



Universidade Federal de Uberlândia
Faculdade de Engenharia Elétrica
Graduação em Engenharia Biomédica

LARISSA RIBEIRO LOURENÇO

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ÓPTICA DE CORANTES
NATURAIS FLUORESCENTES COMO INDICADORES DE PH EM
LEITE**

Uberlândia
2021

LARISSA RIBEIRO LOURENÇO

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ÓPTICA DE CORANTES
NATURAIS FLUORESCENTES COMO INDICADORES DE PH EM
LEITE**

Trabalho apresentado como requisito parcial de avaliação na disciplina Trabalho de Conclusão de Curso de Engenharia Biomédica da Universidade Federal de Uberlândia.

Orientadora: Profa. Dra. Viviane Pilla

Assinatura do Orientador

Uberlândia
2021

“Tuan volgen oketh ama – acrescentei, usando um de meus idiomatismos favoritos em siaru. Significava “não deixe isso enlouquecê-lo”, mas tinha a tradução literal de “não ponha uma colher no seu olho por causa disso”.

– Patrick Rothfus, O Nome do Vento

AGRADECIMENTOS

Agradeço o apoio da minha família, principalmente da minha mãe, meu pai, meu irmão, minhas primas, Gabi e Sopa, e minha irmã, que sempre acreditaram em mim e continuam sendo fonte de carinho e inspiração fundamental para minhas conquistas.

À minha orientadora Prof. Dra. Viviane Pilla por abrir a porta da pesquisa e me introduzir nesse mundo desde a iniciação científica até a realização do meu trabalho de conclusão de curso.

Aos membros do laboratório GPOTM, principalmente ao Sthanley, pela paciência e ensinamentos na área da física.

Ao meu namorado por ser meu porto seguro, fonte de infinitas palavras de encorajamento e pelos cortes de todas as fotos de “fraquinhos” que foram necessários.

Às cubanas, Bruna, Ciça e Lu, por escutarem minhas reclamações e surtos, por sempre estarem do meu lado e acreditarem no meu potencial, sem pressão ou julgamento, apenas uma amizade na melhor forma que existe.

À Manu, minha companheira de curso, alma gêmea, que passou todos os apertos comigo, desde o cálculo até IB2, e me ajudou a viver os melhores momentos dentro da UFU.

A todos os professores que participaram do meu desenvolvimento acadêmico.

À Faculdade de Engenharia Elétrica, especialmente aos membros da Engenharia Biomédica, e ao Instituto de Física.

RESUMO

O interesse em corantes naturais é cada vez maior, devido às suas características de não toxicidade, biodegradabilidade e fontes renováveis, que atendem à tendência de uso de materiais ambientalmente seguros. Além disso, suas funções antioxidantes, antibacterianas e alterações químicas devido à mudança de seu potencial hidrogeniônico (pH) tem atraído estudos para aplicação dessas substâncias em diferentes áreas da indústria. Dentre esses materiais, na classe dos flavonoides, está a antocianina, presente em folhas e flores de diversas plantas, que apresenta uma coloração vermelha / arroxeada. Esse é um corante muito estudado devido a sua mudança de cor com o pH e sua aplicação em filmes para monitoramento da qualidade de alimentos. Já na classe dos carotenoides, o anato, corante extraído do urucum (*Bixa Orellana*), possui cor amarela / alaranjado. Suas aplicações mais comuns são na área de alimentos como corante de derivados de leite, como queijos e manteiga. Nesse trabalho foram realizadas as extrações dos corantes anato e antocianina em função do pH, e as soluções aquosas dos pigmentos foram caracterizadas utilizando as técnicas de absorvância, fluorescência e o tempo de vida da fluorescência. O corante de anato foi extraído das sementes do urucum e a antocianina das folhas da planta *Tradescantia pallida purpurea* em soluções aquosas com diferentes valores de pH, ~ 5-11 e 4-8, respectivamente. Então, após o estudo do comportamento óptico dos corantes naturais extraídos em soluções aquosas com diferentes valores de pHs, eles foram avaliados inseridos em leites adulterados, com pH mais ácido e mais alcalino que o leite natural, com pH de 4-11. Em complementação, a partir dessas amostras líquidas (leite e corante natural), foram avaliadas as possibilidades de uso da antocianina e do anato como indicadores colorimétricos e/ou fluorimétricos de pH em leite.

