

Influência do pH da solução extrativa no teor de antocianinas em frutos de morango

Influence of the extraction solution pH on the content of anthocyanins in strawberry fruits

Celso Luiz BORDIGNON Jr.^{1*}, Vanessa FRANCESCATTO², Alexandre Augusto NIENOW¹, Eunice CALVETE¹, Flávio Henrique REGINATTO³

Resumo

Nos últimos anos, os estudos sobre a composição química do fruto do morangueiro vêm ganhando destaque devido ao seu elevado consumo e às atividades biológicas atribuídas a ele. Além disso, os principais metabólitos secundários encontrados nesses frutos são as antocianinas, compostos responsáveis pela intensa coloração vermelha e amplamente utilizados como corantes naturais pela indústria alimentícia. Neste trabalho, foram preparados diferentes extratos de frutos de morango com a cultivar Oso Grande, com o intuito de verificar a influência do pH no perfil espectroscópico do extrato e no teor de antocianinas. O extrato em pH 1,0 forneceu um perfil clássico para antocianinas na análise por espectroscopia no ultravioleta, assim como um maior teor de antocianinas nos frutos frescos devido a uma extração mais eficiente das substâncias de interesse.

Palavras-chave: *Fragaria x ananassa* (morango); pH; UV-vis; antocianinas.

Abstract

Recently, the study on the chemical composition of the strawberry fruit has been recognized in view of its increased consumption and biological activities. Moreover, the main secondary metabolites found in strawberry fruits are anthocyanins, which are the compounds responsible for the intense red color of the fruit and are widely used as natural colorants by the food industry. In this work, were prepared different extracts with strawberry fruits of the cultivar Oso Grande in order to verify the pH influence on the spectroscopic profile of the strawberry extracts and on the content of anthocyanins. The results indicate that at pH 1,0 the extract showed a classic profile to anthocyanins through ultraviolet spectra analysis and a higher content of anthocyanins in fresh fruits.

Keywords: *Fragaria x ananassa* (strawberry); pH, UV-vis; anthocyanins.

1 Introdução

O morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) é uma planta de pequeno porte pertencente à família das Rosáceas. Os principais países produtores são Estados Unidos, Espanha, Coréia, Rússia, Polônia, Japão e Turquia (FAOSTAT, 2007). Embora o Brasil não figure entre os maiores produtores, sua produção vem crescendo nos últimos anos, concentrando-se principalmente nos Estados de Minas Gerais, Rio Grande do Sul, São Paulo, Paraná e Distrito Federal (PAGOT; HOFFMANN, 2003). O consumo do morango está ligado não somente à forma e ao tamanho, mas também ao aroma e à cor. Para Cordenunsi et al. (2002), a cor vermelha é um importante componente na aparência de morangos, sendo um atrativo aos consumidores. Essa coloração intensa se deve às antocianinas presentes nos frutos, principalmente na epiderme e aquênios (AABY et al., 2005).

As antocianinas são metabólitos pertencentes à classe dos flavonóides (WALTON et al., 2006). São largamente encontradas na natureza e responsáveis pela maioria das colorações azuis, violeta e vermelho das flores e frutos, sendo sua principal utilização na indústria, como corante natural (MARKAKIS, 1982; WROLSTAD, 2000; MALACRIDA; MOTTA, 2005). O

principal emprego biológico atribuído às antocianinas é a atividade antioxidante (SUN et al., 2002; MEYERS et al., 2003). Essa atividade se deve a sua estrutura química formada por três anéis, que possuem ligas duplas conjugadas e também hidroxilas distribuídas ao longo da estrutura que possibilitam o sequestro de radicais livres, causadores de danos celulares e doenças degenerativas (KONG et al., 2003; SILVA et al., 2007). Diversos ensaios estão sendo desenvolvidos para a avaliação desta atividade em diferentes vegetais, principalmente frutos e flores (WALTON et al., 2006; ZHENG et al., 2007; AABY et al., 2005). Segundo Bagchi et al. (2004), além da atividade antioxidante, as antocianinas apresentam considerável atividade anticarcinogênica e antiangiogênica.

