

Comparação de métodos para quantificação de antocianinas

Luciana Nascimento Teixeira¹

Paulo César Stringheta¹

Fabiano Alves de Oliveira¹

RESUMO

As antocianinas provavelmente são os mais conhecidos pigmentos naturais. São reconhecidos compostos funcionais capazes de agregar valor à qualidade alimentar de vegetais e alimentos industrializados que podem conter esses pigmentos naturalmente ou adicionados na forma de corantes naturais. Torna-se evidente, portanto, a necessidade de avaliar novas fontes de antocianinas bem como técnicas para quantificá-las com o intuito de conhecer-se seu conteúdo e viabilizar seu emprego como aditivo bioativo. O presente trabalho avaliou dez fontes como matrizes antociânicas potenciais, determinando o seu conteúdo por dois métodos: pH Único e pH Diferencial. Avaliaram-se: casca de berinjela (*Solanum melongena*) e jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba*), polpa de repolho roxo (*Brassica oleraceae*), casca e polpa de sabugueiro (*Sambucus negra*), morango (*Fragaria ssp*), maria-pretinha (*Solanum americanum*), açai (*Euterpe oleracea*), romã (*Punica granatum*), pétalas de hibisco (*Hibiscus rosa-sinensis*) e inflorescência de capim-gordura (*Melinis minutiflora*). Foi verificado que casca de Jabuticaba, pétalas de Hibisco e casca e polpa de Sabugueiro apresentaram maior conteúdo de antocianinas ($p < 0,05$), sendo considerados fontes de elevado teor do pigmento (teor superior a 200 mg/100 g). Os métodos diferiram apenas para a quantificação na casca de jabuticaba. O Método de pH Diferencial mostrou-se mais sensível à quantificação de antocianinas sendo capaz de minimizar ação de interferentes presentes na casca da jabuticaba, principalmente os taninos. Para qualquer uma das demais fontes, o uso de qualquer um dos métodos avaliados não implica em diferença ($p < 0,05$) quanto ao teor de antocianinas e, devido a simplicidade do método, recomenda-se utilizar o método de pH Único.

Palavras-chave: extração, quantificação, antocianina.

ABSTRACT

Comparison of methods for anthocyanin quantification

Anthocyanins are probably the most known natural pigments. They are functional compounds that provide added value to quality of vegetables and industrialized food. It is therefore crucial to assess new sources of anthocyanin as well as techniques to investigate its content and make it into a bioactive additive. The present work evaluated ten potential anthocyanin sources, determining its content by two methods: single pH and Differential pH. The following materials were evaluated: eggplant (*Solanum melongena*) and jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba*) skin, purple cabbage (*Brassica oleraceae*) pulp, skin and pulp of *Sambucus nigra*, strawberry (*Fragaria ssp*), nightshade (*Solanum americanum*), açai (*Euterpe oleracea*), pomegranate (*Punica granatum*), hibiscus (*Hibiscus rosa-sinensis*) petals and molasses grass (*Melinis minutiflora*) inflorescence). Jabuticaba skin, hibiscus petals and sabugueiro skin and pulp showed the highest anthocyanin content (higher than 200mg/ 100g). The methods differed only in the quantification

Recebido para publicação em agosto de 2006 e aprovado em outubro de 2007.

¹ Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Laboratório de Pigmentos Naturais e Secagem, 36570-000, Viçosa, MG, Brasil.
Email: teixeiraln@yahoo.com.br, pstringheta@yahoo.com.br, eng.oliveirafa@yahoo.com.br

of jabuticaba skin. The differential pH method was more efficient in quantifying anthocyanin, minimizing interferents from jabuticaba peel, especially tannin. For any of the other sources, the use of the evaluated methodologies do not imply differences ($p < 0.05$) in the anthocyanin content, and single pH is recommended because of the simplicity of the methodology,

Key words: extraction, quantification, anthocyanin.

INTRODUÇÃO

As antocianinas são compostos da família dos flavonóides e constituem grupo de pigmentos responsáveis por grande parte das cores em flores, frutas, folhas, caules e raízes de plantas (Markakis, 1982). Esses pigmentos conferem diferentes tonalidades de cor, oscilando entre vermelho, laranja e roxo, de acordo com condições intrínsecas, como o pH, encontradas nos vegetais (Brouillard, 1983). A tonalidade vermelho brilhante, por exemplo, é encontrada predominantemente em condições ácidas (Sarni-Manchado *et al.*, 1996). São compostos solúveis em água e sensíveis ao calor (Shahidi & Naczki, 1995) apresentando-se, na maior parte das vezes, glicosadas com açúcares que auxiliam na estabilização da molécula (Francis, 1989).