Palavras-chave: Anato, Antocianina, Absorvância, Fluorescência, Tempo de Vida da Fluorescência, Indicador de pH.

ABSTRACT

*There is a growing interest in natural dyes due to their characteristics of non-toxicity, biodegradability, and renewable sources, which meet the trend of using environmentally safe materials. Furthermore, their antioxidant, antibacterial and chemical alterations due to the change in their hydrogen potential (pH) have attracted studies for the application of these substances in different areas of industry. Among these materials, in the flavonoids class, is the anthocyanin, present in leaves and flowers of several plants, which has a red / purple color. This is a well-studied dye due to its color change with pH and its application in films to monitor the quality of several products. On the other hand, in the class of carotenoids, annatto, a dye extracted from the annatto (*Bixa Orellana*), has a yellow / orange color. Its most common applications are in the food area as a dye for dairy products, such as cheese and butter. In this work, extractions of anthocyanin and annatto dyes were carried out as a function of pH, and the aqueous solutions of the pigments were characterized by absorbance, fluorescence, and the fluorescence lifetime techniques. Annatto dye was extracted from the seeds and anthocyanin from the leaves of the *Tradescantia pallida purpurea* plant in aqueous solutions with different pH values ~5-11, and 4-8, respectively. Then, after studying the optical behavior of natural dyes extracted in aqueous solutions with different pH values, they were evaluated inserted in adulterated milk, with more acidic as well as more alkaline pH content than natural milk, in the pH range of 4-11. In addition, from these liquid samples (natural dye inserted in milk) the possibilities of using anthocyanin and annatto as colorimetric and/or fluorometric pH indicators in milk were evaluated.*

Keywords: Absorbance, Annatto, Anthocyanin, Fluorescence, Fluorescence Lifetime, pH Indicator.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diferentes aplicações de corantes naturais.....	13
Figura 2: Estrutura química (a) cis-bixina, (b) cis-norbixina, (c) trans-bixina e (d) trans-norbixina.....	17
Figura 3: (a) Estrutura química do cátion flavílio e (b) da cianidina	18
Figura 4: Fórmulas químicas presentes na antocianina quando exposta a diferentes pHs.	18
Figura 5: Diagrama de Jablonski, onde $h\nu_a$ = Energia de absorção e $h\nu_f$ = Energia de fluorescência.....	20
Figura 6: modelo de funcionamento do TCSPC.....	21
Figura 7: Diagrama de blocos da absorbância.....	25
Figura 8: Amostras de anato (a) extraído em água, (b) extraído em leite pH 6,56 e (c) extraído em leite pH 10,52.	28
Figura 9: Espectro de absorbância das amostras de anato em função do pH [43].	28
Figura 10: Espectro de fluorescência das amostras de anato em diferentes pHs.	29
Figura 11: Fluorescência resolvida no tempo para o (a) Ludox e (b) anato pH 8,130. O ajuste da curva foi obtido com os valores de τ e χ^2 de 1.80 ns e 1.10, respectivamente [43].	30
Figura 12: Medidas de (A) tempo de vida de fluorescência [43] e (B) da área das curvas das amostras de anato em função do pH.	31
Figura 13: Fluorescência das amostras de anato extraídos em leite com diferentes pHs e os respectivos frascos são apresentados na parte superior.	33
Figura 14: Frascos contendo as amostras de antocianina de diferentes pHs.	34
Figura 15: Espectro de absorbância das amostras de antocianina com variação de pH.....	35
Figura 16: Espectro de fluorescência das amostras de antocianina com variação do pH excitadas em $\lambda = 532$ nm.....	36
Figura 17: Fluorescência resolvida no tempo para o (a) Ludox e (b) antocianina pH 5,45. O ajuste da curva foi obtido com os valores de τ e χ^2 de 3,30 ns e 1,15, respectivamente [58]. ..	37
Figura 18: Resultados das medidas de (A) tempo de vida de fluorescência [58] e (B) da área dos espectros de fluorescências das antocianinas extraídas em função do pH.....	38
Figura 19: Amostras de antocianina em leite em diferentes pHs, sendo (A) foto dos frascos, (B) espectro de fluorescência e (C) espectro de fluorescência normalizado pelos maiores valores de cada curva.....	40
Figura 20: Resultados das medidas de (A) tempo de vida de fluorescência e (B) da área dos espectros de fluorescências das antocianinas inseridas em leite adulterado com diferentes valores de pH.....	41
Figura 21: Espectro de fluorescência das amostras de anato extraídas em leite em pó com diferentes quantidades de NH_4OH . Os valores de pH das amostras são (1) $6,640 \pm 0,005$, (2) $6,80 \pm 0,01$, (3) $7,270 \pm 0,08$, (4) $10,620 \pm 0,007$ e (5) $10,860 \pm 0,007$	50

