



Copigmentação de Antocianinas

Paulo César Stringheta
Dr. Prof. Titular da
Universidade Federal de Viçosa
stringap@mail.ufv.br

Paulo A. Bobbio
Dr. Prof. Titular da
Universidade Estadual
de Campinas- Unicamp

Uso de corantes naturais em alimentos processados

As antocianinas são pigmentos naturais bastante conhecidos pois determinam a coloração característica de uma grande variedade de vegetais, incluindo àqueles usados na alimentação humana. Estes pigmentos têm sido, portanto, consumidos pelo

aninas aciladas presentes em alguns vegetais, que mantém a coloração estável numa faixa de pH entre 2,0 e 4,0, bem como a possibilidade de formação de complexos antocianinas-flavonóides não antociânicos, trazem novas perspectivas para o uso desses corantes naturais nos alimentos processados.

ticos e/ou aromáticos ligados ao açúcar na molécula de antocianina. As antocianidinas que ocorrem com maior frequência como agliconas nas antocianinas naturais estão relacionadas na Figura 2.

As antocianinas são caracterizadas estruturalmente por possuir um esqueleto de carbono C6-C3-C6 e, em função



Figura 1. Plantas que contêm partes pigmentadas: (a) *Acalypha wilkesiana*; (b) *Callistephus chinensis* Nees; (c) *Rhododendron x simsii* Panch; (d) *Salvia Splendens* Ker-Gawl; (e) Frutas e hortaliças.

homem por incontáveis gerações sem causar aparentemente qualquer efeito sobre a saúde. Apesar disso, seu uso como aditivo natural está ainda bastante restrito em função de limitação, como a disponibilidade de matéria-prima produtora de pigmentos na quantidade e na qualidade requerida, a dificuldade na sua purificação, o poder corante reduzido quando comparado aos produtos sintéticos e, principalmente, a baixa estabilidade apresentada pelas antocianinas.

O conhecimento da estrutura dos pigmentos, a influência de fatores como o pH, a temperatura, a presença de ácidos, de açúcares, de íons metálicos e a presença de substâncias chamadas de copigmentos, assumem importância fundamental no estudo da estabilidade das antocianinas, visando seu possível uso em alimentos.

As recentes descobertas de antoci-

Estrutura Química das Antocianinas

As antocianinas estão incluídas no grupo de pigmentos de ocorrência natural, responsáveis pela coloração azul, vermelha, violeta e púrpura de muitas espécies do reino vegetal (Figura 1). As antocianinas, substâncias fenólicas, são glicosídeos de antocianidinas, polihidróxi derivados de íon flavilium. As antocianidinas (angliconas) são substâncias polihidroxiladas aparentemente ausentes nos tecidos de plantas.

As diferenças entre as várias antocianinas estão no número de grupos hidroxílicos, no grau de metilação destes grupos, na natureza e no número de açúcares ligados à molécula e na posição dessas ligações, bem como na natureza e no número de ácidos alifá-

disto, podem estar associadas com compostos flavonóides não antociânicos. Apesar de possuir a mesma origem biossintética de outros flavonóides naturais, as antocianinas diferem destes por absorver fortemente na região visível do espectro.

As antocianinas podem ser glicosadas por diferentes açúcares nas posições 3, 5 e 7, mas sempre ocorre a glicosilação na posição C-3. Glucose, arabinose, galactose e ramnose são os açúcares mais comuns ligados às antocianinas. Di e trissacarídeos, formados pela combinação destes quatro monossacarídeos, podem também glicosilar algumas antocianidinas (Timberlake & Bridle, 1975). Em muitos casos, os açúcares são acilados pelos ácidos p-cumárico, cefeico, ferúlico e sináptico (Mazza & Brouillard, 1987).

Os grupos metoxila e hidroxila, além da presença do açúcar e do ácido,



Figura 2 – Estruturas de Antocianinas de Ocorrência Natural. (Adaptado de Timberlake, 1980 e Mazza & Broiullard, 1987)

Sal de Flavilium	Substituição (R)					
	3	5	6	7	3'	5'
<i>Pelargonidina (Pg)</i>	OH	OH	H	OH	H	H
<i>Cianidina (Cy)</i>	OH	OH	H	OH	OH	H
<i>Peonidina (Pn)</i>	OH	OH	H	OH	OMe	H
<i>Delfinidina (Dp)</i>	OH	OH	H	OH	OH	OH
<i>Petunidina (Pt)</i>	OH	OH	H	OH	OMe	OH
<i>Malvidina (Mv)</i>	OH	OH	H	OH	OMe	OMe

têm um efeito importante na cor e na estabilidade das antocianinas. A mesma antocianina poderá ter diferentes cores, dependendo de pH, da concentração da solução e da presença de copigmentos, entre outros fatores. Com o aumento do número de hidroxilas, a coloração das antocianinas muda de rosa para azul. A presença de grupo metoxila no lugar de hidroxila, reverte a tendência anterior (Mazza & Brouillard, 1987).

