

Imagem microscópica do mesocarpo do fruto de açai
Prof. Dr. Marcos Arduin/ Dep. Botânica - UFSCar

Efeito das Variações de pH e Temperatura Sobre as Antocianinas na Polpa de Açai - Estudos Espectrofotométricos e Cromatográficos

Tatiane Regina Albarici¹
José Dalton Cruz Pessoa²
Moacir Rossi Forim³

O açazeiro é uma palmeira do gênero *Euterpe* encontrada na Região Norte, especialmente no Pará, Amapá, Acre e Maranhão. A *Euterpe oleracea*, das áreas de várzea e a *Euterpe precatoria*, das áreas de terra firme, são exploradas por extrativismo pelos caboclos há pelo menos dois ou três séculos como fonte de alimento, fibra para manufatura e madeira (MELO et al., 1974; ROGEZ, 2000). O açazeiro também fornece palmito e a bebida feita de seus frutos é o principal alimento diário do caboclo juntamente com o peixe e a farinha de mandioca (MURRIETA et al., 1999).

O hábito alimentar de consumo de açai amplamente arraigado nas populações tradicionais da região do estuário do Rio Amazonas, projetou-se sobre Belém, seu consumo tem sido estabelecido a um *per capita* anual de 63,8 litros de bebida por pessoa (ROGEZ, 2000). A demanda pelo açai fora da região também está em alta, com o produto tendo boas possibilidades de mercado, principalmente no Rio de Janeiro, São Paulo, Brasília, Goiás e na Região Nordeste. Em 2000, foi iniciada a exportação de polpa congelada de açai para os Estados Unidos e para a Itália. Esse mercado externo vem crescendo 20% ao ano nos últimos três anos com a comercialização do açai concentrado em latas e com a popularização da mistura com diversas outras frutas feitas em academias de ginástica.

A Secretaria de Agricultura do Estado do Pará estima que a safra no ano de 2004 chegou a 350 mil

toneladas do fruto, 35% a mais que em 2003. Somente na Grande Belém estima-se que sejam consumidos entre 120 e 180 mil litros de bebida por dia. Em 2005 estima-se que tenham sido exportadas 2 a 3 mil toneladas de bebida, o que equivaleria a um montante de aproximadamente R\$17 milhões. Entre agosto 2004 e agosto de 2005, foram comercializados para os Estados Unidos US\$3,8 milhões, 770% a mais do que nas 52 semanas anteriores (SFINS, [200-]).

Segundo Rogez, 2000 "um conjunto de consumidores concordam em dizer que o açai é muito perecível. Mesmo mantida a polpa em geladeira, ela não se conserva por mais que 12 horas. Notam-se modificações de cor e de sabor". Os frutos após a colheita (geralmente em regiões de várzea) são guardados em paneiros. O transporte dos frutos se dá normalmente por barco ou por transporte terrestre (ROGEZ, 2000). Estes frutos são condicionados em porões de embarcações ou em sacos. Independente da forma transportada, os frutos se encontram em condições propícias para infecções provocadas por microrganismos além de diversos danos causados por pancadas durante o transporte. A carga microbiana é um dos principais fatores que tornam o açai perecível (AKWIE, 2000). Outro fator é a ação catalítica enzimática das polifenoloxidasas, peroxidases e lipases sobre as antocianinas e ácidos graxos. Antes do despulpamento os frutos devem ser lavados abundantemente para a retirada das folhas, poeiras, etc.

