

ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA E BIOLÓGICA DE CONCENTRADOS DE PIGMENTOS ANTOCIÂNICOS OBTIDOS DE BAGAÇOS DE UVA

M. I. SPRANGER-GARCIA *, A. P. BELCHIOR *,
M. C. LEANDRO *, C. SANTOS **

* Estação Vitivinícola Nacional. Dois Portos, 2575 Runa.

** Instituto Gulbenkian de Ciência. 2780 Oeiras.

RESUMO

Verificou-se por cromatografia líquida de alta pressão que 94 a 98 % das antocianinas presentes nos concentrados de pigmentos obtidos de bagaços de uva são os 3-glucósidos da malvidina, peonidina, petunidina, cianidina e delphinidina, apresentando-se o primeiro como predominante (41 a 54 %).

A estabilidade destes concentrados é condicionada não só por factores físico-químicos: luz, temperatura, pH, oxigénio, presença de copigmentos, que estão inter-relacionados, como também por factores de natureza biológica.

O aparecimento de turvação de natureza microbiológica conduziu ao isolamento de uma levedura apresentando características muito peculiares, resistente às diferentes condições de preparação dos concentrados de pigmento. Os testes bioquímicos e morfológicos efectuados permitiram identificá-la como uma *Candida ishivadae*, descrita por Sugiyama e Goto (1969) baseada numa estirpe isolada do solo no Japão, sendo esta a segunda estirpe desta espécie a ser relatada.

INTRODUÇÃO

A estabilidade química e biológica aliada à solubilidade em água e à ausência de sabores e aromas indesejáveis são factores essenciais na utilização de corantes de origem vegetal.

Os processos tecnológicos utilizados na produção dos concentrados de pigmentos antociânicos obtidos a partir de bagaços de uva influem na sua composição. Para além dos compostos antociânicos, componentes maioritários destes concentrados, outros constituintes existem, uns de natureza fenólica que poderão

actuar como copigmentos intensificando a cor, outros indesejáveis, em particular, os que poderão ser fonte nutricional para diversos microorganismos.

A conservação destes concentrados durante períodos mais ou menos dilatados é condicionada por diferentes factores que intervêm sobre a estabilidade das antocianinas, nomeadamente pH, temperatura, luz, condições de oxigenação e teor de humidade. Estes factores são mais acentuados nos concentrados sob forma líquida do que nos que são submetidos a processos de secagem. Esta é aliás vantajosa do ponto de vista de estabilidade biológica.

Neste trabalho apresentam-se os principais resultados já obtidos acerca dos factores condicionantes da estabilidade dos concentrados de pigmentos antociânicos, sendo caracterizada uma levedura isolada destes concentrados e adaptada a estes meios, e que se julga ser responsável por alterações de natureza microbiológica.

MATERIAL E MÉTODOS

Nos ensaios realizados utilizaram-se concentrados de pigmentos obtidos a partir de bagaços de uva por extracção com água sulfitada a 2 g.dm^{-3} (expresso em SO_2) e purificação por técnicas de adsorção-desadsorção, com excepção do concentrado IV obtido por concentração do extracto sem purificação prévia. O concentrado V foi purificado por adsorção sobre talco Luzenac ADSO1, sendo os restantes purificados com resina, Duolite S761, de esqueleto formofenólico.

A concentração efectuou-se por evaporação sob vácuo a uma temperatura inferior a 35°C .

A levedura em estudo foi isolada de um concentrado de pigmentos preparado segundo a metodologia descrita.

Métodos analíticos

Antocianinas totais — método espectrofotométrico baseado na descoloração das antocianinas pelo hidrogenossulfito de sódio em meio ácido (Ribéreau-Gayon e Stonestreet, 1965).

pH — método potenciométrico (Anónimo, 1978).

Avaliação qualitativa da matéria corante — método espectrofotométrico após fracionamento da matéria corante (antocianinas monómeras-M, polímeros vermelhos-PV e polímeros castanhos-PC) por cromatografia em coluna (Bourzeix e Heredia, 1985).

Cor — método espectrofotométrico (A520).

% cor remanescente — razão entre as absorvências (A520) nos instantes t e inicial $(A_t/A_0) \times 100$.

Análise das antocianinas — cromatografia líquida de alta pressão (Roggero *et al.*, 1987; Spranger-Garcia, 1988).

Testes de identificação da levedura — métodos descritos por Yarrow e Van der Walt (1984).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Composição antociânica dos concentrados de pigmentos

A composição antociânica dos concentrados foi efectuada por recurso à cromatografia líquida de alta pressão.

