

CONCENTRADO DE ANTOCIANINAS DE MALVAVISCUS ARBOREUS



CONCENTRADO DE ANTOCIANINAS DE MALVAVISCUS ARBOREUS

Ismênia Salignac de Souza Guimarães
Eng^o – Quim., PhD., EMBRAPA-CTAA

Maria da Piedade Monteiro de Carvalho
Ci. Dom., Bs., EMBRAPA-CTAA

Thomas Philip
Consultor IICA – EMBRAPA-CTAA



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA

Vinculada ao Ministério da Agricultura

Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos – CTAA

Rio de Janeiro, RJ.

Exemplares desta publicação podem ser solicitados ao
CTAA

Av. das Américas, 29.501 – Guaratiba

End. Teleg.: EMBRAPATEC

Telef.: (021) 310-1337 310-1353

Telex: (021) 33267-EBPA-BR

23000 - Rio de Janeiro - RJ

Tiragem: 1.000 exemplares

Comitê de Publicações

Guimarães, Ismênia Salignac de Souza.

Concentrado de antocianinas de *Malvaviscus arboreus*, por Ismênia Salignac de Souza Guimarães, Maria da Piedade Monteiro de Carvalho e Thomas Philip. Rio de Janeiro, EMBRAPA-CTAA, 1984.

28 p. ilustr. (EMBRAPA-CTAA. Boletim de Pesquisa, 10)

1. Corantes Naturais. 2. Antocianinas. 3. Alimentos Naturais. 4. *Malvaviscus arboreus*. I. Carvalho, Maria da Piedade Monteiro de, colab. II. Philip, Thomas, colab. III. Título. IV. Série.

CDD 547.7

© EMBRAPA-1984

Concentrado de antocianinas de Malvaviscus Arboreus

E R R A T A

pág.	parágrafo	linha	onde se lê	leia-se
7	1	1	ã partir de	a partir de
7	1	6	de frutos de <u>Viburnun dentatum</u>	frutos de <u>Viburnun dentatum</u>
7	1	7	e de frutos de	e frutos de
13	Tabela 4	Sub-título	EXTRADO	EXTRATO
13	Tabela 4	Abaixo da Tab.	*Cor total e, 5ml...	*Cor total em 5 ml...
15	3	1	pétalas frescas de 2,80 l	pétalas frescas e 2,80 l
15	3	2	idênticas as empregadas	idênticas às empregadas
15	4	3	ã vácuo	a vácuo
19	2	4	iniciou	iniciou-se
19	2	7 e 8	metanol-ácido glacial-água	metanol-ácido acético glacial-água
21	2	1	álcool-ácido a	álcool-ácido e

S U M Á R I O

INTRODUÇÃO	6
MATERIAL E MÉTODOS	9
RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
CONCLUSÕES	22
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

CONCENTRADO DE ANTOCIANINAS DE MALVAVISCUS ARBOREUS

RESUMO - Foram desenvolvidos processos de extração do corante vermelho de flores de Malvaviscus arboreus L. var. penduliforme, MALVACEAE. O concentrado de antocianinas (344 mg/100ml de concentrado) obtido poderá ser usado como aditivo corante em alimentos, após sua aprovação em testes toxicológicos. Nas extrações das antocianinas, empregou-se processos de imersão, imersão-percolação e contra corrente em quatro estágios usando-se como solventes de extração, etanol-ácido clorídrico, água contendo dióxido de enxofre e solução aquosa de ácido clorídrico. No processo de extração em contra corrente, foram utilizadas flores frescas submetidas ao branqueamento prévio por vapor d'água para facilitar a liberação do corante. Todos os processos ensaiados foram realizados à temperatura ambiente, condição mais adequada para assegurar a estabilidade das antocianinas. A concentração de antocianinas obtidas das flores de M. arboreus varia de 0,35% a 1,20%, dependendo do processo de extração empregado. Em todos os processos estudados visou-se estabelecer condições para a obtenção de um concentrado de antocianinas viável. Foi identificada a aglicona do constituinte principal do corante como sendo a pelargonidina, antocianidina permitida pela legislação brasileira para uso em alimentos.

Termos para indexação: Malvaviscus arboreus L. var. penduliforme, MALVACEAE, antocianinas, antocianinas-processo de extração, corantes-alimentos, corante natural vermelho, pelargonidina.

CONCENTRATE OF ANTHOCYANINS OF MALVAVISCUS ARBOREUS

ABSTRACT - Processes of extractions of anthocyanins from flowers of Malvaviscus arboreus L. var. penduliforme, MALVACEAE were studied and a red concentrate of these anthocyanins was prepared having a color concentration of 344mg/100ml. The possibility of using this concentrate as food color additive depends upon toxicological tests. The extractions of colorant were done by different processes such as: immersion, percolation and countercurrent batch system in four stages. The solvents used were ethanol-hydrochloric acid, water with

sulfur dioxide, and aqueous solution of hydrochloric acid. In the counter-current process the fresh flowers were previously blanched with steam in order to help release the color. Since the anthocyanins are sensitive to high temperatures, all the extractions were done at room temperature. The concentration of anthocyanins in the extracts obtained varied from 0,35% to 1.20%, according to the process employed. In all processes studied, care was taken to obtain a good product at low cost. Perlagonidin was identified as the major component of the anthocyanins of the extract as it is allowed as a food additive by the Brazilian food law.

Index terms: *Malvaviscus arboreus* L. var. *penduliforme*, MALVACEAE, anthocyanins, anthocyanins-process of extraction, colorants - foods, red natural color, pelardonidin.

