

ELIANA FERREIRA OZELA

**CARACTERIZAÇÃO DE FLAVONÓIDES
E ESTABILIDADE DE PIGMENTOS DE FRUTOS DE BERTALHA**
(Basella rubra L.)

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL

2004

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

T

O99c
2004

Ozela, Eliana Ferreira, 1952-
Caracterização de flavonóides e estabilidade de pigmentos de frutos de bertalha (*Basella rubra* L.) / Eliana Ferreira Ozela. – Viçosa : UFV, 2005.
xv, 71f. : il. ; 29cm.

Orientador: Paulo Cesar Stringheta
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 64-71

1. Flavonóides. 2. Antocianinas - Análise. 3. Pigmentos - Estrutura. 4. Bertalha - Efeito do pH. 5. Bertalha - Efeito da luz. 6. Bertalha - Efeito do oxigênio. 7. Bertalha - Efeito da temperatura. I. Universidade Federal de Viçosa.

II. Título.

CDD 22.ed. 664.06

ELIANA FERREIRA OZELA

**CARACTERIZAÇÃO DE FLAVONÓIDES
E ESTABILIDADE DE PIGMENTOS DE FRUTOS DE BERTALHA**
(Basella rubra L.)

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

APROVADA: 30 de novembro de 2004

Prof.^a Mara Sílvia Pinheiro Arruda
(Conselheira)

Prof. José Carlos Gomes
(Conselheiro)

Prof.^a Helena Maria Pinheiro Sant'Ana

Prof.^a Tânia Toledo de Oliveira.

Prof. Paulo Cesar Stringheta
(Orientador)

A Sebastião Geraldo.

À minha família, em especial à minha mãe Horácia.

Aos meus filhos André e Érika.

AGRADECIMENTOS

À DEUS, pela presença em todos os momentos.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e a Universidade Federal do Pará (UFPA), pela oportunidade de realização deste curso.

Ao Orientador, Prof. Paulo Cesar Stringheta, desejo expressar a mais profunda gratidão não só por acreditar em minha capacidade e possibilitar meu crescimento acadêmico, como por sua orientação constante e confiança durante a realização deste trabalho.

À Conselheira, Prof^ª Mara Sílvia Pinheiro Arruda (UFPA), agradeço pela cordial acolhida em seu grupo de trabalho, pelo interesse, pelo apoio constante, exemplo de responsabilidade, dedicação e profissionalismo.

Ao Conselheiro Prof. José Carlos Gomes, pelas sugestões e pelos oportunos esclarecimentos.

A todos os membros da banca examinadora, pelas correções e sugestões apresentadas na redação final da tese.

A todos os professores do curso de pós-graduação do DTA/UFV, pelos conhecimentos transmitidos.

Aos funcionários do DTA/UFV e DQ/UFPA, pelo carinho, apoio e auxílio. Em especial a Lígia Santana, Valério Poletto, Hayde Fonseca e Marçal Luna.

À CEPLAC, na pessoa de seu pesquisador Carlos Alberto Spaggiari Sousa, da Estação Experimental Filogônio Peixoto, Linhares, ES, pelo cultivo e pela preparação do fruto da bertalha utilizado na realização deste trabalho.

Ao doutorando da UFScar Milton Nascimento da Silva, o meu especial agradecimento pelo apoio constante, pela amizade e por todo auxílio na utilização da CLAE.

Ao mestrando da UFPA Marcelo Lobato Fonseca, pela valiosa ajuda na elucidação estrutural das substâncias isoladas.

Aos amigos de curso Ana Cristina Baetas, Aline Nachtigall, Laura Cariello, Leonardo Pontes, Lívia Lobo, Luís Adriano Nascimento, Michele Bertoldi, Milton Cano, Paulo César Fortes, Penha Picolly, Pollyanna Ibrahim, Sônia Pamplona, pelo convívio e pela amizade.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para o êxito deste trabalho.

BIOGRAFIA

Eliana Ferreira Ozela, filha de Carlos da Silva Ozela e Horácia Ferreira Ozela, nasceu em Belém, Estado do Pará, em 19 de julho de 1952.

Em dezembro de 1978, graduou-se em Farmácia pela Universidade Federal do Pará.

Em março de 1994, iniciou o curso de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa-MG, concluindo-o em setembro de 1996.

Foi aprovada em concurso público como docente, em janeiro de 1998 pela Universidade Federal do Pará, lotada no Departamento de Farmácia.

Em abril de 2002, iniciou o curso de doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Viçosa.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E NOMENCLATURAS ...	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2. 1. Descrição botânica e características da bertalha	4
2. 2. Estrutura química das antocianinas	6
2. 3. Extração das antocianinas	9
2. 4. Estabilidade das antocianinas	12
2. 4. 1. Efeito do pH	12
2. 4. 2. Efeito da luz e oxigênio	14
2. 4. 3. Efeito da temperatura	16
2. 4. 4. Copigmentação	18
2. 4. 5. Isolamento e identificação de antocianinas	19
2. 5. Antocianinas, fontes e sua importância na saúde	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3. 1. Preparação do extrato de bertalha (<i>Basella rubra</i> L.)	25
3. 2. Isolamento das substâncias contidas no extrato de bertalha	26
3. 2. 1. Preparação das amostras e dos reagentes	26
3. 2. 2. Separação das substâncias do extrato de bertalha	26
3. 2. 3. Isolamento das substâncias do extrato de bertalha	27
3. 3. Rendimento das substâncias purificadas	28
3. 4. Reações características para identificação de antocianinas	28
3. 4. 1. Reconhecimento de antocianinas	28
3. 4. 2. Determinação do R _f	29
3. 5. Análise por espectrofotometria no UV/Vis	29

3. 6. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	29
3. 7. Estudo da estabilidade do pigmento	30
3. 7. 1. Estabilidade do pigmento do extrato bruto em solução tampão	30
3. 7. 1. 1. Efeito da luz sobre a estabilidade do pigmento	30
3. 7. 1. 2. Efeito da temperatura sobre a estabilidade do pigmento	31
3. 7. 1. 3. Cálculo dos parâmetros de degradação das antocianinas	31
3. 7. 2. Estabilidade das substâncias purificadas	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4. 1. Separação das substâncias contidas no extrato de bortalha	33
4. 2. Rendimento das substâncias S ₁ e S ₂ isoladas do pigmento de extrato bruto de bortalha	34
4. 3. Reações características para identificação de antocianinas	35
4. 4. Caracterização das estruturas químicas	39
4. 4. 1. Substância S ₁	39
4. 4. 2. Substância S ₂	41
4. 4. 3. Substância S ₃	48
4. 5. Apresentação das substâncias isoladas.....	54
4. 6. Avaliação da estabilidade de pigmentos antociânicos extraídos de frutos de bortalha	55
4. 6. 1. Efeito da luz	55
4.6. 2. Efeito da temperatura	58
4. 7. Estabilidade das substâncias S ₁ e S ₂ isoladas do pigmento de extrato bruto de bortalha por CLAE	60
5. RESUMO E CONCLUSÕES	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E NOMENCLATURAS

- BAW: Butanol-Ácido acético-Água.
- CEPLAC: Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira.
- CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.
- CP: Cromatografia em papel
- D₂O: Água deuterada.
- CD₃OD: Metanol deuterado.
- Forestal: Ácido acético-Ácido clorídrico-Água.
- Fórmico: Ácido fórmico-Ácido clorídrico-Água
- RMN: Ressonância Magnética Nuclear.
- Rf: Razão entre as distâncias percorridas simultaneamente desde o ponto de partida até o centro de maior concentração da mancha do soluto e até a frente da fase móvel.
- TFA: ácido trifluoracético.

LISTA DE TABELA

		pag.
Tabela 1	Antocianidinas que ocorrem nas antocianinas naturais, adaptado de HARBORNE (1967) e FRANCIS(1882) ..	8
Tabela 2	Antocianinas encontradas com freqüência em alimentos, adaptado de BOBBIO e BOBBIO (1992) e JACKMAM e SMITH (1996)	9
Tabela 3	Lista dos solventes utilizados no processo de extração de antocianinas	11
Tabela 4	Antocianinas em vegetais comestíveis e teores de pigmento	23
Tabela 5	Características cromatográficas para antocianidinas conforme HARBORNE (1967)	36
Tabela 6	Características espectrais do extrato bruto, das substância S ₁ e S ₂ da literatura para malvidina, cianidina e cianidina-3-G.....	36
Tabela 7	Dados de RMN ¹ H a 300MHz e ¹³ C a 100MHz em D ₂ O:TFA (9:1) da S ₂	47
Tabela 8	Dados de RMN ¹ H a 300MHz e ¹³ C a 100MHz em CD ₃ OD da S ₃	50
Tabela 9	Valores das constantes de degradação K (h ⁻¹) e o tempo de meia vida t _{1/2} (h), obtidos ao longo do tempo, em sistemas tampões (pH 4,0; 5,0 e 6,0), na ausência e presença da luz, à temperatura ambiente (25°±1°C)	57
Tabela 10	Valores das constantes de degradação K (h ⁻¹) e o tempo de meia vida t _{1/2} (h), obtidos ao longo do tempo, em sistemas tampões (pH 4,0; 5,0 e 6,0), na presença da luz, à temperatura de 40 e 60°C	59
Tabela 11	Valores das constantes de degradação K (h ⁻¹) e o tempo de meia vida t _{1/2} (h), obtidos ao longo do tempo, das substâncias S ₁ e S ₂ extraídas dos frutos de bortalha, em acetonitrila: solução aquosa de ácido fórmico 1,0% (1:9), na presença da luz, à temperatura de 25°C	61

LISTA DE FIGURAS

		pag.
Figura 1	Plantio de bertalha (<i>Basella rubra</i> L.) em sistema de espaldeiramento (A) e vista parcial da inflorescência e frutos maduros (B).....	5
Figura 2	Estrutura básica das antocianinas (HARBORNE, 1967)	6
Figura 3	Transformações estruturais das antocianinas existentes em uma solução em equilíbrio (FRANCIS, 1992)	14
Figura 4	Deslocamento de equilíbrio.....	17
Figura 5	Modelo de empilhamento entre dois resíduos de ácido cafeico com núcleo pirilium (BROUILLARD, 1983) ..	19
Figura 6	Frutos de bertalha (<i>Basella rubra</i> L.)	25
Figura 7	Perfil cromatográfico obtido por CLAE do extrato bruto de bertalha a 275 nm	33
Figura 8	Rendimento das substâncias S ₁ e S ₂ isoladas do extrato bruto de bertalha, por CLAE	34
Figura 9	Espectros de absorção UV/Vis do extrato bruto e das substâncias purificadas S ₁ e S ₂	37
Figura 10	Espectros de absorção UV/Vis da antocianina S ₁ a pH 1,0; 3,0; 6,0 e 9,0, apresentando comportamento ácido - base	38
Figura 11	Espectros de absorção UV/Vis da antocianina S ₂ a pH 1,0; 3,0; 6,0 e 9,0, apresentando comportamento ácido - base	38
Figura 12	Espectro de RMN de ¹ H a 300 MHz da S ₁ em solvente D ₂ O:TFA (9:1)	39
Figura 13	Estrutura química sugerida para a substância S ₁	40
Figura 14	Espectro de RMN de ¹ H a 300 MHz da S ₂ em solvente D ₂ O:TFA (9:1)	41
Figura 15	Subestrutura A	42
Figura 16	HSQC da S ₂ em solvente D ₂ O:TFA (9:1)	43
Figura 17	Expansões do espectro de RMN de ¹³ C a 100 MHz da S ₂ em solvente D ₂ O:TFA (9:1)	44
Figura 18	Expansão do espectro de RMN de ¹³ C a 100 MHz da S ₂ em solvente D ₂ O:TFA (9:1)	45
Figura 19	Estrutura química sugerida para a substância S ₂	46
Figura 20	Espectro de RMN de ¹ H a 300 MHz da S ₃ em solvente CD ₃ OD	48
Figura 21	Subestrutura do anel C	48
Figura 22	Subestrutura do anel B	49
Figura 23	Subestrutura do anel A	49

Figura 24	Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz em solvente CD_3OD da S_3	51
Figura 25	Expansão do espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz em solvente CD_3OD da S_3	51
Figura 26	Expansão do espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz em solvente CD_3OD da S_3	52
Figura 27	Espectro de DEPT em CD_3OD da S_3	53
Figura 28	Estrutura da flavona sugerida para a substância S_3	53
Figura 29	Estruturas químicas das substâncias S_1 , S_2 , e S_3	54
Figura 30	Curvas de degradação de extratos de bortalha ao longo do tempo, em sistemas tampões (pH 4,0; 5,0 e 6,0), na presença da luz, à temperatura ambiente ($25^\circ\pm 1^\circ\text{C}$)	56
Figura 31	Curvas de degradação de extratos de bortalha ao longo do tempo, em sistemas tampões (pH 4,0; 5,0 e 6,0), na ausência da luz, à temperatura ambiente ($25^\circ\pm 1^\circ\text{C}$)	56
Figura 32	Curvas de degradação de extratos de bortalha ao longo do tempo, em sistemas tampões (pH 4,0; 5,0 e 6,0), na presença da luz, à temperatura de 40°C	59
Figura 33	Curvas de degradação de extratos de bortalha ao longo do tempo, em sistemas tampões (pH 4,0; 5,0 e 6,0), na presença da luz, à temperatura de 60°C	59
Figura 34	Perfil cromatográfico obtido por CLAE da S_1 a 275 nm, coluna Phenomenex, em acetonitrila:solução aquosa de ácido fórmico 1% (1:9)	61
Figura 35	Perfil cromatográfico obtido por CLAE da S_2 a 275 nm, coluna Phenomenex, em acetonitrila:solução aquosa de ácido fórmico 1% (1:9)	61
Figura 36	Curvas de degradação das substâncias S_1 e S_2 extraídas dos frutos de bortalha, em acetonitrila:solução aquosa de ácido fórmico 1,0% (1:9), na presença de luz, à temperatura de 25°C por CLAE	62

RESUMO

OZELA, Eliana Ferreira, D.S., Universidade Federal de Viçosa, novembro, 2004.

Caracterização de flavonóides e estabilidade de pigmentos de frutos de bertalha (*Basella rubra* L.). Professor Orientador: Paulo Cesar Stringheta. Professores Conselheiros: Mara Silvia Pinheiro Arruda e José Carlos Gomes.

A busca de matéria prima para produção de corantes naturais com propriedades adequadas ao uso pelas indústrias de alimentos processados, medicamentos, cosméticos e tintas, levou à proposta de um estudo da bertalha (*Basella rubra* L.) como mais uma fonte potencial de corante natural. Assim, objetivou-se com este trabalho realizar a caracterização de flavonóides e estudar a estabilidade de pigmentos. A extração foi realizada com metanol em pH 2,0, partindo-se de dois quilos de frutos, obtendo-se 13,0 gramas de pigmentos liofilizados. As substâncias presentes nos extratos liofilizados foram isoladas por CLAE preparativa, usando coluna RP 18 Luna de 5 μm , fase móvel acetonitrila:solução aquosa de ácido fórmico (9:1), fluxo de 3,5mL/mim em sistema isocrático por 30 mim. Este foi considerado um excelente método, capaz de isolar as substâncias S₁, S₂ e S₃ das demais presentes no extrato bruto. A utilização de RMN, cromatografia em papel, métodos espectrais UV/Vis e reações químicas específicas para antocianinas foram muito úteis para a caracterização das substâncias S₁, S₂ e S₃ como malvidina, cianidina e flavona, respectivamente. A estabilidade do extrato antociânico foi estimada determinando-se os valores de absorvância no comprimento de onda de máxima absorção, em função do tempo. A partir desses valores foram calculadas as constantes de velocidade de reação (k), assim como o tempo de meia vida (t_{1/2}), na presença e ausência de luz, em diferentes pHs e diferentes temperaturas. O extrato de bertalha em pH 4,0, frente a luz e temperatura de 25°C apresentou tempo de meia vida de 210,0 h, enquanto que na ausência de luz apresentou

tempo de meia vida de 577,5 h. Em pH 5,0 e 6,0, com luz e temperatura de 25°C apresentou tempo de meia vida de 315,0 h, enquanto que na ausência de luz apresentou tempo de meia vida de 693,0 h. Na presença de luz, observou-se o efeito drástico da temperatura sobre a degradação do pigmento. Na temperatura de 40°C o sistema mais estável foi em pH 5,0 com tempo de meia vida de 7,46h, seguido do pH 6,0 com 7,18h e o menos estável em pH 4,0 com 6,01h. Na temperatura de 60°C, o sistema mais estável foi em pH 6,0 com tempo de meia vida de 2,70h, seguido do pH 5,0 com 2,50h e o menos estável em pH 4,0 com 2,08h. A temperatura e a luz foram os agentes considerados mais destrutivos aos pigmentos. As substâncias purificadas S₁ e S₂ apresentaram, frente à luz e à temperatura de 25°C, tempo de meia vida de 50,90h e 40,76h respectivamente, mostrando elevada sensibilidade das antocianinas à luz, quando puras.

ABSTRACT

OZELA, Eliana Ferreira, D.S., Universidade Federal de Viçosa, November, 2004. **Flavonoid characterization and pigment stabilization of Malabar nightshade (*Basella rubra* L.) fruit.** Adviser: Paulo Cesar Stringheta. Committee Members: Mara Silvia Pinheiro Arruda and José Carlos Gomes.

The search for raw material for the production of natural colorants with adequate properties for use by processed food, medicine, cosmetics, and dye industries has led to the proposal of a study on Malabar nightshade (*Basella rubra* L.) as an additional potential source of natural colorant. Thus, the aim of this study was to carry out flavonoid characterization and to study pigment stabilization. The extraction was performed with methanol at pH 2.0, using 2 kg of fruit and obtaining 13.0 g of lyophilized pigments. The substances present in the lyophilized extracts were isolated by preparative high performance liquid chromatography (HPLC), using a 5 μm RP-18 Luna column, acetonitrile: formic acid aqueous solution (9:1) mobile phase at a flow of 3.5 mL/min in isocratic mode for 30 min. This method was considered to be excellent, capable of isolating the substances S₁, S₂ and S₃ from the others in the raw extract. The application of the techniques NMR, paper chromatography, UV/Vis spectral methods and specific chemical reactions for anthocyanins was very useful to characterize the substances S₁, S₂ and S₃ as maldivin, cyanidin, and flavone, respectively. The stability of the anthocyanin extract was estimated by determining the absorbance values at maximum absorption wavelength as a function of time. Based on these values, the reaction velocity constants (k), were calculated, as well as half-life time (t_{1/2}), in the presence and absence of light, at different pHs and temperatures. Malabar nightshade extract at pH 4.0, in the presence of light and temperature of 25°C, presented half-life of 210.0 h, whereas in the absence of light it presented a half-life of 577.5 h. At pH 5.0 and 6.0 in the

presence of light and temperature of 25°C, it presented a half-life of 315.0 h., but a half-life of 693.0 h. in the absence of light. In the presence of light, a drastic temperature effect was observed on pigment degradation. At temperature of 40°C the most stable system was at pH 5.0 with a half- life of 7.46 h, followed by pH 6.0 with 7.18 h while the least stable was at pH 4.0 with 6.01 h. At temperature of 60°C, the most stable system was at pH 6.0 with half-life of 2.70 h, followed by pH 5.0 with 2.50 h while the least stable was at pH 4.0 with 2.08 h. Temperature and light were considered most destructive to the pigments. The purified substances S₁ and S₂ in the presence of light and at temperature of 25°C, presented a half-life of 50.90h and 40.76h, respectively, showing high anthocyanin sensitivity to light, when pure.

1. INTRODUÇÃO

A prática de colorir alimentos é bastante antiga, sendo os pigmentos naturais de especiarias e condimentos os primeiros a serem utilizados para tal fim. Após, surgiram os pigmentos inorgânicos que demonstraram ser bastante prejudiciais à saúde do homem.

A percepção do mundo ao nosso redor é dada pelos nossos sentidos. Destes, o impacto visual é o mais marcante, não sendo definido apenas pela forma e aspectos dos objetos, mas também pela cor. Dos três principais atributos de qualidade dos alimentos “cor, sabor e textura”, a cor torna-se cada vez mais importante, a medida em que os alimentos são expostos e vendidos, como em supermercados (FERREIRA, 1991).

A primeira avaliação que normalmente se faz dos alimentos é através das cores, o que influencia muito nas decisões para a escolha de cada produto, pois a cor, além da associação pré estabelecida, afeta a estética, as características sensoriais e a aceitabilidade do alimento (CLYDESDALE, 1993).

Segundo ANGELUCCI (1991), dentre as percepções sensoriais do homem, 87% são captadas pela visão, 9% pela audição e as demais, 4% pelo olfato, paladar e tato.

De acordo com CARVALHO (1992), existe uma preocupação para substituir os corantes artificiais, utilizados na indústria de alimentos, pelos corantes naturais, devido a toxicidade apresentada, generalizada indevidamente, a todos os corantes desse grupo, tornando-os indesejáveis ao consumo.

Os corantes são adicionados aos alimentos por várias razões, que incluem as perdas ou alterações da cor natural que ocorrem durante o processamento e estocagem, ou ainda por problemas de matérias-primas de origens diferentes.

Colorir alimentos e bebidas não é fruto da moderna tecnologia, porém arte do homem desde cerca de 3.000 anos a.C., quando as especiarias e os condimentos eram utilizados para tal fim.

Por volta de 1850, a descoberta do primeiro corante sintético “malva” marcou o início da síntese de novos compostos similares, isto em vista da alta estabilidade da cor, do alto poder tintorial e do baixo custo, abrindo uma perspectiva altamente promissora no campo dos corantes artificiais (CARVALHO, 1992). Isso levou ao uso desenfreado de corantes artificiais em alimentos e bebidas, chegando ao exagero de, nos Estados Unidos, corantes que não encontravam boa aplicação em produtos têxteis eram usados para fins alimentícios (ANGELUCCI, 1991).

Existe um certo questionamento quanto ao uso de corantes sintéticos nos alimentos, principalmente no que diz respeito a problemas de saúde humana (TIMBERLAKE e BRIDLE, 1980). Testes toxicológicos realizados em diversos países, sob rigorosa vigilância da Organização Mundial de Saúde (OMS), comprovaram que, dependendo do tipo e da quantidade consumida, estes corantes podem provocar uma variedade de efeitos colaterais, tais como: alergias, disritmia, câncer e mutações gênicas (IVANISSEVICH e MASSARANI, 1989).

De acordo com a Divisão Nacional de Vigilância Sanitária (DINAL), através da portaria nº 17 de 07/08/1987, foram proibidos os seguintes corantes sintéticos: amarelo ácido ou amarelo sólido, azul de indantreno ou azul de alizarina, laranja GCN, vermelho sólido e escarlata (DAMASCENO, 1988).

