

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

IDENTIFICAÇÃO DA ESTRUTURA E ESTUDO DA ESTABILIDADE DAS
ANTOCIANINAS EXTRAÍDAS DA INFLORESCÊNCIA DE CAPIM
GORDURA (Melinis minutiflora, Pal de Beauv)

Paulo Cesar Stringheta
Engenheiro Agrônomo

Orientador:
Prof. Dr. Paulo A. Bobbio

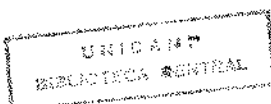
Tese Apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos
da Universidade Estadual de Campinas para Obtenção do
Título de Doutor em Ciência de Alimentos.

Parecer

Este exemplar corresponde a redação final
da tese defendida por Paulo Cesar
Stringheta e aprovada pela comissão
Julgadora em 12/07-91.

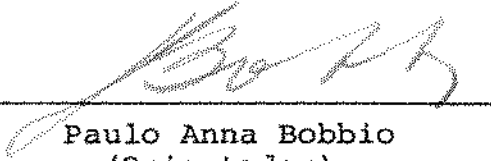
1991

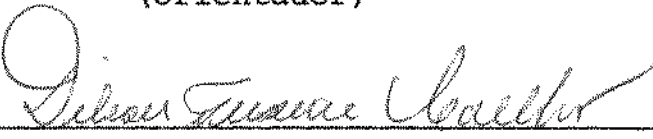
Campinas, 12 de julho de 1991.

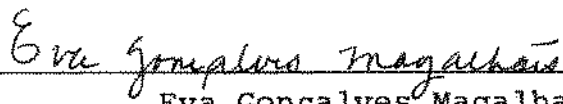


Stringheta

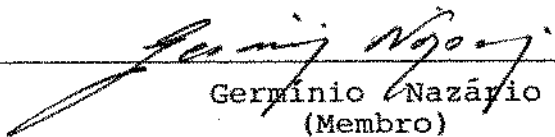
BANCA EXAMINADORA


Paulo Anna Bobbio
(Orientador)

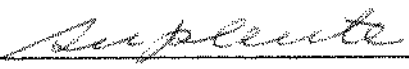

Dilson Teixeira Coelho
(Membro)


Eva Gonçalves Magalhães
(Membro)


Olavo Rusio
(Membro)


Germinio Nazário
(Membro)


Florinda Orsatti Bobbio
(Membro)


Delia Rodriguez Amaya
(Membro)

Campinas, 12 de julho

de 1991

A Angela Cristina,
ao João Pedro,
ao Bruno.

AGRADECIMENTOS

Ao orientador Prof. Dr. Paulo A. Bobbio, pela participação diária na execução deste trabalho, pelos ensinamentos técnico-científicos e pelo exemplo de dignidade.

A Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP.

A Prof^a. Dr^a Florinda O. Bobbio, pela ativa participação neste trabalho.

A prof^a. Dr^a. Délia Amaya pelo incentivo.

Aos Professores Bento, Carlos Grosso e a Engenheira Marília Nutti, pelo convívio.

Ao João Tosello pelo auxílio e pela amizade.

Ao Hélio Pinheiro e à Sueli Maria pelo convívio e pela hospitalidade.

A Telma e a Cristiane da secretaria da pós-graduação da FEA pelos oportunos esclarecimentos.

Aos funcionários da Biblioteca da FEA e da secretaria do DCA pelo auxílio.

A ABIA (Associação Brasileira das Indústrias de Alimentos) pelo patrocínio de cópias.

A UFV, pela oportunidade.

A CAPES/PICD, pela bolsa de estudo.

ÍNDICE

	Página
RESUMO	i
SUMMARY	iv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Estabilidade das Antocianinas	3
2.1.1. Efeito da Estrutura Química	3
2.1.2. Efeito do pH	11
2.1.3. Efeito da Copigmentação	18
2.1.4. Efeito de Ions Metálicos	27
2.1.5. Efeito do SO ₂	29
2.1.6. Efeito do Oxigênio	30
2.1.7. Efeito da Temperatura	32
3. MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1. Preparação do Extrato de Antocianinas	37
3.2. Purificação do Extrato	38
3.3. Purificação das Frações	38

3.4. Hidrólise Ácida da Zona A Purificada	39
3.4.1. Identificação dos Açúcares	39
3.4.2. Identificação das Antocianidinas	40
3.5. Hidrólise Alcalina da Zona A Purificada	40
3.5.1. Identificação dos Ácidos	40
3.6. Hidrólise Controlada	41
3.7. Separação das Antocianinas e dos Flavonóides Não Antociânicos por HPLC	41
3.8. Reações Específicas de Antocianinas	42
3.9. Estabilidade Comparativa Entre as Frações de Antocianinas	42
3.9.1. Estabilidade das Frações F1 e F2 Obtidas em 3.2.	42
3.9.2. Estabilidade das Zonas A e B, Obtidas em 3.3.	44
3.9.3. Estabilidade do Extrato	44
3.10. Efeito da Adição de Solução Alcoolica de Rutina Sobre as Antocianinas	44
3.11. Efeito da Adição de Solução Alcalina de Rutina Sobre as Antocianinas	45
3.12. Efeito da Adição do Ácido Tânico à Solução de Antocianinas a pH 3,5	45
3.13. Efeito do Ácido Tânico em Soluções de Antocianinas a pH 2,0, 3,0 e 4,0	46
3.14. Efeito do Ácido Tânico Sobre Diferentes Concentrações de Antocianinas a pH 2,0, 3,0 e 4,0	47
3.15. Estabilidade das Antocianinas	50
3.15.1. Efeito da Luz Sobre as Antocianinas a pH 2,0	50
3.15.2. Efeito da Luz Sobre as Antocianinas a pH 3,0	51

3.15.3. Efeito da Luz Sobre as Antocianinas a pH 4,0	52
3.16. Efeito da Luz e do Oxigênio Sobre as Antocianinas a pH 2,0, 3,0 e 4,0	52
3.17. Efeito da Temperatura Sobre as Antocianinas ..	53
3.18. Efeito do Fe^{+++} ($FeCl_3$)	54
3.19. Efeito do Cu^{++} ($CuCl_2$)	57
3.20. Efeito do HSO_3^-	58
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4.1. Purificação do Extrato de Antocianinas	59
4.2. Identificação da Estrutura da Zona A	68
4.3. Estabilidade das Antocianinas	73
4.3.1. Efeito da Luz na Estabilidade do Extrato, das Frações F1 e F2 e das Zonas A e B	74
4.3.2. Efeito da Rutina Sobre as Antocianinas ..	80
4.3.3. Efeito do Ácido Tânico Sobre as Antocianinas	84
4.3.4. Determinação da Concentração do Ácido Tânico	87
4.3.5. Efeito de Diferentes Concentrações de Antocianinas Sobre as Características do Espectro	90
4.3.6. Efeito da Luz e do Oxigênio Sobre a Estabilidade das Antocianinas Copigmentadas a pH 2,0, 3,0 e 4,0	96
4.3.7. Efeito da Temperatura Sobre a Estabilidade das Antocianinas e do Complexo Antocianina-Ácido Tânico (AT-ACY), a pH 2,0, 3,0 e 4,0	105
4.3.8. Efeito de Ions Metálicos e do SO_2 , Sobre a Estabilidade das Antocianinas e do Complexo Antocianina-Ácido Tânico (AT-ACY)	113

4.3.8.1. Efeito do Fe^{+++}	115
4.3.8.2. Efeito do Cu^{++}	120
4.3.8.3. Efeito do SO_2	124
5. CONCLUSÕES	128
6. LITERATURA CITADA	131

RESUMO

O extrato metanólico da inflorescência do capim gordura (Melinis minutiflora) foi fracionado cromatograficamente e foi determinada a composição de uma de suas frações. A estabilidade desta e de outras frações antociânicas, incluindo o extrato parcialmente purificado, foi estudada, em função dos efeitos degradativos da luz, pH, oxigênio, temperatura, íons metálicos, SO_2 , atuando isoladamente ou pela combinação de alguns destes fatores.

A partir do extrato bruto parcialmente purificado, procurou-se estabelecer as condições para produzir no extrato uma melhoria na estabilidade frente aos fatores que determinam a perda de cor das antocianinas.

Para a identificação da estrutura da antocianina presente no extrato, em maior proporção, utilizaram-se técnicas cromatográficas, características espectrais e reações químicas específicas. Para o estudo da estabilidade das antocianinas foram feitas medidas de absorbância das soluções no comprimento de onda de máxima absorção e a determinação dos

valores de k e $t_{1/2}$, além do estudo do comportamento espectral das soluções de antocianinas na região do espectro visível.

A utilização da cromatografia em coluna de PVP associada à cromatografia em papel com os solventes HCl e BAW, mostrou ser efetiva na separação das frações de antocianinas presentes no extrato metanólico da inflorescência do capim gordura.

A hidrólise ácida da fração antociânica presente em maior proporção no extrato, permitiu a identificação dos açúcares, glucose e arabinose, ligados na posição C-3 como parte da estrutura da antocianina desta fração.

Pela hidrólise alcalina, seguida de cromatografia em camada fina e HPLC, identificou-se o ácido cafeico como constituinte da antocianina da fração principal.

Por técnicas cromatográficas, reações específicas e características espectrais, identificou-se a cianidina como a aglicona da antocianina presente no extrato em maior proporção, definindo a estrutura da antocianina como sendo: a cianidina-3-cafeoil-glucosil-arabinose.

No estudo da estabilidade das frações de antocianinas e do extrato foi verificada a efetividade dos flavonóides não antociânicos, naturalmente presentes no extrato e nas frações parcialmente purificadas, no aumento da estabilidade frente a fatores degradativos como a luz e a variação de pH.

A adição do ácido tânico às antocianinas presentes no extrato, levou à formação de um complexo ácido tânico-antocianina elevando consideravelmente a estabilidade da cor da solução.

A estabilidade da cor do extrato de antocianinas foi mais afetada pela luz e pelas variações de pH, quando comparados a outros fatores de degradação.

SUMMARY

The pigments in the inflorescence of Mellinis minutiflora were exhaustively extracted with methanol acidified with hydrochloric acid.

Column and paper chromatography of the extract revealed its complexity since several zones containing anthocyanins and yellow flavonols could be detected visually.

The two major red zones were separated and purified. Using adapted published techniques the anthocyanin from the more intensely colored of the two zones was identified as cyanidin-3-caffeoyl-glucosyl-arabinoside. The anthocyanin from the second purified zone was partially identified as a non-acylated cyanidin.

The effect of light, pH, oxygen, temperature, metallic ions and sulfur dioxide on the color of the extract and of its purified fractions were studied by measuring the loss of absorbance with time and therefrom determining the values of the apparent first order reaction rate and the periods of half life for the anthocyanins in each system.

Tannic acid and rutin were tried as copigments for the formation of more stable products to light and pH. The conditions for copigmentation were established and rutin had to be eliminated for its very low water solubility at pH below 5.0.

The formation of stable complex between the pigments and tannic acid was responsible for the bathochromic shift registered when the pigments and the acid were mixed. The different chromatographic mobility of tannic acid, pure anthocyanin and copigmented anthocyanin was considered evidence of the formation of a stable complex between the anthocyanin and the copigment. Copigmentation between anthocyanins and the natural flavonols of the extract was observed.

Effective protection was conferred by the copigmentation with tannic acid as was shown by the values for apparent first order reaction rate and periods of half-life when compared with values from the non complexed anthocyanins.

1. INTRODUÇÃO

A coloração é um dos mais importantes atributos de qualidade em alimentos, influenciando seu valor estético e servindo de base para a identificação e a aceitação de uma grande variedade de produtos alimentícios. Gostar ou não de um determinado alimento está, muitas vezes, condicionado a sua coloração.

A introdução de alimentos processados na dieta humana trouxe a necessidade da adição de substâncias coloridas a esses alimentos com a finalidade de aproximar as características de cor dos alimentos processados às dos alimentos naturais. Este efeito foi conseguido com o uso de corantes sintéticos, hoje largamente utilizados pelas indústrias alimentícias.

Nos últimos anos, a inocuidade dos corantes sintéticos tem sido questionada, levando a proibição de alguns deles em função da descoberta de seus efeitos tóxicos ao homem. Devido a essa limitação e da tendência mundial do consumo de produtos chamados "naturais", o interesse pelos corantes naturais tem crescido substancialmente.

As antocianinas são pigmentos naturais bastante conhecidos pois determinam a coloração característica de uma grande variedade de vegetais, incluindo aqueles usados na alimentação humana. Estes pigmentos tem sido, portanto, consumidos pelo homem por incontáveis gerações sem causar aparentemente qualquer efeito sobre a saúde. Apesar disso, seu uso como aditivo natural está ainda bastante restrito em função de limitações, como a disponibilidade de matéria prima produtora de pigmentos na quantidade e na qualidade requerida, a dificuldade na sua purificação, o poder corante reduzido quando comparado aos produtos sintéticos e, principalmente, a baixa estabilidade apresentada pelas antocianinas.

O conhecimento da estrutura dos pigmentos, a influência de fatores como o pH, a temperatura, a presença de ácidos, de açúcares, íons metálicos e a presença de substâncias chamadas de copigmentos, assume importância fundamental no estudo da estabilidade das antocianinas, visando seu possível uso em alimentos.

As recentes descobertas de antocianinas aciladas presentes em alguns vegetais, que mantém a coloração estável numa faixa de pH entre 2,0 e 4,0, bem como a possibilidade de formação de complexos antocianinas-flavonóides não antociânicos, traz novas perspectivas para o uso desses corantes naturais nos alimentos processados.

A descoberta de novas e melhores fontes de antocianinas e a melhor compreensão de suas propriedades físico-químicas, poderá levar as antocianinas a um nível maior de aplicação como corantes naturais de produtos alimentícios.

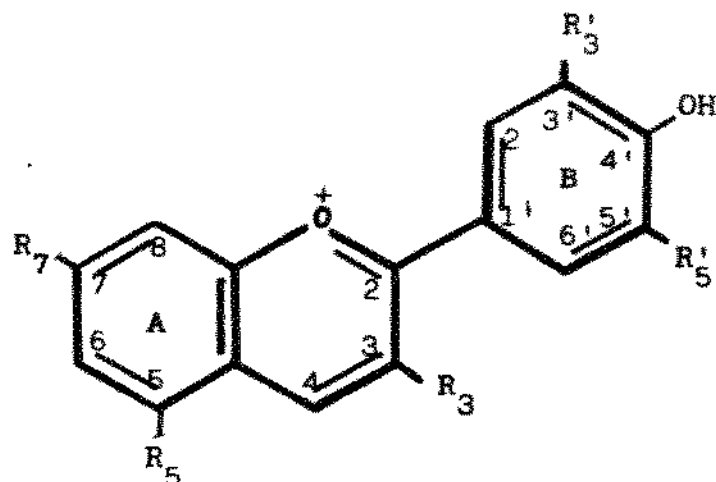
2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Estabilidade das Antocianinas

2.1.1. Efeito da Estrutura Química

As antocianinas estão incluídas no grupo de pigmentos de ocorrência natural, responsáveis pela coloração azul, vermelha, violeta e púrpura de muitas espécies do reino vegetal. As antocianinas, substâncias fenólicas, são glicosídeos de antocianidinas, polihidróxi derivados do íon flavilium (Figura 1). As antocianidinas (angliconas), são substâncias polihidroxiladas aparentemente ausentes nos tecidos de plantas (Jackman, 1987a).

As diferenças entre as várias antocianinas estão no número de grupos hidroxílicos na molécula, no grau de metilação destes grupos, na natureza e no número de açúcares ligados à molécula e na posição dessas ligações, bem como na natureza e no número de ácidos alifáticos e/ou aromáticos ligados ao açúcar na molécula de antocianina. As antocianidinas que ocorrem como agliconas nas antocianinas



Sal de Flavilium	Substituição (R)					
	3	5	6	7	3'	5'
Apigenidina (Ap)	H	OH	H	OH	H	H
Luteolinidina (Lt)	H	OH	H	OH	OH	H
Truitinidina (Tr)	OH	OH	H	OH	OH	OH
Pelargonidina (Pg)	OH	OH	H	OH	H	H
Cianidina (Cy)	OH	OH	H	OH	OH	H
Peonidina (Pn)	OH	OH	H	OH	OMe	H
Rosinidina (Rs)	OH	OH	H	OMe	OMe	H
Delfinidina (Dp)	OH	OH	H	OH	OH	H
Petunidina (Pt)	OH	OH	H	OH	OMe	OH
Pulchelinidina (Pl)	OH	OMe	H	OH	OH	H
Europinidina (Eu)	OH	OMe	H	OH	OMe	OH
Malvidina (Mv)	OH	OH	H	OH	OMe	OMe
Hirsutidina (Hs)	OH	OH	H	OMe	OMe	OMe
Capensinidina (Cp)	OH	OMe	H	OH	OMe	OMe

FIGURA 1 - Estruturas de Antocianinas de Ocorrência Natural.
(Adaptado de Timberlake, 1980 e Mazza & Brouillard, 1987).

naturais estão relacionadas na Figura 1 e, as que ocorrem com maior frequência são: pelargonidina, cianidina, peonidina, delphinidina, malvidina e petunidina (Timberlake & Bridle, 1975; Harborne, 1967).

Segundo Geissman, (1962) as antocianinas são caracterizadas estruturalmente por possuir um esqueleto de carbono $C_6-C_3-C_6$ e em função disto, podem estar associadas com compostos flavonóides não antociânicos. Por outro lado, Brouillard, (1982) e Griseback (1982), afirmam que apesar de possuir a mesma origem biossintética de outros flavonóides naturais, as antocianinas diferem destes por absorver fortemente na região visível do espectro.

A natureza dos açúcares, ácidos e número de grupos metoxila, tem pouco efeito nas reações que induzem modificações estruturais mas a presença e a posição de suas ligações na molécula pode influenciar profundamente as alterações estruturais (Timberlake, 1980). Segundo Asen (1976), estas modificações são geralmenete obscuras, muito embora sejam consideradas como as principais responsáveis pelas mudanças de coloração associadas às antocianinas.

As antocianinas podem ser glicosiladas por diferentes açúcares nas posições 3, 5 e 7 mas, sempre ocorre a glicosilação na posição C-3 (Harborne, 1958a). Glucose, arabinose, galactose e ramnose, são os açúcares mais comuns ligados às antocianidinas. Di e trissacarídeos, formados pela combinação destes quatro monosacarídeos, podem também glicosilar algumas antocianidinas (Harborne, 1967; Timberlake & Bribble, 1975). Em muitos casos, os açúcares são acilados

pelos ácidos p-cumárico, cafeico, ferúlico, sinápico e mais raramente por ácido malônico, acético e vanílico entre outros (Mazza & Brouillard, 1987).

As antocianidinas são instáveis e menos solúveis em solução aquosa que as antocianinas (Timberlake & Bridle, 1966), e a glicosilação aumenta a estabilidade e torna a molécula de pigmento solúvel em água (Harborne, 1979). A perda do açúcar ligado na posição C-3, é acompanhada de uma rápida decomposição da aglicona, com alteração irreversível na coloração da solução (Jurd, 1972a).

A glicosilação em C-5 também é frequentemente encontrada nas antocianinas (Brouillard, 1982). Cada substituição está associada a um deslocamento batocrômico tal que, a diferença no comprimento de onda de máxima absorção da antocianidina 3-glicosídeo em relação a antocianidina 3,5-diglicosídeo, tem sido utilizada como um meio de sua diferenciação por técnicas espectrais (Harborne, 1958b).

É frequente a glicosilação na posição 7 e raramente nas posições 3', 4' e/ou 5', pois, impedimentos estéricos geralmente dificultam a glicosilação nestas posições (Brouillard, 1982). O mesmo autor afirma que, nenhuma antocianina apresenta a glicosilação nos grupos hidroxílicos nas posições 5, 7 e 4' ao mesmo tempo, pois um dos grupos hidroxila deve permanecer livre em uma destas posições, já que é essencial para a formação de uma estrutura quinoidal, também chamada de anidrobases. A estrutura quinoidal (Figura 3) das antocianinas é responsável pela pigmentação de flores e de tecidos de frutas (Jurd & Asen 1966; Asen *et al* 1970, 1972,

1975, 1977; Scheffeldt & Hrazdina 1978; Williams & Hrazdina, 1979).

Os grupos metoxila e hidroxila, além da presença do açúcar e do ácido, tem um efeito importante na cor e na estabilidade das antocianinas (Tabela 1). A mesma antocianina poderá ter diferentes cores, dependendo de pH, da concentração da solução e da presença de copigmentos, entre outros fatores. Com o aumento do número de hidroxilas, a coloração das antocianinas muda de rosa para azul. A presença de grupo metoxila no lugar de hidroxila, reverte a tendência anterior (Mazza & Brouillard, 1987).

A diferença de cor entre as antocianinas que são vermelhas e as desoxiantocianidinas que são amarelas, está na presença do grupo hidroxila na posição C-3 das antocianinas. A mesma hidroxila desestabiliza a molécula, uma vez que, as 3-desoxiantocianidinas são mais estáveis que as antocianinas correspondentes (Sweeney & Iacobucci, 1983).

A presença de um grupo hidroxila em C-5 e a substituição em C-4, estabiliza a forma colorida, impedindo a hidratação em C-2, que levaria à formação de espécies não coloridas (Brouillard, 1982; Sweeney & Iacobucci, 1983). Antocianinas glicosiladas em C-3 a um dado pH, possuem coloração mais intensa que as antocianinas glicosiladas em 3 e 5 e glicosiladas em C-5. Comparando o comportamento do espectro, Harborne (1967) e Timberlake & Bridle, (1977), mostraram que 3,5 di e 5-glicosídeo tem somente cerca de 50% de absorção a 440 nm da antocianina 3-glicosídeo e de outras antocianinas livres.

A glicosilação também afeta a estabilidade do pigmento. Assim, por exemplo, o tempo de meia vida ($t_{1/2}$) de uma antocianina (cianidina-3-rutinosídeo) é em torno de 65 dias a temperatura ambiente, em solução 0,01M de ácido cítrico (pH 2,8). A correspondente antocianidina livre entretanto, tem meia vida de apenas 12 horas (Iacobucci & Sweeney, 1983). A pH 2,5 e 4,5, a estabilidade da peonidina e malvidina é significativamente menor que seu correspondente 3-glicosídeo (Ohta *et al.*, 1983). Os mesmos autores afirmam que a resistência à hidrólise ácida da ligação glicosídica em C-3 é supostamente responsável pela maior estabilidade destes pigmentos. A presença de uma hidroxila em C-4 ou em C-7 na molécula da antocianina, estabiliza significativamente o pigmento, enquanto a metilação destas hidroxilas (Tabela 1) reduz a sua estabilidade (Iacobucci & Sweeney, 1983).

TABELA 1 - Efeito da Estrutura na Estabilidade de Pigmentos a 25°C, em Ácido Cítrico 0,01 M, pH 2,8. (Adaptado de Iacobucci & Sweeny, 1983)

Compostos	λ máx. (nm)	$t_{1/2}$ (dias)
3-hidroxi-4'-5,5',7'-tetrametoxiflavilium	512	0,04
3,4',5,5',7 - pentahidroxiflavilium	512	0,5
3,4',5,5',7 - pentametoxiflavilium	512	6
3-rutinese-4',5,5',7-tetrametoxiflavilium	512	13
3-rutinese-4',5,5',7-tetrahidroxifavilium	512	65
4',5,5',7-tetrametoxiflavilium	488	170
4',5,7-trihidroxiflavilium	547	400
4',7-dihidroxiflavilium	458	400
4'-hidroxiflavilium	436	400
4'-metoxiflavilium	437	35
7-hidroxiflavilium	428	300
7-metoxidrofavilium	427	8

A estabilidade da estrutura, determinante na coloração das antocianinas, é influenciada pela presença de grupos acila ligados na posição C-3 dos açúcares (Harborne, 1964; Sommers, 1966a). Antocianinas com dois ou mais grupos acila, tem sido descobertas (Saito *et al.*, 1971; Asen *et al.*, 1972; Du & Francis, 1975 e Asen, 1976). Estes pigmentos exibem excelente estabilidade numa ampla faixa de pH. Um destes pigmentos acilados é a platiconina, isolada por Saito *et al.* (1971) de pétalas de Platycodon grandiflorum, cuja estrutura foi estabelecida por Goto, *et al.* (1983) como sendo 3-O-(6-O-(8-L-rhamnopiranosil)-β-D-glucopiranosil)-7-O(6-O(trans-4-O-(6-O-(trans-4-O-(β-D-glucopiranosil)-cafeoil)-β-D-glucopiranosil)-β-D-glucopiranosil) delfinidina (Figura 2).

Brouillard (1982), sugeriu a possibilidade de uma interação hidrofóbica entre o anel de pirilium e os radicais aromáticos dos grupos acila, o que protegeria o anel do ataque nucleofílico da água, aumentando a estabilidade destas antocianinas. Brouillard sugeriu também, que a presença de dois grupos acila localizados acima do anel de pirilium e abaixo dele, poderiam estabilizar a molécula dificultando sua hidratação. Por outro lado, as antocianinas monoaciladas não tem revelado estabilidade de cor acentuada, sugerindo que, a presença de dois grupos acila é necessária para uma boa retenção de cor em meio aquoso. A desacilação das antocianinas, resulta em uma imediata descoloração das mesmas após a solubilização em meio neutro ou fracamente ácido (Yoshitama, 1978). Yoshitama & Hayashi, (1974), afirmam que em soluções aquosas neutras, as antocianinas aciladas por ácido

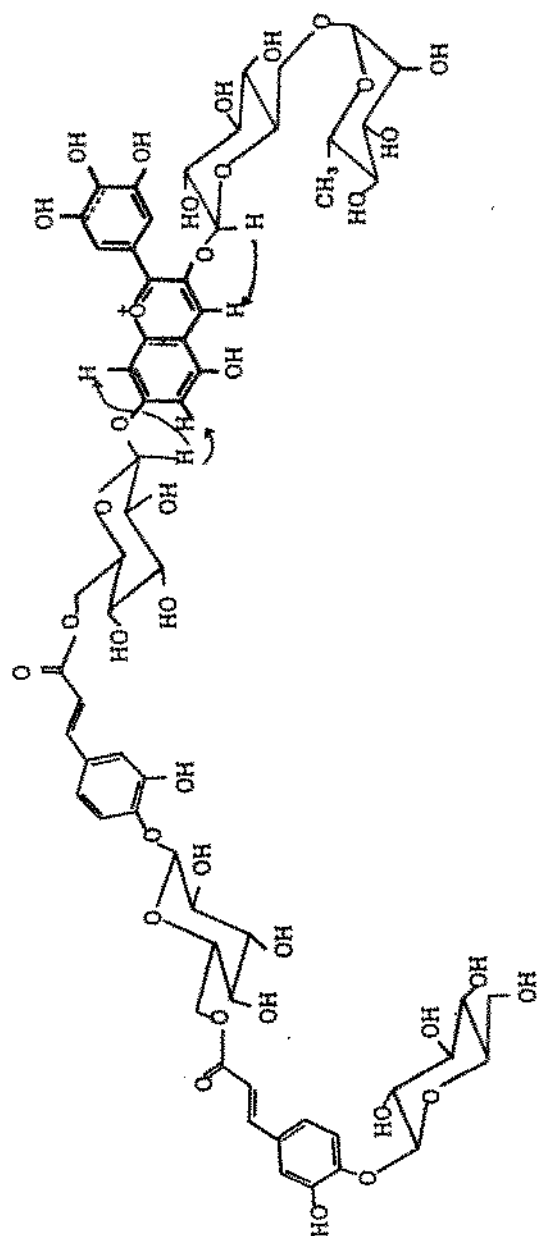


FIGURA 2 - Estereoestrutura da Platiconina Determinada por Espectroscopia $^1\text{H-NMR}$ (Goto et al., 1980).

p-cumárico são menos estáveis que aquelas aciladas por ácido cafeico, admitindo que os grupos hidroxila vicinais do ácido cafeico podem ser importantes na estabilidade das antocianinas, especialmente em pH acima de 3,0.

A formação de pontes de hidrogênio, a insaturação adicional na posição C-2 e C-3 da estrutura do complexo formado, a força eletrostática e o efeito estérico, podem estar relacionados com os mecanismos de associação que induzem a uma maior estabilidade, as antocianinas aciladas (Scheffeldt & Hrazdina, 1978; Hrazdina, 1974; Williams & Hrazdina, 1979).

2.1.2. Efeito do pH

Soluções de antocianinas apresentam uma coloração vermelha mais intensa quando em pH abaixo de 3,0. Quando o pH é aumentado para a faixa de 4,0 a 5,0, a coloração vermelha tende a desaparecer. Aumentos adicionais de pH levam as antocianinas a apresentarem uma coloração azulada e estas, após estocagem ou aquecimento, tornam-se amareladas (Mazza & Brouillard, 1987).

Em uma solução aquosa ácida, podem existir quatro formas estruturais de antocianinas em equilíbrio entre si: a base quinoidal A, o cation flavilium AH^+ , a pseudobase ou carbinol B e a chalcona C (Figura 3).

A interconversão entre as quatro formas está resumida no esquema abaixo (Brouillar & Delaporte, 1977; Brouillard, 1982).

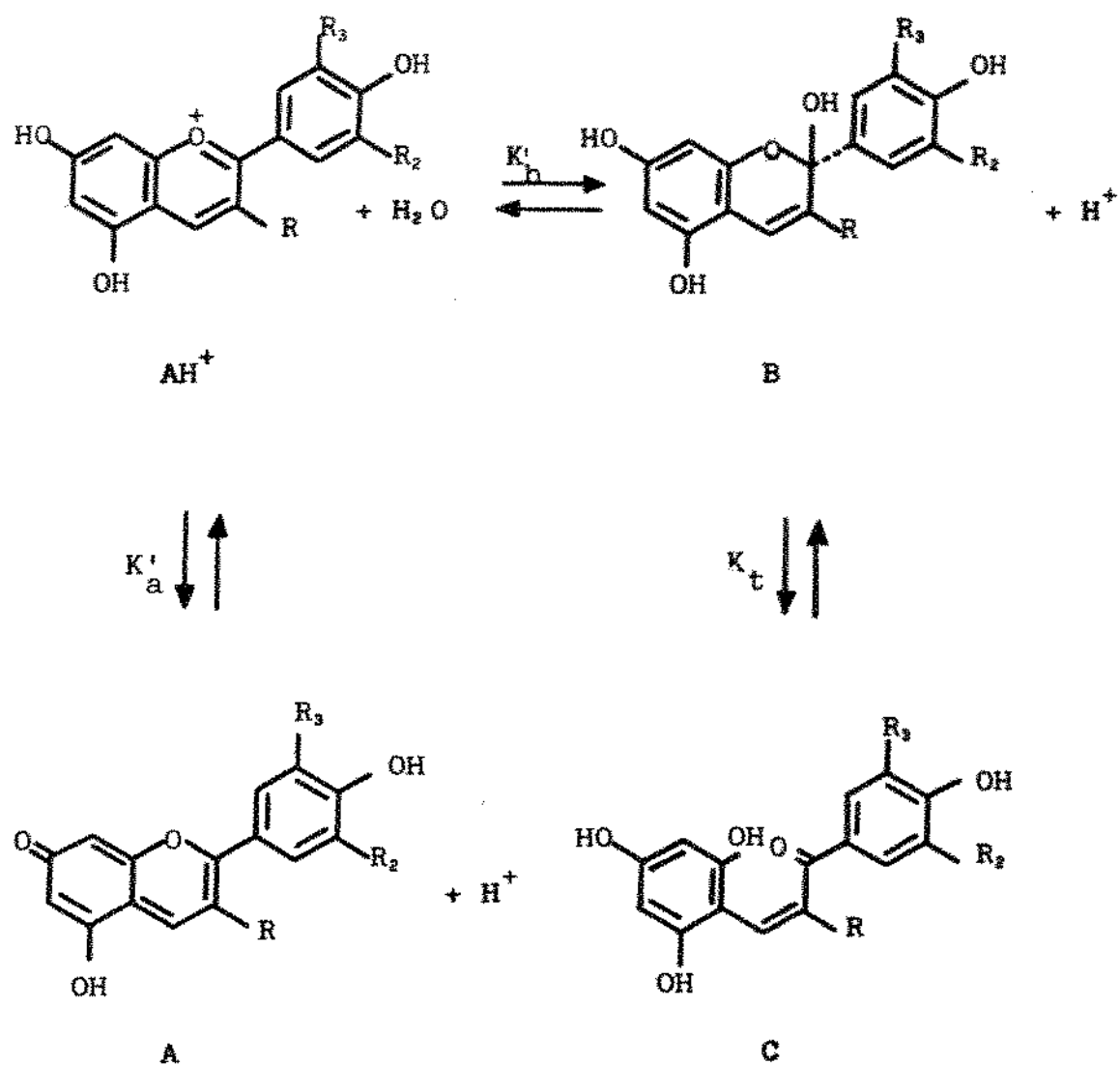
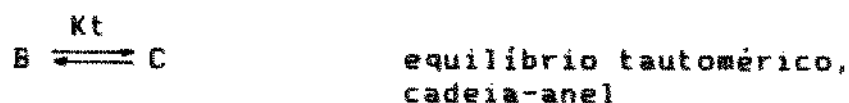
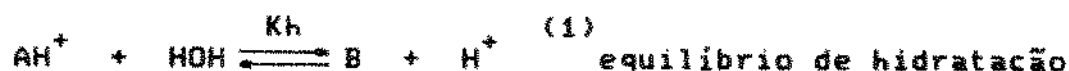


FIGURA 3 - Transformações Estruturais das Antocianinas em Função do pH (Iacobucci & Sweeny, 1983).



onde K_a , K_h , K_t , são as constantes de equilíbrio para ácido-base, hidratação e equilíbrio tautomérico cadeia-anel.

$$K_a = \frac{[\text{A}]}{[\text{AH}^+]} a_{\text{H}^+}$$

$$K_h = \frac{[\text{B}]}{[\text{AH}^+]} a_{\text{H}^+} \quad (2) \quad a_{\text{H}^+} \text{ é a atividade do íon hidrônio} \\ (\text{pH} = -\log a_{\text{H}^+})$$

$$K_t = \frac{[\text{C}]}{[\text{B}]}$$

No esquema (1), em condições ácidas há um equilíbrio entre as antocianinas na forma AH^+ e B, com a existência de uma espécie transiente, a anidrobases A, que é uma estrutura obtida pela desprotonação do cátion flavilium (Sondheimer, 1953; Timberlake & Bridle, 1966, 1967a; Harper, 1968; Jurd, 1963 e 1972a) Soluções contendo pigmentos com pH acima de 7,0, ou em elevadas temperaturas, gradualmente mudam a coloração de tonalidade azul para amarela, como um resultado indireto da formação de chalcona C, via fissão do anel da anidrobases A (Hrazdina, 1974). A chalcona C, tem sido descrita também como

um composto não colorido (Timberlake, 1980), entretanto a forma ionizada da estrutura C está associada a uma leve tonalidade amarela, que não é estável, tendendo a desaparecer com o tempo, dependendo do pH da solução (Brouillard, 1982).

A quantidade relativa de cátion (AH^+), anidrobases quinoidal (A), pseudobase (B) e chalcona (C), no equilíbrio, varia com o pH e com a estrutura da antocianina (Iacobucci *et al.*, 1983), (Figuras 4, 5, 6 e 7).

Segundo Mazza & Brouillard (1987), para a malvidina-3-glucosídeo em solução a pH abaixo de 0,5, o cátion AH^+ vermelho é a única estrutura presente. Com o aumento do pH, a concentração de AH^+ decresce, pois sofre um ataque nucleofílico da água, formando a estrutura do carbinol B que existe em equilíbrio com a forma de chalcona C. O equilíbrio entre as formas AH^+ , H^+ e B é definido pelo valor de $pK_h=2,6$, quando existem quantidades iguais de ambas as formas. Neste pH, entretanto, também estão presentes pequenas quantidades de chalcona C não colorida e, de base quinoidal A. A proporção destas formas aumenta com a elevação do pH que produz uma diminuição da forma catiônica AH^+ , que desaparece em $pH = 4,5$. Na faixa de pH entre 4,0 e 5,5, muito pouca cor permanece na solução já que as formas coloridas AH^+ e A ficam em concentrações bastante reduzidas. Acima de pH 5,5, somente a forma quinoidal está presente. Assim, a malvadina-3-glucosídeo não confere nenhuma pigmentação a uma solução que tenha seu pH elevado de 4,0 para 6,0.

