KOIDA, K.; MANCUSO, K. Advances in Color Science: From Retina to Behavior. **The Journal of Neuroscience**, nov. 2010. 14955–14963.
- COSTA, C. T. D.; HORTON, D.; MARGOLIS, S. A. Analysis of anthocyanins in foods by liquid chromatography, liquid chromatography–mass spectrometry and capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 881, p. 403-410, jun. 2000.
- DELGADO-VARGAS, F.; JIMÉNEZ, A. R.; PAREDES-LÓPEZ, O. Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains — Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, n. 3, p. 173–289, ago. 2000.
- DOWNHAM, A.; COLLINS, P. Colouring our foods in the last and next millennium. **International Journal of Food Science and Technology**, 2000. 5-22.
- DURÁN-ESPINOSA, C. Hydrangeaceae. **Flora de Veracruz**, p. 1-22, abr. 1999.
- DARAVINGAS, G.; CAIN, R. F. Thermal degradation of black raspberry anthocyanin pigments in model system. **Jornal of food science**, v. 33, p. 138-142, 1968.
- DYRBY, M.; WESTERGAARD, N.; STAPELFELDT, H. Light and heat sensitivity of red cabbage extract in soft drink. **Food Chemistry**, v. 72, p. 431-437, 2001.
- ESCRIBANO-BAILÓN, M. T.; SANTOS-BUELGA, C.; RIVAS-GONZALO, J. C. Anthocyanins in cereals. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, p. 129-141, out. 2004.
- FEBRIANTO, J.; KOSASIH, A. N.; SUNARSO, J.; JU, Y.; INDRASWATI, N.; ISMADJI, S. Equilibrium and kinetic studies in adsorption of heavy metals using biosorbent: A summary of recent studies. **Journal of Hazardous Materials**, v. 162, p. 616-645, 2009.
- FERARSA, S.; ZHANG, W.; MOULAI-MOSTEFA, N.; DING, L.; JAFFRIN, M. Y.; GRIMI, N. Recovery of anthocyanins and other phenolic compounds from purple eggplant peels and pulps using ultrasonic-assisted extraction. **Food and Bioproducts Processing**, v. 109, p. 19-28, set. 2018.
- FULEKI, T.; FRANCIS, F. J. Quantitative Methods for Anthocyanins. 1. Extraction and Determination of Total Anthocyanin in Cranberries. **Journal of food science**, v. 33, p. 72-77, nov. 1968.
- GUARATINI, C. C. I.; ZANONI, M. V. B. Corantes Têxteis. **Química Nova**, mar. 2000. 71-78.

HARBONE, J. B. Spectral Methods of Characterizing Anthocyanins. **Biochem. J**, v. 70, p. 22-28, ago. 1958.

HARBORNE, J. B. **The flavonoids: advances in research since 1980**. Springer-Science+Business Media, B.V., 1982. 208 p.

HEINONEN, J.; VUORINEN, A.; YANG, B.; KALLIO, H.; FARAHMANDAZAD, H.; SAINIO, T. Extraction and purification of anthocyanins from purple-fleshed potato. **Food and Bioproducts Processing**, v. 99, p. 136-146, maio 2016.

HELENE, O.; HELENE, A. F. Alguns aspectos da óptica do olho humano. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 33, p. 1-7, out. 2011.

HO, Y. S.; MCKAY, G. A kinetic study of dye sorption by biosorbent waste product pith. **Conservation and Recycling**, n. 25, p. 171-193, 1999.

ICHYANAGI, T; KASHIWADA, Y.; SHIDA, Y.; IKESHIRO, Y.; KANEYUKI, T.; KONISHI, T. Nasunin from Eggplant Consists of Cis–Trans Isomers of Delphinidin 3-[4-(p-Coumaroyl)-L-rhamnosyl (1-6)glucopyranoside]-5-glucopyranoside. **Journal of Agricultural and food chemistry**, v. 53, p. 9472–9477, 2005.

IKAN, R. **Natural Products - A laboratory guide**. 2ª. ed. London: Academic Press, 1991. 262 p.