A estabilidade da estrutura, determinante na coloração das antocianinas, é influenciada pela presença de grupos acila ligados na posição C-3 dos açúcares. Antocianinas com dois ou mais grupos acila exibem excelente estabilidade numa ampla faixa de pH.

Brouillard (1982) sugeriu a possibilidade de uma interação hidrofóbica entre o anel de pirilium e os radicais aromáticos dos grupos acila, o que protegeria o anel do ataque nucleofílico da água, aumentando a estabilidade destas antocianinas (Figura 3).

A formação de pontes de hidrogênio, a insaturação adicional na posição C-2 e C-3 da estrutura do complexo formado, a força eletrostática e o efeito estérico podem estar relacionados com os mecanismos de associação que induzem a uma maior estabilidade, as antocianinas aciladas (Sheffeldt & Hrazdina, 1978; Williams & Hrazdina, 1979).

Soluções de antocianinas apresentam uma coloração vermelha mais intensa quando em pH abaixo de 3,0. Quando o pH é aumentado

para a faixa de 4,0 a 5,0, a coloração vermelha tende a desaparecer. Aumentos adicionais de pH levam as antocianinas a apresentarem uma coloração azulada e estas, após estocagem ou aquecimento, tornam-se amareladas.

Em uma solução aquosa ácida, podem existir quatro formas estruturais de antocianinas em equilíbrio entre si: a base quinoidal **A**, o cation flavilium AH^+ , a pseudobase ou carbinol **B** e a



Figura 3. Modelo de empilhamento entre dois resíduos de ácido cafeico com o núcleo pirilium

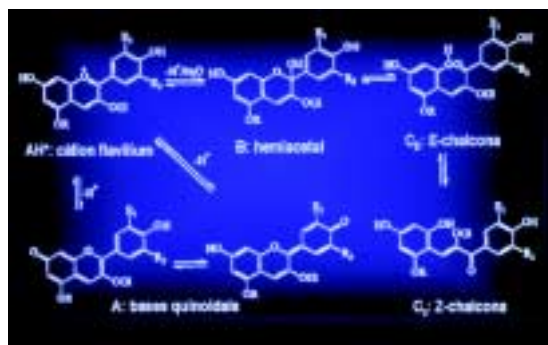


Figura 4. Transformações estruturais de antocianinas

chalcona **C** (Figura 4).

Em condições ácidas, há um equilíbrio entre as antocianinas na forma AH^+ e B, com a existência de uma espécie transitente, a anidrobasa A, que é uma estrutura obtida pela desprotonação de cátion flavilium. Soluções contendo pigmentos com pH acima de 7,0, gradualmente mudam a coloração de tonalidade azul para amarela, como um resultado indireto da formação de chalcona **C**, via fissão do anel da anidrobasa A (Hrazdina, 1974).

Copigmentação

Se considerarmos a coloração das antocianinas apenas em função de pH, somos levados a crer que as plantas, ou parte delas, não deveriam ser coloridas, uma vez que, na maioria dos casos, o pH natural dos vegetais se encontra na faixa ligeiramente ácida para neutra. Nesta região de pH, a maioria das antocianinas se encontra na forma não colorida. Entretanto, o que se observa é que as antocianinas se encontram sempre associadas às partes coloridas das plantas, indicando que estas antocianinas devem estar estabilizadas por fatores físico-químicos incomuns. A presença de compostos chamados copigmentos pode ser um destes fatores. Os flavonóides não antocianínicos, alcalóides, aminoácidos e nucleosídeos, entre outros, podem atuar como copigmentos (Tabela 1) e a própria antocianina pode agir copigmentando outra antocianina.