Além de conferir coloração característica aos vegetais, as antocianinas apresentam propriedades que associam sua ingestão a hábitos saudáveis de alimentação. Falcão *et al.* (2003) cita diversos trabalhos que demonstram que esses pigmentos apresentam atividade anticarcinogênicas (Hagiwara *et al.*, 2001; Kapadia *et al.*, 1997), antioxidantes (Wang *et al.*, 2000; Youdim *et al.*, 2000) e antivirais (Kapadia *et al.*, 1997) que promovem associação destas propriedades aos alimentos que os contém. A citar exemplo, o consumo de derivados de uva, principalmente o suco e o vinho e a farinha desidratada de casca de uva, é comumente relatado como benéfico à saúde pelo poder antioxidante proporcionado. Renaud & de Logeril (1992) demonstraram haver relação inversa entre volume de vinho diário consumido *per capita* e índice de mortalidade por insuficiência cardíaca. Países cujos habitantes são tradicionais consumidores de vinho, como França e Itália, apresentaram de 2 a 4 casos de óbito por insuficiência cardíaca para cada 1000 homens, enquanto nos EUA, Canadá, Nova Zelândia, Austrália e Escócia, países de baixo consumo *per capita* de vinho, esses números ficam entre 8 e 10. Também a berinjela é classificada pelo Ministério da Saúde (1999) como alimento funcional por conter em sua constituição compostos terapêuticos e Reis (2007) relacionam a presença das antocianinas em berinjelas ao poder antioxidante dessa hortaliça.

Nesse contexto, a indústria alimentícia encontra nas antocianinas um importante substituinte aos corantes artificiais, atendendo um público cada vez mais disposto a consumir alimentos isentos de produtos químicos sintéticos, dando preferência ao natural e ao saudável. Além da preferência por parte dos consumidores, restrições legais à utilização de determinados corantes sintéticos, como corantes tipo azo, incentivam pesquisas que avaliam corantes naturais a serem empregados em alimentos.

A aplicação desse pigmento em produtos alimentícios, apesar de difícil devido à baixa estabilidade ao pH, luz, presença endógena de enzimas e à temperatura de processamento e menor poder tintorial, não apresenta nenhum efeito adverso à saúde. Adicionalmente, proporciona coloração viva, especialmente em tons próximos ao vermelho, e se torna de fácil incorporação por serem esses pigmentos hidrossolúveis (Francis, 1982; Constant, 2003; Mallacrida & Motta, 2006). Além das propriedades químicas e sensoriais desejáveis, suas propriedades funcionais contribuem também para a agregação de valor à imagem final do produto (Falcão *et al.* 2007).

São poucas as fontes de antocianinas comercialmente utilizadas. Apesar de existirem aproximadamente 400 tipos de antocianinas (Kong, 2003) presentes em diversas plantas como uva, cereja, morango, amora, maçã, azeitona, figo, marmelo, jabuticaba, cacau, repolho roxo, rabanete, berinjela, feijão, entre outras, (Malacrida & Motta, 2006) poucas delas apresentam-se como fonte comercial desse pigmento. Alguns vegetais, como elderberry (*Sambucus nigra*), aronia (*Aronia melanocarpa*) e black carrot (*Daucus carota*), tiveram algum êxito como fontes de antocianina, porém (Francis, 1999), apenas a uva e o repolho roxo são empregados comercialmente (Constant, 2003).

De acordo com trabalhos citados por Falcão *et al.* (2007), as antocianinas presentes em uvas estão concentradas principalmente na casca, com exceção de poucas variedades cuja polpa também é pigmentada (Bonilla *et al.*, 2003), e apresenta como pigmentos antocianínicos majoritários malvidina-3-glicosídeo, petunidina-3-glicosídeo, cianidina-3-glicosídeo, delphinidina-3-glicosídeo, peonidina-3-glicosídeo (Kelebek *et al.*, 2006; Rizzon *et al.*, 2000), po-

dendo alcançar até 750 mg/100 gramas de fruta madura (Mallacrida & Motta, 2006). O repolho roxo, apesar de conter menor teor de antocianina, média de 175 mg/100 g, apresenta vantagem comercial de ser fonte de baixo valor comercial agregado (Lopes *et al.*, 2006) quando comparado à uva.

Na maioria das frutas e hortaliças, os pigmentos encontram-se localizados em células próximas à superfície, o que permite que eles atuem como filtro a radiações ultravioleta nas folhas, melhorem e regulem a taxa de fotossíntese (Mazza & Miniati, 1993). Dessa maneira, encontram-se dissolvidos na seiva das células e sua extração geralmente envolve o uso de solventes ácidos, que rompem a membrana celular do tecido e dissolvem os pigmentos (Fuleki & Francis, 1968a). No entanto, Revilla *et al.* (1989), advertem que o uso de solventes de acidez demasiadamente elevada (superior a 1% de ácido clorídrico) pode resultar em hidrólise parcial das antocianinas aciladas e, conseqüentemente, na estimação incorreta do teor de antocianinas total. Assim, o método usualmente empregado para obter o extrato bruto consiste em tratar a matéria-prima com metanol acidificado com 1% de HCl. Alguns métodos empregam etanol em substituição ao metanol pela menor toxicidade. Esse procedimento é recomendado especialmente quando a extração se faz com fim alimentício. Embora Francis (1982) afirme que a extração com metanol seja mais eficiente, Silva (1996) demonstrou não haver diferença quando realizada extração com qualquer dos solventes.