Figura 22: Amostras de anato extraído em leite em pó, numeração e pH equivalente às medidas de fluorescência.....	50
Figura 23: Espectro de fluorescência das amostras de antocianina adicionada a leite em pó (L + ANT) com diferentes quantidades de AA ou NH ₄ OH. Os valores de pH das amostras são (1) 3,500 ± 0,004 (2) 4,420 ± 0,05 (3) 5,320 ± 0,06 (4) 6,640 ± 0,005, (5) 6,920 ± 0,005 (6) 7,870 ± 0,006 (7) 9,340 ± 0,012 e (8) 10,540 ± 0,006	51
Figura 24: Amostras de antocianina adicionadas a leite em pó, numeração e pH equivalente à legenda dos espectros de fluorescência.	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Aplicações de corantes naturais como indicadores de pH.....	14
Tabela 2: Medidas de pH das amostras de anato e a quantidade de NH ₄ OH em cada amostra.	27
Tabela 3: $\lambda_{\text{máx}}$ dos picos de absorbância das amostras de anato.....	29
Tabela 4: λ_{em} dos espectros de fluorescência das amostras de anato.	30
Tabela 5: Medidas de tempo de vida da fluorescência do anato e seus respectivos desvios estatísticos.....	31
Tabela 6: Quantidade de base adicionada ao leite, medidas de pH das amostras de anato extraído em leite e λ_{em} dos espectros de fluorescência.....	32
Tabela 7: pH das soluções aquosas utilizadas nas extrações e das amostras de antocianina extraídas nas mesmas.....	33
Tabela 8: $\lambda_{\text{máx}}$ dos picos de absorção das amostras de antocianina.....	35
Tabela 9: λ_{em} dos espectros de fluorescência das amostras de antocianina em função do pH.	36
Tabela 10: Medidas de τ e χ^2 nas amostras de antocianina extraídas em função do pH.....	37
Tabela 11: Medidas de pH das amostras de antocianina em leite, suas quantidades de adulterante e λ_{em}	39
Tabela 12: Valores de τ e χ^2 para amostras de antocianina e leite em diferentes pHs.....	41
Tabela 13: Medidas em anato com adição de diferentes quantidades de NH ₄ OH em solução aquosa para variação do pH.....	47
Tabela 14: Medidas de pH das amostras de anato extraído em leite, sua média e desvio padrão amostral.	48
Tabela 15: Medida de pH de antocianina em leite, suas médias e desvio padrão amostral.	48
Tabela 16: Medidas de pH de amostras de antocianina extraídas em diferentes soluções aquosas adicionadas de ácido acético (AA) ou NH ₄ OH.....	49
Tabela 17: Medidas de pH das soluções aquosas com adição de ácido acético ou NH ₄ OH para extração das amostras de antocianina.	49