Como o pK_h para o equilíbrio entre a forma catiônica (AH^+) e a pseudobase (B) de um glicosídeo é aproximadamente

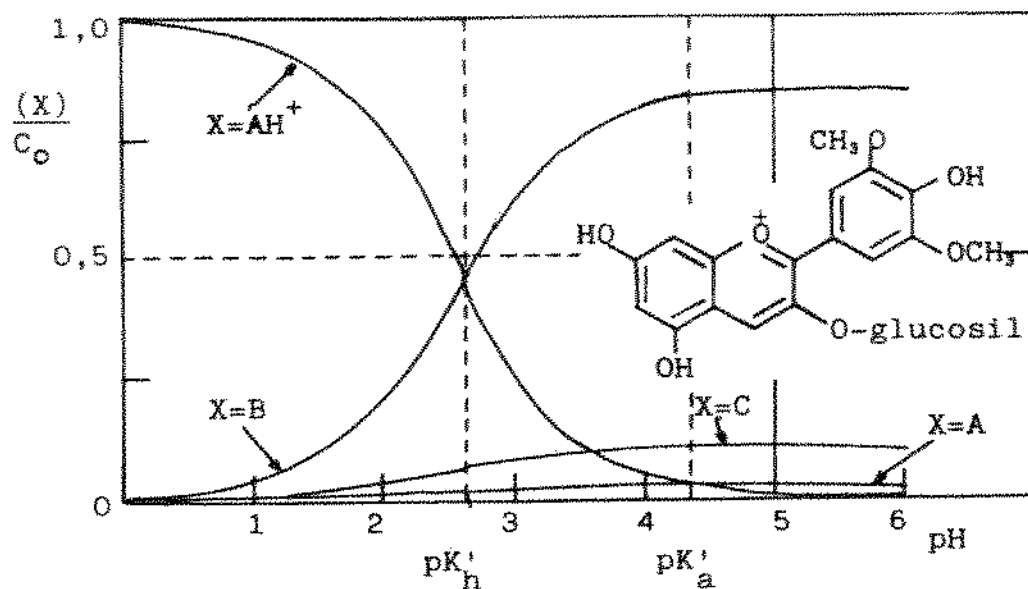


FIGURA 4 - Equilíbrio entre as Formas AH^+ , A, B e C para a Malvidina-3-glucosídeo em Função do pH (Iacobucci & Sweeny, 1983).

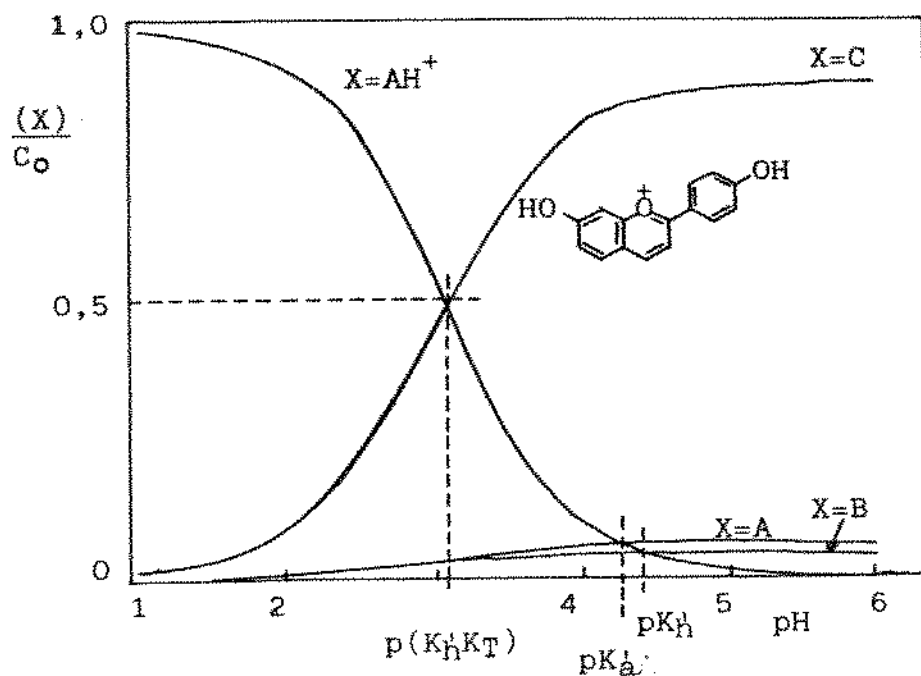


FIGURA 5 - Equilíbrio entre as Formas AH^+ , A, B e C para o Cloreto-4', 7-dihidróxi Flavilium em Função do pH (Iacobucci & Sweeny, 1983).

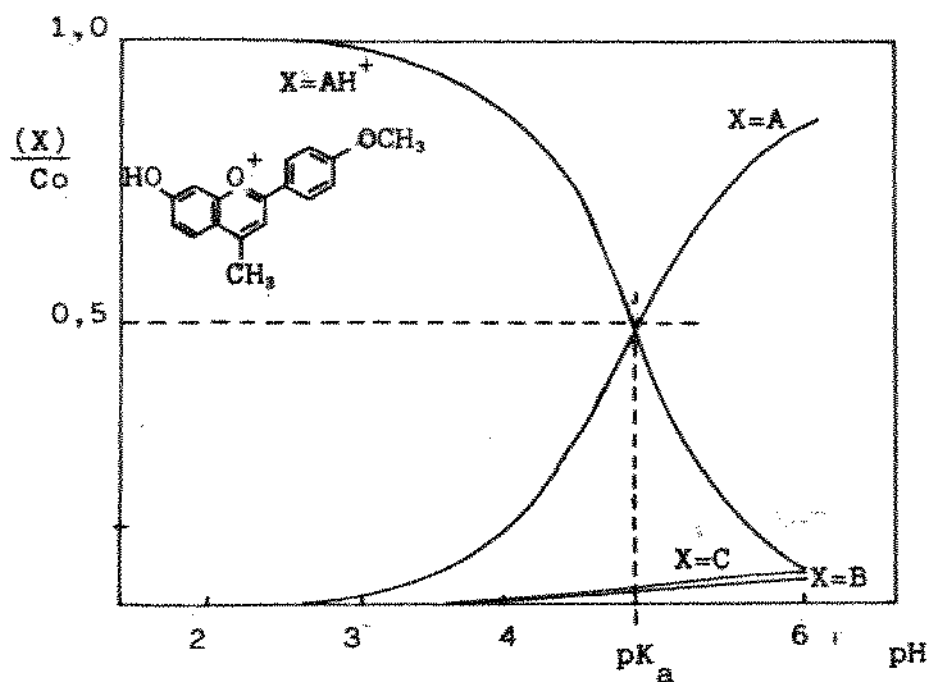


FIGURA 6 - Equilíbrio entre as Formas AH^+ , A, B e C para o Cloreto 4'-metóxi-4-metil-7-hidróxi Flavilium (Brouillard, 1982).

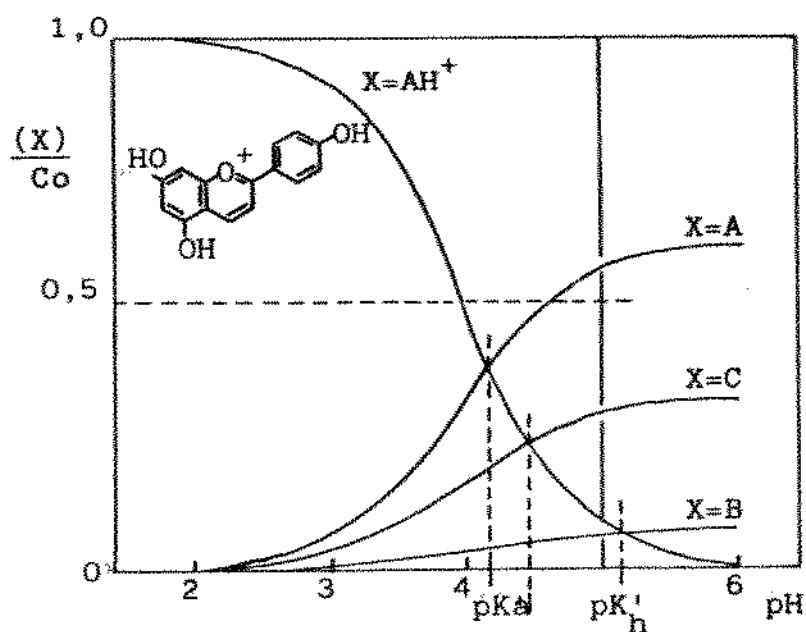


FIGURA 7 - Equilíbrio entre as Formas AH^+ , A, B e C para o Cloreto Aspiginidina (Brouillard, 1982).

uma unidade de pH a menos que a do monoglicosídeo, a malvadina-3,5-diglucosídeo exibe sempre uma menor coloração que a malvadina-3-glucosídeo nas mesmas condições de pH. Soluções de malvadina-3,5-diglucosídeo são essencialmente descoloridas acima de pH 4,0 (Brouillard & Dellaporte, 1977).

A apigenidina (Figura 7), é uma 3-desoxiantocianidina que existe na forma de cátion, na faixa de pH de 0,0 a 2,5 passando a uma mistura de formas catiónicas, quinoidal, chalcona e pseudobase em pH entre 2,5 e 6,0. O cloreto de 4-metoxi-metil-7-hidroxi-flavilium existe somente na forma de cátion em pH abaixo de 2,5 e na forma quinoidal em pH acima de 5,0 (Figura 6). A presença de uma metila na posição C-4 da estrutura da Figura 6 e a presença de uma hidroxila em C-5 da apigenidina (Figura 7), são supostamente a causa da elevada estabilidade da coloração destes pigmentos, em soluções fracamente ácidas, próximas a neutralidade (Brouillard, 1982; Sweeney & Iacobucci, 1981).

Timberlake (1980), afirma que se nenhum fator de estabilização está presente para aumentar ou preservar a coloração do cátion flavilium AH^+ e da base quinoidal A, como acilação e copigmentação, a possibilidade de usar antocianinas como corantes de alimentos seria bastante remota, já que a maioria dos alimentos tem pH na faixa de 3,0 a 7,0.

O abaixamento do pH para valores entre 1,0 e 2,0 em sucos de morango e de framboeza, aumentou sensivelmente a estabilidade das antocianinas características de cada produto (Meschter, 1953; Daravingas & Cain, 1968). Tinsley & Bockian (1960), observaram um efeito estabilizante em pelargonidina-3-

glucosídeo em sistemas modelos submetidas ao aquecimento, com o abaixamento do pH da solução.

Segundo Lukton *et al* (1956), a velocidade de destruição da pelargonidina-3-glucosídeo, na presença de oxigênio está diretamente relacionada com a forma de pseudobase B e, inversamente proporcional a quantidade de cátion flavilium A (Figura 3).

Brouillard (1982), estudando a cinética das reações, observou que o aquecimento de uma solução de antocianina deslocava o equilíbrio para a forma de chalcona C, resultando em um decréscimo das formas coloridas AH^+ e A. Com acidificação e resfriamento, a base quinoidal A e a base carbinol B eram rapidamente transformadas na forma catiônica AH^+ , mas, a mudança da chalcona C para B era relativamente lenta.

2.1.3. Efeito da Copigmentação

Osawa (1982) afirma que se considerarmos a coloração das antocianinas apenas em função de pH somos levados a crer que as plantas ou parte delas, não deveriam ser coloridas uma vez que, na maioria dos casos o pH natural dos vegetais se encontra na faixa ligeiramente ácida para neutra. Nesta região de pH, a maioria das antocianinas se encontra na forma não colorida. Entretanto, o que se observa é que as antocianinas se encontram sempre associadas às partes coloridas das plantas, indicando que estas antocianinas devem estar estabilizadas por fatores físico-químicos incomuns. A presença

de compostos chamados copigmentos pode ser um destes fatores. Os flavonóides não antociânicos, alcalóides, aminoácidos e nucleosídeos entre outros, podem atuar como copigmentos (Tabela 2) e, a própria antocianina pode agir copigmentando outra antocianina.

Segundo Asen *et al.*, (1972, a copigmentação de antocianinas sob condições específicas, produz um deslocamento batocrômico no comprimento de onda de máxima absorção e, um aumento da absorbância na faixa visível do espectro. Mazza & Brouillard (1987), afirmam que o mecanismo de associação entre a antocianina e o copigmento envolve ligações de hidrogênio e possíveis interações hidrofóbicas entre as moléculas.

A copigmentação intramolecular é possivelmente responsável pela extraordinária estabilidade dos cromóforos de antocianinas poliaciladas (Brouillard, 1981), como ocorre com a Platicinina extraída da flor de Platicodon grandiflorum (Saito *et al.*, 1971), cuja coloração é exclusivamente produzida pelo pigmento em si, sem nenhuma interferência de outros agentes como íons metálicos e copigmentos. Os resíduos aromáticos de grupos acila se alinham com o anel pirilium do cátion flavilium dificultando a adição da água em C-2 e C-4 do anel (Brouillard, 1981). Com a dificuldade para a hidratação da molécula e, o aparente impedimento das reações de transferência de prótons pelo processo de "empilhamento" das moléculas, a estabilidade dos cromóforos aumenta sensivelmente. Provavelmente, as forças que atuam no processo de "empilhamento" sejam forças hidrofóbicas.

TABELA 2 - Copigmentação da Cianidina-3,5-diglucosídeo (2×10^{-3} M) a pH 3,32 (Asen et al. 1972)

Copigmento (6×10^{-3} M)	máx. (nm)	máx. (nm)	A/no máx. (nm)	Aumento de A no máx. (%)
Sem copigmento	508	-	0,500	-
AURONA				
Aureusidina	540	32	2,135	327
ALCALÓIDES				
Cafeína	513	5	0,590	18
Brucina	512	4	1,110	122
AMINO ÁCIDOS				
Alanina	508	0	0,525	5
Arginina	508	0	0,600	20
Ácido aspártico	508	0	0,515	3
Ácido glutâmico	508	0	0,530	6
Glicina	508	0	0,545	9
Histidina	508	0	0,595	19
Prolina	508	0	0,625	25
ÁCIDOS BENZÓICOS				
Ácido benzóico	509	1	0,590	18
Ácido O-hidroxibenzoico	509	1	0,545	9
Ácido p-hidroxibenzoico	510	2	0,595	19
Ácido protocatequico	510	2	0,615	23
CUMARINA				
Esculina	514	6	0,830	66
ÁCIDOS CINÂMICOS				
Ácido m-hidroxicinâmico	513	5	0,720	44
Ácido p-hidroxicinâmico	513	5	0,660	32
Ácido cafeico	515	7	0,780	56
Ácido ferúlico	517	9	0,800	60
Ácido sinápico	519	11	1,085	117
Ácido clorogênico	513	5	0,875	75
DIHIDROCHALCONA				
Floridizina	517	9	1,005	10
(+) - Catequina	514	6	0,890	78
FLAVONA				
Apigenina-7-glucosídeo	517	9	0,840	68

(continua ...)

TABELA 2 - cont.

Copigmento (6×10^{-3} M)	$\lambda_{\text{máx.}}$ (nm)	$\lambda_{\text{máx.}}$ (nm)	A/ $\lambda_{\text{máx.}}$ (nm)	Aumento de A no $\lambda_{\text{máx.}}$ (%)
Sem copigmento	508	-	0,500	-
C-GLICOSIL FLAVONA				
8-C-glucosilapigenina (Vitexina)	517	9	1,690	238
6-C-glucosilapigenina (Isovitexina)	537	29	1,705	241
6-C-glucosilgenkwanina (Swertisina)	541	33	2,835	467
FLAVONONAS				
Hesperidina	512	13	1,095	119
Naringina	518	10	0,985	97
FLAVONOLS				
Kaenferol 3-glucosídeo	530	22	1,693	239
Kaenferol 3-robinobiosídeo 7-ramnosídeo	524	16	1,423	185
Quercetina 3-glucosídeo isoquercitrina)	527	19	1,440	188
Quercetina 3-ramnosídeo (quercitrina)	527	19	1,588	217
Quercetina 3-galactosídeo (hiperina)	528	23	1,910	282
Quercetina 3-rutinosídeo (rutina)	528	20	1,643	228
Quercetina 7-glucosídeo	518	10	1,363	173
7-O-metilquercetina-3-ramnosídeo	530	22	1,576	215

Na Figura 8, é mostrado o hipotético mecanismo de "empilhamento" que protegeria o anel e dificultaria o ataque nucleofílico da água na molécula do pigmento, uma vez que a formação do complexo deveria reduzir sensivelmente a suscetibilidade da antocianina à ação de hidratação da água (Brouillard, 1982).

As antocianinas monoaciladas não mostram uma grande estabilidade, indicando que somente um lado do anel pirilium é efetivamente protegido, deixando livre o outro lado do anel, permitindo o ataque da água (Hoshino *et al.*, 1980).

A copigmentação intermolecular além do aumento da absorção na região do visível também pode causar um deslocamento batocrômico no comprimento de onda de máxima

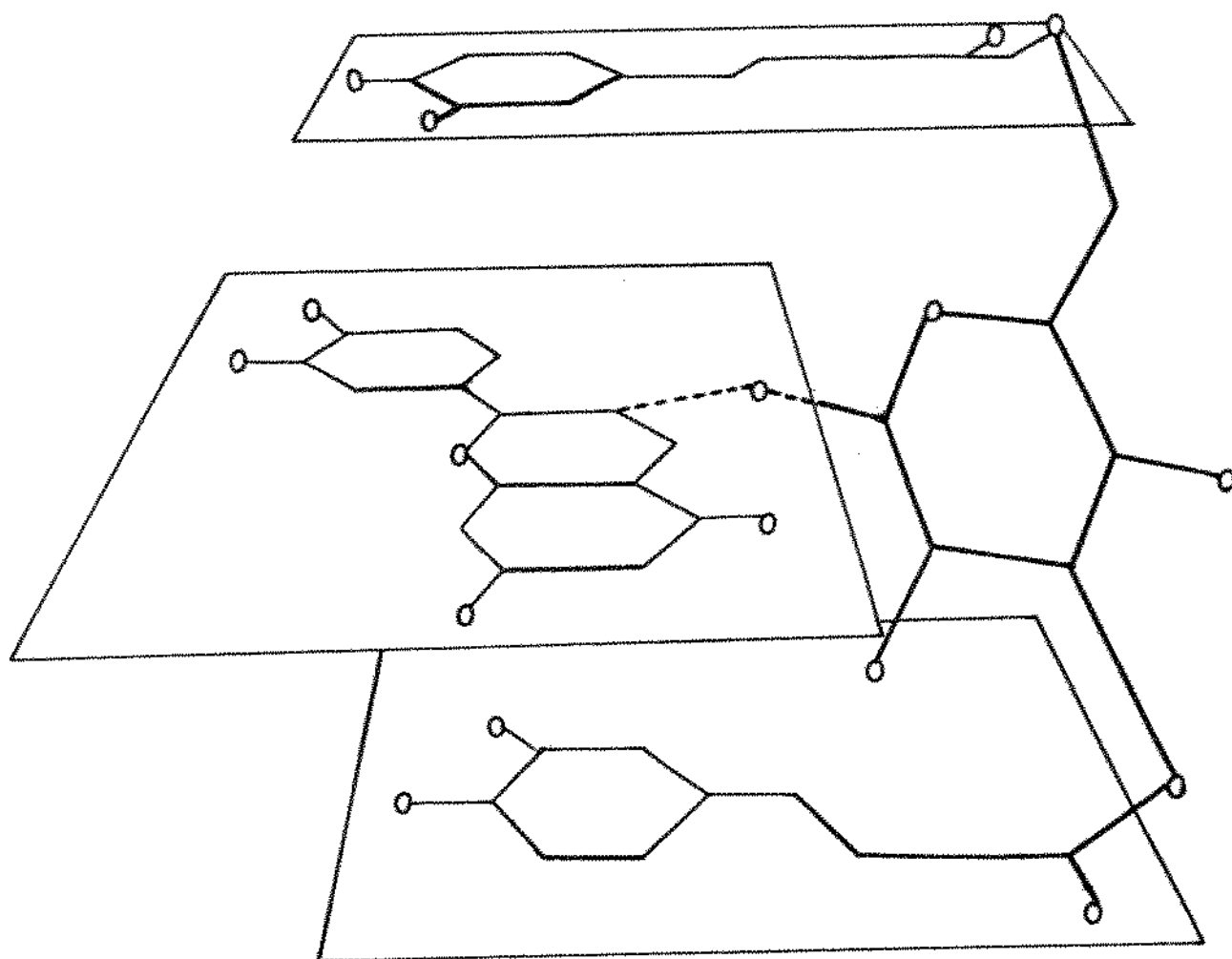


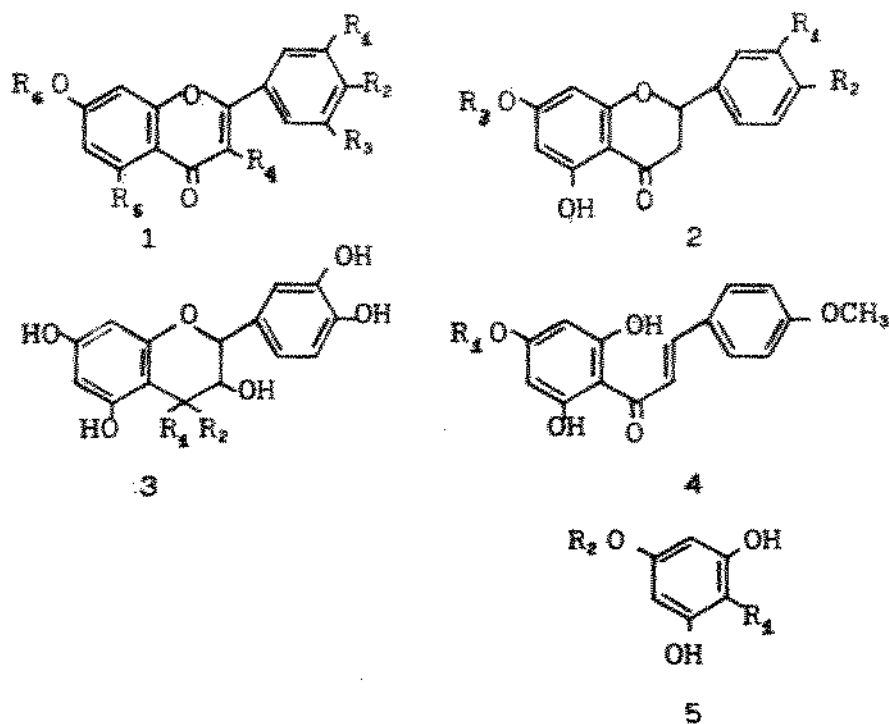
FIGURA 8 - Modelo de "Empilhamento" entre Dois Resíduos de Ácido Cafeico com o Núcleo Pirilium (Brouillard, 1983).

absorção (Asen *et al.*, 1971; Osawa, 1982; Asen, 1976; Timberlake, 1980).

A formação do complexo antocianina-flavonóide é uma típica copigmentação intermolecular e a complexação se dá pela formação de pontes de hidrogênio entre o grupo carbonila da forma anidrobases da antocianina e o grupo hidroxila aromático do flavonóide. O grande número de grupos hidroxila da molécula flavonóide fortalece a formação do complexo. A presença de um grupo hidroxila em C-3 na molécula do flavonóide e, a natureza do açúcar substituinte tem pouco efeito na reação de copigmentação. O grupo hidroxila em C-5 do flavonóide está fortemente ligado por pontes de hidrogênio ao grupo carbonila em C-4 e também, não participa da formação do complexo.

Apesar da insaturação em C-2 e C-3 do anel heterocíclico ser um importante fator na formação do complexo, ele não é imprescindível, uma vez que flavonas não possuem insaturações em C-2 e C-3 (Figura 9 e Tabela 3) e formam complexos mais estáveis que outros, sugerindo que forças eletrostática e efeitos estéricos estão adicionalmente envolvidos na reação (Chen & Hrazdina, 1981).

Os flavonóides formam complexos com a maioria das antocianinas. O estudo espectral das transformações estruturais de antocianinas e, as propriedades do complexo antocianina-flavonóide, mostram que as mudanças no máximo de absorção e na absorbância das soluções de pigmentos, são causadas pela estabilização da forma anidrobases (Asen *et al.*, 1972; Scheffeldt & Hrazdina, 1978; Willians & Hrazdina, 1979).



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
FLAVONA GLICOSÍDEO (1)						
Apigenina 7-glucosídeo	H	OH	H	HOH	H	Glu
FLAVONOL GLICOSÍDEO E FLAVONOLS (1)						
Quercetina 3-glucosídeo	OH	OH	H	O-Glc	OH	H
Quercetina 3-ramnosídeo	OH	OH	H	O-Ram	OH	H
Quercetina 3-rutinosídeo	OH	OH	H	O-Glu-Ram	OH	H
Quercetina	OH	OH	H	OH	OH	H
FLAVONONAS GLICOSÍDEOS (2)						
Naringenina 7-nehesperidosídeo	H	OH	Glu-Ram			
Hesperina 7-rutinosídeo	OH	OMe	Glu-Ram			
FLAVANONOIS E FLAVANOIS (3)						
(+) - Catequina	H	H				
CHALCONA GLICOSÍDEOS (4)						
Poncirina Chalcona			Glu-Ram			
DERIVATIVOS DE FLOROGLUCINOL (5)						
Floroglucinol	H	H				

FIGURA 9 - Estruturas Básicas das Flavonas, a Flavononas, Flavonois e Chalconas. (Clen & Hrazdina, 1981).

TABELA 3 - Formação de Complexos Entre Alguns Flavonóides
(4×10^{-5} M) com Malvidina -3,5-diglucosídeo (10^{-5} M).
(Chen & Hrazdina, 1981)

Flavonoides	$\Delta \lambda$ máx. (nm)	Abs/ λ máx.
Apigenina 7 - glucosídeo	31	1,29
Quercetina 3 - glucosídeo	30	1,48
Quercetina 3 - ramnosídeo	29	1,49
Quercetina 3 - rutinosídeo	30	1,52
Quercetina	28	1,67
Naringenina 7 - neohesperidosídeo	6	0,46
Catequina	6	0,35
Poncirina chalcona	29	0,65
Floroglucinol	0	0

O complexo antocianina-flavonóide pode ser dissociado pelo aquecimento, pela diluição com álcool etílico ou dimetil formamida (Asen *et al.*, 1972).

Um outro fator de grande importância na formação do complexo é o pH do meio. O efeito do copigmento pode ocorrer em valores de pH próximos de 1,0 até a neutralidade (Asen *et al.*, 1970). Segundo Yazaki, (1976), a malvina pode formar complexo com a quercitina-glucosídeo em diferentes condições de pH. A pH 1,0, a malvina existe essencialmente na forma de cátion flavilium e, o deslocamento que se observa no λ máx se deve a interação entre o cátion da malvina e o copigmento. Com pH na faixa de 2,0 e 3,0, ocorre uma grande perda de cor para a malvina e uma significativa retenção de cor para a solução

contendo a antocianina e o copigmento. Ainda segundo Yazaki (1976), o copigmento reduz a produção da forma pseudobase carbinol, que é descolorida. Em pH 4,0 a 6,0, a solução contendo apenas malvina é praticamente descolorida, o que não ocorre com a solução antocianina-copigmento, que é ligeiramente colorida. Esta faixa de pH é favorável à formação da base quinoidal e, a retenção da cor pela atuação do copigmento seria consequência do decréscimo da quantidade de pseudobase carbinol na solução (Mazza & Brouillard, 1987).

A formação do complexo é dependente da concentração do copigmento e da concentração da antocianina e, segundo Asen *et al* (1972), a medida que se aumenta a relação copigmento/antocianina, aumenta a absorbância da amostra e aumenta o deslocamento batocrômico do λ máx.

Estudando a formação de complexo entre a cianidina-3,5-diglucosídeo e quercetina, Asen *et al* (1972) observaram um deslocamento batocrômico de 21 nm quando a concentração de cianidina-3,5-diglucosídeo era 10^{-2} M e a razão molar de quercitina para a antocianina era de 3:1. Por outro lado, para se obter um deslocamento similar do espectro em uma concentração de 5×10^{-3} e 10^{-4} M de cianindina-3,5-diglucosídeo, a razão molar do copigmento para o pigmento foi acrescida para 4:1 e 100:1 respectivamente. Scheffeldt & Hrazdina (1978), trabalhando com rutina como copigmento, sugeriram que, para uma dada concentração de copigmento havia uma correspondente razão molar de antocianina/copigmento, ótima para cada tipo de antocianina.

Quando a concentração de antocianinas é relativamente alta, as antocianinas podem atuar como copigmentos de si mesmo. Scheffeldt & Hrazdina (1978), demonstraram que soluções de antocianinas muito diluídas apresentavam uma intensificação no aumento da coloração, quando copigmentadas com rutina, mas, este aumento na absorbância era paulatinamente reduzido a medida que se aumentava a concentração da antocianina. Ainda segundo Scheffeldt & Hrazdina (1978), esta menor disponibilidade de antocianina para a copigmentação com a rutina, pode ser atribuída à estabilização do cátion flavílium através da auto associação das antocianinas quando presentes em concentrações mais elevadas.

Um estudo feito com malvidina glucosídeo, mostrou que a pH 3,2, a coloração da malvidina 3,5-diglucosídeo aumentou 10 vezes quando complexada à rutina e, que a cor da malvidina-3-glucodídeo aumentou apenas 1,5 vezes vezes em condições semelhantes (10^{-3} M de antocianina e $1,2 \times 10^{-2}$ M de rutina). Este fato demonstra o efeito do tipo de antocianina influenciando a copigmentação (Scheffeldt & Hrazdina, 1978). Para muitos pigmentos e copigmentos, há uma razão molar ótima entre eles onde a intensidade da cor e a sua estabilidade são maximizadas (Jurd & Asen, 1966).

2.1.4. Efeitos de Ions Metálicos

Certos metais podem formar quelatos com as antocianinas (Asen, 1976) que contém um sistema orto-dihidroxila. Os quelatos formados são complexos estáveis e coloridos numa

faixa de pH onde as antocianinas normalmente se encontram na forma descolorida. Das antocianinas mais comuns, apenas os glicosídeos da cianidina, delfindina e petunidina formam quelatos com metais (Asen, 1976). A formação de complexos entre alguns íons metálicos trivalentes como Fe^{+3} e Al^{+3} e as antocianinas, provocam um deslocamento batocrômico no máximo de absorção do espectro visível (Harborne, 1973; Francis, 1977). Nenhum quelato intensamente colorido se forma entre as antocianinas e íons metálicos bivalentes. Na faixa de pH entre 4,0 e 6,0, a cianidina-3,5-diglucosídeo não forma quelatos estáveis coloridos com cobalto, níquel, cálcio, magnésio e bário. Por outro lado, Fe^{+3} e Al^{+3} , formam complexos estáveis e coloridos com a cianidina diglucosídeo (Bayer *et al.* 1966). Asen *et al.* (1969), mostraram que o pH afeta a coloração de quelatos entre o Al^{+3} e a cianidina-3-glucosídeo. Abaixo de pH 3,0, havia pouca ou nenhuma quelação e, apenas uma mudança no brilho da cor da solução. A medida que se aumenta o pH de 3,0 para 4,0, a coloração mudava de vermelho para violeta. Esta alteração já era visível com um aumento de apenas 0,1 unidades de pH. Jurd & Asen (1966), trabalhando com a cianidina-3-glucosídeo, verificaram a formação de complexo estável e colorido com íons de alumínio e que o máximo de formação do complexo ocorria a pH próximo de 5,5. Sistrunck & Cash (1970), estabilizaram a cor de polpa de morango pela adição de sal de estanho. Wrolstad & Erlandson (1973), observaram que a cor vermelha do suco de morango estabilizado era mais intensa para o complexo Sn^{++} -cianidina, que para o complexo Sn^{++} -perlagonidina-3-glucosídeo, já que a

pelargonidina é incapaz de se complexar com metais pois não possui os grupos hidroxila vicinais.

Os metais atuam quelando as antocianinas em uma estrutura quinoidal estável quando o pH se encontra na faixa de 3,0 a 6,0 (Nakayama & Powers, 1972), uma faixa comum em sucos de frutas. Embora os íons de Cu^{++} , Fe^{+++} e Al^{+++} proporcionem grande proteção e estabilidade para as antocianinas do suco de morango, este efeito não era benéfico, pela formação de cor azul como resultado da formação de complexos metais-taninos (Starr & Francis, 1973). Coffey et al (1981), investigando a estabilidade da cor da cianidina-3-glucosídeo e, do extrato de framboeza na presença de Al^{+++} , concluíram que, embora ocorresse a formação do complexo metal-antocianina, a estabilidade conferida por este complexo não era uma justificativa suficiente para uma aplicação prática de quelatos de metais com antocianinas, pois a complexação com alumínio provoca um deslocamento batocrômico no pigmento, alterando o padrão de cor, levando a antocianina a apresentar uma coloração de tonalidade azulada, não característica de alimentos.

2.1.5. Efeito de Dióxido de Enxofre (SO_2)

Valores elevados de SO_2 presentes em sucos de frutas contendo antocianinas podem inviabilizar a sua utilização como preservativo uma vez que pode atuar como agente de descoloração para os pigmentos presentes. Apesar disto, há a possibilidade do uso de solução aquosa de SO_2 como um solvente

para extração de antocianina dos tecidos de plantas, (Adams & Woodman, 1973; Jurd, 1964). Segundo Jurd (1964), seriam necessários apenas 50 ppm de dióxido de enxofre para proporcionar uma estabilidade considerável às antocianinas. O efeito descorante do SO_2 pode ser reversível, bastando apenas reduzir o pH do meio para valores próximos de 1,0 para restaurar a cor das antocianinas.

As antocianinas na sua forma de cátion flavilium, podem, reversivelmente reagir com SO_2 , formando um composto incolor, o ácido 4-sulfóxi flavânico (Figura 10b; Jurd, 1964a).

De acordo com Brouillard & El Hage Chaine (1980b) e Markakis, (1982a), os elevados valores para a constante de formação do derivado antocianina- SO_2 , sugerem que uma pequena quantidade de SO_2 poderá descolorir quantidades significativas de antocianinas. Timberlake & Bridle (1968), sugeriram que o SO_2 pode se ligar ao C-4 (Figura 10b) do íon flavilium e que qualquer substituinte nesta posição como é o caso das catequinas e proantocinidinas, dificultaria a formação do derivado SO_2 -antocianina.