Os métodos para quantificação das antocianinas encontram-se bem elucidados na literatura. Uma maneira de se expressar os resultados da determinação de antocianinas é em termos da quantidade absoluta total de antocianinas presentes num extrato particular, estimando, dessa maneira, o teor de antocianina expresso usualmente em mg de Antoc./100 gramas de amostra. Diferentemente da grande parte dos flavonóides, que absorvem luz na região entre 350 e 380nm, as antocianinas são capazes de absorver fortemente luz na região do visível, compreendida entre 496 e 550 nm (Brouillard, 1982). Essa característica particular permite a quantificação das antocianinas por métodos espectrofotométricos em medições simples de absorvância em comprimentos de onda adequados (Wrolstad, 1976). A análise de antocianinas pelo método de pH diferencial consiste em efetuar leitura espectrofotométrica do extrato em tampão pH 1,0 e pH 4,5, baseando-se na sensibilidade destes compostos ao pH. Elevando-se o pH para 4,5 estabelece-se condição em que as antocianinas praticamente não apresentam coloração, apresentando menor absorção de energia. Por outro lado, abaixando-se o pH para em torno de 1,0, os pigmentos exibem coloração intensa. A diferença de absorvância observada espectrofotometricamente possibilita, por diferença direta, estimar a fração real de antocianina presente (Fuleki & Francis, 1968a).

Considerando o quadro de escassez de fontes utilizadas comercialmente e a ampla distribuição desses compostos na natureza, torna-se necessário avaliar novas fontes de antocianinas, buscando vegetais de menor valor agregado e de fácil disponibilidade. A busca por novas fontes, investigando vegetais comumente encontrados pela população ou de consumo cotidiano, permite também informar acerca do teor de antocianinas presente nesses vegetais e incentivar o consumo baseado nos benefícios advindos da ingestão das antocianinas.

As novas perspectivas do uso de antocianinas, principalmente na indústria alimentícia, ilustram a importância dos estudos analíticos destes pigmentos. Considerando a sensibilidade desses compostos a diversos fatores como acidez, oxigênio, luz e presença de metais (Lopes, 2002), torna-se necessário avaliar técnicas para quantificá-los, extraí-los e purificá-los.

Este trabalho tem como objetivo avaliar o potencial de algumas fontes de antocianinas e avaliar técnicas de quantificação desses compostos. O enfoque desse estudo com espécies vegetais típicas ou nativas do Brasil visa a contribuir com informações para melhoria dos hábitos alimentares da população bem como a incentivar novas atividades econômicas.

MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Pigmentos Naturais e Secagem do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil.

Foram avaliados teores de 10 fontes potenciais de antocianinas: casca de berinjela (*Solanum melongena*) e jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*), polpa de repolho roxo (*Brassica oleraceae*), casca e polpa de sabugueiro (*Sambucus negra*), morango (*Fragaria ssp*), maria-pretinha (*Solanum americanum*), açaí (*Euterpe oleracea* Martins) romã (*Punica granatum*), pétalas de hibisco (*Hibiscus rosa-sinensis*) e inflorescência de capim-gordura (*Melinis minutiflora*).

Repolho roxo, berinjela e morango foram coletados aleatoriamente, simulando aquisição doméstica, na Central de Abastecimento de Minas Gerais (CEASA – Belo Horizonte) nos meses de maio, junho e julho respectivamente. A jaboticaba foi adquirida na zona rural de Viçosa (Minas Gerais) no mês de junho. Hibisco e romã, na zona rural de Juiz de Fora (Minas Gerais), no mês de julho e setembro, respectivamente. Todos esses vegetais foram classificados, por meio de avaliação visual e de consistência, como maduros e avaliados quanto ao teor de antocianinas logo após a aquisição. O açaí, adquirido na forma “*in natura*” junto a Belém-Pafruta, o sabugueiro e o capim-gordura, coletados na zona rural de Viçosa (Minas Gerais), foram avaliados após serem descongeladas

amostras armazenadas, em freezer a -18°C , do banco presente no laboratório.

A Figura 01 ilustra os procedimentos para extração e quantificação das antocianinas.