As antocianinas podem apresentar diferentes formas estruturais, as quais podem assumir diferentes colorações. Essas formas podem sofrer interferências de diversos fatores, destacando-se entre estes a temperatura, o valor do pH e possíveis ligações com outras substâncias químicas. O pH é o fator que mais influencia na coloração das antocianinas, visto

Recebido para publicação em 15/8/2007

Aceito para publicação em 10/1/2008 (002773)

¹ Programa de Pós-graduação em Agronomia, Universidade de Passo Fundo – UPE, Bairro São José, BR 285, Km 171, CEP 99001-970, Passo Fundo - RS, Brasil, E-mail: celsobordignonjr@terra.com.br

² Curso de Farmácia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Passo Fundo – UPE, Bairro São José BR 285, Km 171, CEP 99001-970, Passo Fundo - RS, Brasil

³ Curso de Pós-graduação em Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Bairro Trindade, Florianópolis - SC, Brasil

*A quem a correspondência deve ser enviada

que, em função de sua acidez ou alcalinidade, estas podem apresentar diferentes estruturas (LEE et al., 2005; ANDERSEN; JORDHEIM, 2006).

Dados da literatura indicam que podem ocorrer quatro estruturas químicas principais em equilíbrio no meio: o cátion flavilium, a base quinoidal, o carbinol pseudobase e a chalcona, conforme a Figura 1 (LEVI et al., 2004). Estes resultados foram evidenciados em estudo realizado por Março e Scarminio (2007), com flores de *Hibiscus acetosella* Welw. Ex Hiern. Neste trabalho, os autores relatam que, conforme a variação do pH, ocorre mudança dos máximos de absorção no espectro, fato que interfere diretamente no doseamento destes metabólitos na matéria-prima analisada. Esses dados corroboram os resultados obtidos por Rubinskiene et al. (2005), que citam que as antocianinas, de um modo geral, são susceptíveis às mudanças de pH, temperatura e enzimas.

Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a influência do pH da solução extrativa no teor de antocianos dos frutos de morangueiro utilizando métodos espectroscópicos.

2 Material e métodos

2.1 Material vegetal

Frutos frescos de morangueiro da cultivar *Oso Grande* foram coletados no Setor de Horticultura da Universidade de Passo Fundo em Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil. Estes foram produzidos em ambiente protegido, que se caracteriza por uma estrutura metálica de 510 m², coberta com plástico de polietileno de baixa densidade (PEBD) de 150 micras e com aditivo anti UV. Após a coleta, os frutos foram armaze-

nados em sacos plásticos em freezer a -28 °C por período não superior a 30 dias.

2.2 Preparação dos extratos

Os extratos foram preparados segundo Revilla et al. (1998). Brevemente, frutos congelados (30 g) foram extraídos por sonificação à temperatura ambiente durante 20 minutos, com 90 mL de uma solução hidroetanólica (70 °GL) sob diferentes valores de pH. Após a extração, as amostras foram filtradas e foi retirada uma alíquota de 5,0 mL, a qual foi diluída até 25,0 mL com solvente de mesmo valor de pH. Para as análises por espectroscopia de varredura no ultravioleta/visível foi utilizado espectrofotômetro de duplo feixe marca Perkin Elmer®, modelo Lambda 20. Os ensaios foram realizados em triplicata.

2.3 Determinação de antocianos (LEE et al., 2005)

Para a realização deste ensaio, foi retirada uma alíquota de 5,0 mL dos extratos, a qual foi diluída até 25,0 mL com solventes nos mesmos valores de pH. Em seguida, as amostras foram analisadas em comprimento de onda definido de 510 nm (AABY et al., 2005; LEE et al., 2005). Os resultados foram expressos em mg equivalentes de cianidina 3-glicosídeo/100 g de frutos. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as diferenças entre as médias, comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância (Estat 2.0, UNESP, SP, Brasil).

3 Resultados e discussões

As antocianinas, pigmentos da classe dos flavonoides, são os principais cromóforos encontrados nas flores vermelhas, azuis e púrpuras. Quando extraídas do meio natural, apresentam-se na forma de sais de *flavilium*, normalmente glicosiladas, sendo as mais comuns a β -D-glicose, β -D-galactose e a α -D-ramnose (RAMOS et al., 2000).