2.1.6. Efeito do Oxigênio

Starr & Francis (1968), verificaram que as perdas de pigmentos em suco de "cranberry" aumentavam com o acréscimo dos níveis de oxigênio e de ácido ascórbico na solução de antocianinas, e que o teor total dos pigmentos decrescia sensivelmente durante a estocagem. A cianidina e a peonidina

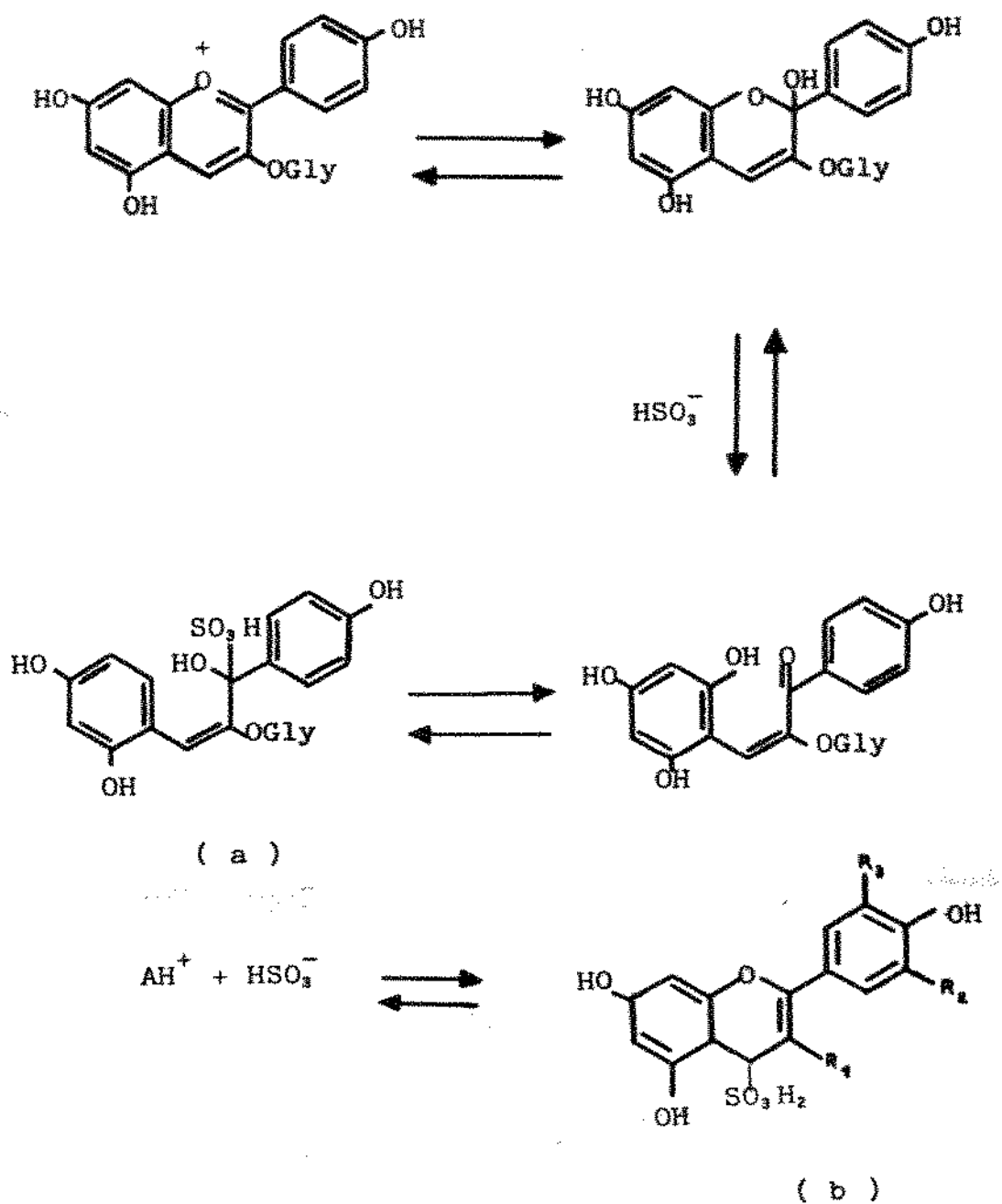


FIGURA 10 - Mecanismos de Atuação do Ion Bissulfito sobre as Antocianinas, (a) Jurd (1964a); (b) Timberlake & Bridle (1968).

arabínosídeos eram muito mais sensíveis aos efeitos do oxigênio que a cianidina e a peonidina galactosídeos. Habib & Brown (1956) e Daravingas & Cain (1965), também constataram que o oxigênio afetava a velocidade e a extensão da descoloração dos pigmentos vermelhos. Markakis *et al* (1975), trabalhando com antocianinas de morango em sistemas modelo, mostraram que a destruição dos pigmentos era mais intensa na presença conjunta de oxigênio e ácido ascórbico, quando comparado com o efeito de apenas um dos fatores isoladamente, sugerindo que os compostos formados na oxidação do ácido ascórbico, também agem no processo de degradação das antocianinas. Daravingas *et al* (1965), afirmaram que o oxigênio pode causar degradação das antocianinas através de oxidação indireta, oxidando constituintes do meio capazes de reagir com pigmentos, produzindo compostos de decomposição escuros ou compostos despigmentados.

2.1.7. Temperatura

Segundo Daravingas *et al* (1965); Hrazdina *et al* (1970); Adans *et al* (1973b) e Simard *et al* (1982), a velocidade de degradação das antocianinas em sistemas modelos e em sistemas naturais era significativamente influenciada pela temperatura do processamento e da estocagem. Markakis *et al* (1957), recomendaram o menor tempo possível de aquecimento na esterilização de vegetais, que deveria ser feita pelo sistema HTST quando se deseja um máximo de retenção de cor. Adans *et*

al (1973a), também mostraram que a destruição dos pigmentos em conserva de morangos era pequena durante o processo de esterilização utilizando sistema HTST, comparado às perdas ocorridas durante o resfriamento e subsequente estocagem em temperatura ambiente.

Tensley & Bokean (1960), mostraram que a degradação da pelargonidina-3-glucosídeo seguia uma cinética de 1ª ordem em sistema modelos, o mesmo ocorrendo com a degradação da cianidina-3-glucosídeo (Wrolstad *et al* 1970).

A energia de ativação (E_a), (Q_{10}) e valor de (Z), são parâmetros cinéticos utilizados para se determinar a influência da temperatura na degradação das antocianinas e as seguintes equações propostas por Lund (1975), podem ser usados para a determinação de E_a , Z e Q_{10} .

$$E_a = \frac{2,303 \cdot R \cdot T \cdot T_1}{Z}$$

$$Z = \frac{N \cdot 10^{\circ}\text{C}}{\log Q_{10}}$$

E_a = Energia de ativação (Cal/mol)

R = Constante dos gases (1,987 Cal/mol/ $^{\circ}\text{K}$)

T = Temperatura em $^{\circ}\text{K}$

T_1 = Temperatura 10° acima de T

$\frac{1}{Z}$ = Inclinação da curva de destruição térmica.

Z = Mudança de temperatura necessária para alterar o tempo de destruição térmica por um fator de 10 ($^{\circ}\text{C}$).

$$Q_{10} = \frac{\text{velocidade da reação } (T + 10)}{\text{Velocidade da reação } T}$$

Em relação a determinação do valor de Q_{10} , Labuza *et al* (1982), chegaram à seguinte equação:

$$\log Q_{10} = \frac{2 \cdot 2E_a}{T (T + 10)}$$

No estudo da cinética de degradação das antocianinas em frutos estocados a 10, 20, 30 e 40°C, Tanchev (1983), encontrou valores de $E_a = 16,6$ Kcal/mol; $Z = 24,5^\circ\text{C}$ e $Q_{10} = 2,5$. Para frutos aquecidos à temperatura de 78, 88, 98 e 108°C os valores encontrados foram $E_a = 23,2$; $Z = 27,5^\circ\text{C}$ e $Q_{10} = 2,4$ respectivamente. Estes resultados segundo Tanchev (1983), sugerem que a cor das antocianinas é mais estável sob condições de processamento que sob condições de estocagem, o que foi atribuído a possibilidade de uma reação de condensação, com consequente aumento da concentração dos pigmentos poliméricos em função da temperatura e do tempo de estocagem.

Segundo Markakis *et al* (1957), antes de ocorrer a hidrólise da ligação glicosídica, o anel heterocíclico da pseudobase se abre para formar uma chalcona descolorida (Figura 11). Este mecanismo tem sido mostrado como dependente de temperatura. Adams (1972, 1973a, b), mostrou que para valores de pH entre 2,0 e 4,0, o aquecimento das antocianinas provoca primeiramente a hidrólise da ligação glicosídica para depois formar a chalcona, com subsequente formação de

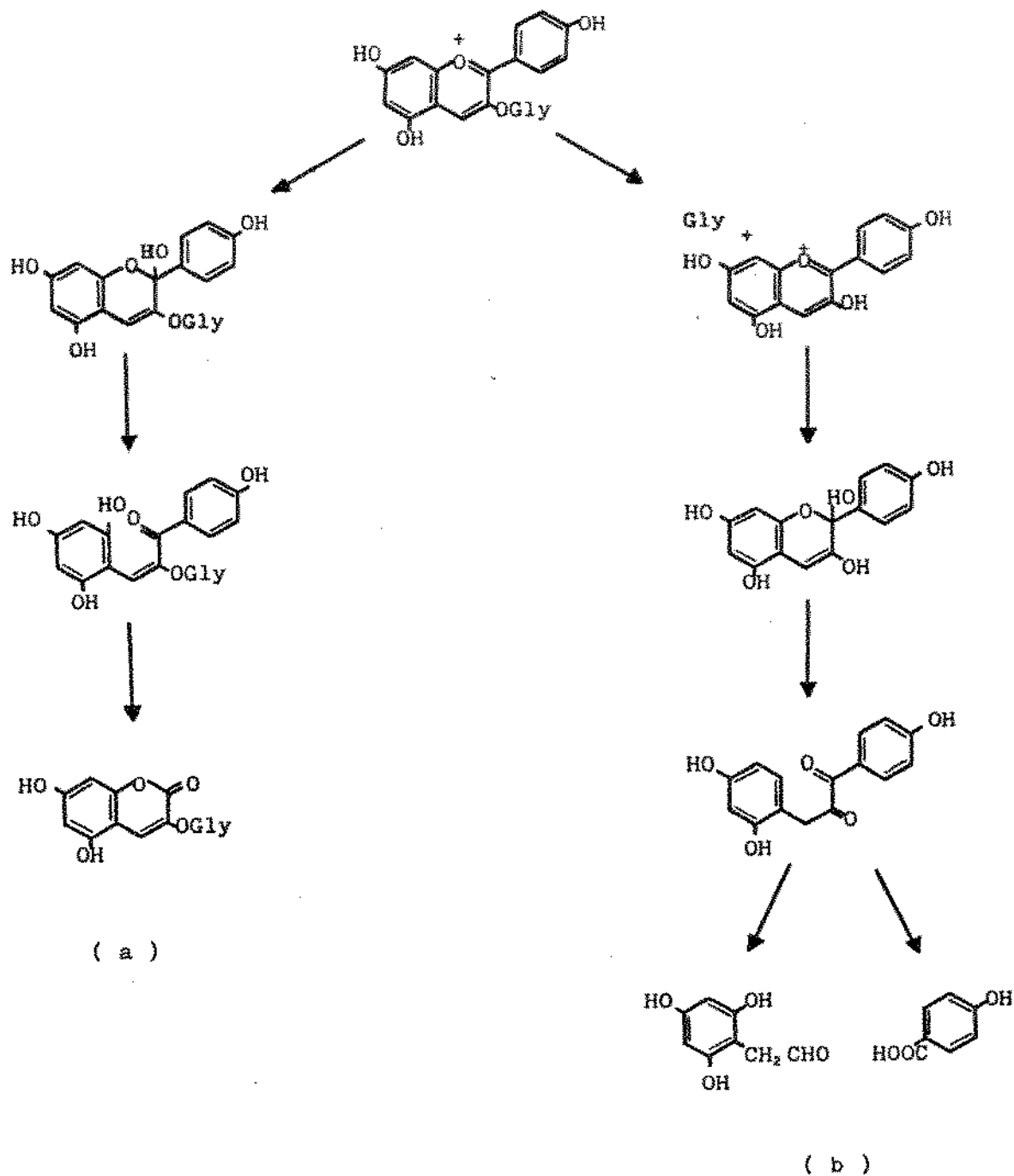
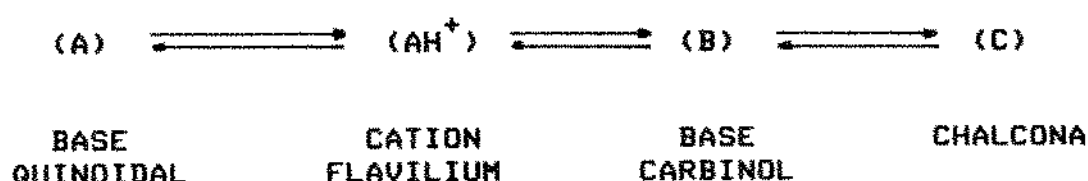


FIGURA 11 - Mecanismos de Degradação das Antocianinas Proposto por (a) Markakis *et al* (1957), (b) Adams (1972, 1973a,b).

β -dicetona (Figura 11). Há evidências de que a hidrólise glicosídica das antocianinas era a principal causa da perda de cor do pigmento, uma vez que a velocidade de formação de açúcar livre era proporcional a velocidade de desaparecimento da cor vermelha das antocianinas (Adams, 1972, 1973b).

Segundo Markakis (1982a), a reação de equilíbrio entre as formas de antocianinas tende a ser endotérmica, da esquerda para a direita no esquema de Brouillard (1982):



Estudando a cinética das reações durante o aquecimento de soluções de antocianinas, Brouillard (1982), verificou que havia um deslocamento do equilíbrio para a formação de chalcona (C), resultando num decréscimo nas formas coloridas da base quinoideal (A) e íon flavilium (AH^+). Com o resfriamento e acidificação, as formas (A) e (B) eram rapidamente transformadas na forma catiônica (AH^+), mas, a mudança da forma chalcona (C) para (B) era mais lenta que a reação inversa. Como o cátion flavilium (AH^+) tem sido utilizado para quantificar as antocianinas, Markakis (1982a) sugeriu que se os tempos entre o aquecimento da solução e as análises quantitativas não forem suficientemente longos, os resultados dos estudos dos efeitos de temperatura podem ser incorretos, uma vez que parte da chalcona (C) poderia não ter sido ainda transformada em cátion (AH^+) (Brouillard, 1987).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Preparação do Extrato de Antocianinas

Um quilograma de inflorescências de capim gordura (Melinis minutiflora) colhidos na região do Distrito de Barão Geraldo, Município de Campinas, SP, foi macerado com suficiente volume de ácido clorídrico 0,05% em metanol, para cobrir todo o material sólido. A maceração foi feita a $25^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas ao abrigo da luz seguido de filtração em pano fino e uma prensagem do resíduo, que foi submetido a uma nova extração. O extrato assim obtido, foi centrifugado a 2.000 rpm e concentrado sob pressão reduzida à temperatura de $35^{\circ} - 40^{\circ}\text{C}$ até alcançar um teor de sólidos de aproximadamente 50%. Em seguida a clorofila existente no extrato foi extraído com eter etílico.

O extrato assim preparado foi armazenado sob nitrogênio ao abrigo da luz a -18°C para posterior uso durante a execução das etapas seguintes do trabalho.

A quantidade de antocianinas (mg/100g) no extrato concentrado foi determinada pelo método de Fuleki & Francis (1968).

3.2. Purificação do Extrato

O extrato obtido em 3.1., foi purificado (na medida das necessidades), por cromatografia em coluna de PVP (polivinilpirrolidona) preparada conforme técnica descrita por Wrolstad & Struthers (1971). Foram usadas colunas de vidro de 30 cm de comprimento por 6 cm de diâmetro, contendo PVP até uma altura de 20 cm, com capacidade de absorção suficiente para a separação de 10 ml do extrato concentrado. A coluna foi desenvolvida e eluída com metanol: água (70:30) com 0,01% de HCL.

As zonas com melhor resolução e que apresentavam uma maior intensidade de cor foram eluídas e recolhidas separadamente constituindo as frações F1 e F2.

3.3. Purificação das Frações

As frações F1 e F2 (3.2.) foram cromatografadas separadamente em papel Whatman nº 3 e os cromatogramas desenvolvidos com HCL 1%. A região central da banda única resultante, foi eluída com metanol e, após concentração a 35°C sob pressão reduzida, foi recromatografada em papel Whatman nº 1. Os cromatogramas foram desenvolvidos com BAW (n-butanol-ácido acético-água, 6:1:2). Duas zonas, A e B, foram eluídas

separadamente com metanol e concentradas sob pressão reduzida a 35°C. A pureza e igualdade das duas frações F1 e F2 obtidas na coluna de PVP (3.2.) e das bandas resolvidas pela cromatografia em papel utilizando BAW como solvente, foi verificada por cromatografia em papel Whatman 3MM com os seguintes solventes: BFW (butanol-ácido fórmico-água, 15:2,5:2,4) e AWH (ácido acético-água-ácido clorídrico, 15:82:3).

3.4. Hidrólise Ácida da Zona A Purificada

A hidrólise ácida da antocianina da zona A foi feita de acordo com o método descrito por Du & Francis (1973).

3.4.1. Identificação dos Açúcares

Os açúcares livres, resultantes da hidrólise, foram identificados por cromatografia em papel Whatman nº-1, utilizando como padrões, soluções puras de glucose, ramnose, xilose, manose, galactose, e arabinose. Os cromatogramas, foram desenvolvidos com acetato de etila-piridina-água, (8:2:1) e BAW (6:1:2) e a revelação foi feita com solução de p-anisidina-ácido ftálico preparada conforme descrito por Zweig & Sherma (1986).

3.4.2. Identificação da Antocianidina

A solução contendo a aglicona separada dos açúcares (3.4.) foi concentrada à vácuo, para eliminar parcialmente o resíduo de álcool n-amílico e posteriormente, resolubilizada em metanol. A solução de antocianidina foi cromatografada em papel Whatman nº 1 com os solventes BAW, AWH, Forestal. Os valores dos Rf foram determinados e comparados com os valores fornecidos pela literatura.

3.5. Hidrólise Alcalina da Zona A Purificada

A hidrólise alcalina foi feita de acordo com a metodologia descrita por Francis (1982).

3.5.1. Identificação dos Ácidos

O extrato etéreo da hidrólise alcalina (3.5.) foi submetido a cromatografia em placa fina de celulose juntamente com amostras padrão dos ácidos: cafeico, cumárico, ferúlico, sinápico, málico e cinâmico.

As placas foram desenvolvidas respectivamente em TAE (tolueno-ácido acético-etanol, 15:3:1) e BAW (6:1:2) e revelados com solução de FeCl_3 conforme o método descrito por Bobbio *et al* (1982).

Os ácidos obtidos foram submetidos a cromatografia líquida de alta eficiência utilizando um cromatógrafo CG, modelo 480 C, detetor UV-CG 435 e integrador-processador CG

300, nas seguintes condições de operação: coluna RP-18, fluxo de 1,5 ml/min, comprimento de onda de 354 nm, volume injetado de 20 µl, solvente acetonitrila-ácido acético-água (18:2:80). Soluções padrões de ácido cafeico e de ácido cumárico foram utilizadas para a identificação.

3.6. Hidrólise Controlada

A hidrólise controlada da solução metanólica da zona A purificada obtida em 3.3., foi feita segundo método preconizado por Francis & Harborne (1966). Amostras da solução hidrolizada foram retiradas com 0,4, 8, 12, 18, 26, 36 e 60 minutos de reação e cromatografadas em papel Whatman nº 1. Os cromatogramas foram desenvolvidos respectivamente em BAW (6:1:2), HCL 1% e AWH (15:82:3).

3.7. Separação das Antocianinas e dos Flavonóides Não Antociânicos por HPLC

Para a separação de antocianinas, por HPLC utilizaram-se condições semelhantes àsquelas descritas para ácidos (3.5.1.), no comprimento de onda de 520 nm e com solvente metanol-ácido acético-água (20:9,6:7,4). Os flavonóides não antociânicos foram separados utilizando o solvente MeOH:HCL a 280 nm começando com a proporção 85:15 até chegar em 15:85, após 50 minutos, com fluxo de 1,0 ml/minuto.

3.8. Reações Específicas de Antocianinas

A reação da antocianina com o cloreto de alumínio (AlCl_3) foi feita conforme técnica descrita em Geissman *et al.*, (1953), para se verificar a existência de hidroxilas vicinais.

A reação com NH_3 foi feita submetendo o papel contendo as antocianinas, aos vapores de NH_3 durante 3 minutos segundo preconizado por Harborne (1967).

3.9. Estabilidade Comparativa Entre as Frações de Antocianinas

3.9.1. Estabilidade das Frações F1 e F2, Obtidas em 3.2.

A estabilidade das frações F1 e F2 foram determinadas em solução tampão citrato/fosfato a pH 2,0, 3,0 e 4,0. Em cada pH foram usadas concentrações de pigmentos suficientes para a obtenção de leituras de absorbância inicial entre 0,800 e 0,900.

As soluções de antocianinas a pH 2,0, 3,0 e 4,0, foram distribuídas (5 ml) em tubos de ensaio de 15 ml com tampa rosqueável e vedadas com teflon. Cada tubo foi imediatamente submetido a um fluxo de nitrogênio por 15 segundos e fechado.

Metade dos tubos foram deixados no escuro e os demais tubos foram expostos à luz de lâmpadas fluorescentes de 40 W, 2.500 LUX, guardando uma distância de 10 cm entre a lâmpada e os tubos. Todos os tubos permaneceram em ambiente com temperatura controlada de $25^{\circ}\text{C} \pm 1$.

A cada 24 horas foram tiradas amostras para a determinação do espectro (350 a 650 nm) e a leitura das absorbâncias no comprimento de onda de máxima absorção.

O Quadro 1, resume as condições utilizadas para o estudo da estabilidade da fração F1 no pH 2,0, 3,0 e 4,0 e estas mesmas condições foram usadas para a fração F2.

QUADRO 1 - Resumo das Condições Experimentais Usadas em 3.9.1.

Amostra	pH Solução Extrato	Volume Solução Extrato (ml)	Ambiente Luz/Escuro
1	2,0	5	luz
2	2,0	5	luz
3	2,0	5	luz
4	2,0	5	luz
5	2,0	5	escuro
6	2,0	5	escuro
7	2,0	5	escuro
8	2,0	5	escuro
9	3,0	5	luz
10	3,0	5	luz
11	3,0	5	luz
12	3,0	5	luz
13	3,0	5	escuro
14	3,0	5	escuro
15	3,0	5	escuro
16	3,0	5	escuro
17	4,0	5	luz
18	4,0	5	luz
19	4,0	5	luz
20	4,0	5	luz
21	4,0	5	escuro
22	4,0	5	escuro
23	4,0	5	escuro
24	4,0	5	escuro

3.9.2. Estabilidade das Zonas A e B, Obtidas em 3.3.

As antocianinas das zonas A e B foram solubilizadas em tampão citrato/fosfato a pH 2,0, 3,0 e 4,0 e as condições experimentais usadas foram as mesmas daquelas descritas em 3.9.1., cujo resumo pode ser visto no Quadro 1.

3.9.3. Estabilidade do Extrato

Para este experimento foi utilizado o "Extrato" obtido em 3.1., diluído em tampão citrato/fosfato a pH 2,0, 3,0 e 4,0 e a experiência conduzida segundo a metodologia descrita em 3.9.1.

3.10. Efeito da Rutina em Alcool Sobre as Antocianinas

Foi utilizada uma solução de rutina (500 mg) em etanol 99% (50 ml) (Poeli & Wrolstad, 1981), e 4 g de extrato de antocianinas (5,8%) obtido em 3.1., em 250 ml de tampão citrato/fosfato (Shrikhande & Francis, 1974), a pH 3,0.

A solução de rutina foi adicionada à solução de antocianina nas proporções desejadas, e após 2 horas em repouso no escuro, foi feita a leitura da absorbância no comprimento de onda de máxima absorção, determinado pelo espectro obtido entre 350 e 700 nm. O Quadro 2 resume as condições experimentais utilizadas.

QUADRO 2 - Resumo das Condições Experimentais Usadas em 3.10.

Amostra	Solução de Extrato de Antocianinas (ml)	Rutina em Alcool (ml)	Alcool (ml)
Branco	10 (9,28 mg)*	0 (0)	5
A	10	1 (10 mg)*	4
B	10	2 (20 mg)	3
C	10	3 (30 mg)	2
D	10	4 (40 mg)	1
E	10	5 (50 mg)	0

* - Os valores (mg) referem-se às quantidades de antocianinas e de Rutina em 10 ml de solução.

3.11. Efeito de Solução Alcalina de Rutina Sobre as Antocianinas

O efeito da solução de rutina solubilizada em NaOH 0,0016 N (Williams & Hrazdina, 1979), foi avaliado utilizando o mesmo procedimento usado no ensaio anterior (3.10.). As condições experimentais estão resumidas no Quadro 3.

3.12. Efeito da Adição de Ácido Tânico à Solução de Antocianina

Foram adicionadas quantidades crescentes de ácido tânico a 100 ml de uma solução contendo 1,5 g do extrato de antocianina (3.1.) em tampão citrato/fosfato a pH 3,0.

QUADRO 3 - Resumo das Condições Experimentais Usadas em 3.11.

Amostra	Solução de Extrato de Antocianinas (ml)	Rutina em NaOH 0,0016 N (ml)	NaOH 0,0016 N (ml)
Branco	10 (9,28 mg)*	0 (0)	5
A	10	1 (10 mg)*	4
B	10	2 (20 mg)	3
C	10	3 (30 mg)	2
D	10	4 (40 mg)	1
E	10	5 (50 mg)	0

* - mg de antocianinas e de rutina em 10 ml de solução.

Após a adição do ácido, as amostras foram deixadas no escuro por 2 horas, numa temperatura de $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Decorrido esse tempo, foram feitos os espectros de absorção entre 350 a 700 nm. Após a leitura inicial da absorção no comprimento de onda máxima absorção, as amostras foram mantidas sob efeito de luz (3.9.1.) à temperatura de $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 15 dias, com leituras de absorbância aos 7 dias e aos 15 dias. O Quadro 4 resume as condições experimentais utilizadas.

3.13. Efeito do Ácido Tânico em Soluções de Antocianinas em pH 2,0, 3,0 e 4,0

Foram preparadas soluções contendo 1 g de extrato de antocianinas (3.1.) em 100 ml de tampão citrato/fosfato a pH 2,0, 3,0 e 4,0. A estas soluções de antocianinas foi adicionado ácido tânico em concentrações crescentes.

QUADRO 4 - Resumo das Condições Experimentais Utilizadas em 3.12.

Amostra	Solução de Extrato de Antocianinas (ml)	Ácido Tânico (mg)
Branco (P)	100 (87 mg)*	0
A	100	100
B	100	200
C	100	400
D	100	1000

* - mg de antocianinas em 100 ml de solução.

A determinação dos espectros de absorção para as amostras foi feita no intervalo de 350 a 700 nm após deixar a solução em repouso por duas horas no escuro. No Quadro 5, estão as condições experimentais utilizadas.

3.14. Efeito do Ácido Tânico Sobre Diferentes Concentrações de Antocianinas em pH 2,0, 3,0 e 4,0

Para se estudar o efeito do ácido tânico (80 mg) adicionados em diferentes soluções de extrato de antocianinas (3.1.), dissolvidas em 100 ml de solução tampão citrato/fosfato nos pH 2,0, 3,0 e 4,0, foram utilizadas as condições resumidas no Quadro 6. Antes de se fazer os espectros de absorção, as amostras permaneceram no escuro por duas horas a uma temperatura de $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, como nos experimentos anteriores.

QUADRO 5 - Resumo das Condições Experimentais Usadas em 3.12.

Tratamentos	Solução de Extrato de Antocianina (ml)			Ácido Tânico (mg)
	pH 2,0	pH 3,0	pH 4,0	
B - 2,0	10 (5,8 mg)*	-	-	000
1	10	-	-	40
2	10	-	-	80
3	10	-	-	120
B - 3,0	-	10 (5,8 mg)*	-	000
1	-	10	-	40
2	-	10	-	80
3	-	10	-	120
B - 4,0	-	-	10 (5,8 mg)*	000
1	-	-	10	40
2	-	-	10	80
3	-	-	10	120

B - branco

* - mg de antocianinas em 10 ml de solução.

QUADRO 6 - Resumo das Condições Experimentais utilizadas em 3.14

pH	Solução de Extrato de Antocianinas				Ácido Tanico (mg)
	0,5*	1,0* (ml)	1,5*	2,0*	
2,0	10 (2,9)**	-	-	-	00
	10	-	-	-	00
	-	10 (5,8)**	-	-	00
	-	10	-	-	00
	-	-	10 (8,7)**	-	00
	-	-	10	-	00
	-	-	-	10 (11,6)**	00
	-	-	-	10	00
3,0	10	-	-	-	00
	10	-	-	-	00
	-	10	-	-	00
	-	10	-	-	00
	-	-	10	-	00
	-	-	10	-	00
	-	-	-	10	00
	-	-	-	10	00
4,0	10	-	-	-	00
	10	-	-	-	00
	-	10	-	-	00
	-	10	-	-	00
	-	-	10	-	00
	-	-	10	-	00
	-	-	-	10	00
	-	-	-	10	00

* - Volume em ml de solução de extrato de antocianinas diluídas em 100 ml de tampão citrato/fosfato

** - (mg) de antocianinas em 10 ml de solução de extrato.

3.15. Estabilidade das Antocianinas

3.15.1. Efeito da Luz Sobre as Antocianinas a pH 2,0

Para este estudo foi utilizado uma solução com 1,5 g de extrato de antocianina (3.1.), dissolvidas em 100 ml de tampão citrato/fosfato a pH 2,0.

Em cada tubo de ensaio utilizado, contendo 10 ml de solução de antocianina foram adicionados 0,001 ml de solução a 5% de sorbato de potássio para prevenir o desenvolvimento de fungos. Em uma parte dos tubos foram acrescentados 80 mg de ácido tânico seguido de agitação e posterior repouso no escuro por duas horas. Uma parte desses tubos foi colocada em um suporte em fila dupla, posicionados entre duas lâmpadas fluorescentes de 40 W, 2.500 lux, correspondente à luz do dia, a uma distância de 10 cm dos tubos, protegidos de qualquer outra fonte de luz, e a uma temperatura de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$. O restante dos tubos contendo ácido tânico, permaneceu na mesma temperatura, no escuro.

Os tubos de ensaio aos quais não foi adicionado ácido tânico, tiveram um tratamento igual ao descrito acima. Todos os tubos de ensaio antes do fechamento, foram submetidos a um fluxo de nitrogênio por 15 segundos.

A determinação do espectro de absorção (350 a 650 nm) e a leitura da absorbância no λ máx., foram feitos em triplicatas a cada 24 horas. O Quadro 7 indica a distribuição dos tubos de ensaio.

QUADRO 7 - Resumo das Condições Experimentais em 3.15.1.

Solução de Extrato de Antocianinas a pH 2,0 (ml)	Ácido Tânico (mg)	Nitrogênio	Luz/ Escuro	Número de Tubos
10 (8,7 mg)*	80	+	luz	20
10	80	+	escuro	20
10	-	+	luz	20
10	-	+	escuro	20

* - (mg) de antocianinas em 10 ml de solução.

3.15.2. Efeito da Luz Sobre as Antocianinas em pH 3,0

Foi utilizada, uma solução contendo 1,5 g de extrato de antocianinas (3.1.), em 100 ml de tampão citrato/fosfato a pH 3,0.

As condições experimentais utilizadas foram as mesmas daquelas descritas no item anterior (3.15.1.), resumidas no Quadro 8.

QUADRO 8 - Resumo das Condições Usadas em 3.15.2.

Solução de Extrato de Antocianinas a pH 3,0 (ml)	Ácido Tânico (mg)	Nitrogênio	Luz/ Escuro	Número de Tubos
10 (8,7 mg)*	80	+	luz	20
10	80	+	escuro	20
10	-	+	luz	20
10	-	+	escuro	20

* - (mg) de antocianinas em 10 ml de solução.

3.15.3. Efeito da Luz Sobre as Antocianinas em pH 4,0

Foi utilizada uma solução contendo 1,5 g de extrato de antocianinas (3.1.), em 100 ml de tampão citrato/fosfato a pH 4,0. As condições experimentais foram as mesmas daquelas descritas em 3.15.1., e a distribuição dos tubos está resumida no Quadro 9.

QUADRO 9 - Resumo das Condições Experimentais Usadas em 3.15.3.

Solução de Extrato de Antocianinas a pH 4,0 (ml)	Ácido Tânico (mg)	Nitrogênio	Luz/Escuro	Número de Tubos
10 (8,7 mg)*	80	+	luz	20
10	80	+	escuro	20
10	-	+	luz	20
10	-	+	escuro	20

* - (mg) de antocianinas em 10 ml de solução.

3.16. Efeito de Luz e Oxigênio Sobre as Antocianinas a pH 2,0, 3,0 e 4,0

Soluções contendo 1,5 g de extrato de antocianinas (3.1.), em 100 ml de tampão citrato/fosfato a pH 2,0, 3,0 e 4,0, foram utilizadas para este experimento.

As condições experimentais utilizadas foram as mesmas daquelas descritas em 3.15.1., alterando-se apenas a atmosfera interna dos tubos de ensaio, que neste caso foi mantida com

saturação de oxigênio através de um fluxo do gás antes do fechamento dos frascos.

O Quadro 10 indica a distribuição e a composição dos tubos utilizados para as soluções de antocianinas a pH 2,0, 3,0 e 4,0.

3.17. Efeito da Temperatura Sobre as Antocianinas

Foram utilizados frascos ambar de 60 ml providos de tampa de borracha autosealante e lacre de alumínio e em cada frasco foram adicionados 40 ml de uma solução do extrato de antocianina (3.1.), na concentração de 15 mg de extrato/ml de solução, preparadas em tampão citrato/fosfato a pH 2,0. À metade dos frascos, adicionou-se 320 mg de ácido tânico. Todos os frascos antes do fechamento foram submetidos a um fluxo de nitrogênio. Após repouso de duas horas a temperatura de $25 \pm 0^{\circ}\text{C}$, foram determinados os espectros de absorção (350 a 650 nm) e os valores de absorbância no comprimento de onda de

QUADRO 10 - Resumo das Condições Usadas em 3.16.

Solução de Extrato de Antocianinas (ml)	Ácido Tânico (mg)	Nitrogênio	Luz/ Escuro	Número de Tubos
10 (8,7 mg)*	80	+	luz	20
10	80	+	escuro	20
10	-	+	luz	20
10	-	+	escuro	20

* - (mg) de antocianinas em 10 ml de solução.

máxima absorção. A retirada das amostras foi feita, com auxílio de uma seringa comum de injeção, sempre substituindo o volume de amostra retirado para leitura, com igual volume de nitrogênio.

Após a leitura inicial, três dos frascos contendo as antocianinas adicionadas de ácido tânico, foram colocadas em banho termostatizado a $35 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ e protegidos da luz. Os dois frascos restantes, foram mantidos sob refrigeração a $3 \pm 1^{\circ}\text{C}$. O mesmo procedimento foi feito com os frascos que continham a solução de antocianinas, sem a adição de ácido tânico.

A leitura das absorbâncias foram feitas duas vezes ao dia durante um período mínimo de sete dias.

Todos os procedimentos descritos neste item, para pH 2,0, foram repetidos para as soluções de extrato de antocianinas solubilizadas em tampão a pH 3,0 e 4,0.

O Quadro 11 resume as condições experimentais utilizadas para a temperatura de 35°C .

Todos os procedimentos descritos neste item (3.17.), foram repetidos para as temperaturas de 45° e 55°C e as condições experimentais estão resumidas no Quadro 11.

3.18. Efeito do Fe^{+++} (FeCl_3)

Para se verificar o efeito da adição de íons Fe^{+++} sobre a estabilidade das antocianinas, foram preparadas soluções contendo 2 g de extrato de antocianinas (3.1.), em 100 ml de tampão KCl/HCl a pH 2,0, 3,0 e 4,0.

QUADRO 11 - Resumo das Condições Experimentais Usadas em 3.17.

pH	Solução de Extrato de Antocianinas (ml)	Ácido Tânico (mg)	Temperatura (°C)
2,0	40 (34,8 mg)*	320	35
2,0	40	320	35
2,0	40	320	35
2,0	40	320	3
2,0	40	320	3
2,0	40		35
2,0	40		35
2,0	40		35
2,0	40		3
2,0	40		3
3,0	40	320	35
3,0	40	320	35
3,0	40	320	35
3,0	40	320	3
3,0	40	320	3
3,0	40		35
3,0	40		35
3,0	40		35
3,0	40		3
3,0	40		3
4,0	40	320	35
4,0	40	320	35
4,0	40	320	35
4,0	40	320	3
4,0	40	320	3
4,0	40		35
4,0	40		35
4,0	40		35
4,0	40		3
4,0	40		3

* - (mg) de antocianina em 40 ml de solução.

A solução contendo antocianinas foi colocada em tubos de ensaio, acrescentando em parte deles, o ácido tânico (80 mg). A todos os tubos adicionou-se volumes variáveis de uma solução de FeCl_3 , contendo 1% de Fe^{+++} . A uma das amostras adicionadas de ácido tânico e outra com antocianina apenas, não se adicionou o FeCl_3 .

Após a homogenização das amostras e um repouso de 6 horas, obteve-se o espectro de absorção entre 350 a 700 nm de cada um dos tratamentos, repetindo-se a cada 24 horas de reação.

O Quadro 12 mostra resumidamente as condições experimentais utilizadas para cada pH.

QUADRO 12 - Resumo das Condições Experimentais Usadas em 3.18.

Tratamentos	Solução de Extrato de Antocianinas (ml)	Ácido Tânico (mg)	Fe^{+++} (1 %) (ml)
1	10 (11,6 mg) *	80	0,000
2	10	80	0,005
4	10	80	0,010
4	10	80	0,015
5	10	80	0,020
6	10	80	0,025
7	10	80	0,030
8	10	-	0,000
9	10	-	0,005
10	10	-	0,010
11	10	-	0,015
12	10	-	0,020
13	10	-	0,025
14	10	-	0,030

* - (mg) de antocianina em 10 ml de solução.

3.19. Efeito do Cu^{++} (CuCl_2)

Para o estudo do efeito da adição de Cu^{++} sobre as soluções de antocianinas, foram utilizadas soluções de 2 g de extrato de antocianinas (3.1.) dissolvidas em 100 ml de tampão KCl/HCl pH 2,0, 3,0 e pH 4,0.

A uma parte da solução de extrato (10 ml) de antocianinas, foi adicionado 80 mg de ácido tânico. Em todas as amostras foram acrescentados volumes variáveis de uma solução de CuCl_2 contendo 10% de íons Cu^{++} .

O desenvolvimento do experimento foi feito da mesma maneira que aquela descrita em 3.18.

O Quadro 13 resume as condições experimentais utilizadas.

QUADRO 13 - Resumo das Condições Experimentais Usadas em 3.19.