Os corantes artificiais permitidos pela legislação brasileira são: amarelo crepúsculo, azul brilhante, bordeaux S ou amaranto, eritrosina, indigotina, ponceau 4R, tartrazina e vermelho 40.

DELGADO-VARGAS et al. (2000), relatam que os corantes naturais estão presentes em frutas, vegetais, flores e que são usados em medicamentos, alimentos, cosméticos, sendo que alguns pigmentos naturais têm importância funcional.

A busca de matéria prima para a produção de corantes naturais com propriedades adequadas ao uso das indústrias de alimentos processados, medicamentos, cosméticos e tintas, levou pesquisadores a investigar praticamente toda a biosfera. Esses pigmentos são encontrados principalmente em vegetais considerados componentes da dieta humana. As fontes de corantes naturais incluem

flores, frutos, folhas, tubérculos e cereais. Os principais grupos de corantes naturais são: antocianinas, betalaínas, carotenóides, carmin, cúrcuma e clorofila.

As antocianinas poderão vir a substituir os corantes artificiais: vermelho 40, ponceau 4R, eritrosina e bordeaux S.

Segundo WILEY et al. (1979), a produção comercial de pigmentos naturais tem sido retardada pela carência de quantidades significativas de tecidos de plantas frescas altamente pigmentadas e pela falta de métodos simples e eficientes de extração e purificação desses produtos de plantas.

Mesmo com o avanço tecnológico, a substituição dos corantes sintéticos por naturais está condicionada a vários aspectos, como toxicológico, tecnológico e avaliação mercadológica.

A bertalha é uma hortaliça de fácil cultivo e de consumo comum nas regiões brasileiras, principalmente nas regiões do sudeste. Suas folhas são conhecidas pela riqueza em β -caroteno e vitamina A (BATISTA et al., 2004). Seus frutos são carnosos vermelhos arroxeados, hidrossolúveis e apresentam alto poder tintorial, podendo ser uma promissora fonte de corante natural. Assim, objetivou-se com este trabalho, realizar a caracterização de substâncias presentes em extrato de frutos de bertalha (*Basella rubra* L.) e estudar a estabilidade dos pigmentos frente a luz, pH e temperatura.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2. 1. Descrição botânica e características da bortalha

Bortalha, bortalha, João-gomes e couve-de-cerca são alguns dos nomes comuns pelos quais são conhecidas, em vários estados do Brasil, algumas espécies da família das Basellaceas. De acordo com CORRÊA (1984), também são conhecidas como Basela (Espanha); Basella (Itália); Baselle blanche e Épinard rouge (França); Bretaña (Cuba); Common white basella e Malabar night shade (Inglaterra); Malabar spinach (Alemanha), entre outros. Ainda de acordo com esse autor, são conhecidas as espécies *Basella rubra* L. e *Basella alba* L.

A bortalha é uma erva perene, trepadeira, de folhas e caules suculentos e muito ramificados, atingindo até 10 m de comprimento (CORRÊA, 1984). Possui folhas alternas, pecioladas, ovado-cordiformes, agudas ou acuminadas, carnosas e de coloração verde; as flores são brancas, avermelhadas ou esverdeadas, dispostas em espigas frouxas medindo de 6 a 15 cm; fruto achenio carnoso ou baga vermelha a roxa (Figuras 1A e 1B). De acordo com CORRÊA (1984), praticamente distinguem-se duas variedades: branca e vermelha, de conformidade com a cor das flores ou dos frutos ou até mesmo do caule. Originária da Índia e introduzida no Brasil há muitos anos, sempre foi cultivada em hortas e, de preferência, junto aos muros. É utilizada como hortaliça e, às vezes, em ornamentações. A raiz é emoliente e refrigerante.



Figura 1 - Plantio de bortalha (*Basella rubra* L.) em sistema de espaldeiramento (A) e vista parcial da inflorescência e frutos maduros (B).

2. 2. Estrutura química das antocianinas

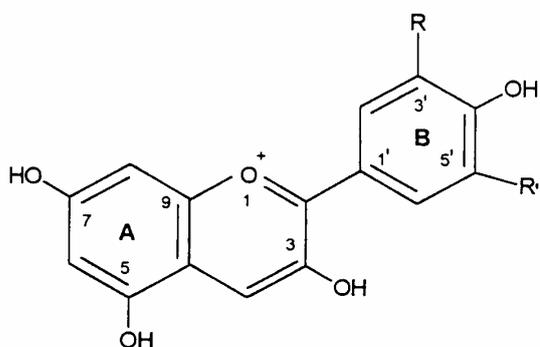
O termo antocianina deriva das palavras gregas: *anthos* (flor) e *kyanos* (azul) (VON ELBE e SCHWARTZ, 1996).

Um dos maiores grupos de pigmentos naturais hidrossolúveis estudados até hoje, são as antocianinas, responsáveis pela coloração azul, vermelha, violeta e púrpura da maioria das espécies do reino vegetal (HRAZDINA, 1982).

Uma das mais importantes funções das antocianinas na área da percepção visível é a atração de animais (principalmente insetos e pássaros), com propósito de polinização e dispersão de sementes, sendo, por esta razão, de considerável valor na co-evolução das interações entre plantas e animais (HARBORNE, 1967; STRACK e WRAY, 1989).

As antocianinas são glicosídeos das antocianidinas, cujo núcleo básico é a estrutura do íon 4'-hidroxiflavilium. Todas as antocianinas são compostas de duas ou três partes: a estrutura básica, que é uma aglicona (antocianidina) (Figura 2), o açúcar e, freqüentemente, um grupo acil (GUIMARÃES, 1987; FRANCIS, 1992).

A ordem de freqüência dos açúcares mais comuns são: glicose, ramnose, xilose, galactose, arabinose e frutose (FRANCIS, 1992). Segundo ainda este autor, algumas antocianidinas podem ser glicosiladas, pela combinação de monossacarídeos, resultando em di ou trissacarídeos. A glicosilação pode ocorrer nas posições 3,5 e 7, sendo as mais frequentes ligados na posição 3 e 5 hidroxil e, menos comum na posição 7 hidroxil (LEE e HONG, 1992).



Compostos	R	R'
Cianidina	OH	H
Delfinidina	OH	OH
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃
Pelargonidina	H	H
Peonidina	OCH ₃	H
Petunidina	OCH ₃	OH

Figura 2 - Estrutura básica das antocianinas (HARBORNE, 1967).

De acordo com FRANCIS (1992) e HUTCHINGS (1994), o número de grupos hidroxílicos na molécula, o grau de metilação desses grupos, a natureza e o número de açúcares ligados a molécula e a posição dessas ligações, bem como a natureza e o número de ácidos alifáticos e, ou aromáticos ligados ao açúcar, indicam as diferenças entre as várias antocianinas.

As antocianinas apresentam maior solubilidade em soluções aquosas do que as antocianidinas, além de serem mais estáveis quando glicosilada na posição (C₃), a perda do açúcar ligado nesta posição, é acompanhada de uma decomposição rápida da aglicona, alterando irreversivelmente a coloração da solução (JURD, 1972).

Os grupos acilas ligados ao açúcar na posição C-3 influenciam na estabilidade da estrutura, a qual é determinante na coloração das antocianinas (LEE e HONG, 1992). Sendo que os ácidos orgânicos cumárico, cafeíco, ferúlico, p-hidroxibenzóico, sináptico, malônico e acético estão geralmente acilando os resíduos de açúcares (FRANCIS, 1992).

Segundo SCHEFFELDT e HRAZDINA (1978); WILLIANS e HRAZDINA (1979), a pigmentação de flores e tecidos de plantas é função da estrutura quinoidal das antocianinas. A formação da anidrobases (estrutura quinoidal), ocorre desde que nenhuma antocianina presente ao mesmo tempo glicosilação nos grupos hidroxílicos nas posições 5, 7 e 4'.

A glicosilação em C-5 também é freqüentemente encontrada nas antocianinas. Raramente ocorre glicosilação nas posições 3', 4' e 5', pois impedimentos estéricos geralmente dificultam a glicosilação nestas posições (BROUILLARD, 1982).

Existem hoje dezessete antocianidinas, seis delas ocorrendo com maior freqüência como agliconas de várias antocianinas, são elas: pelargonidina, cianidinas, petunidina, delfinidina, malvidina e peonidina (TIMBERLAKE e BRIDLE, 1980; HUTCHINGS, 1994; DELGADO – VARGAS et al., 2000).

As antocianidinas que ocorrem nas antocianinas naturais, estão relacionadas na Tabela 1, adaptado segundo HARBORNE (1967) e FRANCIS (1982).

Tabela 1 - Antocianidinas que ocorrem nas antocianinas naturais, adaptado de HARBORNE (1967) e FRANCIS (1982)

Antocianidinas	Posição de substituição							Cor
	3	5	6	7	3'	4'	5'	
Apigendina (Ap)	H	OH	H	OH	H	OH	H	Laranja
Luteolidina (Lt)	H	OH	H	OH	OH	OH	H	Laranja
Triacetidina (Tr)	H	OH	H	OH	OH	OH	OH	Vermelha
Pelargonidina (Pg)	OH	OH	H	OH	H	OH	H	Laranja
Aurantidina (Au)	OH	OH	OH	OH	H	OH	H	Laranja
Cianidina (Cy)	OH	OH	H	OH	OH	OH	H	Lar.-Verm.
5-Metilcianidina (5MCy)	OH	OMe	H	OH	OH	OH	H	Lar.-Verm.
Peonidina	OH	OH	H	OH	OMe	OH	H	Vermelho
6-Hidroxicianidina (6OHCy)	OH	OH	OH	OH	OH	OH	H	Vermelho
Delfinidina (Dp)	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH	Verm.-Azul
Petunidina (Pt)	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OH	Verm.-Azul
Malvidina (Mv)	OH	OH	H	OH	OMe	Ome	OH	Verm.-Azul
Pulchellidina (Pl)	OH	OMe	H	OH	OH	OH	OH	Verm.-Azul
Capensinidina (Cp)	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	Ome	Verm.-Azul
Hirsutidina (Hs)	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	Ome	Verm.-Azul

Segundo HARBORNE (1967), as antocianinas se caracterizam estruturalmente por possuírem um esqueleto carbônico C₆-C₃-C₆, podendo, dessa maneira, associar-se a compostos flavonóides não-antociânicos. Por outro lado, apesar de os flavonóides antociânicos possuírem a mesma origem biossintética de outros flavonóides não-antociânicos, como observado por BROUILLARD (1982) e GRISEBACK (1982), eles se diferenciam por absorverem em regiões diferentes do espectro UV- Vis. Os flavonóides antociânicos absorvem fortemente na região do visível e apresentam mais forte coloração, enquanto os flavonóides não-antociânicos absorvem na região compreendida entre 350 e 380 nm (BROIULLARD, 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 à antocianidina 3,5-diglicosídeo tem sido utilizada como um meio para sua diferenciação por técnicas espectrais (HARBORNE, 1964). Com o aumento do número de hidroxilas, a coloração das antocianinas passa de rosa para azul. A presença de grupo metoxila no lugar de hidroxila reverte a tendência anterior (MAZZA e BROUILLARD, 1987).

As antocianinas encontram-se largamente distribuídas na natureza como mostra a Tabela 2.

Tabela 2 –Antocianinas encontradas com frequência em alimentos, adaptado de BOBBIO e BOBBIO (1992) e JACKMAM e SMITH (1996)

Antocianinas	Fontes
Cy-3-glicosídeo	Açaí, amora vermelha e preta, cereja, cebola, jamelão, morango, maçã, uva, vinho,
Pn-3-glicosídeo	Cebola, cereja, jabuticaba, uva, vinho
Mv-3- glicosídeo	Uva, vinho
Pg-3-glicosídeo	Morango
Dp-3,5-diglicosídeo	Berinjela
Pt-3-glicosídeo	Uva, vinho
Dp-3,5- diglicosídeo	Berinjela
Dp-3-cafeoilglicosídeo-5- glicosídeo	Berinjela
Campferol-3- glicosídeo	Morango, uva, vinho
Quercitina-3- glicosídeo	Uva, vinho, morango
Pn-3- glicosídeo	Manga
Pn, Dp-3- glicosídeo	Maracujá
Cy, Dp e Pg-3- glicosídeo e 3,5- diglicosídeo	Romã
Cy-3- glicosídeo e Pg-3-rutinosídeo	Figo
Cy-3-soforosídeo-5- glicosídeo	Repolho roxo

2. 3. Extração das Antocianinas

A extração do pigmento a partir da matéria prima, pode ser considerada a primeira e mais importante etapa no processo de purificação e identificação de antocianinas.

Existe na literatura, descrição de vários processos e solventes utilizados para extração de pigmentos das partes vegetais. A extração é necessariamente o primeiro passo para a determinação total e individual de antocianinas em qualquer tecido de planta (FULEKI e FRANCIS, 1968 a,b).

Estes autores afirmam que o melhor método de extração será aquele em que uma quantidade máxima de antocianinas seja recuperada com uma mínima quantidade de interferentes, bem como aquele em que a perda de antocianinas em razão de mudanças enzimáticas e não-enzimáticas seja também mínima.

A escolha de um método para extrair antocianinas, depende em grande parte do propósito de extração e também da natureza dos constituintes das moléculas de antocianinas. Entretanto quando os pigmentos forem usados como aditivos, ou seja, como corantes de alimentos, o rendimento máximo obtido, a força tintorial e a estabilidade são itens de maior relevância (JACKMAM e SMITH, 1996).

A extração de antocianinas é geralmente feita por maceração da parte vegetal em metanol ou etanol acidificado com HCl (0,1 a 1%). Dependendo da parte da planta. STRACK e WRAY (1989), aconselham a adição de água (10 a 50%) para uma extração completa. Sendo que o metanol apresenta vantagens sobre o etanol, já que forma mistura azeotrópica em água e tem um menor ponto de ebulição, o que favorece a posterior concentração dos compostos (SHRIKHANDE, 1976). Em alimentos, no entanto, prefere-se o emprego de etanol devido à elevada toxicidade do metanol (FRANCIS, 1982).

O processo de extração de antocianinas, que envolve a presença de moderadas quantidades de ácidos minerais como HCl, pode influenciar na ocorrência de hidrólise e desacilação das antocianinas, para formar agliconas (LEA, 1988).

O poder extrator dos solventes é muito influenciado pela acidez, entretanto antocianinas aciladas por compostos alifáticos, principalmente pelo ácido malônico, podem ser hidrolisadas parcial ou totalmente por solventes extratores altamente ácidos (FRANCIS, 1989).

Comparando diversos procedimentos usados na extração de antocininas de uvas vermelhas REVILLA et al. (1998), constataram que solventes que continham cerca de 1% até 12N de ácido clorídrico, eram mais eficientes na extração, porém causaram hidrólise parcial da malvidina 3-O-acetilglicosídeo.

A Tabela 3 mostra a variedade de solventes extratores e concentrações usados na extração de antocianinas.

Tabela 3 – Lista dos solventes utilizados no processo de extração de antocianinas

Solvente extrator utilizado	Referências
Ácido clorídrico 0,1N em etanol 95%	FULEKI e FRANCIS, (1968 a,b)
Ácido acético 4% em metanol-água (1:1)	BRIDLE et al., (1984)
Ácido clorídrico 1% em etanol	ANDERSEN, (1985)
Ácido clorídrico 0,1N em etanol 96%	BLOM e THOMASSEN, (1985)
Ácido clorídrico 0,1% em etanol 80%	OSZMIANSKI e SAPIS, (1988)
Metanol-ácido acético-água (10:1:9)	TAKEDA et al., (1989)
Ácido clorídrico 0,05% em metanol	STRINGHETA, (1991)
Ácido cítrico 0,5% em metanol	GUEDES, (1993)
Ácido clorídrico 1% em metanol	FORNI et al., (1993)
Metanol-ácido fórmico-água (70:2:28)	GAO e MAZZA, (1996)
Ácido cítrico 3%- metanol	BAILONI et al.,(1998)
Ácido cítrico 1%- etanol	KUSKOSKI (2000a)
Ácido clorídrico 0,15% - metanol	PAZMIÑO-DURÁN et al., (2001a)
Metanol-gotas ácido clorídrico	MATAIX et al., (2001)
Ácido clorídrico 0,1N em metanol	MULLEN et al., (2002)
Ácido clorídrico pH2,0 – etanol 70%	CONSTANT, 2003
HCl 0,03% e ác cítrico 3% em etanol 70%	OZELA e STRINGHETA, 2004

De acordo com o método diferencial de pH, DONDERO e BADILLA (1983), extraíram antocianinas da casca da uva, utilizando três solventes extratores: água, água com 500 ppm de SO₂ e etanol 95% com 0,01% de ácido cítrico. Sendo comprovado que o etanol 95% com 0,01% de ácido cítrico foi o solvente mais eficiente.

IADEROZA et al. (1992), utilizando metanol - HCl 1% extraíram cianidina do fruto de açaí e juçara, encontrando o teor de 336 mg/100g (açaí) e 1347 mg/100g (juçara).

GAO E MAZZA (1996), ao extraírem pigmentos antociânicos de girassóis púrpuros, concluíram que o solvente etanol: ácido acético: água (EAW 50:1:40 v/v/v) e a solução com SO₂ foram mais efetivos que ácido acético 0,01M.

SILVA (1996), extraiu antocianinas de frutos frescos de *Solanum americanum* utilizando como solventes: metanol acidulado com 0,05% de ácido clorídrico e metanol acidulado com 0,5 % de ácido cítrico ambos em pH 2,0. Sendo que o metanol acidulado com 0,05% de ácido clorídrico em pH 2.0 foi mais efetivo na extração que o metanol acidulado com 0,5 % de ácido cítrico em pH 2,0.

2. 4. Estabilidade de antocianinas

As antocianinas como os demais corantes naturais apresentam problemas de estabilidade. A degradação pode ocorrer desde a extração, purificação dos pigmentos até o processamento e estocagem, sendo que os principais fatores que afetam a estabilidade das antocianinas são: a estrutura química do pigmento, pH, temperatura, tipo de solvente e outros.

2. 4. 1. - Efeito do pH

Uma das principais características das antocianinas é a mudança de coloração de suas soluções em função do pH do meio.

O pH é um fator importante na estabilidade das antocianinas, pois estas apresentam em pH abaixo de 3,0 coloração vermelho intensa, sendo que quando este pH aumenta a coloração tende a desaparecer (MAZZA e BROUILLARD, 1987; RAMOS et al., 2000).

Em pH neutro ou ligeiramente ácido as antocianinas existem predominantemente nas formas não coloridas (JACKMAN e SMITH 1996).

Segundo BROUILLARD (1982), as antocianinas são mais estáveis em soluções ácidas que em soluções neutras ou alcalinas. Colocando-se uma alíquota de antocianinas em uma solução aquosa em que os valores de pH variam de 1 a 14,

o resultado seria a produção de todas as cores do arco íris. Em base a tais observações visuais, fica claro que, um grande número de reações elementares devem estar envolvidas no aparecimento e no desaparecimento de tantos estados coloridos.

Em uma solução aquosa ácida podem existir quatro formas estruturais de antocianinas em equilíbrio entre si: a base quinoidal (A), o cátion flavilium (AH^+), a pseudobase ou carbinol (B) e a chalcona (C) conforme mostra a Figura 3 (FRANCIS, 1992).

A coloração das antocianinas varia de acordo com o pH do meio onde estão presentes. Em valores de pH abaixo de 3,0, a forma AH^+ de cátion flavilium prevalece. Com o aumento do pH ocorre competição entre a reação de adição de água ou desprotonação do cátion flavilium, levando a formação da base quinoidal A, que apresenta coloração azul. As soluções que apresentam pigmentos com pH acima de 7,0 mudam lentamente de tonalidade azul para a incolor formando pseudo base carbinol B, que se encontra em equilíbrio com a forma chalcona C, ambas incolores (FRANCIS, 1992).

Segundo TIMBERLAKE, (1980 e 1982) apesar da chalcona (C) ser um composto não colorido a sua forma ionizada apresenta levemente uma coloração amarelada, contudo esta coloração não é estável, e dependendo do pH da solução, desaparece com o tempo.

Os fatores de estabilização da estrutura de antocianinas como a acilação e copigmentação, são importantes para preservar ou aumentar a coloração do cátion flavilium AH^+ e da base quinoidal, pois sem estes, a possibilidade de usar as antocianinas como corante de alimentos seria bastante remota já que a maioria dos alimentos se encontra em uma faixa de pH de 3,0 a 7,0.

De acordo com FRANCIS (1992), deve-se manter o pigmento na forma AH^+ , na tentativa de aumentar a estabilidade de coloração, mesmo com a redução de pH.

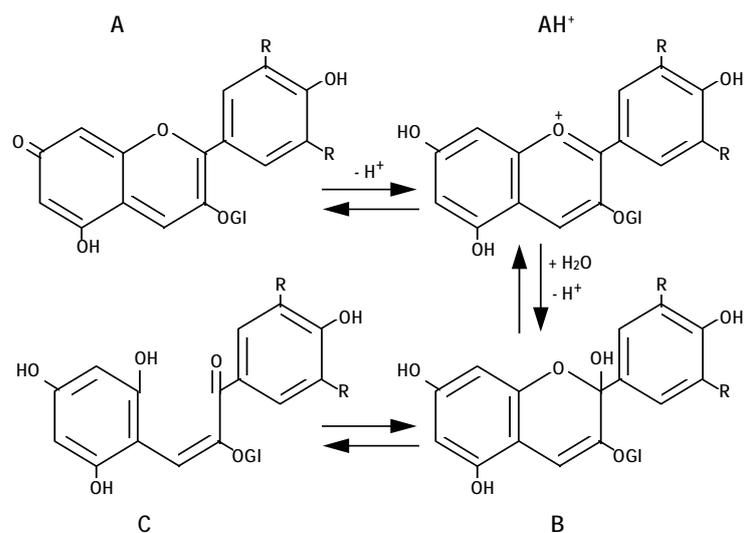


Figura 3: Transformações estruturais das antocianinas existentes em uma solução em equilíbrio (FRANCIS, 1992).

Segundo BROUILLARD (1982), JACKMAN e SMITH (1996) e WONG (1995), as antocianinas que são glicosiladas na posição 3 e estão abaixo do pH 2,0 encontram-se na forma do cátion AH⁺. Aumentando o pH numa faixa de 3 a 6 ocorre a rápida hidratação do cátion AH⁺ à pseudobase carbinol (B), com a adição de água acontecendo essencialmente na posição 2, tendo sido demonstrado por BROUILLARD (1982) que não ocorre adição na posição 4, onde a adição é desfavorável cinética e termodinamicamente.

Em antocianinas monoaciladas em condições ácidas a cor é determinada pela substituição no anel B da aglicona. Com metoxilação predominará a coloração vermelha, enquanto um aumento na hidroxilação aumentará a coloração azul (OTT, 1992).

