

TRIAGEM RÁPIDA PARA DIFERENCIAÇÃO DAS ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS POR SOLUÇÃO ALCALINA

GABRIEL BARROS¹; FLAVIA SILVA²; RENIRES TEXEIRA³; FERNANDA CONCENCO⁴; MÁRCIA VIZZOTO⁵; LEONARDO NORA⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – gabrielbarros95@yahoo.com.br

²Universidade Federal de Pelotas – flavia.belavista2@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – reniresantos@gmail.com

⁴Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – fernanirocha@yahoo.com.br

⁵Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – marcia.vizzotto@embrapa.br

⁶Universidade Federal de Pelotas – l.nora@me.com

1. INTRODUÇÃO

As antocianinas (AC) são pigmentos naturais polifenólicos, encontrados nas estruturas diferentes de plantas, pertencentes ao grupo dos flavonoides, solúveis em água (LIMA et al., 2021). AC apresentam componente cromóforo, responsável por amplo espectro de cores, bem com pigmentos antociânicos com alta atividade antioxidante, tornando-se atrativo às exigências do consumidor (RIBEIRO e VELOSO, 2021).

Tais características, tem impulsionado estudos na área de alimentos e produtos diversos, suscitando a busca por diversas fontes de matéria prima voltadas ao baixo custo, alta concentração, estabilidade e sustentabilidade (RIGOLON; OLIVEIRA e STRINGHETA, 2021). Entretanto, após a extração das AC, os extratos precisam passar por métodos mais complexos para identificação e quantificação, para isso, vários métodos têm sido estudados e aplicados, com destaque a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a diferentes tipos de detectores (JESUS et al., 2021; LOZADA-RAMÍREZ et al., 2021).

Apesar deste método apresentar resultados satisfatórios, exige bastante conhecimento do analista, desde a aquisição de padrões até às realizações das análises, tornando o processo oneroso e complexo, necessitando de alto grau de assertividade antes do processo analítico (LOZADA-RAMÍREZ et al., 2021).

Por essa razão, é comum observações de diversos trabalhos que quantificaram as AC baseadas apenas na similaridade da coloração das matérias primas para seleção de padrões a serem usados, o que resulta em dados qualitativos e quantitativos irônicos (LIMA et al., 2021 e JESUS et al., 2021).

Pesquisas simples de aprimoramento na classificação das AC em matérias primas desconhecidas que reduzam os erros decorrentes das seleções dos padrões analíticos, trona-se necessário (LOZADA-RAMÍREZ et al., 2021). O trabalho, visou avaliar o efeito da titulação de solução alcalinas na diferenciação das antocianinas em extratos de amora-preta e batata-doce roxa.

2. METODOLOGIA

Extração e quantificação das antocianinas

A extração das antocianinas de amora-preta (cv. Tupi) e batata-doce roxa (ILS 50) foram feitas seguindo a metodologia descrita por (ZANNOU & KOCA, 2022), com algumas modificações. Resumindo, cinco gramas de amostra de cada foram misturados em 15 mL de solução de álcool de cereais acidificado com pH=2, homogeneizada em Ultra Turrax na rotação máxima, centrifugada (4000 x g) por 20

minutos, sob refrigeração (0°C), os sobrenadantes foram coletados e analisados em espectrômetro de microplaca (SpectraMax® 190 Microplate Reader). A quantificação foi feita usando a seguinte fórmula:

$$Antocianinas = a + b \cdot X \cdot \frac{mL_{extrato} + mL_{solvente}}{mL_{extrato}} \cdot \frac{massa_{amostra}}{4} \cdot 4 \quad (100)$$

Onde: Antocianinas foi expresso em mg cianidina-3-glicosídeo/100g de amostra;
O termo a e b vem da curva padrão (equação obtida na plotagem da curva padrão); O termo X refere-se a absorbância a 535 nm.

Preparo de solução de hidróxido de sódio

A Solução de hidróxido de sódio 0,1M foi feita seguindo a metodologia de SINGLETON e ROSSI (1965).

Caracterização da cor por titulação das amostras

A avaliação por indicadores de pH foi feita seguindo a metodologia (ARRUDA et al., 2019) com algumas modificações, resumindo, 1 mL antocianinas, foi titulado com 1mL de solução de hidróxido de sódio 0,1 M. em seguida, caracterizada pela metodologia descritas por PRIYADARSHI et al. (2021).