Tratamentos	Solução de Extrato de Antocianinas (ml)	Ácido Tânico (mg)	Cu^{++} (10 %) (ml)
1	10 (11,6 mg) *	80	0,000
2	10	80	0,010
3	10	80	0,020
4	10	80	0,030
5	10	80	0,040
6	10	-	0,000
7	10	-	0,010
8	10	-	0,020
9	10	-	0,030
10	10	-	0,040

* - (mg) de antocianina em 10 ml de solução.

3.20. Efeito do HSO_3^-

A identificação do efeito do íon HSO_3^- , sobre as antocianinas, adicionadas ou não de ácido tânico, seguiu o mesmo procedimento descrito em 3.18., adicionando-se volumes variáveis de uma solução de NaHSO_3 com uma concentração de 1% de SO_2 .

O Quadro 14 resume as condições experimentais utilizadas para os pH 2,0, 3,0 e 4,0.

QUADRO 14 - Resumo das Condições Experimentais Usadas em 3.20.

Tratamentos	Solução de Extrato de Antocianinas (ml)	Ácido Tânico (mg)	HSO_3^- (1 %) (ml)
1	10 (11,6 mg)*	80	0,000
2	10	80	0,005
3	10	80	0,010
4	10	80	0,020
5	10	80	0,040
6	10	-	0,000
7	10	-	0,005
8	10	-	0,010
9	10	-	0,020
10	10	-	0,040

* - (mg) de antocianina em 10 ml de solução.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Purificação do Extrato de Antocianina

Normalmente, as plantas apresentam misturas de antocianinas e conseqüentemente sua separação e purificação apresenta dificuldades quando se utiliza cromatografia em papel, placa ou coluna (Wrolstad & Struthers, 1971). A necessidade de se obter material suficiente para o presente trabalho, levou-nos a optar pelo uso de cromatografia em coluna pela maior capacidade de purificação desta técnica em relação à cromatografia em papel ou placa.

Após ensaios preliminares, optou-se por utilizar o solvente metanol: água (70:30), acidulado com HCl 0,01% para a separação das antocianinas na coluna de PVP (polivinilpirrolidona) e, a eficiência da separação das frações do extrato de antocianinas pode ser vista na representação esquemática da coluna de PVP (Figura 12).

Os resultados demonstram que o uso da mistura metanol: água como solvente, e do PVP como adsorvente, representa uma

boa técnica preparativa para a separação de misturas de antocianinas de capim gordura (M. minutiflora).

As zonas 2 e 3 (Figura 12), foram selecionadas por apresentarem coloração mais intensa e melhor separação. A zona 1, foi eliminada por apresentar uma coloração vermelho fraca, indicando baixa concentração de pigmentos. As zonas vermelhas 4, 5 e 6, foram excluídas pela dificuldade de eluição, associada à fraca intensidade de coloração dessas zonas.

As zonas selecionadas 2 e 3, foram denominadas frações F1 e F2 respectivamente, para efeito de discussão neste trabalho.

As frações F1 e F2 quando cromatografadas em papel Whatman nº 3 com HCl 1% como solvente (3.2.), apresentaram uma única zona colorida. Entretanto, após o tratamento do cromatograma com NH_3 , verificou-se que a única zona de cor avermelhada nos cromatogramas se localizava entre duas zonas amarelas de flavonóides (Figura 13). Este fato indica que, pelo menos parte dos flavonóides não antociânicos presentes no extrato das antocianinas não separável com coluna de PVP, pode ser separada por cromatografia em papel usando HCl 1% como solvente.

A recromatografia em papel Whatman 3 MM da parte central da fração F2, e o desenvolvimento do cromatograma em BAW (3.3.) forneceu duas zonas distintas A e B (Figura 14). A exposição do cromatograma ao NH_3 mostrou a presença de uma única zona amarela de flavonóides não antociânicos, localizada próximo à origem do cromatograma e separada das zonas vermelhas A e B.

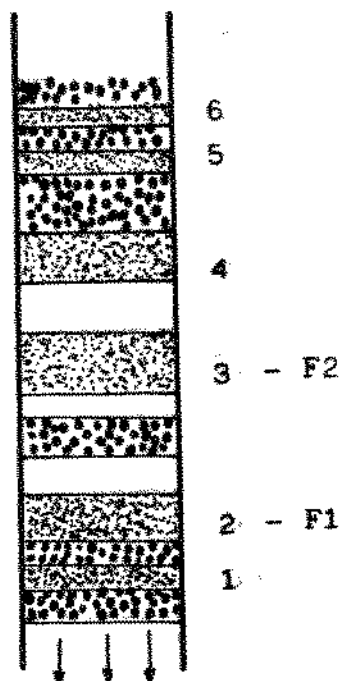


FIGURA 12 - Representação Esquemática da Separação das Antocianinas em Coluna de PVP Desenvolvida por Metanol: H_2O (70:30).

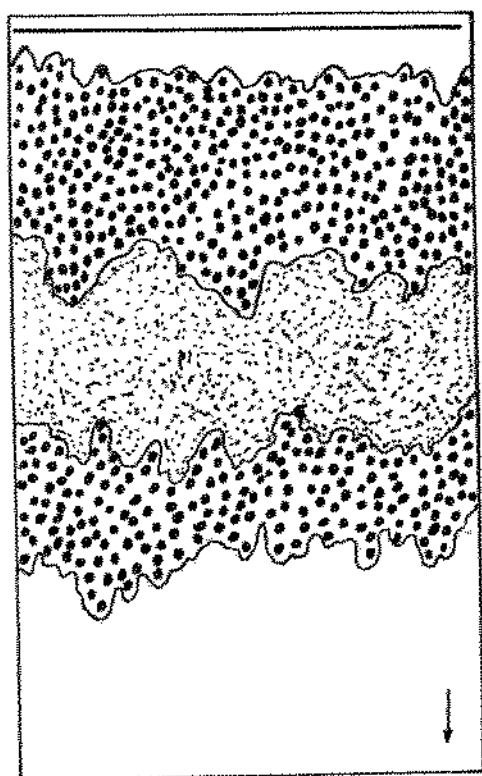


FIGURA 13 - Cromatograma da Fração F2 em Papel Desenvolvida por HCl 1%.

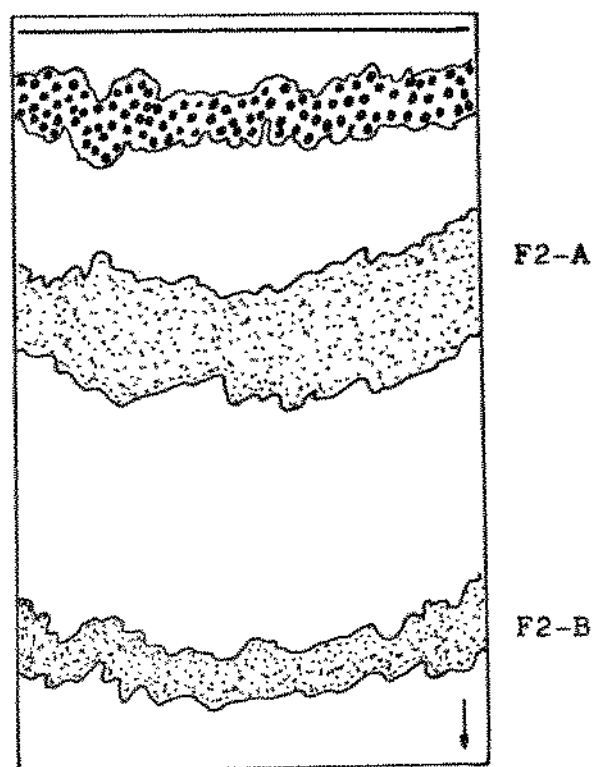


FIGURA 14 - Cromatograma da Fração F2 em Papel Desenvolvida por Baw (6:1:2)

As mesmas zonas A e B foram obtidas com a recromatografia da fração F1.

Os resultados da cromatografia em papel Whatman nº 1, das frações obtidas na purificação do extrato (3.3.), usando BFW e BAW, como solventes mostram que as frações F1 e F2 são constituídas dos mesmos pigmentos formados pelas zonas A e B (Figura 15), os quais apresentam diferentes mobilidades no papel para os dois solventes utilizados. A Figura 15, mostra que a diferença entre as frações F1 e F2 está na presença de maiores quantidades de compostos flavonóides não antociânicos na fração F2 em relação à fração F1.

Na Figura 16, estão representados os cromatogramas (HPLC) das frações F1 e F2. Os cromatogramas mostram que tanto a fração F1 como a fração F2 são formadas cada uma por duas frações distintas com tempo de retenção iguais, indicando a identidade entre os componentes das frações F1 e F2.

Os espectros do "Extrato", das frações F1 e F2 e das zonas A e B se encontram na Figura 17, onde se pode observar a semelhança dos espectros das frações F1 e F2 e a diferença dos espectros entre essas frações e aquelas das zonas A e B.

A diferente mobilidade na coluna de PVP das frações F1 e F2 pode ser atribuída a uma maior proporção de flavonóides não antociânicos associados às antocianinas na fração F2. Esta associação pode retardar a eluição da fração F2 em função de uma estrutura em que há um aumento dos grupos potencialmente capazes de se ligarem ao PVP. Estes flavonóides não antociânicos somente são separados quando as frações são cromatografadas em papel (3.3.).

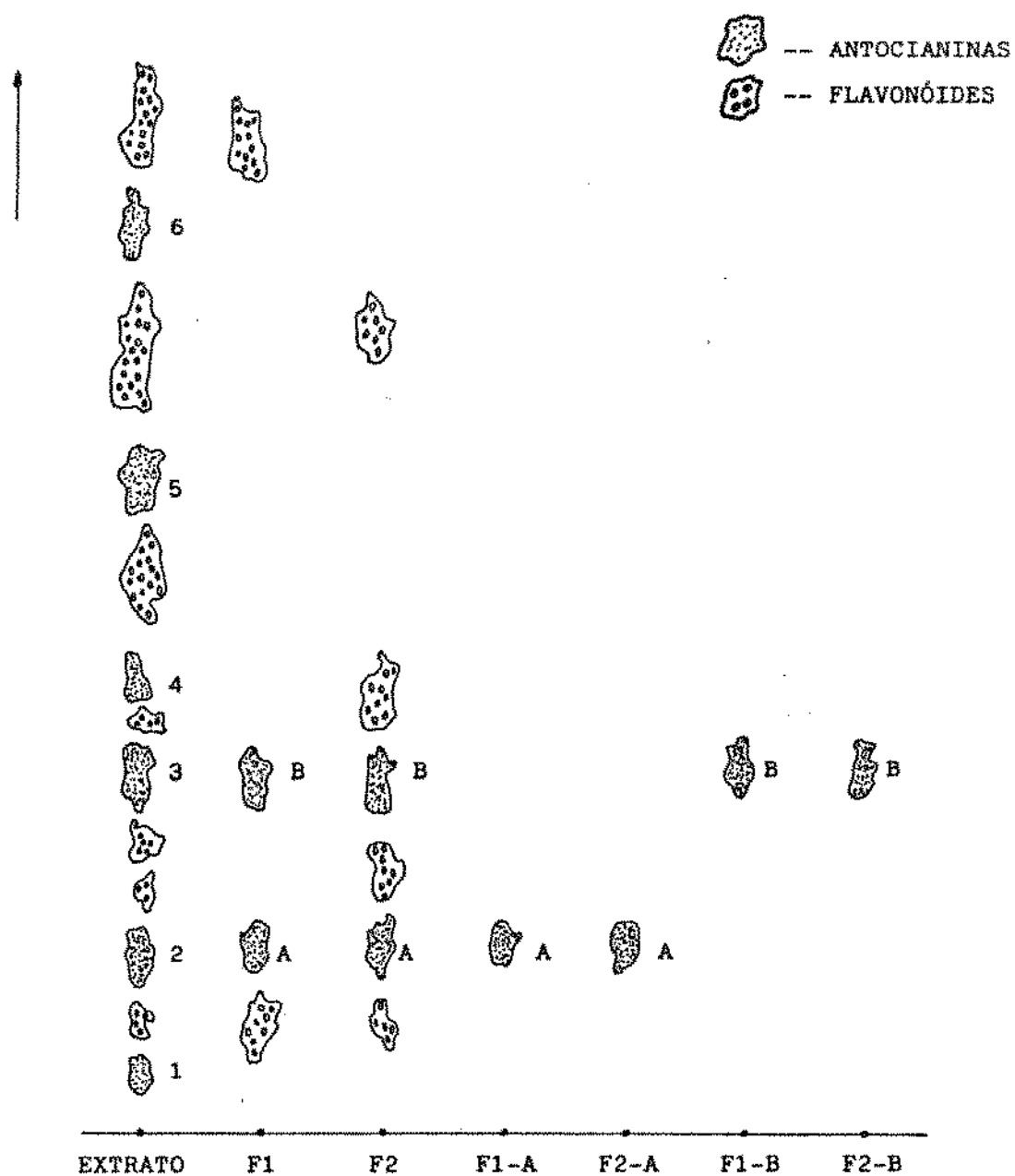


FIGURA 15 - Cromatograma das Frações de Antocianinas Eluidas com BFW (15:2,5:2,4) em Papel Whatman 1, por 72 horas.

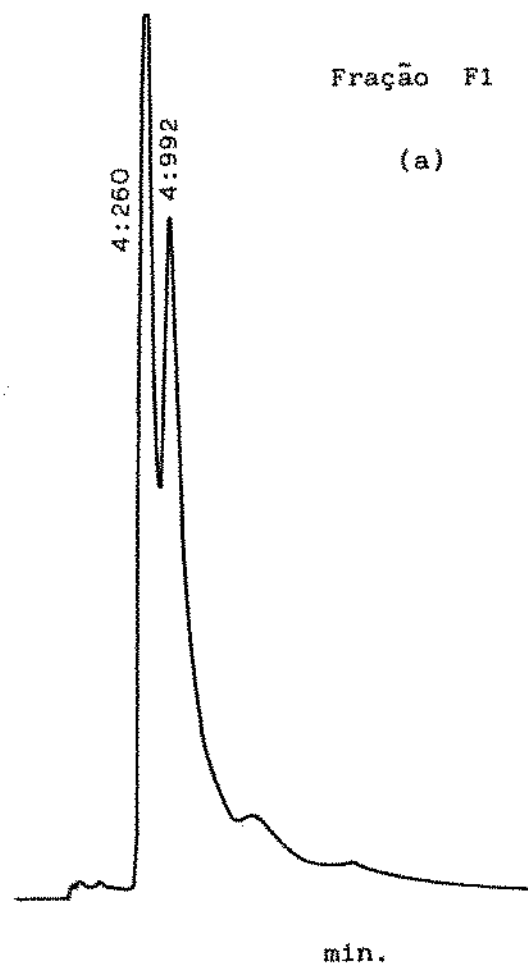
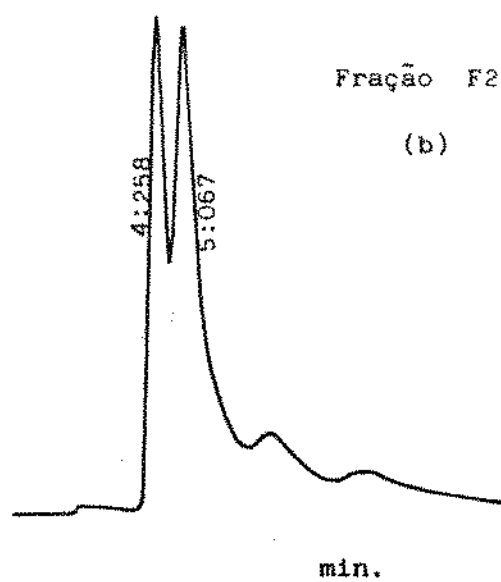


FIGURA 16 - Cromatogramas Obtidas por HPLC das Frações F1 e F2.

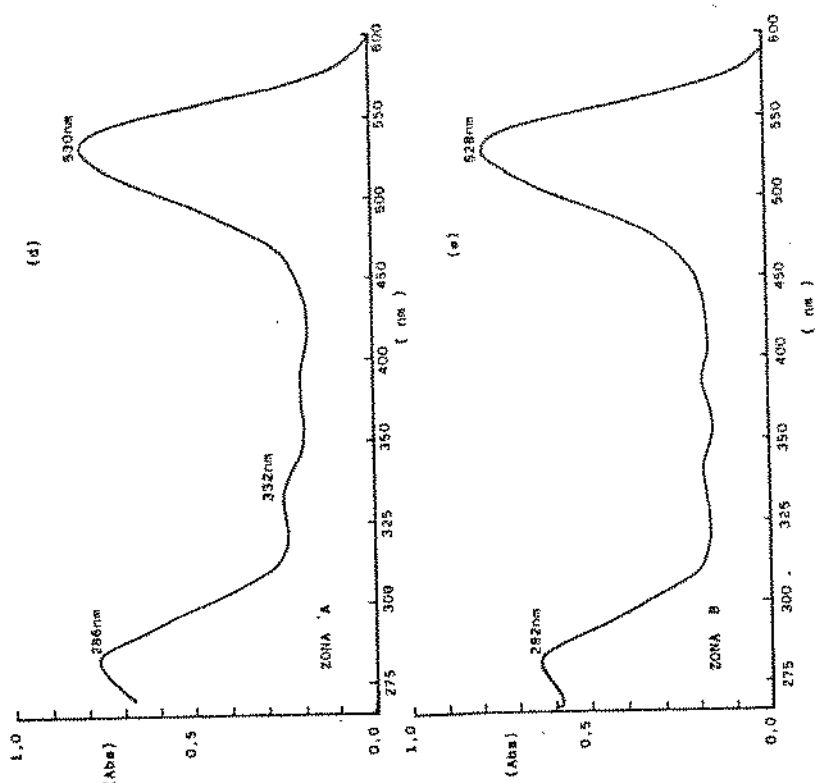
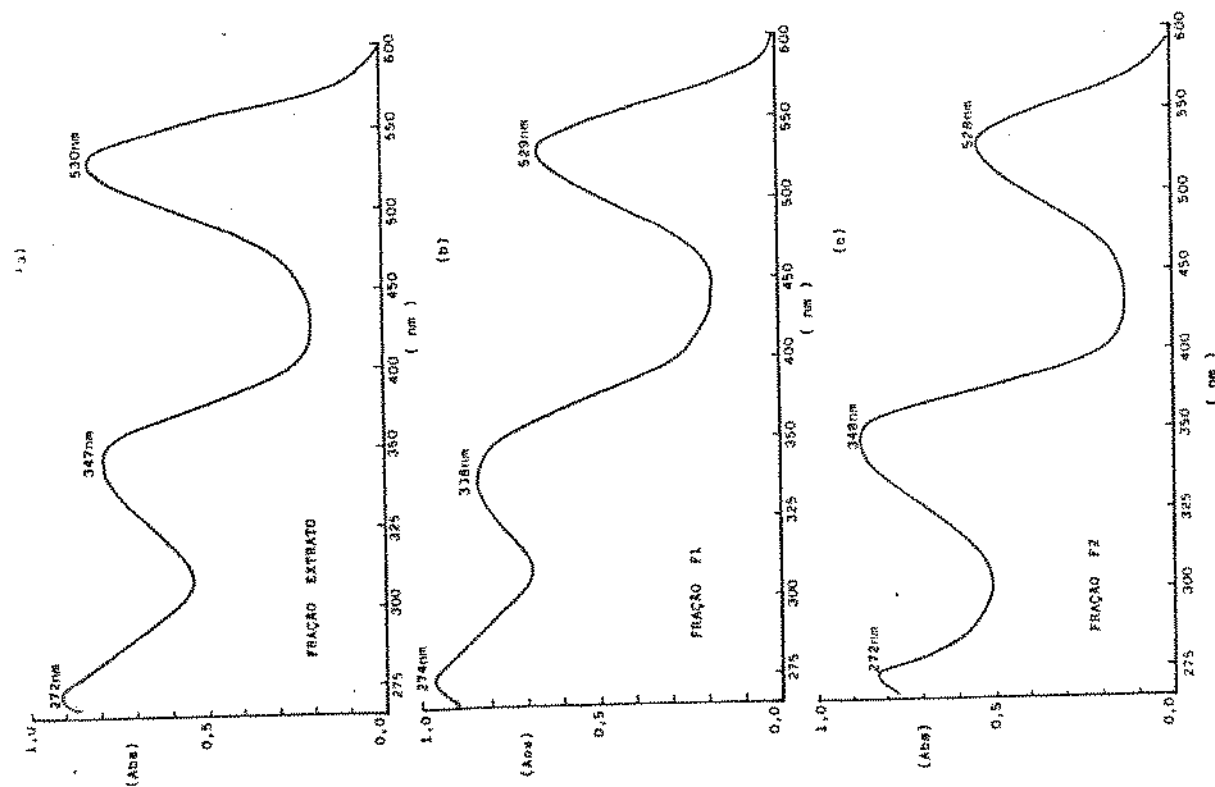


FIGURA 17 - Espectro de Absorção UV-Visível do Extrato de Antocianinas Ex (a) das Frações F1 (b); F2 (c); e das Zonas A (d) e B (e).

O progresso na separação cromatográfica do "Extrato", das frações F1, F2 e da zona A, pode ser observado pelas diferenças apresentadas nos cromatogramas da Figura 18. Os cromatogramas confirmam a presença dos mesmos pigmentos nas frações F1 e F2 e mostram a forte absorção na região do UV da fração "Extrato" e a sua diminuição após as etapas de purificação.

Os cromatogramas das frações F1 e F2 mostram uma redução no n^o de picos em relação ao "Extrato" (Figura 18) resumindo-se praticamente a um pico a 520 nm, para ambas as frações. Os espectros a 280 nm mostram que os compostos que absorvem na região do UV estão em menor quantidade na fração F1 do que na fração F2, confirmando desta maneira as observações baseadas no cromatograma da Figura 15, onde a fração F1 mostra a presença de menor quantidades de flavonóides não antociânicos associados às antocianinas.

O cromatograma da zona A (Figura 18), mostra uma fração pura tanto a 520 nm como a 280 nm, indicando que a purificação do pigmento utilizando coluna de PVP, seguida de cromatografia em papel como os solventes HCl e BAW (exp. n^o 3), são técnicas que permitem a purificação de antocianinas extraídas de capim gordura (*M. minutiflora*) e de outras fontes, conforme preconiza Francis (1967) e Francis *et al* (1966).

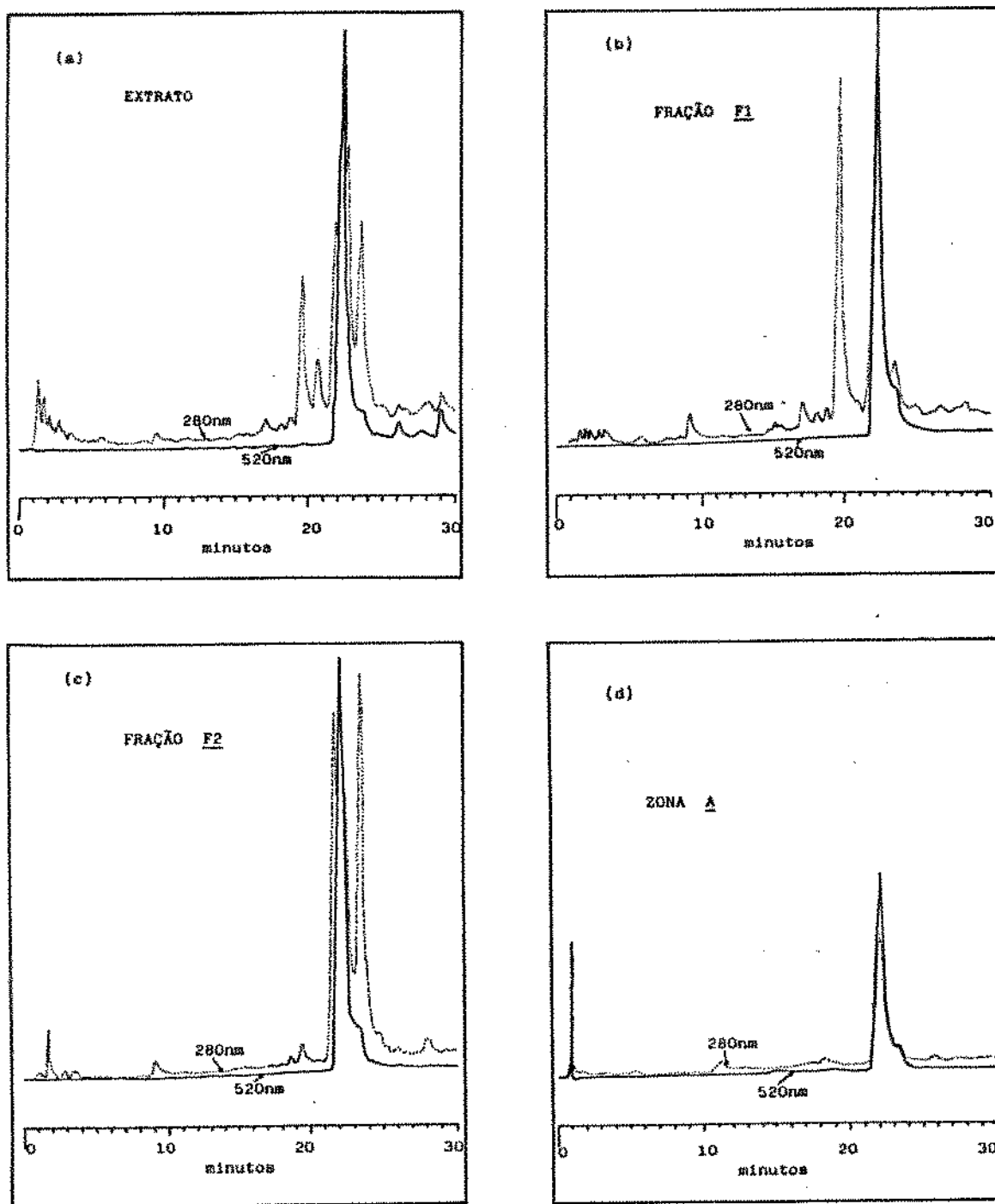


FIGURA 18 - Cromatogramas Obtidos por HPLC das Frações de Antocianinas a 520 nm e a 280 nm.

4.2. Identificação da Estrutura da Zona A

A solução contendo os açúcares livres da zona A hidrolizada (3.4.) após ter sido cromatografada em papel, juntamente com padrões de açúcares, mostram a presença de glucose e arabinose, confirmada pela co-cromatografia e pelos Rf, em dois diferentes solventes, conforme os dados do Quadro 15.

A possibilidade da arabinose estar presente por ser um artefato do processo de purificação utilizando o HCl 1X como solvente (Francis, 1984), foi eliminada pela ausência desse açúcar no cromatograma da zona A antes da hidrólise ácida.

As antocianinas que apresentam reação positiva com cloreto de alumínio com deslocamento batocrômico de 13 a 25 nm, dependendo do pH do meio, possuem em sua estrutura grupos orto-dihidroxílicos no anel B, como é o caso das cianidinas e delphinidinas (Harborne, 1964).

No Quadro 15, estão os valores dos Rf da aglicona em tres diferentes solventes e os valores de Rf nos mesmos solventes para cianidina, fornecidos pela literatura (Mullick & Brink, 1967). Os valores comparativos de Rf, a reação positiva com cloreto de alumínio com deslocamento batocrômico de 28 nm e o comprimento de onda de máxima absorção de 528 nm (Harborne, 1958a), indicam a presença de uma cianidina como a antocianidina da zona A purificada.

A relação percentual entre Abs 440 nm/Abs λ máx. para o pigmento da zona A chegou a 27,0 (Quadro 15), indicando que os

QUADRO 15 - Características Cromatográficas (R_F e R_G) e Espectrais dos Produtos de Hidrólise da Zona Purificada A.

	BAW	AWH	FORESTAL	TAE	ETAC-PY.W.
Aglicona	0,67	0,10	0,48		
Ácido	0,83			0,40	
Açúcar 1	0,98				0,99
2	1,14				1,36
Cianidina ^a	0,68	0,11	0,49		
Glucose	1,00				1,00
Arabinose	1,16				1,34
Ácido Cafeico	0,85			0,37	
Vis máx. (nm)			528		
UV máx. (nm)			286 (334)		
Vis com AlCl ₃ (nm)			556 (+28)		
Abs 440 nm			27,0		
			(%)		
Abs Vis λ máx.					
BAW	- n-butanol - ác. acético - água			(6:1:2)	
AWH	- ác. acético - água - 12 NHCl			(15:82:3)	
FORESTAL	- ác. acético - conc. HCl - água			(30:3:10)	
TAE	- Tolueno - ác. acético - éter			(15:3:1)	
ETAC-PY.W.	- Acetato etila - Piridina - água			(8:2:1)	
a - Segundo Mullick & Brink (1967).					

açucares estão ligados em C-3 da aglicona, no caso a cianidina (Harborne, 1958b).

A existência de uma molécula de açúcar em C-3 de uma cianidina faz com que a relação percentual Abs 440 nm/Abs λ máx. alcance valores superiores a 25,0 (Francis, 1984).

O valor de 528 nm obtido para o λ máx. deste pigmento (Quadro 15), está de acordo com os valores citados por Harborne (1958a) para a cianidina.

O espectro UV da zona A (Figura 17d) mostra o pico característico de antocianinas a 286 nm e um pico menor a 334 nm.

Estes dados indicam, segundo Shrinkland (1977), a presença de ácido na molécula da antocianina. Em 1974 Srikellariades identificou ácido cumárico em antocianina da uva pela presença de pico, ainda que pouco acentuado, na faixa de 300 a 330 nm.

O espectro da zona A (Figura 17d) apresenta na região de 334 nm um "ombro", que foi considerado indicativo de uma antocianina acilada. A presença de ácido cafeico na molécula da cianina do capim gordura foi confirmada de diferentes maneiras: em primeiro lugar, pela resistência a hidrólise ácida para cujo início foram necessários 50 minutos de reação e que segundo Hall (1966) e Harborne (1965) é o tempo aproximado para a hidrólise de glicosídeos ou diglicosídeos acilados. Em segundo lugar, os dados da cromatografia em camada delgada no Quadro 15 mostram que o ácido tem os mesmos valores de R_f do ácido cafeico. Finalmente, a cromatografia (Figura 19) e a cocromatografia (Figura 20) do hidrolizado alcalino da zona A em HPLC, mostram que o tempo de retenção é o mesmo do ácido cafeico, e que, houve aumento da área do pico desse ácido na cocromatografia. Também deve ser considerada a ausência de ácidos livres antes da hidrólise alcalina da solução da zona A, como pode ser observado pelo cromatograma do HPLC dessa solução (Figura 19c).

Os dados obtidos para o tipo de aglicona e substituintes na molécula da antocianina da zona A purificada, nos levam a definir a estrutura da antocianina como uma cianidínia-3-cafeoil-glicosil-arabinose.

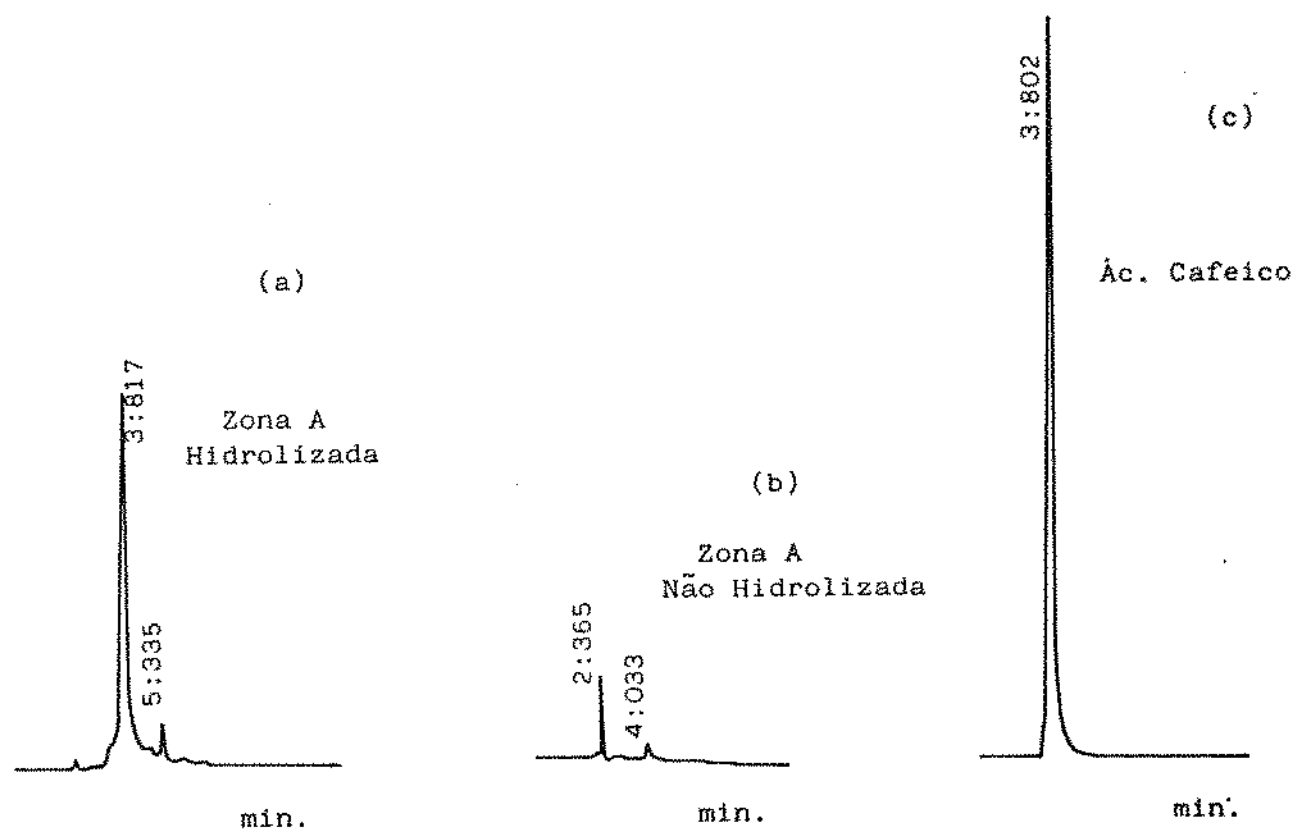


FIGURA 19 - Cromatogramas Obtidos por HPLC do Produto da Hidrólise Alcalina da Zona A (a); da Zona A antes da Hidrólise (b) e do Padrão do Ácido Cafeico (c).

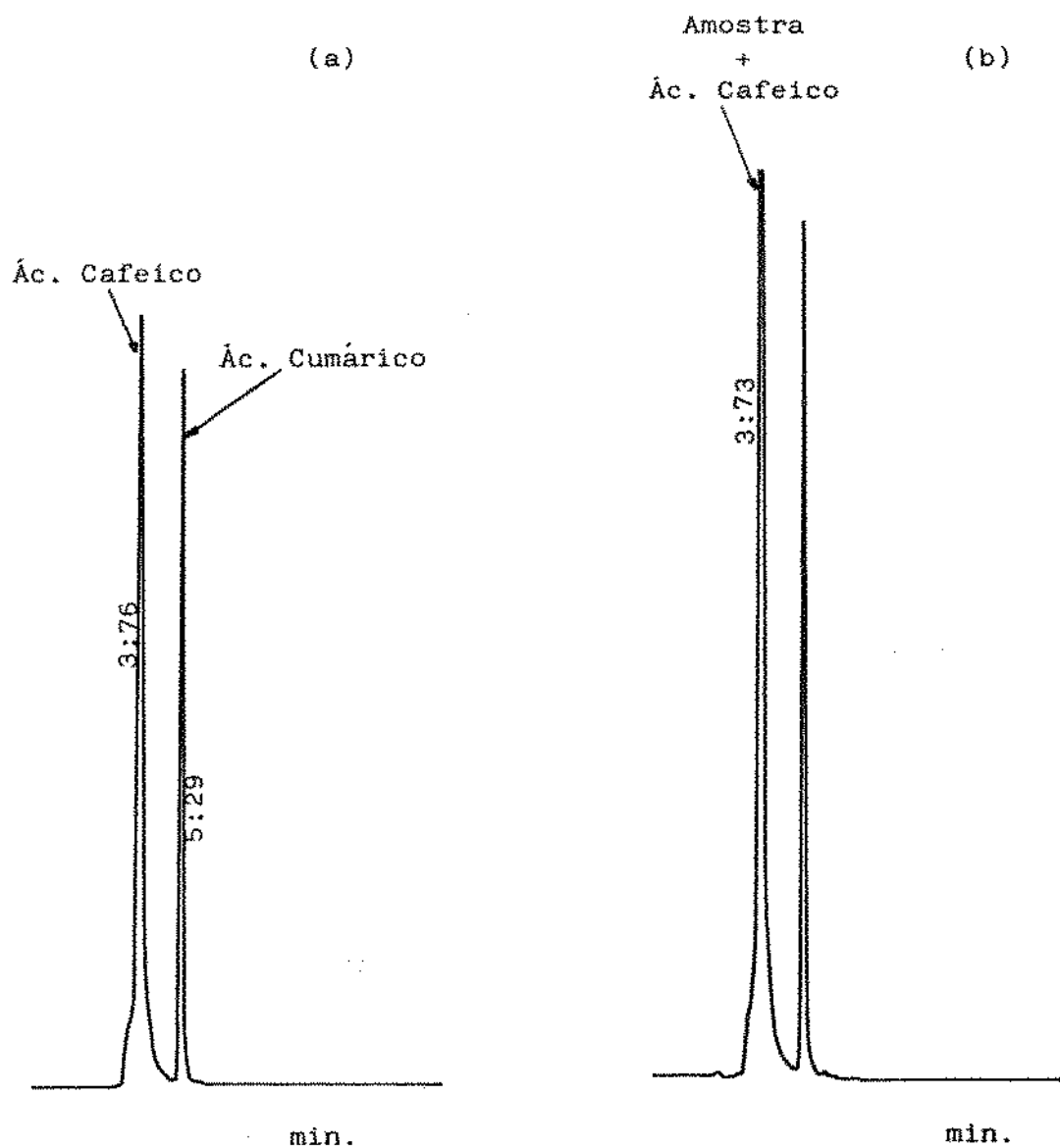


FIGURA 20 - Co-cromatografia (HPLC) do Ácido Cafeico com o Hidrolizado da Zona A (b) e a Cromatografia do Padrão do Ácido Cafeico.