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

λ – Comprimento de onda

ν – Frequência de uma onda eletromagnética

τ – Tempo de vida da fluorescência

λ_{em} – Comprimento de onda de emissão médio

$\lambda_{m\acute{a}x}$ – Comprimento de onda do pico

$\tilde{\nu}$ – Número de onda

$^{\circ}C$ – Graus Celsius

μm – Micrômetros

μW – Microwatts

AA – Ácido Acético

Abs – Absorbância

Aprox. – Aproximadamente

c – Velocidade da luz

E – Energia dos fótons de luz

GPOTM – Grupo de propriedades ópticas e térmicas de materiais

h – Constante de Plank

I – Intensidade de luz transmitida

I_0 – Intensidade de luz emitida

IF – Infravermelho

L – Espessura

Ludox – Sílica Coloidal

MHz – Mega Hertz

min – Minutos

NH_4OH – Hidróxido de Amônio

P.M. – Peso Molecular

pH – Potencial hidrogeniônico

S_x – Nível energético X , onde X pode ser 0, 1 ou 2

TCSPC – Contagem de fóton único correlacionada com o tempo

UAT – Ultra-alta temperatura

UFU – Universidade Federal de Uberlândia

UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1. Motivação.....	12
1.2. Objetivos	15
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
2.1. Corantes Naturais	16
2.1.1. Anato.....	16
2.1.2. Antocianina	17
2.2. Espectroscopia.....	19
2.3. Medidas e Indicadores de pH.....	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1. Extração do Anato	23
3.2. Extração da Antocianina.....	23
3.3. Variação do pH	24
3.4. Aplicação dos Corante Naturais em Leite	24
3.5. Técnicas Espectroscópicas.....	25
3.5.1. Absorbância	25
3.5.2. Fluorescência.....	25
3.5.3. Tempo de Vida	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1. Anato	27
4.1.1. Absorbância	28
4.1.2. Fluorescência.....	29
4.1.3. Tempo de Vida	30
4.2. Anato e Leite.....	32
4.3. Antocianina.....	33
4.3.1. Absorbância	34
4.3.2. Fluorescência.....	35
4.3.3. Tempo de Vida	36
4.4. Antocianina e Leite	38
5. CONCLUSÃO	42
6. REFERÊNCIAS	43
ANEXO I – TABELA DE MEDIDAS DE PH ANATO.....	47
ANEXO II – TABELAS DE MEDIDAS DE PH DE ANATO EXTRAÍDO EM LEITE E ANTOCIANINA ADICIONADA AO LEITE	48
ANEXO III – TABELAS DE MEDIDAS DE PH ANTOCIANINA, SOLUÇÕES E AMOSTRAS	49
ANEXO IV – ANATO EXTRAÍDO EM LEITE EM PÓ, MEDIDAS DE FLUORESCÊNICA E FOTO DAS AMOSTRAS.....	50
ANEXO V – ANTOCIANINA ADICIONADA A LEITE EM PÓ, MEDIDAS DE FLUORESCÊNICA E FOTO DAS AMOSTRAS.....	51

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

Nesse capítulo serão abordados conceitos amplos que levaram a idealização desse trabalho, como a consciência ambiental, vantagens do uso de corantes naturais e suas diversas aplicações, e o objetivo do mesmo.

1.1.Motivação

Os corantes naturais são utilizados desde os primórdios da civilização, sendo empregados em pinturas, o índigo natural na Grécia (320 – 640 a.C.), e na coloração de tecidos, tanto no Egito Antigo com o uso de alizarina, quanto pelos povos árabes e chineses com o uso do açafrão para o mesmo fim [1]. Entretanto, com a descoberta dos corantes artificiais, em 1856, o uso de pigmentos naturais decaiu consideravelmente. Essa queda se deve ao fato dos corantes artificiais estarem facilmente disponíveis, à simplicidade de sua aplicação, consistência dos tons de cor e sua estabilidade [2].