Análise estatística

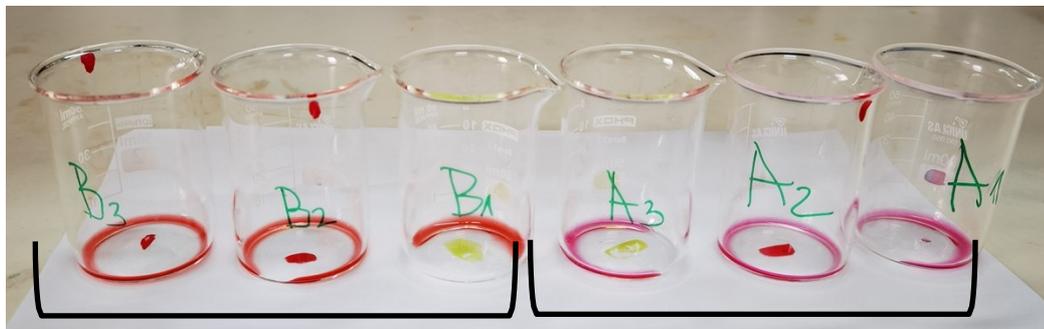
A análise foi executada no ambiente estatístico “R” (R Development Team, 2019), utilizando funções disponibilizadas pelos pacotes ExpDes. Foi realizada análise de variância pelo teste F, e a comparação de médias foi executada pelo teste T, ambos a 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 1: Concentração de antocianinas de amora-preta e batata-doce roxa

Tratamento	Média (mg cianidina-3-glicosídeo/100g)	pH da matéria fresca	pH das antocianinas extraídas
Amora-preta	375.1567 ^s	3,49	2,61
Batata doce roxa	315.6867	6,09	2,74

^s Médias seguidas pela letra na coluna não diferem entre si pelo teste T-student (P ≤ 0,05) entre os grupos de tratamentos

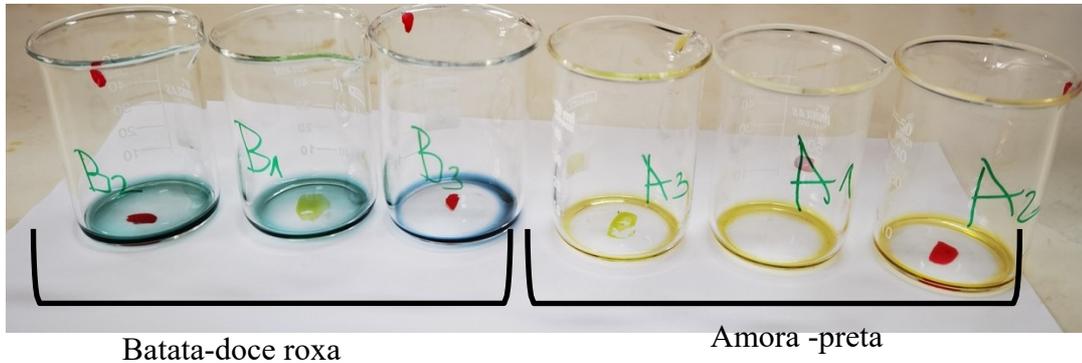


Batata-doce roxa

Amora -preta

(Figura 1): Triplicatas Batata-doce roxa e Amora-preta antes do tratamento com alcalina

De acordo com a classificação de WROLSTAD (2004) e ANANGA et al., (2013), as antocianinas presentes em amora preta e batata-doce roxa extraídas, indicam a predominância do tipo Cianidina ($C_{15}H_{11}O_6^+$), Cianidina e Peonidina ($C_{16}H_{13}O_6^+$) como estruturas primárias em amora-preta e batata-doce roxa, respectivamente, devido a presença do *cátion flavilium* quando submetidas ao pH entre 1 a 3, conferindo colorações variando de vermelho intenso a rosa.



(Figura 2): Triplicatas de Batata-doce roxa e Amora-preta após o tratamento com solução alcalina.

Com a titulação das soluções alcalinas foi possível observar que a Batata-doce roxa apresentou coloração mais esverdeada nas repetições 1 e 2 (Figura 2), indicando a presença de pseudobase Carbinol e coloração mais azulada na repetição três, indicando então a presença de Base quinoidal aniônico, ou seja, incrementados grupos hidroxila. Enquanto para amora-preta, todas triplicatas apresentaram coloração amarelada, indicando então de forma indireta, a formação de chalcona por via fissão do anel da anidrobases Chalcona (PRIYADARSHI et al., 2021).