4.3. Estabilidade das Antocianinas

As possibilidades de aplicação de corantes naturais em substituição aos corantes sintéticos apresenta alguns fatores limitantes, dentre os quais podemos citar: toxidez, cor e estabilidade bem como os custos para obtenção do corante natural.

A inocuidade das antocianinas consumidas por homens e pelos animais em quantidades apreciáveis, através da ingestão de vegetais (frutas, flores e sementes) por inúmeras gerações, parece ser um fato estabelecido. Uma vez encontrada uma fonte produtora de antocianinas da cor e tonalidade desejada, resta ainda estudar a sua estabilidade e a viabilidade econômica da sua produção.

A existência de uma fonte produtora de antocianinas que tenha um só componente antociânico é caso excepcional. Normalmente, o extrato antociânico contém várias antocianinas com diferentes tonalidades e em concentrações muito diferentes. Sua separação é difícil e atualmente não seria economicamente viável.

Assim, após estudar a extração dos pigmentos do capim gordura (M. minutiflora) e a composição das duas mais importantes frações antociânicas, presentes no extrato foi estudada a estabilidade destas frações frente aos agentes que mais afetam as antocianinas: luz e pH.

Além do extrato de antocianinas (3.1.), foram utilizadas as frações F1 e F2 (3.2.) e as zonas A e B (3.3.).

4.3.1. Efeito da Luz na Estabilidade do Extrato, Frações F1 e F2 e Zonas A e B

Os resultados do efeito da luz em diferentes pH sobre as antocianinas do capim gordura estão resumidos no Quadro 16 e na Figura 21.

QUADRO 16 - Valores de $k(hs^{-1})$ e $t_{1/2}$ (hs) para as Antocianinas a pH 2,0, 3,0 e 4,0, e das Relações k_{Luz}/k_{escuro} , para as Frações "Extrato", F1 e F2 e para as Zonas A e B em Atmosfera de Nitrogênio

pH	Extrato		"F1"		"F2"		"A"		"B"	
	Luz	Escuro	Luz	Escuro	Luz	Escuro	Luz	Escuro	Luz	Escuro
2,0										
k^*	0.8941	0.0187	0.5040	0.0044	0.0969	0.00464	1,6202	0.00461	1,669	0.00462
$t_{1/2}$	78	3706	137	15750	715	14.935	43	15.002	42	14.998
$\frac{k_{Luz}}{k_{escuro}}$	47,5		115,0		21,9		348,9		357,1	
3,0										
k^*	1.498	0.447	1.2085	0.0143	0.4777	0.00462	3.0737	0.00484	2.9930	0.00462
$t_{1/2}$	46	479	57	4846	145	14.993	23	14.318	23	15.000
$\frac{k_{Luz}}{k_{escuro}}$	10,4		85,0		103,4		622,15		652,2	
4,0										
k^*	2.1017	0.2890	1.805	0.08743	0.7727	0.0301	2.7686	0.4122	3.6405	0.5284
$t_{1/2}$	33	240	38	793	90	2302	25	168	19	131
$\frac{k_{Luz}}{k_{escuro}}$	7,3		20,9		25,6		6,7		6,9	

* Valores de $k(h^{-1}) \times 10^{-2}$.

Foram estudados os efeitos da luz: a) sobre o extrato (Ex) que é rico em impurezas representadas pelos ácidos, açúcares e demais compostos presentes na inflorescência do vegetal e extraídos com metanol acidificado; b) sobre as frações F1 e F2 que representam produtos livres da maior parte dessas impurezas, mas, contendo flavonóides não antociânicos que podem estar complexados com as antocianinas tal como no extrato (Ex), c) sobre as zonas A e B que são antocianinas puras.

Os resultados resumidos no Quadro 16 mostram que a pH 2,0, a luz afeta significativamente o extrato (Ex), as frações F1 e F2 e as zonas A e B purificadas, já que os valores de k_{luz} são muito maiores que aqueles para as antocianinas que permaneceram no escuro (k_{escuro}). Para a fração F2, o valor de k_{luz} é muito menor que para as outras frações, com uma correspondente elevação do tempo de meia vida ($t_{1/2}$).

As frações purificadas como aquelas das zonas A e B, apresentam uma velocidade de degradação (k) muito elevada, com aumento nos valores das relações de:

$$\frac{k_{A_{\text{luz}}}}{k_{A_{\text{escuro}}}} \text{ e } \frac{k_{B_{\text{luz}}}}{k_{B_{\text{escuro}}}}$$

Os resultados no Quadro 16 mostram que o $t_{1/2}$ quando em presença de luz e nos três diferentes pH segue a mesma ordem decrescente para F2, F1, Ex, A e B, com alteração entre A e B a pH 4,0. Assim, a presença de flavonóides não antociânicos é efetiva na preservação das antocianinas mas, no extrato, a presença de impurezas em maior proporção e deversidade pode

ser responsável pelo decrescimo na estabilidade, inibindo o efeito dos flavonóides não antociânicos.

Quando se examinam os resultados obtidos na ausência de luz, o efeito do pH torna-se aparente, bem como a falta de efeito dos flavonóides não antociânicos, que atuam protetivamente sobre as antocianinas em presença de luz. A pH 2,0 e 3,0, as impurezas presentes no extrato devem atuar intensamente na degradação das antocianinas, não sendo possível explicar as diferenças entre os dois pH's em base aos dados da literatura ou daqueles aqui apresentados.

É de interesse mostrar que o comportamento das frações e zonas antociânicas a pH 4,0, no escuro, difere totalmente daquele mostrado a pH 2,0 e a pH 3,0 mas, é praticamente o mesmo daquele encontrado em presença de luz, a pH 4,0 indicando que tanto no escuro como na luz o efeito do pH é o mais efetivo em relação as alterações nas absorbâncias das antocianinas a pH 4,0 e que, possivelmente, as transformações estruturais sejam muito semelhantes nesse pH, ao contrário do que ocorre com pH mais ácido.

A pH 4,0, todas as relações k_{luz}/k_{escuro} mostram valores comparativamente menores em função do próprio aumento da velocidade de degradação das antocianinas no escuro para este pH. Nesse pH, todas as frações exceto a F2, não suportaram o efeito da luz associado ao pH fracamente ácido, com uma degradação quase total das antocianinas durante o período do experimento.

A reduzida estabilidade das zonas purificadas A e B, que são antocianinas puras e a estabilidade maior de F1 em relação a F2 comprovam o efeito protetor dos flavonóides não antociânicos.

Pela Figura 21, observa-se que a pH 2,0, apenas a fração "Extrato" apresenta alguma alteração no espectro de absorção. Todas as outras frações permanecem inalteradas, apesar da zona "A" e da zona "B" apresentarem taxas elevadas de degradação, indicando que a perda de antocianinas não resulta na formação de outros compostos estáveis e coloridos. A pH 3,0, as zonas A e B, além da fraca estabilidade, apresentam uma grande alteração no espectro de absorção no visível, quando expostas à luz, sendo que a zona "B" reflete o efeito com menor intensidade (Figura 21). Todas elas, apresentam acentuada degradação da cor. A fração "Extrato" e as zonas "A" e "B" a pH 4,0, sofrem alterações na absorbância no visível quando expostas à luz (Figura 21). A fração F2, manteve seu espectro de absorção sem nenhuma alteração até o final do experimento. Assim, a pH 4,0, sob efeito de luz, há uma completa degradação da molécula na maioria das frações de antocianinas, uma vez que a associação do pH fracamente ácido com a luz é danoso, tanto para a estabilidade, como para o padrão característico do espectro de absorção no visível das antocianinas do capim gordura (M. minutiflora).

Os resultados indicam que o efeito destruidor da luz se faz sentir em todas as frações com considerável intensidade mas também, está estreitamente ligado ao efeito do pH, que provoca mudanças nas proporções das várias estruturas, AH^+ , Q ,

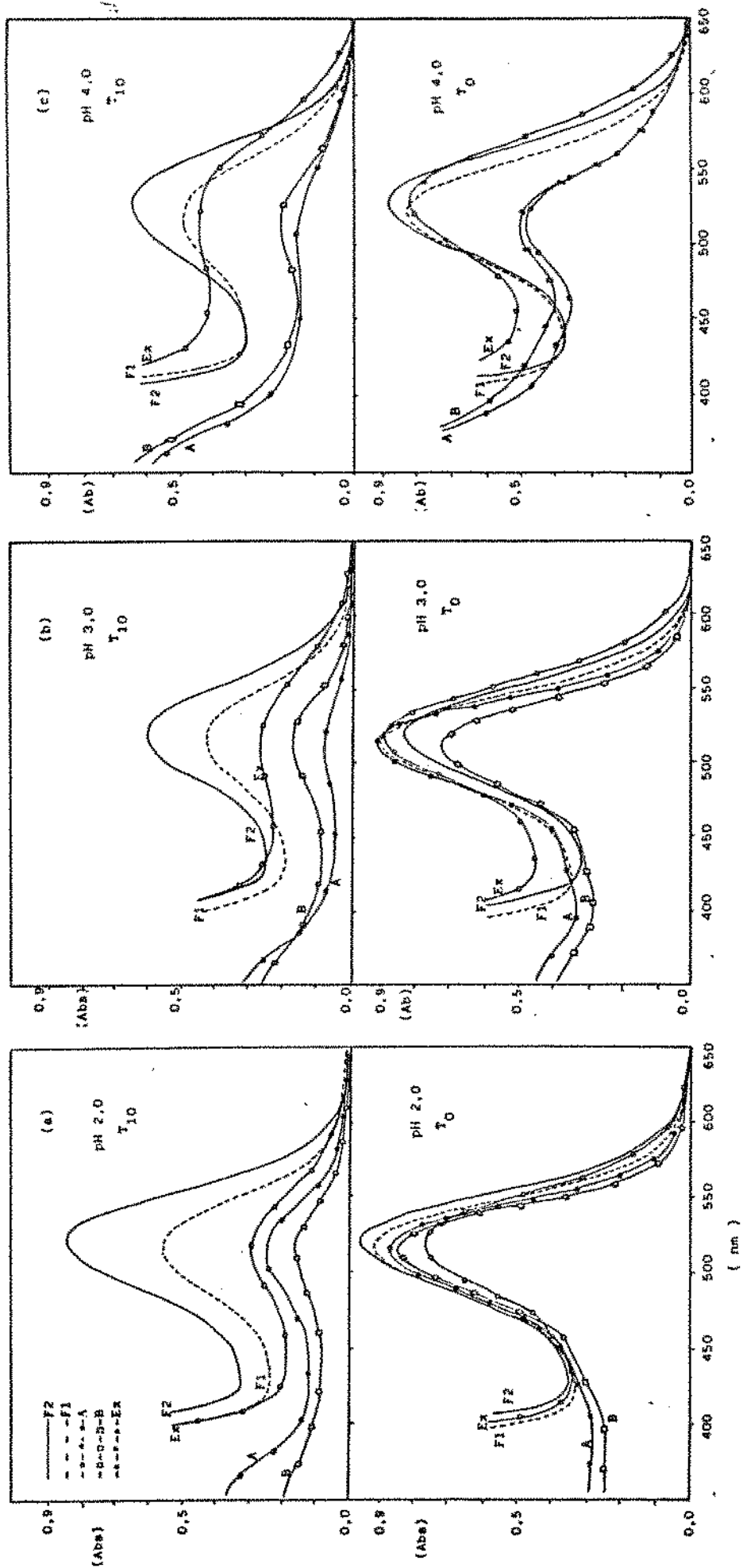


FIGURA 21 - Espectro de Absorção do Extrato de Antocianinas (Ex) das Frações F1 e F2 e das Zonas A e B, sob Efeito de Luz e Nitrogênio, a pH 2,0, 3,0 e 4,0, no Tempo T_0 e após 7 dias a 25°C.

B e A (Figura 3), presentes a pH 2,0, 3,0 e 4,0. Em função disto, a antocianina passa de uma alta concentração de AH^+ para uma forma B carbinol com um grupo OH em C-2, que facilmente forma a chalcona C, com uma estrutura descolorida.

Em meio fracamente ácido, além da forma catiônica AH^+ , existe também a forma quinoidal A resultante da desprotonação do íon flavilium, e que contribui para a coloração característica das antocianinas. Se o pH aumentar ainda mais, o equilíbrio tautomérico B C, será deslocado para a formação da chalcona C. Além dos efeitos do pH e luz sobre a molécula de antocianina deve ser levado em conta a existência de compostos naturalmente presentes no extrato e que podem promover a degradação das antocianinas (Jackman *et al.*, 1987). Pela purificação em coluna de PVP e cromatografia em papel, essas impurezas foram eliminadas nas zonas A e B e parcialmente eliminadas nas frações F1 e F2 (Figura 15).

Pelos resultados, correspondentes a fração F2, mais rica em flavonóides não antociânicos, verifica-se a capacidade protetora dos flavonóides sobre as antocianinas presentes no capim gordura, quando a pH 2,0 e a pH 3,0. Já a pH 4,0, onde as formas estruturais carbinol B e chalcona C podem existir em maiores quantidades, a resistência da fração F2 é semelhante à da fração F1, porém, ainda maior que as demais frações antociânicas do *M. minutiflora*, livres de flavonóides ou ricos em impurezas como é o caso do extrato EX.

Os dados relativos a estabilidade do extrato e das frações F1 e F2, bem como as zonas A e B mostram que uma completa purificação das antocianinas (zonas A e B), diminui

sua estabilidade à luz e pH (Quadro 16) e que o extrato não purificado é mais estável que as zonas A e B mas, menos estável que as frações parcialmente purificadas F1 e F2, especialmente se considerarmos a fração mais rica em flavonóides não antociânicos.

Considerando que seria economicamente vantajoso o uso do extrato de antocianinas sem purificação, desde que fosse demonstrada a possibilidade de sua estabilização e inocuidade, procurou-se obter a copigmentação das antocianinas diretamente no extrato, usando como copigmentos, compostos como o ácido tânico e a rutina.

4.3.2. Efeito da Rutina

Segundo Asen *et al* (1972), vários compostos entre os quais galotanninos e flavonóides não antociânicos como a quercitina e rutina, podem formar complexos com as antocianinas através de uma copigmentação intermolecular. Esta associação envolve ligações de hidrogênio (Timberlake & Bridle, 1975; Asen, 1976) e, a formação do complexo resulta em um deslocamento batocromico e aumento da absorbância no comprimento de onda máxima no visível (Asen *et al*, 1972; Sweeny *et al*, 1981).

Sweeny *et al* (1981), afirmam que a formação de um complexo entre as antocianinas e flavonóides não antociânicos como a rutina, além do aumento da intensidade de cor, produz um deslocamento batocrômico no λ máx. e, estes complexos são

mais resistentes a degradação fotoquímica, que as antocianinas livres.

Em função da disponibilidade da rutina e do seu efeito sobre a estabilidade das antocianinas, a mesma foi selecionada inicialmente para o estudo de sua viabilidade como copigmento para as antocianinas do capim gordura (*M. minutiflora*).

Para a rutina, foram utilizados dois meios de solubilização, em álcool sob aquecimento (exp. n^o 3.10) e em NaOH (exp. n^o 3.11), em função da impossibilidade da adição direta da rutina à solução de antocianina devido a sua baixa solubilidade em soluções aquosas ácidas, meio utilizado para a solubilização das antocianinas.

Os efeitos da adição de diferentes concentrações de rutina solubilizada em álcool sobre as soluções de extrato de antocianinas estão mostradas na Figura 22.

No Quadro 17, podemos observar os resultados da adição de rutina à solução de antocianinas, após 7 dias de exposição à luz.

Os resultados mostram que a adição de rutina à solução de antocianina retarda a degradação das antocianinas em níveis consideráveis, já que as perdas de absorção sem a adição de rutina, podem chegar a 37% enquanto as perdas de antocianinas em presença de rutina são no máximo de 12%.

Inicialmente, pelo espectro (Figura 22), nota-se que a medida que se aumenta a concentração de rutina na solução de extrato de antocianina, ocorre um aumento na absorção no comprimento de onda de máxima, e esta por sua vez, se desloca de 514 nm para 520 nm, quando à solução de antocianina foram

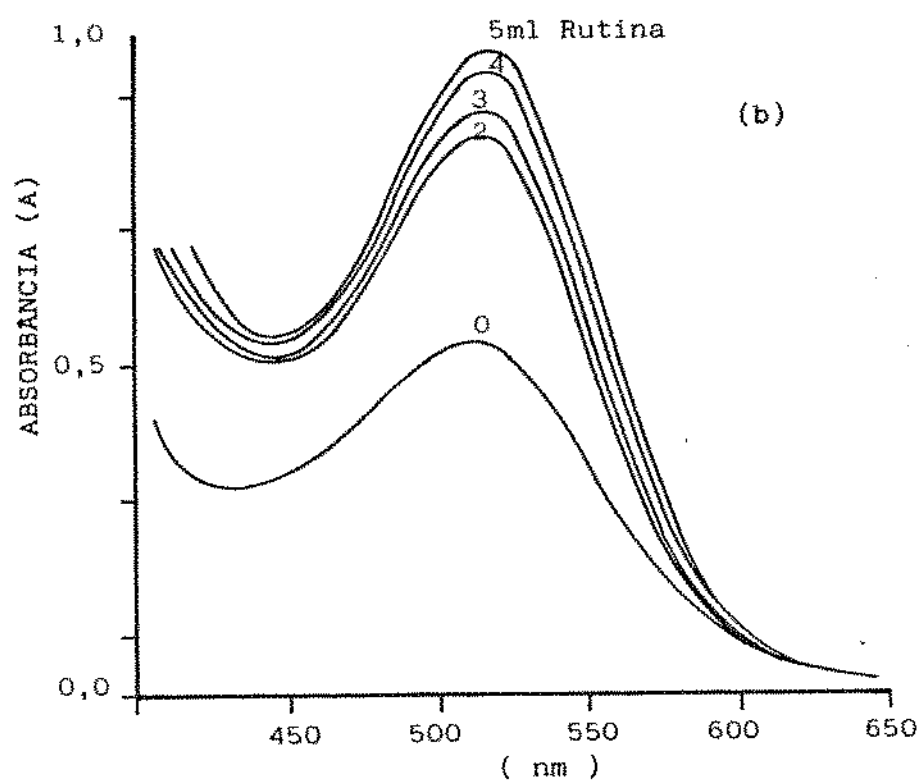
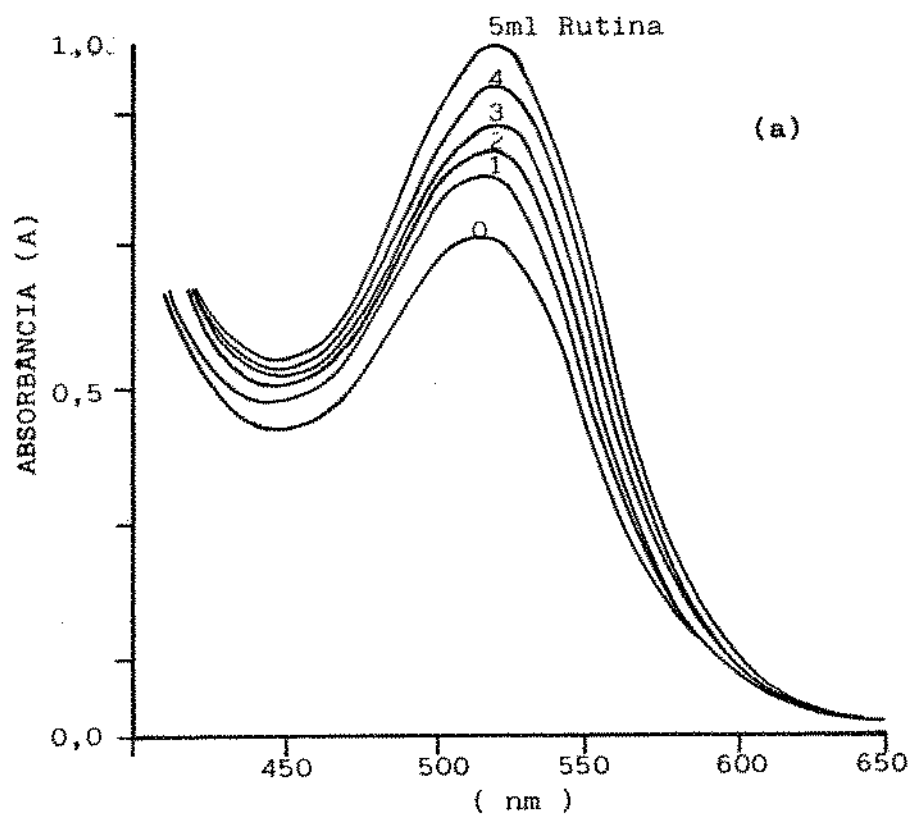


FIGURA 22 - Espectros de Absorção das Soluções de Extrato de Antocianinas Adicionadas de 0, 1, 2, 3, 4 e 5 ml de Solução de Rutina no Tempo T_0 (a) e Após 5 dias (b) a Temperatura de 25°C.

QUADRO 17 - Leitura de Abs λ máx. para Soluções de Antocianinas (9,2 mg/ml) em pH 3,0 Contendo Diferentes Níveis de Rutina (10 mg/ml) Solubilizadas em Alcool

Tubo	Solução de Antocianina (ml)	Solução de Rutina (ml)	Alcool (ml)	Abs λ máx.		Perdas (%)	λ Máx. (nm)
				26/02	02/03		
P	10	0	5	0,86	0,54	37,2	514
A	10	1	4	0,93	0,80	13,9	514
B	10	3	2	0,96	0,84	12,5	514
C	10	4	1	0,99	0,90	9,1	518
D	10	5	0	1,02	0,91	10,8	520

adicionadas 5 ml de solução de rutina (10 mg/ml). Os dados obtidos indicam a formação de complexo rutina-autocianina de acordo com as conclusões de Asen *et al* (1972, 1976); Sweeny *et al* (1981) e Timberlake e Bridle (1975).

A adição de rutina solubilizada em NaOH (3.11.), produziu um efeito mais acentuado sobre o deslocamento batocromico da solução de antocianina porém, após 24 horas, a rutina solubilizada em meio alcalino, torna-se insolúvel na solução de antocianina a pH 3,0, formando um sedimento amarelado com arraste de parte das antocianinas em solução. Este fato dificultou a observação do efeito de diferentes níveis de rutina em soluções alcalina sobre as antocianinas. A rutina solubilizada em alcool também apresenta ainda que, em menor escala, problemas de solubilidade durante o período das experiências, mostrando que a utilização deste agente de copigmentação mesmo em etanol poderá oferecer dificuldades

práticas já que ocorre a formação de precipitado nos diferentes pH.

4.3.3. Efeito do Ácido Tânico

Em virtude das dificuldades encontradas com o uso da rotina e considerando que segundo Asen *et al* (1981), galotaninos também estabilizariam antocianinas, e as informações contidas nos trabalhos de MacCarone *et al* (1987) e Crosby *et al* (1984), sobre a estabilização de antocianinas por ácido tânico, nos levaram a avaliar a potencialidade deste ácido como copigmento para as antocianinas de capim gordura (*M. minutiflora*).

Os testes para se conhecer o efeito do ácido tânico sobre as antocianinas, foram realizadas segundo metodologia descrita em 3.10., 3.11. e 3.12.

Observa-se um deslocamento batocronico no λ máx. de 514 para 520 nm (Figura 23) quando se adiciona ácido tânico às soluções de antocianinas. A comparação entre os espectros da Figura 23, mostra que após 15 dias de incidência de luz, a solução de antocianina não adicionada de ácido tânico, praticamente não apresenta absorbância no λ máx., com distorção no espectro visível (Figura 23b), onde não se observa um pico característico mas sim, uma banda de absorção.

Quantidades acima de 200 mg e até 1.000 mg de ácido tânico adicionados ao extrato são capazes de evitar alterações mais significativas nas características do espectro visível das antocianinas do capim gordura (Figura 23).

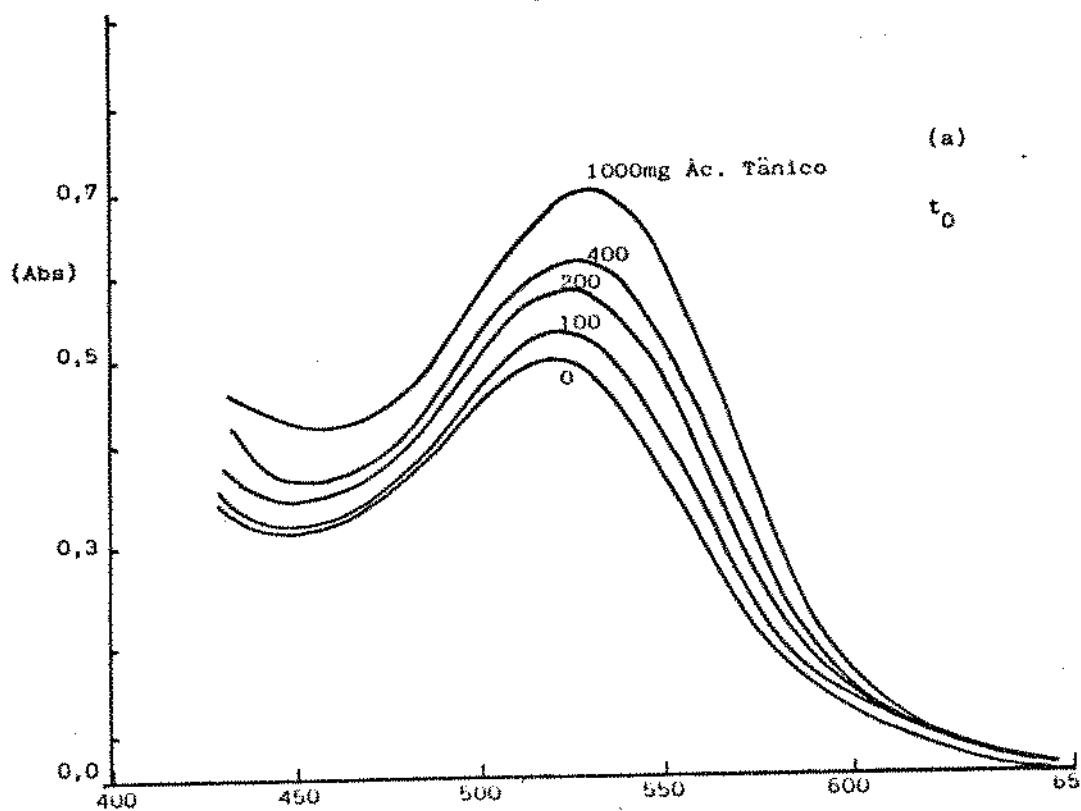
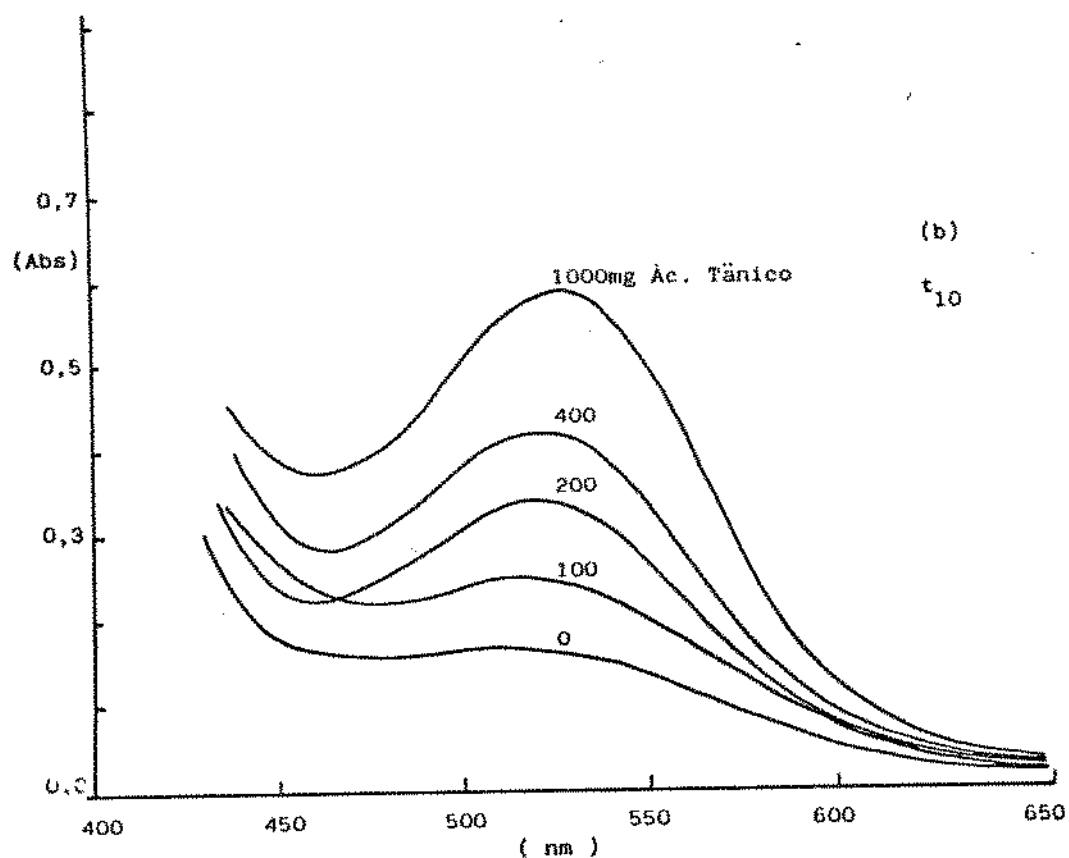


FIGURA 23 - Espectros de Absorção das Soluções de Extrato de Antocianinas (1,5 g/100 ml), Adicionadas de 0, 100, 200, 400 e 1000 mg de Ácido Tânico, no Tempo t (a) e após 10 dias (b) a PH 3,0, sob Efeito de Luz e a 25°C.

Pelos dados do Quadro 18 e Figura 23, nota-se que o aumento da quantidade de ácido tânico aumenta proporcionalmente a estabilidade das antocianinas, com uma redução significativa nos seus níveis de degradação. Ao mesmo tempo, observa-se que níveis inferiores a 200 mg de ácido tânico adicionados à solução, mostram efeitos muito reduzidos na preservação da cor.

Quando se compara as perdas percentuais na absorbância das antocianinas em função da adição de 400 mg e 1000 mg de ácido tânico (Quadro 18), observa-se uma diferença na redução da absorbância de apenas 8,5%, ou seja, um adicional de 600 mg de ácido resulta em uma pequena melhoria na estabilidade da cor das antocianinas. Este fato, indica que depois de uma certa quantidade, o aumento da concentração do ácido tânico em solução tem pouco reflexo na melhoria da estabilidade da solução de antocianina, conforme discutido por Mazza & Brouillard (1987).

QUADRO 18 - Absorbância no λ máx. para Soluções de Antocianinas (1,5 g/100 ml) Contendo Diferentes Concentrações de Ácido Tânico em pH 3,0. Durante 15 Dias sob Efeito de Luz

Ácido Tânico (mg/100 ml)	λ máx. (nm)	Abs λ máx.		Perdas (%)
		t ₀	t ₁₅	
B(0,0)	514	0,48	0,10	79,2
100	518	0,54	0,16	70,4
200	520	0,57	0,33	42,1
400	523	0,60	0,41	31,7
1000	526	0,69	0,53	23,2

Os resultados deste teste mostram a potencialidade do ácido tânico como copigmento para as antocianinas, o que nos levou a estudar os parâmetros ideais para sua utilização como copigmento no estudo da estabilidade das antocianinas.

4.3.4. Determinação da Concentração do Ácido Tânico

O efeito de diferentes concentrações de ácido tânico sobre as soluções de antocianinas em diferentes pH (3.13.), está resumido nos dados do Quadro 19.

Podemos observar que, para a solução de extrato de antocianina contendo 5,8 mg de antocianina a pH 2,0, a adição de quantidades crescentes de ácido tânico à solução, altera pouco a absorbância da solução, chegando a uma elevação máxima de 7,6% em relação ao branco, apresentando também uma ligeira alteração no espectro visível e um deslocamento batocromico máximo de 10 nm (Figura 24a).

Apesar da absorbância inicial atingir valores mais elevados a pH 3,0, o deslocamento batocromico, pela adição do ácido tânico, é da mesma ordem que a pH 2,0 (Quadro 19). A pH 3,0, a absorbância da solução de antocianinas teve um aumento máximo de 26,5%, quando comparada às soluções de antocianinas sem a adição de ácido tânico.

A adição de 80 mg de ácido tânico provoca um aumento de 21,7% na absorbância da solução de antocianinas a pH 3,0, aumento este, muito próximo aquele ocasionado pela adição de 120 mg de ácido tânico (Quadro 19). Este fato, permite considerar que um acréscimo de 50% na concentração do ácido

QUADRO 19 - Absorbância e Relações Percentuais entre as Soluções de Extrato de Antocianinas (1 g/100 ml) a pH 2,0, 3,0 e 4,0 Adicionadas de Diferentes Níveis de Ácido Tânico (0, 40, 80 e 120 mg)

pH	Absorbância ($\lambda_{\text{máx}}$)				Relação Percentual		
	Branco (B)	Ac. Tânico (mg)			Abs 40 (%)	Abs 80 (%)	Abs 120 (%)
		40	80	120	Abs B	Abs B	Abs B
2,0	1,18 (516)*	1,20 (521)	1,23 (523)	1,27 (524)	1,7	4,2	7,6
3,0	0,83 (518)	0,93 (522)	1,01 (525)	1,05 (527)	12,1	21,7	26,5
4,0	0,36 (520)	0,52 (526)	0,60 (528)	0,67 (529)	44,4	66,7	86,1
2,0 Abs --- (X)	29,7	22,5	17,9	17,3			
3,0 Abs --- (X)	56,7	44,1	40,6	36,2			
4,0 Abs --- (X)	227,8	130,8	105,0	89,6			

()* - Valores observados do comprimento de onda de máxima absorção (nm).

tânico na solução de antocianinas, provoca um aumento de absorbância de apenas 5% com pequena alteração no deslocamento batocromico.

A pH 4,0, a adição do ácido tânico altera a absorbância no $\lambda_{\text{máx}}$ das soluções de antocianinas e esta absorbância chega a ser 80% maior quando se adicionam 120 mg de ácido tânico.