INTRODUÇÃO

Antocianinas são corantes solúveis em água, responsáveis pelas cores atraentes de flores, frutos, folhas, sucos de frutas e vinho aos quais imprimem tonalidades de vermelho ao violáceo e azul. São apreciadas pelas suas qualidades estéticas e poderão ter importância econômica pela comercialização dos extratos das plantas que contêm estes pigmentos.

Antocianinas são características de plantas que florescem e suprem a maior parte dos alimentos vegetais que satisfazem às necessidades nutricionais do homem.

Pigmentos presentes nos alimentos têm sido consumidos desde a mais remota antiguidade, sem nenhum efeito tóxico aparente. Por esse motivo, corantes naturais têm sido objeto de estudos intensivos nos últimos anos, com a finalidade de se encontrar substitutos para os corantes artificiais empregados em produtos alimentícios.

Corantes sintéticos estão sob contínuo controle de toxicidade, sendo que alguns já foram proibidos e outros estão em caráter provisório nas listas de corantes aprovados pelos comitês de Organização Mundial de Saúde (OMS), e do Food and Drug Administration (FDA) (Marmion 1979).

Pesquisas no sentido de preparar corantes comercialmente, a partir de fontes naturais incluem: folhas e frutos da planta ornamental Prunus ceracifera; flores de Clitoria ternata; frutos de Vaccinium myrtilus (Markakis 1982), cálices das flores de Hibiscus sabdariffa, planta tropical anual (Esselen & Sammy 1973, 1975); frutos de Synsepalum dulcificum (Buckmire & Francis 1978); milho, Maiz morado (Kikuchi et al. 1977); de frutos de Viburnum dentatum (Francis 1975) e de frutos de Phytolaccadecandra (Forni et al. 1983).

Apesar das antocianinas serem bastante conhecidas, elas não tem sido usadas com frequência como corantes em alimentos, por razões de estabilidade da cor, custo de produção e disponibilidade no mercado.

A estabilidade das antocianinas está diretamente relacionada com a sua estrutura química que deriva basicamente do cation flavílio mostrado na Fig. 1.

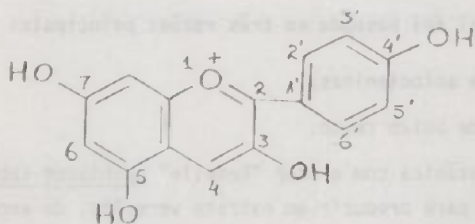


FIG. 1. Estrutura de cation flavílio, comum a todas as antocianinas.

Uma antocianina é composta da parte básica aglicona (antocianidina) que é esterificada por um ou mais açúcares. Os resíduos de açúcar por sua vez podem estar acilados (Harborne 1967; Gueffroy et al. 1971; Hrazdina & Franzese 1974; Geissman 1962; Goodwin 1976 e Hulme 1970). A presença desses grupos, em geral, se dá na posição 3 e promovem estabilização da cor (Harborne 1964). Como exemplo de que a presença desses grupos estabiliza a cor, pode-se citar a antocianina peonidina-3-(dicafeilsoforosideo)-5-glicosideo, isolada de Ipomoea tricolor que produz coloração estável em alimentos e bebidas

na faixa de pH compreendida entre 2,0 e 8,0. Verificou-se que refrigerantes contendo a antocianina mencionada não perdem a cor, visualmente, após um período de 11 meses de armazenamento (Asen et al. 1977).

O custo dos corantes naturais está intimamente relacionado com a disponibilidade no mercado, que por sua vez dependerá de uma seleção de matérias-primas de baixo custo e de processo econômico de obtenção. Por outro lado, a demanda será função direta da exigência do consumidor esclarecido quanto aos danos causados pelos corantes artificiais. Cabe ainda aos órgãos que legislam sobre o assunto, restringir o uso de corantes sintéticos suspeitos ou de toxicidade já comprovada.

O objetivo deste trabalho foi estudar processos de extração do corante das pétalas de flores Malvaviscus arboreus L. MALVACEAE, abundante em países tropicais e com alto rendimento em flores.

A escolha do material foi baseada em três razões principais:

- (a) elevado teor de antocianinas;
- (b) matéria-prima de baixo custo;
- (c) similaridade botânica com a flor "Roselle" (Hibiscus sabdariffa L.) que tem sido usada para produzir um extrato vermelho, de aroma agradável e empregado em refrescos e geleias (Esselen & Sammy 1973, Du & Francis 1973 e Main et al. 1978).

O concentrado de Malvaviscus arboreus L. a exemplo do corante extraído de Hibiscus sabdariffa L., poderá ser usado para substituir corantes artificiais cuja permanência na lista de corantes permitidos para alimentos é duvidosa.

O corante de M. arboreus deverá ser submetido a testes toxicológicos, a despeito de que flores desta planta sejam muito procuradas por beija-flores (Gottsberger 1971) que dela extraem o mel existente na parte interna do cálice, mostrando dessa forma, ausência de toxicidade.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Matéria-Prima

Utilizou-se neste trabalho flôres de Malvaviscus arboreus L., var. penduliforme, MALVACEAE (Schery 1942), das quais foram retirados os cálices verdes e as hastes. Parte das flores foram secadas em estufa de aeração à temperatura de 40°C até cerca de 7% de umidade, com a finalidade de es tocagem e a outra parte foi utilizada para extração imediata.

2. Processos de Extração

As flôres secas foram extraídas pelo processo de imersão e as flores frescas foram submetidas aos seguintes processos de extração:

- I. imersão
- II. imersão - percolação
- III. contra corrente em quatro estágios.