Apesar dos dois grupos inicialmente apresentarem o mesmo tipo de antocianinas (cianidina), fica evidente que a variabilidade da cor difere com o número de grupos hidroxila ligadas em suas moléculas. No caso, as antocianinas de batata-doce roxa diferem estruturalmente das antocianinas de amora-preta na sensibilidade ao pH. Esses resultados podem ser comparados por BRIDLE & TIMBERLAKE (1997) e ANANGA et al., (2013), evidenciando que a presença de um ou mais grupos acila na molécula de antocianina inibe a hidrólise do *cátion flavilium* (vermelho) para a formar a base carbinol (incolor), permitindo a formação preferencial da base quinoidal (azul), resultando em pigmentos menos sensíveis às mudanças de pH (ou seja, eles mantêm a coloração em meio levemente acidificado a neutro).

Entretanto, de acordo com a rota fotossintética dos flavonoides descrito por ANANGA et al., (2013), evidências demonstram que as antocianinas de batata-doce roxa, podem ser classificadas como petunidina-compostas de uma ou mais moléculas estabilizantes em sua estrutura, sendo o *cafeoil* o mais provável.

4. CONCLUSÕES

A amora-preta apresentou maior concentração das antocianinas total do grupo cianidina-3-glicosídeo enquanto a batata-doce roxa apresentou maior estabilidade por solução alcalina, indicando que diferem estruturalmente na composição química das antocianinas majoritárias quando comparado a amora-preta.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANANGA, ANTHONY & GEORGIEV, VASIL & OCHIENG, JOEL & PHILLS, BOBBY & TSOLOVA, VIOLETA. Production of Anthocyanins in Grape Cell Cultures: A Potential Source of Raw Material for Pharmaceutical, Food, and Cosmetic Industries. 10.5772/3442. 2013.
- ARRUDA, M.R.E., BARBOSA, E.K.D.S., SILVA, C.F.D., VINHAS, G.M. Avaliação de extratos de antocianinas como indicadores de pH obtidos por diferentes métodos. **Brazilian Journal of Food Research** 10, 87. 2019.
- BRIDLE, P.; TIMBERLAKE, C.F. Anthocyanins as natural food colours – selected aspects. **Food Chemistry**, v.58, n.1-2, p.103-109, 1997.
- JESUS, M S C de et al. Acylated anthocyanins from organic purple-fleshed sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) produced in Brazil. **Scientia Agricola**, v. 78, n. 2021.
- LIMA, Á S, OLIVEIRA, B S DE, SHABUDIN, S V, ALMEIDA, M, FREIRE, M G, & BICA, K. Purification of anthocyanins from grape pomace by centrifugal partition chromatography. **Journal of Molecular Liquids**, 326, 115324. 2021.
- LOZADA-RAMÍREZ, J.D.; ORTEGA-REGULES, A.E.; HERNÁNDEZ, L.R.; ANAYA DE PARRODI, C. Spectroscopic and Spectrometric Applications for the Identification of Bioactive Compounds from Vegetal Extracts. **Appl. Sci.**, 11, 3039. 2021.
- PRIYADARSHI, R., KIM, S.-M., & RHIM, J.-W. Pectin/pullulan blend films for food packaging: Effect of blending ratio. **Food Chemistry**, 347, 129022. 2021.
- RIBEIRO, J S, & VELOSO, C M. Microencapsulation of natural dyes with biopolymers for application in food: A review. *Food Hydrocolloids*, 112, 106374. 2021.
- RIGOLON, T C B; Oliveira, I R N; Stringheta, P C. Antocianinas. In: STRINGHETA, P C e Freitas, P A V. **Corantes naturais: da diversidade da natureza as aplicações e benefícios**. Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa, Cap. 1, p. 17-53. 2021.
- SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A.J.R. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.16, p.144-158, 1965.
- WROLSTAD R. E. Anthocyanin pigments - bioactivity and coloring properties. **Journal of Food Science**; 69(5) C419-C425. 2004.
- ZANNOU, O., & KOCA, I. Greener extraction of anthocyanins and antioxidant activity from blackberry (*Rubus* spp) using natural deep eutectic solvents. **LWT**, 158, 113184. 2022.