Condições cromatográficas

- Coluna: Lichrosorb RP 18 ($5 \mu\text{m}$), 4×250 mm.
- Solventes: A ácido fórmico-água (10:90 v/v); B acetonitrilo-ácido fórmico-água (30:10:60 v/v).
- Fluxo: $0,7 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$.
- Perfil de eluição: gradiente linear de 20 a 85% de B em 70 minutos.
- Detecção: $\lambda = 525 \text{ nm}$.
- Temperatura: ambiente.

Verifica-se da análise dos cromatogramas apresentados na Fig. 1 que as principais antocianinas nos concentrados analisados são os 3-glucósidos, os quais representam de 94 a 98% da área total das antocianinas presentes (Quadro I). De entre estes é o derivado da malvidina o predominante (41 a 54%).

A nítida diferença de composição do concentrado III, ausência dos derivados da delphinidina, trihidroxilado, e diminuta percentagem dos derivados da cianidina e petunidina dihidroxilados em *orto*, facilmente oxidáveis, é atribuída às deficientes condições de fabrico deste concentrado.

QUADRO I

Composição antocianina de três concentrados de pigmentos.

Composition anthocyanique de trois concentrés de pigments

| Concentrado de pigmento | Esteres dos 3-glucosídeos | | | | | | | | | | Total | | | | |
|-------------------------|---------------------------|-----|------|------|------|----------|-----|-----|-----|-----|-------|-------------|-----|-----|-----|
| | 3 Glucosídeos | | | | | Acéticos | | | | | | p-Cumáricos | | | |
| | Df | Cn | Pt | Pn | Mv | Total | Df | Cn | Pt | Mv | | Total | Mv | Pn | Mv |
| I | 17,1 | 3,6 | 18,1 | 13,9 | 41,4 | 94,3 | — | — | 0,4 | 0,7 | 1,2 | 0,9 | 0,5 | 1,9 | 5,7 |
| II | 6,6 | 4,2 | 10,1 | 25,9 | 49,1 | 95,9 | 0,4 | 0,4 | 0,8 | — | 0,8 | — | 0,6 | 1,1 | 4,1 |
| III | — | 1,4 | 2,3 | 40,9 | 53,5 | 98,1 | — | — | — | — | — | — | — | 1,9 | 1,9 |

(Valores expressos em percentagem de área total das antocianinas integradas).

(Valeurs exprimés en pourcentage de l'aire intégrée des anthocyanines totaux).