Os solventes usados para extração foram:

- (a) etanol 95^o GL - HCl concentrado (d=1,18) (97:3)(v/v)
- (b) água contendo SO₂ (1000 a 1500 ppm) sendo a fonte de SO₂ o metabi-sulfito de sódio.
- (c) solução aquosa de HCl 0,05 N

O solvente (a) foi considerado padrão para medida de extração de cor em relação aos solventes (b) e (c) devido à sua utilização tradicional em pesquisa de extração de antocianinas (Fuleki & Francis 1968a).

Após as extrações com os solventes (a) e (c) procedeu-se uma leve prensa-gem das flores com tecido de algodão rústico, seguindo-se a filtração, medida de volume e leitura da densidade ótica.

O procedimento geral empregado nas extrações de antocianinas quando se usou água contendo SO₂, envolveu as seguintes etapas:

- extração (por imersão, imersão-percolação e contra corrente);
- prensagem leve das pétalas utilizando-se tecido de algodão rústico;
- filtração e ajuste de pH em torno de 2,8-3 (Fuleki & Francis 1968a);
- eliminação do SO_2 em evaporador rotativo, sob vácuo e a temperatura de 40°C ;
- acerto do volume;
- medida da densidade ótica.

Em todas as experiências mediu-se a concentração de cor em espectrofotometro Berckman DBG, na faixa de 520 nm, sendo o valor de $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 875$ para solvente aquoso e $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 981$ para solvente etanólico.

O ajuste de pH do extrato foi feito com solução de HCl 6 N.

Nas extrações por imersão em água contendo SO_2 , estudou-se a variação de concentração de cor extraída em função da concentração de SO_2 em ppm, do tempo de imersão de pH do meio. (Tabelas 1, 2 e 3).

As extrações contra corrente simuladas em laboratório foram feitas em estágios, empregando-se dois tipos de solventes: água e SO_2 (1200 ppm) e solução de HCl 0,05N (Tabelas 4 e 5).

Nos primeiros experimentos, tentou-se a extração das pétalas secas e moidas, utilizando-se como solvente, água contendo SO_2 , não havendo extração e sim o aparecimento de mucilagem. Esse processo foi abandonado em virtude das dificuldades encontradas para a extração do corante. Fêz-se então a extração com as pétalas secas e inteiras mantendo-se o mesmo tempo de imersão, relação amostra: solvente de 1:30 variando-se apenas a concentração de SO_2 na faixa 1000 a 1500 ppm (Tabela 1).

TABELA 1. Extração de antocianinas de flores secas de Malva viscus arboreus por imersão em água contendo SO_2 em várias concentrações.

Relação amostra:solvente (g)	Concentração de SO_2 (ppm)	Tempo de imersão (hrs)	Concentração média de antocianinas. (mg/100g)
1:30			
1a. extração*	1000	2:30	125
2a. extração	1000	2:30	55
3a. extração	1000	2:30	75
Total			255
1:30			
1a. extração*	1200	2:30	137
2a. extração	1200	2:30	82
3a. extração	1200	2:30	70
Total			289
1:30			
1a. extração*	1500	2:30	137
2a. extração	1500	2:30	68
3a. extração	1500	2:30	70
Total			275

* O solvente foi renovado, na mesma proporção, a intervalos de 2:30 hr.

TABELA 2 - Extração de antocianinas de flores secas de Malvaviscus arboreus por imersão em água contendo 1200 ppm de SO_2 variando-se o tempo de imersão.

Relação amostra: solvente (g)	Tempo de imersão (hrs)	Concentração de antocianinas (mg/100g)
1:30	4	212
1:30	6	300
1:30	8	325
1:30	20	400

TABELA 3 - Extração de antocianinas de pétalas secas de Malvaviscus arboreus por imersão em água contendo 1200 ppm de SO_2 variando-se pH.

Relação amostra: solvente g	Concentração de SO_2 em ppm	Tempo de Extração hrs	pH do meio	Concentração de antocianinas mg/100g
1:30	1200	7	3	295
1:30	1200	7	3,8	310
1:30	1200	7	4	360

TABELA 4 Extração de antocianinas de flores frescas de *Malvaviscus arboreus* em corrente, quatro estágio, solvente água contendo 1200 ppm SO_2

BRANQUEAMENTO					EXTRAÇÃO DA CÔR							
Amostra Peso g	Volume do Vapor Con- densado	Peso da água absorvida g	Cor no vapor con- densado mg/ml	Umidade na Flor g/100g	EXTRATO MAIS CONCENTRADO				EXTRATO MENOS CONCENTRADO			
					Volume do Solvente ml	Volume de Extração ml	Cor mg/ml	Cor mg/100g	Volume do Solvente ml	Volume de Extração ml	Cor mg/ml	Cor mg/100g
1) 5	5	8,2	0,0457*	90	25	32	0,092	59	25	24,0	0,0199	9,50
2) 5	5	8,9	-	90	25	30	0,0587	53	25	24,5	0,0107	1,08
3) 5	3,5	7,0	0,0802**	90	25	32	0,129	64	25	26,0	0,0096	5,03
Média	4,5	8,03	0,063	90	25	31,33	0,0932	58,66	25	24,83	0,0134	5,20

* Cor total e, 5 ml de vapor condensado = 0,2285 mg

$$\text{Perda \%} = \frac{0,2285 \times 100}{5} = 4,57 \text{ mg/100g flores}$$

** Cor total em 3.5 ml de vapor condensado = 0,2807 mg

$$\text{Perda \%} = \frac{0,2807 \times 100}{5} = 5,61 \text{ mg/100g flores}$$

TABELA 5 . Extração de antocianinas de flores frescas de Malva viscus arboreus em contra corrente, quatro estágios, solvente solução aquosa de HCl 0,05 N.