¹Química, Dra., Embrapa Instrumentação Agropecuária, C.P. 741, CEP 13560-970, São Carlos, SP, Brasil, tatiane@cnpdia.embrapa.br

²Físico, Dr., Pesquisador, Embrapa Instrumentação Agropecuária, C.P. 741, CEP 13560-970, São Carlos, SP, Brasil, e-mail: dalton@cnpdia.embrapa.br

³Químico, Dr., Embrapa Instrumentação Agropecuária, C.P. 741, CEP 13560-970, São Carlos, SP, Brasil, moacir@cnpdia.embrapa.br

Na seqüência, o amolecimento começa mergulhando os frutos em um banho de água morna durante 10 a 60 minutos até a polpa despedir do fruto. A temperatura usada nesta etapa pode afetar diretamente a qualidade do suco. Durante o despulpamento, quantias variáveis de água são adicionadas caracterizando a bebida do açai como fino, médio ou grosso segundo a consistência. O despulpamento pode ocorrer de três maneiras: a) manualmente; b) com auxílio de uma máquina manual; ou c) mecanicamente.

O açai é um produto com características organolépticas próprias que poderia encontrar uma abertura maior no mercado internacional, com a condição que a qualidade seja satisfatória e constante (ROGEZ, 2000). Uma conservação prolongada do suco permitiria seguramente aumentar o volume comercializado nos diferentes mercados, um consumo mais bem distribuído ao longo do ano e exigir uma qualidade superior do produto.

A bebida de açai é calórica em virtude do alto teor de lipídeos. É rica em fibras, antocianinas e compostos fenólicos, contém também proteínas, vitaminas, macronutrientes (S e P) e outros numerosos micronutrientes (Na, K, Zn, Fe, Mg e Cu) (ROGEZ, 2000; IADEROZA et al., 1992; GALLORI et al., 2004; POZO-INSFRAN et al., 2004).

As antocianinas são pigmentos naturais pertencentes à classe dos flavonóides e são responsáveis por uma variedade de cores atrativas de frutas, flores e folhas que variam do vermelho ao azul. Na natureza encontram-se associadas a moléculas de açúcares; quando livres destes açúcares são denominadas antocianidinas (agliconas). A principal bioatividade das antocianinas é sua atividade antioxidante (COISSON et al., 2005). Além disso, também são relatadas as propriedades vasotônicas e vaso protetoras, aumentando a resistência dos capilares sanguíneos, anti-trombóticas, impedindo a agregação de plaquetas e antineoplásicas, podendo estar correlacionada ao poder antioxidante, encontrado nos flavonóides para as antocianinas (WANG et al., 1997; Da SILVA, 2002). Recentemente foi demonstrado por Ramirez-Tortosa et al. (2001) a inibição da peroxidação lipídica em células *in vivo* pelas antocianinas.

As antocianinas, pigmentos muito instáveis, podem ser degradadas durante o processamento e a estocagem de alimentos com conseqüente alteração da cor. Seu núcleo flavílio é caracterizado por uma estrutura de ressonância responsável pela forte reatividade e os seus grupos funcionais adjacentes influenciando sua estabilidade. As antocianinas são uma alternativa viável para a substituição de corantes sintéticos devido seu grande número de conjugações, cores atrativas e sua solubilidade em água o que permite sua incorporação em uma grande variedade de produtos alimentícios (POZO-INSFRAN et al., 2004). Porém, o uso de extratos antocianínicos como corantes naturais é limitado em decorrência da grande instabilidade desses compostos a vários fatores dentre os quais destacam-se a luz, pH e a temperatura (LIMA et al., 2002; LIMA et al., 2005).

O pH do meio tem efeito sobre a forma química, a cor e a estabilidade das antocianinas. A Fig. 1 mostra as diferentes estruturas assumidas pelas antocianinas em função do pH. A estrutura básica da antocianina na forma do cátion flavílio (AH^+) de cor vermelha predomina a pH inferior a 3,0. À medida que o pH aumenta, o cátion perde um próton e sofre uma hidratação, formando um

pseudobase ou carbinol (B) incolor em pH menor que 6,0, o carbinol se transforma por tautomerismo numa chalcona (C) amarelo pálido em pH entre 12 e 13. Aumentando o pH acima de 6,0 o cátion flavílio perde prótons, formando primeiro a base quinoidal (A) de cor púrpura claro que em seguida em pHs acima de 9,0 perde outro próton formando uma base ionizada de cor azul escuro (AKWIE, 2000). Em pHs acima de 9, as antocianinas ocorrem principalmente nas formas ionizadas e chalconas.