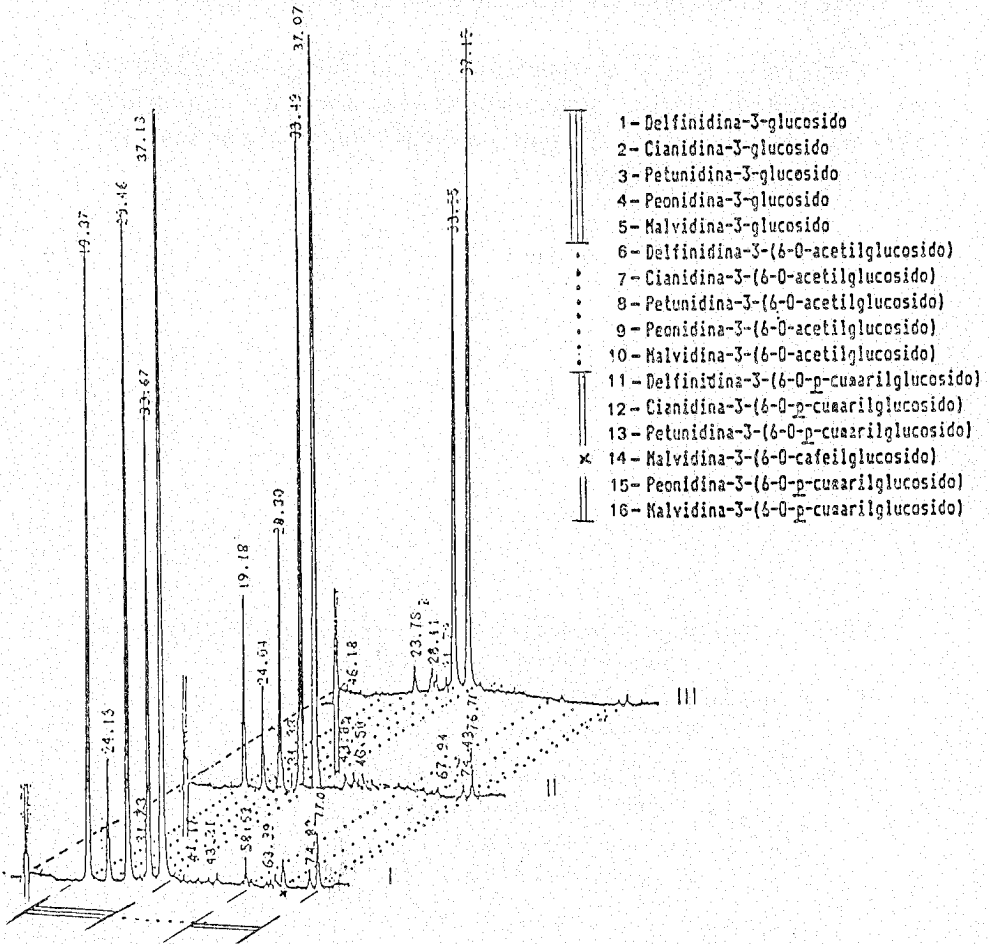


Fig. 1 — Cromatogramas das antocianinas de três concentrados de pigmentos.

Chromatogrammes des anthocyanines de trois concentrés de pigments.

Factores influentes na estabilidade

Físico-químicos

Temperatura

A evolução do teor em antocianinas ao longo do tempo dos concentrados IV e V conservados na obscuridade, a 4 e 20°C, com e sem adição de ácido ascórbico (40 mg.dm⁻³) após remoção

do oxigénio dissolvido por saturação com azoto, é apresentada na Fig. 2.

Verifica-se que a temperatura é um factor determinante na estabilidade destes concentrados em face do importante aumento da velocidade de polimerização das antocianinas por elevação daquele parâmetro.

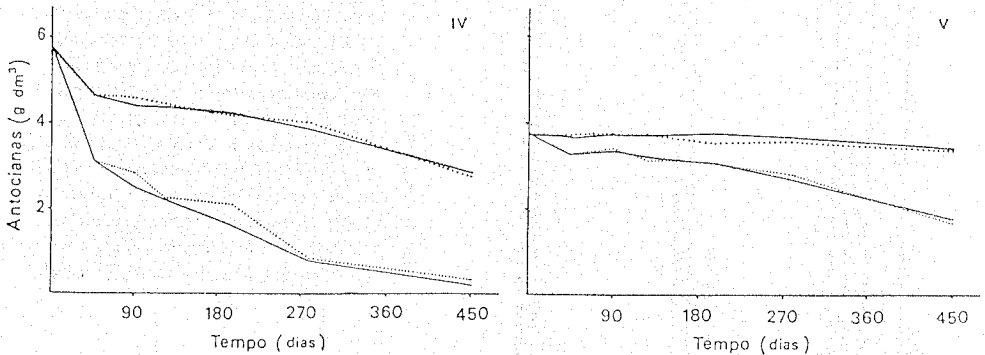


Fig. 2 — Influência da temperatura na estabilidade das antocianinas em concentrados de pigmentos.

Testemunha (—); com adição de ácido ascórbico (..).
Temperatura 4°C (—); 20°C (—).

Influence de la température dans la stabilité des anthocyanines de concentrés de pigments.

*Témoin (—); avec addition de l'acide ascorbique (..).
Temperatura 4°C (—); 20°C (—).*

Palamidis e Markakis (1975) observaram efeitos idênticos na pigmentação de bebidas carbonatadas com extractos de pigmentos da mesma origem. Contudo, a velocidade de polimerização depende da natureza dos pigmentos, pois como foi observado por Simard *et al.* (1981) a velocidade de polimerização das antocianinas em mostos de *Vaccinium angustifolium*, conservado em condições semelhantes, era consideravelmente maior.

A secagem destes concentrados poderá aumentar significativamente a estabilidade face à temperatura atendendo aos resultados apresentados por Shewfelt e Ahmed (1978) relativamente às antocianinas da couve roxa.

Ácido ascórbico

O ácido ascórbico, antioxidante vulgarmente usado na indústria alimentar, não induz nas condições do ensaio à degradação oxidativa das antocianinas que poderia ocorrer na presença de oxigénio (King *et al.*, 1979).

A utilização nestes ensaios de concentrados submetidos ou não a um processo de purificação permite-nos concluir que a estabilidade das antocianinas nos concentrados purificados é nitidamente superior. Este facto é também evidenciado pelos resultados apresentados no Quadro II (concentrados IV e V).