2. 4. 2. Efeito da luz e oxigênio

Este fator é tão importante quanto o pH na degradação das antocianinas, especialmente quando a luz está associada ao oxigênio (CAMAREZ et al., 2000).

Estudo realizado por MARKAKIS (1982), com antocianinas de morango demonstrou que a ação conjunta do oxigênio com o ácido ascórbico destruiu intensamente os pigmentos quando comparados com apenas a ação de um dos fatores isolados e os compostos formados na oxidação do ácido ascórbico também degradam as antocianinas.

Antocianinas que possuem uma substituição no carbono 5, por um grupamento hidroxila e apresentam fluorescência, são mais susceptíveis a decomposição fotoquímica que as não substituídas nesta posição (JACMAN e SMITH, 1996).

Luz alta, enzimas e reações com outros componentes tais como ácido ascórbico e metais, podem comprometer a degradação das antocianinas durante o processamento e estocagem (WROLSTAD, 2001).

Segundo STRINGHETA (1991), os fatores que mais contribuem para a degradação da cor das antocianinas são as variações de pH e a incidência de luz, essa destruição é mais intensa quando, associada ao fator luz, encontra-se o efeito do oxigênio.

Os efeitos nocivos do oxigênio podem ser verificados através de mecanismos de oxidação direto ou indireto, onde constituintes do meio são oxidados e capazes de reagir com o pigmento, formando produtos escuros ou compostos despigmentados (MARKAKIS, 1982).

Na presença conjunta de oxigênio e ácido ascórbico GUEDES (1993), verificou que a destruição dos pigmentos antociânicos tem maior intensidade.

A diminuição do tempo de meia vida de 4,1 horas para 2,5 horas foi constatado por SUYAMA et al. (1983), quando nos tubos das amostras analisadas verificaram a presença de oxigênio contudo, um aumento da estabilidade das antocianinas contidas no suco dos frutos *Empetrum nigrum*, foi verificado por KALLIO et al. (1986), depois que destes removeu-se 90% do oxigênio.

Na exposição de soluções aquosas da Cianidina-3- (p-Cumaroil - Glicosídeo) - 5-Glicosídeo, sob nitrogênio, a pH igual a 3, após 5 e 10 horas à ação da luz,

verificou-se uma perda na absorção de cor de 28% e 51%, respectivamente. (SUYAMA et al., 1983).

Experimentos realizados por KEARSLEY e RODRIGUES (1981), apresentaram 75% de perda da absorção, revelando assim o efeito destrutivo da luz sobre as antocianinas, em ampolas com soluções aquosas de enocianinas comerciais (400 mg/100mL), a pH igual a 2,3 e a 25⁰C, sendo metade das ampolas expostas à luz e metade conservadas no escuro.

O extrato de baguaçu (*Eugenia umbelliflora*, Berg) obtido com a solução de EAW (etanol: ácido clorídrico: água – 50:1:49) apresentou no escuro um tempo de meia vida de 1.838h, enquanto que sob ação da luz, o tempo de meia vida diminuiu para 468h, o que comprovou a ação destrutiva da luz (KUSKOSKI, 2000b).

2. 4. 3. Efeito da Temperatura

A estabilidade das antocianinas e a taxa de degradação, é notadamente influenciada pela temperatura. A estabilidade térmica das antocianinas varia com a estrutura, o pH, a presença de oxigênio e interações com outros componentes tais como: açúcares e ácido ascórbico (HENDRY, 1996).

OTT (1992), relata que o armazenamento de conservas a temperatura de refrigeração (4°C), aumenta a vida de armazenamento em até seis vezes em comparação com o armazenamento a temperatura ambiente.

A velocidade de degradação das antocianinas em sistemas modelos é influenciada por alta temperatura de estocagem e do processamento. Sendo assim, recomenda-se reduzido tempo e alta temperatura de processamento para alcançar o máximo de retenção do conteúdo de pigmentos nos alimentos (JACKMAN e SMITH, 1996).

A reação de equilíbrio entre as formas de antocianinas tende a ser endotérmica de acordo com a (Figura 4), da esquerda para a direita, segundo BROUILLARD (1982).

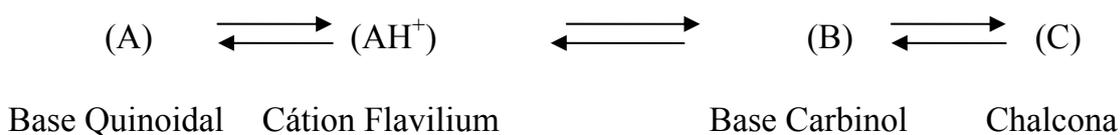


Figura 4: Deslocamento do equilíbrio.

Ainda segundo este autor, foi observado que durante o aquecimento havia um deslocamento do equilíbrio para a formação da chalcona (C) resultando num decréscimo da base quinoidal (A) e do cátion flavilium (AH^+). Promovendo-se a acidificação e o resfriamento do meio, as formas (A) e (B) eram rapidamente transformadas no cátion flavilium, sendo a mudança da chalcona (C) para (B) mais lenta que a reação inversa. Como o cátion flavilium é utilizado para quantificar as antocianinas, o tempo de aquecimento da solução e as análises quantitativas deverão ser muito longos, pois como a mudança da chalcona (C) para (B) é lenta, os resultados do estudo dos efeitos da temperatura poderá ser incorreto (BROUILLARD, 1982).

De acordo com ADAMS (1972, 1973 a; b), a principal causa da perda de cor do pigmento, parece estar relacionada com a hidrólise das antocianinas, devido ocorrer uma proporcionalidade entre a velocidade de desaparecimento da cor vermelha das antocianinas com a velocidade de formação de açúcar livre, pois com o aquecimento, as antocianinas que se encontram em pH 2,0 a 4,0, sofrem hidrólise da ligação glicosilada para formar chalcona e, em seguida, α - dicetona.

A temperatura de estocagem e do processamento influencia na velocidade de degradação das antocianinas em sistemas modelos e em sistemas naturais (STRINGHETA, 1991).

2. 4. 4. Copigmentação

Embora não esteja totalmente esclarecido como acontece, a copigmentação é um fenômeno verificado e aceito; havendo a influência de vários fatores na sua formação.

A copigmentação é um fenômeno através do qual a cor das antocianinas se torna mais vermelha, mais brilhante e mais estável, graças à interação entre substâncias orgânicas e antocianinas, mesmo em pH dos tecidos das plantas (OSAWA, 1982).

Este mesmo autor menciona que se for considerada a coloração das antocianinas apenas em função do pH, as plantas ou parte delas não deveriam ser coloridas, já que, na maioria dos casos, o pH natural dos vegetais se encontra na faixa ligeiramente ácida para neutra. Entretanto, observa-se que as antocianinas estão sempre associadas às partes coloridas das plantas, indicando que são estabilizadas por fatores físico-químicos incomuns.

Segundo ASEN et al., (1971), o pH do meio apresenta-se como fator de grande importância na formação do complexo, ocorrendo em valores próximos de 1 até a neutralidade.

As antocianinas podem atuar como copigmentos de si mesmas, se estiverem em altas concentrações. Podemos verificar também em pesquisas realizadas com a rutina como pigmento, a existência de uma razão molar de copigmento antocianina para cada tipo de antocianina (SCHEFFELDT e HRAZDINA, 1978).

BROUILLARD (1983), sugeriu a possibilidade de uma interação hidrofóbica entre o anel pirilium e os resíduos aromáticos dos grupos acila, o que protegeria o anel do ataque nucleofílico da água aumentando a estabilidade destas antocianinas. (Figura 5). Com este acontecimento haverá um aumento na estabilidade dos cromóforos devido impedirem a entrada de água nos carbonos C₂ e C₄ da molécula. Conseqüentemente ocorrerá uma dificuldade na transferência de prótons pelo processo de empilhamento das moléculas.

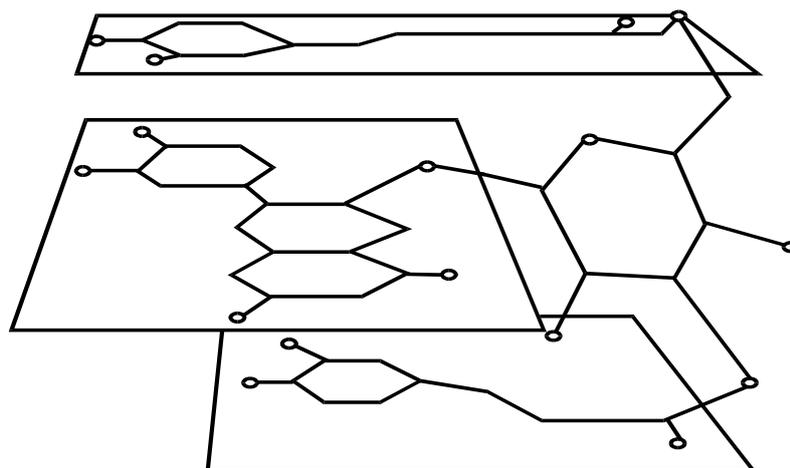


Figura 5: Modelo de empilhamento entre dois resíduos de ácido cafeico com núcleo pirilium (BROUILLARD, 1983).

A auto-associação é outro fenômeno associado com a intensificação e estabilidade da cor. Ela ocorre entre as formas coloridas das moléculas de antocianinas com o cátion flavilium e com bases quinoidais (HOSHINO et al., 1982).

O comportamento de uma mesma estrutura cromófora de antocianina pode originar diferentes cores, dependendo de diversos fatores químicos e físicos, tais como temperatura, pH, solvente, a estrutura do próprio pigmento e a presença de outras moléculas, descritas como copigmentos (MINIATI et al., 1992).

Existe um grande número de substâncias orgânicas que podem atuar como copigmentos, incluindo flavonóides, outros polifenóis, aminoácidos, nucleotídeos, alcalóides e até mesmo as próprias antocianinas (MAZZA, 1995).

2. 4. 5. Isolamento e Identificação de antocianinas

As técnicas cromatográficas de papel, placa e coluna aberta, que foram tão utilizadas por muitos anos para separação de antocianinas, modernamente estão sendo substituídas pela Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Porém

uma completa caracterização estrutural de uma antocianina, envolve também a identificação da aglicona, dos açúcares, dos grupamentos acila, bem como sua posição na molécula estrutural. O recomendado para atingir melhores resultados seria a combinação de técnicas espectrais: espectroscopia no ultravioleta (UV-Vis), Ressonância Magnética Nuclear (RMN ^1H , RMN ^{13}C , COSY, DEPT, NOESY), infravermelho (IR) e espectrometria de massas (JACKMAN e SMITH, 1996).

Os espectros de absorção de antocianinas na região de UV/Vis são muito importantes na caracterização estrutural. Em solução ácida, antocianinas e agliconas mostram uma absorvância intensa na região compreendida entre os comprimentos de onda de 465 a 550 nm (Banda I) e uma absorvância muito intensa na região entre 270 e 280nm (Banda II), sendo os espectros bastante característicos para identificação desses pigmentos, quando puros (FRANCIS 1982).

Antocianinas aciladas apresentam um comprimento de onda de absorvância máxima adicional entre 560 e 600 nm ou 600 e 640nm em pH maior que 4,0 (DELGADO-VARGAS, 2000).

O comprimento de onda máximo de absorção ($\lambda_{\text{máx}}$) na faixa do visível, de uma antocianina está diretamente relacionado com o seu padrão de hidroxilação. O efeito de uma hidroxila adicional provoca deslocamento batocrômico até maiores comprimentos de onda (FRANCIS, 1982).

Antocianidas cuja aglicona possui um grupamento *o*-dihidroxila livre, em presença de AlCl_3 , apresentam um deslocamento batocrômico de 15-35 nm. Assim cianidina, delphinidina e petunidina podem ser diferenciadas de pelargonidina, peonidina e malvidina (HARBORNE, 1967).

A glicosilação das antocianinas na posição 3, geralmente resulta no deslocamento hipocrômico nos espectros visível (JACKMAN et al., 1987).

A determinação das relações das absorvâncias nos comprimentos de onda de absorção máxima no UV-Vis e da relação de absorvância a 440 nm fornecem informações sobre a extensão e a posição da substituição glicosídica.

BAKKER et al. (1997), identificaram malvidina 3-glicosídeo presente em vinhos vermelhos, através da CLAE analítica, utilizando coluna ODS de 5 μm ,

detector de arranjos diodos a 280, 320 e 520 nm, fase móvel com fluxo de 0,3 mL/min constituída por solvente A) 0,6% HClO₄ e solvente B) metanol, gradiente linear 20- 53% de solvente B, por 33min.

Seis antocianinas foram separadas da bracts de banana por CLAE usando detector de arranjos diodos a 280, 320 e 520nm, coluna Supercosil LC-18 (5 µm), solvente A) 100% acetonitrila e B) 1% ácido fosfórico, 10% ácido acético e 5% acetonitrila em água, gradiente linear 0-3%/30 min, fluxo 1 mL/min, injeção de 50 µL (PAZMIÑO-DURÁN et al., 2001).

Utilizando espectrometria de massas e cromatografia líquida de alta eficiência ORDAZ-GALINDO et al. (1999), identificaram duas cianidinas presentes no Capulin (*Prunus serotina* Ehrh), utilizando detector de arranjos diodos a 280, 320 e 520nm, coluna PolyLC ODS C-18 (5 µm), solvente A) 100% acetonitrila e B) 1% ácido fosfórico, 10% ácido acético e 5% acetonitrila em água, gradiente linear 0-30%/30 min, fluxo 1 mL/min.

MULLEN et al. (2002), caracterizaram antocianinas de amora vermelha através da espectrometria de massas e da CLAE usando coluna Novapac C₁₈, detector de UV a 371 e 520 nm, gradiente 8-18%, 30 min, fase móvel acetonitrila em água contendo 1% de ácido fórmico, fluxo 0,8 mL/min.

A determinação de malvidina 3-glicosídeo, cianidina 3-glicosídeo e peonidina 3-glicosídeo em vinho foi realizada por MATAIX et al. (2001), usando detector Vis a 520nm, coluna Ultrabase C-18 (5 µm), fase móvel: acetonitrila e ácido fosfórico 10% em água, fluxo 1 mL/min., tempo 40 min.

GALORI et al. (2004), identificaram constituintes polifenólicos presentes na polpa de açaí, através do CLAE-EM, utilizando uma coluna Luna RP-18 Phenomenex Germany, de 5 µm, detector de arranjos diodos a 230, 254, 280, 330 e 350 nm, fase móvel constituída por solvente A) água pH=3,2 HCOOH e solvente B) metanol e acetonitrila, 0,8 mL/min, gradiente linear.

O isolamento de duas antocianinas a partir de *Vaccinium myrtillus* foi realizada utilizando CLAE, com coluna RP-18 Luna 5 µm, 150 x 4,6mm (Phenomenex, Torrance, CA, USA), 0,8 mL/min, fase móvel constituída por

solvente A) água: ácido fórmico: acetonitrila, 87:10:3, v/v, e B) água: ácido fórmico: acetonitrila (40:10:50, v/v), gradiente linear (DU et al., 2004).

2. 5. Antocianinas, fontes e sua importância na saúde

Existem evidências de que as antocianinas e os polifenóis da dieta podem ter papel preventivo e terapêutico em várias doenças humanas. A grande publicidade do “paradoxo francês” permitiu observar que populações de bebedores de vinho vermelho na França e Itália tinham taxas mais baixas de doença coronária de coração (CHD) que populações do norte da Europa e americanas (WROLSTAD, 2001a).

Lopaczynski e Zeisel (2001), citado por CHAGAS (2002), relatam que existem mais de 200 estudos na literatura epidemiológica questionando uma possível associação entre baixo consumo de frutas e vegetais com a incidência de câncer.

Os pigmentos de antocianinas de uva-do-monte (*vaccinium myrtillus*) têm sido usados experimentalmente para melhorar a acuidade visual e tratar distúrbios circulatórios (WROLSTAD, 2001b). As antocianinas têm atividade antiinflamatória e ação sobre a microangiopatia em diabéticos, possuem atividade anti-úlceras e protegem da radiação UV. Quando as antocianinas de uvas são aplicadas via intravenosa, intramuscular ou por via oral reduzem a permeabilidade e a fragilidade capilar (MAZZA, 1998).

O alto consumo de frutas e vegetais contendo flavonóides, carotenóides e vitaminas C e E, vem sendo associado à prevenção de várias doenças, incluindo câncer e doenças cardíacas e cerebrovasculares (TOIL et al., 2001).

Pesquisas confirmam que os alimentos ricos em antioxidantes desempenham um papel essencial reduzindo os riscos de doenças cardiovasculares, câncer, doença neurodegenerativa de Alzheimer's, inflamações e danos causados nas células. Os

flavonóides e as antocianinas, conhecidos como complexadores com radicais livres, são eficientes na prevenção das desordens degenerativas (GAULEJAC et al.,1999).

Os efeitos farmacológicos das antocianinas têm sido pesquisados para o tratamento de problemas microcirculatórios, prevenção da fragilidade capilar e trombozes (MORAZZONI e MAGISTGRETTEI, 1986).

WANG et al. (1997), relatam ainda que as antocianinas possuem alguns efeitos nos tratamentos de retinopatia diabética, doença fibrocística do coração e visão.

As antocianinas são amplamente distribuídas na dieta humana através de frutas, feijão, outros vegetais (Tabela 4) e vinho tinto. TSUDA (1999), sugere acrescentar fontes de antocianinas na dieta, sendo que a ingestão média de flavonóides por humanos varia de 25mg/dia a 1g/dia.

Tabela 4 – Antocianinas em vegetais comestíveis e teores de pigmento

Fonte	Teor de antocianina mg/100g	Umidade %
Jaboticaba (<i>Myrciaria jaboticaba</i>)	1779	91,00
Açaí (<i>Euterpe oleracea</i> M.)	1566	85,63
Jambolão (<i>Syzygium cumini</i> L.)	1475	88,74
Uva de vinho (<i>Vitis vinífera</i>)	959	89,95
Ameixa (<i>Prunus domestica</i>)	812	90,28
Repolho roxo (<i>Brassica oleraceae</i>)	773	88,08
Bacabi (<i>Oenocarpus minor</i> M.)	712	76,64
Amora (<i>Rubus fruticosus</i>)	563	80,93
Berinjela (<i>Solanum melongena</i>)	484	86,42
Jambo vermelho (<i>Syzygium malaccense</i> L.)	319	79,82
Uva de mesa (<i>Vitis vinífera</i>)	293	92,64
Acerola (<i>Malpighia glaba</i> L.)	177	92,10
Camu-camu (<i>Myrciaria dublia</i>)	135	74,61
Morango (<i>Fragaria spp.</i>)	104	83,32
Maracujá vermelho (<i>Passiflora edulis</i>)	97	80,25
Maçã (<i>Malu pumila</i>)	65	79,82
Romã (<i>Punica granatum</i>)	20	74,61
Cebola roxa (<i>Allium cepa</i>)	20	90,28
Figo roxo (<i>Ficus spp.</i>)	6	88,08

Fonte: OZELA e STRINGHETA (2004)

As antocianinas são comercialmente usadas em soluções ácidas como refrigerantes (pH entre 2,5 e 3,8, em que se apresentam na cor vermelha). São ainda usadas em refrescos, geléias, compotas, coberturas para bolos, sorvetes e iogurtes (GUIMARÃES, 1996).

BRIDLE e TIMBERLAKE (1997), citam que nos Estados Unidos a ingestão diária de antocianinas intactas em alimentos no ano de 1971 foi de 215mg/dia no verão e de 180mg/dia no inverno. Já na Itália em estudo com 569 italianos, o consumo de antocianinas variou de 25-215 mg/pessoa/dia.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido nos laboratórios do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa-MG e Departamento de Química da Universidade Federal do Pará, com frutos maduros da bertalha (*Basella rubra* L.).

A matéria-prima utilizada nos ensaios (Figura 6), foi cultivada na Estação Experimental Filogênio Peixoto pertencente à (CEPLAC), localizada no Município de Linhares - ES. Foram utilizados frutos maduros, colhidos entre os meses de janeiro a julho de 2002 e mantidos em freezer à temperatura de $-18 \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante todo o período de pós-colheita e realização da pesquisa.



Figura 6 - Frutos de bertalha (*Basella rubra* L.).

3. 1. Preparação do extrato de bertalha (*Basella rubra* L.)

Dois quilogramas de frutos maduros de bertalha foram macerados com 2.000 mL de metanol. Posteriormente o pH foi ajustado para 2,0 com HCl concentrado, de acordo com OZELA (1996). O material macerado foi deixado por 24 horas, a 5°C , ao abrigo da luz, para proceder a extração. Após este tempo,

realizou-se a prensagem manual do extrato por meio de um pano fino para a remoção do resíduo, seguida de centrifugação a 2.000 rpm, por 10 minutos, e filtração em papel Whatman nº1, por meio de funil de Buchner. Após a filtração extraiu-se a clorofila com 100mL da mistura éter etílico: éter de petróleo (1:1). O extrato, assim obtido, foi concentrado sob pressão reduzida a uma temperatura de 38°C, em evaporador rotatório, modelo 802, da Fisaton Equipamentos Científicos Ltda. Posteriormente procedeu-se a liofilização para retirada da água. O extrato liofilizado foi armazenado sob nitrogênio, ao abrigo da luz, a $-18 \pm 2^\circ\text{C}$, para utilização nas etapas seguintes.

3. 2. Isolamento das substâncias contidas no extrato de bertalha

O isolamento das substâncias contidas no extrato bruto foi feito por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

3. 2. 1. Preparação das amostras e dos reagentes

O extrato de bertalha foi dissolvido em solução aquosa de ácido fórmico 1%. A solução resultante foi filtrada em membrana FH 1.300, Millipore, com diâmetro do poro de $0,45 \mu$, e imediatamente injetada no sistema CLAE.

Todos os reagentes empregados na fase móvel foram filtrados em sistema Millipore de filtração a vácuo e, a seguir, degaseificado em sistema de ultra-som.

3. 2. 2. Separação das substâncias do extrato de bertalha

Um miligrama de extrato liofilizado de bertalha proveniente do item (3.1) foi pesado e dissolvido em 10 mL de solução aquosa de ácido fórmico 1%, filtrado

em filtro Millipore e injetada no sistema CLAE. Muitas tentativas foram feitas para estabelecer quais seriam as melhores condições de separação. Para isto foram utilizadas várias metodologias e a que proporcionou um cromatograma, com melhor definição foi o escolhido.