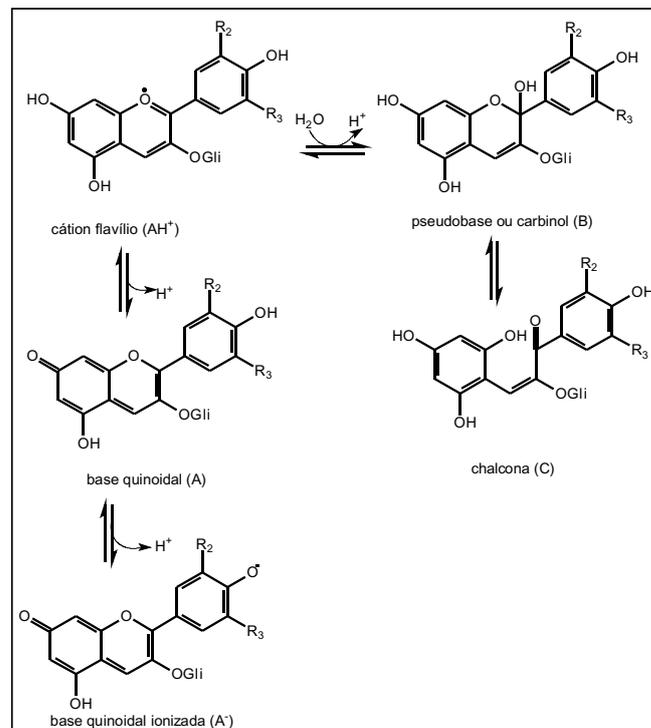


Fig. 1 Transições das estruturas das antocianinas em função do pH (R_1 = açúcar; R_2 e R_3 = H/OH/OMe).

As antocianinas, quando na forma de cátion flavílio, mostram uma absorbância intensa na região do visível compreendida entre os comprimentos de onda de 465 a 530nm.

Na Fig. 2 pode-se observar o efeito do pH no espectro de absorção da solução de antocianinas.

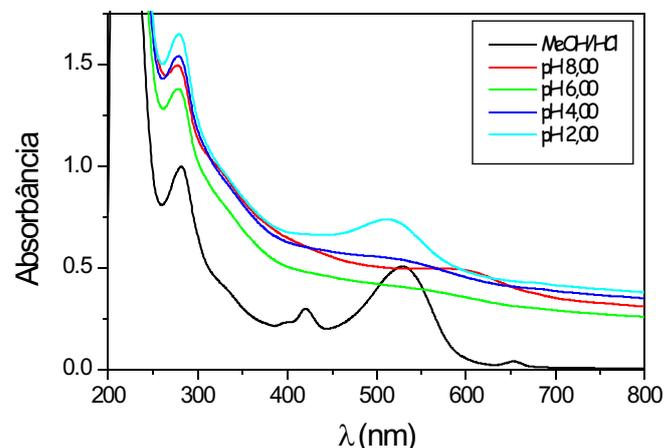


Fig. 2 Espectro de absorção molecular da solução de antocianinas em diferentes pHs.

Em meio ácido (MeOH/H⁺ e pH = 2,0) os espectros demonstram a absorção característica do cátion na forma da estrutura flavílio com uma forte banda de absorção em $\lambda_{\text{máx}} = 529 \text{ nm}$. A banda em $\lambda_{\text{máx}} = 281 \text{ nm}$ é característica da estrutura base do carbinol B (Fig. 1). Diminuindo a acidez do meio, em solução tampão neutro ou fracamente acidificado (pH > 6,0), a banda de absorção do íon flavílio não é observada no espectro. Em pHs acima de 7,0 uma nova banda surge ao redor de 600 nm. Esta banda pode ser atribuída às bases quinoidais.