Esta variação de cores foi extensamente estudada e discutida por diversos autores (BROUILLARD; DELAPORTE, 1977; COUTO et al., 1998; RAMOS et al., 2000). Segundo estes autores, três equilíbrios principais ocorrem quando se eleva o pH de uma solução ácida contendo uma antocianina. Um esquema geral é apresentado na Figura 1. Na primeira reação, ocorre o equilíbrio ácido-base de protonação do cátion *flavilium*, muito rápido, com uma constante de equilíbrio K_a , representado pela reação 1, da Figura 2. Em seguida, forma-se um carbinol pseudobase, através de um equilíbrio rápido, com constante K_b , representado pela reação 2, da Figura 2. Finalmente, estabelece-se lentamente um equilíbrio tautomérico, com formação de uma pseudobase chalcona, incolor, com constante de equilíbrio K_T , representado na reação 3, da Figura 2.

Os resultados obtidos nas análises indicam um perfil espectroscópico variado, conforme os valores de pH utilizados na extração, apresentando bandas em regiões distintas e com intensidade variada. Isso pode ser mais bem evidenciado na Figura 3, na qual são apresentados os espectros de varredura no ultravioleta/visível. Cabe destacar que os dados aqui apresenta-

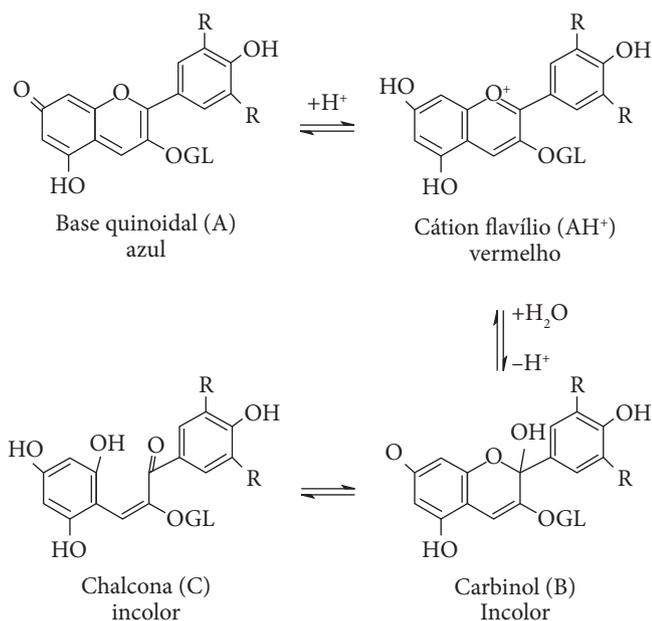


Figura 1. Estruturas moleculares encontradas em solução aquosa com diferentes valores de pH. Cátion *flavilium* (AH⁺), a) base quinoidal; b) carbinol ou pseudobase; e c) chalcona (adaptado de LEVI et al., 2004).