Contudo, a utilização de corantes sintéticos apresenta algumas desvantagens, como a presença de agentes carcinogênicos, poluição da água nos processos de tintura, fontes não renováveis e tempo de degradação. Adicionalmente a esses fatores, tem aumentado a preocupação com o meio ambiente e a consciência ecológica da população, o que ampliou a busca por produtos mais sustentáveis, naturais e saudáveis [3]. Nesse sentido, os corantes naturais por possuírem fontes renováveis (plantas, minerais ou de origem animal), serem não tóxicos, não carcinogênicos e biodegradáveis, voltaram a ganhar atenção tanto de consumidores quanto de pesquisadores [4].

Além das características de sustentabilidade ambiental corantes naturais possuem características antibactericidas, antioxidantes, ópticas e de coloração que tem possibilidade de aplicações na indústria de tecido, alimentícia, de energia e cosméticos. Sendo assim, suas funcionalidades que têm sido mais estudadas são na produção de tecidos com propriedades de proteção UV, desodorantes e antimicrobianas, produção de células solares sensibilizadas e como indicadores de pH, essas e outras aplicações são esquematizadas na Figura 1 [5]. Entretanto, ainda há necessidade de pesquisas e avanços em relação a produção, forma de extração e fontes de corantes naturais para que esses possam ser usados em larga escala [5]. Dessa maneira, o foco deste trabalho será na caracterização de dois corantes naturais (anato e

antocianina) e sua utilização como indicadores de pH.

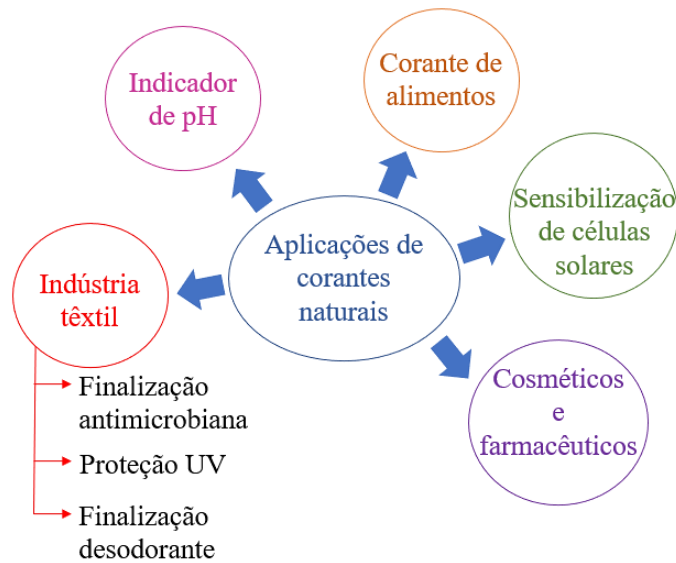


Figura 1: Diferentes aplicações de corantes naturais.

Fonte: Adaptado de (SHAHID, 2013).

Neste sentido, indicadores de pH são substâncias, naturais ou sintéticas, que possuem a capacidade de mudar de cor quando ocorrem mudanças de pH no meio em que estão inseridas (halocromismo), são chamados também de indicadores ácido-base [6,7]. Essa mudança de cor é causada pela protonação ou desprotonação de uma molécula da substância indicadora. Isso fará com que ocorra uma mudança da energia entre as moléculas, o que afeta o espectro de absorção causando um deslocamento (*shift*) do pico da banda para o vermelho (halocromismo positivo) ou para o azul (halocromismo negativo) [8]. Ainda, existem substâncias em que a fluorescência é afetada com a mudança de pH, essas são chamadas de substâncias fluorescentes sensíveis ao pH [9]. Logo, nesse trabalho serão utilizadas técnicas ópticas para analisar as mudanças causadas nos corantes naturais de interesse com a variação no pH.