Assim, como observado através da Fig. 2, em pHs acima de 4 a solução de antocianinas perde sua banda de absorção característica em 520 nm limitando a faixa de pH de trabalho. Ainda, comparando a solução tampão pH=2 com a solução de MeOH/H⁺ observa-se uma banda em 529 nm bem definida para a solução alcoólica em comparação com a tampão.

A temperatura tem um grande impacto sobre a destruição das antocianinas durante o transporte, o processamento e o armazenamento dos alimentos. O armazenamento prolongado de frutas contendo antocianinas é acompanhado de branqueamento de alguns pigmentos ou do desenvolvimento da cor marrom (MEYER, 1978; SOUZA, 1998 citados por AKWIE, 2000).

Submetendo-se uma solução metanólica (1% HCl) da

polpa do açai a diferentes temperaturas, 10 °C, temperatura ambiente e 40 °C, e submetendo-se as amostras a análises por absorciometria observa-se a variação na intensidade de absorção para estas amostras nos comprimentos de onda de 529 e 281 nm (Fig. 3 e 4 respectivamente).

Na Fig. 3a e 3b (10 °C e temperatura ambiente) observa-se inicialmente um aumento a intensidade de absorção em 529 nm logo atingindo um estado de equilíbrio. As Fig. 3a e 3b diferem entre si apenas na velocidade de equilíbrio sendo que este equilíbrio é atingido primeiramente na solução de maior temperatura. Ambas as temperaturas não afetaram a estabilidade das antocianinas num tempo inferior a 30 dias. A Fig. 3c demonstra decréscimo linear na intensidade de absorção das antocianinas em função do tempo. Este resultado pode ser justificado pela perda da conjugação das antocianinas através de reações de oxidação. Neste caso, a temperatura (40 °C) serve como um catalisador para a reação de oxidação.

Comparando as Fig. 3c e 4c observa-se que com o decaimento da intensidade de absorção em 529 nm ocorre um aumento em 281 nm o que pode ser justificado pela reação de oxidação entre as antocianinas ($\lambda_{\text{máx}} = 529 \text{ nm}$) e a hidratação formando o carbinol ($\lambda_{\text{máx}} = 281 \text{ nm}$) (Fig. 5).

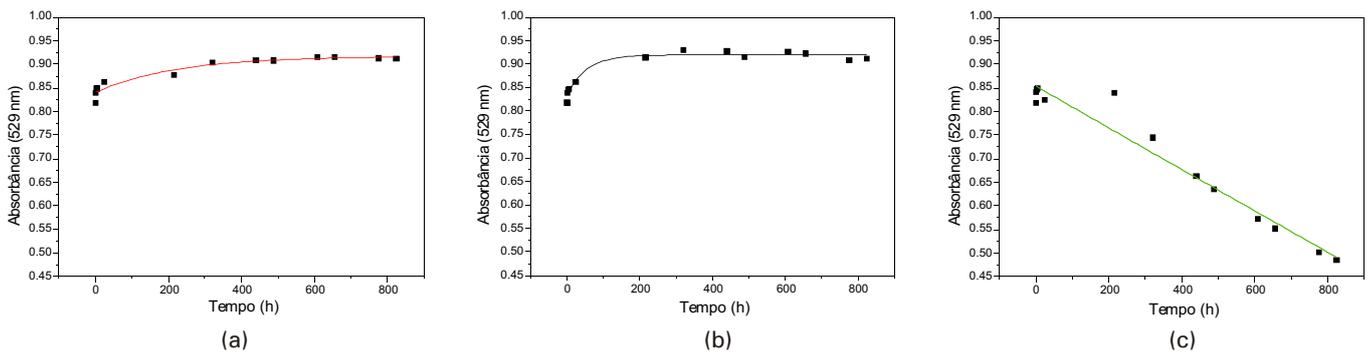


Fig. 3 Avaliação da estabilidade da solução de antocianinas em 529 nm sob temperatura controlada: a) 10 °C; b) temperatura ambiente e c) 40 °C.