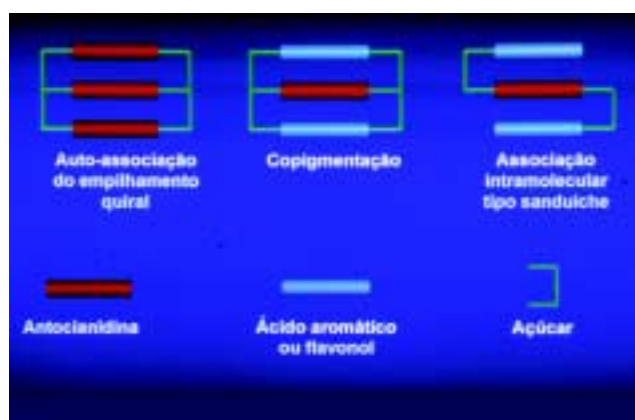
Segundo Goto & Kondo (1991), podem existir três mecanismos básicos de estabilização de antocianinas, ou seja, copigmentação intramolecular, copigmentação intermolecular e auto-associação, com o envolvimento de moléculas de antocianidinas, de flavonóides ou ácidos aromáticos e de açúcares (Figura 5).

Quando a concentração de antocianinas é relativamente alta, as antocianinas podem atuar como copigmentos de si mesmo. As soluções de antocianinas muito diluídas apresentam uma intensificação no aumento da coloração, quando copigmentadas com rutina, mas este aumento na absorvância é paulatinamente reduzido à medida que se aumenta a concentração da antocianina. Segundo Scheffeldt & Hrazdina (1978), esta menor disponibili-

Tabela 1:Copigmentação de cianidina 3,5 - diglicosídeo ($2 \times 10^{-3} \text{M}$) a pH 3,32

COPIGMENTO ($6 \times 10^{-3} \text{M}$)	λ_{max} (nm)	$\Delta\lambda_{\text{max}}$ (nm)	A/nm a λ_{max}	% de incremento de A no λ_{max}
Sem copigmento	508	-	0,500	-
Ácidos cinâmicos				
Ácido cafeico	515	7	0,780	56
Ácido ferúlico	517	9	0,800	60
Ácido clorogênico	513	5	0,875	75
Dihidrochalcona				
(+) - Catequina	514	6	0,890	78
Flavona				
Apigenina-7-glucosídeo	517	9	0,840	68
Flavononas				
Hesperidina	512	13	1,095	119
Naringina	518	10	0,985	97
Flavonols				
Kaferol 3-glucosídeo	530	22	1,693	239
Quercitina 3-ramnosídeo (quercitrina)	527	19	1,599	217
Quercitina 3-rutinosídeo (rutina)	528	20	1,643	228

Fonte: Osawa, 1982

**Figura 5.** Esquema representativo de três tipos de copigmentação

dade de antocianina para a copigmentação com a rutina, pode ser atribuída à estabilização do cátion flavílium por meio da **auto-associação** das antocianinas quando presentes em concentrações mais elevadas.

A **copigmentação intramolecular** é possivelmente res-

pensável pela extraordinária estabilidade dos cromóforos de antocianinas poliaciladas (Brouillard, 1981), como ocorre com a zebrina (Figura 6), extraída da *Zebrina pendula* (Goto & Kondo, 1991), cuja coloração é exclusivamente produzida pelo pigmento em si, sem nenhuma interferência de outros agentes como íons metálicos e copig-

mentos. Os resíduos aromáticos de grupos acila se alinham com o anel pirilium do cátion falvílium dificultando a adição da água em C-2 e C-4 do anel (Broillard, 1981). Com dificuldade para a hidratação da molécula e o aparente impedimento das reações de transferência de prótons pelo processo de “empilhamento” das moléculas, a estabilidade dos cromóforos aumenta sensivelmente. Provavelmente as forças que atuam no processo de “empilhamento” sejam forças hidrofóbicas.

A **copigmentação intramolecular** somente ocorre quando o pigmento e o copigmento são partes de uma única molécula, ou seja, quando o cromóforo da antocianina e um resíduo de ácido cinâmico (copigmento) estão covalentemente ligados ao mesmo resíduo de açúcar (Figura 4).

A **copigmentação intramolecular** é mais eficiente na estabilização das antocianinas que a copigmentação intermolecular, pois, sob o ponto de vista termodinâmico, o efeito intramolecular tem vantagem entrópica sobre o efeito intermolecular, uma vez que não é necessário as moléculas, separadas inicialmente em solução, se unirem (Brouillard, 1983).