BRANQUEAMENTO				EXTRAÇÃO DO COLORANTE							
				EXTRATO MAIS CONCENTRADO				EXTRATO MENOS CONCENTRADO			
Amostra Peso g	Umidade total g/100g	Vapor conden- sado ml	Peso do resíduo g	Volume do Solvente ml	Volume do Extrato ml	Conc. cor mg/ml	Cor mg/100g	Volume do Solvente ml	Volume do Extrato ml	Conc. Cor mg/ml	Cor mg/100g
5	93	2,3 ^(a)	7,3	25	18	0.048	43,3	25	27	0.0137	18,55
5	93	2,5 ^(b)	7,5	25	17,5	0.045	38,9	25	26	0,016	20,84
Medias		2,4	7,4		17,7	0.0046	40,6		26,5	0.0148	19,00

(a) Cor em 2,3 ml de vapor condensado = 0.110 mg
 Perda % = $\frac{0,1104}{5} \times 100 = 2,25$ mg/100g flores

(b) Cor em 2,5 ml de vapor condensado = 0.1125 mg
 Perda % = $\frac{0,1125}{5} \times 100 = 2,25$ mg/100g flores

3. Experimentos

Nas melhores condições encontradas de pH, tempo e concentração de dióxido de enxofre, foram feitos dois ensaios em escala maior. A finalidade foi observar possíveis variações ao se adaptar as condições empregadas para a escala se mi-industrial.

No primeiro ensaio utilizou-se 2,70 kg de pétalas frescas e 3,25 l de sol vente (água com 1200 ppm de SO_2) e a extração foi imersão à temperatura ambien te, durante 15 horas. Obteve-se 2,80 l de extrato com teor de sólidos solú veis de 3^o Brix e 23,50 mg de antocianinas por 100g de pétalas frescas.

No segundo experimento, empregou-se 2,30 kg de pétalas frescas de 2.80 l do mesmo solvente de extração e em condições idênticas as empregadas no ensaio anterior. Obteve-se 2,20 l de extração com 3^o Brix e 26,00 mg de antocianinas por 100g de pétalas frescas.

Os extratos resultantes dos dois ensaios foram juntados, filtrados e concen trados a 55^o Brix, sob pressão de 27 pol. de Hg, com agitação e temperatura de 70^oC, em tacho à vácuo com camisa de água quente. O teor de antocianinas foi de 345 mg por 100ml de concentrado.

No processo combinado de imersão e percolação, as flores frescas (18g) fo ram deixadas em contato com o líquido de extração (100 ml de uma solução aque sa contendo 1200 ppm de SO_2), durante 4 horas, em coluna de vidro de 5 cm de diâmetro e 30 cm de comprimento. Após esse período, fez-se a leitura de den sidade ótica. O líquido foi drenado a intervalos de uma hora, procedendo-se a seguir a leitura da densidade ótica. O mesmo líquido foi recolocado na colu na e essa operação foi repetida 4 vezes, quando se verificou o equilíbrio, não havendo mais variação da densidade ótica. O teor de antocianinas foi de 27,0 mg por 100g de pétalas frescas.

Na extração pelo processo em contra corrente, as flores frescas foram prê viamente submetidas ao branqueamento por vapor d'água, para facilitar a libe ração de cor. Verificou-se que o tempo ótimo de injeção de vapor ($0,5 \text{ kg/cm}^2$) foi de 45 segundos e nessas condições o tempo de extração foi de 2 horas. Esta beleceu-se um esquema de extração contra corrente em quatro estágios, a nível de laboratório, empregando-se água contendo 1200 ppm de SO_2 na proporção de 25 ml desse solvente para 5 g de pétalas. Observou-se, em média, no extrato

mais concentrado, um teor de antocianinas de 58,66 mg por 100 g de flores frescas e no extrato menos concentrado 5,20 mg de antocianinas por 100 g de flores frescas. (Tabela 4).

Esse procedimento foi repetido nas mesmas condições substituindo-se o solvente de extração por solução aquosa de HCl 0,05N. Verificou-se que o teor de antocianinas nesse caso, foi de 40,0 mg e 19,0 mg/100g de pétalas frescas nos extratos mais concentrado e menos concentrado, respectivamente. (Tabela 5).

Repetiu-se o ensaio com solução aquosa de HCl 0,05 N com e sem tratamento prévio de vapor nas flores. A extração da cor foi acompanhada pela medida da densidade ótica em intervalos de 1 hora (Tabela 6).

A Fig. 2 representa o processo de extração contra corrente em quatro estágios, simulada em laboratório.

O método convencional para extração de antocianinas utiliza etanol 95%GL HCl concentrado (97:3) (v/v) como solvente de extração (Fuleki & Francis 1968a). As condições de extração empregadas nesse processo foram flores frescas (25g), solvente (250ml), imersão à temperatura de 6°C durante 8 horas. O rendimento em antocianinas foi de 86 mg/100g de pétalas frescas. A umidade média das flores Malvaviscus arboreus foi de 93%.

Experiências seguindo esse método foram realizadas com a finalidade de comparar o rendimento de extração dos diversos processos nos quais foram empregados diferentes solventes.

TABELA 6 . Extração de antocianinas de *Malvaviscus arboreus* por imersão em solução aquosa de HCl 0,05 N, flores previamente submetidas ao branqueamento e não branqueadas.