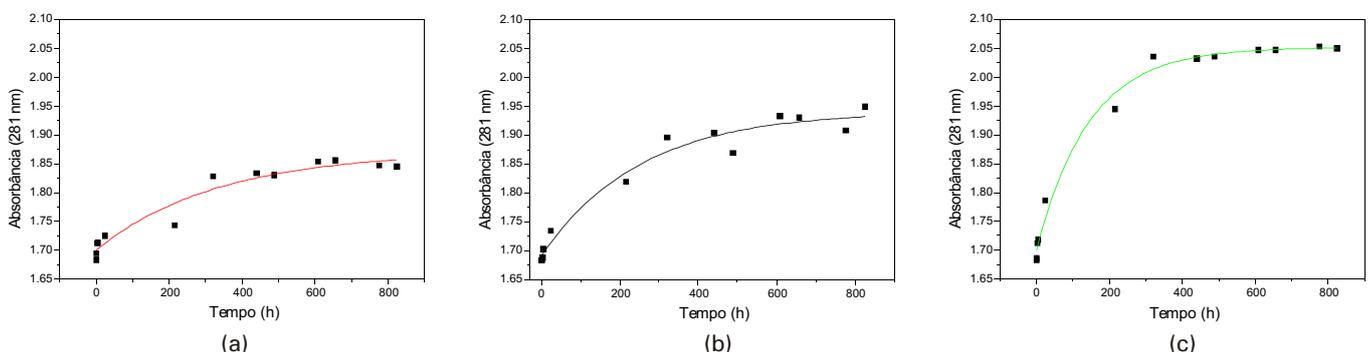


Fig. 4 Avaliação da formação das carbinol em 281 nm sob temperatura controlada: a) 10 °C; b) temperatura ambiente e c) 40 °C.

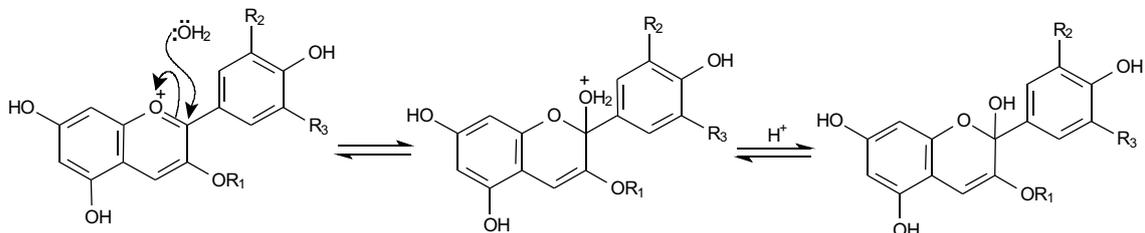


Fig. 5 Formação do carbinol a partir da antocianina. Mecanismo de adição nucleofílica.

O aumento na intensidade de absorção também é observado nas Fig. 4a e 4b, porém em velocidade e extensão menores confirmando a temperatura como um catalisador. Estes resultados novamente demonstram que a temperatura está diretamente envolvida na estabilização das antocianinas, onde, um aumento na temperatura, reduz sua estabilidade.

A influência da temperatura nas reações de oxidação das antocianinas também pode ser observada na Fig. 6. Foram retiradas diversas alíquotas de uma mesma amostra de polpa de açaí e congeladas, semanalmente uma alíquota era descongelada e submetida ao procedimento de extração com metanol acidificado (1% HCl), sendo, em seguida, analisada por absorciometria.