JAUMOT, J.; JUAN, A. D.; TAULER, R. MCR-ALS GUI 2.0: New features and applications. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 140, p. 1-14, jan. 2015.

JOB, P. Formation and Stability of Inorganic Complexes in Solution. **Annali Di Chimica**, v. 9, p. 113-203, 1928.

KAMMERER, D. R. Anthocyanins. In: KAMMERER, D. R. **Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages**. [S.l.]: Woodhead Publishing, 2016. Cap. 3, p. 538.

KONDO, T.; TOYAMA-KATOB, Y.; YOSHIDAB, K. Essential structure of co-pigment for blue sepal-color development of hydrangea. **Tetrahedron Letters**, v. 46, p. 6645–6649, jul. 2005.

KUBELKA, P. New Contributions to the Optics of Intensely Light-Scattering Materials. Part I. **Journal of the optical society of America**, v. 38, p. 448-457, maio 1948.

LAU, K.; MCLEAN, W. G.; WILLIAMS, D. P.; HOWARD, V. Synergistic interactions between commonly used food additives in a developmental neurotoxicity test. **Toxicological Sciences**, v. 90, p. 178–187, jul. 2006.

LAWRENCE, W. J. C.; PRICE, J. R.; ROBINSON, G. M.; ROBINSON, R. CCXV. A Survey of Anthocyanins. V. **Biochem**, p. 1661-1667, jul. 1938.

LOPES, T. J.; XAVIER, M. F.; QUADRI, M. G. N.; QUADRI, M. B. Antocianinas: Uma breve revisão das características estruturais e da estabilidade. **Revista Brasileira Agronegócio**, v. 13, p. 291-297, mar, 2007.

MA, J. F.; RYAN, P. R.; DELHAIZE, E. Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. **TRENDS in Plant Science**, v. 6, p. 273-278, jul. 2001. ISSN 6.

MARÇO, P. H.; POPPI, R. J.; SCARMINIO, I. S.; TAULER, R. Investigation of the pH effect and UV radiation on kinetic degradation of anthocyanin mixtures extracted from *Hibiscus acetosella*. **Food Chemistry**, v. 125, p. 1020-1027, mar. 2011.

MARÇO, P. H.; VALDERRAMA, P.; ALEXANDRINO, G. L.; POPPI, R. J.; TAULER, R. Resolução multivariada de curvas com mínimos quadrados alternantes: Descrição, Funcionamento e aplicações. **Química Nova**, v. 37, p. 1525-1532, jul. 2014.

MARÇO, P. H.; POPPI, R. J. Procedimentos Analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Química Nova**, Campinas, v. 31, n. 5, p. 1218-1223, julho 2008.

MARMITT, S.; PIROTTA, L. V.; STÜLP, S. Aplicação de fotólise direta e UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a efluente sintético contendo diferentes corantes alimentícios. **Química Nova**, v. 33, p. 384-388, jan. 2010.

MARTINS, G. B. C.; SUCUPIRA, R. R.; SUAREZ, P. A. Z. A Química e as cores. **Revista Virtual de Química**, Brasília, v. 7, n. 4, p. 1508-1534, julho 2015.

MAZZA, G.; BROUILLARD, R. Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products. **Food Chemistry**, v. 25, p. 207-225, setembro 1987.

MEBANE, R. C.; RYBOLT, T. R. Edible Acid-Base Indicators. **Journal of Chemical Education**, v. 62, p. 285, 1985.

MEHRI, A. Non-extensive distribution of human eye photoreceptors. **Journal of Theoretical Biology**, v. 419, p. 305-309, abr. 2017.

MOLNÁR-PERL; ZS.FÜZFAI. Chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrochromatographic techniques in the analysis of flavonoids. **Journal of Chromatography A**, v. 1073, p. 201-227, dez. 2005.

MUSTAFI, D.; ENGEL, A. H.; PALCZEWSKI, K. Structure of cone photoreceptors. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 28, p. 289-302, jul. 2009.