Intervalo h	Peso g	Flores previamente branqueadas		Flores sem branqueamento		
		Volume Solvente ml	DO a 520 nm	Peso g	Volume Solvente ml	DO a 520 nm
0	5	25	-	5	25	-
3	5	25	0.22	5	25	0.25
4	5	25	0.22	5	25	0.31
5	5	25	0.24	5	25	0.35
6	5	25	0.30	5	25	0.40
20	5	25	0.36	5	25	0.50

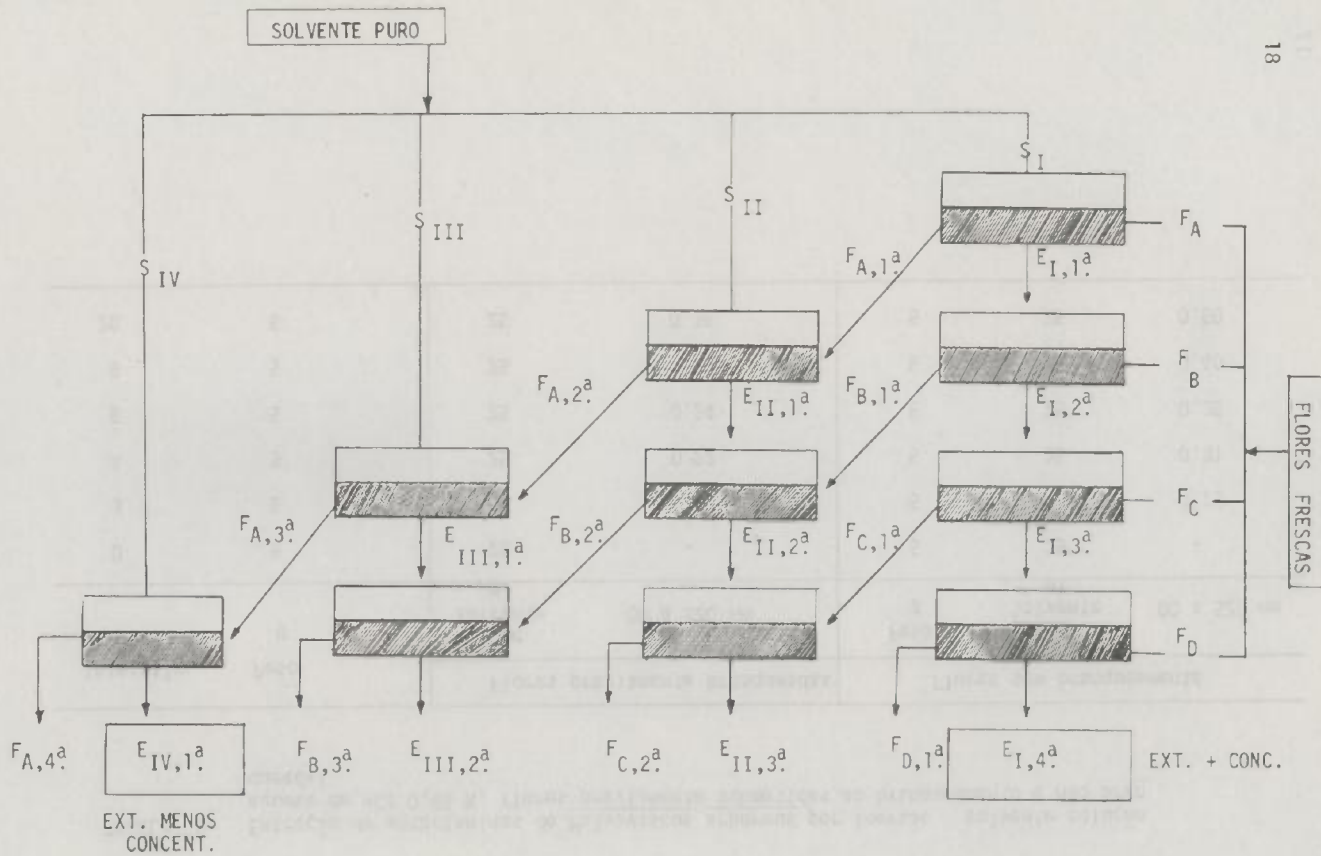


FIG. 2 - Diagrama representativo da extração contra corrente em 4 estágios.

4. Separação e isolamento das antocianinas

Para a separação das antocianinas componentes do extrato de Malvaviscus arboreus, empregou-se a técnica padrão de cromatografia em papel descrita por Fuleki & Francis 1968b, 1968c).

O concentrado foi aplicado em folhas de papel Whatman Nº 3 MM (46x57cm) e eluido pela técnica de cromatografia descendente com a fase superior da emulsão de n-butanol-ácido acético glacial-água (4:1:5) até se obter o máximo de separação. A numeração dos pigmentos iniciou pela antocianina com menor velocidade de deslocamento. O cromatograma desenvolvido mostrou quatro pigmentos distintos e após secagem, o papel foi cortado em quatro tiras, cada uma das quais correspondeu a um pigmento diferente. As tiras foram eluidas com metanol-ácido glacial-água (90:5:5), o solvente foi evaporado sob vácuo em evaporador rotativo à temperatura de 30°C. Cada pigmento foi purificado pelo tratamento com os sistemas de solventes na seguinte ordem: solução de HCl concentrado 1% (p/v), n-butanol-ácido acético glacial-água (4:1:5) (Francis 1982).

5. Identificação da principal antocianina

Identificação dos pigmentos foi feita seguindo-se os métodos descritos por Francis (1982), através dos quais foram determinados R_f das agliconas e dos açúcares em papel Whatman nº 1 usando-se os sistemas de solventes específicos para cada grupo.

Foi identificado o pigmento em maior concentração no extrato (pigmento nº 2), que possui como aglicona a pelargonidina e glicose como açúcar ligado na posição 3. A confirmação foi feita através da hidrólise do constituinte principal do extrato vermelho das bractees de Poinsettia pulcherrima (bico de pagão), EUPHORBIACEAE (Francis 1982)¹.