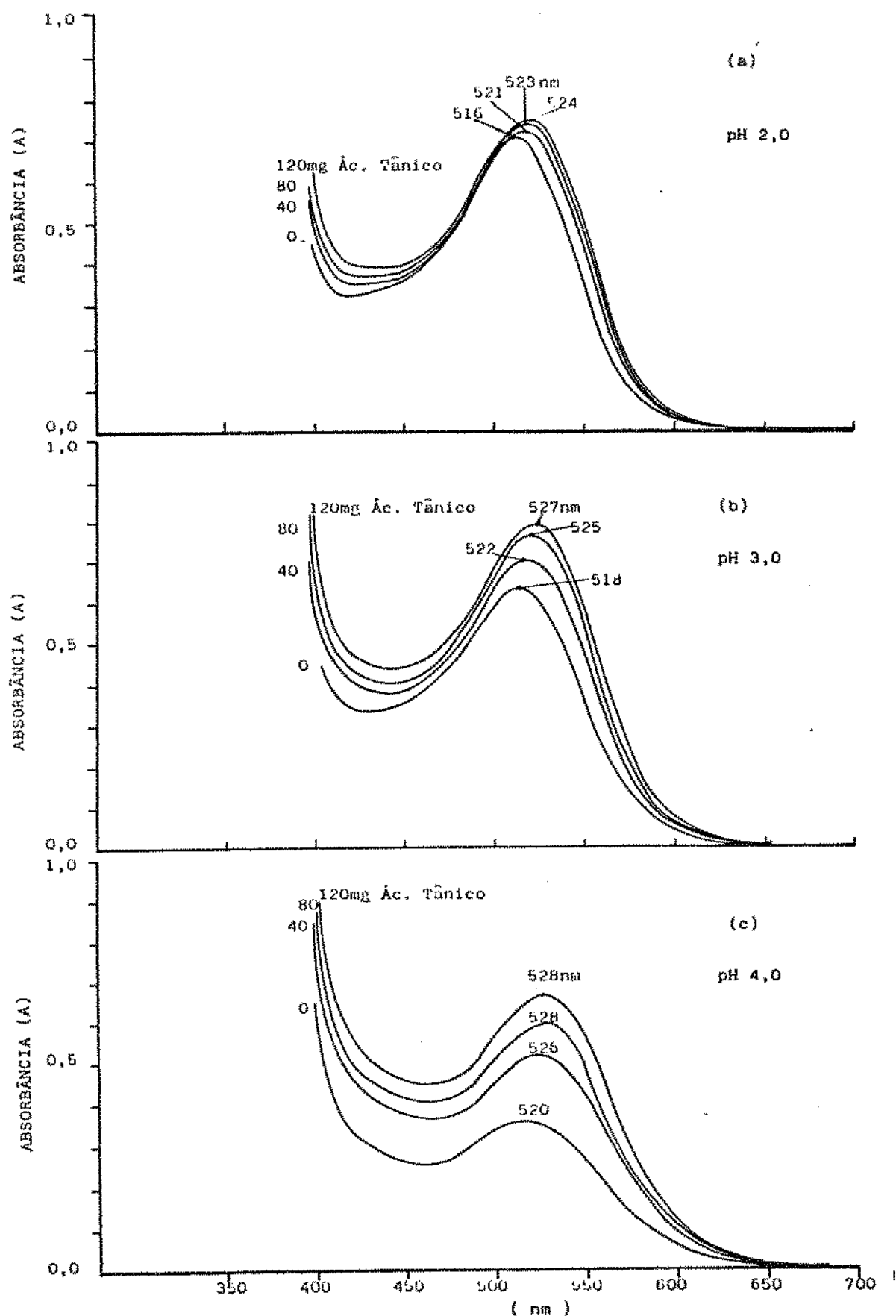


FIGURA 24 - Espectros de Absorção das Soluções de Antocianinas (1,0 g Extrato/100 ml) a pH 2,0 (a); pH 3,0 (b); pH 4,0 (c), após a Adição de 0, 40, 80 e 120 mg de Ácido Tânico em 10 ml de Solução.

Os dados do Quadro 19 mostram que a absorbância da solução de antocianina a pH 4,0 é consideravelmente menor que a pH 2,0. Este fato, evidencia a baixa estabilidade das antocianinas a pH 4,0.

Os valores baixos para a relação percentual da Abs. 40/Abs. B (Quadro 19) a pH 2,0 e 3,0 e o pequeno deslocamento batocromico no λ máx. quando comparados a adição de 80 e 120 mg de ácido tânico mostra um reduzido efeito da adição de 40 mg de ácido tânico sobre as características espectrais das antocianinas.

Ao mesmo tempo, considerando que o efeito da adição de 80 ou 120 mg de ácido tânico sobre a absorbância e sobre o comportamento de espectro das soluções de antocianinas a pH 2,0, 3,0 e 4,0 é semelhante, optou-se pelo uso de 80 mg de ácido tânico a ser adicionado às soluções de antocianinas com finalidade de copigmentação.

4.3.5. Efeito de Diferentes Concentrações de Antocianinas Sobre as Características do Espectro

Para estimar a concentração de antocianinas na solução para o estudo da estabilidade, utilizou-se soluções de antocianinas contendo 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 ml de extrato (3.1.) com 5,8% de antocianinas em 100 ml de tampão pH 2,0, 3,0 e 4,0. O Quadro 20 mostra a absorbância no λ máx. para todos os tratamentos e, a diferença (%) entre as soluções de antocianinas com adição de 80 mg de ácido tânico e aquela sem o ácido.

QUADRO 20 - Absorbância no λ máx. e as Relações Percentuais para as Soluções Contendo 0,5; 1,0; 1,5; e 2,0 ml de Extrato/100 ml de Tampão 2,0; 3,0 e 4,0 Adicionados (A) ou não (B) de 80 mg de Ácido Tânico

Solução de Antocianina ml Extrato/100 ml	pH 2,0			pH 3,0			pH 4,0		
	B	A	A/B(%)	B	A	A/B(%)	B	A	A/B(%)
0,5	0,56	0,65	16,1	0,43	0,54	26,3	0,28	0,46	65,3
Abs 1,0 ----- (X) Abs 0,5		(83,1)*			(83,3)			(56,5)	
1,0	1,16	1,19	2,6	0,74	0,99	34,7	0,37	0,72	95,6
Abs 1,5 ----- (X) Abs 1,0		(49,6)			(45,5)			(43,1)	
1,5	1,73	1,78	2,9	1,20	1,44	20,0	0,58	1,03	78,3
Abs 2,0 ----- (X) Abs 1,5		(34,8)			(31,0)			(25,2)	
2,0	2,31	2,40	3,9	1,60	1,90	18,8	0,80	1,29	62,3
Abs 2,0 ----- (X) Abs 0,5		(269,2)			(251,9)			(180,4)	

B - antocianina sem adição de ácido tânico
A - antocianina com adição de 80 mg de ácido tânico
()* - os valores entre os parenteses, se referem as variações percentuais entre as absorbâncias.

Observa-se pelo Quadro 20, que para todos os pH, a concentração de 1,0 ml de extrato em/100 ml de solução é aquela que proporciona um maior aumento na absorbância, quando à solução são adicionados os 80 mg de ácido tânico (3.14.).

O comportamento do espectro visível para as diferentes concentrações de antocianinas pode ser visto na Figura 25.

Em todos os tratamentos a pH 2,0, o ácido tânico tem pouco efeito no aumento da absorbância, mas causa um deslocamento batocrômico da ordem de 7 nm.

Em todos os pH's, há um deslocamento batocromico que aumenta a medida que se reduz a concentração de antocianina, em consequência da elevação da proporção de ácido tânico em relação as mesmas antocianinas.

Apesar de uma menor absorbância da solução a pH 4,0 (Quadro 20), com e sem ácido tânico em relação àquela nos demais pH, o aumento da absorbância nesse pH para as soluções com o ácido tânico em relação à solução padrão (branco), é maior que a pH 2,0 e 3,0.

Observa-se que a medida que se aumenta o pH também aumenta o efeito da adição do ácido tânico em relação ao branco, o que pode ser comprovado pelos aumentos das diferenças entre as absorbâncias das soluções de antocianinas com e sem adição de ácido tânico para todas as concentrações de antocianinas utilizadas (Quadro 20). É possível observar também um maior aumento nas absorbâncias com a adição do ácido tânico em relação ao branco, para as soluções de antocianinas na concentração entre 1,0 ml e 1,5 ml/100 em todos os pH's.

Os resultados obtidos neste experimento e o cromatograma do complexo (Figura 26) indicam a formação nas condições experimentais utilizadas, de um produto que não é decomposto pela cromatografia em papel, com Rf diferentes daqueles apresentados pelo ácido tânico e pela solução de

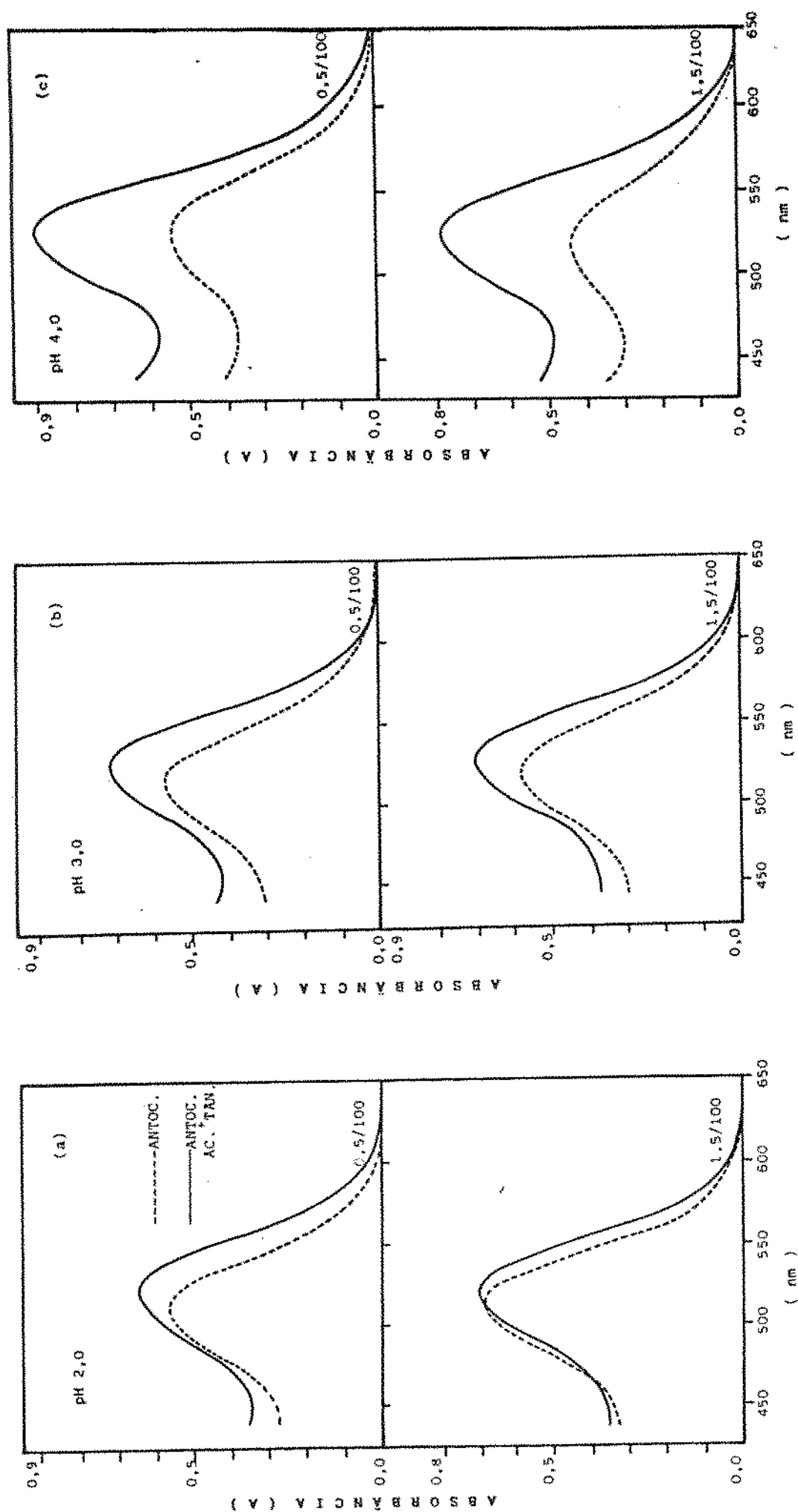
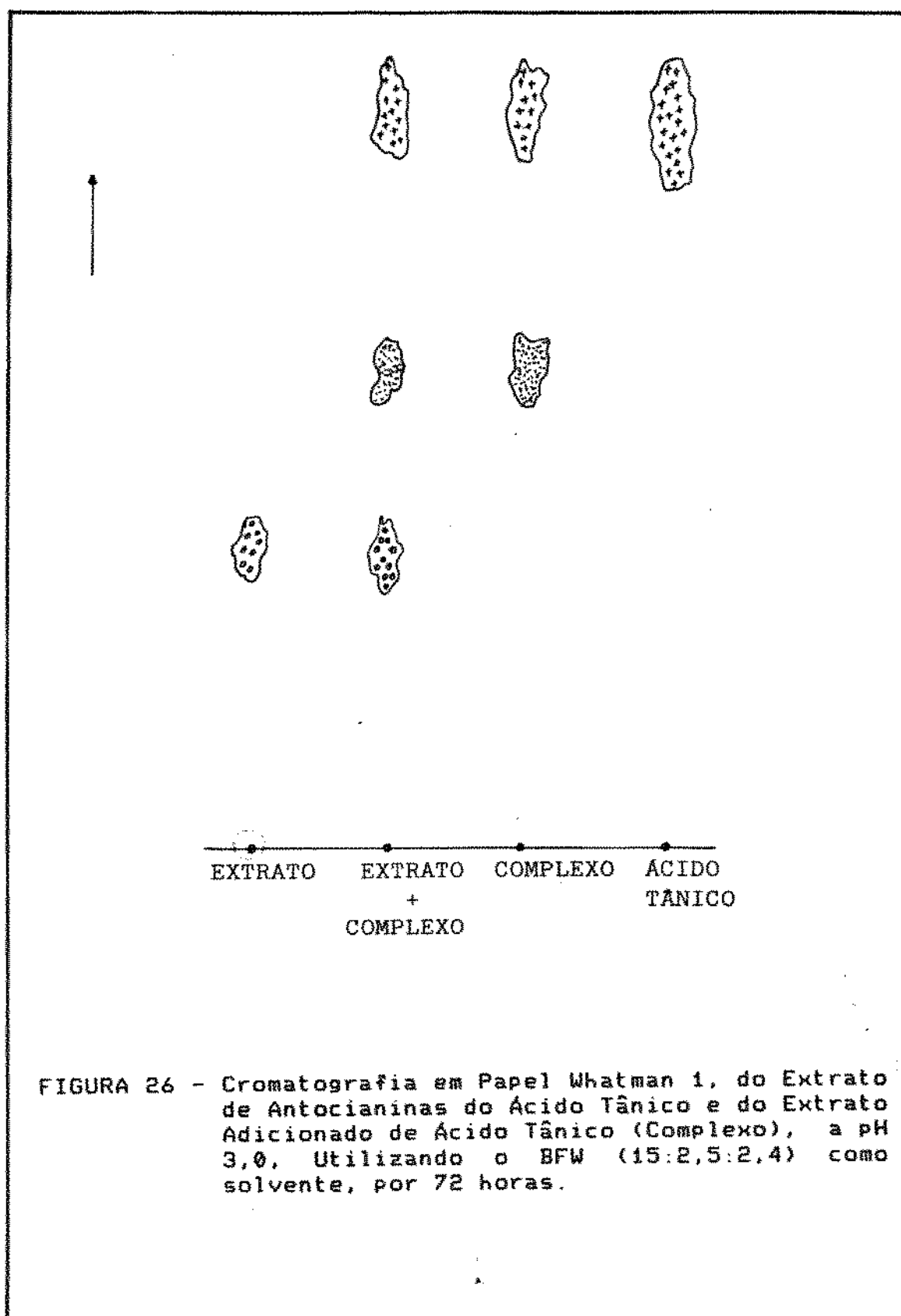


FIGURA 25 - Espectro de Absorção das Soluções de Extrato de Antocianina (0,5 e 1,5 ml de Extrato em 100 ml de Tampão) a pH 2,0 (a), pH 3,0 (b) e pH 4,0 (c). Adicionadas (---) ou não (—) de 80 mg de Ácido Tânico em 100 ml de Solução.



antocianinas do extrato. O complexo forma-se em solução aquosa ácida o que em parte contradiz as conclusões de Mazza & Brouillard (1987) e especialmente Chen & Hrazdina (1981). No caso do complexo antocianina-ácido tânico, a estrutura do copigmento apresenta um número muito alto de grupos OH e de grupos carbonílicos. Além disso, o complexo poderia conter moléculas de flavonóides naturais oriundas do extrato de antocianinas utilizado para a copigmentação e, não totalmente separáveis pela cromatografia em papel. Entretanto, verifica-se uma separação de consideráveis quantidades de flavonóides não antociânicos, amarelos, das antocianinas do extrato quando cromatografados em papel, indicando que se houver complexação natural da antocianina com o flavonóide não antociânico o complexo formado é pouco estável.

Por outro lado, deve ser considerado que, apesar da pouca estabilidade do complexo antocianina com flavonóides não antociânicos sob condições naturais, o efeito protetivo do complexo pode ser sensivelmente melhorado pela adição de ácido tânico (Quadro 20).

Tal como para a rutina, a adição de ácido tânico ao extrato provoca um efeito batocromico com um aumento no λ máx. o que poderia ser considerado como indicativo da formação de um complexo antocianina-ácido tânico. Os deslocamentos batocrômicos nos pH 's 2,0, 3,0 e 4,0 e com a concentração de extrato de 1,0, 1,5 e 2,0 ml/100 ml de solução são muito próximos, variando de 6 a 8 nm (Figura 25).

4.3.6. Efeito da Luz e do Oxigênio Sobre a Estabilidade das Antocianinas Copigmentadas a pH 2,0, 3,0 e 4,0

Uma vez comprovada a formação e a eficiência da copigmentação com ácido tânico e determinadas as condições de atuação, procurou-se estudar sistematicamente o alcance desta eficiência frente a outros fatores que influenciam a degradação das antocianinas, como luz, pH, oxigênio, SO_2 e íons metálicos.

Os resultados do efeito da luz e do oxigênio nos diferentes pH, sobre a degradação das antocianinas do extrato e o efeito estabilizador do complexo antocianina-ácido tânico, estão resumidos nos Quadros 21, 22 e 23.

Pelo Quadro 21, os valores menores de $k(\text{h}^{-1})$ a pH 2,0, para todas as condições, mostram a maior estabilidade das antocianinas a pH ácido sob efeito da luz. A medida que se

QUADRO 21 - Valores de $k(\text{h}^{-1})$ e $t_{1/2}(\text{hs})$ para as Soluções de ACY em pH 2,0, 3,0 e 4,0 em Presença de Luz e de Oxigênio, Adicionadas ou não de 80 mg de Ácido Tânico

pH		AT+LUZ+N ₂	P+LUZ+N ₂	AT+N ₂	P+N ₂	AT+LUZ+O ₂	P+LUZ+O ₂	AT+O ₂	P+O ₂
2,0	k	0,0931	0,4945	0,0048	0,0159	0,1396	0,5386	0,0343	0,0719
	$t_{1/2}$	744	140	14378	4358	496	129	2026	964
3,0	k	0,3322	0,6632	0,0289	0,068	0,5334	0,9187	0,1334	0,2507
	$t_{1/2}$	209	104	2398	1018	130	75	520	276
4,0	k	0,7673	1,1307	0,2161	0,2386	1,0654	1,2296	0,3634	0,3563
	$t_{1/2}$	90	61	320	290	65	56	191	195

AT = complexo antocianina - ácido tânico
P = antocianina do extrato.

aumenta o pH do meio, a estabilidade das antocianinas diminuiu acentuadamente, tanto na ausência como na presença de luz, provocando uma redução nos valores das relações $k_{\text{luz}}/k_{\text{escuro}}$ para as antocianinas do extrato e para o complexo ácido-tânico-antocianina. Na ausência do ácido tânico, os valores k_{luz} são maiores dentro de um mesmo pH, quando comparados aos valores de k_{escuro} , indicando o forte efeito de luz na degradação das antocianinas.

O efeito do oxigênio na degradação de antocianinas é acentuado, mesmo na ausência de luz, em todos os pH, o que pode ser visto quando se compara com os valores de k (constante de degradação) para as antocianinas em atmosfera de nitrogênio nas mesmas condições (Quadro 21). A adição do ácido tânico mostra-se pouco efetiva nas soluções no escuro e em presença de oxigênio quando comparada às soluções no escuro e sob nitrogênio (Quadro 22). Este fato indica que a degradação das antocianinas do capim gordura em presença de oxigênio deve estar relacionada a um mecanismo diferente daquele predominante quando sob efeito de luz.

Os valores das relações do Quadro 22, mostram o efeito estabilizador do complexo ácido tânico-antocianina com o aumento do pH. Assim, nota-se que os valores das relações de $k_{\text{luz}}/k_{\text{escuro}}$ decrescem a medida que se aumenta o pH e que, para um mesmo pH, os valores são maiores para as soluções sem a adição do ácido tânico. Dentro de um mesmo pH, as soluções de antocianinas em presença de oxigênio apresentam valores das relações $k_{\text{luz}}/k_{\text{escuro}}$ muito menores que aqueles apresentados pelas soluções de antocianinas sob atmosfera de nitrogênio.

QUADRO 22 - Relações Entre Valores de $k(h^{-1})$ para Soluções de ACY sob Efeito de Luz e de Oxigênio, Adicionadas (AT) ou não de 80 mg de Ácido Tânico (P)

Relações entre k_1 Valores de $k(h^{-1})$	2,0	3,0	4,0
<u>AT+N₂+LUZ</u>	19,3	11,5	3,6
AT+N ₂ +ESCURO			
<u>P+N₂+LUZ</u>	31,1	9,7	4,7
P+N ₂ +ESCURO			
<u>AT+O₂+LUZ</u>	4,1	4,0	2,9
AT+O ₂ +ESCURO			
<u>P+O₂+LUZ</u>	7,5	3,7	3,5
P+O ₂ +ESCURO			
<u>LUZ+N₂+P</u>	5,3	2,0	1,5
LUZ+N ₂ +AT			
<u>LUZ+O₂+P</u>	3,9	1,7	1,2
LUZ+O ₂ +AT			
<u>ESCURO+N₂+P</u>	3,3	2,3	1,1
ESCURO+N ₂ +AT			
<u>ESCURO+O₂+P</u>	2,1	1,9	1,0
ESCURO+O ₂ +AT			
<u>AT+O₂+ESCURO</u>	7,2	4,6	1,7
AT+N ₂ +ESCURO			
<u>AT+O₂+LUZ</u>	1,5	1,6	1,3
AT+N ₂ +LUZ			
<u>P+O₂+ESCURO</u>	4,5	3,6	1,5
P+N ₂ +ESCURO			
<u>P+O₂+LUZ</u>	1,1	1,4	1,1
P+N ₂ +LUZ			

A estabilidade das antocianinas a pH 2,0, adicionadas de ácido tânico e sob efeito de luz é 5,4 vezes maior que aquela correspondente, sem a adição de ácido. A efetividade do ácido tânico, é menor em solução de antocianinas a pH 2,0, quando em presença de luz e oxigênio, comparadas àquelas sob efeito de luz e atmosfera inerte. Esta menor efetividade se deve provavelmente, à associação dos fatores luz e oxigênio na degradação das antocianinas, dificultando a efetividade do complexo ácido tânico-antocianina na estabilização de sua estrutura, indicando a possibilidade da existência de um mecanismo diferente de degradação das antocianinas quando na presença de oxigênio.

A pH 2,0, tanto em atmosfera de oxigênio como de nitrogênio, o efeito protetor do complexo ácido tânico - antocianina é menor para as soluções na ausência de luz. Isto poderia estar relacionado à maior estabilidade das antocianinas nesse pH, independente das condições a que estão submetidas. A presença do oxigênio diminui o efeito protetor do ácido tânico em soluções de antocianinas no escuro, quando comparadas com aquelas sob nitrogênio. O fato indica que o complexo formado entre o pigmento e o ácido tânico tem baixa atividade protetora no escuro, quando sob atmosfera de oxigênio, em função de prováveis mecanismos degradativos diferentes para luz e para o oxigênio.

Pelos dados dos Quadros 21 e 22, pode-se afirmar que para pH 2,0, o efeito da luz somada ao oxigênio sobre a estabilidade das antocianinas é mais acentuado que aqueles onde atua apenas um fator de decomposição e que, a efetividade

do complexo ácido tânico - antocianina, consequentemente, também é reduzida pela atuação conjunta de fatores degradativos.

Os dados resumidos no Quadro 23 e o espectro da Figura 27a reforçam a fraca resistência das antocianinas aos efeitos da luz mesmo a pH 2,0, bem como a considerável ação protetora que o ácido tânico tem sobre esse efeito. Se, ao efeito da luz, for somado o efeito do oxigênio, verifica-se que, pelos resultados (Quadro 23), da relação percentual Abs 440 nm/Abs λ máx. o efeito do ácido tânico é sensivelmente menor.

Apesar da degradação mais acelerada do complexo ácido - pigmento a pH 3,0, e apesar do próprio efeito do pH mais elevado sobre a cor das antocianinas, a presença do ácido tânico mostra considerável efeito protetor, claramente visível pelas relações entre os valores de k do Quadro 22.

A pH 4,0, o efeito do complexo na estabilidade das antocianinas é praticamente inexistente. Nestas condições, o próprio pH atua como principal fator de degradação dos pigmentos, com formação de estruturas intermediárias de reduzida absorção na região de 520 nm, que é o comprimento de onda característico da coloração vermelha das antocianinas.

Pelos dados do Quadro 22 e levando em conta a existência de equilíbrios entre as várias formas de antocianinas a diferentes pH, verifica-se que, com o aumento da concentração da forma catiônica (AH^+) (pH fortemente ácido), há um aumento da estabilidade das antocianinas aos efeitos do oxigênio. Com o aumento do pH há um aumento da concentração das demais formas especialmente carbinol (B) e

QUADRO 23 - Valores de λ máx. (nm), Abs λ máx., Abs 440 nm e Abs 440/ λ máx. (%) para Soluções de ACY em pH 2,0, 3,0 e 4,0, Adicionados ou não de Ácido Tânico e sob Efeito de Luz e Luz + O₂

pH			LUZ/N ₂ /AT	LUZ/N ₂ /P	N ₂ /AT	N ₂ /P	LUZ/O ₂ /AT	LUZ/O ₂ /P	O ₂ /AT	O ₂ /P
	λ máx. (nm)		520	516	---	---	526	518	---	---
2,0	Abs λ máx.	t ₀	0,87	0,85	0,87	0,85	0,82	0,97	0,82	0,97
		t _f	0,69	0,33	0,86	0,84	0,60	0,29	0,80	0,84
	Abs 440 nm	t ₀	0,45	0,44	0,45	0,44	0,40	0,42	0,40	0,42
		t _f	0,34	0,22	0,40	0,38	0,33	0,20	0,37	0,38
	Abs 440 ----- %	t ₀	51,7	51,8	51,7	51,8	48,8	43,3	48,8	43,3
		t _f	49,3	66,7	46,5	45,2	55,0	70,0	46,3	41,3
	Abs λ máx.									
	λ máx. (nm)		526	518	---	---	528	520	---	---
	Abs λ máx.	t ₀	0,86	0,74	0,88	0,74	0,92	0,78	0,92	0,78
		t _f	0,59	0,20	0,79	0,56	0,43	0,24	0,88	0,32
3,0	Abs 440 nm	t ₀	0,49	0,39	0,49	0,39	0,46	0,39	0,98	0,39
		t _f	0,40	0,10	0,44	0,31	0,35	0,30	0,40	0,23
	Abs 440 ----- %	t ₀	55,7	52,7	5,7	52,7	50,0	50,0	50,0	50,0
		t _f	67,8	95,0	55,7	55,4	81,4	125,0	58,8	71,9
	Abs λ máx.									
	λ máx. (nm)		526	524	---	---	532	528	---	---
	Abs λ máx.	t ₀	0,76	0,72	0,76	0,72	0,88	0,68	0,88	0,68
		t _f	0,43	0,26	0,55	0,52	0,27	0,23	0,53	0,48
	Abs 440 nm	t ₀	0,43	0,43	0,43	0,43	0,53	0,43	0,53	0,43
		t _f	0,32	0,30	0,37	0,36	0,35	0,37	0,43	0,
4,0	Abs 440 ----- %	t ₀	57,2	60,0	57,0	60,0	60,2	63,2	60,2	63,
		t _f	74,0	45,0	69,3	69,2	129,6	160,9	81,1	89,6
	Abs λ máx.									
	λ máx. (nm)									
	Abs λ máx.	t ₀								
		t _f								
	Abs 440 nm	t ₀								
		t _f								
	Abs 440 ----- %	t ₀								
		t _f								

t₀ - início
t_f - 220 horas.

chalcona (C) (Figura 3) e, considerando o valor da relação $k_{O_2} + \text{ESCURO} / k_{N_2} + \text{ESCURO}$ verifica-se que nos efeitos associados de O_2 e pH, predomina o efeito do pH para a perda de absorbância.

Para a degradação das antocianinas a pH 2,0, 3,0 e 4,0 pelo efeito da luz na presença de O_2 ou N_2 , os valores baixos da relação $k_{O_2} + \text{LUZ} / k_{N_2} + \text{LUZ}$, indicam a predominância de uma reação fotoquímica.

As Figuras 27 e 28 ilustram o comportamento dos espectros de absorção na região do visível para as antocianinas submetidas às condições do experimento.

Para as soluções de antocianinas a pH 3,0, as alterações no espectro de absorção são mais profundas que a pH 2,0 (Figura 27b e 28b). Apenas as soluções de antocianinas em nitrogênio e sem luz ($AT + N_2$) e ($P + N_2$), não mostram alterações no espectro. Os sistemas ($LUZ + N_2$), ($LUZ + O_2$) e ($ESCURO + O_2$), com ou sem a adição de ácido tânico, apresentam alteração no espectro de absorção, porém, em menor intensidade quando o ácido tânico está presente. Os dados evidenciam a eficiência do ácido tânico na melhoria da estabilidade das antocianinas a pH 3,0.

O ácido tânico apresenta uma baixa efetividade para as antocianinas em presença de oxigênio quando comparado à efetividade apresentada nas antocianinas sob nitrogênio.

Quando se utilizam soluções de antocianinas a pH 4,0, o espectro de absorção apresenta alguma alteração já no início do experimento (t_0) (Figura 27c e 28c). Os valores da relação percentual $\text{Abs } 440 \text{ nm} / \text{Abs } \lambda \text{ máx.}$ a pH 4,0 (Quadro 23),

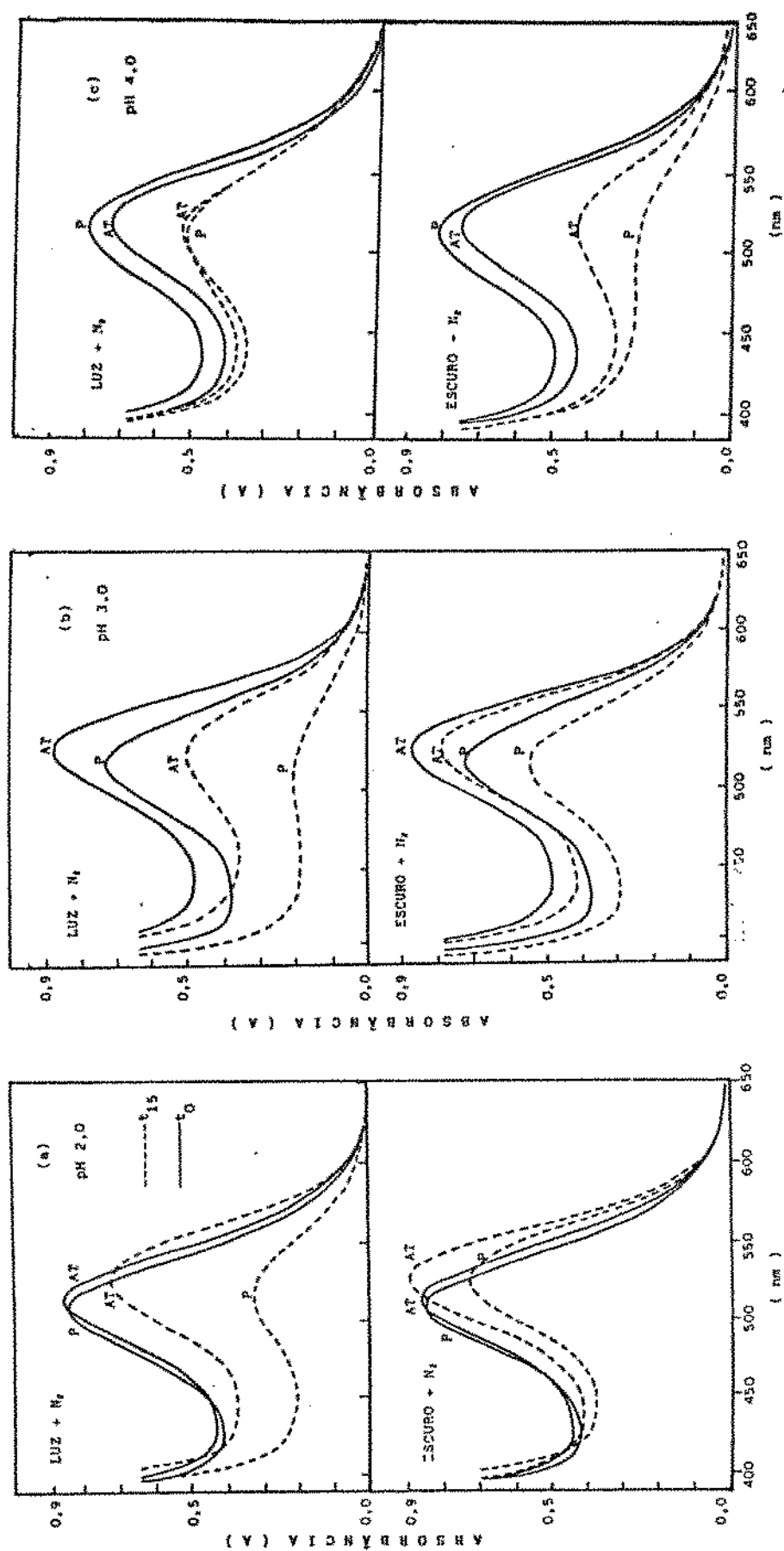


FIGURA 27 - Espectros de Absorção das Soluções de Extrato de Antocianinas a pH 2,0 (a), pH 3,0 (b) e pH 4,0 (c), sob Efeitos de Luz + Nitrogênio e sob Nitrogênio no Escuro, Adicionados (AT) ou não (P) de Ácido Tânico, no Tempo t₀ e após 15 dias - T₁₅ a 25°C.

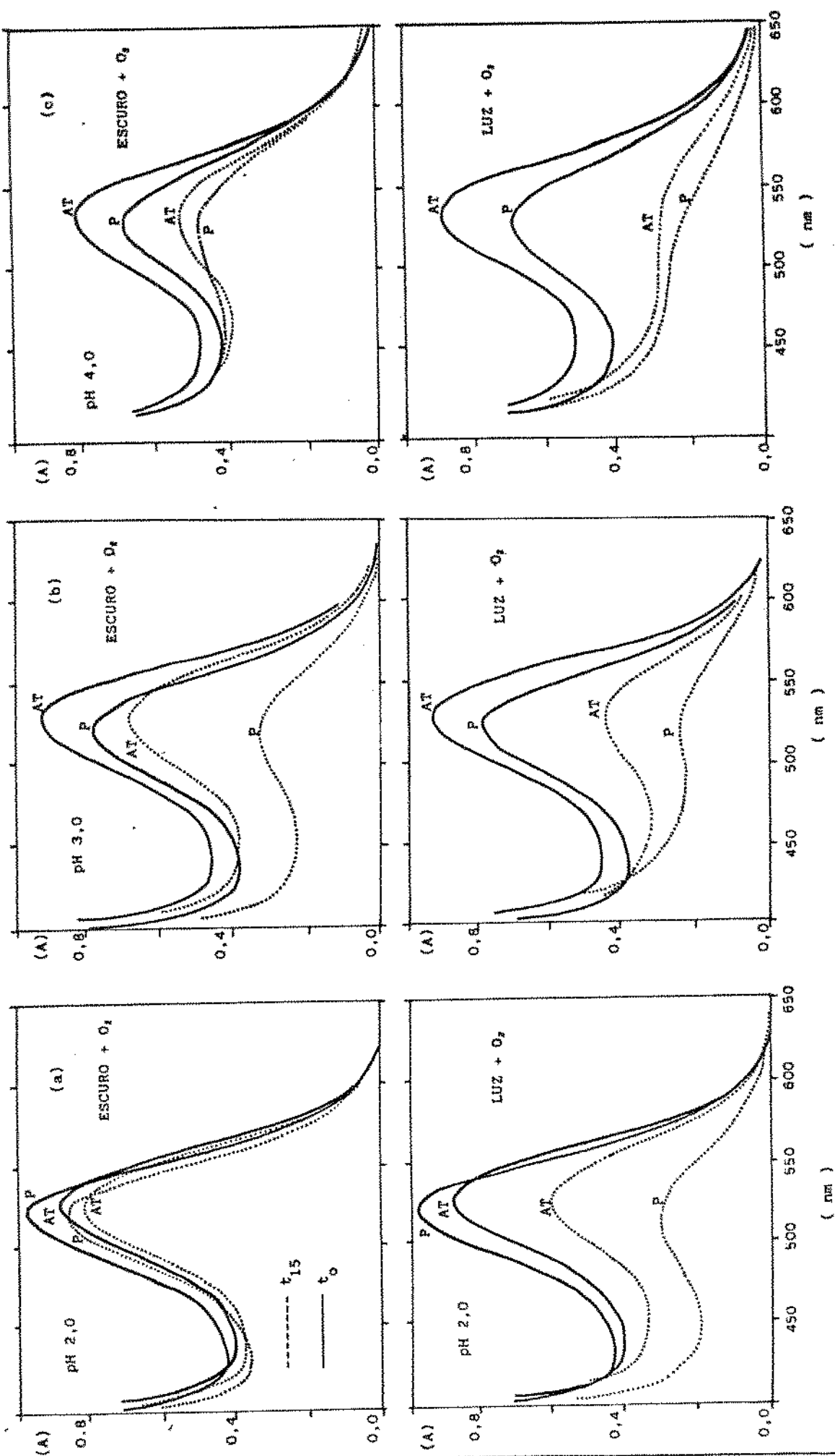


FIGURA 28 - Espectros de Absorção das Soluções de Antocianinas a pH 2,0 (a); pH 3,0 (b) e pH 4,0 (c), sob Efeito de Luz + Oxigênio e em Atmosfera de Oxigênio no Escuro, na Presença (AT) e na Ausência (P) de Ácido Tânico no Tempo t_0 e após 15 dias - T_{15} , a 25°C.

variam entre t_0 e t_f de 57 a 63,2 %. Mesmo assim, o ácido tânico mostra algum efeito protetor, pois, os valores da relação das absorbâncias são mais baixos nos tratamentos onde se adicionou o ácido tânico, sugerindo uma menor degradação.