A estabilidade da cor de moléculas aciladas é causada por um fenômeno de copigmentação intramolecular, no qual os resíduos aromáticos dobram-se e interagem com o sistema π do núcleo pirilium, protegendo as formas coloridas contra o ataque nucleofílico da água (Figueiredo et al., 1995).

A **copigmentação intermolecular** (Figura 7), além do aumento da absorção na região do visível, também pode causar um deslocamento batocrômico no comprimento de onda de máxima absorção (Timberlake, 1980).

A complexação é provavelmente dominada por forças de Van der Waals e efeitos hidrofóbicos em meio aquoso, resultados do empilhamento $\pi - \pi$ entre a molécula de antocianina e copigmento (Liao et al., 1992).

A reação de copigmentação é provavelmente o principal mecanismo de interação molecular envolvido em variações da cor e da adstringência durante a produção e envelhecimento dos vinhos (Mazza, 1995).

Quadro 2 – Valores de $k(\text{h}^{-1}) \times 10^{-2}$ e $t_{1/2}(\text{h}) \times 10^2$ para as soluções de antocianinas (ACY) e antocianinas adicionadas de Ácido Tânico (AT) em pH 2,0, 3,0 e 4,0, sob efeito de luz

PH		AT + ACY	ACY
2,0	k	0,0931	0,4945
	$t_{1/2}$	7,44	1,40
3,0	k	0,3322	0,6632
	$t_{1/2}$	2,09	1,04
4,0	k	0,7673	1,1307
	$t_{1/2}$	0,90	0,61

Quadro 3 – Valores de $k(\text{h}^{-1}) + 10^{-2}$ e $t_{1/2} + 10^2(\text{h})$ para as frações purificadas de antocianinas em pH 2,0; 3,0 e 4,0

PH		Fração F1	Fração F2	Fração F3
2,0	k	0,0969	0,5040	1,6202
	$t_{1/2}$	7,15	1,37	0,43
3,0	k	0,4777	1,2085	3,0737
	$t_{1/2}$	1,45	0,57	0,23
4,0	k	0,7727	1,805	2,7886
	$t_{1/2}$	0,90	0,38	0,25

A formação do complexo é dependente da concentração do copigmento e da concentração da antocianina e, segundo Asen *et al.* (1972), à medida que se aumenta a relação copigmento/antocianina, aumenta a absorvância da amostra e aumenta o deslocamento batocromico no λ máx. Além do deslocamento batocromico, a copigmentação resulta em um sensível aumento na estabilidade das antocianinas. A Figura 8 mostra o esquema de uma copigmentação de flavocomelina e malvina a pH 6,0.

O Quadro 2 mostra o efeito do ácido tânico, copigmentando as antocianinas em diferentes pHs. Observa-se valores de $t_{1/2}$, em torno de 5 vezes maior para as antocianinas copigmentadas a pH 2.0 e que esta relação decresce à medida que se eleva o pH de 2.0 para 4.0. Este fato comprova a importância do pH na formação e na estabilidade do complexo antocianico-copigmento.

Pelo Quadro 3 observa-se o comportamento de diferentes frações de antocianinas extraídas de inflorescência de capim gordura (*Melinis minutiflora*) em função da presença de copigmentos naturais (flavonóides). À medida que se purificam as frações de antocianinas, se reduz a presença de flavonóides naturais do extrato e, conseqüentemente, se eleva a suscetibilidade das antocianinas aos efeitos de luz, indicando que a decomposição é maior quanto maior o grau de purificação dos pigmentos, o que pode ser observado pelo valor de $t_{1/2}$ a pH 2.0 de 7,15, 1,37 e 0,43, para as frações F1, F2 e F3, respectivamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASEN, S., STEWART, R.N., NORRIS, K.H. Co-pigmentation of anthocyanins in plant tissues and its effect on color. **Phytochem.**, v.11, n.3, p.1139-44.

BROUILLARD, R. Origin of the exceptional color stability of the zebrina anthocyanin.

Phytochem., v.20, n.6, p.1453-6, 1981.

BROUILLARD, R. Chemical structure of anthocyanins. In: MARKAKIS, P. (Ed.).