QUADRO II

Influência do tempo de conservação na estabilidade das antocianinas dos concentrados de pigmentos

Influence du temps de conservation dans la stabilité des anthocyanines des concentrés de pigments

| Concentrados de pigmentos | Composição final | | | | Composição final | | | | Perda de antocianinas |
|---------------------------|------------------------------------|-------|--------|--------|------------------------------------|-------|--------|--------|-----------------------|
| | Antocianinas (g.dm ⁻³) | M (%) | PV (%) | PC (%) | Antocianinas (g.dm ⁻³) | M (%) | PV (%) | PC (%) | |
| I | 5,7 | 94 | 4 | 2 | 4,6 | 94 | 4 | 2 | 19 |
| II | 3,4 | 91 | 6 | 3 | 2,8 | 87 | 7 | 6 | 18 |
| III | 5,3 | 66 | 25 | 9 | 2,2 | 62 | 26 | 11 | 59 |
| IV | 5,7 | 85 | 11 | 4 | 2,9 | 66 | 21 | 13 | 50 |
| V | 3,8 | 89 | 7 | 4 | 3,5 | 88 | 7 | 5 | 8 |

Tempo de conservação dos concentrados: I, II — 24 meses; III — 36 meses; IV, V — 15 meses. Temperatura: 4°C.

Temps de conservation des concentrés: I, II — 24 mois; III — 36 mois; IV, V — 15 mois. Temperature: 4°C.

A quebra inicial do teor em antocianinas nos concentrados não purificados atribui-se à coprecipitação daqueles compostos com o hidrogenotartarato de potássio, evidenciado pela formação de um depósito de aspecto cristalino intensamente corado de vermelho.

pH

Outro factor condicionante da estabilidade destes concentrados é o pH do meio. Na Fig. 3 representa-se a evolução do teor em antocianinas em função do pH de quatro concentrados conservados à temperatura de 4°C.

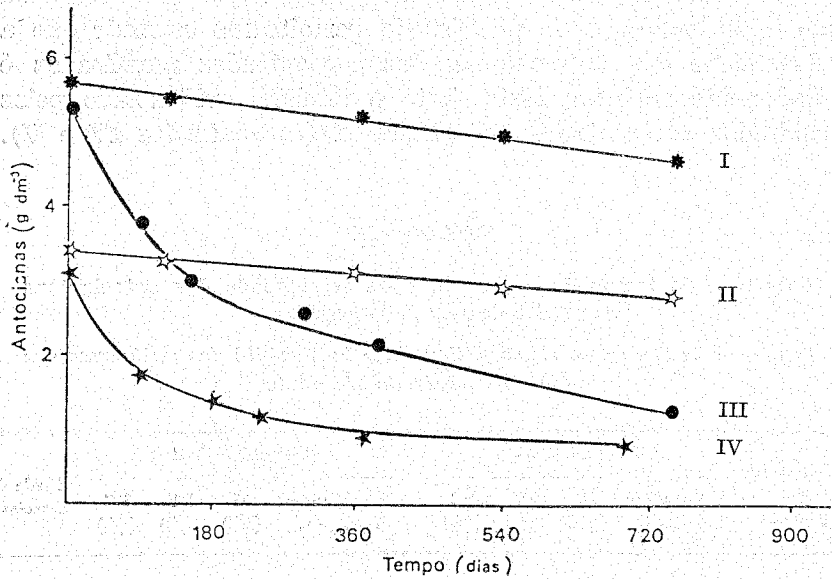


Fig. 3 — Influência do pH na estabilidade das antocianinas em concentrados de pigmentos.

* pH = 1,03; ☆ pH = 1,37; ★ pH = 2,41; ● pH = 2,54.

Influence du pH dans la stabilité des anthocyanines des concentrés du pigments.

* pH = 1,03; ☆ pH = 1,37; ★ pH = 2,41; ● pH = 2,54.

Verifica-se que a perda de antocianinas ao longo do período de conservação é muito mais acentuada nos concentrados III e VI com valores de pH mais acentuados, da ordem de 2,5, valor este próximo do pK_h da reacção de hidratação das antocianinas responsável pela formação da estrutura carbinol, incolor. Embora os resultados apresentados sejam referentes a concentrados distintos, observou-se um efeito similar em concentrados cujo pH ≈ 1,0 foi elevado para um valor próximo de pH = 3,0

por adição de hidróxido de sódio. Verifica-se assim uma nítida influência do abaixamento do pH do meio, na estabilidade das antocianinas ao longo do tempo de conservação.

Luz

Outro factor considerado influente na estabilidade das antocianinas é a luz.

O seu efeito negativo foi já observado em extractos antocianicos (Spranger-Garcia *et al.*, 1982). Neste trabalho evidencia-se a sua acção em soluções modelo pigmentadas a diferentes níveis de concentração e expostas à acção directa da luz solar.

Da análise do Quadro III conclui-se que a perda de cor das soluções pigmentadas é tanto maior quanto maior o factor de diluição.