O concentrado das flores de M. arboreus foi aplicado em alimentos em combinação ou não com outro corante. Por exemplo, em mistura com o concentrado de

¹ Francis, F.J. Comunicação Pessoal. Rio de Janeiro, CTAA-EMBRAPA, 1982.

antocianinas extraídas das uvas foi adicionado às gelatinas e refrescos os quais adquiriram cor típica de framboesa. Ao ser usado puro em gelatinas e iogurtes, esses produtos apresentaram cor típica de pêssego.

Um dos processos descritos nesse trabalho é inédito, no que se refere à extração realizada à temperatura ambiente e utilização de baixa concentração de dióxido de enxofre. Foi por isso solicitado ao Instituto Nacional de Propriedade Industrial (MIC) um pedido de privilégio de invenção.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A sensibilidade das antocianinas quanto ao pH, luz, temperatura, presença de ácido ascórbico, metais e oxigênio, tem sido amplamente estudada (Lukton et al. 1956; Nebesky et al. 1949, Tressler & Pederson 1936; Meschter 1953; Starr & Francis 1968 e Wrolstad & Erlandson 1973).

Na escolha de qualquer processo de extração das antocianinas, há necessidade de se considerar os fatores citados acima para evitar ou diminuir as perdas de cor durante a obtenção dos pigmentos.

Nesse trabalho buscou-se estabelecer condições de extração eficientes dos corantes das flores de *Malvaviscus arboreus*. Com essa finalidade empregou-se dióxido de enxofre (SO_2) para facilitar a liberação do corante dos tecidos das flores (Timberlake & Bridle 1971).

O dióxido de enxofre tem ação descolorante que pode ser reversível por acidificação. Por outro lado, excesso de SO_2 (0,8 a 1,5%) em contato com a matéria-prima por longo tempo, tem efeito descolorante irreversível resultando no branqueamento do material (Markakis 1982). Para selecionar a concentração ótima de SO_2 a ser empregada de modo a se obter rendimento máximo nas extrações, foram feitos ensaios cujos resultados são apresentados na Tabela 1.

Verificou-se por estes experimentos que a melhor concentração de dióxido de enxofre foi de 1200 ppm que resultou num rendimento de 289 mg de antocianinas por 100g de pétalas secas. Vale ressaltar que esse resultado inclui três extrações da mesma amostra.

A extração das pétalas de *M. arboreus* com etanol-ácido clorídrico (97:3) durante 8 horas, forneceu 385 mg de antocianinas por 100g de pétalas secas. O processo que emprega SO_2 extrai cerca de 75% das antocianinas, em relação a extração padrão com álcool-ácido (97:3) adotado por Fuleki & Francis (1968a).

Apesar do rendimento ser superior quando se emprega álcool-ácido a este ser um solvente relativamente barato, o processo se torna desvantajoso devido à sua recuperação ser incompleta ou seja, cerca de 20% fica absorvida pelo resíduo.

Por outro lado, o volume, do líquido de extrações (1:90) quando se usa água contendo SO_2 , é bastante grande, sendo necessário gasto adicional de energia para concentração do mesmo, o que torna o processo economicamente inviável.

A Tabela 2 mostra os resultados dos ensaios nos quais manteve-se a concentração de SO_2 em 1200 ppm, reduziu-se a proporção do líquido de extração de 1:90 para 1:30 e variou-se o tempo de extração. Verificou-se que até 20 horas de contato das flores com o solvente não houve perda da cor e nesse caso, o rendimento foi superior ao da extração com etanol-HCl (97:3).

Na Tabela 3 estão os resultados de extração nas quais variou-se o pH do meio, mantendo-se a concentração de SO_2 e fixando-se o tempo em 7 horas para que a extração fosse realizada durante o dia. Nessas condições, o melhor rendimento foi conseguido em pH em torno de 4.

Repetiram-se em dois experimentos, as condições ideais estabelecidas nos diversos ensaios, porém, mudou-se a proporção entre matéria-prima-solvente que passou a ser 1:1,2. No primeiro ensaio usou-se 2,70 kg de pétalas frescas e 3,25l de solvente (água contendo 1200 ppm de SO_2) e no segundo 2,30 kg de flores frescas e 2,80 l de solvente. Os dois ensaios forneceram 5 litros de extrato com teor de sólidos solúveis de 3^o Brix que foi concentrado até 55^o Brix com 345 mg de antocianinas por 100 ml de concentrado. Quanto ao aspecto econômico, essa extração é vantajosa uma vez que o solvente empregado é a água e o volume de líquido a ser concentrado foi reduzido, embora a concentração de antocianinas no extrato inicial seja relativamente baixa quando comparada ao processo que utiliza álcool-ácido (97:3).

As extrações por imersão seguida de percolação não contribuíram para aumentar a eficiência em geral.

Para reduzir o tempo de extração no processo que emprega água contendo 1200 ppm de SO_2 , estudou-se o efeito do vapor nas flores de Malvaviscus arboreus, para facilitar a liberação do corante. Observou-se que o tempo ótimo de injeção de vapor nas pétalas se situava em torno de 40 segundos. Após o branqueamento, esgotou-se o vapor condensado e iniciou-se a extração contra corrente. Nessas condições conseguiu-se redução do tempo de extração de 7 para 2 horas. Obteve-se nos extratos de 3 ensaios, um teor médio de antocianinas de 58,66 mg/100g de pétalas frescas, o que equivale a cerca de 70% das extrações com álcool-ácido (97:3) (Tabela 4).