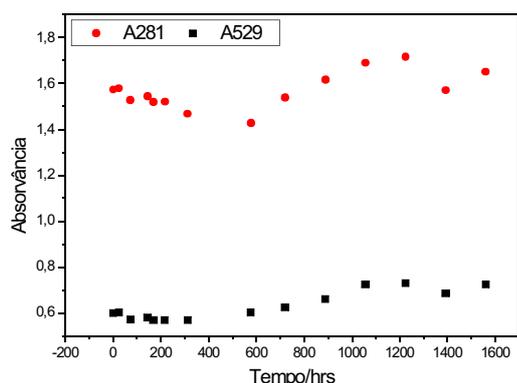


Fig. 6 Avaliação da estabilidade das antocianinas na polpa do açaí mantido congelado.

As análises não demonstraram variação no equilíbrio entre as estruturas isômeras das antocianinas e o carbinol nas amostras mantidas congeladas. Novamente, pode-se concluir que a temperatura afeta o equilíbrio nas reações de oxidação das antocianinas. Quanto menor a temperatura, maior a estabilidade do cátion flavílio.

A quantificação de antocianinas apresenta dois problemas principais: 1) a falta de estabilidade dessas moléculas e 2) a interferência de outras moléculas na própria medida ou sob a forma de co-pigmentação (FRANCIS, 1989; CLIFFORD, 2000). A CLAE é desde muito tempo o método de referência utilizado para análise do conteúdo de antocianinas. As vantagens ligadas à análise das antocianinas por CLAE são: sensibilidade, exatidão, precisão elevadas, reprodutibilidade dos resultados e a possibilidade de determinar a natureza de diferentes antocianinas de uma mistura.

Antocianinas totais (263 mg/ 100 g) e as antocianininas como cianidina-3-arabinosídeo e cianidina-3-arabinosídeo foram identificados em bebida de açaí utilizando métodos espectroscópicos e por CLAE (BOBBIO et al., 2000). Compostos fenólicos (quercetina e kaempferol), ácidos fenólicos (ácido *p*-cumárico, ferúlico, cafeico e clorogênico) e os pigmentos fenólicos (pelargonidina, malvidina 3,5-diglicosilada e cianidina 3-glicosilada) também foram determinados por métodos cromatográficos e espectrais em acerola (*Malpighia puniceifolia*, L.) (VENDRAMINI e TRUGO, 2004). A presença de antocianinas, flavonóis e carotenóides totais em pitanga roxa foram estudados por meio do método espectrofotométrico. Estudos de diferentes antocianinas revelaram sua atividade antioxidante e antiradicalar. Diversos trabalhos foram realizados por CLAE/DAD e

CLAE/EM, em vinhos comprovando novamente a ação antioxidante desta classe de composto (GHISELI et al., 1998) e em frutos (TSUDA et al., 1994; HEINONEM et al., 1998; KUSKOSKI et al., 2004; POZO-INSFRAN et al., 2004).

O uso de CLAE para a detecção das antocianinas está apresentado na Fig. 7.

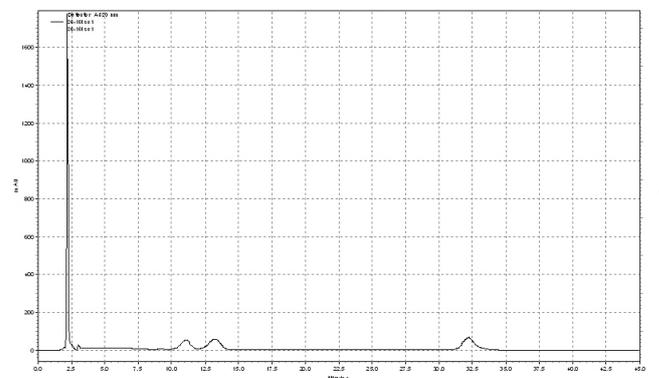


Fig. 7 Cromatograma da polpa do açaí extraída com metanol ácido (1% HCl) no comprimento de onda de 520 nm.