QUADRO III

Influência da luz solar na cor de soluções modelo pigmentadas com aditivos antocianicos

Influence du plein soleil dans la couleur de solutions modèle colorées avec additives anthocyaniques

| Tempo de exposição à luz solar (dias) | % Cor remanescente | | | | | | | | |
|---------------------------------------|--------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | A* | | | B* | | | C* | | |
| | pH = 2,55 | pH = 3,02 | pH = 3,75 | pH = 2,55 | pH = 3,02 | pH = 3,75 | pH = 2,55 | pH = 3,02 | pH = 3,75 |
| 0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 2 | 95 | 90 | 79 | 74 | 72 | 68 | 25 | 31 | 42 |
| 5 | 91 | 77 | 62 | 62 | 54 | 61 | 17 | 20 | 30 |
| 12 | 68 | 36 | 40 | 29 | 19 | 33 | 11 | 6 | 8 |
| 16 | 63 | 19 | 34 | 20 | 14 | 32 | 1 | 4 | 6 |

* Teor em antocianinas nas soluções modelo: A — 450 mg.dm⁻³; B — 200 mg.dm⁻³; C — 50 mg.dm⁻³.

Teneur en anthocyanines en solutions modèle: A — 450 mg.dm⁻³; B — 200 mg.dm⁻³; C — 50 mg.dm⁻³.

A aceleração da decomposição fotoquímica das antocianinas com a diluição atribui-se ao efeito desta no mecanismo de auto-associação. Este mecanismo de associação molecular das antocianinas em soluções concentradas foi observado por diversos

autores (Asen *et al.*, 1972; Scheffdelt e Hrazdina, 1978; Timberlake, 1980).

Dos resultados apresentados verifica-se também uma nítida influência do pH do meio na velocidade de descoloração das antocianinas nas soluções pigmentadas com o tempo de exposição à luz solar. Os resultados sugerem que a maior resistência à degradação fotoquímica a pH = 2,55 se deve à auto-associação das estruturas flavíio das antocianinas. A valores de pH mais elevados (pH = 3,0) os complexos formados por associação molecular são menos resistentes à degradação fotoquímica. A reacção de hidratação e a auto-associação são competitivas. No entanto para valores de pH = 3,75 superior ao pK'a de reacção de desprotonação conducentes à formação da estrutura quinona a perda de cor é menos acentuada. A associação molecular das estruturas quinonas poderá contribuir também para uma estabilização de cor.

Copigmentação

Dada a importância do mecanismo foto-oxidativo na perda de cor das antocianinas, procurou determinar-se o efeito da adição de copigmentos na protecção da cor das antocianinas em sistemas modelos pigmentados. Os resultados apresentados no Quadro IV referem-se a soluções modelo tamponizadas a valores de pH respectivamente 2,55 (X), 3,02 (Y) e 3,75 (Z) e coradas com 450 mg.dm⁻³ de concentrados de pigmentos.

Utilizaram-se como copigmentos a quercetina e a rutina (quercetina-3-ramnoglucósido) que foram adicionados na razão de 1 g.dm⁻³ aos sistemas modelo.

Verifica-se pelos resultados apresentados que a copigmentação desempenha um importante efeito fotoprotector das antocianinas. Este efeito é mais acentuado utilizando como copigmento flavónico a rutina do que a aglícona correspondente.

Embora a protecção à descoloração foto-oxidativa das antocianinas pelo mecanismo da copigmentação seja observado nos sistemas modelo a diferentes níveis de pH, verifica-se que esse efeito é mais acentuado a pH = 3,02. Neste sistema a perda de cor por exposição à luz foi de 81 %, enquanto que na solução copigmentada foi de apenas 37 %. Nas soluções a pH = 2,55 que apresentam a maior estabilidade de cor, o efeito da copigmen-

QUADRO IV

Influência da copigmentação na protecção à descoloração foto-oxidativa das antocianinas em soluções modelo

Influence de la copigmentation dans la protection à la decoloration photo-oxidative des anthocyanines em solutions modèle

| Tempo de exposição à luz solar (dias) | % Cor remanescente | | | | | | | | |
|---------------------------------------|--------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | X | | | Y | | | Z | | |
| | T | T+Q | T+R | T | T+Q | T+R | T | T+Q | T+R |
| 0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 2 | 95 | 95 | 96 | 90 | 95 | 95 | 79 | 88 | 93 |
| 5 | 91 | 92 | 95 | 77 | 86 | 89 | 62 | 69 | 74 |
| 12 | 64 | 72 | 81 | 36 | 59 | 64 | 40 | 50 | 50 |
| 16 | 63 | 68 | 80 | 19 | 53 | 63 | 34 | 44 | 44 |

T — testemunha; Q — quercetina; R — rutina.