NAKAGAWA, K.; MAEDA, H. EPR imaging and HPLC characterization of the pigment-based organic free radical in black soybean seeds. **Free Radical Research**, v. 51(2), p. 187-192, jun. 2017.

NICHOLS, C. *Hydrangea macrophylla*. Disponível em: < [https://www.flickr.com/photos/clivenichols\\_4316497164/in/photostream/](https://www.flickr.com/photos/clivenichols_4316497164/in/photostream/)>. Acesso em: jan, 2020.

NIÑO-MEDINA, G.; URÍAS-ORONA, V.; MUY-RANGEL, M. D.; HEREDIA, J. B. Structure and content of phenolics in eggplant (*Solanum melongena*) - a review. **South African Journal of Botany**, v. 111, p. 161-169, mar. 2017.

OZKAN, M. Degradation of anthocyanins in sour cherry and pomegranate juices by hydrogen peroxide in the presence of added ascorbic acid. **Food Chemistry**, v. 78, p. 499-504, fev. 2002.

PAULA, C. E. R. D.; ALMEIDA, V. G. K.; CASSELLA, R. J. Determinação Espectrofotométrica de cefalexina em formulações farmacêutica explorando a sua reação de transferência de carga com a quinalizarina. **Química Nova**, v. 33, p. 914-919, mar. 2010.

PAVIA, D. M.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**. 4. ed. Estados Unidos: Cengage Learning, 2010. 700 p.

PAZMIÑO-DURÁN, E. A.; GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E.; GLÓRIA, M. B. A. Anthocyanins from *Oxalis triangularis* as potential food colorants. **Food Chemistry**, Belo Horizonte, v. 75, p. 211-216, abril 2001.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 5ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 830 p.

SADILOVA, E.; STINTZING, F. C.; CARLE, R. Anthocyanins, Colour and Antioxidant Properties of Eggplant (*Solanum melongena* L.) and Violet Pepper (*Capsicum annum* L.) Peel Extracts. **Z. Naturforsch.**, v. 66, p.527-535, mar. 2006.

SADILOVA, E. STINTZING, F. C.; KAMMERER, D. R.; CARLE, R. Matrix dependent impact of sugar and ascorbic acid addition on color and anthocyanin stability of black carrot, elderberry and strawberry single strength and from concentrate juices upon thermal treatment. **Food Research International**, v. 42, p. 1023–1033, abr. 2009.

SAKAMURA, S.; WATANABE, S.; OBATA, Y. The Structure of the Major Anthocyanin in Eggplant. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 27, p. 663-665, 1963.

SALAS, E.; DUEÑAS, M.; SCHWARZ, M.; WINTERHALTER, P.; CHEYNIER, V.; FULCRAND, H. Characterization of Pigments from Different High Speed Countercurrent Chromatography Wine Fractions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4536-4346, abr. 2005.

SANTOS, V. S. D. **Mundo Educação**. Disponível em: < <https://mundoeducacao.bol.uol.com.br/biologia/celula-vegetal.htm>>. Acesso em: 21 jan. 2020.

SCHREIBER, H. D.; JONES, A. H.; LARIVIERE, C. M.; MAYHEW, K. M.; CAIN, J. B. Role of aluminum in red-to-blue color changes in *Hydrangea macrophylla* sepals. **Biometals**, v. 24, p. 1005-1015, maio 2011.

SCHREIBER, H. D.; SWINK, A. M.; GODSEY, T. D. The chemical mechanism for  $Al^{3+}$  complexing with delphinidin: A model for the bluing of hydrangea sepals. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 10, p. 732–739, mar. 2010.

SHITAN, N.; YAZAKI, K. Dynamism of vacuoles toward survival strategy in plants. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, nov. 2019.

SOUZA, T. S.; ZANIN, H. G.; PETERLEVITZ, A.; BARANAUSKAS, V.; SILVA, G. A.; REIS, C.; REIS, E. L.; TEÓFILO, R. F. MCR-ALS aplicado no monitoramento quantitativo do processo de eletrodegradação da Atrazina usando espectros UV: Resultados comparativos com HPLC-DAD como um método de referência. **Química Nova**, v. 39, p. 137-145, jan. 2016.