Os experimentos realizados em condições idênticas às anteriores, porém substituindo-se a água contendo SO_2 por solução aquosa de HCl 0,05N, tiveram como finalidade a obtenção de um produto isento de dióxido de enxofre residual, além de verificar o rendimento em corantes. Nas atuais condições, obteve-se um teor médio de 40,6 de antocianinas por 100g de pétalas frescas, ou seja, cerca de 50% do rendimento comparado ao método padrão de Fuleki & Francis (1968a) (Tabela 5). Este processo mostrou ser relativamente melhor que os anteriores, embora com rendimento menor, uma vez que não havendo SO_2 , eliminam-se duas etapas no processo: a da correção de pH e a da evaporação do dióxido de enxofre, obtendo-se ainda um produto de melhor qualidade.

Para verificar a necessidade ou não de se submeter a matéria-prima ao branqueamento por vapor d'água, foram realizadas duas experiências com solução aquosa de HCl 0,05N em contra corrente. O desempenho das extrações foi acompanhado pela medida da densidade ótica em intervalos de 1 hora. Observou-se densidades óticas mais elevadas para as flores que não foram submetidas ao tratamento por vapor d'água, sugerindo melhor extração. (Tabela 6).

CONCLUSÕES

As flores de Malvaviscus arboreus são matéria-prima de baixo custo, contendo teor elevado em antocianinas, podendo ser fonte de corantes para adição em alimentos, após aprovação nos testes toxicológicos exigidos pela legislação de alimentos.

A concentração de antocianinas obtidas das flores variou de 350 mg a 1200 mg por 100g de matéria-prima seca, dependendo do processo empregado na extração desses pigmentos (Tab. 7). Para ser economicamente viável, a concentração de antocianinas totais, extraídas pelo método padrão (álcool-ácido) nas matérias-primas deve ser:

material fresco	50 mg%	
concentrado	250 mg%	Bom
concentrado	1.000 mg%	Excelente

Concentração inferior a 50 mg% no extrato é inviável (Philip 1983)². O teor de antocianinas no concentrado de M. arboreus foi de 345 mg% e no extrato alcóolico foi de 86 mg de antocianinas por 100g de flores frescas.

A extração dos corantes com álcool-ácido, apesar de fornecer melhor rendimento, não é economicamente viável, devido à grande retenção (cerca de 20%) do álcool no resíduo, dificultando sua recuperação.

Extrações que envolvem o branqueamento prévio das flores seguidas de extração contra corrente com água contendo 1200 ppm de SO₂, apresentam vantagens de facilitar a liberação dos corantes e de reduzir o tempo de extração dos mesmos, o que tratando-se de antocianinas é importante, evitando-se dessa maneira a exposição prolongada dos pigmentos ao oxigênio e à luz.

O processo de extração que envolve o uso de solução aquosa de ácido clorídrico 0,05N em contra corrente mostrou ser o mais viável, embora o rendimento nesse caso seja de 70% quando comparado com o rendimento do processo onde se emprega SO₂ em contra corrente. Entretanto, esse processo além de eliminar 2 etapas do processo anterior não tem os inconvenientes da presença da SO₂ residual no concentrado. Embora em baixa concentração, o SO₂ residual nos concentrados de corantes é pouco desejável para certos produtos a que se destinam.

Todos os processos ensaiados foram realizados à temperatura ambiente, condições excelentes para as antocianinas, uma vez que o efeito da temperatura na estabilidade dessas substâncias é desastroso: são rapidamente destruídas quando submetidas à temperaturas moderadamente elevadas.

² PHILIP, T. Comunicação Pessoal. Rio de Janeiro, CTAA-EMBRAPA, 1983

TABELA, 7. Resumo dos melhores rendimentos obtidos nos diferentes processos de extração das flores de Malvaviscus arboreus.

	Antocianinas mg/100g	Relação	Tempo de	
matéria úmida	matéria seca	matéria-prima:solvente	extração (h)	
Extração álcool-ácido flores secas c/7% umidade	385	414	1:5	15
Extração álcool-ácido flores frescas c/93% umidade	86	1228	1:5	15
Extração por imersão água SO ₂ 1200ppm flores secas c/7% umidade	360	387	1:30	8
Extração por imersão, água SO ₂ 1200ppm flores frescas c/93% umidade	24,35	347,86	1:1,2	15
Extração contra corrente, 4 estágios, água SO ₂ 1200ppm flores frescas c/93% umidade	58,66	838	1:25	2
Extração contra corrente, 4 estágios, HCl 0,05N flores frescas com 93% umidade	40,60	580	1:25	2

Foi identificada a aglicona do constituinte principal do corante extraído das flores de Malvaviscus arboreus como sendo a pelargonidina, antocianidina permitida pela legislação brasileira.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Dr. ROMEO TOLEDO, do Departamento de Ciências de Alimentos da Universidade de Georgia (USA) e consultor do CTAA-EMBRAPA (Abril a Junho 1983), pela orientação dada nos processos de extração contra corrente.

Ao Dr. ESDRAS SUNDFELD, pesquisador do CTAA, somos gratos pela orientação dada na adaptação dos dados de laboratório para o fluxograma da Figura 2.

Nossos agradecimentos ao Dr. RODRIGO OTÁVIO TEIXEIRA NETO, do ITAL, Campinas, pela concentração do extrato de M. arboreus, preparado sob sua orientação.