T — témoin; Q — quercétine; R — rutine.

tação é menos acentuado, o que se atribui à menor disponibilidade das moléculas de antocianinas devido à auto-associação das estruturas flavílio.

Segundo Asen *et al.* (1972) a formação de complexos por copigmentação pode realizar-se a pH tão baixo como pH = 1,2.

Verificou-se ainda, em ensaios posteriores, que a velocidade de decomposição fotoquímica das antocianinas aumenta significativamente por diminuição do teor em antocianinas no meio.

Este facto é atribuído ao efeito da diluição nos mecanismos de auto-associação e copigmentação. Asen *et al.* (1972) verificaram aliás que a copigmentação depende não só da relação antocianinas/copigmentos como das concentrações absolutas daqueles compostos.

Microbiológicos

A estabilidade dos concentrados de pigmentos depende não só de factores físico-químicos como microbiológicos.

De facto, durante as diferentes fases do processamento destes concentrados observou-se contaminações microbianas importantes de que poderão ser fontes não só a matéria-prima

(bagaço) como focos de infecção nos diversos materiais e equipamentos em contacto com as soluções.

A multiplicação desses microorganismos é por vezes inibida devido não só à composição dos meios utilizados na recuperação dos pigmentos lhe ser adversa, como também às temperaturas extremas a que são submetidas. No entanto, a alteração da composição do meio ou de factores ambientais podem originar alterações microbiológicas importantes, com o entrada em actividade dos microorganismos viáveis.

Foi notório, em particular nos concentrados com valores de pH mais elevados ($\text{pH} > 2$), o aparecimento de turvação associada a uma precipitação acentuada de matéria corante. A observação microscópica do depósito revelou a presença de leveduras e nalguns casos bactérias e fungos além de muita matéria corante. Por cultura em mosto estéril, à temperatura de 25°C observou-se o desenvolvimento de leveduras. Estas parecem particularmente adaptadas aos concentrados provavelmente devido a menores exigências nutricionais e à maior resistência ácida.

Face às observações feitas, procedeu-se ao isolamento de leveduras de um concentrado de pigmentos para caracterização das espécies possíveis, tendo-se observado a existência de um tipo de colónia predominante.

Esta levedura foi identificada no Instituto Gulbenkian de Ciência, utilizando os métodos descritos por Yarrow e Van der Walt (1984).

Testes morfológicos

A morfologia em meio sólido é caracterizada por uma colónia de cor branca/creme claro, de superfície lisa, brilhante, de textura cremosa, secção transversal convexa e margem inteira.

A cultura em placa de Dalmau, em meio CMA, revelou a presença de pseudomicélio, a ausência de artrósporos e gemulação multilateral.

A observação microscópica em meio líquido revelou células ovais, isoladas, aos pares ou em pequenos grupos. A gemulação é multilateral. Após três dias de crescimento em meio líquido não se observou a formação de anel nem de película e o sedimento formado era compacto.

Em meios específicos como ME, PDA e V8 não se observou a formação de esporos ou de qualquer estrutura sexuada.

Testes Fisiológicos

Foram efectuados os seguintes testes de natureza fisiológica: fermentação, assimilação de compostos de carbono e azoto, susceptibilidade a antibióticos, osmotolerância, crescimento a várias temperaturas e necessidade de vitaminas para o seu crescimento.

Fermentação

A levedura conseguiu fermentar os seguintes açúcares utilizados como única fonte de carbono do meio: glucose, maltose, trealose e celobiose. Os testes de fermentação revelaram-se negativos com a galactose, sacarose, melibiose, lactose, melezitose, rafinose e inulina.

Assimilação de fontes de carbono

Foram positivos os testes utilizando como única fonte de carbono do meio: glucose, glucosamina, D-ribose, D-xilose, L-arabinose, L-ramnose, sacarose, maltose, trealose, α -metil-D-glucósido, celobiose, salicina, arbutina, metezitose, amido, etanol, glicerol, eritritol, ribitol, xilitol, D-glucitol, D-manitol, D-glucono-1,5-lactona, D-gluconato, succinato, citrato e malato. Foram negativos os testes com a galactose, L-sorbose, D-arabinose, melibiose, lactose, rafinose, inulina, galactitol, inositol, gluconato, lactato, tartarato e metanol.

Assimilação de fontes de azoto

Houve crescimento da levedura utilizando como única fonte de azoto os seguintes compostos: nitrato, nitrito, etilamina, L-lisina e cadaverina. Os testes de crescimento foram negativos apenas com a creatina e a creatinina.