Aqui também como a pH 3,0, o efeito da associação da luz com o oxigênio (Figura 28c), colabora para aumentar a degradação das antocianinas e, essa alteração é parcialmente evitada pela presença do ácido tânico (Figura 27c). A pH 4,0, no final do experimento, as antocianinas submetidas às condições de (LUZ + N₂ + P), (LUZ + O₂ + AT) e (LUZ + O₂ + P), ilustradas respectivamente, pelas Figuras 27c e 28c, sofrem uma alteração em sua coloração característica mostrada pelos elevados valores das relações Abs 440 nm/Abs λ máx. (%) (Quadro 23).

4.3.7. Efeito da Temperatura Sobre a Estabilidade das Antocianinas e do Complexo AT-ACY a pH 2,0, 3,0 e 4,0

Os Quadros 25 e 26, mostram os valores de $k(h^{-1})$ e $t_{1/2}$ (tempo de meia vida) e as relações entre os tratamentos para todas as soluções de antocianinas a pH 2,0, 3,0 e 4,0, para as diferentes temperaturas.

Observa-se que, em relação às soluções de antocianinas armazenadas a 3°C e complexadas com ácido tânico, o efeito degradativo da temperatura intensifica-se com o aumento do pH do meio. A relação $k_{AT/35^{\circ}C}/k_{AT/3^{\circ}C}$ sobe de 3,0 para 5,2 quando o pH aumenta de 2,0 para 4,0 e 3,0 para 10, quando se

QUADRO 25 - Valores de $k \cdot 10^{-2} \cdot (h^{-1})$ e $t_{1/2} (h)$ para as ACY em pH 2,0; 3,0 e 4,0, sob Efeito de Temperatura de 35, 45 e 55 °C, Adicionados (AT) ou não (P) de Ácido Tânico

pH	AT				P			
	3°C	35°C	45°C	55°C	3°C	35°C	45°C	55°C
2,0	0,0228 (3040)*	0,0681 (1018)	0,0874 (793)	0,2303 (301)	0,0244 (2840)	0,1251 (1554)	0,1779 (389)	0,4013 (173)
3,0	0,0324 (2139)	0,1237 (1560)	0,1595 (435)	0,4468 (155)	0,0343 (2020)	0,2080 (333)	0,2602 (266)	0,4626 (190)
4,0	0,0282 (1997)	0,1474 (470)	0,2301 (301)	0,3585 (193)	0,0291 (2381)	0,1644 (421)	0,2381 (291)	0,2897 (234)

AT - Complexo antocianina - ácido tânico

P - Solução de extrato de antocianinas

(*) - Valores entre parenteses, refere-se ao tempo de meia vida ($t_{1/2}$) em horas.

manteve o pH em 2,0 e se aumentou a temperatura de 35 para 55°C (Quadro 26).

Esses dados indicam que a medida que se submete as soluções de antocianinas a uma temperatura mais elevada, a sua degradação é maior mesmo quando complexadas com ácido tânico e, esta degradação é ainda mais acentuada quando se aumenta o pH do meio. Para as soluções de antocianinas sem o ácido tânico, o comportamento é semelhante, porém, aqui, os valores das relações entre as temperaturas de 35, 45 e 55 °C com a temperatura de 3°C, tendem a ser maiores.

A formação de estruturas em que a forma catiônica AH^+ se liga pelo cátion pirilium ao ácido tânico, parece ser mais provável e com isto diminui a eletrofilicidade na posição C-2 e conseqüentemente diminui a formação da pseudobase B,

QUADRO 26 - Relações Entre Valores de $k(h^{-1})$ para Soluções de ACY sob Efeito de Diferentes Temperaturas, Adicionadas (AT) ou não de Ácido Tânico (P)

	2,0	3,0	4,0
$\frac{AT/35^{\circ}C}{AT/3^{\circ}C}$	3,0	3,8	5,2
$\frac{AT/45^{\circ}C}{AT/3^{\circ}C}$	3,8	4,9	8,2
$\frac{AT/55^{\circ}C}{AT/3^{\circ}C}$	10,1	13,8	12,7
$\frac{P/35^{\circ}C}{P/3^{\circ}C}$	5,1	6,1	5,7
$\frac{P/45^{\circ}C}{P/3^{\circ}C}$	7,3	7,6	8,2
$\frac{P/55^{\circ}C}{P/3^{\circ}C}$	16,5	13,5	10,0
$\frac{P/3^{\circ}C}{AT/3^{\circ}C}$	1,07	1,06	1,03
$\frac{P/35^{\circ}C}{AT/35^{\circ}C}$	1,8	1,6	1,2
$\frac{P/45^{\circ}C}{AT/45^{\circ}C}$	2,0	1,6	1,04
$\frac{P/55^{\circ}C}{AT/55^{\circ}C}$	1,7	1,04	0,81
$\frac{P/35^{\circ}C}{AT/35^{\circ}C} - \frac{P/3^{\circ}C}{AT/3^{\circ}C}$	2,2	1,9	1,2
$\frac{P/45^{\circ}C}{AT/45^{\circ}C} - \frac{P/3^{\circ}C}{AT/3^{\circ}C}$	2,4	1,7	1,1
$\frac{P/55^{\circ}C}{AT/55^{\circ}C} - \frac{P/3^{\circ}C}{AT/3^{\circ}C}$	1,8	1,03	0,79

reduzindo a formação das demais formas incolores das antocianinas, aumentando a anidrobases quinoidal A complexada, ou a forma catiônica AH^+ , dependendo do pH da solução.

Considerando os dados apresentados por Asen *et al* (1972), verifica-se no Quadro 24 que a formação do complexo deve estar relacionada com o tipo de substituição no anel heterocíclico da estrutura básica das antocianinas e principalmente com a presença de um açúcar na posição C-5. Por outro lado, os dados do Quadro 24 mostram que o efeito batocromico é pequeno e semelhante para todas as antocianinas usadas.

A necessidade de uma substituição em C-5 para facilitar a complexação, tem nos dado da literatura apenas o caráter de possível pois, pressupõe a participação desse grupo, o que parece contrariar a participação do grupo C-3 (Asen *et al* 1972), especialmente nas antocianinas aciladas nesta posição.

QUADRO 24 - Efeito Batocromico e Hiperchromico para Diferentes Antocianinas (Asen *et al*, 1972).

	Aumento (%) da Abs máx. após adição de quercitina	$\frac{N^{\circ} \text{ OMe}}{N^{\circ} \text{ OH}}$	Efeito Batocromico
Delfinidina-3-glucosideo	116	0,0	4
Petunidina-3-5-diglucosideo	288	0,5	4
Cianidina-3-5-diglucosideo	310		4
Pelargonidina-3-5-diglucosideo	326	1,0	3
Peonidina-3-5-diglucosideo	331		4
Malvidina-3-5-diglucosideo	663		6

O aumento da proporção de grupos OMe em relação ao n^o de grupos OH proporciona um aumento na absorbância das soluções de antocianinas (Quadro 24).

Segundo Bishop & Nagel (1984), a malvidina-3-5-diglucosídeo condensa com a catequina formando uma proantocianidina única pois o exame dos produtos por HNMR ou C^{13} , mostram um só composto. A malvidina-3-glucosídeo não dá origem a nenhum complexo. Os dados obtidos por cromatografia em papel do complexo antocianina-ácido tânico também indicam um só composto (Figura 26). A estrutura proposta por Bishop & Nagel (1984), envolve condensação no C-2 do anel heterocíclico com uma molécula de catequina, ou a formação de um dímero da malvidina-3-5-diglucosídeo. Ambos os compostos são incolores, ao contrário do complexo ácido-antocianina. Estes fatores são indicações indiretas de que a estrutura ácido tânico-antocianina deve ser de outro tipo, o que também é confirmado pelos dados de Asen *et al* (1972), que obtiveram complexação de quercitina com uma malvidina-3-monoglucosídeo, com formação do complexo colorido.

Evidentemente, os dados de Asen *et al* (1972) e de Bishop & Nagel (1984) são parcialmente conflitantes e, a necessidade de um açúcar no carbono C-5 não parece ser condição imprescindível para a formação do complexo. Entretanto a existência de diferentes proporções das formas A, AH^+ , B e C das antocianinas em função do pH, leva a admitir, face aos resultados da literatura e deste trabalho, que não há participação do C-2 na formação da estrutura do complexo antocianina-ácido tânico, pois, isto resultaria em perda de

cor, mesmo admitindo uma menor eletrofilicidade do C-2 quando o pH do meio favorece a forma iônica das antocianinas. Neste pH, a formação de pontes de hidrogênio poderia ser favorecida entre o copigmento e a antocianina através dos vários grupos OH e por interação dos eletrons π dos vários anéis aromáticos, que levaria a formação de um aduto estável e com maior coloração, pela expansão dos orbitais $\pi \rightarrow \pi^*$. Deve ser considerado que enquanto o complexo ácido tânico-antocianina (extrato) não for decomposto pela cromatografia em papel (Figura 26), a cromatografia do extrato mostra a separação dos flavonóides não antociânicos da antocianina, levando a admitir a possibilidade de uma complexação pouco estável, com menor efeito protetivo mas, sensivelmente melhorada pela adição de ácido tânico.

A formação do complexo ácido tânico-antocianina (extrato) permite possivelmente, um aumento da área hidrofóbica na molécula do complexo quando um maior número de ligações de hidrogênio se formam diminuindo a exposição do C-2 ao ataque nucleofílico da água.

O aumento do pH pode produzir um aumento na forma não protonada dos grupos fenólicos do ácido e portanto, poderá haver uma maior exposição do carbono na posição C-2, facilitando a degradação das antocianinas.

No caso do ácido tânico, a estrutura poderia estar entre aquela preconizada para as antocianinas diaciladas e aquela preconizada para os flavonóides já que o ácido tânico contém em sua estrutura, moléculas de ácido gálico livres e esterificados com glucose. Se tal complexo se forma e mostra-

se estável no caso das antocianinas do capim gordura (*Melinis minutiflora*), seria de esperar e realmente acontece, que em produtos como vinhos tintos de alto teor de taninos, houvesse uma considerável estabilização da cor pela formação de complexo estável em teor alcoólico de 22%, (Reboreau-Gayon, 1982) contrariando o que foi observado por Maccarone et al (1987) e Asen et al (1972).

A pH 2,0 (Quadro 26), observa-se que em todas as temperaturas, a relação k_P/k_{AT} mostra valores próximos a 2,0, exceto a pH 2,0 indicando que as soluções sem adição do ácido tânico se degradam com uma taxa duas vezes maior que as antocianinas complexadas com o ácido.

A pH 3,0, o ácido tânico é menos eficiente e, a pH 4,0, a proteção do complexo ácido tânico-antocianina é praticamente inexistente nas diferentes temperaturas.

Para a temperatura de 3°C, a formação do complexo não altera de forma significativamente a estabilidade das soluções de antocianinas, o que pode ser comprovado pelos valores das relações $k_P/3^{\circ}C/k_{AT/3^{\circ}C}$ próximos a 1,0, para os pHs 2,0, 3,0 e 4,0. A temperatura de 3°C portanto, parece ser suficiente para proteger as antocianinas da degradação. Para pH 2,0, uma ligeira queda na absorbância ocorre somente quando a temperatura atinge 55°C para as soluções com e sem o ácido tânico (Quadro 27). A pH 3,0, o comportamento é semelhante, porém com uma queda mais acentuada a 55°C. A pH 4,0, a complexação antocianina-ácido tânico mostra-se instável e, a degradação das antocianinas ocorre a partir da temperatura de

QUADRO 27 - Valores de λ máx. (nm), Abs λ máx. e Abs 440 nm para as Soluções de ACY com (AT) e sem Ácido Tânico (P) em Função da Temperatura, no Início (to) e Final do Tratamento (tf = 210 h)

pH	AT				P				
		3 ⁰ C	35 ⁰ C	45 ⁰ C	55 ⁰ C	3 ⁰ C	35 ⁰ C	45 ⁰ C	55 ⁰ C
2,0	$\lambda_{\text{máx.}}$ (nm)		---	526	---	---	520	---	---
	Abs $\lambda_{\text{máx.}}$	to	0,96	0,95	0,94	0,86	0,95	0,94	0,93
		tf	0,91	0,78	0,70	0,53	0,92	0,67	0,60
	Abs 440 nm	to	0,45	0,44	0,43	0,40	0,43	0,43	0,41
		tf	0,41	0,38	0,35	0,32	0,42	0,33	0,30
	Abs 440 nm	to	46,9	46,3	45,7	46,5	45,3	45,8	44,1
	----- %	tf	45,1	48,7	50,0	60,4	45,7	49,3	50,0
	Abs $\lambda_{\text{máx.}}$								
3,0	$\lambda_{\text{máx.}}$ (nm)		---	520	---	---	522	---	---
	Abs $\lambda_{\text{máx.}}$	to	0,93	0,91	0,87	0,80	0,83	0,80	0,74
		tf	0,92	0,65	0,63	0,35	0,82	0,56	0,44
	Abs 440 nm	to	0,46	0,45	0,43	0,41	0,42	0,41	0,38
		tf	0,44	0,36	0,37	0,34	0,41	0,31	0,27
	Abs 440 nm	to	49,5	49,5	49,4	51,3	50,6	51,3	51,4
	----- %	tf	47,8	55,4	58,7	97,1	50,0	55,4	61,4
	Abs $\lambda_{\text{máx.}}$								
4,0	$\lambda_{\text{máx.}}$ (nm)		---	534	---	---	530	---	---
	Abs $\lambda_{\text{máx.}}$	to	0,85	0,84	0,73	0,81	0,82	0,80	0,87
		tf	0,84	0,50	0,49	0,42	0,81	0,59	0,52
	Abs 440 nm	to	0,50	0,50	0,42	0,49	0,50	0,51	0,51
		tf	0,46	0,40	0,40	0,40	0,52	0,48	0,41
	Abs 440 nm	to	58,8	59,5	57,5	60,5	61,0	63,8	58,6
	----- %	tf	54,8	80,0	81,6	95,2	64,2	81,4	78,9
	Abs $\lambda_{\text{máx.}}$								

AT - ácido tânico + antocianina

P - antocianina.

35°C, aumentando de intensidade a medida que se eleva a temperatura (Figura 29).

De uma maneira geral, a formação do complexo pouco contribui para minimizar a perda de absorbância das antocianinas a 55°C em todos os pHs. Por outro lado, a presença do ácido tânico melhora a estabilidade das antocianinas à pH 2,0 e pH 3,0, tanto a 35 como a 45°C.

4.3.8. Efeito de Ions Metálicos e SO₂ Sobre a Estabilidade das Antocianinas e do Complexo Antocianina-Ácido Tânico

O aumento aparente da contaminação de alimentos processados através do ar e da água utilizada é uma preocupação constante dos órgãos de saúde pública e dos processadores de alimentos. Os efeitos de alguns destes contaminantes já que ocorrem antes, durante e após o processamento dos alimentos, são bastante conhecidos, e o de outros, pouca coisa se sabe.

Para as antocianinas, a presença de ions metálicos que podem entrar em contacto com o pigmento durante todas as fases do processamento, é uma preocupação pois algumas antocianinas podem se complexar com os ions metálicos sob condições específicas e, como resultado, há um deslocamento batocrômico (Markakis, 1974) que afeta a cor e o poder de tintura do pigmento. Assim, o estudo dos efeitos destes ions na estabilidade da cor das antocianinas deve ser encarado como de grande interesse para a área de corantes naturais.

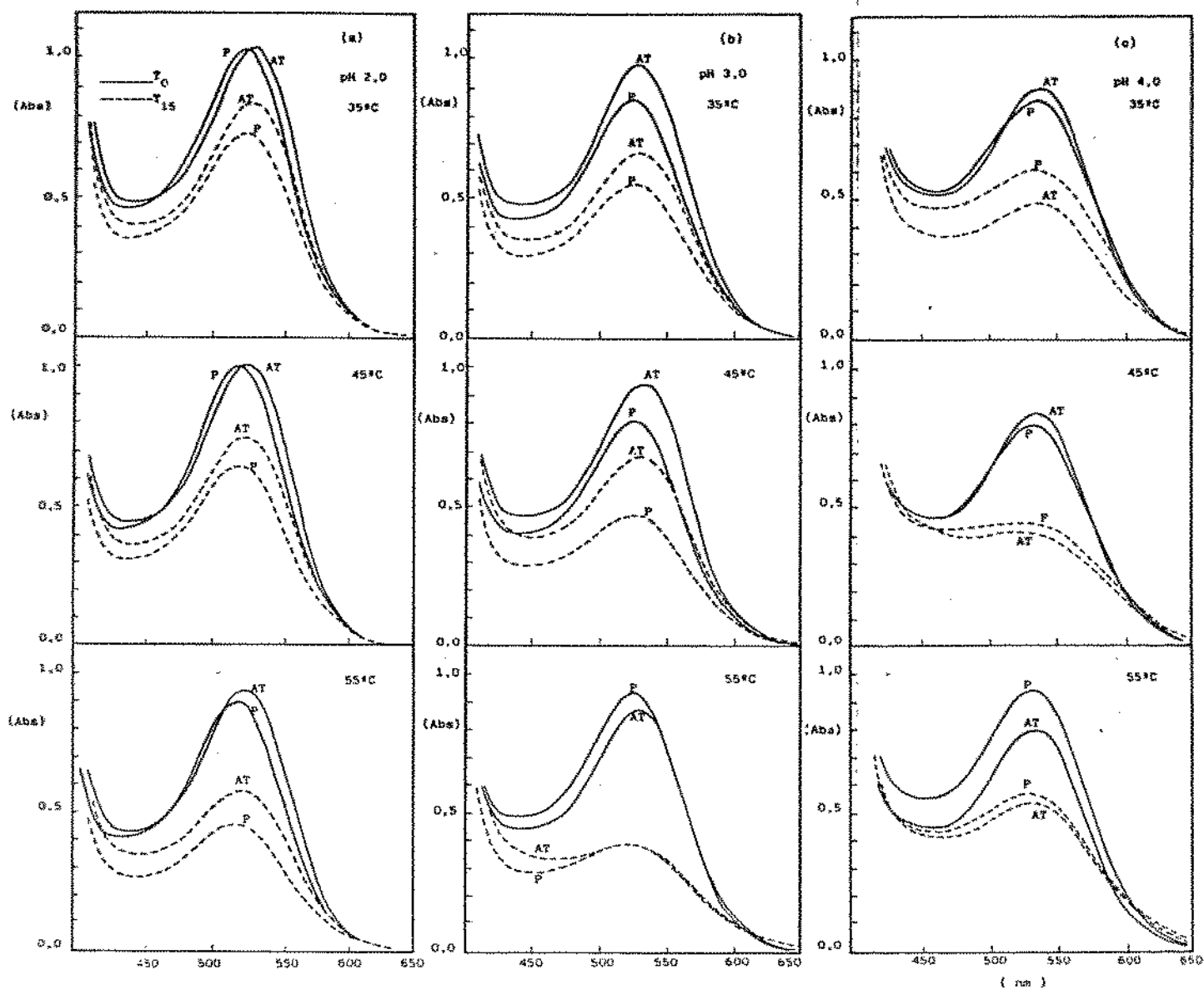


FIGURA 29 - Espectros de Absorção das Soluções de Extrato de Antocianinas a pH 2,0 (a); pH 3,0 (b) e pH 4,0 (c), Adicionadas (AT) ou não (P) de Ácido Tânico, no Tempo t_0 (—) e após 15 dias (---), a Temperatura de 35, 45 e 55°C.

4.3.8.1. Efeito do Fe^{+++} (FeCl_3)

A influência da adição de íons Fe^{+++} às soluções de antocianinas a pH 2,0 e 3,0, pode ser observado pelos dados do Quadro 28 e Figura 30. Na medida que se aumenta a concentração de íons de Fe^{+++} na solução de antocianina sem a adição do ácido tânico, ocorre uma redução significativa na absorbância do pigmento (0,810 - 0,380).

A redução da absorbância é acompanhada por um aumento na relação percentual Abs 440/Abs λ máx. (Quadro 28). A alteração no comportamento espectral ocasionada pelo aumento da absorbância a 440 nm, inclui o aparecimento e a possível predominância de antocianinas nas formas de chalcona C e base carbinol B, dentre as formas de equilíbrio descritas no item 2.1.2. e ilustrada na Figura 3.

O complexo ácido tânico-antocianina, a pH 2,0, sofre pouca alteração com a adição de Fe^{+++} .

Níveis de 30 ppm de Fe^{+++} induzem uma ligeira alteração na absorção característica, com uma elevação na relação percentual Abs 440 nm/Abs λ máx. de 53,8% (0,0 ppm de Fe^{+++}) para 63,4% (30 ppm de Fe^{+++}). Para as outras soluções a pH 2,0, não há alteração significativa pela adição de Fe^{+++} (Figura 30).

Para as soluções de antocianinas a pH 3,0, a presença de Fe^{+++} não altera significativamente o comportamento do espectro das soluções (Figura 30b) e Quadro 6, com e sem ácido tânico.

QUADRO 28 - Valores de Abs no λ máx. e a 440 nm e suas Relações, para Antocianinas a pH 2,0 e 3,0 Adicionadas (AT) ou não, (P) de 80 mg de Ácido Tânico em Presença de Fe

Fe ⁺⁺⁺		Antocianina + Ácido Tânico (AT)			Antocianina (P)			
	(ppm)	Abs λ máx.	Abs 440 nm	Abs 440 (X)	Abs λ máx.	Abs 440 nm	Abs 440	Abs (AT-P)x100
				Abs λ máx. (X)			Abs λ máx.	Abs P
pH 2,0	0	0,93 (522)*	0,50	53,8	0,81 (518)	0,39	48,2	14,8
	5	0,78	0,46	60,0	0,75	0,38	50,7	4,0
	10	0,74	0,44	59,5	0,70	0,37	52,9	5,7
	15	0,94	0,53	56,4	0,71	0,37	52,1	32,4
	20	0,92	0,53	57,6	0,47	0,34	72,3	95,8
	25	0,90	0,53	58,9	0,43	0,32	74,4	109,3
	30	0,93 (530)	0,59	63,4	0,38 (520)	0,33	86,8	144,7
$\bar{X} \lambda$ máx.		526 nm			520 nm			$\bar{X} = 124,7$
$\bar{X}$ Abs		0,88			0,61			
pH 3,0	0	0,77 (520)	0,43	55,8	0,56 (520)	0,30	53,6	37,5
	5	0,76 (530)	0,43	56,6	0,42 (522)	0,22	52,4	81,0
	10	0,68	0,38	55,9	0,30	0,15	50,0	126,7
	15	0,64	0,35	54,7	0,23	0,13	56,5	178,3
	20	0,57	0,30	52,7	0,19 (552)	0,15	78,9	200,0
	25	0,53 (533)	0,29	54,7	---	---	---	---
	30	---	---	---	---	---	---	---
$\bar{X} \lambda$ máx.		531 nm			535 nm			$\bar{X} = 124,7$
$\bar{X}$ Abs		0,66			0,34			

(*) - Valores do comprimento de onda de máxima absorção.

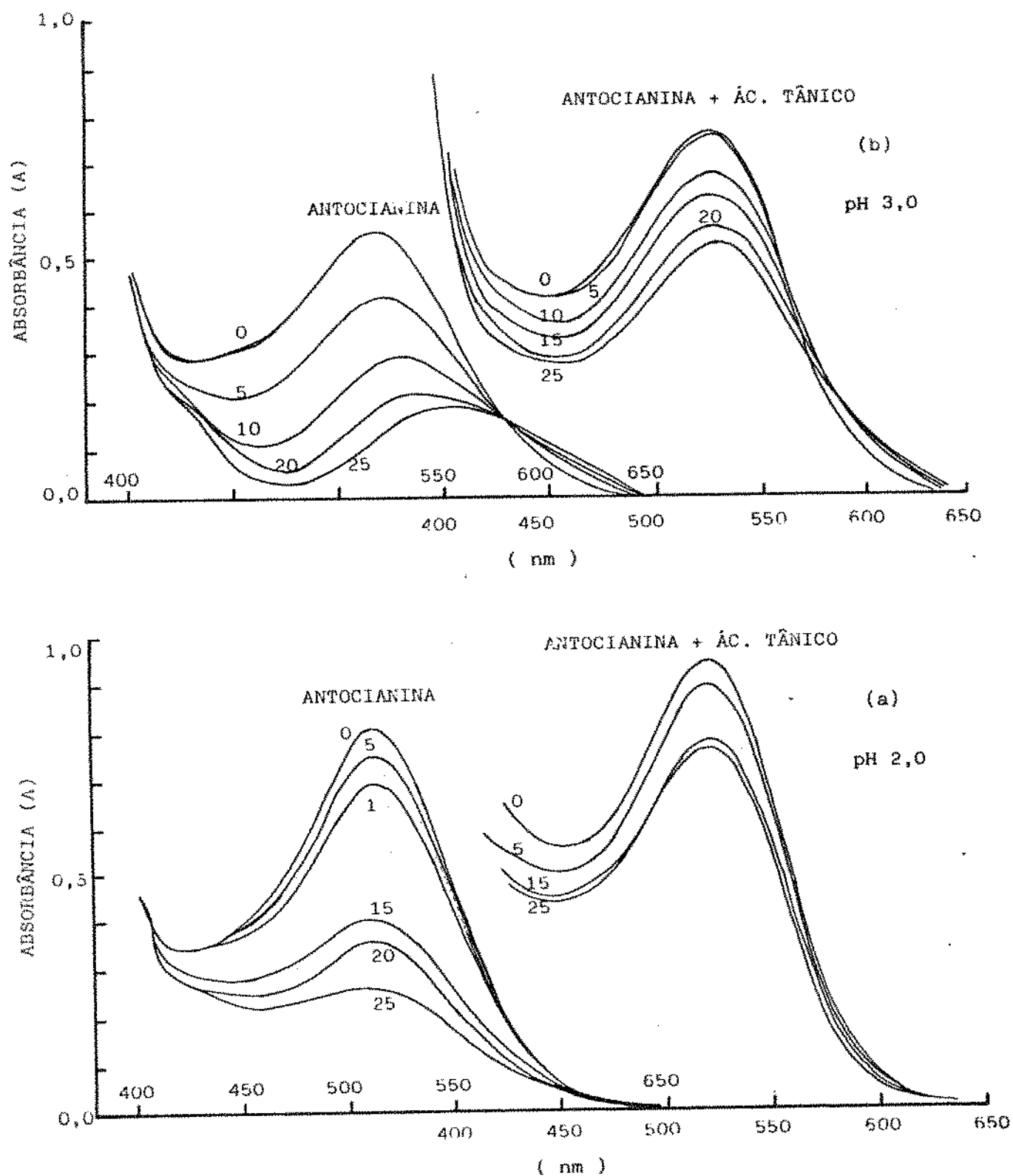


FIGURA 30 - Espectros de Absorção das Soluções de Extrato de Antocianinas a pH 2,0 (a) e a pH 3,0 (b), Adicionadas ou não de Ácido Tânico em Presença de 0, 5, 10, 15, 20 e 25 ppm de Fe^{++}).

Os dados do Quadro 28, mostram que as soluções de antocianinas a pH 3,0, sem a adição de ácido tânico, somente apresentam alteração no espectro visível a partir de 20 ppm de Fe^{+++} quando a relação percentual Abs 440 nm/Abs λ máx. sobe de 56,5 para 78,9%.

Pelos dados do Quadro 28, pode-se observar que a redução da absorbância a pH 3,0 foi maior para as soluções de antocianinas sem a adição do ácido tânico. Ao mesmo tempo, as soluções a pH 3,0 apresentam deslocamento batocrômico na ausência de ácido tânico. O deslocamento aumenta a medida que se adiciona concentrações maiores de Fe^{+++} , variando de 522 nm (5 ppm) para 552 ppm (20 ppm). A mesma amplitude de variação não ocorre com as soluções do complexo ACY-AT, que ficam na faixa de 530 e 533 nm para 5 e 25 ppm de Fe^{+++} , respectivamente.

O efeito protetor do complexo ACY-AT é mais acentuado para as soluções a pH 3,0, do que a pH 2,0 pois a efetividade do ácido tânico medido pela relação $(Abs(AT-P)/Abs P) \times 100$, sobe de 58,1% em pH 2,0 para 124,0 a pH 3,0. Este aumento pode ser explicado pela maior proteção do ácido tânico à degradação das antocianinas pela própria influência do pH (Quadro 28).

Evidentemente há que considerar o efeito do pH sobre a estrutura das antocianinas, do ácido tânico e da formação de $Fe(OH)_3$. Os dados no Quadro 6, mostram um efeito protetor maior para as soluções a pH 2,0, decrescendo para pH 3,0 e 4,0. Os dados mostram que o efeito dos íons Fe^{+++} não varia com o aumento da sua concentração a pH 2,0 mas, esse efeito existe a pH 3,0 e 4,0. A pH 2,0 o ácido tânico pode existir

predominantemente na forma não dissociada dos seus grupos carboxílicos e fenólicos aumentando a dissociação com o aumento do pH. Pode-se admitir que a formação do complexo ferro-ácido tânico aumenta a pH baixo e que esta formação predomina sobre a formação da laca, evitando a perda de cor. Esta ocorrência é visível nos dados do Quadro 6, para o efeito de Fe^{+++} sem a adição do ácido tânico onde a laca poderá se formar.

A formação de complexos protetores das antocianinas pode ser causada pela combinação da molécula da antocianina com a molécula de ácido tânico e, pela formação de lacas entre os íon Fe^{+++} e os grupos -OH vicinais do anel B da cianidina originando compostos estáveis com alterações na cor característica do pigmento. Assim, o efeito protetor do ácido tânico em soluções de antocianinas com a adição de Fe^{+++} pode ser devido à formação de complexos estáveis entre os íons de Fe^{+++} e o ácido tânico, e entre as antocianinas, ácido tânico e íons de Fe^{+++} .

Esses efeitos estão aumentados a pH 3,0 (Quadro 28), onde aumenta a formação de laca e já há formação de precipitado com 20 ppm de Fe^{+++} , o que só ocorre a 30 ppm de Fe^{+++} com a adição do ácido tânico. Também a pH 3,0, começa a haver aumento da concentração da forma de base carbinol B (Figura 3) das antocianinas, que é incolor.

Para as soluções de antocianinas a pH 4,0, o efeito da adição de Fe^{+++} não pode ser observado pois, nesse pH, a adição de apenas 5 ppm de Fe^{+++} às soluções de antocianinas, são suficientes para o desenvolvimento de turbidez e formação

de precipitado, impedindo totalmente qualquer observação. O sobrenadante com baixa absorção, indica uma considerável redução na concentração dos pigmentos na solução.

Szecheny & Box (1964), observaram que a adição de 5 ppm de Fe^{+++} é suficiente para provocar uma imediata mudança na coloração das antocianinas de framboeza.

8.3.8.2. Efeito de Cu^{++} (CuCl_2)

Os resultados do efeito do Cu^{++} sobre as soluções de antocianinas, estão resumidas no Quadro 29 e ilustradas na Figura 31.

Para as soluções de antocianinas a pH 2,0 (Quadro 29), adicionadas de ácido tânico, a presença de 100 ppm de Cu^{++} altera o espectro da solução e, a adição de concentrações maiores de Cu^{++} não altera proporcionalmente as características do espectro visível da solução, não havendo portanto evidências de uma relação entre aumento de concentração de Cu^{++} com maior degradação de pigmentos nesse pH.

As soluções do complexo antocianina-ácido tânico a pH 3,0, apresentam um comportamento semelhante.

Para as soluções de antocianinas sem a adição do ácido tânico a pH 2,0 e 3,0 (Quadro 29), observa-se que os valores percentuais de $\text{Abs } 440 \text{ nm} / \text{Abs } \lambda \text{ máx.}$ foram significativamente inferiores àqueles das soluções adicionadas de ácido, nesses pHs. Aqui, à medida que se aumenta a concentração de Cu^{++} na solução, há um decréscimo acentuado na absorbância no $\lambda \text{ máx.}$,

QUADRO 29 - Valores de Abs no λ máx. e a 440 nm e suas Relações, para Antocianinas em pH 2,0; 3,0 e 4,0, Adicionadas (AT) ou não (P) de 80 mg de Ácido Tânico/10 ml em Presença de Cu++

Cu++ (ppm)	Antocianina + Ácido Tânico (AT)				Antocianina (P)			
	Abs λ máx.	Abs 440 nm	Abs 440 (%)	Abs λ máx.	Abs 440 nm	Abs 440	Abs (AT-P)x100	
			Abs λ máx. (%)			Abs λ máx.	Abs P	
pH 2,0	0	0,91 (530)*	0,49	53,9	0,75 (520)	0,35	46,7	21,3
	100	0,77	0,61	79,2	0,51	0,28	54,9	51,0
	200	0,76	0,58	76,3	0,40	0,25	62,5	90,0
	300	0,74	0,53	71,6	0,32	0,22	68,8	131,3
	400	0,72	0,56	77,8	0,26	0,21	80,8	176,9
	500	0,69 (530)	0,56	81,2	0,22 (520)	0,19	86,4	213,6
$\bar{X}$ λ máx.	530 nm			520 nm			$\bar{X} = 114,0 \%$	
$\bar{X}$ Abs	0,77			0,41				
pH 3,0	0	0,75 (532)	0,41	54,7	0,49	0,29	54,2	53,1
	100	0,64	0,53	82,0	0,31	0,25	80,7	106,5
	200	0,68	0,59	86,8	0,15	0,21	110,0	353,3
	300	0,72	0,56	77,8	---	---	---	---
	400	0,65	0,64	98,5	---	---	---	---
	500	0,74 (528)	0,60	81,1	---	---	---	---
$\bar{X}$ λ máx.	530 nm			522 nm			$\bar{X} = 114,0 \%$	
$\bar{X}$ Abs	0,70			0,32				
pH 4,0	0	0,82 (536)	0,45	54,9	0,44 (532)	0,29	65,9	86,4
	10	0,73	0,51	69,4	0,36	0,30	83,3	102,8
	20	0,68	0,55	80,4	0,31	0,32	103,2	119,4
	50	0,64 (532)	0,70	109,4	0,23	0,32	139,1	178,9
$\bar{X}$ λ máx.	534 nm			532 nm			$\bar{X} = 121,7 \%$	
$\bar{X}$ Abs	0,72			0,34				

(*) - Valores do comprimento de onda de máxima absorção.