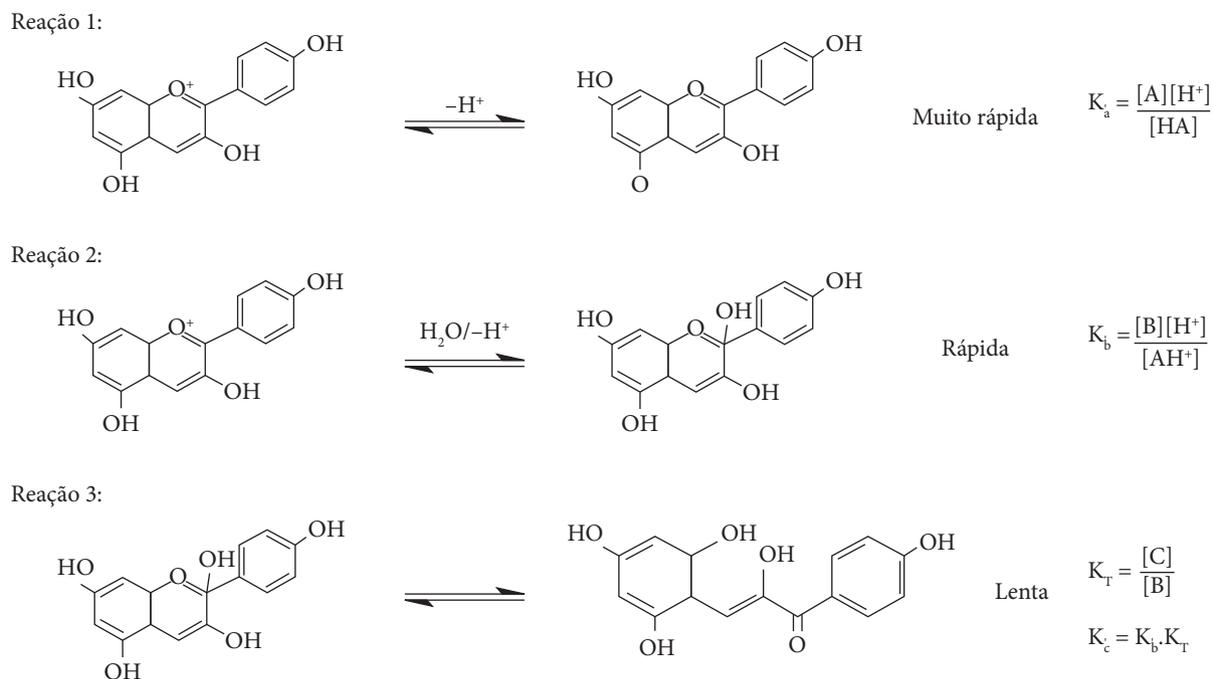


Figura 2. Esquema geral dos equilíbrios que ocorrem com o cátion *flavilium*, quando se muda o pH do meio, de acordo com Ramos et al. (2000).

dos estão em consonância com outros já existentes na literatura (COUTO et al., 1998; RAMOS et al., 2000)

Em meio ácido, a pH 1,0 (Figura 3a) e pH 3,0 (Figura 3b), os espectros mostram característica do equilíbrio ácido-base de protonação da estrutura do cátion *flavilium*, o qual possui máximos de absorção na faixa dos 510 nm e na faixa dos 285 nm. Além disso, o perfil do espectro obtido da amostra com pH 1,0 é bastante característico para antocianinas, conforme descrito na literatura (MARKHAM, 1982; WROLSTAD, 2000; LEE et al., 2005). Ainda em pH ácido, porém pH 4,5 (Figura 3c), o extrato apresenta uma coloração vermelha menos intensa, e seu espectro de ultravioleta apresenta fraca absorção na região de 510 nm e uma forte absorção na faixa de 275 nm. Os resultados aqui obtidos estão de acordo com o estudo desenvolvido por Março e Scarmínio (2007), que evidenciaram a formação do cátion *flavilium* em pH fortemente ácido (pH = 1,0 e 3,2), e também por Lee et al. (2005), que verificaram a formação de carbinol em solução levemente ácida.

Em meio neutro (pH 7,0 – Figura 3d), o espectro obtido mostra efeito batocrômico em 540 nm devido à formação da anidrobases quinoidal e, ainda, a presença de outra banda na região de 440 nm, mesmo perfil observado por Levi et al. (2004), que define as bandas de absorção como anidrobases e chalcona ionizada, respectivamente. Segundo Lee et al. (2005) e Março e Scarmínio (2007), em pH 7,0, ocorre o predomínio de formas com características que não acentuam a coloração vermelha.

A solução em pH 9 (Figura 3e) apresentou deslocamento nos máximos de absorção na faixa dos 555 nm em comparação aos extratos ácidos, porém com menor intensidade. Foi possível

observar também duas outras bandas, uma em 465 nm e outra em 385 nm. Estes valores encontrados são bastante semelhantes aos obtidos por Levi et al. (2004), que evidenciaram também a presença destas bandas, definindo a primeira banda como anidrobases, e as outras duas, como formas ionizadas de chalcona. As mesmas características foram observadas para o pH 13 (Figura 3f), destacando que, neste valor de pH, a banda na faixa de 465 nm não foi evidenciada.

Como mencionado anteriormente, a mudança nos máximos de absorção se deve às reações de equilíbrio que ocorrem com o cátion *flavilium*, quando se eleva o pH do meio (BROUILLARD; DELAPORTE, 1977). Essas reações levam a uma configuração estrutural das antocianinas em que, conforme se aumenta o pH, ocorre uma diminuição do número de ligas duplas conjugadas, que são responsáveis pelo aumento nos máximos de absorção das substâncias, pela protonação do cátion *flavilium* (RAMOS et al., 2000). Com a diminuição das ligas duplas conjugadas, os máximos de absorção das antocianinas tendem a diminuir, o que caracterizaria a perda de coloração.