Além disso, um tipo de uso de materiais halocromáticos é para o monitoramento da qualidade de alimentos [10]. Dessa forma, na Tabela 1 é apresentado um resumo de aplicações de diversos corantes naturais na área alimentícia [10-14]. Dentre esses produtos, o leite será o foco desse trabalho devido à sua importância na sociedade e ao fato de que as técnicas de verificação da integridade do leite ainda são imprecisas, podendo não refletir o estado real da bebida. Isso leva à utilização de datas de validade subestimadas pelos produtores e ao desperdício de leite ainda adequado por consumidores [15].

Tabela 1: Aplicações de corantes naturais como indicadores de pH.

Corante Natural	Origem do corante	Aplicação	Referência
	<i>Brassica oleraceae</i>	Desenvolvimento de filme de PVA com antocianina extraída de repolho roxo sensível ao pH. Potencial aplicação na avaliação da qualidade do leite.	(MADUSHAN et al., 2021) [10]
Antocianina	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> , <i>Clitoria ternatea</i> , <i>Beta vulgaris</i> , <i>Opuntia dillenii</i> .	Aplicação do corante líquido em leite não processado para aferição de sua qualidade.	(MOAZAMI GOODARZI et al., 2020) [11]
	Cenoura Preta*	Criação de filme de amido com antocianina de cenoura preta para avaliação da validade do leite.	(PEREIRA; DE ARRUDA; STEFANI, 2015) [12]
Cúrcuma, quercetina e ficocianina	Plantas, os dois primeiros, e microalga <i>Spirulina</i> , o terceiro. *	Introdução de corantes naturais em nanofibras para uso como indicadores de pH em função do tempo para monitorar qualidade de alimentos.	(TERRA et al., 2021) [13]
Tornassol	Líquen. *	Desenvolvimento de um filme sensor de pH a partir de polissacarídeo extraído da semente de tamarindo e tornassol, como indicador aplicado em leite.	(LIANG; WANG, 2018) [14]

* Corantes naturais comprados prontos.

Estudos mostram que o leite adequado para o consumo possui pH entre 6,5 – 6,9 [16]. Essa propriedade se altera quando há contaminação bacteriana, característica do leite vencido, reduzindo o pH para valores entre 5,5 – 4,0, devido à quebra da lactose em ácido lático por

bactérias [17]. Ainda, também é importante garantir a qualidade do produto antes desse passar pelo processo industrial. Sendo assim, um leite com pH alcalino pode ser um indicativo de doenças, como mastite, nas vacas produtoras, sendo inadequado para consumo [18]. Ademais, aditivos, como neutralizadores de leite (soda cáustica, bicarbonato de sódio), leite sintético e sabão pulverizado, também afetam o pH do leite. Dessa forma, indicadores de pH podem ser utilizados para avaliar a qualidade do leite ao sinalizar seu vencimento de forma mais precisa e leite de qualidade ruim ou adulterado [19, 20].

1.2.Objetivos

Considerando as informações acima, o presente trabalho traz como objetivo a extração de dois corantes naturais, a antocianina (*Tradescantia pallida purpurea*) e o anato (*Bixa Orellana*). Além disso, ambos corantes fluorescentes foram caracterizados utilizando três técnicas espectroscópicas, absorção, fluorescência e tempo de vida da fluorescência. A partir dos resultados dessas medidas, foi possível a avaliação das estruturas químicas presentes em cada um desses corantes e suas caracterizações ópticas. Posteriormente, os corantes naturais foram extraídos em diferentes valores de pH, entre 3 – 12, e as modificações espectroscópicas foram avaliadas. Com base nesses dados, serão apresentadas e avaliadas as comparações dos resultados espectroscópicos obtidos entre diferentes valores de pH para o anato e antocianina, e a possível modificação de coloração das soluções em função do pH. Por fim, os corantes extraídos em solução aquosa foram adicionados/extraídos em leite com diferentes valores de pH, entre 4 – 11, e suas aplicações como indicadores de pH em leite foram avaliadas como possível indicador colorimétrico e/ou fluorimétrico para detecção de leite adulterado.