Extração das Antocianinas

A extração dos pigmentos foi realizada de acordo com Silva (1996). Às amostras previamente trituradas e pesadas (valores aproximados em cada replicata de cada fração avaliada (m): capim gordura: 5,0 g; sabugueiro: 4,0 g; repolho roxo: 150,0 g; berinjela: 100,0 g; jabuticaba: 43,0 g; hibisco: 5,5 g; morango: 35,0 g; maria pretinha: 10,0 g; açaf: 60,0 g; e romã: 42,0 g), foram adicionados 80 mL de Solvente extrator (Etanol-Água (70:30)) e HCl suficiente para ajustar o pH do meio para 2,0. O material foi, então, deixado em repouso por 24 horas a 5°C , ao abrigo da luz, para extração. Findado o período, o material foi prensado manualmente em filtro de tecido, com o fim de reter o resíduo, e o extrato transferido para balão volumétrico de 100 mL (V_{Ec}), tendo seu volume completado com o solvente extrator, formando o Extrato Concentrado (EC). O conteúdo do balão foi centrifugado a 2000 rpm, por 10 minutos. O sobrenadante foi filtrado, posteriormente, em papel Whatman n° 1. Após a filtração, o extrato foi purificado, extraindo-se (três extrações sucessivas) o conteúdo de clorofila com auxílio de 10 mL de solvente extrator Éter Etílico : Éter de petróleo (1/1).

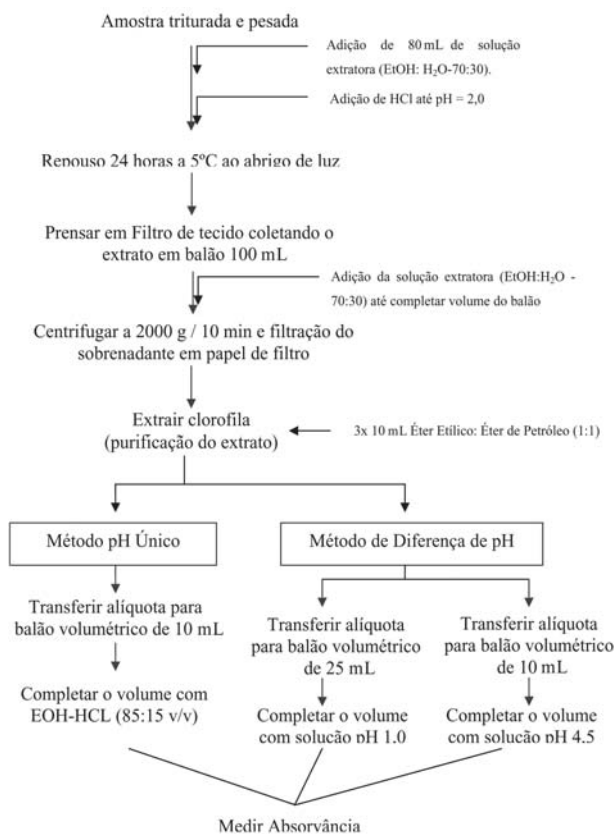


Figura 1. Fluxograma de Preparo das amostras.

Quantificação das Antocianinas

Ambos os métodos de quantificação, pH Único e pH Diferencial, foram adaptados a partir dos trabalhos de Fuleki & Francis (1968a; 1968b).

Foi quantificado o teor das antocianinas por dois métodos espectrofotométricos: Método de pH Único e Método de pH Diferencial. As Absorvâncias em ambos os métodos foram avaliadas em espectrofotômetro UV/VIS marca HITACHI U-2001, efetuando-se leituras em comprimento de onda de 535 nm. O conteúdo total de antocianinas foi expresso em mg de antocianinas/100g da fração da amostra analisada (casca, polpa, casca + polpa, pétala ou inflorescência). Foi utilizado o Coeficiente de Extinção médio ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$) de diversas antocianinas, adotando-se para o método de pH Único (pH 2,0) valor de 982 (Fuleki & Francis, 1968b) e o método do pH Diferencial 873 e 775 respectivamente para os pHs 1,0 e 4,5 (Fuleki & Francis, 1968a).

O método de pH único consistiu da transferência quantitativa de uma alíquota (V_{Alq}) do Extrato Concentrado para balão volumétrico (V_{Ed}) de 10 mL (exceção do extrato de Capim Gordura que foi transferido para balão de 50 mL), tendo o volume completado com solução Etanol 95% – HCl 1,5N (85/15), formando, dessa maneira, o Extrato Diluído (ED). Os valores de absorvância (DO) foram contrastados com os valores dos brancos (Solução Etanol-HCL 1,5N (85:15)). O cálculo do teor de Antocianinas Totais (AntT) por 100 gramas da fração avaliada foi efetuado de acordo com a Fórmula 01.

Fórmula 01 – Cálculo do teor de Antocianinas Totais (Ant-T)

$$AntT_{\text{mg Ant}/100\text{g Amostra}} = \frac{DO_{535\text{nm}}^* \times V_{E1} \times V_{E2} \times 100}{V_{Alq} \times m} = \frac{DO_{535\text{nm}}^* \times V_{E1} \times V_{E2} \times 1000}{V_{Alq} \times m \times E_{1\text{cm}}^{1\%}}$$

DO_{535}^* : Densidade Ótica do Extrato Diluído

pH Único: Medida direta da DO no espectrofotômetro

pH Diferencial: Diferença entre a DO nos pH's 4,5 e 1,0.