O cromatograma foi obtido utilizando-se uma coluna cromatográfica com fase estacionária C18 e fase móvel (A) água acidificada (2% ácido fórmico) e (B) acetonitrila utilizando o seguinte modo de eluição 0-25 min modo isocrático 11%, 25-35 min 25-100% B, 35-45 min 100-12% B. Foi utilizado um detector de DAD. Devido absorvância intensa das antocianinas na região do visível compreendida entre os comprimentos de onda de 465 a 530nm o comprimento de onda utilizado para acompanhar a eluição das mesmas foi de 520nm.

A análise do cromatograma mostra a presença de duas antocianinas com tempo de retenção de 11,0 min e 13,25 min estas antocianinas ainda não tiveram as estruturas elucidadas porém, encontram-se em fase de isolamento. A presença de um pico em 32,5 min pode ser atribuído a uma antocianidina resultante da hidrólise das antocianinas, que é favorecida pelo meio ácido como demonstrado na Fig. 8.

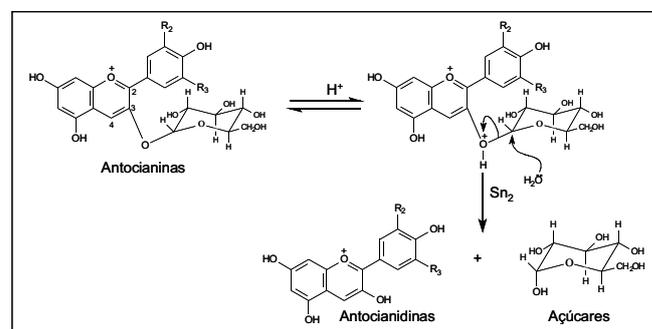


Fig. 8 Proposta de mecanismo de hidrólise ácida para as antocianinas. (R₁ = açúcar; R₂ e R₃ = H/OH/OMe)

Referências

- AKWIE, S. N. L. T. **Cinética de Amadurecimento, Extração e Estabilidade das Antocianinas do Açaí**. 2000. Dissertação (Mestrado em Engenharia química) - Universidade Federal do Pará, Belém.

BOBBIO, F. O.; DRUZIAN, J. I.; ABRÃO, P. A.; BOBBIO, P. A.; FADELLI, S. Identificação e Quantificação das Antocianinas do Fruto do Açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.). **Ciênc. Tecnol. Aliment**, Campinas, v. 20, n. 3, p. 388-390, 2000.

CLIFFORD, M. N. Anthocyanins nature, occurrence and dietary burden. **J. Sci. Food Agric.**, London, v. 69, n. 3, p. 385-391, 2000.

COISSON, J. D.; TRAVAGLIA, F.; PIANA, G. et al. *Euterpe oleracea* juice as a functional pigment for yogurt. **Food Research International**, Barking, v. 38, p. 893-897, 2005.

DA SILVA, E. M. **Otimização de Métodos de Análise de Antocianinas: poder Antioxidante e Quantificação Rápida**. 2002. 126 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal do Pará, Belém.

FRANCIS, F. J. Food Colorants: Anthocyanins. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 28, n. 4, 1989.

GALLORI, S.; BILIA, A.; BERGONZI, M.; BARBOSA, W.; VINCIERI, F. Polyphenolic Constituents of Fruit Pulp of *Euterpe oleracea*, Mart. (Açaí palm) **Chromatographia**, New York, v. 59, n. 11-12, p. 739-743, 2004.

GHISELI, A.; NARDINI, M.; BALDI, A.; SCACCINI, C. Antioxidant Activity of Different Phenolic Fractions Separated from Italian Red Wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 46, n. 2, p. 361-367, 1998.

HEINONEM, I. M.; MEYER, A. S.; FRANKEL, E. N. Antioxidant Activity of Berry Phenolics on Human Low-density Lipoprotein and Liposome Oxidation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 46, p. 4107-4112, 1998.

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

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; GRACIA-PARILLA, C.; TRONCOSO, A. M.; FETT, R. Atividade Antioxidante de Pigmentos Antocianínicos. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 23, 2004.