Para identificação das substâncias foi utilizado um CLAE analítico da Shimadzu, modelo SPD-10 AV, com sistema manual de injeção, “loop” de 20 µL e detector UV/Vis 275nm, coluna RP-18 Fenomenex –Luna (250 x 4,6 mm), com partículas de 5µm e pré-coluna Phenomex. A fase móvel foi constituída de: A) Acetonitrila e B) Solução aquosa de ácido fórmico 1% (1:9 v/v), fluxo 1 mL/min em sistema isocrático, por 30 minutos.

3. 2. 3. Isolamento das substâncias do extrato de bertalha

Cem miligramas de extrato liofilizado de bertalha proveniente do item (3.1) foi pesado e dissolvido em 1,0 mL de solução aquosa de ácido fórmico 1%, filtrado em filtro Millipore e injetado 100 µL por vez no sistema CLAE.

Para realizar o isolamento das substâncias contidas no extrato de bertalha foram extrapoladas as mesmas condições utilizadas no cromatógrafo analítico, item (3.2.2) para o cromatógrafo preparativo. Foi utilizado um CLAE preparativo shimadzu, modelo SPD-10 AV, com sistema manual de injeção “loop” de 1,0 mL e detector UV/Vis 275 nm, coluna RP-18 Fenomenex –Luna (250 x 10 mm), com partículas de 5µm e pré-coluna Phenomex. A fase móvel foi constituída de: A) Acetonitrila e B) Solução aquosa de ácido fórmico 1% (1:9 v/v), fluxo 3,5 mL/min em sistema isocrático por 30 minutos.

3.3. Rendimento das substâncias purificadas

Um miligrama de extrato de bortalha proveniente do item (3.1) foi pesado e dissolvido em 10 mL de solução aquosa de ácido fórmico 1%, filtrado em filtro Millipore e injetada no sistema CLAE. Seguindo a mesma metodologia do item (3.2.2), realizou-se 20 injeções em triplicata para obter-se a média do rendimento das substâncias S_1 e S_2 contidas no extrato bruto de bortalha. Para o cálculo do percentual de rendimento utilizou-se a média das áreas dos picos.

3.4. Reações características para identificação de antocianinas

Em virtude do forte matiz de cor vermelho arroxeadado apresentado pelo corante de bortalha e o mesmo ser hidrossolúvel, surgiu a hipótese de que o corante em pesquisa poderia ser uma antocianina. Então realizou-se as reações químicas, itens (3.4.1 e 3.4.2), específicas para antocianinas.

3.4.1. Reconhecimento de antocianinas

Soluções metanólicas com pH 1,0; 3,0; 6,0 e 9,0 foram preparadas com o auxílio de ácido clorídrico concentrado e hidróxido de sódio.

1,0 mg de pigmento de bortalha purificado e liofilizado foi dissolvido nas soluções metanólicas a diferentes pH e deixadas em repouso por duas horas, quando se obteve para cada amostra o espectro de absorção na região de 650 a 220 nm, em espectrofotômetro Shimadzu UV-1601PC.

Estas reações foram realizadas para diferenciar as betalainas das antocianinas pois, como se sabe, as antocianinas em pH ácido apresentam coloração que vão do vermelho ao violeta, enquanto que em pH alcalino apresentam coloração que vão do verde ao azul, indicando um comportamento de indicadores ácido-base.

3. 4. 2. Determinação do Rf

A determinação do Rf foi feita por cromatografia em papel Whatman nº1, utilizando-se uma cuba cromatográfica. Como fase móvel utilizou-se Forestal (ácido acético: ácido clorídrico: água, 30:3:10), Fórmico (ácido fórmico:ácido clorídrico: água, 5:2:3) e BAW (n-butanol: ácido acético: água, 4:1:5). O fator de retenção foi calculado pela razão entre a distância (cm, mm) percorrida pela substância e a distância percorrida pela frente da fase móvel.

3. 5. Análise por espectrofotometria no UV/Visível

Os espectros no ultravioleta e no visível foram obtidos em espectrofotômetro modelo Shimadzu UV-1601PC.

3. 6. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As substâncias S₁ e S₂ isoladas do corante de bertalha foram dissolvidas em água deuterada (D₂O):TFA 9:1 e a S₃ em metanol (CD₃OD) para posterior obtenção dos espectros de ressonância magnética nuclear a 100 e 300 MHz, no aparelho VARIAN, Mercury 300, do Departamento de Química da Universidade Federal do Pará.

3. 7. Estudo da estabilidade do pigmento

3. 7. 1. Estabilidade do pigmento do extrato bruto em solução tampão

Estabelecidas as características espectroscópicas e analíticas, o corante foi submetido ao estudo da estabilidade.

Foram escolhidos para os experimentos valores de pH 4,0; 5,0 e 6,0 já que, em ensaios anteriores, o corante mostrou-se instável em valores de pH abaixo de 4,0. A estabilidade foi testada frente à luz (presença e ausência de luz) e frente ao calor, com valores de temperatura de 40 e 60°C.

3. 7. 1. 1. Efeito da luz sobre a estabilidade do pigmento

Para este experimento foram utilizados dois tipos de frascos, sendo 60 frascos transparentes (presença de luz) e 60 frascos âmbar (ausência de luz), de 50 mL de capacidade. Foram preparados tampões citrato/fosfato em pH 4,0; 5,0 e 6,0. Em cada pH foram usadas concentrações de pigmentos suficientes para obtenção de leitura de absorvância inicial entre 0,900 e 1,000. Foi adicionado 0,2 mL de solução a 5% de sorbato de potássio a cada 40 mL de extrato, para prevenir desenvolvimento de fungos. Esses 40 mL foram distribuídos em frascos de 50 mL de capacidade, providos de tampa de borracha auto-selante e lacre de alumínio. Todos os frascos foram submetidos a um fluxo de nitrogênio, durante 10 segundos. Os frascos transparentes, contendo as soluções, foram colocados em um suporte em fila simples, posicionados entre duas lâmpadas fluorescentes de 40W, 2500 lux, correspondentes à luz do dia, a uma distância de 10 cm entre a lâmpada e os tubos, protegidos de qualquer outra fonte luminosa, a uma temperatura monitorada de $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Os frascos de cor âmbar contendo as soluções permaneceram ao abrigo da luz a uma temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$. A leitura inicial foi realizada após as duas primeiras horas de repouso e, as demais, em intervalos pré-determinados.

A retirada das amostras para leitura das absorvâncias em 540 nm comprimento de máxima absorção, foi feita com o auxílio de uma seringa comum. Cada experimento foi repetido pelo menos três vezes e os resultados representam a média aritmética de pelo menos dois valores. As leituras foram finalizadas quando atingissem próximo de 0,2 nm, quando então os frascos foram descartados.

Todas as leituras de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro modelo Hitachi U-2001 de feixe duplo.

3. 7. 1. 2. Efeito da temperatura sobre a estabilidade do pigmento

Foram utilizados frascos âmbar de 50 mL providos de tampa de borracha auto-selante e lacre de alumínio. Em cada frasco foram adicionados 40 mL da solução de extrato de bertalha seguindo-se o mesmo procedimento adotado em, (3.7.1.1) modificando-se apenas as condições de temperatura, que foram monitoradas em 40 e 60 ± 1°C. Todos os frascos, antes de serem lacrados, foram submetidos a um fluxo de nitrogênio durante 10 segundos. A cada 0,5 horas foram retiradas amostras para leitura de absorvância no comprimento de onda de máxima absorção (540 nm).

3. 7. 1. 3. Cálculo dos parâmetros de degradação das antocianinas

As medidas de absorvância dos sistemas de soluções tamponadas foram usadas para construir gráficos do logaritmo neperiano da razão absorvância/absorvância inicial ($\ln A/A_0$) versus o tempo, obtendo-se através da inclinação da reta o valor da velocidade de degradação (K), assim como o tempo de meia vida ($t_{1/2}$), através da equação de Arrhenius de primeira ordem (Equação 1 e 2).

$$k = \ln \left[\frac{\text{absorv\~{a}ncia}(t)}{\text{absorv\~{a}ncia}(t_0)} \right] \quad (1)$$

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{K} \quad (2)$$

3. 7. 2. Estabilidade das subst\~{a}ncias purificadas

As subst\~{a}ncias S₁ e S₂, provenientes do item (3.2.3), foram liofilizadas para retirada dos solventes. Posteriormente foram pesados 2,0 miligramas de cada subst\~{a}ncia em 2 beckeres, separadamente, que foram transferidos para dois bal\~{o}es volum\~{e}tricos de 20 mL com o aux\~{i}lio de uma solu\~{c}\~{a}o constitu\~{i}da de acetonitrila:solu\~{c}\~{a}o aquosa de \~{a}cido f\~{o}rmico 1% nas propor\~{c}\~{o}es de (1:9). Foi adicionado 0,05 mL de solu\~{c}\~{a}o a 5% de sorbato de pot\~{a}ssio, para prevenir desenvolvimento de fungos.

Foram distribu\~{i}dos (2,0 mL ou 2000 μ L) em 12 frascos de 5,0 mL de capacidade, providos de tampa de borracha auto-selante e lacre de alum\~{i}nio. Todos os frascos foram submetidos a um fluxo de nitrog\~{e}nio durante 10 segundos. Os frascos transparentes contendo as solu\~{c}\~{o}es foram colocados em um suporte em fila simples, posicionados entre duas l\~{a}mpadas fluorescentes de 40W, 2500lux, correspondentes \~{a} luz do dia, a uma dist\~{a}ncia de 10 cm entre a l\~{a}mpada e os tubos, protegidos de qualquer outra fonte luminosa, a uma temperatura monitorada de $25 \pm 1^\circ\text{C}$. A leitura inicial foi realizada ap\~{o}s as duas primeiras horas de repouso e, as demais, num intervalo de 24 em 24 horas, durante sete dias.

A retirada das amostras foi feita com o aux\~{i}lio de uma seringa comum e transferidas imediatamente para a seringa do sistema CLAE. Cada experimento foi repetido pelo menos tr\~{e}s vezes e os resultados foram expressos pela m\~{e}dia aritm\~{e}tica de pelo menos dois valores, descartando-se os dados discrepantes. O monitoramento da estabilidade foi feito por CLAE seguindo o item (3.2.2.).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. 1. Separação das substâncias contidas no extrato de bertalha

A Figura 7 contém o perfil cromatográfico do extrato de bertalha, o qual apresenta uma mistura complexa de pelo menos 15 substâncias, as quais foram isoladas por CLAE preparativa. Das substâncias isoladas foram estudadas as substâncias S₁, S₂ e S₃, assim denominadas, aleatoriamente, para efeito de avaliação.

As substâncias S₁ e S₂ apresentaram coloração vermelho arroxeadado e a substância S₃ apresentou coloração amarela. Este perfil cromatográfico foi muito importante para caracterização, pois indicou as áreas de cada pico, bem como, os tempos de retenção frente ao sistema utilizado.

Ao se realizar a separação das substâncias, ao contrário do esperado, observou-se no cromatograma (Figura 7) que os corantes foram os picos menores correspondendo aos picos S₁ e S₂.

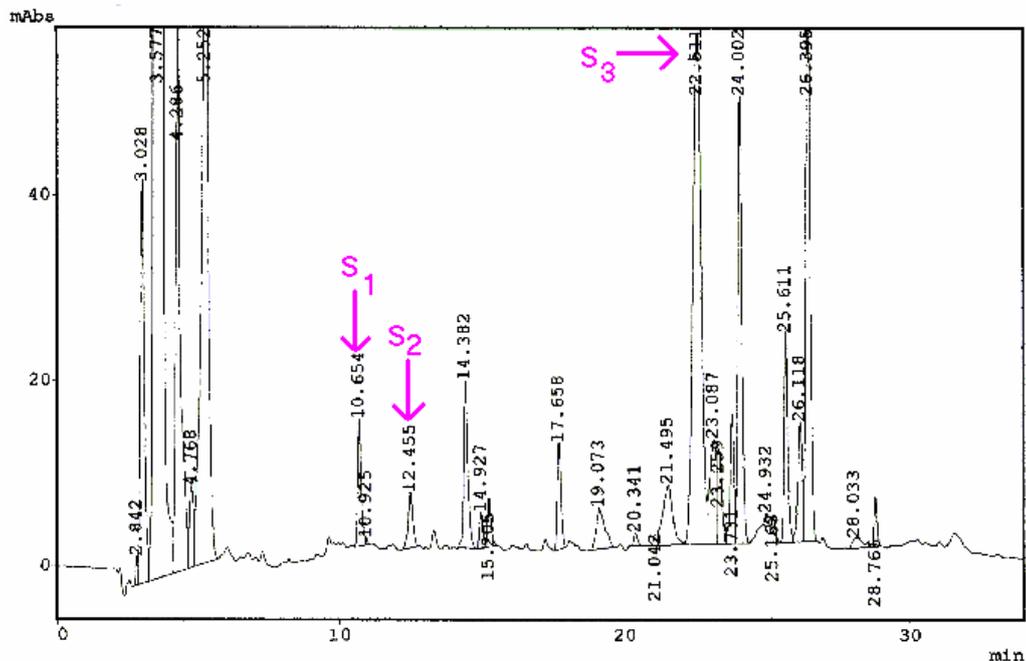


Figura 7 – Perfil cromatográfico obtido por CLAE do extrato bruto de bertalha a 275 nm.

Ressalta-se ainda que existem outras substâncias coloridas nesse cromatograma, correspondendo aos picos com tempos de retenção de 3,57, 23,0 e 23,2 minutos respectivamente, porém, elas não foram objeto deste estudo devido os picos não se apresentarem bem definidos.

4. 2. Rendimento das substâncias S₁ e S₂ isoladas do pigmento de extrato bruto de bortalha

Trabalhando com extração e quantificação do extrato bruto de bortalha e expressando os resultados em antocianinas totais, OZELA (1996), obteve 48,0 mg de antocianinas/100g de polpa de fruto. Esse resultado foi baixo e surpreendente, frente ao forte matiz de cor e poder tintorial apresentado pela polpa da bortalha.

Analisando a Figura 8, observa-se que apesar do forte matiz de cor apresentado pelo corante, apenas 5,15% representam a somatória das substâncias coloridas, sendo que (3,05%) da S₁ e (2,11%) da S₂.

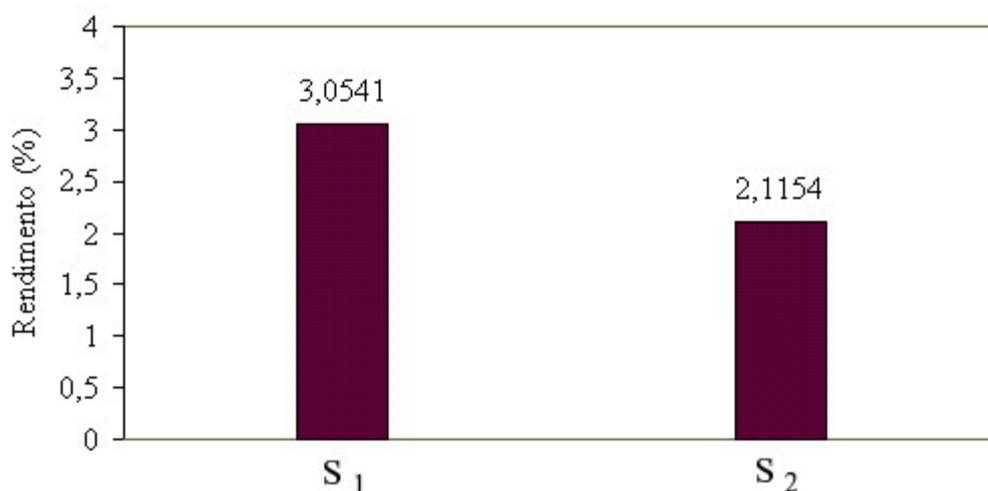


Figura 8 – Rendimento das substâncias S₁ e S₂ isoladas a partir do extrato bruto de bortalha, por CLAE.

Talvez a explicação mais pertinente para este fato seja o fenômeno de copigmentação que pode estar acontecendo entre os compostos antociânicos e outros flavonóides presentes no extrato de bortalha, proporcionando assim, forte coloração.

Pode-se afirmar que, apesar do baixo rendimento de pigmento apresentado pelas substâncias S₁ e S₂, o corante da bortalha pode ser considerado uma fonte promissora de corante natural, podendo vir a substituir os corantes artificiais vermelho 40, ponceau 4R e bordeaux S.

4. 3. Reações características para identificação de antocianinas

Basicamente, antocianidinas são identificadas pela observação de sua cor em solução ou no papel (Tabela 1, p. 8) e, também, pela medida do seu R_f em solventes Forestal, BAW e Fórmico e suas propriedades espectrais (Tabela 5 e 6).

Analisando-se os resultados apresentados nas Tabelas 5 e 6 referentes a cromatografia em papel pela medida de R_f, observa-se que os resultados obtidos para a substância S₁ nos sistemas solventes BAW = 58, Forestal = 58 e Fórmico = 28, encontram-se com valores próximos aos citados por HARBORNE (1967) (BAW = 58, Forestal = 60 e Fórmico = 27) para a malvidina. Para a substância S₂ obteve-se BAW = 64, Forestal = 49 e Fórmico = 21, que comparados aos valores citados por HARBORNE (1967) (BAW = 68, Forestal = 49 e Fórmico = 22) dão indicativo da presença de uma cianidina.

Antocianinas normalmente apresentam absorção máxima no visível, na faixa de 500-550 nm (FRANCIS, 1982). Os valores do comprimento de onda máximo UV-Vis do extrato bruto e das substâncias purificadas (Tabela 6, Figura 9) mostram os picos característicos de antocianinas. Para o extrato bruto foi verificada a presença de bandas de absorção na região de 275 e 540 nm.

Tabela 5 – Características cromatográficas para antocianidinas conforme HARBORNE (1967).

Antocianidinas	Rf% BAW	Rf% Forestal	Rf% Fórmico
Cianidina	68	49	22
Delfinidina	42	32	13
Malvidina	58	60	27
Pelargonidina	80	68	33
Peonidina	71	63	30
Petunidina	52	46	20

Tabela 6 – Características espectrais do extrato bruto, das substâncias S₁ e S₂ e de citação de literatura para malvidina, cianidina e cianidina-3-GR.

Característica	λ max. Vis (nm)	λ max. UV (nm)	Rf % BAW	Rf % Forestal	Rf% Fórmico	Fluores cência
S ₁	540	276	58	58	28	Negativo
S ₂	533	285	64	49	21	Negativo
Extrato bruto	540	275	—	—	—	Negativo
Cianidina-3-GR**	530	282	—	—	—	Negativo
Malvidina*	543	278	58	60	27	Negativo
Cianidina*	535	277	68	49	22	Negativo

*HARBORNE (1967) e **CONSTANT (2003).

Para a substância S₁ as bandas de absorção foram 276 e 540 nm, valores estes que são semelhantes aos relatados para a malvidina (278 e 543 nm), conforme HARBORNE (1967). Para a S₂ as bandas de absorção observadas foram 285 e 533 nm, que são muito próximas a 282 e 530 nm, valores citados para a cianidina-3-GR (CONSTANT, 2003).

A ausência de fluorescência dos pigmentos quando expostos a luz ultravioleta (Tabela 6), sugeriu ausência de substituintes na posição 5 (HARBORNE, 1967).

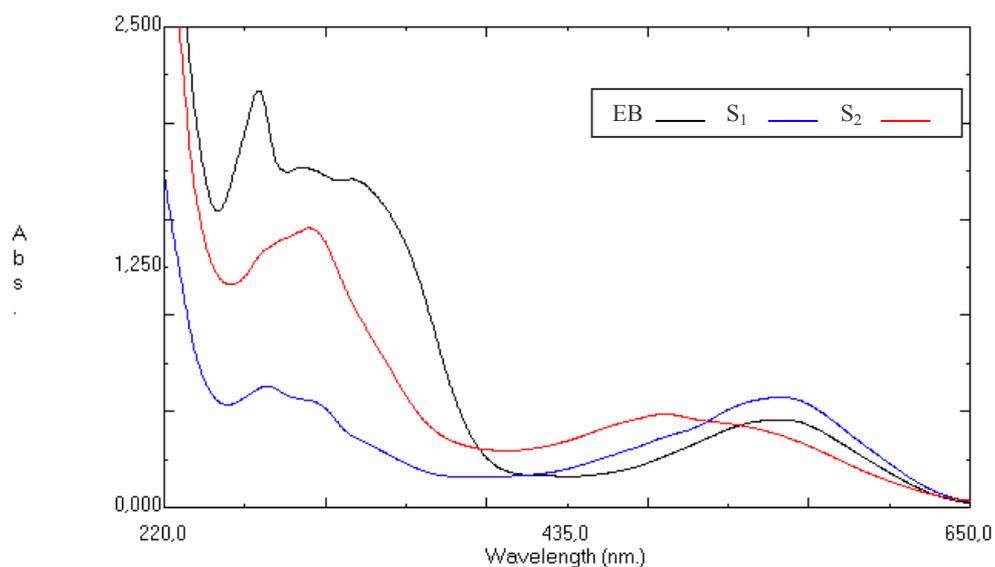


Figura 9 - Espectros de absorção UV-Vis do extrato bruto e das substâncias purificadas S₁ e S₂.

Na reação de reconhecimento de antocianinas, ilustrada nos espectros de absorção (Figuras 10 e 11) das substâncias S₁ e S₂, houve indicativo de que elas possuem comportamento ácido-base, característica peculiar das antocianinas, descartando assim a possibilidade de serem betalaínas, pigmentos hidrossolúveis de coloração vermelho violeta de plantas pertencentes à ordem Centrosperma (BOBBIO et al.,1992).

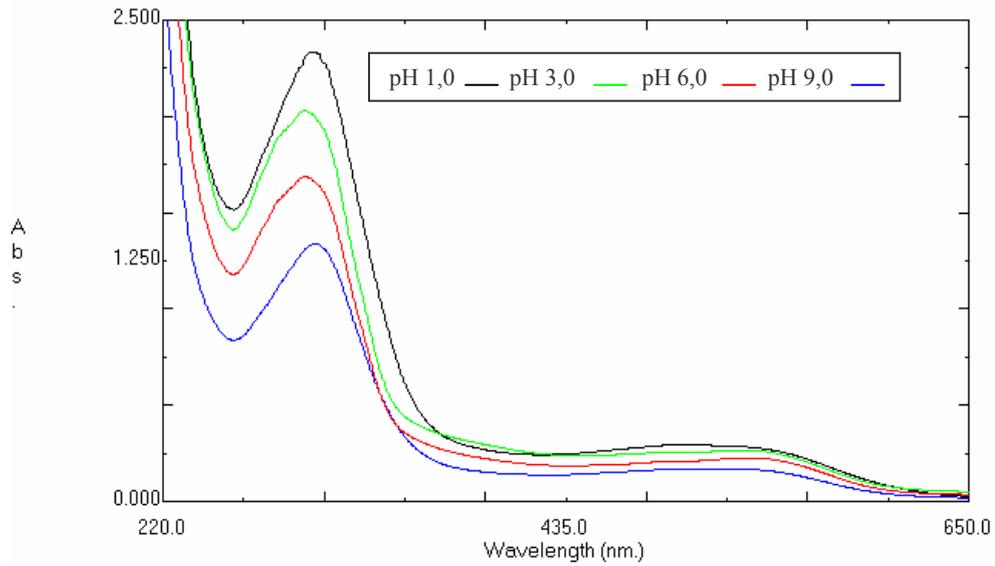


Figura 10 - Espectro de absorção UV/Vis da antocianina S₁ a pH 1,0; 3,0; 6,0 e 9,0, apresentando comportamento ácido-base.