Considerando que os valores de pH alteram o espectro de UV dos extratos, foram realizadas leituras com o intuito de verificar a influência do valor de pH da solução extrativa no teor de antocianos totais. O comprimento de onda de 510 nm foi utilizado por melhor ilustrar os resultados obtidos pelos espectros de varredura no UV-vis (PAZMIÑO-DURAN et al., 2001; MORAIS et al., 2002; MANHITA et al., 2006; SILVA et al., 2007; ZHENG et al., 2007), já que a literatura preconiza as análises espectroscópicas de ultravioleta para antocianinas nesta faixa.

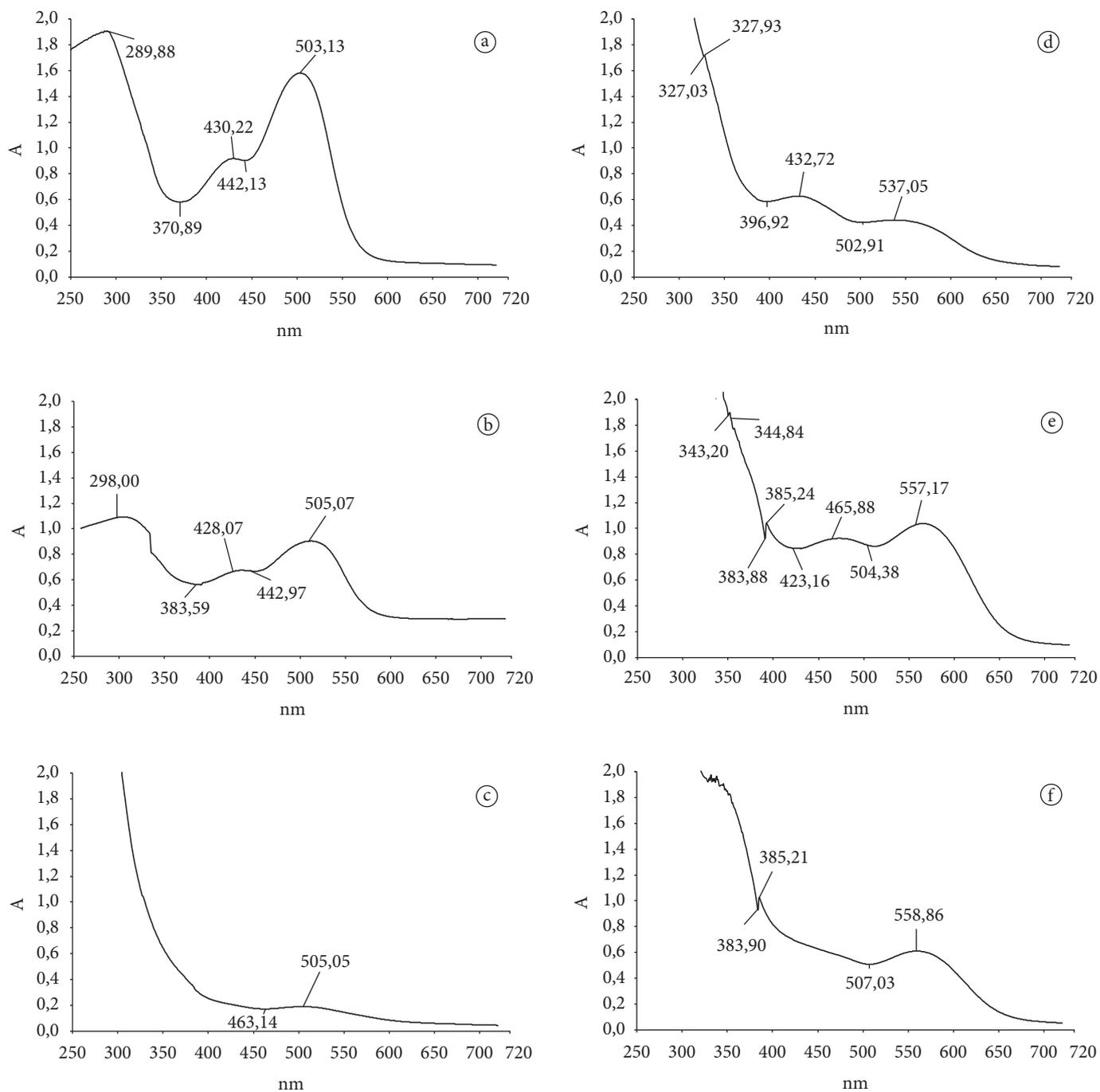


Figura 3. Espectros de varredura dos extratos obtidos de frutos de *Fragaria x ananassa*. a) extrato com pH 1; b) extrato com pH 3; c) extrato com pH 4,5; d) extrato com pH 7; e) extrato com pH 9; e f) extrato com pH 13.