V_{Ec} : Volume Total do Extrato Concentrado

V_{Alq} : Volume da Alíquota do Extrato Primário a ser diluída para fazer o Extrato Secundário

V_{Ed} : Volume Total do Extrato Diluído.

m: Massa de Amostra

100: Fator de Correção para que resultado seja expresso em 100 gramas de Amostra

$E_{1\text{cm}}^{1\%}$: Coeficiente de Extinção

10: Constante para correção do Coeficiente de Extinção de modo a expressar o resultado em mg de Antocianina/ 100 gramas de Amostra

Para o método de pH Diferencial, foram utilizadas soluções tampão pH 1,0 e 4,5. A solução pH 1,0 foi preparada a partir da mistura de soluções de KCl (0,2 N) e HCl (0,2N) na proporção 25/67. O tampão pH 4,5 foi preparado a partir de solução de Acetato de Sódio (1N), HCl e Água na proporção 100/60/90. Alíquotas do extrato Concentrado (V_{Alq}) foram transferidas quantitativamente para balões volumétricos de 25 mL e 10 mL (V_{Ed}), tendo seus volumes completados com as soluções tampões pH 1,0 e pH 4,5, respectivamente, os valores de absorvância foram contrastados com os valores dos respectivos brancos (soluções tampão pH 1,0 e 4,5). O cálculo do teor de Antocianinas Totais (AntT) por 100 gramas da fração avaliada foi obtido de acordo com a Fórmula 01, adaptando-se o valor de DO para a diferença de leitura entre os dois pHs.

Delimitação Experimental

O experimento foi conduzido em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), em arranjo Fatorial 10 x 2 (10 vegetais e 2 métodos de análise) com três repetições analisadas em duplicata. Os dados foram submetidos a Análises de Variância e teste T de modo a investigar semelhança entre as fontes e entre os métodos. Foi utilizado software Statistical Analysis System (SAS) versão 8.0 devidamente licenciado para uso pela Universidade Federal de Viçosa.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Teor de Antocianinas

O teor de Antocianinas Total para cada fonte é apresentado na Tabela 01. Em ambos os métodos de análise, Jabuticaba apresentou maior teor ($p < 0,05$) seguido por Hibisco e Sabugueiro, que não diferiram entre si ($p < 0,05$). Ambos os vegetais podem ser classificados como “vegetais com elevado teor de Antocianinas” de acordo com classifica-

ção adotada por Macheix *et al.* (1990), que estabeleceram limite inferior de 200 mg/100 g para tal classificação.

A casca da jabuticaba apresentou teor de Antocianina próximo ao encontrado em uva (750 mg/100g – Mallacrida & Motta (2006)) e superior ao teor encontrado no repolho-roxo (175 mg/100g – Lopes *et al.* (2006)), ambos empregados usualmente como fonte comercial desse pigmento. Esse resultado sugere o aproveitamento da casca da jabuticaba, tegumento destinado como resíduo, como fonte potencial de antocianinas. Além de se tratar de matéria-prima de baixo valor agregado é também uma fonte disponível em abundância em grande parte do território brasileiro.

Fenômeno semelhante pode ser associado à presença de antocianinas na casca de Berinjela. Também considerada subproduto do consumo direto ou processamento, sua casca apresentou teor aproximado de 60 mg/100 gramas. É de conhecimento científico (Gonçalves *et al.*, 2006) que a berinjela, em especial sua casca, contém as antocianinas nasunina e delphinidina que, entre outros compostos, são responsáveis pelo efeito redutor de dislipidemias, principalmente a hipercolesterolemia. Mesmo contendo menor teor, quando comparada às demais fontes, dentro do contexto de agregação funcional, essa hortaliça possibilita melhoria na qualidade alimentar quando incorporado à dieta reforçando, dessa maneira, sua qualidade alimentar. Por ser cultivada em todo país, especialmente em São Paulo e Minas Gerais (Ribeiro, 2007), caracteriza-se, portanto, em fonte de antocianina de expressiva disponibilidade.

Poucas informações são disponíveis na literatura acerca do conteúdo de antocianina em romãs. Neste trabalho, foi encontrado teor reduzido do pigmento, quando comparado ao das demais fontes avaliadas. Jardini & Mancini Filho (2007) apontam em seu trabalho que a romã apre-

Tabela 1. Teor de antocianinas totais determinado pelo Método Único e pelo Método de Diferença de pH.