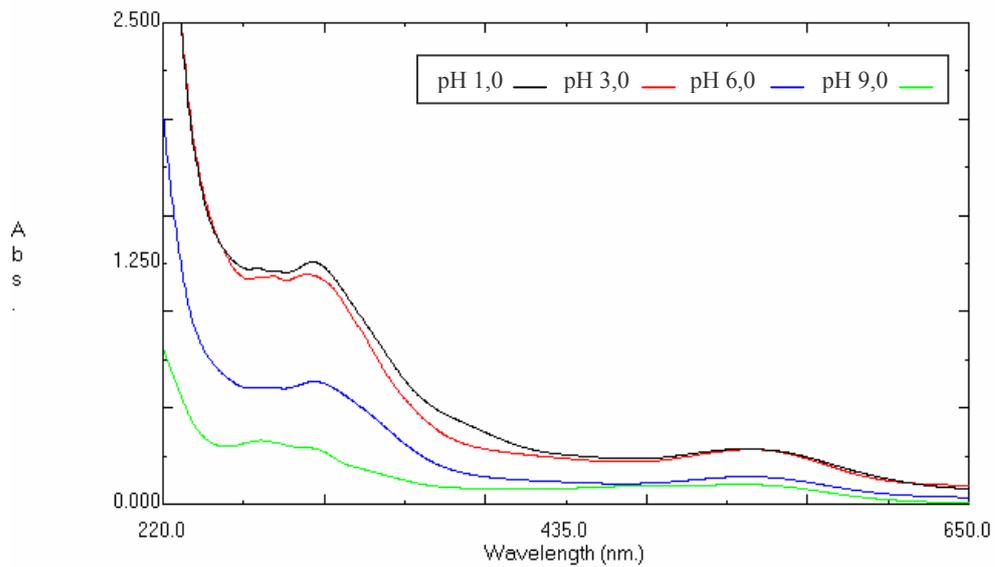


Figura 11 - Espectro de absorção UV/Vis da antocianina S₂ a pH 1,0; 3,0; 6,0 e 9,0, apresentando comportamento ácido-base.

4.4. Caracterização das estruturas químicas

4.4.1. Substância S₁

O espectro de RMN ¹H da S₁ é apresentado na Figura 12. Através da análise deste espectro observa-se a presença de sinais de hidrogênios na região de aromáticos e também sinais de hidrogênios de unidades de açúcares, que provavelmente devem estar ligados a uma estrutura de flavonóide.

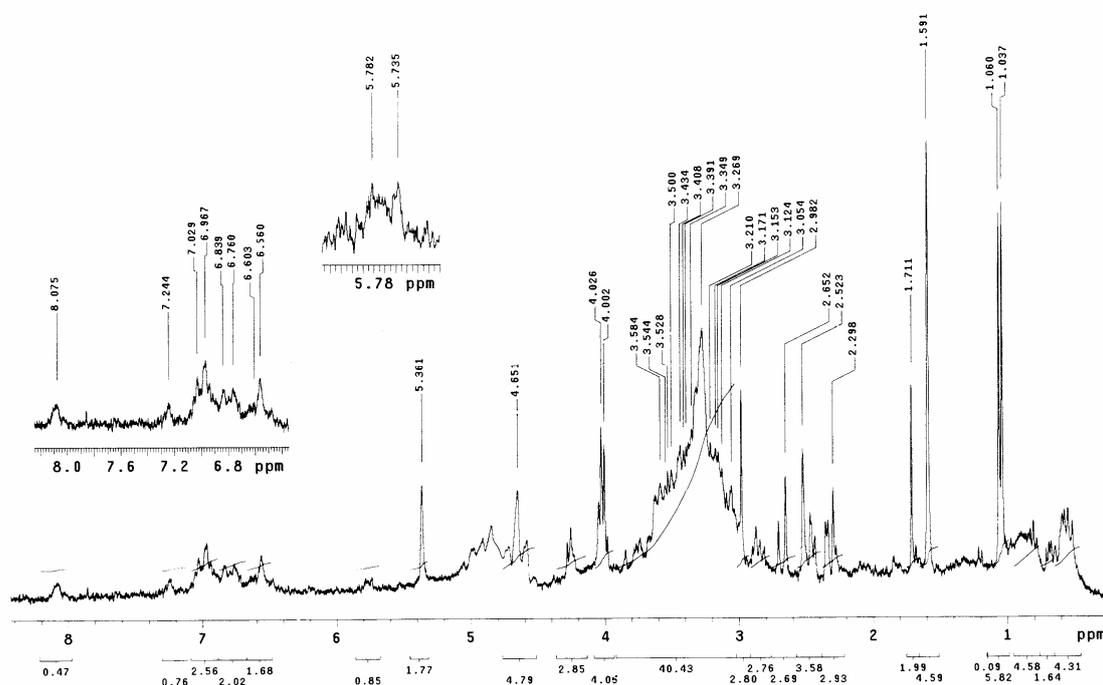


Figura 12 – Espectro de RMN de ¹H a 300 MHz da S₁ em solvente D₂O:TFA (9:1).

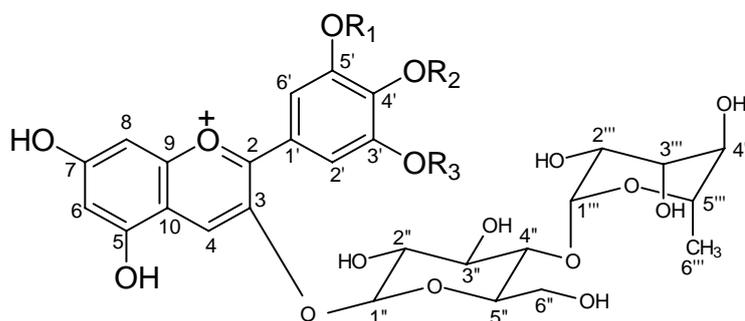
Entre os sinais característicos destacam-se: o sinal em δ 8,07 (s), que pode ser atribuído a hidrogênio H-4 do anel C de uma antocinina; os sinais na faixa de δ 6,50 a 7,30, na qual observa-se um envelopado de sinais que podem ser atribuídos aos hidrogênios aromáticos dos anéis A e B do flavonóide; nos sinais do intervalo de δ 4,00 a 4,02 observam-se dois singletos típicos de hidrogênios de grupo metoxila ligado a anel aromático; com relação aos sinais na faixa de δ 3,2 a 3,6 observa-se um conjunto de sinais sobrepostos que são atribuídos aos hidrogênios de

açúcares; considerando-se os sinais referentes ao intervalo de δ 4,6 a 5,3 observa-se dois singletos que são típicos de hidrogênio acetálico de açúcar, e ainda, o sinal em δ 1,05 (d, $J=6,9$ Hz) que é característico de hidrogênio metílico do açúcar rarnose.

Os dados espectrais de RMN ^1H não foram suficientes para se identificar a estrutura da substância S_1 , porém associou-se esses dados aos espectrofotométricos e cromatográficos em uma tentativa de elucidar a estrutura química.

Observando-se o espectro UV-Vis, verifica-se a presença de duas bandas $\lambda_{\text{máx VIS}}=540$ nm e $\lambda_{\text{máx UV}}=276$ nm, características de antocianinas (Figura 9). Houve também indicativo de comportamento ácido-base (Figura 11, p.38) próprio de antocianinas. Reunindo estes resultados aos obtidos por cromatografia em papel pela medida de R_f nos sistemas solventes (BAW=58, Forestal=58 e fórmico=28) e comparando-se aos valores citados por HARBORNE (1967) (BAW=58, Forestal=60 e fórmico=27) para a malvidina (Tabela 5 e 6), pode-se observar valores muito próximos. A ausência de fluorescência quando exposto a luz ultravioleta, sugeriu ausência de substituintes na posição 5 (HARBORNE, 1967).

Reunindo todos os resultados e diante de tantas evidências, pode-se sugerir que a substância S_1 do corante da bortalha trata-se de um flavonóide antociânico e que possivelmente a antocianidina em estudo trata-se de uma substância com estrutura próxima a Malvidina (Figura 13).



R_1, R_2 e $R_3 = \text{H}$ ou Me

Figura 13 – Estrutura química sugerida para substância S_1 .

4.4.2. Substância S₂

O espectro de RMN ¹H (Figura 14 e Tabela 7, p. 47) da S₂, apresenta sinais de hidrogênios aromáticos e alifáticos que caracterizam a presença de uma substância pertencente à classe dos flavonóides, com unidades de açúcar como substituintes, podendo tratar-se de uma antocianina.

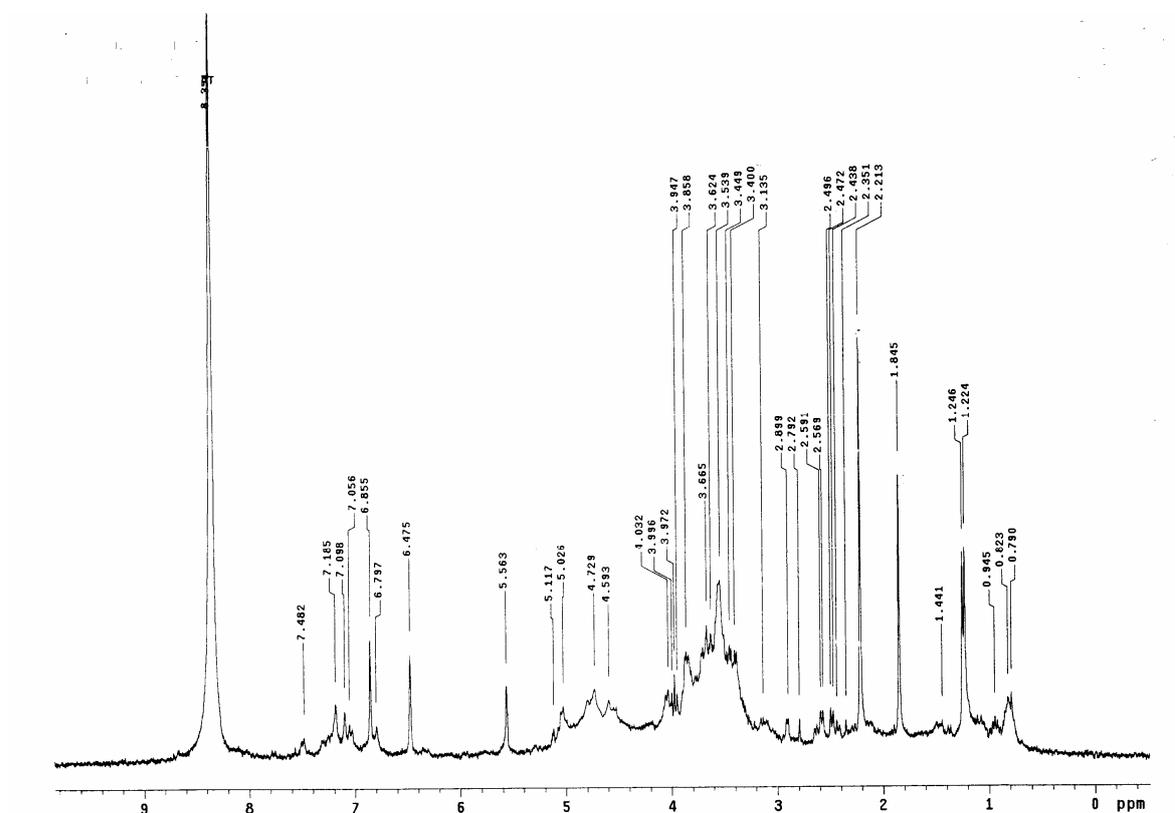


Figura 14 - Espectro de RMN de ¹H a 300 MHz da S₂ em solvente D₂O:TFA (9:1).

Na região de hidrogênios aromáticos, observam-se dois singletos centrados em δ 6,47 e δ 6,85, que podem ser atribuídos, respectivamente, aos hidrogênios H-8 e H-5, de uma antocianina. Estes sinais sugerem a seguinte subestrutura para o anel A (Figura 15).

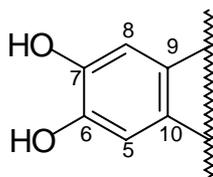


Figura 15 – Subestrutura A.

Observam-se ainda, na região de hidrogênios aromáticos, um conjunto de sinais sobrepostos que podem ser atribuídos aos hidrogênios do anel B.

Na região de hidrogênios alifáticos, no intervalo de δ 3,10 a 4,00, observam-se sinais de hidrogênios que caracterizam a presença de unidades de açúcar ligados a estrutura do flavonóide.

Os sinais em δ 4,73 e δ 5,11 podem ser atribuídos aos hidrogênios acetálicos das unidades de açúcar. Sendo que um dos açúcares deve se tratar da ramnose, pela observação do sinal duplete em δ 1,23 ($J = 6,6$ Hz), que é típico dos hidrogênios metílicos da estrutura desse açúcar.

Por comparação com dados da literatura, a outra unidade de açúcar presente na estrutura, deve ser de uma glicose.

Observa-se ainda um sinal singlete em δ 2,21, típico de metila de grupo acetil (ALBACH et al., 2003).

A correlação entre os carbonos e os hidrogênios a eles ligados foi feita pela análise do mapa de contornos HSQC (Figura 16), o qual mostra correlação entre os sinais de hidrogênio em δ 6,85 (s), δ 6,47 (s), δ 5,11 (d), δ 2,21(s) e δ 1,23(d) com os sinais relativos aos carbonos C-8, C-5, C-1'', CH₃ (OAc) e C-6'', respectivamente.

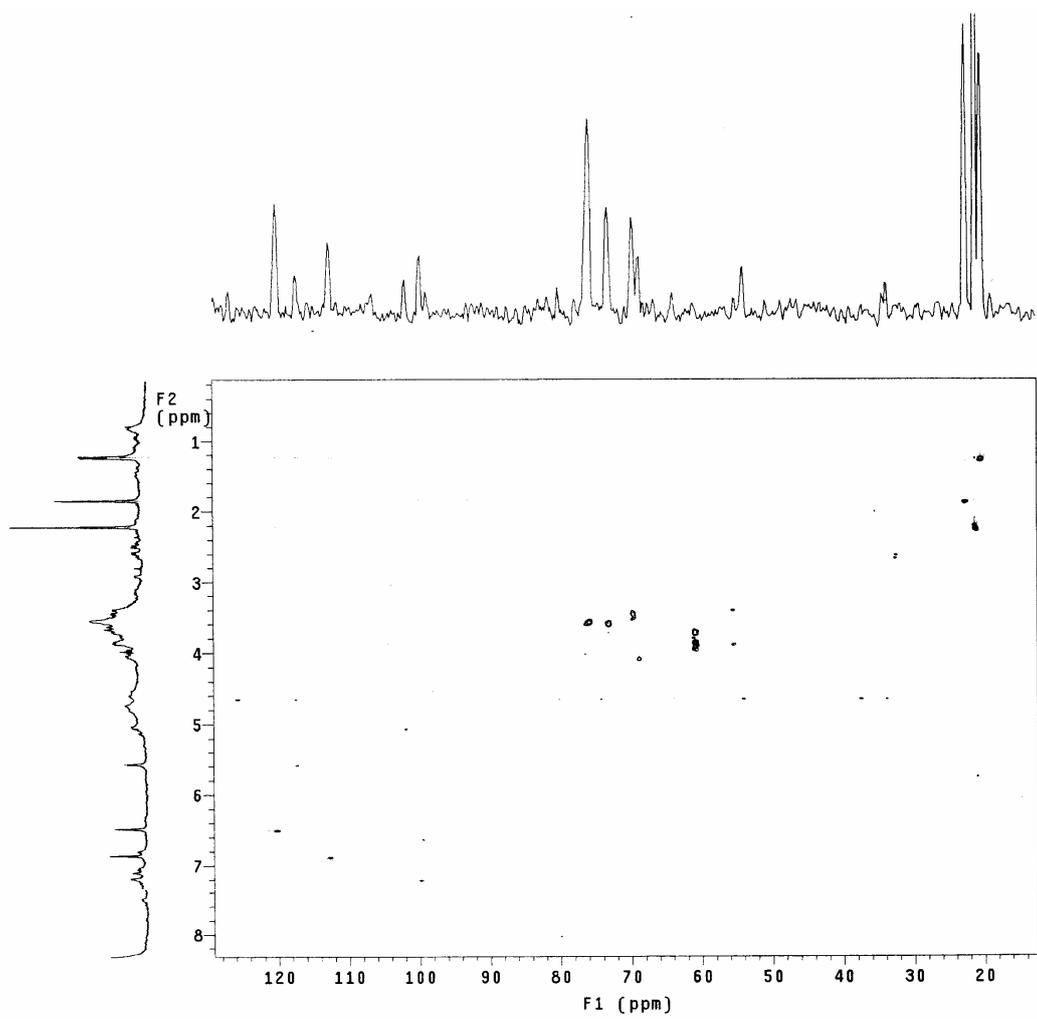


Figura 16 – HSQC da S₂ em solvente D₂O:TFA (9:1)

Os espectros de RMN ¹³C (Figuras 17, 18 e a Tabela 7), não mostraram todos os sinais esperados para a estrutura de uma antocianina com duas unidades de açúcar substituintes, talvez devido ao tempo de relaxamento e/ou baixa concentração da amostra. No entanto, destacam-se os sinais referentes a C-4 em δ 132,6 e a uma carbonila em δ 170,3 que pode ser atribuída ao grupo acetil.

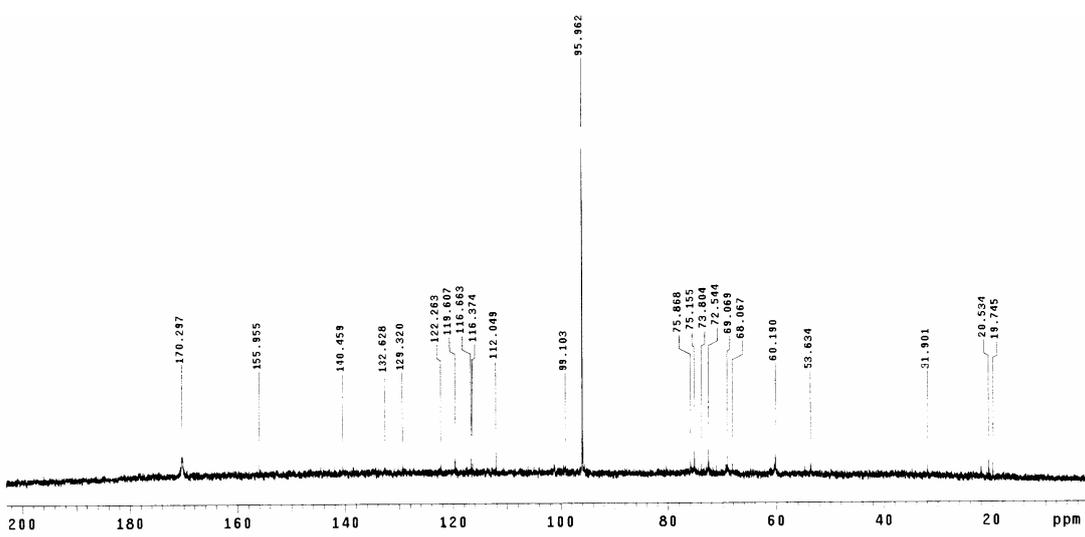
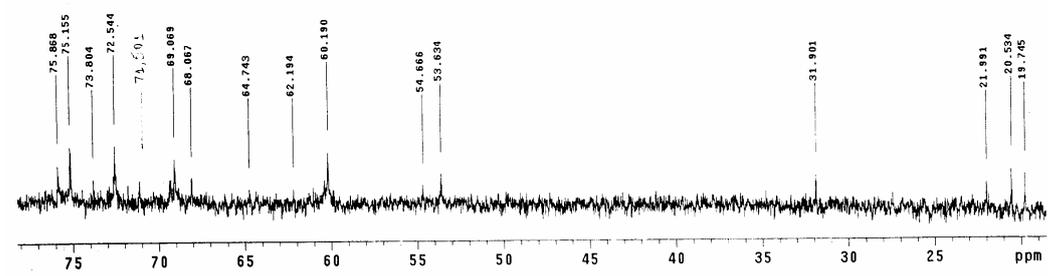
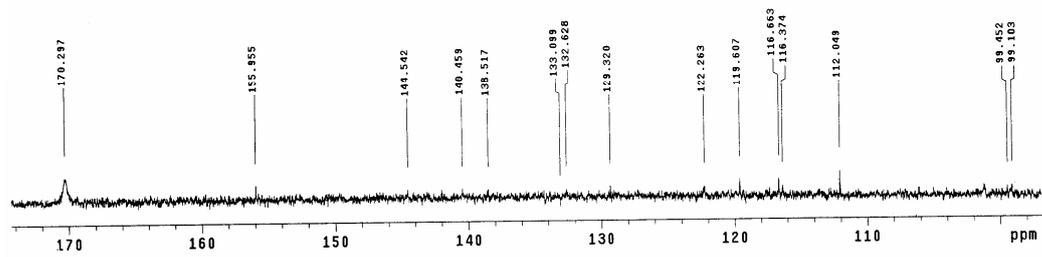


Figura 17 – Expansões do espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz da S_2 em solvente $\text{D}_2\text{O}:\text{TFA}$ (9:1).