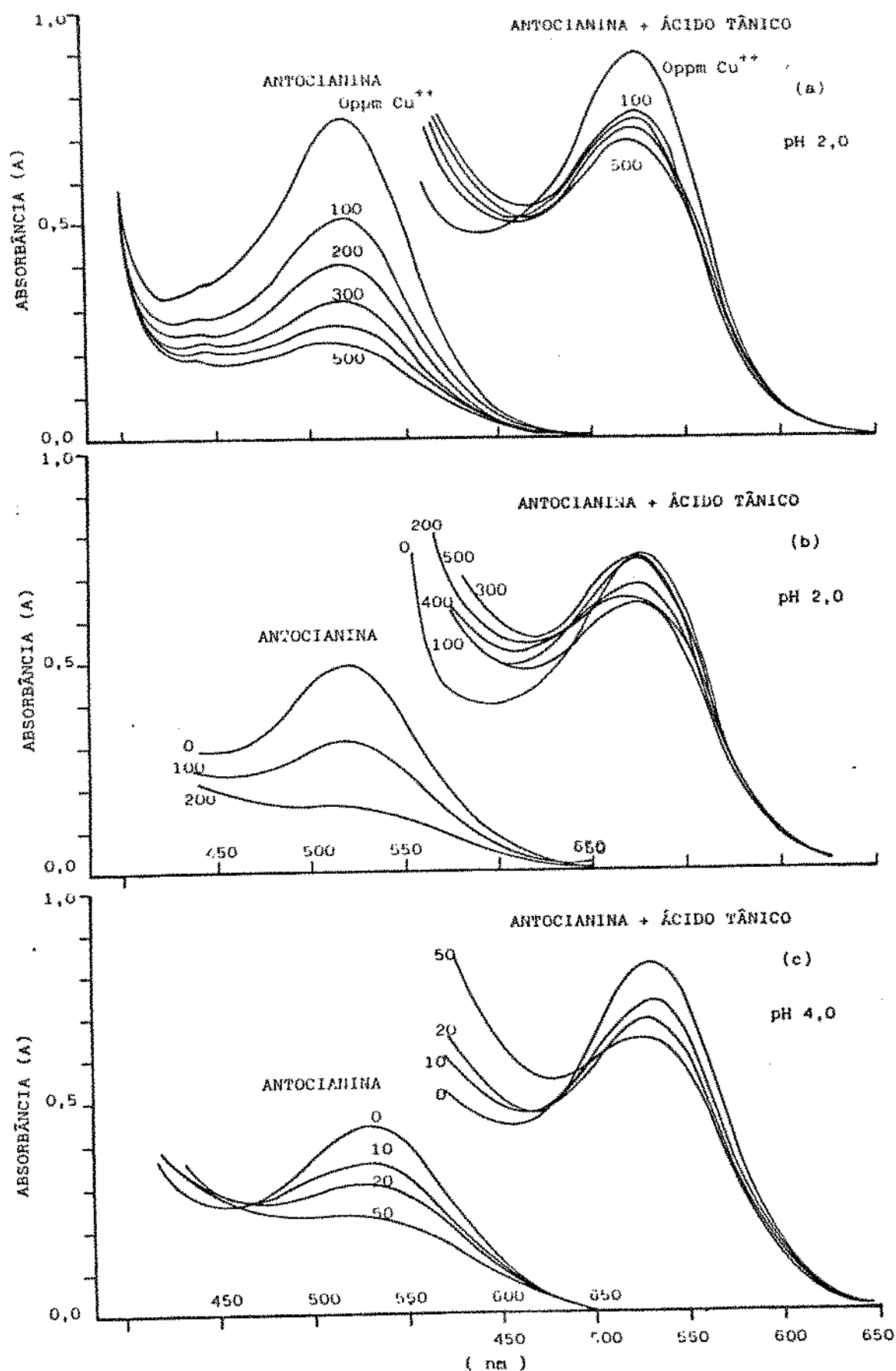


FIGURA 31 - Espectros de Absorção das Soluções de Extrato de Antocianinas a pH 2,0 (a), pH 3,0 (b), pH 4,0 (c), Adicionadas ou não de Ácido Tânico em Presença de 0, 100, 200, 300, 400 e 500 ppm de Cu^{++} .

e um decrescimo menor na Abs 440 nm, o que, consequentemente, origina uma elevação no valor da relação percentual Abs 440 nm/Abs λ máx.

Para as soluções de antocianinas com mais de 200 ppm de Cu^{++} a pH 3,0 (Quadro 29), sem o ácido tânico, as concentrações altas de Cu^{++} dificultam a leitura da absorbância, pela formação de precipitado.

A pH 4,0, as soluções de antocianinas são afetadas pela adição de Cu^{++} , mesmo a níveis inferiores àqueles utilizados para pH 2,0 e pH 3,0. A adição de níveis superiores a 50 ppm de Cu^{++} a pH 4,0, provoca a formação de considerável quantidade de precipitado.

Segundo Starr & Francis (1973) e McKee & Wolf (1963), a presença de Cu^{++} em grandes concentrações poderá levar a alguma reação indesejável em produtos alimentícios, pela formação de complexos Cu^{++} - antocianina.

De uma forma geral, podemos observar (Figura 31) que para todas as soluções, a adição de Cu^{++} alterou drasticamente o comportamento do espectro na região do visível das antocianinas, levando a relação percentual Abs 440 nm/Abs λ máx. a valores superiores a 100% (Quadro 29), com uma descaracterização do espectro original da solução das antocianinas, na faixa do visível (Figura 31).

A formação de complexo de Cu^{++} e Fe^{+++} com as antocianinas afetando a coloração das soluções foi observado por Somaatmadja *et al* (1964) e Jurd & Asen (1966).

A maior proporção de formação de anidrobases da antocianina com o aumento do pH pode ser responsável pelo

aumento da formação de complexos antocianinas-metals, pois a pH acima de 3,0, a formação de anidrobases das antocianinas aumenta (Asen *et al.*, 1972; Jurd *et al.*, 1966).

8.3.8.3. Efeito do SO₂

Os dados sobre o efeito do SO₂ nas antocianinas estão resumidos no Quadro 30 e na Figura 32.

A pH 2,0, as soluções de antocianinas em presença de ácido tânico e adicionadas de 5, 10, 20 ppm de SO₂ não sofreram uma degradação significativa, com a absorbância caindo de 0,90 (0,0 ppm de SO₂) para 0,760 (20 ppm de SO₂). Sem a adição do do ácido, a absorbância cai de 0,790 para 0,540 entre 0 e 20 ppm de SO₂. Estes dados indicam que o ácido tânico tem efeito protetor em relação a degradação das antocianinas a pH 2,0, quando as soluções apresentaram níveis de até 20 ppm de SO₂. Quando se aumenta a concentração de SO₂ do meio para 40 ppm, as perdas, tanto para as antocianinas com o ácido tânico como para aquelas sem o ácido, são semelhantes indicando a baixa efetividade do complexo ácido tânico-pigmento para a estabilidade das antocianinas na presença de concentrações superiores a 20 ppm de SO₂.

O aumento da concentração de SO₂ produz uma pequena elevação na relação percentual Abs 440 nm/Abs λ máx. (%) (Quadro 30), tanto para as soluções de antocianinas sem a adição de ácido tânico, como para aquelas adicionadas de 80 mg de ácido tânico.

QUADRO 30 - Valores de Abs no λ máx. e Abs. 440 nm e suas Relações, Percentuais para Antocianinas em pH 2,0; 3,0 e 4,0, Adicionadas (AT) ou não (P) de Ácido Tânico em Presença de SO_2

SO_2		Antocianina + Ácido Tânico (AT)			Antocianina (P)			
(ppm)		Abs λ máx.	Abs 440 nm	Abs 440 (%)	Abs λ máx.	Abs 440 nm	Abs 440	Abs (AT-P)x100
				Abs λ máx. (%)			Abs λ máx.	Abs P
pH 2,0	0	0,90 (526)*	0,50	55,6	0,79	0,36	45,6	13,9
	5	0,84	0,47	55,9	0,71	0,33	46,5	18,3
	10	0,82	0,46	56,1	0,56	0,32	49,2	26,2
	20	0,76	0,44	57,9	0,54	0,28	51,9	40,7
	40	0,45 (518)	0,25	55,6	0,41	0,23	56,1	9,8
$\bar{X} \lambda$ máx.		522 nm			518 nm			$\bar{X} = 21,0 \%$
$\bar{X}$ Abs		0,75			0,62			
pH 3,0	0	0,83	0,50	60,2	0,61	0,34	55,7	36,1
	5	0,71	0,46	64,8	0,46	0,28	60,9	53,3
	10	0,61	0,43	70,5	0,31	0,22	71,0	96,8
	20	0,46	0,38	82,6	0,20	0,17	85,0	130,0
	40	0,31	0,31	100,0	0,14	0,14	100,0	121,4
$\bar{X} \lambda$ máx.		528 nm			522 nm			$\bar{X} = 87,5 \%$
$\bar{X}$ Abs		0,58			0,34			
pH 4,0	0	0,78	0,61	78,2	0,60	0,41	68,3	30,0
	5	0,51	0,36	70,6	0,42	0,30	71,4	21,4
	10	0,43	0,31	72,1	0,26	0,22	84,6	65,4
	20	0,29	0,25	86,2	0,18	0,18	100,0	61,1
	40	0,16	0,17	106,3	0,10	0,13	130,0	60,0
$\bar{X} \lambda$ máx.		532 nm			526 nm			$\bar{X} = 47,6 \%$
$\bar{X}$ Abs		0,43			0,31			

(*) - Valores do comprimento de onda de máxima absorção.

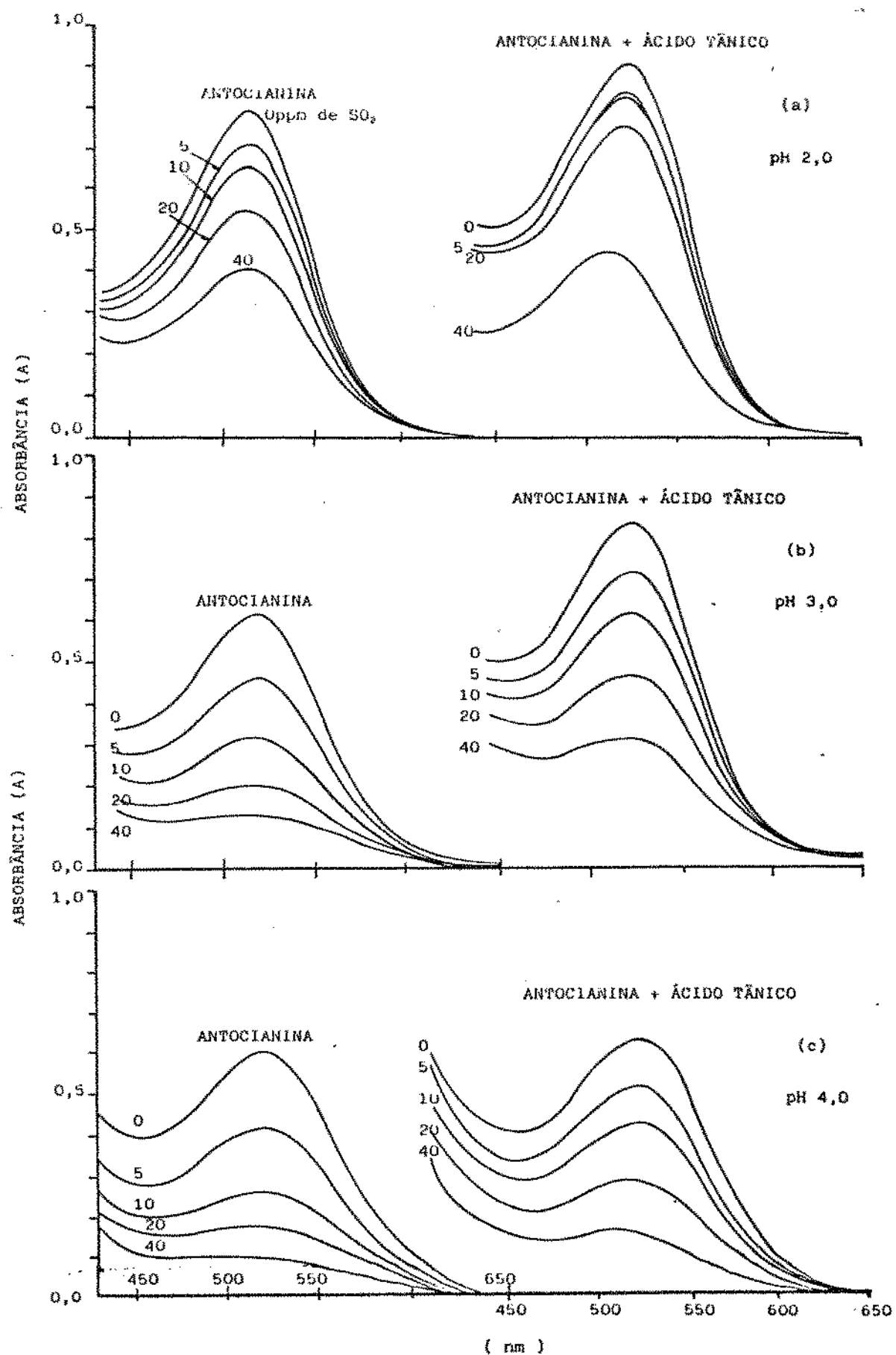


FIGURA 32 - Espectros de Absorção das Soluções de Antocianinas a pH 2,0 (a); pH 3,0 (b); pH 4,0 (c), Adicionadas ou não de Ácido Tânico, na Presença de (0, 5, 10, 20 e 40 ppm de SO_2 .

Tanto a pH 3,0, como a pH 4,0, os espectros de absorção (Figura 32), mostram valores significativamente alterados quando às soluções de antocianinas são adicionadas concentrações crescentes de SO_2 , com aumento na relação $\text{Abs}_{\text{nm}}/\text{Abs}_{\lambda \text{ máx.}} (\%)$ (Quadro 30). As absorbâncias das soluções de antocianinas a pH 3,0, adicionadas de ácido tânico são em média 85% maior que aquelas sem o ácido, indicando que a presença do ácido tânico, resulta em uma solução com menor perda de absorbância no $\lambda \text{ máx.}$

Brouillard *et al* (1980b) e Markakis (1982a), sugerem que pequenas quantidades de SO_2 podem descolorir quantidades significativas de antocianinas dependendo do pH do meio. Estas informações comprovam os resultados obtidos no presente trabalho, onde a pH 2,0, a descoloração somente começa a ocorrer em concentrações mais elevadas de SO_2 . A pH 3,0 e pH 4,0, o poder descolorante do SO_2 é sentido mesmo em concentrações muito baixas, como pode ser verificado pelos dados do Quadro 30.

5. CONCLUSÕES

A cromatografia em coluna de PVP eluída com MeOH:H₂O seguida de separação em papel cromatográfico com os solventes HCl e BAW, mostrou ser uma técnica capaz de separar as antocianinas presentes na inflorescência do capim gordura (M. minutiflora).

O extrato de antocianinas do capim gordura é constituído de 5 frações antociânicas distintas, com uma delas presente no extrato numa proporção de 87% do total.

A fração principal purificada apresenta em sua estrutura química, uma molécula de glucose, uma de arabinose e uma molécula de ácido caféico, ligados em C-3 a uma cianidina, formando a estrutura da cianidina-3-cafeoil-glucosil-arabinose.

A presença de flavonóides não antociânicos melhora sensivelmente a estabilidade da cor da solução quando em presença da luz e variação de pH.

A rutina, apesar de ser caracterizada como um bom elemento para formar complexos com as antocianinas, apresenta

problemas de solubilidade a pH ácido, o que dificulta sua utilização no estudo da estabilidade do complexo rutina-antocianina.

. O ácido tânico forma complexo com as antocianinas presentes no extrato da inflorescência do capim gordura, com deslocamento batocrômico no comprimento de onda de máxima absorção e, efeito hiperacrômico na absorbância da solução de antocianinas.

. O deslocamento batocrômico provocado pela formação do complexo ácido tânico-antocianina é mais acentuado a pH 3,0, e o efeito hiperacrômico aumenta na medida que se eleva o pH de 2,0 para 4,0.

. A formação do complexo ácido tânico-antocianina, permite, possivelmente, o aumento da área hidrofóbica na molécula do complexo, diminuindo a exposição do C-2 ao ataque nucleofílico da água.

. O complexo formado entre ácido tânico e as antocianinas apresenta características cromatográficas diferentes da antocianina e do ácido tânico que lhes deram origem.

. As variações de pH e a incidência de luz são os fatores que mais contribuem para a degradação da cor das antocianinas do capim gordura e, esta degradação é acelerada quando ocorre a associação de luz com o oxigênio.

. Independente do pH, na ausência de luz e, em atmosfera de nitrogênio, ocorre a degradação da cor das antocianinas mostrando existir um mecanismo diferente de degradação, que não necessita de luz.

. A formação do complexo ácido tânico-antocianina contribui sensivelmente para a melhoria da estabilidade das antocianinas em pH 2,0 e 3,0 e, em menor amplitude a pH 4,0.

. A presença de íons metálicos pode alterar o padrão espectral da cor das antocianinas na região do espectro visível e pode formar precipitado pela reação dos metais com as antocianinas, cujo efeito é acentuado na medida em que se eleva o pH do meio de 2,0 para 4,0.

. A formação do complexo ácido tânico-antocianina não contribui significativamente para a melhoria da estabilidade da cor da solução quando em presença de íons metálicos e SO_2 .

. A cor da solução de antocianinas e do complexo antocianina-ácido tânico sofre uma pequena degradação quando estocados sob refrigeração (3°C), na ausência de luz numa faixa de pH de 2,0 até 4,0.

. O aumento da temperatura provoca um aumento proporcional na degradação da cor tanto das antocianinas como do complexo ácido tânico-antocianinas.

6. LITERATURA CITADA

- ADAMS, J.B. 1972. Changes in the polyphenols of red fruits during processing - the kinetics and mechanism of anthocyanins degradation. Campden Food Pres. Res. Assoc. Tech. Bull. p. 22, Chipping Campden, Gloucestershire, Eng.
- ADAMS, J.B. 1973a. Colour stability of red fruits. Food Manuf., 41., 19-20.
- ADAMS, J.B. 1973B. Thermal degradation of anthocyanins with particular reference to the 3-glycosides of cyanidin. I. In acidified aqueous solution at 100°C. J. Sci. Food Agric. 24, 747-762.
- ADAMS, J.B. & WOODMAN, J.S. 1973. Thermal degradation of anthocyanins with particular reference to the 3-glucoside of cyanidin. II. The anaerobic degradation of cyanidin-3-rutinoside at 100°C and pH 3.0 in the presence of sodium sulphite. J. Science Food Agric. 24, 763-768.
- ASEN, S. 1974. Factors affecting flower colour. Acta Hortic. 41, 57-68.
- ASEN, S. 1976. Known factors responsible for infinite flower color variations. Acta Hortic. 63, 217-223.
- ASEN, S. and JURD, L. 1967. The constitution of crystalline, blue cornflower pigment. Phytochem. 6, 577-584.
- ASEN, S., NORRIS, K.H. and STEWART, R.N. 1969. Absorption spectra and color of aluminium-cyanidin 3-glucoside complexes as influenced by pH. Phytochem. 8, 653-659.
- ASEN, S., NORRIS, K.H. and STEWART, R. N. 1971. Effect of pH and concentration of the anthocyanin-flavonol co-pigment complex on the color of 'Better Times' roses. J. Am. Soc. Hort. Sci. 96, 770-773.

- ASEN, S., STEWART, R.N. and NORRIS, K.H. 1972. Co-pigmentation of anthocyanins in plant tissues and its effect on color. *Phytochem.* 11, 1139-1144.
- ASEN, S., STEWART, R.N. and NORRIS, K.H. 1975. Anthocyanin, flavonol copigments, and pH responsible for Larkspur flower color. *Phytochem.* 14, 2677-2682.
- ASEN, S., STEWART, R.N. and NORRIS, K.H. 1977. Anthocyanin, and pH involved in the color of 'Heavenly Blue' morning glory. *Phytochem.* 16, 1118-1119.
- ASEN, S., STEWART, R.N. and NORRIS, K.H. and MASSIE, D.R. 1970. A stable blue nonmetallic co-pigment complex of delphinin and C-glycosylflavones in Prof. Blaauw Iris. *Phytochem.* 9, 619-627.
- ASEN, S., STEWART, R.N. and NORRIS, K.H. 1978. Naturally occurring colorant for food and beverages. U.S. Pat. Appl. 910-152.
- BAYER, F. FINK, A., NETHER, K. and WEGMANN, K. 1966. Complex formation and flower colors. *Angew. Chem. Inter. Edit.* 5, 791-798. Cited by Asen, S. 1976. Known factors responsible for infinite flower color variations. *Acta Hort.* 63, 217-223.
- BISHOP, P.D. & NAGEL, C.W. 1984. Characterization of the condensation product of malvidin 3,5-diglucoside and catechin. *J. Agric. Food Chem.* 32, 1022-1026.
- BOBBIO, F.O., BOBBIO, P.A. & SOUZA, S.C. 1982. Separation and Identification of cinnamic acids by TLC. *J. Chemical Education.* 2:182.
- BROUILLARD, R. 1981. Origin of the exceptional color stability of the Zebrina anthocyanin. *Phytochem.* 20: 143-146.
- BROUILLARD, R. 1982. Chemical structure of anthocyanins. In Anthocyanins as Food Colors, (P. Markakis, ed.) pp. 1-40, Academic Press, New York.
- BROUILLARD, R. and DELAPORTE, B. 1977. Chemistry of anthocyanin pigments. 2. Kinetic and thermodynamic study of proton transfer, hydration, and tautomeric reactions of malvidin 3-glucoside. *J. Am. Chem. Soc.* 99, 8461-8468.
- BROUILLARD, R. and EL HAGE CHAHINE, J.M. 1980b. Chemistry of anthocyanin pigments. 6. Kinetic and thermodynamic study of hydrogen sulfite addition to cyanin. Formation of a highly stable Meisenheimer-type adduct derived from a 2-phenylbenzopyrylium salt. *J. Am. Chem. Soc.* 102, 5375-5378.

- CHEN, L.J. & HRAZDINA, G. (1981). Structural aspects of anthocyanin-flavonoid complex formation and its role in plant colour. Phytochem., 20, 297.
- COFFEY, D.G., CLYDESDALE, F.M., FRANCIS, F.J. and DAMON JR., R.A. 1981. Stability and complexation of cyanidin 3-glucoside and raspberry juice extract in the presence of selected cations. J. Food Protect. 44, 516-523.
- CROSBY, W.H.; FULGER, C.V.; HASS, G.J. & NESHEIWAT, D.M. 1984. Stabilized anthocyanin food colorant. U. S. Patent. n-4.481. 226.
- DARAVINGAS, G. and CAIN, R.F. 1965. Changes in the anthocyanin pigments of raspberries during processing and storage. J. Food Sci. 30, 400-405.
- DARAVINGAS, G. and CAIN, R.F. 1968. Thermal degradation of black raspberry anthocyanin pigments in model systems. J. Food Sci. 33, 138-142.
- DU, C.T. and FRANCIS, F.J. 1973. Anthocyanins of roselle (Hibiscus sabdariffa L.). J. Food. Sci. 38, 810-812.
- DU, C.T. and FRANCIS, F.J. 1975. Anthocyanins of garlic (Allium sativum L.). J. Food. Sci. 40, 1101-1102.
- FULEKI, T. & FRANCIS, F.J. 1968. Quantitative methods for anthocyanins. 2. Determination of total anthocyanins and degradation index for cranberry juice. J. Food. Sci. 33, 78-83.
- FRANCIS, F.J. 1967. Criteria for identification of anthocyanin. Horticultural Society. 2(4): 170-171.
- FRANCIS, F.J. 1977. Anthocyanins. In Current Aspects of Food Colorants, (T.E. Furia, ed.) pp. 19-27, CRC Press, Chleveland, OHIO.
- FRANCIS, F.J. 1982. Analyss of anthocyanins in MARKAKIS, P. Anthocyanins in the food color. AVI. 586 p. 1982.
- FRANCIS, F.J. and HARBORNE, J.B. 1966. Anthocyanins of the garden huckleberry, Solanum quineense. J. Food Sci. 31, 524-528.
- GEISSMAN, T.A. 1962. The Chemistry of Flavonoid Compounds. The MacMillan Co., New York. pp. 666
- GEISSMAN, T.A.; JORGENSON, E.C. and HARBORNE, J.B. 1953. The effect of aluminium chloride on absorption spectra of anthocyanins. Chem. Ind., Dec., 1389.

- GOTO, T.; KONDO, T.; TAMURA, H.; KAWAHORI, K. & HATTORI, H. 1983. Structure of platyconin, a diacylated anthocyanin isolated from the Chinese bell-flower Platycodon grandiflorum. Tetrahedron Letters, 24, 2181.
- GRISEBACH, H. 1982. Biosynthesis of anthocyanins. In Anthocyanins as Food Colors, (P. Markakis, ed.) pp. 69-92, Academic Press, New York.
- HABIB, A.T. & BROWN, H.D. 1916. The effect of oxygen and hydrogen ion concentration on color change in processed beets straw berries and raspberries. Proc. Am. Soc. Hort. Sci. 68, 482-490.
- HARBORNE, J.B. 1958a. The chromatographic identification of anthocyanin pigments. J. Chromatog. 1, 473-488.
- HARBORNE, J.B. 1958b. Spectral methods of characterizing anthocyanins Biochem. J. 70, 22-28.
- HARBORNE, J.B. 1964. Plant polyphenols - XI. The structure of acylated anthocyanins. Phytochem. 3, 151-160.
- HARBORNE, J.B. 1965. Plant polyphenols - XIV. Characterization of flavonoid glycosides by acidic and enzymic hydrolyses. Phytochem. 4, 107-120.
- HARBORNE, J.B. 1967. Comparative Biochemistry of the Flavonoids, pp. 1-36, Academic Press, London, England.
- HARBORNE, J.B. 1973. Phytochemical Methods, pp. 38-88, Chapman & Hall Ltd., London, England.
- HARBORNE, J.B. 1979. Variation in and functional significance of phenolic conjugation in plants. In Recent Advances in Phytochemistry, Vol. 12. Biochemistry of Plant Phenolics, (T. Swain, J.B. Harborne and C.F. Van Sumere, eds.) pp. 457-474, Plenum Press, New York.
- HARBORNE, J.B. & HAW, E. 1964. Plant polyphenols, XIII. The systematic distribution and origin of anthocyanins containing branched trisacharides. Phytochem. 3, 453-463.
- HARPER, K.A. 1968. Structural changes of flavylum salts. IV. Polarographic and spectrometric examination of pelargonidin chloride. Aust. J. Chem. 21, 221-227.
- HOSHINO, T.; MATSUMOTO, U. & GOTO, T. 1980. The stabilizing effect of the acyl group on the co-pigmentation of acylated anthocyanins with C-glucosylflavones. Phytochem., 19, 663.
- HRAZDINA, G. 1970. Oxidation of the anthocyanidin-3,5-diglucosides with H_2O_2 : The structure of malvone. Phytochem. 9, 1647-1652.

- HRAZDINA, G. 1974. Reactions of anthocyanins in food products. *Lebensm. - Wiss. u. Technol.* **7**(4), 103-108.
- IACOBucci, G.A. & Sweeny, J.G. 1983. The chemistry of anthocyanins, anthocyanidins and related flavylum salts. *Tetrahedron*, **39**(19), 3005.
- JACKMAN, R.L.; YADA, R.Y.; TUNG, M.A.; SPEERS, R.A. (1987a). Anthocyanins as food colorants. A Review. *J. of Food Biochemistry*. **11**. 201-247.
- JACKMAN, R.L.; YADA, R.Y. & TUNG, M.A. 1987b. A Review. Separation and chemical properties of anthocyanins used for their qualitative and quantitative analysis. *J. of Food Biochemistry*. **11**. 279-308.
- JURD, L. 1963. Anthocyanins and related compound. I. Structural transformations of flavylum salts in acidic solutions. *J. Org. Chem.* **28**, 987-991.
- JURD, L. 1964a. Reactions involved in sulfite bleaching of anthocyanins. *J. Food Sci.* **29**, 16-19.
- JURD, L. 1972a. Some advances in the chemistry of anthocyanin-type plant pigments. In The Chemistry of Plant Pigments, Chichester, C.O. (ed.) pp. 123-142, Academic Press, New York.
- JURD, L. and ASEN, S. 1966. The formation of metal and "copigment" complexes of cyanidin 3-glucoside. *Phytochem.* **5**, 1263-1271.
- LABUZA, T.P. and RIBOH, D. 1982. Theory and application of Arrhenius kinetics to the prediction of nutrient losses in foods. *Food Technol.* **36**(10), 66-74.
- LUKTON, A.; CHICHESTER, C.O. and MACKINNEY, G. 1956. The breakdown of strawberry anthocyanin pigment. *Food Technol.* **10**, 427-432.
- LUND, D.B. 1975. Heat processing. In Principles of Food Science. Part II. Physical Principles of Food Preservation, (O.R. Fennema, ed.) pp. 31-92, Marcel Dekker, New York.
- MACCARRONE, E.; MACCARRONE, A. & RAPISARDA P. 1987. Technical note: Colour stabilization of orange fruit juice by tannic acid. *International J. of Food Science and Technology*. **22**. 159-162.
- MCKEE, J.E. & WOLF, H.W. 1963. Water quality criteria. The Resources Agency of California. State water quality control. Board Publication 3-A. 548 p.

- MARKAKIS, P. 1982a. Stability of anthocyanins in foods. In Anthocyanins As Food Colors, (P. Markakis, ed.) pp. 163-181, Academic Press, New York.
- MARKAKIS, P., LIVINGSTON, G.E. and FELLERS, C.R. 1957. Quantitative aspects of strawberry pigment degradation. Food Res. 22, 117-129.
- MESCHTER, E.E. 1953. Effects of carbohydrates and other factors on strawberry products. J. Agr. Food Chem. 1, 574-579.
- MAZZA, G. & BROUILLARD, R. 1987. Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products. Food Chemistry 25, 207-225.
- MULLICK, D.B. & BRINK, U.C. 1967. Solvents for anthocyanidins chromatography. J. chromatography. 28, 471.
- NAKAYAMA, T.O.M. and POWERS, J.J. 1972. Absorption spectra of anthocyanin in vivo. Adv. Food Res., Supp. 3, 193-199.
- OSAWA, Y. 1982. Copigmentation of anthocyanins. In Anthocyanins As Food Colors, (P. Markakis, ed.) pp. 41-86, Academic Press, New York.
- POEI-LANGSTON, M.S. and WROLSTAD, R.E. 1981. Color degradation in an ascorbic acid-anthocyanin-flavonol model system. J. Food Sci. 46, 1218-1236.
- RIBEREAU-GAYON, P. 1982. The anthocyanins of grapes and wines. In: Anthocyanins As Food Colors, (P. Markakis, ed.) pp 209-244, Academic Press, New York.
- SAITO, N.; OSAWA, Y. & HAYASHI, K. 1971. Platyconin, a new acylated anthocyanin in Chinese Bell-Flower, Platycodon grandiflorum. Phytochem., 10, 445.
- SAITO, N.; OSAWA, Y. and HAYASHI, K. 1972. Isolation of a blue-violet pigment from the flowers of Platycodon grandiflorum. Bot. Mag. Tokyo 85, 105-110.
- SAKELLARIADES, H.C. & LUH, B.S. 1974. Anthocyanins in Barbera Grapes. J. Food Science. 32: 329-333.
- SCHEFFELDT, P. and HRAZDINA, G. 1978. Co-pigmentation of anthocyanins under physiological conditions. J. Food Sci. 43, 517-520.
- SHRIKHANDE, A.J. and FRANCIS, F.J. 1974. Effect of flavonols on ascorbic acid and anthocyanin stability in model systems. J. Food Sci. 32, 904-906.

- SIMARD, R.E.; BOURZEIX, M. and HEREDIA, N. 1982. Factors influencing color degradation in blueberry juice. *Lebensm. - Wiss. u. Technol.* 15, 177-180.
- SISTRUNK, W.A. and CASH, J.N. 1970. The effect of certain chemicals on the color and polysaccharides of strawberry puree. *Food Technol.* 24, 169-173.
- SOMAATMADJA, D.; POWERS, J.J. & HAMDY, M. 1964. Anthocyanins. 6. Chelation studies on anthocyanin and other related compounds. *J. Food Sci.*, 29: 655.
- SOMERS, T.C. 1966a. Grape phenolics: The anthocyanins of *Vitis vinifera*, variety Shiraz. *J. Sci. Food Agric.* 17, 215-219.
- SONDHEIMER, E. 1953. On the relation between spectral changes and pH of the anthocyanin pelargonidin 3-monoglucoside. *J. Am. Chem. Soc.* 75, 1507-1508.
- STAPLES, L.C. and FRANCIS, F.J. 1968. Colorimetry of cranberry cocktail by wide range spectrophotometry. *Food Technol.* 22, 611-614.
- STARR, M.S. and FRANCIS, F.J. 1973. Effect of metallic ions on color and pigment content of cranberry juice cocktail. *J. Food. Sci.* 38, 1043-1046.
- SZECHENY, L. & ROSE, P. 1964. Changes in color and anthocyanin pigments in colored fruit juice during processing. *Ind. Kozlen*, 1: 1.
- SWEENEY, J.G. & IACOBucci, G.A. 1983. Effects of substitution on the stability of 3-deoxyanthocyanidins in aqueous solutions. *J. Agric. Food Chem.*, 31, 531.
- SWEENEY, J.G.; WILKINSON, M.M. & IACOBucci, G.A. 1981. Effects of flavonoid sulfonates on the photobleaching of anthocyanins in acid solution. *J. Agric. Food Chem.*, 29, 563.
- TANCHEV, S. 1983. Kinetics of thermal degradation of anthocyanins. In Basic Studies In Food Science, Volume 2. Proceedings of the Sixth International Congress of Food Science and Technology, (J.V. McLoughlin and B.M. McKenna, eds.) p. 96, Boole Press, Dublin, Ireland.
- TIMBERLAKE, C.F. 1980. Anthocyanins-occurrence, extraction and chemistry. *Food Chem.* 5, 69-80.
- TIMBERLAKE, C.F. and BRIDLE, P. 1966. Spectral studies of anthocyanin and anthocyanidin equilibria in aqueous solution. *Nature* 212, 158-159.

- TIMBERLAKE, C.F. and BRIDLE, P. 1967a. Flavylum salts, anthocyanidins and anthocyanins. I. Structural transformations in acid solution. *J. Sci. Food Agric.* **18**, 473-478.
- TIMBERLAKE, C.F. and BRIDLE, P. 1968. Flavylum salts resistant to sulphur dioxide. *Chem. Ind.*, Oct., 1489.
- TIMBERLAKE, C.F. and BRIDLE, P. 1975. The anthocyanins. In: The Flavonoids, (J.B. Harborne, T.J. Mabry and H. Mabry, eds.) pp. 215-266, Chapman & Hall Ltd., London.
- TIMBERLAKE, C.F. and BRIDLE, P. 1977. Anthocyanins: Colour augmentation with catechin and acetaldehyde. *J. Sci. Food Agric.* **28** 539-544.
- TINSLEY, I.J. and BOCKIAN, A.H. 1960. Some effects of sugars on the breakdown of pelargonidin-3-glucoside in model systems at 90°C. *Food Res.* **25**, 161-173.
- WILLIAMS, M. and HRAZDINA, G. 1979. Anthocyanins as food colorants: Effect of pH on the formation of anthocyanin-rutin complexes. *J. Food Sci.* **44**, 66-68.
- WROLSTAD, R.E. and ERLANDSON, J.A. 1973. Effect of metal ions on the color of strawberry puree. *J. Food Sci.* **38**, 460-463.
- WROLSTAD, R.E.; PUTMAN, T.P. and VARSEVELD, G.W. 1970. Color quality of frozen strawberries: Effect of anthocyanin, pH, total acidity and ascorbic acid variability. *J. Food Sci.* **35**, 448-452.
- WROLSTAD, R.E. & STRUTHERS, B.J. 1971. Polyvinylpyrrolidone column chromatography of strawberry, rhubarb, and raspberry anthocyanins. *J. chromatogr.* **55**, 405-408.
- YAZAKI, Y. 1976. Co-pigmentation and the color change with age in petals of Fuchsia hybrida. *Bot. Mag. Tokyo* **89**, 45-57.
- YOSHITAMA, K. 1978. Blue and purple anthocyanins isolated from the flowers of Tradescantia reflexa. *Bot. Mag. Tokyo* **91**, 207-212.
- YOSHITAMA, K. and HAYASHI, K. 1974. Concerning the structure of cinerarin, a blue anthocyanin from garden cineraria. Studies on anthocyanins, LXVI. *Bot. Mag. Tokyo* **87**, 33-40.
- ZWEIG, G. & SHERMA, J. 1986. Detection reagents for paper and/or thin-layer chromatography In: *CRC Handbook of chromatography: General Data and Principles Vol II*. pp 103-189. CRC-Press, Cleveland, OHIO.