Susceptibilidade a antibióticos

Verificou-se que a levedura é resistente à cicloheximida a 0,01% e 0,1% (p/v).

Osmotolerância

Verificou-se tolerância a soluções de glucose a 50% e de cloreto de sódio a 10%.

Crescimento em meio sem vitaminas

Num meio isento de vitaminas não se observa o crescimento da levedura.

Testes adicionais efectuados pela Divisão de Leveduras CBS do «Centraalbureau voor Schimmelcultures», Holanda, revelaram haver crescimento quando as únicas vitaminas ausentes do meio eram: o inositol, o ácido pantoténico, a piridoxina, a niacina e o ácido *p*-aminobenzóico. A biotina e a tiamina revelaram-se essenciais ao crescimento da levedura.

Crescimento a várias temperaturas

Verificou-se o crescimento da levedura às temperaturas de 25°C, 30°C e 35°C, mas não à temperatura de 37°C.

Testes adicionais

Realizaram-se ainda os testes de formação de amido e hidrólise da ureia que se revelaram negativos.

A reacção com o azul de diazónio B (DBB) foi negativa.

Com base nos resultados dos testes efectuados a levedura foi identificada como *Candida ishiwadae*. Só há registo de uma outra estirpe desta levedura isolada do solo no Japão que foi descrita por Sugiyma e Goto (1969) (CBS 6022), sendo a estirpe em estudo a segunda a ser relatada (CBS 7401).

Em face dos resultados obtidos e dado verificar-se o crescimento desta levedura nos concentrados de pigmentos antocianínicos haverá todo o interesse em determinar os compostos presentes naqueles meios que poderão ser utilizados como nutrientes por esta estirpe de levedura.

Por outro lado, os resultados mostram o interesse de um controlo microbiológico ao longo das diferentes fases do processo de fabrico destes concentrados de pigmentos.

CONCLUSÕES

A composição antocianica determinada por cromatografia líquida de alta pressão mostra a predominância nestes concentrados das antocianinas glucosiladas na posição 3 (94 a 98%), sendo a malvidina-3-glucósido o composto maioritário (41 a

54 %). Deficientes condições de fabrico e ou de conservação determinaram uma perda acentuada em particular dos derivados trihidroxilados (delfinidina) e dihidroxilados (cianidina e peonidina) facilmente oxidáveis.

Confirma-se a importância da purificação na composição e estabilidade das antocianinas dos concentrados de pigmentos provenientes de bagaços de uva.

A estabilidade das antocianinas é fortemente condicionada por diversos factores físico-químicos, sendo a temperatura um dos mais influentes; o seu aumento acelera os processos de degradação.

O pH do meio condiciona também de uma forma acentuada a estabilidade, devendo-se este facto à estabilidade relativa das diferentes estruturas das antocianinas em equilíbrio em solução aquosa em função do pH.

O ácido ascórbico, vulgarmente usado como antisséptico na indústria alimentar não afecta significativamente a estabilidade das antocianinas desde que o oxigénio seja eliminado do meio.

A luz exerce um efeito negativo, verificando-se que a degradação por mecanismo foto-oxidativo é menos acentuada em soluções concentradas do que em soluções muito diluídas, o que se atribui à maior resistência à descoloração dos complexos formados por auto-associação das moléculas de antocianinas.

Um dos mecanismos que maior efeito produz na estabilidade das antocianinas é a copigmentação. Dos copigmentos flavónicos ensaiados a rutina originou o efeito mais acentuado.

A estabilidade do ponto de vista biológico é outro problema a ser considerado na utilização destes concentrados de pigmentos como corante natural na indústria agro-alimentar, devendo ser considerada numa fase final do processo de fabrico destes concentrados líquidos uma filtração esterilizante.

Foi isolada uma levedura, apresentando características muito peculiares e parecendo dominante entre as espécies possíveis. Os resultados dos testes morfológicos e bioquímicos efectuados permitiram a sua identificação. Trata-se da segunda estirpe de *Candida ishiwadae* a ser relatada, descrita pela primeira vez por Sigiyama e Goto (1969) com base numa estirpe do solo no Japão.

RÉSUMÉ

Stabilité physico-chimique et biologique de solutions concentrées de pigments anthocyaniques obtenues de marcs de raisin

L'analyse par chromatographie liquide à haute performance des anthocyanes des solutions concentrées obtenues des marcs de raisin mis en évidence que les 3-glucosides des cinq anthocyanidines principaux — malvidine, paeonidine, pétunidine, cyanidine et delphinidine — sont les pigments les plus importants (94-98 %). A sont tour le monoglucoside de malvidine c'est le prédominant (41-54 %).