Com relação ao teor de antocianos totais, são evidenciadas as absorvâncias obtidas na Tabela 1, bem como os valores de concentração, em mg equivalente de cianidina 3-glicosídeo/100 g de frutos. A solução extrativa em pH 1,0 foi a mais eficiente para a extração de antocianinas em frutos de morangueiro, já que os valores de absorvância foram significativamente superiores aos demais. Neste pH, o teor de antocianos foi de $76,60 \pm 0,55$, enquanto em pH 4,5 foi de $7,48 \pm 0,03$.

Na Figura 4, através de modelos estatísticos de regressão obtidos para definir o comportamento para os resultados obtidos, foi evidenciado um comportamento polinomial para as variações de pH, (equação = $y = -0,3346x^3 + 7,7021x^2 - 51,587x + 126,76$; $R^2 = 0,8221$, 5%). Com um aumento nos valores de pH da solução extrativa, ocorre a diminuição nos teores de antocianos até um ponto estimado de 5,20, em seguida ocorre novamente um crescimento nos valores de antocianos (pH 9,0), para posterior decréscimo (pH 13,0).

Tabela 1. Teor médio de antocianinas obtido dos extratos de frutos de *Fragaria X ananassa* com diferentes pHs na faixa de 510 nm.

pH	Antocianinas (mg equivalente de cianidina 3-glicosídeo/100 g de frutos)
1,0	76,60 ± 0,55 ^a
3,0	49,83 ± 1,31 ^b
4,5	7,48 ± 0,03 ^d
7,0	22,16 ± 0,04 ^c
9,0	49,16 ± 0,02 ^b
13,0	21,24 ± 0,40 ^c

*Valores médios em triplicatas ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as soluções extrativas (teste de Tukey, $p < 0,05$).

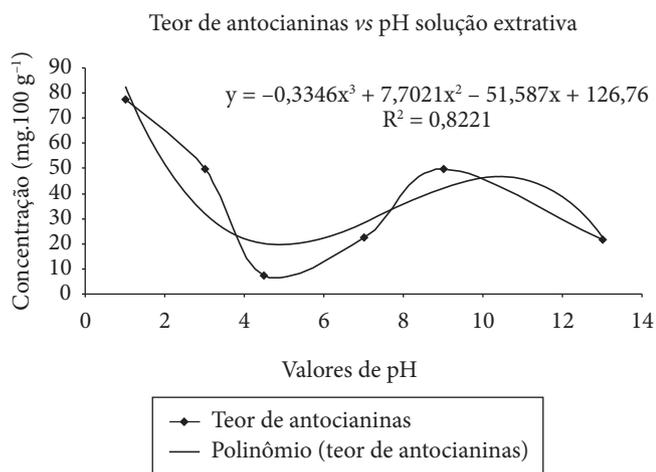


Figura 4. Teores de antocianinas obtidos de cada solução extrativa em comprimento de onda fixo no espectro de ultravioleta. Os valores são expressos em mg.100 g⁻¹ de frutos.

4 Conclusões

A extração em meio ácido, com pH 1,0, é a mais eficiente para a análise de antocianinas em frutos de morango cultivar Oso Grande, devido à formação do cátion *flavilium*, que acentua as características espectroscópicas das antocianinas, gerando uma melhor representação do conteúdo dos frutos frescos.

Agradecimentos

Os autores agradecem à CAPES pela concessão de bolsa de Mestrado ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade de Passo Fundo; à FAPERGS pelo suporte financeiro dado à pesquisa (processo n.º: 04/540.3).