Amostra	Teor de Acy (mg/100g)*		Valor P **
	pH Único	pH Diferencial	
Jabuticaba	492,74 ± 64,06 ^A	641,01 ± 29,20 ^A	<0,0001
Hibisco	250,97 ± 28,01 ^B	229,75 ± 31,98 ^B	0,3422
Sabugueiro	218,14 ± 57,51 ^B	221,45 ± 65,00 ^B	0,8815
Capim gordura	96,90 ± 3,80 ^C	99,16 ± 9,49 ^C	0,9189
Berinjela	64,06 ± 8,44 ^{CD}	56,75 ± 7,45 ^{CD}	0,7423
Repolho roxo	24,36 ± 1,53 ^{DE}	61,44 ± 3,71 ^{CD}	0,1035
Morango	21,69 ± 1,33 ^{DE}	20,98 ± 0,46 ^{DE}	0,9745
Maria preta	21,63 ± 2,77 ^{DE}	25,09 ± 4,09 ^{DE}	0,8765
Açaí	21,23 ± 4,75 ^E	19,62 ± 5,16 ^E	0,9421
Romã	12,67 ± 1,25 ^E	5,55 ± 0,42 ^E	0,7469

* Média ± Desvio Padrão expresso em mg/100g de amostra.

** P-Valor referente ao contraste método “pH Único” e “Diferença de pH” em cada uma das fontes avaliadas.

Valores, na mesma coluna, seguidos por letras iguais não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) pelo teste t.

senta as antocianinas delphinidina, cianidina e pelargonidina e outros compostos fenólicos responsáveis por benefícios biológicos, como a atenuação de fatores aterogênicos, modulação das respostas antiinflamatórias e de enzimas do sistema de defesa antioxidante endógeno. É pouco habitual o consumo da romã pela população brasileira, sendo na maior parte das vezes consumida por recomendação em tratamentos terapêuticos. Dessa maneira a presença de antocianinas, ainda que em teor reduzido, reforça o importante papel funcional nessa fruta.

O teor de antocianinas em maria-pretinha foi considerado bastante baixo neste trabalho. Silva (1996) encontrou valores entre 149,95 e 198,57 mg/100g de fruta. Essa diferença pode estar associada ao grau de maturação da fruta bem como à época do ano da colheita e diferenças na forma de cultivo do vegetal. Apesar de não apresentar grande popularidade para consumo direto, provavelmente devido ao gosto quase insípido (Silva, 1996), a maria-pretinha é um fruto encontrado em praticamente toda parte entre nordeste e sul do país, caracterizando-se, dessa forma, em uma fonte de antocianina de disponibilidade elevada. O incentivo ao seu consumo deve ser realizado com precaução, já que o fruto ainda verde é considerado tóxico. Bobbio *et al* (1987) identificaram malvidina-3-soforosídeo-5-glucosídeo e malvidina3-(di-cafeoil-soforodídeo)-5-glucosídeo como as principais formas de antocianinas presentes no fruto de maria-pretinha.

Constant (2003) encontrou para o açaí teores mais elevados de antocianinas do que os resultados do presente trabalho. Utilizando método de pH Único, foram obtidos 127,33 mg/100 g de fruto. Lopes *et al* (2006) também encontraram teores mais elevados para o repolho-roxo (175 mg/100 g) comparativamente aos resultados deste trabalho. Uma possível razão para variações nos resultados pode decorrer de diferenças entre os métodos. É usual que se realizem extrações consecutivas (em média 3 extrações) dos pigmentos nos vegetais. Porém, neste trabalho, por questões técnicas operacionais, foi realizada apenas uma extração.

Açaí, capim-gordura e sabugueiro encontravam-se armazenados congelados a aproximadamente 1 ano antes de serem avaliados. Dada a característica lábil das antocianinas e o conhecimento das alterações causadas na estrutura dos alimentos pelo congelamento, é possível que esse tratamento tenha contribuído para diminuir o conteúdo desses pigmentos e, portanto, para subestimação desses teores. Agostini-Costa *et al.* (2003) verificaram, em trabalho conduzido com polpa de acerola, que 9 meses de armazenamento a -20°C causa perda em torno de 9% no teor de antocianinas e em 12 meses a perda cumulada alcança valores próximos a 14%. Lima *et al* (2005) verificaram perda de 8,77% do teor de antocianinas com 60 dias de estocagem e citam trabalhos que detectaram

perda de 40% para suco de cranberry, 58% para polpa de cereja ácida e 21,74% para polpa de acerola quando congelados por 1, 4 e 6 meses respectivamente. Porém, o efeito do armazenamento (congelamento) não foi avaliado neste trabalho sendo, portanto, apenas sugerido seu efeito.

De acordo ainda com Macheix *et al* (1990) o teor de antocianinas pode ser influenciado por fatores climáticos, como temperatura e iluminação, que, dessa forma, dificultam a comparação entre diferentes cultivos de uma mesma fruta, e ainda mais quando se deseja comparar frutas diferentes avaliadas em trabalhos realizados em diferentes regiões, em épocas climáticas diferentes, com forma de cultivo diferente, entre outros.

Apenas o repolho-roxo é empregado comercialmente para extração de antocianina. Os demais vegetais avaliados neste trabalho não são empregados usualmente para esse fim, e não possuem apelo comercial como fonte de antocianinas para a população. Os resultados sugerem que os demais vegetais pesquisados merecem ser mais bem avaliados por configurarem-se fontes de compostos funcionais de fácil acessibilidade, cujo consumo poderia ser incentivado.