La stabilité de ces concentrés anthocyaniques est conditionnée par des facteurs physico-chimiques — lumière, température, pH, oxigène et copigments, bien que par des facteurs biologiques.

Des troubles microbiologiques qu'on a trouvé ont conduit à l'isolement d'une souche de levure présentant des caractéristiques spécifiques résistant aux conditions d'obtention de ces concentrés. Des tests biochimiques et morphologiques effectués ont permis leur identification comme une *Candida ishiwadae*, décrite par Sugiyama e Goto (1969) pour une souche isolée du sol au Japon, étant ainsi celle-là la deuxième souche de cette espèce qui est décrite.

SUMMARY

Physical-chemical and biological stability of anthocyanins in concentrated liquid grape pomace

Anthocyanin composition of concentrated liquid grape pomace extracts has been analysed by high performance liquid chromatography (HPLC). The 3-glucosides of the malvidin, peonidin, petunidin, delphinidin and cyanidin are the main pigments in these extracts (94-98 %). Malvidin-3-glucoside is the most important (41-54 %).

In this work is discussed the effect of several chemical and physical factors: light, temperature, pH, oxygen and copigmentation on the color stability of red grape pomace extracts.

We are observed microbiological spoilage in these grape pomace extracts. The isolated yeast has been characterized and identified as *Candida ishiwadae*, described by Sugiyama and Goto (1969) from one strain isolated of a Japan's soil. So that is the second strain of this specie being related.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Anónimo

1983 Recueil des Méthodes Internationales d'Analyse des Vins, O. I. V., Paris.

Asen, S.; R. N. Stewart; K. H. Norris

1972 Co-pigmentation of anthocyanins in plant tissues and its effect on color. *Phytochemistry*, 11: 1139-1144.

- Bourzeix, M.; N. Heredia
1985 Estimation qualitative de la matière colorante du vin rouge. *Feuilltt Vert OIV*, n.º 796.
- King, G. A.; J. C. Sweeny; T. Radford; G. A. Iacobucci
1979 The ascorbic acid/O₂ degradation of anthocyanidins. *Bull. Liaison-Groupe Polyphenols*, 9: 121-128.
- Palamidis, N.; P. Markakis
1975 Stability of grape anthocyanin in a carbonated beverage. *J. Fd. Sci.*, 40: 1047-1049.
- Ribéreau-Gayon, P.; E. Stonestreet
1965 Le dosage des anthocyanes dans le vin rouge. *Bull. Soc. Chim.*, 9: 2649-2652.
- Roggero, J. P.; S. Coen; P. Archier; C. Rocheville-Divorne
1987 Étude par C. L. H. P. de la reaction glucoside de malvidine-acetaldehyde-composé phénolique. *Conn, Vigne Vin*, 21: 163-168.
- Scheffeldt, P.; G. Hradina
1978 Anthocyanins as food colorants. Pigmentation of anthocyanins under physiological conditions. *J. Fd. Sci.*, 21: 517-520.
- Shewfelt, R. L.; E. M. Ahmed
1987 Enhancement of powdered soft drink mixes anthocyanin extracts. *J. Fd. Sci.*, 43: 435-437.
- Spranger-Garcia, M. I.; A. S. Curvelo-Garcia; M. C. Leandro
1982 La matière colorante des marcs de raisin; extraction et purification. Stabilité. *Bull. Liaison-Groupe Polyphenols*, 11: 583-590.
- Spranger-Garcia, M. I.
1988 *Pigmentos vermelhos de bagaços de uva. Estudo da tecnologia de recuperação. Contribuição para o estudo de parâmetros definidores da estabilidade.* Dissertação apresentada às provas de Acesso à categoria de Investigador Auxiliar. Estação Vitivinícola Nacional-INIA.
- Sugiyama, J.; S. Goto
1969 Microflora in core samples from stratigraphic drillings in middle Japan, IV. The Yeasts General *Candida* Berkhout *Trichosporon* Behrend and *Rhodotorula* Harrison, in Lodder from core samples. *J. Faculty of Science, Univ. Tokyo, Section III*, 10: 97-116.
- Timberlake, C. F.
1980 Anthocyanins — Occurrence, extractions and chemistry. *Fd. Chem.*, 5: 69-80.
- Walt, J. P. van der; D. Yarrow
1984 Methods for isolation, maintenance, classification and identification of yeasts. In: *The Yeasts: a taxonomic study*. N. J. W. KREGGER-VAN RIJ éd., Elsevier Science Pub., B. V., Amsterdam, 45-104.