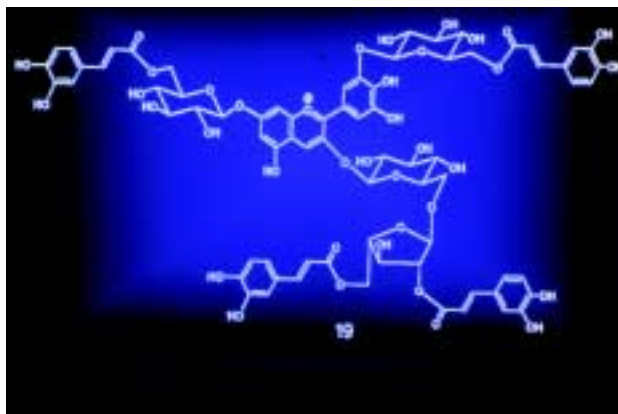


Figura 6 - Estrutura química de antocianina extraída de *Zebrina pendula*

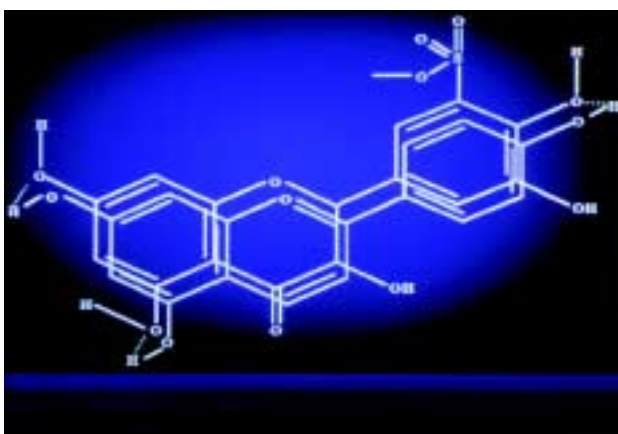


Figura 7 - Representação do complexo molecular entre a apigenidina e o ácido 5'-sulfônico quercitina (Iacobucci & Sweeny, 1983)

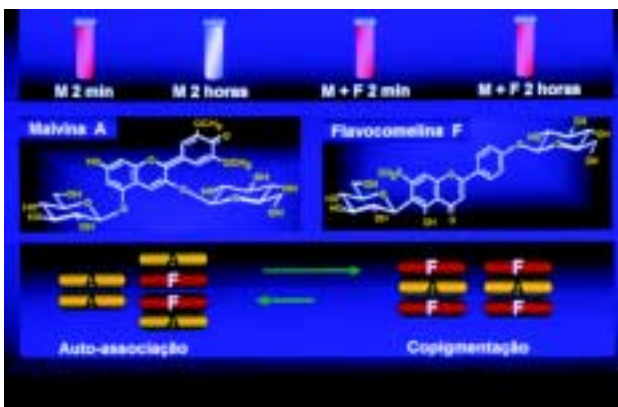


Figura 8 - Esquema da copigmentação entre flavocomelina(flavona) e Malvina(antocianina). (Goto & Kondo, 1991)

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.1311-23, 1983.

FIGUEIREDO, P., ELHABIRI, M., TOKI, K. SAITO, N., DANGLES, O., BROUILLARD, R. New aspects of anthocyanin complexation. Intramolecular copigmentation as a means for colour loss? **Phytochem.**, v.41, n.1, p.301-8, 1995.

GOTO, T., KONDO, T. Structure and molecular stacking of anthocyanins – flower color variation. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, v.30, p.17-33, 1991.

IACOBUCCI, G.A., SWEENY, J.G. **The chemistry of anthocyanins, anthocyanidins and related flavilium salts.** Tetrahedron, v.39, n.19, p.3005-38, 1983.

LIAO, H., CAI, Y., HASLAM, E. Polyphenol interactions. Anthocyanins: copigmentation and colour changes in red wines. **J. Sci. Food Agric.**, v.59, p.299-305, 1992.

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.; BROUILLARD, R. Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products. **Food Chem.**, v.25, p.207-225, 1987.

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

SCHEFFELDT, P., HRAZDINA, G. Co-pigmentation of anthocyanins under physiological conditions. **J. Food Sci.**, v.43, n.2, p.517-20, 1978.

TIMBERLAKE, C.F., **Anthocyanins** – occurrence, extraction and chemistry. **Food Chemistry**, n.5, p.69-80, 1980.

TIMBERLAKE, C.F., Bridle, p. The anthocyanins. In: HARBONE, J.B., (Ed). **The Flavonoids.** London: Chapman & Hall Ltd., 1975. P.215-66

WILLIAMS, M., HRAZDINA, G. Anthocyanins as food colorants: effect of pH on the Formation of anthocyanin-rutin complexes. **J. Food Sci.**, v.44, n.1, p.66-68, 1979.