LIMA, V. L.; MELO, E.; LIMA, D. Polpa Congelada de Acerola: Efeito da Temperatura Sobre os Teores de Antocianinas e Flavonóis Totais. **Rev. Bras. Frutic**, Cruz das Almas, v. 24, 2002.

LIMA, V. L.; MELO, E.; LIMA, D. Efeito da luz e da Temperatura de Congelamento sobre a Estabilidade das Antocianinas da Pitanga Roxa. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 25, 2005.

MELO, C. F. M.; WISNIEWSKI, A.; ALVES, S. M. **Possibilidades papeleiras do açaizeiro**. Belém, PA: IPEAN, 1974. p.1-34. (Boletim Técnico do IPEAN).

MURRIETA, R. S. S.; DUFOUR, D.; SIQUEIRA, A. D. Food consumption and subsistence in three caboclo populations on Marajó Island, Amazonia, Brazil. **Human Ecology**, New York, v. 27, n. 3, p. 455-475, 1999.

POZO-INSFRAN, D.; BRENES, C. H.; TALCOTT, S. T. Phytochemical Composition and Pigment Stability of Açaí. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, p. 1539-1545, 2004.

QUADROS, M. Agroindústria do açaí é a esperança de Igarapé-Miri. **Poematropic**, [S. l.], n. 7, jan./jun., 2001.

RAMIREZ-TORTOSA, C.; ANDERSEN, O. M.; GARDNER, P. T.; MORRICE, P. C.; WOOD, S. G.; DUTHIE, S. J.; COLLINS, A. R.; DUTHIE, G. G. Anthocyanin-Rich Extract Decreases Indices Of Lipidperoxidation And Dna Damage In Vitamin E-Depleted Rats. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 31, n. 9, p. 1033-1037, 2001.

ROGEZ, H. **Açaí: Preparo, composição e melhoramento da conservação**. Belém: EDUFPA, 2000.

SPINS. **Açaí sales show wild growth**. [S. l.: s. n., 200-]. Disponível em: <http://www.spins.com/assets/pdf/acai_Q1_06.pdf>. Acesso em: 15 fev. 2006.

TSUDA, T.; WATANABE, M.; OHSHIMA, K.; NORINOBU, S.; CHOI, S.; KAWAKISHI, S.; OSAWA, T. Antioxidative Activity of Antocyanin Pigments Cyanidin 3-O--D-Glucoside and Cyanidin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 42, p. 2407-2410, 1994.

VENDRAMINI, A. L.; TRUGO, L. Phenolic Compounds in Acerola Fruit (*Malpighia puniceifolia*, L.). **J. Braz. Chem. Soc.**, São Paulo, v. 15, n. 5, p. 664-668, 2004.

WANG, H.; CAO, G. H.; PRIOR, R. L. Oxygen Radical Absorbing Capacity of Anthocyanins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 45, n. 2, p. 304-309, 1997.

Comunicado Técnico, 78

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Instrumentação Agropecuária
Rua XV de Novembro, 1542 - Caixa Postal 741
CEP 13560-970 - São Carlos-SP
Fone: 16 3374 2477
Fax: 16 3372 5958
E-mail: sac@cnpdia.embrapa.br
www.cnpdia.embrapa.br

1a. edição
1a. impressão 2006: tiragem 300

Comitê de Publicações

Presidente: Dr. Carlos Manoel Pedro Vaz
Membros: Dra. Débora Marcondes B. P. Milori,
Dr. João de Mendonça Naime,
Dr. Washington Luiz de Barros Melo
Valéria de Fátima Cardoso

Membro Suplente: Dr. Paulo S. P. Herrmann Junior

Expediente

Revisor editorial: Dr. Victor Bertucci Neto
Normalização bibliográfica: Valéria de Fátima Cardoso
Tratamento das ilustrações: Valentim Monzane
Foto da capa: Marcos Arduin
Editoração eletrônica: Valentim Monzane