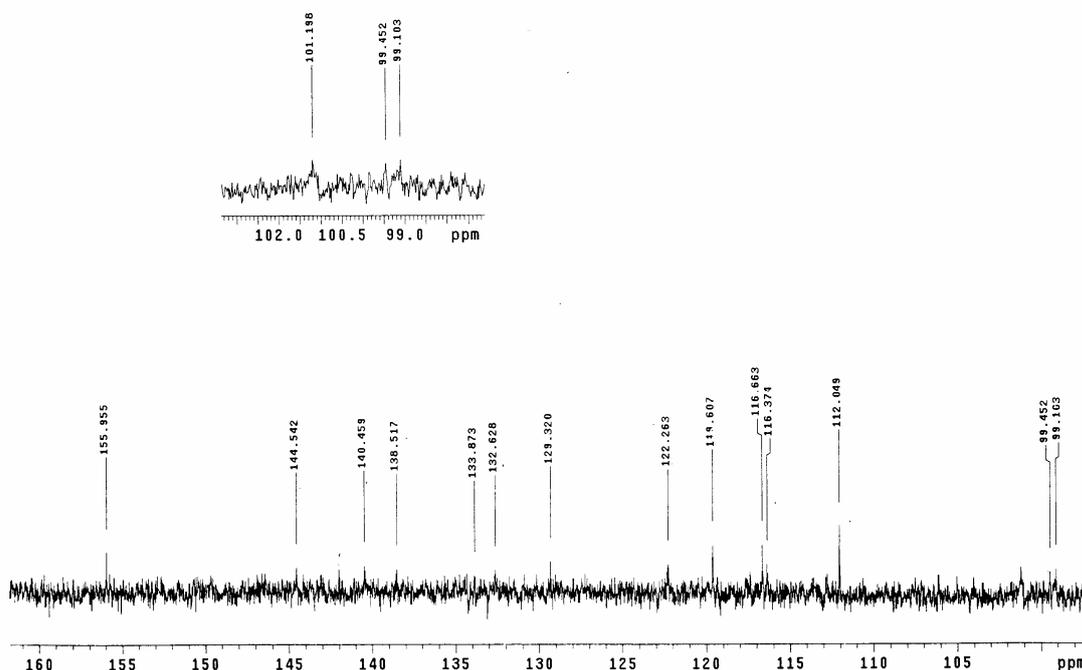


Figura 18 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz de S_2 em solvente $\text{D}_2\text{O}:\text{TFA}$ (9:1).

Para tentar elucidar a estrutura química da S_2 reuniu-se estes dados espectrais de RMN, com os experimentos de UV/Vis, CLAE e CP.

Observando-se o espectro UV-Vis, verifica-se a presença de duas bandas $\lambda_{\text{máx UV}}=285$ nm e $\lambda_{\text{máx Vis}}=533$ nm, características de antocianinas (Figura 9, p.37). Houve também indicativo de comportamento ácido-base (Figura 11, p.38). Reunindo estes resultados aos obtidos por cromatografia em papel pela medida de R_f nos sistemas de solventes (BAW=64, Forestal=49 e fórmico=21) e comparando-se aos valores citados por HARBORNE (1967) (BAW=68, Forestal=49 e fórmico=22) para cianidina (Tabelas 5 e 6, p.36), pode-se observar valores muito próximos. A ausência de fluorescência quando exposto a luz ultravioleta, sugeriu ausência de substituintes na posição 5 (HARBORNE, 1967).

A reunião desses dados permite sugerir que a substância referente à substância S₂, trata-se de um flavonóide do tipo antocianina, sendo que o sinal do hidrogênio H-4, estaria sobreposto ao sinal do solvente em δ 8,39 e a provável estrutura para esta substância seria de uma cianidina conforme Figura 19.

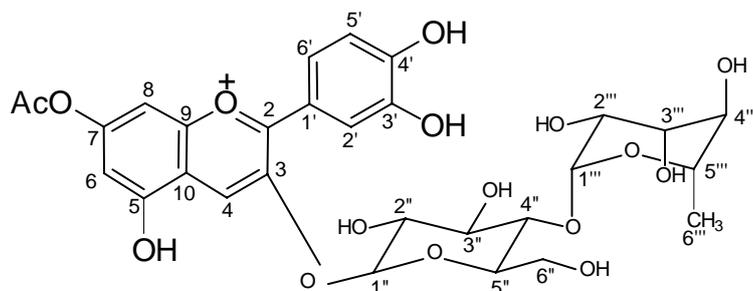


Figura 19 – Estrutura química sugerida para a substância S₂.

Tabela 7 – Dados de RMN ^1H a 300 MHz e ^{13}C a 100 MHz em $\text{D}_2\text{O}:\text{TFA}$ (9:1) da S_2

Aglicona	^{13}C	^1H
2	161,2 ^{*NO}	—
3	140,4	—
4	132,6	—
5	119,6	6,47
6	*NO	—
7	*NO	—
8	112,0	6,85
9	158,7 ^{*NO}	—
10	111,4 ^{*NO}	—
1'	118,7 ^{*NO}	—
2'	116,6	6,70 – 7,40
3'	147,7 ^{*NO}	—
4'	155,9	—
5'	116,4	6,70 – 7,40
6'	129,3	6,70 – 7,40
Açúcar A		
1''	101,2	5,11 (d)
2''	73,8	3,10 – 4,00
3''	75,1	—
4''	68,1	—
5''	75,8	—
6''	60,2	—
Açúcar B		
1'''	99,1	4,73 (s)
2'''	71,5	3,30 – 4,03
3'''	71,5	—
4'''	72,5	—
5'''	69,0	—
6'''	19,7	1,23 (d, J=6,6)
OAc		
C=O	170,3	—
CH ₃	20,5	2,21 (s)

*Valores não observados e assinalados com base em ALBACH et al., (2003) e CONSTANT (2003).

4. 4. 3. Substância S₃

O espectro de RMN de ¹H da S₃ (Figura 20, Tabela 8) apresenta padrão de sinais que caracterizam um esqueleto de flavona (TIAM et al., 2004 e PENG et al., 2003), especialmente o deslocamento químico relacionado ao hidrogênio H-3, que no espectro de S₂ aparece como um singlete típico em δ 6,62.

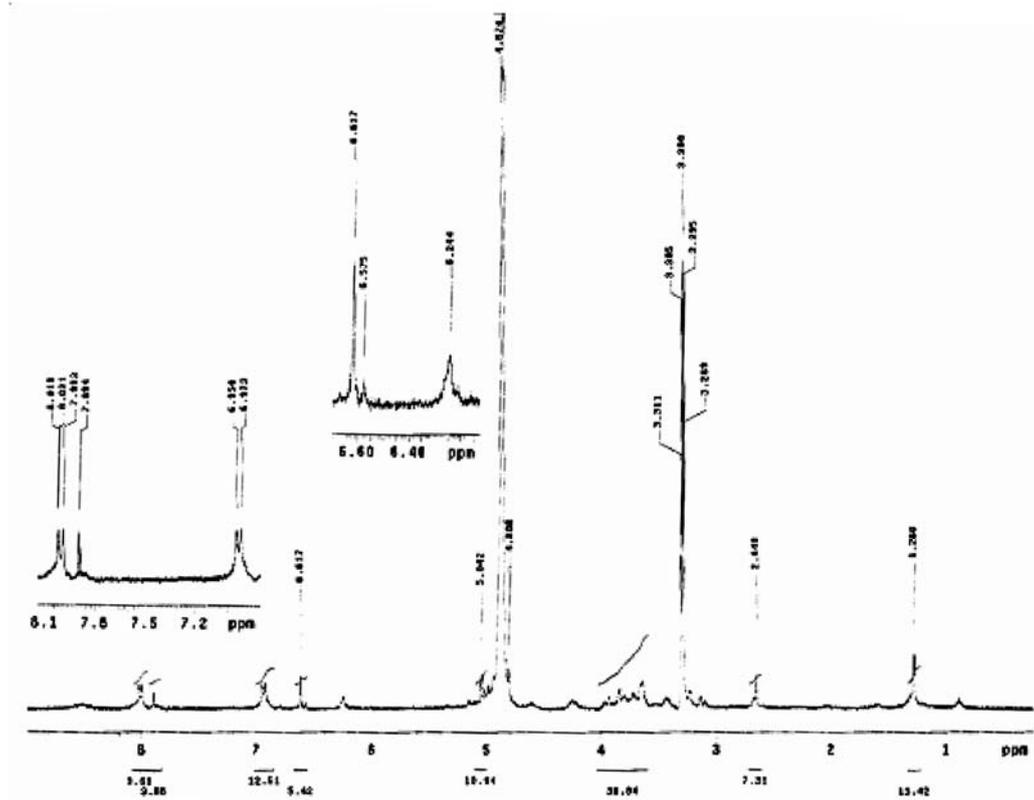


Figura 20 – Espectro de RMN de ¹H a 300 MHz em solvente CD₃OD da S₃.

A partir desses dados espectroscópicos pode-se obter a subestrutura para o anel C da flavona, como mostra a Figura 21.

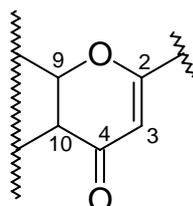


Figura 21 – Subestrutura do anel C.

Ainda na região de hidrogênios aromáticos, observa-se os seguintes sinais: um duplete integrando para dois hidrogênios em δ 8,01 ($J= 8,2\text{Hz}$), atribuídos aos hidrogênios equivalentes H - 2'/6' e um duplete integrando para dois hidrogênios em δ 6,93 ($J=8,2\text{Hz}$), atribuído aos hidrogênios equivalentes H - 3'/5'. Estes sinais definem a subestrutura para o anel B da S₂ conforme a Figura 22.

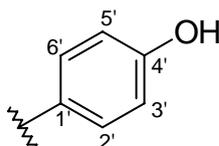


Figura 22 –Subestrutura do anel B.

Observa-se também na região de hidrogênios aromáticos: um singlete em δ 7,89, característico de hidrogênio na posição 5, sofrendo desproteção pela anisotropia magnética da ligação C=O do anel C. Este dado permite sugerir a seguinte subestrutura para o anel A (Figura 23):

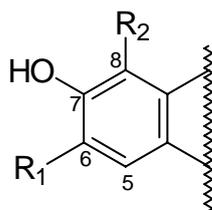


Figura 23 – Subestrutura do anel A.

Na região de hidrogênios alifáticos, entre δ 3,1 a 4,0, observa-se um conjunto de sinais que caracterizam grupamento C-glicose ligado à estrutura da flavona.

Tabela 8 – Dados de RMN ^1H a 300 MHz e ^{13}C a 100 MHz em CD_3OD da S_3 .

Aglicona	^{13}C	^1H
2	162,8	—
3	109,9	6,62 (s)
4	183,9	—
5	103,4	7,89 (s)
6	*NO	—
7	162,7* ^{NO}	—
8	104,7	—
9	146,2	—
10	123,7	—
1'	121,8* ^{NO}	—
2'	130,1	8,01 (d, J=8,4 Hz)
3'	117,0	6,93 (d, J=8,1 Hz)
4'	159,9	—
5'	117,0	6,93 (d, J=8,1 Hz)
6'	130,1	8,01 d, J=8,4 Hz)
Açúcar A		
1''	78,8	3,10 a 4,00
2''	72,3	3,10 a 4,00
3''	77,6	3,10 a 4,00
4''	73,9	3,10 a 4,00
5''	82,8	3,10 a 4,00
6''	61,2	3,10 a 4,00
Açúcar B		
1'''	79,2	3,10 a 4,00
2'''	72,3	3,10 a 4,00
3'''	77,5	3,10 a 4,00
4'''	73,9	3,10 a 4,00
5'''	83,0	3,10 a 4,00
6'''	63,1	3,10 a 4,00

*Valores não observados e assinalados com base em SILVA, (2000).

A análise dos espectros de RMN de ^{13}C (Figuras 24, 25, 26 e Tabela 8), indicam que a estrutura apresenta uma unidade básica de flavona C_{15} , juntamente com duas unidades de glicose, uma vez que se observa pelo experimento de DEPT (Figura 27), a presença de dois CH_2 carbinólicos típicos de grupo β -glucosila, sendo que, provavelmente, devem estar ligados diretamente a carbono aromático, uma vez que não se observa sinal de carbono acetálico no espectro de RMN ^{13}C .

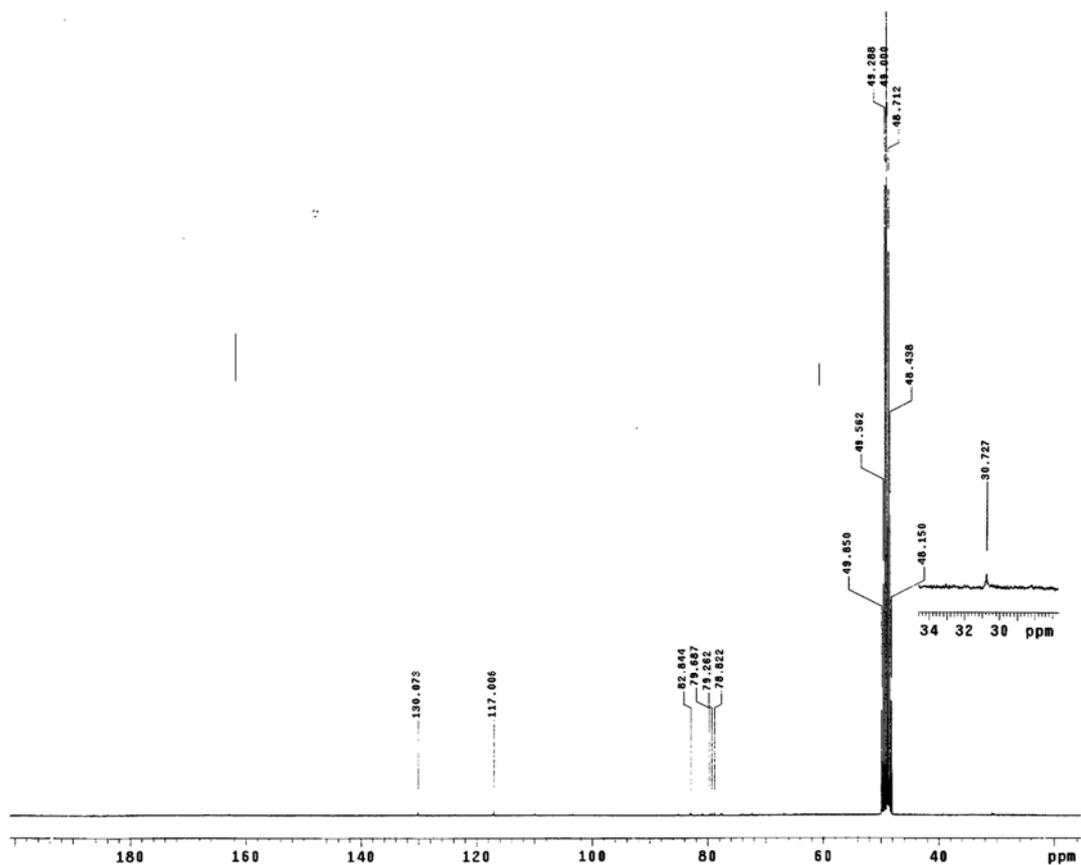


Figura 24- Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz em solvente CD_3OD da S_3 .

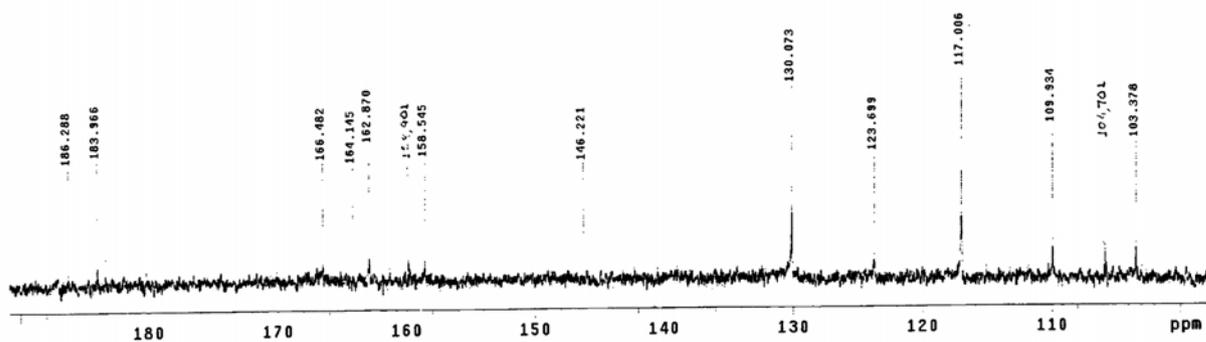


Figura 25 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz em solvente CD_3OD da S_3 .

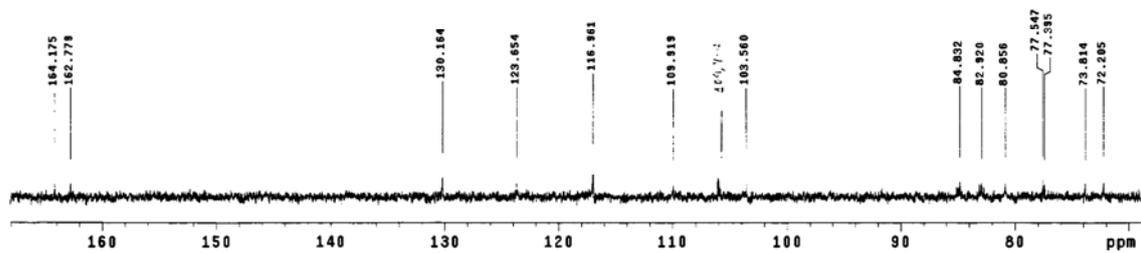
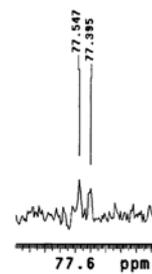
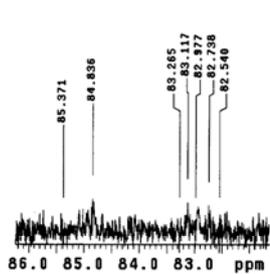
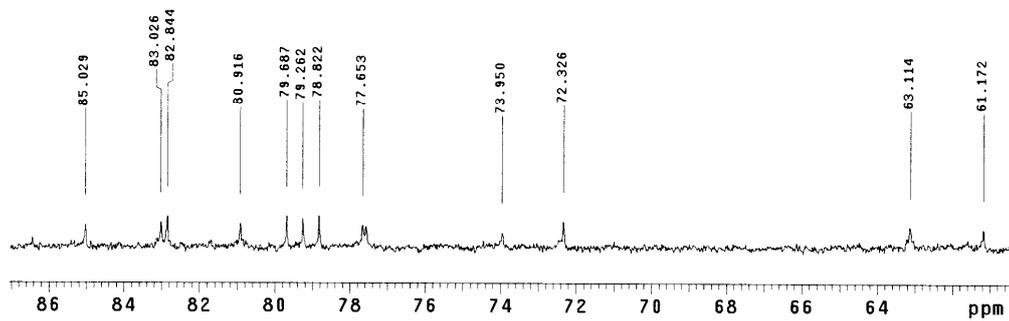


Figura 26– Expansões do espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz em solvente CD_3OD da S_3 .

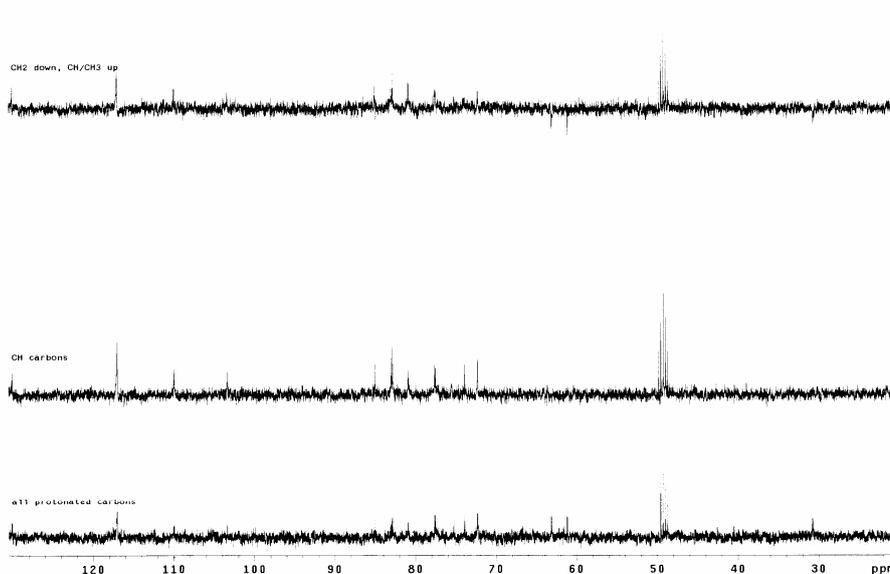


Figura 27 – Espectro de DEPT em CD₃OD da S₃.

Segundo a biossíntese dos flavonóides (DEWIK, 1997), as posições 7 e 4' são normalmente oxidadas portanto, as unidades de açúcar poderão estar ligadas nas posições 6 e 8.

Com base em todos os dados espectrais e por comparação com dados da literatura (SILVA, 2000), pode-se sugerir a estrutura da Figura 28 para S₃, como sendo a 7,4' –dihidróxi- 6,8, β- glucopiranosil-flavona.

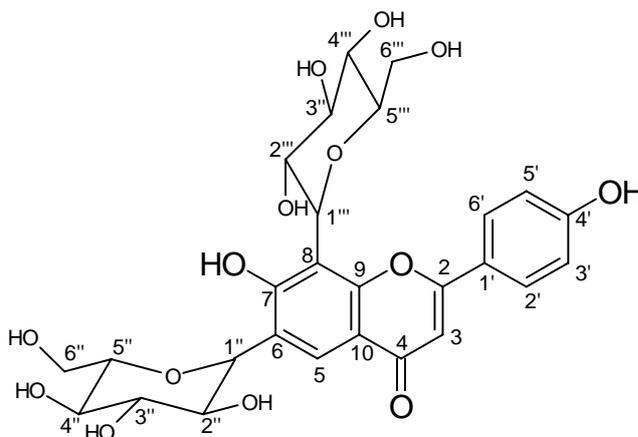


Figura 28– Estrutura da flavona sugerida para a substância S₃.