Referências bibliográficas

- AABY, K.; SKREDE, G.; WROLSTAD, R. E. Phenolic composition and antioxidant activities in flesh and achenes of strawberries (*Fragaria ananassa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, n. 10, p. 4032-404, 2005.
- BAGCHI, D. et al. Anti-angiogenic, antioxidant, and anti-carcinogenic properties of a novel anthocyanin-rich berry extract formula. *Biochemistry*, v. 69, n. 1, p. 75-80, 2004.
- BROUILLARD, R.; DELAPORTE, B. Chemistry of Anthocyanin Pigments. 2.¹ Kinetic and Thermodynamic Study of Proton Transfer, Hydration, and Tautomeric Reactions of Malvidin 3-Glucoside. *Journal of American Chemical Society*, v. 99, p. 8461, 1977.
- CORDENUNSI, B. R. et al. Influence of cultivar on quality parameters and chemical composition of strawberry fruits grown in Brazil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, n. 9, p. 2581-2586, 2002.
- COUTO, A. B.; RAMOS, L. A.; CAVALHEIRO, E. T. G. Aplicação de pigmentos de flores no ensino da química. *Química Nova*, v. 21, n. 2, p. 221-227, 1998.
- Food and Agriculture Organization - FAO. **Statistical of strawberry production in world**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/340/default.aspx>> Acesso em: 20 Jun. 2007.
- LEE, J.; DURST, R. W.; WROLSTAD, R. E. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. *Journal AOAC International*, v. 88, n. 5, p. 1269-1278, 2005.
- LEVI, M. A. B. et al. Three-way chemometric method study and UV-vis absorbance for the study of simultaneous degradation of anthocyanins in flowers of the *Hibiscus rosa-sinensis* species. *Talanta*, v. 62, n. 2, p. 299-305, 2004.
- KONG, J. M. et al. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, v. 64, n. 5, p. 923-933, 2003.
- MALACRIDA, C. R.; MOTTA, S. Compostos fenólicos totais e antocianinas em sucos de uva. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, v. 25, n. 4, p. 659-664, 2005.
- MANHITA, A. C.; TEIXEIRA, D. M.; COSTA, C. T. Application of sample disruption methods in the extraction of anthocyanins from solid or semi-solid vegetable samples. *Journal of Chromatography A*, v. 1129, n. 1, p. 14-20, 2006.
- MARKAKIS, P. **Anthocyanins as Food Colors**. New York: Academic Press, 1982.
- MARKHAM, K. R. **Techniques of Flavonoid Identification**. New York: Academic Press, 1982.
- MARÇO, P. H.; SCARMINIO, I. S. Q-mode curve resolution of UV-vis spectra for structural transformation studies of anthocyanins in acidic solutions. *Analytica Chimica Acta*, v. 583, n. 1, p. 138-146, 2007.
- MEYERS, K. J. et al. Antioxidant and antiproliferative activities of strawberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, n. 23, p. 6887-6892, 2003.
- MORAIS, H. et al. Influence of storage conditions on the stability of monomeric anthocyanins studied by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, v. 770, n. 1-2, p. 297-301, 2002.
- PAGOT, E.; HOFFMANN, A. Produção de pequenas frutas no Brasil. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO SOBRE PEQUENAS FRUTAS, 2003. *Anais...* Vacaria: Embrapa Uva e Vinho, p.9-17.
- RAMOS, L. A. et al. Utilização Do Extrato Bruto De Frutos De *Solanum Nigrum L* No Ensino De Química. *Eclética Química*, v. 25, p. 229-240, 2000.
- REVILLA, E.; RYAN, J. M.; MARTIN-ORTEGA, G. Comparison of several procedures used for the extraction of anthocyanins from red grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 46, n. 11, p. 4592-4597, 1998.

- RUBINSKIENE, M. et al. Impact of various factors on the composition and stability of black currant anthocyanins. **Food Research International**, v. 38, n. 8-9, p. 867-871, 2005.
- SILVA, F. L. et al. Anthocyanins pigments in strawberry. **LWT**, v. 40, n. 2, p. 374-382, 2007.
- SUN, J. et al. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 25, p. 7449-7454, 2002.
- WALTON, M. C. et al. Anthocyanins absorption and antioxidant status in pigs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 20, p. 7940-7946, 2006.
- WROLSTAD, R. E. Anthocyanins. In: FRANCIS, F. J.; LAURO, G. J. (Ed.). **Natural Food Colorants**. New York: Marcel Dekker Inc., 2000. p. 237-252.
- ZHENG, Y. et al. Changes in strawberry phenolics, anthocyanins, and antioxidant capacity in response to high oxygen treatments. **LWT**, v. 40, n. 1, p. 49-57, 2007.