Metodos de Quantificação

Os resultados das comparações entre os métodos em cada fonte vegetal são apresentados na Tabela 01.

Constatou-se não haver diferença significativa ($p < 0,05$) entre o Método pH Único e o Método pH diferencial para a maioria dos vegetais avaliados. Fuleki & Francis (1968a) compararam os métodos de pH Diferencial (1,0 e 4,5) e pH Único (1,0) na quantificação de antocianinas em de suco de *cranberry* e concluíram haver diferença entre os métodos, mas não o suficiente para tornar um deles menos recomendável. Esses autores sugeriram que, de fato, ambos os métodos podem ser empregados com sucesso desde que não existam interferentes no meio.

A avaliação da casca de jabuticaba foi a única a apresentar diferença significativa ($p < 0,05$) entre os métodos. Os dados demonstram que o método de pH Único estimou teor inferior ao estimado pelo método de pH Diferencial. Considerando ainda o relevante trabalho de Fuleki e Francis (1968a), eles sugerem em seu trabalho que a pequena subestimação observada do teor de antocianina pelo método do pH Único se deve a presença de interferentes. Segundo Jackman & Smith (1996), esse método está sujeito a interferências não devendo ser utilizado em produtos que contenham materiais escuros originados da degradação de açúcares e das próprias antocianinas. Existindo, de fato, esses produtos e desejando-se uma avaliação mais precisa, deve-se optar pelo método de pH diferencial (Fuleki & Francis, 1968a; Wrolstad, 1976) já que as características espectrais desses interferentes não são alteradas em função do pH do meio (Francis, 1982).

Considerando a presença característica de taninos e compostos sulfurosos na casca da jabuticaba, sugere-se que estes compostos tenham atuado como interferentes na quantificação de antocianinas pelo método do pH Único para esse vegetal. Apesar dos taninos não apresentarem absorção no comprimento de onda utilizado, eles contribuem para o alargamento do espectro justificando assim sua atividade interferente.

CONCLUSÕES

Todas as fontes de antocianinas investigadas apresentam teores entre 21,63 e 641,01 mg/100 gramas de fração avaliada. Alguns frutos, como a jabuticaba, apresentaram uma alta concentração de antocianinas, indicando que seu consumo proporciona aos indivíduos uma dieta rica em composto bioativo de importante função antioxidante. Outros, como a romã, apresentaram teores reduzidos. O açaí, fruto nativo e com produção intensiva, pode ser indicado como boa fonte potencial do pigmento.

Os métodos avaliados não diferiram na eficiência de quantificação de antocianinas. Apenas para a quantificação em jabuticaba foi verificada diferença, apresentando o método de pH Único valor subestimado em consequência da presença de interferentes, em especial os taninos, que podem ter seus efeitos minimizados quando empregada técnica do pH Diferencial.

Na ausência de interferentes, recomenda-se o uso do Método Único, dada a simplicidade e praticidade da técnica.

REFERÊNCIAS

Agostini-Costa TS, Abreu LN & Rossetti AG (2003) Efeito do congelamento e do tempo de estocagem de polpas de acerola sobre o teor de carotenóides. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 25: 56-58.

Bobbio PA, Bobbio FO & Souza SC (1987) *Solanum americanum* as a source of anthocyanins for use in foods. *Acta Alimentaria*, 6: 155-158.

Brouillard R (1982) Chemical structure of anthocyanins. In: MARKAKIS P (1982) *Anthocyanins as Food Colors*. New York, Academic Press. p.1-39

Brouillard R (1983) The in vivo expression of anthocyanins colour in plants. *Phytochemistry*, 22: 311-323.

Constant PBL (2003) Extração, caracterização e aplicação de antocianinas de açaí (*Euterpe oleraea*, M). Tese de Doutorado. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa. 183p.

Falcão AP, Chaves ES, Kuskoski EM, Fett R, Falcão DL & Bordignon-Luiz T (2007) Índice de polifenóis, antocianinas totais e atividade antioxidante de um sistema modelo de geléia de uvas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27: 637-642.

Falcão LD, Barros DM, Gauche C & Luiz MTB (2003) Copigmentação intra e intromolecular de antocianinas: uma revisão. *CEPPA*, 21: 351-366.

Francis FJ (1982) Analysis of anthocyanins in foods. In: Markakis P, *Anthocyanins as Food Colors*. New York, Academic Press, p. 181-207.

Francis, F. J. (1989). *Food Colorants: anthocyanins*. *Food Science and Nutrition*, 28: 273-314.

Fuleki T & Francis FJ (1968a) Quantitative methods for anthocyanins: 1. Extraction and determination of total anthocyanin in cranberries. *Journal of Food Science*, 33: 72-77.