4. 5. Apresentação das substâncias isoladas

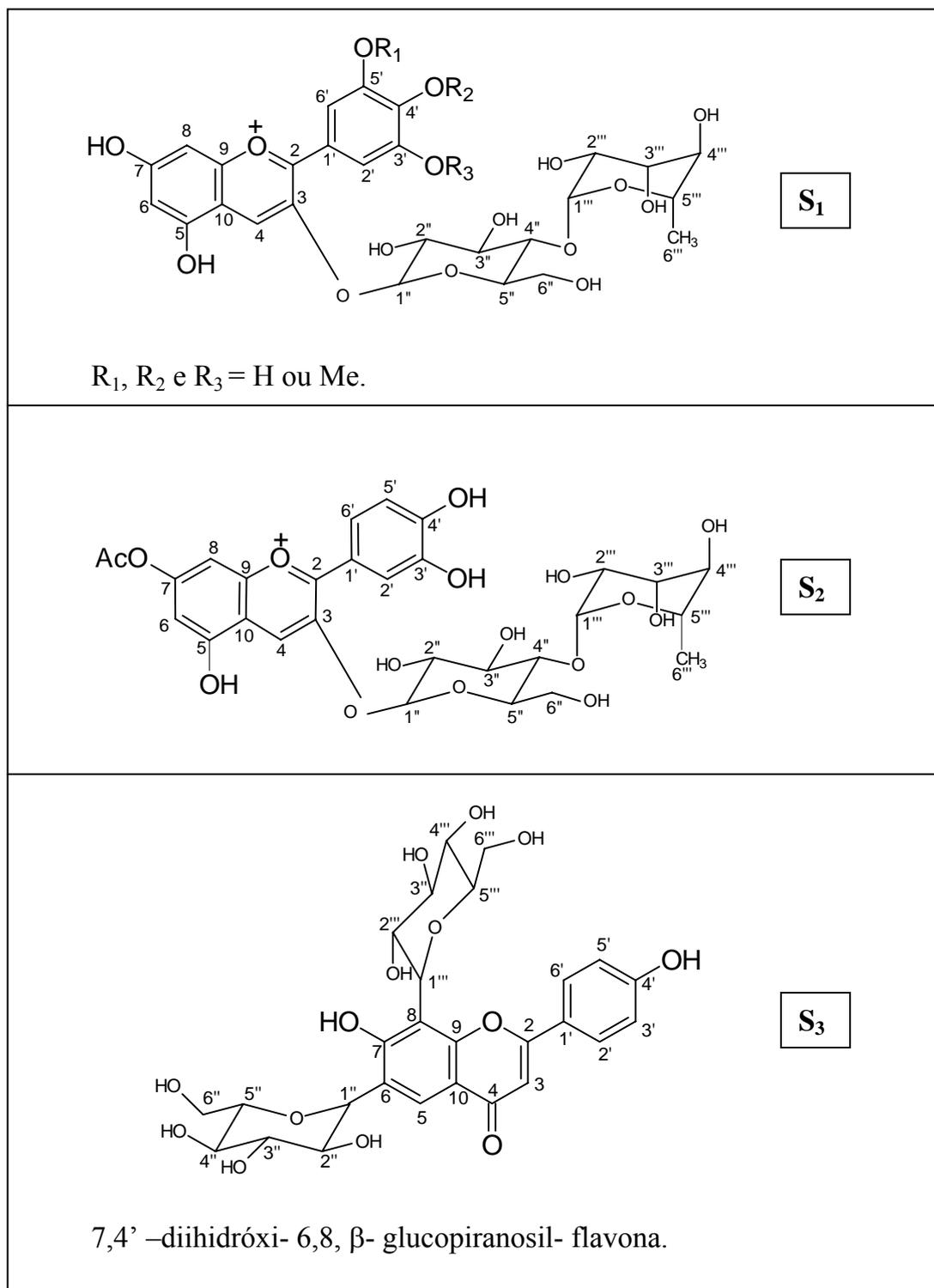


Figura 29 – Estruturas químicas das substâncias S₁, S₂ e S₃.

4.6. Avaliação da estabilidade de pigmentos antociânicos extraídos de frutos de bortalha

Os efeitos da luz, temperatura e pH sobre as antocianinas foram estudados por diversos autores, sendo sempre observada uma relação entre esses efeitos e a decomposição dos pigmentos antociânicos (STRINGHETA, 1991 e KUSKOSKI, 2000b).

4.6.1. Efeito da luz

Avaliando-se a estabilidade das antocianinas extraídas de bortalha observar-se (Figuras 30 e 31) que o pH tem uma grande influência sobre a estabilidade do pigmento antociânico, tanto na presença como na ausência de luz. O pigmento foi mais estável nos maiores valores de pH, ou seja, a menor estabilidade do pigmento foi observada em pH 4,0, e a maior estabilidade ocorreu, igualmente, em pH 5,0 e 6,0. Este fato é muito relevante do ponto de vista de aplicabilidade do corante pelas indústrias de alimento, pois a maioria dos alimentos encontram-se na faixa de pH maior que 4,0. Esse resultado não era esperado, pois segundo dados de literatura para antocianinas, estas são dependentes de pH, mas quanto menor o pH melhor a sua estabilidade (FRANCIS 1992, JACKMAN e SMITH 1996).

Segundo BROUILLARD (1982), a coloração das antocianinas varia de acordo com o pH do meio. Em meio aquoso, quatro espécies de antocianinas existem em equilíbrio: cátion flavilium, base carbinol, base quinoidal e chalcona. Na forma de cátion flavilium, em meio ácido, as antocianinas possuem coloração vermelha e são consideradas estáveis (FRANCIS, 1992). As formas pseudo base carbinol e chalcona são incolores, e predominam em pH neutro ou ligeiramente ácido (WONG, 1995). Porém existem exceções como é o caso da *Trandescantia pallida*, na qual foi identificada a cianidina 3,5,3'- triglicosídeo acilada com 3 moléculas de ácido ferúlico, cuja estabilidade foi estudada por (SHI et al., 1992), apresentando maior estabilidade em pH 5,5.

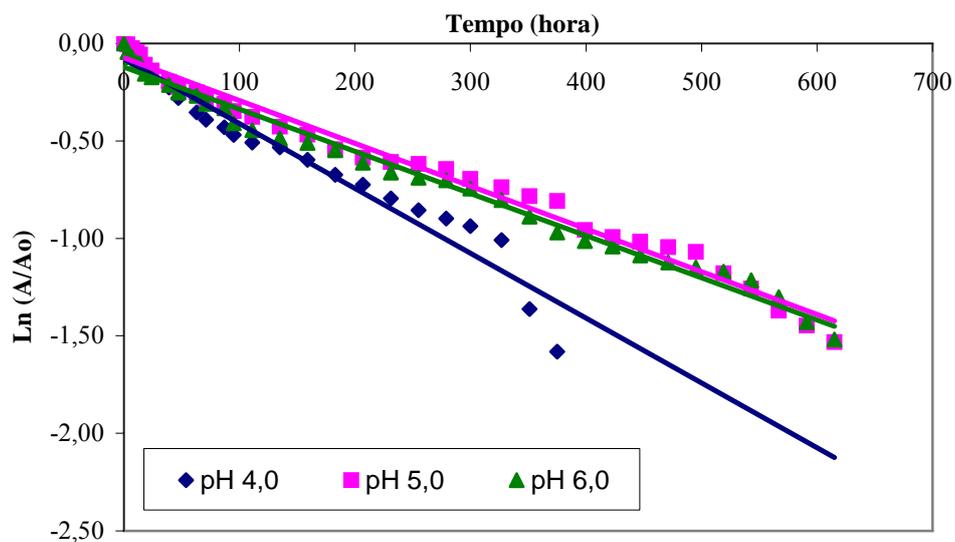


Figura 30 – Curvas de degradação de extratos de bertalha ao longo do tempo, em sistemas tampões (pH 4,0; 5,0 e 6,0), na presença de luz, à temperatura ambiente ($25^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$).

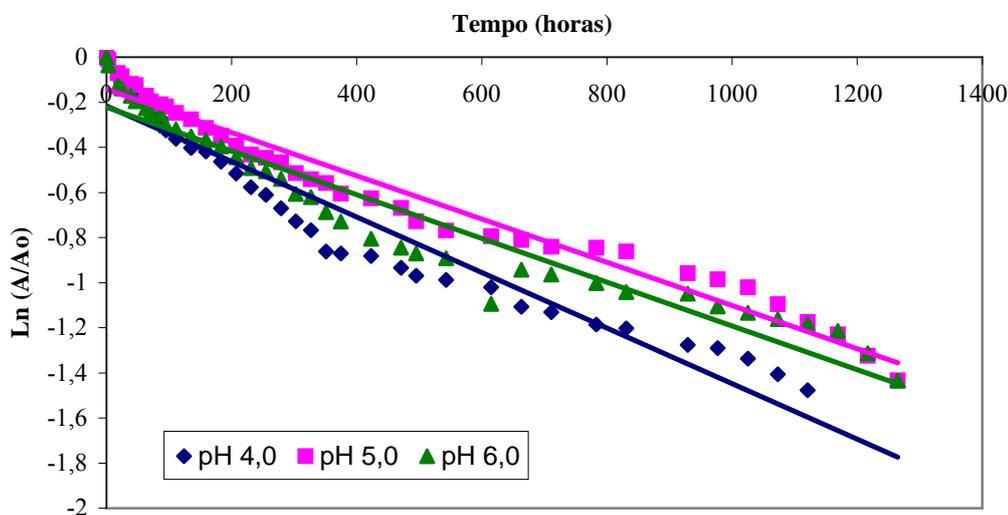


Figura 31 – Curvas de degradação de extratos de bertalha, ao longo do tempo, em sistemas tampões (pH 4,0; 5,0 e 6,0), na ausência de luz, à temperatura ambiente ($25^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$).

Comparando-se os valores da Tabela 9, observa-se que no sistema claro e em pH 4,0 a constante de degradação (K) foi de $3,3 \times 10^{-3}$ e o tempo de meia vida

de $t_{1/2} = 210,0$ h . Por outro lado, no sistema escuro a constante de degradação passou para $1,2 \times 10^{-3}$ e o tempo de meia vida aumentou para 577,50 horas.

Tabela 9 – Valores das constantes de degradação k (h^{-1}) e o tempo de meia vida $t_{1/2}$ (h) obtidos ao longo do tempo, em sistemas tampões (pH 4,0, 5,0 e 6,0), na ausência e presença de luz, à temperatura ambiente ($25^{\circ} \pm 1^{\circ}C$)

SISTEMA	pH	k (h^{-1})	R^2	$t_{1/2}$ (h)
LUZ	4,0	0,0033	0,9565	210,00
	5,0	0,0022	0,9846	315,00
	6,0	0,0022	0,9871	315,00
ESCURO	4,0	0,0012	0,9316	577,50
	5,0	0,0010	0,9659	693,00
	6,0	0,0010	0,9272	693,00

Quando se utilizou pH 5,0 e 6,0, as amostras submetidas ao sistema claro alcançaram um tempo de meia vida de 315,0 horas e constante de velocidade de degradação de $2,2 \times 10^{-3}$, enquanto que no sistema escuro a constante de degradação foi de $1,0 \times 10^{-3}$ e o tempo de meia vida foi de 693,0 horas. Verificou-se uma profunda interferência da luz na cinética de decomposição das antocianinas presentes nas amostras no claro, em comparação com aquelas colocadas ao abrigo da luz, o que é facilmente comprovado pelos elevados valores obtidos por meio da relação entre $t_{1/2}$ da luz e o $t_{1/2}$ no escuro.

Analisando os valores de R^2 contidos na Tabela 9, observa-se que a equação de regressão linear de \ln (Absorvância) se ajustou perfeitamente aos dados obtidos no experimento e que a degradação do pigmento realmente é representada por uma reação de primeira ordem, já que os valores de R^2 se encontram bastante próximos de 1,0 o que valida os resultados e conclusões obtidos neste experimento. Esses resultados estão de acordo com a literatura que relata efeito deletério da luz sobre pigmentos antociânicos (MARKAKIS, 1982).

Comparando-se estes valores com os resultados obtidos por (SILVA, 1996) para maria preta (*Solanum americanum*, Mil), realizado em pH 4,0, na presença

e ausência de luz, onde os resultados foram $t_{1/2} = 4,78$ dias (114,72 horas) e $t_{1/2} = 12,16$ dias (291,84 horas) respectivamente, pode-se concluir que os resultados apresentados nesse trabalho estão superiores aos valores apresentado por (SILVA 1996), nas mesmas condições. Os resultados aqui obtidos mostram que o corante de bertalha apresenta uma boa estabilidade e que por isso pode ser aplicado em alimentos, constituindo uma promissora fonte de corante natural.

4.6.2.Efeito da temperatura

Os resultados ilustrados nas Figuras 32 e 33 permitem observar o efeito drástico da temperatura sobre a degradação do pigmento antociânico em todos os valores de pHs (4,0; 5,0 e 6,0), tanto a 40°C como a 60°C, na presença de luz. O sistema mais estável foi em pH 5,0 com 7,46 horas, seguido do pH 6,0 com 7,18 horas e pH 4,0 com 6,01 horas.

Pelos resultados apresentados na Tabela 10, observa-se que as constantes de velocidade de degradação (K) das antocianinas na presença de luz, a 40°C, foram $1,15 \times 10^{-1}$, $9,28 \times 10^{-2}$ e $9,64 \times 10^{-2}$ em pH 4,0; 5,0 e 6,0 respectivamente. Quando a temperatura foi elevada para 60 °C, o valor de K também aumentou para $3,32 \times 10^{-1}$, $2,76 \times 10^{-1}$ e $2,55 \times 10^{-1}$, em pH 4,0; 5,0 e 6,0, respectivamente.

De forma geral, observou-se que a temperatura afeta sensivelmente a estabilidade das antocianinas. Os resultados indicaram claramente que, à medida que aumenta a temperatura, o pigmento sofre maior degradação e em menor tempo, conforme pode ser observado na Tabela 10.

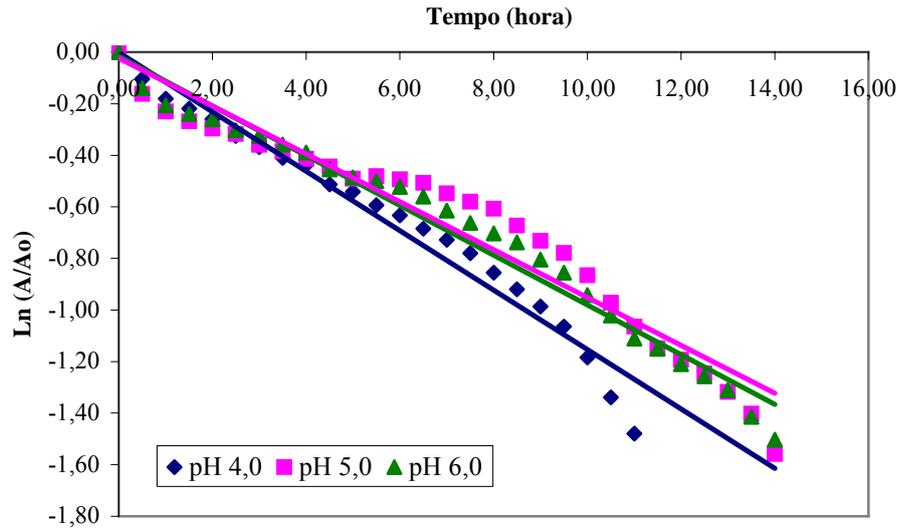


Figura 32 – Curvas de degradação de extratos de bertaalha ao longo do tempo, em sistemas tampões (pH 4,0, 5,0 e 6,0), na presença de luz, à temperatura de 40°C.

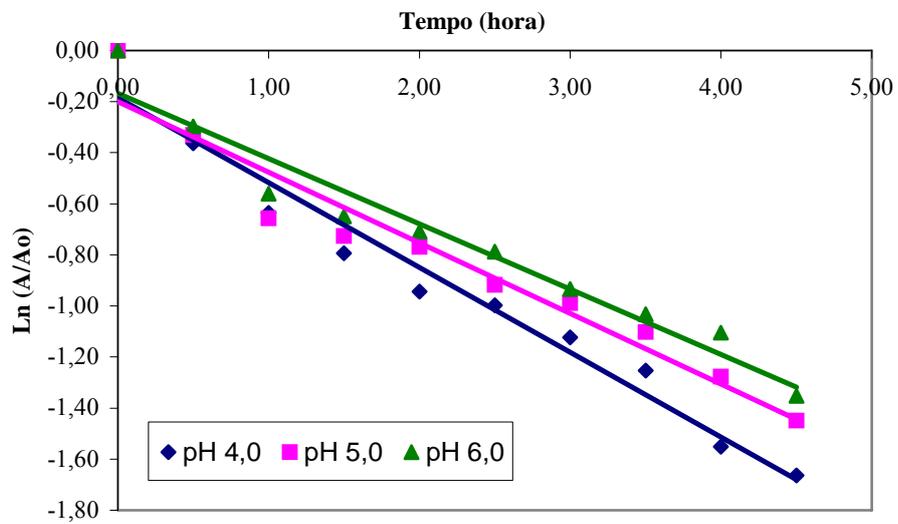


Figura 33 – Curvas de degradação de extratos de bertaalha ao longo do tempo, em sistemas tampões (pH 4,0; 5,0 e 6,0), na presença de luz, à temperatura de 60°C.

Tabela 10 – Valores das constantes de degradação k (h^{-1}) e o tempo de meia vida $t_{1/2}$ (h) obtidos ao longo do tempo, em sistemas tampões (pH 4,0, 5,0 e 6,0), na presença de luz, à temperatura de 40 e 60°C

SISTEMA	pH	k (h^{-1})	R^2	$t_{1/2}$ (h)
40 °C	4,0	0,1152	0,9684	6,01
	5,0	0,0928	0,9389	7,46
	6,0	0,0964	0,9758	7,18
60 °C	4,0	0,3324	0,9645	2,08
	5,0	0,2766	0,9445	2,50
	6,0	0,2559	0,9527	2,70

4. 7. Estabilidade das substâncias S_1 e S_2 isoladas do pigmento de extrato bruto de bertalha por CLAE.

Os valores das constantes de degradação e o tempo de meia vida obtidos para as substâncias S_1 e S_2 purificadas, assim como também o monitoramento, por CLAE, da degradação destas substâncias estão contidos na Tabela 11 e ilustrados nas Figuras 34, 35 e 36, respectivamente.

O sistema acetronitrila: solução aquosa de ácido fórmico 1,0%, (1:9) foi escolhido, pois possui pH próximo de 2,0 onde há um aumento da espécie AH^+ fortemente colorida das antocianinas.

Comparando-se os valores contidos na Tabela 11, observa-se que a constante de degradação (K) da substância S_1 foi de $1,36 \times 10^{-2}$ e o tempo de meia vida de $t_{1/2} = 50,90$ horas, enquanto que para a substância S_2 foi de $K = 1,70 \times 10^{-2}$ e o tempo de meia vida de 40,76 horas. Esses resultados comprovam a elevada sensibilidade das antocianinas puras quando submetidas à luz, o que leva tais corantes a uma degradação fotoquímica.

Possivelmente a presença de alguns componentes do extrato bruto atuam como agentes que auxiliam na estabilidade das antocianinas presentes. Assim quando esses compostos são retirados da solução por ocasião do isolamento das antocianinas a estabilidade decresce sensivelmente. Esse fato reforça a idéia de que o extrato bruto é mais indicado ao uso como corante natural em alimentos, já que,

além de ser mais estável, esse é requerido em menores quantidades para sua aplicação em alimentos.

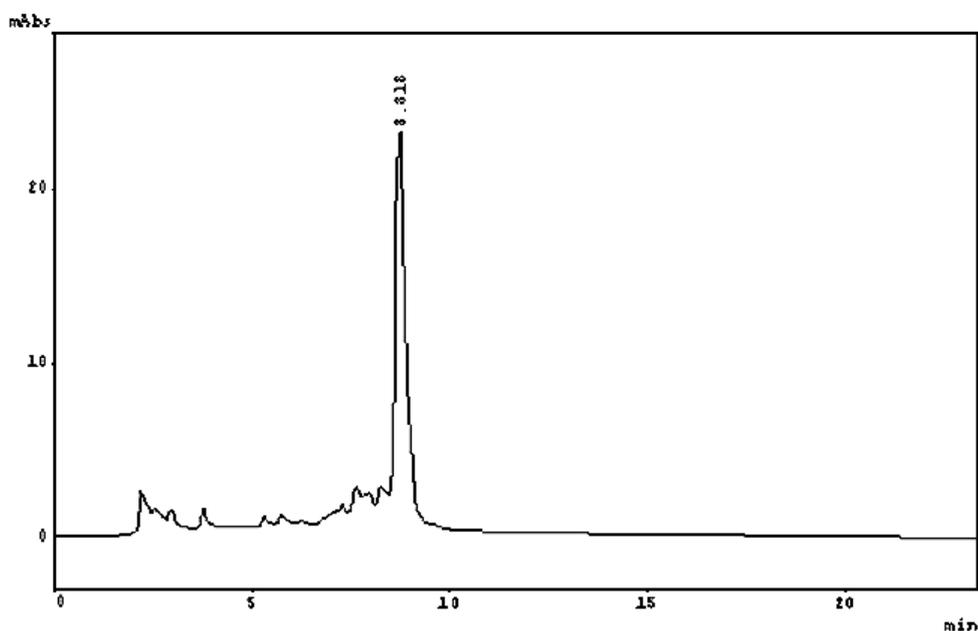


Figura 34 - Perfil cromatográfico obtido por CLAE da S₁ a 275 nm, coluna Phenomenex em acetonitrila: solução aquosa de ácido fórmico 1% (1:9).

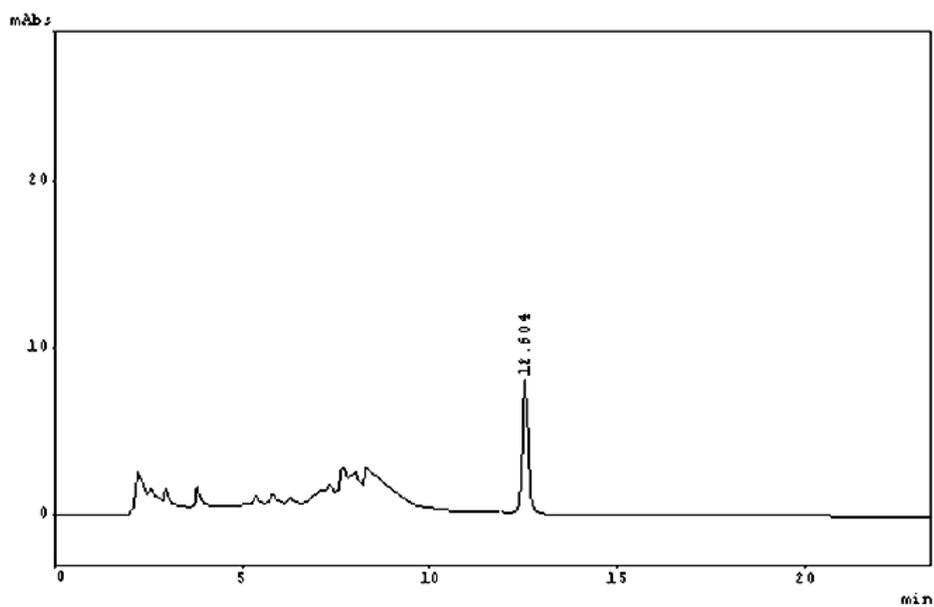


Figura 35 - Perfil cromatográfico obtido por CLAE da fração S₂ a 275 nm, coluna Phenomenex em acetonitrila: solução aquosa de ácido fórmico 1% (1:9).