Agradecemos ao Dr. F.J. FRANCIS, do Departamento de Ciências e Nutrição da Universidade de Massachusetts, Amherst (USA) e consultor do CTAA-EMBRAPA (Agosto a Setembro de 1982) pelos ensinamentos recebidos na identificação de antocianinas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASEN, S.; STEWART, R.N. & NORRIS, K.H. Anthocyanin and pH involved in the color of "Heavenly Blue" Morning Glory. Phytochemistry, 16:1118-9, 1977.
- BUCKMIRE, R.E. & FRANCIS, F.J. Pigments of Miracle fruit, Synsepalum dulcificum, Shum, as potencial food colorants. J. Food Sci., 43:908-11, 1978.
- DU, C.T. & FRANCIS, F.J. Anthocyanins of Roselle (Hibiscus sabdariffa, L.). J. Food Sci., 38:810-2, 1973.
- ESSELEN, W.B. & SAMMY, G.M. Roselle - a natural red colorant for foods? Food Prod. Dev., 7 (1):80-6, 1973.

- ESSELEN, W. B. & SAMMY, G.M. Applications for Roselle as a red food colorant. Food Prod. Dev., 9(1):37-8, 40, 1975.
- FORNI, E.; TRIFILO, A. & POLESELLO, A. Researches on the utilization of the pigment from Phytolacca decandra L. as a food colorant: Part 1 - Preparation of an extract free from toxic substances. Food Chem., 10 (1):35-46, 1983.
- FRANCIS, F.J. Symposium: utilization of plant pigments anthocyanins as food colors. Food Technol., 29 (5):52-4, 1975.
- FRANCIS, F.J. Analysis of Anthocyanins. In: MARKAKIS, P. Anthocyanins as food colors. New York, Academic Press, 1982. p. 181-207.
- FULEKI, T. & FRANCIS, F.J. Quantitative methods for anthocyanins.
I. Extraction and determination of total anthocyanin in cranberries. J. Food Sci., 33(1):72-7, 1968a.
- FULEKI, T. & FRANCIS, F.J. Quantitative methods for anthocyanins.
II. Determination of total anthocyanin and degradation index for cranberry juice. J. Food Sci., 33 (1):78-83, 1968b.
- FULEKI, T. & FRANCIS, F.J. Quantitative methods for anthocyanins.
III. Purification of cranberry anthocyanins. J. Food Sci., 33(3):281-3, 1968c.
- GEISSMAN, T.A. The chemistry of flavonoid compounds. Oxford, Pergamon, 1962. p. 248-85.
- GOODWIN, T.W. Chemistry and biochemistry of plant pigments. 2.ed. London, Academic Press, 1976. 2v. p. 436-63.
- GOTTSBERGER, G. Colour change of petals in Malva viscosa flowers. Acta Bot. Neerl., 20 (4):381-8, 1971.
- GUEFFROY, D.E.; KEPNER, R.E. & WEBB, A.D. Acylated anthocyanins pigments in Vitis vinifera grapes: identifications of malvidin 3- (6-p-coumaroyl glucoside). Phytochemistry, 10: 813, 1971.
- HARBORNE, J.B. Plant polyphenols XI. Structure of acylated anthocyanin. Phytochemistry, 3 (1):151-60, 1964.

- HARBONE, J.B. Comparative biochemistry of the flavonoids. New York, Academic Press, 1967. p.818-30.
- HRAZDINA, G. & FRANZESE, A.J. Structure and properties of the acylated anthocyanins from *Vitis* species. Phytochemistry, 13(1):225-9, 1974.
- HULME, A.C. The Biochemistry of fruits and their products. 3.ed. London, Academic Press, 1970. 2v.
- KIKUCHI, K.; CHIBA, A.; MIYAKE, K.; NAKAI, T. & TOKUDA, M. Anthocyanin food coloring agent from purple corn. Sugiyama Industrial Chemical Institute, 1977, 2 p., apud Chem. Abstr., 88:470, 1978 (Abstract 150953u).
- LUKTON, A.; CHICESTER, C.O. & MAC KINNEY, G. The breakdown of strawberries anthocyanin pigment. Food Technol., 10:427-32, 1956.
- MAIN, J.H.; CLYDESDALE, F.M. & FRANCIS, F.J. Spray drying anthocianin concentrates for use as food colorants. J. Food Sci., 43: 1693-4, 1978.
- MARKAKIS, P. Anthocyanins as food additives. In: MARKAKIS, P. Anthocyanins as food colors. New York, Academic Press, 1982. p. 245-52.
- MARMION, D.M. Handbook of U.S. colorants for food, drugs and cosmetics. New York, John Wiley & Sons, 1979. p. 21-7.
- MESCHTER, E.E. Effects of carbohydrates and other factors on color loss in strawberry products. J. Agric. Food Chem., 1:574-9, 1953.
- NEBESKY, E.A.; ESSELEN, W.B.; Mc CONNELL, J.E.W. & FELLERS, G. Stability of color in fruit juices. Food Res., 14:261-74, 1949.
- SCHERY, R.W. Monography of Malvaviscus. Ann. Mo. Bot. Gard., 29:223, 1942.
- STARR, M.S. & FRANCIS, F.J. Oxygen and ascorbic acid effect on the relative stability of four anthocyanin pigments in cranberry juice. Food Technol., 22 (10):1923-5, 1968.
- TIMBERLAKE, C.F. & BRIDLE, P. The anthocyanins of apples and peas: the occurrence of acyl derivatives. J.Sci.Food Agric., 22:509-13, 1971.

TRESSLER, D.K. & PEDERSON, C.S. Preservation of grape juice. II. Factors controlling the rate of deterioration of bottled concord juice. Food Res., 1:87-97, 1936.

WROLSTAD, R.E. & EKLANDSON, J.A. Effect of ions on the color of strawberry puree. J. Food Sci., 38:460-3, 1973.