Fuleki T & Francis FJ (1968b) Quantitative Methods for anthocyanins: 2. Determination of total anthocyanin and degradation index for cranberries juices. *Journal of Food Science*, 33: 78-83.

Goçalves MCR, Diniz MFFM, Borba JDC, Nunes XP & Barbosa Filho JM (2006) Berinjela (*Solanum melongena* L.) - mito ou realidade no controle de dislipidemias? *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16: 252-257.

Hagiwara A, Miyashita K, Nakanishi T, Sano M, Tamano S, Kadota T, Koda T, Nakamura M, Imaida K, Ito N, Shirai T (2001) Pronounced inhibition by a natural anthocyanin, purple corn color, of 2-amino-16-phenylimidazol (4,5-b) pyridine (PhIP)-associated colorectal carcinogenesis in male F344 rats pretreated with 1,2- dimethylhydrazine. *Cancer Letters*, 171:17-25.

Jackman RL, SMITH JL (1996). Anthocyanins and betalains. In: Hendry GAF & Houghton JD (Eds.) *Natural Food Colorants*. 2nd ed. Londres, Chapman & Hall. p. 245-309.

Jardini FA & Mancini Filho J (2007). Avaliação da atividade antioxidante em diferentes extratos de polpa de semente de romã (*Punica granatum*, L.). *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 43: 137-147.

Kapadia GJ, Balasubramanian V, Tokuda HI, Washina A, Nishino H (1997) Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induced Epstein virus early antigen activation by natural colorants. *Cancer Letters*, 115:173-178.

Kelebek H, Canbas A, Selli S, Saucier C, Joudes M & Glories Y (2006) Influence of different maceration times on the anthocyanins composition of wines made from *Vitis vinifera* L. cvs. Bogazkere and Öküzgözü. *Journal of Food Engineering*, 77: 1012-1017.

Kong JM (2003) Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 64:929-933.

Lima VLAG, Melo EA & Sima DES (2005) Efeito da luz e da temperatura sobre a estabilidade das antocianinas da pitanga roxa. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25: 92-94.

Lopes T J (2002) Adsorção de antocianinas de repolho-roxo em argila. Tese de Mestrado. Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina. 140p.

Lopes TJ, Quadri MB & Quadri MGN (2006) Estudo experimental da Adsorção de Antocianinas comercial de Repolho-roxo em argilas no processo de batelada. *Brazilian Journal of Food Technology*, 9: 49-56.

Macheix JJ, Fleurit A & Billot J (1990) *Fruit Phenolics*. Boca Raton: CRC Press. 378p.

Mallacrida SR & Motta S (2006) Antocianinas em suco de uva: composição e estabilidade. *CEPPA*, 24: 59-82.

Markakis P (1982) Stability of Anthocyanins in foods. In: Markakis P (Ed) *Anthocyanins in color foods*. New York, Academic Press. p. 163-180.

Mazza G & Miniati E (1993) *Anthocyanins in fruits, vegetables and grains*. Boca Raton, CRC Press. 362p.

- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Alimentos funcionais (1999). Disponível em: <<http://www.saude.gov.br>>. Acesso em 20 de maio de 2008.
- Reis A (2007) Berinjela (*Solanum melongena*, L.). Embrapa Hortaliças Disponível em <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Beringela/Beringela_Solanum_melongena_L/index.html>. Acesso em 14 de junho de 2008.
- Renaud S & De Logeril M (1992) Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 339: 1523-1526.
- Revilla E, Ryan JM & Martin-Ortega G (1989) Comparison of several procedures used for the extraction of anthocyanins from red grape. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46: 4592-4597.
- Ribeiro CSC (2007) Berinjela (*Solanum melongena* L.). Embrapa Hortaliças. Nov de 2007. Disponível em <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Beringela/Beringela_Solanum_melongena_L/propriedadesnutraceuticas.html>. Acesso em 14 de junho de 2008.
- Rizzon LA, Miele A & Meneguzzo J (2000) Avaliação da uva cv. Isabel para a elaboração de vinho tinto. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 20: 115-121.
- Sarni-Manchado OS, Fulcrand H, Souquet JM, Cheynier V & Moutounet M (1996) Stability and color of unreported wine anthocyanin-derived pigments. *Journal of Food Science*, 61: 938 – 941.
- Shahidi F & Naczki M (1995) Food phenolics: source, chemistry, effects and applications. Lancaster, TECHNOMIC. 331p.
- Silva SR (1996) Extração e estabilidade de pigmentos antocianínicos de frutos de Maria-Pretinha (*Solanum americanum* Mili.). Tese de Mestrado. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa. 76 p.
- Wang CJ, Wang JM, Lin WL, Chu CY, Chou FP, Tseng TH (2000) Protective effect of Hibiscus anthocyanins against tert-butyl hydroperoxide-induced hepatic toxicity in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 38:411-416.
- Wrolstad RE (1976) Colors and pigment analysis in fruit products. Corvallis, Oregon Agricultural Experimental Station. 17p.