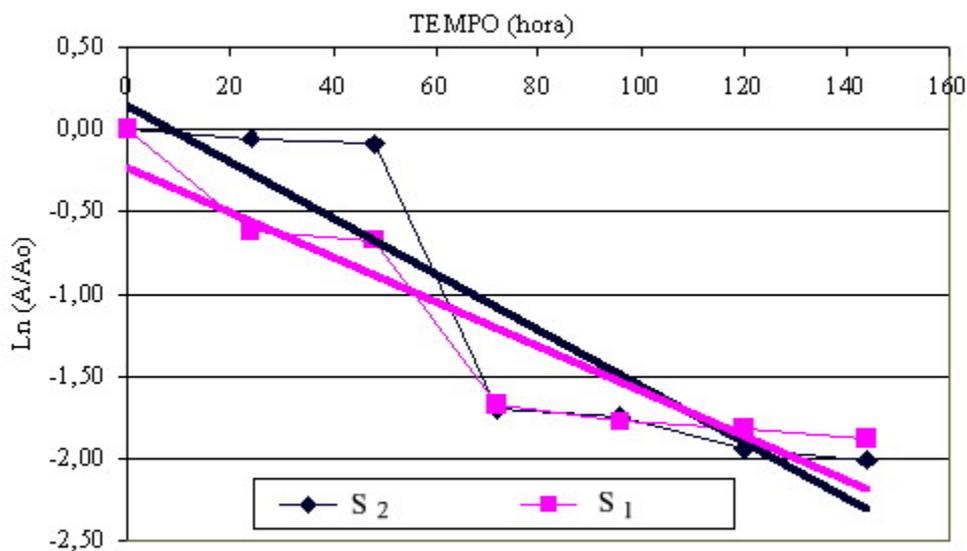


Figura 36 – Curvas de degradação das substâncias S₁ e S₂ extraídas dos frutos de bertalha, em acetronitrila: solução aquosa de ácido fórmico 1% (1:9), na presença de luz, à temperatura de 25°C por CLAE.

Tabela 11 – Valores das constantes de degradação k (h^{-1}) e o tempo de meia vida $t_{1/2}$ (h) obtidos ao longo do tempo, das substâncias S₁ e S₂ extraídas dos frutos de bertalha, em acetronitrila: solução aquosa de ácido fórmico 1% (1:9), na presença de luz, à temperatura de 25 °C

Sistema	k (h^{-1})	R^2	$t_{1/2}$ (h)
S ₁	$1,36 \times 10^{-2}$	0,8631	50,90
S ₂	$1,70 \times 10^{-2}$	0,8328	40,76

5. RESUMO E CONCLUSÕES

O isolamento das substâncias por CLAE foi considerado um excelente método, revelando uma mistura complexa de 15 substâncias.

A utilização de métodos espectrofotométricos UV-Vis, técnicas cromatográficas em papel e reações químicas específicas para antocianinas auxiliaram a confirmar as estruturas das substâncias isoladas.

Os espectros de RMN de ^1H , ^{13}C , DEPT e HSQC permitiram a caracterização das substâncias S_1 como malvidina, da S_2 como cianidina e da S_3 como 7,4'-dihidroxi-6,8, β glucopiranosil-flavona.

A utilização da técnica da CLAE ajudou a estabelecer o percentual de rendimento das antocianinas S_1 e S_2 após purificação como sendo 3,05% e 2,11%, respectivamente.

O extrato da bortalha em sistemas tampões pH 4,0; 5,0 e 6,0 apresentou uma profunda interferência da luz na cinética de degradação das antocianinas presentes nas amostras no claro em comparação com aquelas colocadas ao abrigo da luz.

As temperaturas de 40°C e 60°C afetaram sensivelmente a estabilidade das antocianinas, observa-se que a medida que a temperatura aumenta, também aumenta a degradação do pigmento.

O extrato manteve-se mais estável em pH 5 e 6 que em pH 4,0, diferenciando-se das demais antocianinas que são estáveis em pH abaixo de 3,0, possibilitando assim a sua aplicação como corante natural em alimentos.

As substâncias isoladas apresentam baixa estabilidade, fato que reforça a idéia de que as antocianinas não devem ser comercializadas puras e sim como extrato bruto.

As antocianinas de bortalha podem ser consideradas estáveis, quando comparada com outras antocianinas, podendo ser potencialmente usadas como corante natural.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, J. B. 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. 1972.
- ADAMS, J. B. Colour stability of red fruits. *Food Manuf.*, v. 41, p. 19-20, 1973a.
- ADAMS, J. B. Thermal degradation of antocianins with particular reference to the 3 - glycosides of cyanidin, In: acidified aqueous solution at 100°C. *J. Sci. Food Agric.*, v. 24, p. 746-762. 1973 b.
- ALBACH, D. C.; GRAYER, R. J.; JENSEN, S. R.; ÖZGÖKEE, F.; VEITCH, N. C. Acylated flavone glycosides from Veronica. *Phytochemistry*, v. 64, p 1295-1301. 2003.
- ANDERSEN, O. M., FRANCIS, G. W. Simultaneous analysis of anthocyanins and anthocyanidins on cellulose thin layers. *Journal of Chromatography*, v .318, p. 450-454, 1985.
- ANGELUCCI, E. Corantes para alimentos. In: Seminário de Corantes Naturais para Alimentos, 2; Simpósio Internacional de Urucum, 1, 1991, Campinas, SP. *Anais...* Campinas, SP: ITAL, p.3-4. 1991.
- ASEN, S.; NORRIS, K. H.; STEWAET, R. N. Effect of ph and concentration of the anthocyanin-flavonol co-pigment complex on the color of Better Times roses. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, v. 96, p. 770-773. 1971.
- BAILONI, M. A.; BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. Preparação e estabilidade do extrato antociânico das folhas da *Acalipha hispida*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 18, n. 1, p. 21-24, jan/abril. 1998.
- BATISTA, M. A.; SANT'ANA, H. M. P.; CHAVES, J. B. P. Conteúdo de beta-caroteno e provitamina A em hortaliças comercializadas em Viçosa-MG em quatro estações do ano. In: XIV SIMPÓSIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2004, Viçosa-MG. **XIV Simpósio de Iniciação Científica: Pesquisa, Extensão e Desenvolvimento.** 2004. v. 1, p. 616-616.
- BAKKER, J.; BRIDLE, P.; HONDA, T.; KUWANO, H.; SAITO, N.; TERAHARAS, N.; TIMBERLAKE, C. F. Identification of an anthocyanin occurring in some red wines. *Phytochemistry*, v. 44, n. 7, p. 1375-1382. 1997.
- BLOM, H., THOMASSEN, M. S. Kinetic studies on strawberry anthocyanin hydrolysis by a thermostable anthocyanin- β -glycosidase from *Aspergillus niger*. *Food Chemistry*, v. 17, p.157-168, 1985.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Química de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Varela, 1992. 145p.

BRIDLE, P. I.; TIMBERLAKE, C. F. Anthocyanins a natural food colours – selected aspects. **Food Chemistry**, v. 58, p. 1-2. 1997.

BRIDLE, P.; LOEFFLER, T.; TIMBERLAKE, C. F.; SELF, R. Cyanidin-malonylglucoside in *Cichorium intybus*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 12, p.2968-2969. 1984.

BROUILLARD, R. Chemical structure of anthocyanins. In: MARKAKIS P. **Anthocyanins as Food Colors**. New York: Academic Press, 1982. p. 1- 40.

BROUILLARD, R. The in vivo expression of anthocyanin colour in plants. **Phytochem**, v. 22, n. 6, p. 1311-1323. 1983.

CAMAREZ, R. R. B.; KUSKOSKI, E. M.; BRIGHENTE, I. M. C.; FETT R. Estabilidade das antocianinas do cálice de *Hibiscus sabdariffa* L. **Revista Brasileira de Corante Natural**, v. 4, n. 1, p. 67-72. 2000.

CARVALHO, P. R. N. Potencialidade dos corantes naturais. **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, Viçosa, v. 1, n. 1, p. 244-245. 1992.

CHAGAS, C. M. **Avaliação de parâmetros bioquímicos e de aspectos toxicológicos de antocianina em coelhos Nova Zelândia**.). 2002, 134f. Tese (Doutorado em Ciência e Tec. de Alimentos) - Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

CLYDESDALE, F. M. Color as a factor in food choice. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 33, p. 83. 1993.

CONSTANT, P. B. L. **Extração caracterização e aplicação de antocianinas de açaí (*Euterpe oleracea* M.)** 2003, 183f. Tese (Doutorado em Ciência e Tec. de Alimentos) - Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, IBDF, 1984, v. 1.

DAMASCENO, V. Guerra aos sintéticos ressuscita os naturais. **Química e derivados**, v. 24, n. 250, p. 10-21, 1988.

DELGADO-VARGAS, F.; JIMÉNEZ, A. R.; PAREDES-LÓPEZ, O. Natural pigments: Carotenoids, anthocyanins, and betalains- Characteristics, biosynthesis,

processing, and stability. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, n. 3, p. 173-289. 2000.

DEWIK, P. M. **Medicinal natural products**. A Byosintese Approach, 1997. 466p.

DONDERO, M. L., BADILLA, M. J. Obtencion de Antocianinas a partir de orujo de uva y su aplicacion en alimentos (1). **Revista Chilena de Nutrición**, v. 11, n. 2, p. 33-40. 1983.

DU, Q.; JERZ, G.; WINTERHALTER, P. Isolation of two anthocyanin sambubiosides from bilberry (*Vaccinium myrtillus*) by high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1045, p. 59-63. 2004.

FERREIRA, V. L. P. A cor no controle de qualidade. In: Seminário de Corantes Naturais para Alimentos, 2; Simpósio Internacional de Urucum, 1, 1991, Campinas, SP. **Anais...** Campinas, SP: ITAL. p. 45-51. 1991.

FRANCIS, F. J. A new group of food colorants. Treds in **Food Science & Technology**, Cambridge, v. 3, p. 27-30. 1992.

FRANCIS, F. J. Analysis of anthocyanins. In: MARKAKIS, P. (Ed.). **Anthocyanins as food color**. New York: Academic Press, 1982. p.181-207.

FRANCIS, F. J. Food colorants: Anthocyanins. CRC critical reviews. **Food Science and Nutrition**, v. 28, n. 4, p. 273-314. 1989.

FORNI, E.; POLESELLO, A.; TORREGGIANI, D. Changes in anthocyanins in cherries (*Prunus avium*) during osmodehydration, pasteurization and storage. **Food Chemistry**, v. 48, p. 295-299, 1993.

FULEKI, T., FRANCIS, F. J. Quantitative methods for Anthocyanins. I. Extraction and Determination of Total Anthocyanin in Cranberries. **Journal of Food Science**, v. 33, p. 72-77. 1968a.

FULEKI, T., FRANCIS, F. J. Quantitative methods for Anthocyanins. 2. Determination of total anthocyanins and degradation index for cranberry juice. **Journal of Food Science**, v. 33, p. 78-83. 1968b.

GALORI, S.; BILIA, A. R.; BERGONZI, M. C.; BARBOSA, W. L. R.; VINCIERI, F. F. Polyphenolic constituents of fruit pulp of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí palm) **Chromatographia**, v. 59, p. 739-743. 2004.

GAO, L.; MAZZA, O. Extration of anthocyanin pigments from purple sunflower hulls. **Journal of Food Science**, v 61, n. 3, p. 600-603. 1996.

GAULEJAC, N. S. C.; GLORIES, Y.; VIVAS, N. Free radical effect of anthocyanins in red wines. **Food Research International**, v. 32, p. 327-333. 1999.

GRISEBACK, H. Biosynthesis of anthocyanins. In: MARKAKIS, P. (ed.). **Anthocyanins as Food Colors**. New York: Academic Press, 1982. 69-92.

GUEDES, M. C. **Influência do anel B na estabilidade das antocianidinas e antocianinas**. 1993, 126f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos)- Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

GUIMARÃES, I. S. S. Corantes naturais vermelhos e amarelos. In: Simpósio sobre aditivos para alimentos, 1, 1987, Campinas. **Resumos...**Campinas: ITAL, p.21-25. 1987.

HARBORNE, J. B. Plant polyphenols - XI. The structure of acylated anthocyanins. **Phytochemistry**, v. 3, p. 151-160. 1964.

HARBORNE, J. B. **Comparative biochemistry of the flavonoids**. London: Academic Press, 1967. p.383.

HENDRY, G. A. F.; HOUGHTON, J. D. **Natural Food Colorants**. London: Blackie Academic, 1996. p. 1-103.

HOSMINO, I.; Matsumoto, U.; GOTO, T.; HARADA, N. Evidence for self-association of anthocyanin IV. PMR spectroscopic evidence for the vertical stacking of anthocyanin molecules. **Tetrahedron Letters**, v. 23, p. 433-437. 1982.

HRAZDINA, G. **Anthocyanins**. In: Harborne, J.B., Mabry, T. (Ed). The flavonoids, advances in research. Chapman-Hall, 1982. p. 135-188.

HUTCHINGS, J. B **Food Colour and Apperance**. In: Chemistry of Food Colour London: Blackie Academic, 1994. 513p.

IADEROZA, M. ; BALDINI, V. L. S.; DRAETTA, I. S.; BOVI, M. L. A. Anthocyanins from fruits of açai (*Euterpe oleracea*, Mart) and juçara (*Euterpe edulis*, Mart). **Trop. Sci.**, v. 32, p. 41-46, 1992.

IVANISSEVICH, A.; MASSARANI, L. Urucum, uma cor brasileira. **Ciência Hoje**, v. 2, n. 53, p. 74-75. 1989.

JACKMAN, R.L.; SMITH, J.L. Anthocyanins and betalains. In: Hendry, G.A.F. and HOUGHTON, J.D. **Natural Food Colorants**. London: Blackie Academic, 1996. p. 244-296.

JURD, L. **Some advances in the chemistry of anthocyanin-type plant pigments.** In: *The Chemistry of Plant Pigments*. Chichester: Academic Press, 1972. p. 123-142.

KALLIO, H.; PALLASAHO, S.; KARPA, J.; LINKO, R. R. Comparison of the half-lives of the anthocyanins in the juice of crowberry, *Empetrum nigrum*. **Journal of Food Science**, v. 51, n. 2, p. 408-410. 1986.

KEARSLEY, M. W.; RODRIGUEZ, N. The stability and use of natural colours in foods. Anthocyanin, β -carotene and riboflavin. **Journal of Food Technology**, v. 16, p. 421-431. 1981.

KUSKOSKI, E. M. **Extração, identificação e estabilidade de pigmentos dos frutos de baguaçu (*Eugenia umbelliflora*, Berg.)**. 2000a, 113f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tec. de Alimentos) - Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

KUSKOSKI, E. M.; MARQUES, P. T.; FETT R. Estudo comparativo da estabilidade das antocianinas do baguaçu, jambolão e da uva. **Revista Brasileira de Corante Natural**, v. 4, n. 1, p. 73-76. 2000b.

LEA, a. G. H. HPLC of natural pigments in foodstuffs. In: MACRAE, R. **HPLC in Food Analysis**. London: Academic Press, 1988. p. 277-333.

LEE, H.S.; HONG, V. Review: Chromatographic analysis of anthocyanins. **Journal of Chromatography**, v. 624, p. 221-234. 1992.

MARKAKIS, P. Analysis of anthocyanins. In: (ed). **Anthocyanins as food colors**. New York: Academic Press, 1982. p. 163-178.

MATAIX, E.; LUQUE de CASTRO, M. D. Determination of anthocyanins in wine based on flow-injection, liquid-solid extraction, continuous evaporation and high-performance liquid chromatography-photometric detection. **Journal of chromatography A**, v. 910, p. 255-263. 2001.

MAZZA, G. Anthocyanins in grapes and grape products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 35, n. 4, p. 341-71. 1995.

MAZZA, G. Functional foods-biochemistry & processing aspects agriculture and agri-food. Canadá. **Technomic publishing Company, Inc.** 1998. 460p.

MAZZA, G., BROUILLARD, R. Color stability and structural transformations of cyanidin 3,5-diglucoside and four 3-deoxyanthocyanins in aqueous solutions. **Journal Agric.Chem., ACS.** , v. 35, n. 3, p.422-426. 1987.

MINIATI, E., DAMIANI, P., MAZZA, G. Copigmentation and self-association of anthocyanins in food model systems. **Ital. J. Food Sci.**, n. 2, p. 109-116. 1992.

MORAZZONI, P.; MAGISTGRET, M. J. Effects of *vacconium myrtillus* anthocyanosides on prostacyclin-like activity in rat arterial tissue. **Fitoterapia**, v. 57, n. 1, p. 11-14. 1986.

MULLEN, W.; MICHAEL, E. J.; LEAN, A. C. Rapid characterization of anthocyanins in red raspberry by high-performance liquid chromatography coupled to single quadrupole mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 966, p. 63-70. 2002.

ORDAZ-GALINDO, A.; WESCHE-EBELING, P.; WROLSTAD, R. E.; RODRIGUEZ_SAONA, L.; ARGAIZ-JAMET, A. Purification and identification of Capulin (*Prunus serotina* Ehrh) anthocyanins. **Food Chemistry**, v. 65, p. 201-206. 1999.

OSAWA, Y. Copigmentation of anthocyanins. In: MARKAKIS, P. (Ed.). **Anthocyanins as food colors**. New York: Academic Press, 1982. p.41-65.

OSZMIANSKI, J. C., SAPIS, J. C. Anthocyanins in fruits of *Aronia melanocarpa* (Chokeberry). **Journal of Food Science**, v. 53, n. 4, p. 1241-1242, 1988.

OTT, D. B. **Manual de laboratório de ciência de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1992. p. 168-174.

OZELA, E. F. **Extração e identificação da estrutura de um pigmento de fruto de Bertalha (*Basella rubra*, L.)**. 1996, 56f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tec. de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

OZELA, E. F.; STRINGHETA, P. C. Antocianinas em vegetais comestíveis. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 19, 2004, Recife-PE. **XIX CBCTA...** Recife-PE, 2004. CD-ROM.

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

PENG, Z. F.; STRACK, D.; BAUMERT, A.; SUBRAMANIAM, R.; GOH, N. K.; CHIA, T. F.; TAN, S. N.; CHIA, L. S. Antioxidant flavonoids from leaves of *Polygonum hydropiper* L. **PHYTOCHEMISTRY**, v. 62, p. 219-228.2003.

RAMOS, L. A. ; LUPETTI, K. O., CARVALHO, E. T. G.; FATIBELLO-FILHO, O. Utilização do extrato bruto de frutos de *Solanum nigrum* L. no ensino de química. **Eclética Química**, v. 25. 2000.

REVILLA, E.; RYAN, J. M.; MARTIN-ORTEGA, G. Comparación of several produces used for the extraction of anthocyanins from red grapes. **J. Agric. Chem.**, v. 46, p. 4592-4597. 1998.

SCHEFFELDT, P.; HRAZDINA, G. Co-pigmentation of anthocyanins under physiological condition. **J. Food Sci.**, v.43, p. 517-520. 1978.

SHI, Z.; LIN, M.; FRANCIS, F. J. Stability of anthocyanins from *Tradescantia pallida*. **Journal of Food Science**, v.57, n. 1, p. 758-760. 1992.

SHRIKHANDE, A. J. Anthocyanins in foods. **CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 7, p. 193-217, 1976.

SILVA, da M. N. **Constituintes Químicos de *Ficus aripuannensis* (Moraceae)**. 2000, 100f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Pará, Belém.

SILVA, S.R. **Extração e estabilidade de pigmentos antociânicos de frutos de Maria- Pretinha (*Solanum americanum*, Mill.)**. 1996, 76f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tec. de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

STRACK, D., WRAY, V. Anthocyanins. In: **Methods in plant biochemistry**. Vol. 1, Academic Press, 1989. p. 325-353.

STRINGHETA, P. C. **Identificação da estrutura e estudo da estabilidade das antocianinas extraídas da inflorescência de capim gordura (*Melinis minutiflora*, Pal de Beauv)**. Campinas: UNICAMP, 1991, 138p. Tese (Doutorado em Ciência e Tec. de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas. 1991.

SUYAMA, K.; TAMATE, M.; ADACHI, S. Colour stability of shisonin, red pigment of a Perilla (*Perilla ocimoides* L. var. *crispa* Benth). **Food Chemistry**, v. 10, p. 69-77. 1983.

TAKEDA, K.; ENOKI, S.; HARBORNE, J. B. ; EAGLES, J. Malonated anthocyanins in malvaceaea: malonylmalvin from *Malva sylvestris*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 2, p. 499-500. 1989.

TIAM, G.; ZHANG, U.; ZANG, T.; YANG, F.; ITO, Y. Separation of flavonoids from the seeds of *Vernonia anthelmintica* willd by higt-speed counter-current chromatography. **Journal de Chromatography A**, v, 1049, p. 219-222. 2004.

TIMBERLAKE, C. F., BRIDLE, P. Anthocyanins. In: WALFORD, J. **Development in food colours**. London: Applied Science, 1980. p. 151-187.

TIMBERLAKE, C. F.; BRIDLE, P. Distribution of anthocyanins in food plants. In: MARKAKIS, P. **Anthocyanins as food colors**. New York: Academic Press, 1982. p. 126-162.

TOIL, R. D.; VOLSTEDT, Y.; APOSTOLIDES, Z. Comparison of the antioxidants content of fruits, vegetables and teas measured as vitamin C equivalents. **Toxicology**. p. 63-69. 2001.

TSUDA, T.; HORIO, F.; OSAWA, T. Absorption and metabolism of cyaniding 3-O- β -D-glucoside in rats. **FEBS Letters**, v. 449, p. 179-182. 1999.

VON ELBE, J. H.; SCHWARTZ, S. J. Colorants . In ; FENEMA, O. R. **Food Chemistry**. 3 ed. New York: Marcel Dekker. 1996. p. 651-722.

WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R. L. Oxigen radical absorbing capacity of anthocyanins. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 45, p. 304-309. 1997.

WILEY, R. C., LEE, Y. N., SALADINI, J. J., WYSS, R. C., TOPALIAN, H. H. Efficiency studies of a continuous diffusion apparatus for the recovery of betalaines from the table beet. **Journal of Food Science**, n. 44, p. 208. 1979.

WILLIAMS, M.; HRAZDINA, G. Anthocyanins as food colorants. Effect of pH on the formation of anthocyanin-rutin complexes. **Journal of Food Science**, v. 44, n. 1, p. 66-68. 1979.

WONG, D. W. S. **Química de los alimentos: Mecanismos e teoria**. Zaragoza: Acribia, 1995. p. 164-215.

WROLSTAD, R. E. Anthocyanin pigments: their chemical properties, color characteristics and analysis. In: Simpósio Latino Americano de Ciência de los Alimentos, 4, 2001, Campinas, SP. **Resumos...**Campinas, SP. p. 21. 2001b.

WROLSTAD, R. E. Anthocyanin pigments: their possible health benefits. In: Simpósio Latino Americano de Ciência de los Alimentos, 4, 2001, Campinas, SP. **Resumos...**Campinas, SP. p. 25. 2001a.