STRACK, D.; WRAY, V. Anthocyanins. In: STRACK, D.; WRAY, V. **Methods in plant biochemistry**. J.B. Harbone, v. 1, 1989. Cap. 9, p. 325-355.

STRINGHETA, C. P. **Identificação da estrutura e estudo da estabilidade das antocininas extraídas da inflorescência do capim gordura (*Melinis minutiflora*, Pal de Beauv.)**. UNICAMP. campinas, p. 138. 1991.

TAKEDA, K.; YAMASHITA, T.; TAKAHASHI, A.; TIMBERLAKE, C. F. Stable Blue complexes of anthocyanin-aluminium-3-p-coumaroyl - or 3-caffeoyl-Quinic Acid involved in the blueing of hydrangea flower. **Phytochemistry**, v. 29, p. 1089-1091, jul. 1990.

TAKEDA, K.; KARIUDA, M.; ITOI, H. Blueing of sepal colour of Hydrangea Macrophylla. **Phytochemistry**, v. 24, p. 2251-2254, jan. 1985.

TAKEDA, K.; KUBOTA, R.; YAGIOKA, C. Copigments in the blueing of sepal colour of Hydrangea Macrophylla. **Phytochemistry**, v. 24, n. 6, p. 1207-1209, 1985.

TERCI, D. B. L.; ROSSI, A. V. Indicadores naturais de pH: Usar papel ou solução? **Química Nova**, v. 25, p. 684-688, dez. 2002.

TODARO, A.; CIMINO, F.; RAPISARDA, P.; CATALANO, A. E.; BARBAGALLO, R. N.; SPAGNA, G. Recovery of anthocyanins from eggplant peel. **Food Chemistry**, v. 114, p. 434-439, set. 2009.

TOYAMA-KATO, Y.; YOSHIDA, K.; FUJIMORI, E.; HARAGUCHI, H.; SHIMIZU, H.; KONDO, T. Analysis of metal elements of hydrangea sepals at various. **Biochemical Engineering Journal**, v. 14, p. 237-241, out. 2003.

WANG, C. . Adsorption behavior of lead on aquatic sediments contaminated with cerium dioxide nanoparticles. **Environmental Pollution**, v. 219, p. 416-424, 2016.

WU, X.; PRIOR, R. L. Identification and Characterization of Anthocyanins by High-Performance Liquid Chromatography–Electrospray Ionization–Tandem Mass Spectrometry in Common Foods in the United States: Vegetables, Nuts, and Grains. **Journal of Agricultural and food chemistry**, v. 53, p. 3101–3113, 2005.

X-RITE. The Color Guide and Glossary. Disponível em: <[http://www.xrite.com/documents/literature/en/L11\\_029\\_color\\_guide\\_en.pdf](http://www.xrite.com/documents/literature/en/L11_029_color_guide_en.pdf)> Grandville, p. 48, 2004. Acesso em: 2 jan. 2020.

YONG, H.; WANG, X.; ZHANG, X.; LIU, Y.; QIN, Y.; LIU, J. Effects of anthocyanin-rich purple and black eggplant extracts on the physical, antioxidant and pH-sensitive properties of chitosan film. **Food Hydrocolloids**, v. 104, p. 93-104, 2019.

YOSHIDA, K.; TOYAMA-KATO, Y.; KAMEDA, K.; KONDO, T. Sepal Color Variation of Hydrangea macrophylla and Vacuolar pH Measured with a Proton-Selective Microelectrode. **Plant Cell Physiol**, v. 44, p. 262–268, dez. 2003.

YOSHIDA, K.; MORI, M.; KONDO, T. Blue flower color development by anthocyanins: from chemical. **Natural Product Reports**, v. 26, n. 7, p. 857-964, jul. 2009.

YU, J. et al. Transcriptome analysis of calcium-induced accumulation of anthocyanins in grape skin. **Scientia Horticulturae**, v. 260, jan. 2020. Disponível on-line. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108871>