CAPÍTULO 2

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Esse tópico do trabalho será dedicado a elucidar conceitos teóricos. Inicialmente, serão abordados os corantes naturais, sendo que, as principais características tanto da antocianina quanto do anato serão descritas. Além disso, será exposto o uso das técnicas espectroscópicas para caracterização de substâncias e na identificação de alterações causadas pela variação de pH.

2.1. Corantes Naturais

2.1.1. Anato

Nesse trabalho, o pigmento anato foi extraído das sementes encontradas no fruto da árvore *Bixa Orellana*. Esse corante natural vem sendo utilizado há centenas de anos, dentre suas aplicações, as mais antigas são como pigmento para o corpo utilizado pelos Astecas [21]. Porém, atualmente, as aplicações desse corante são mais vastas e abrangem seu uso na coloração de alimentos, queijos e farinhas, por exemplo, e de tecidos, como algodão e couro. Além disso, diversos estudos estão sendo feitos sobre suas propriedades anticarcinogênicas, anti-inflamatórias, bactericidas e antioxidante, para aplicações farmacêuticas e na área da saúde [22].

Em relação a estrutura do anato, ele é classificado como um carotenoide e possui coloração vermelho/amarelada. Ainda, as duas principais moléculas em sua composição são a bixina e a norbixina, sendo essa última a forma saponificada da bixina [23]. Esses dois componentes possuem formas isoméricas (cis e trans) que podem ser identificadas em uma mesma amostra, dentre ambas a forma mais comum é a cis. Sendo assim, as principais características da cis-bixina é sua coloração alaranjada e solubilidade em solventes polares. Por sua vez, a cis-norbixina também traz a cor laranja para seu solvente, mas é solúvel em água [24]. Por fim, a estrutura trans de ambos os componentes é responsável por uma coloração mais avermelhada [21]. A Figura 2 mostra como são as fórmulas químicas dessas quatro substâncias.

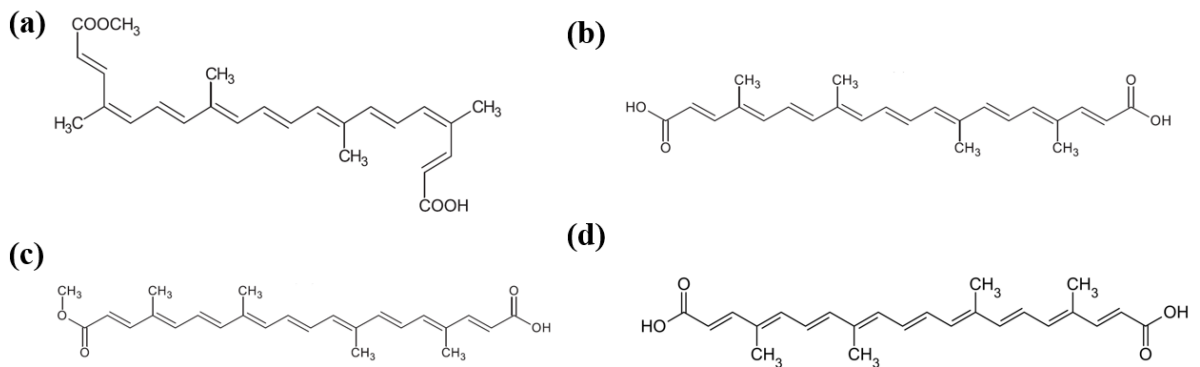


Figura 2: Estrutura química (a) cis-bixina, (b) cis-norbixina, (c) trans-bixina e (d) trans-norbixina.

Fonte: Adaptado de (SHAHID-UL-ISLAM et al., 2016).

Dessa forma, a estrutura química do corante irá depender de alguns fatores, sendo eles o solvente em que o anato é extraído, pH da solução e o método de extração. Por exemplo, anato quando extraído em óleo apresenta maior quantidade de cis-bixina, já quando extraído em solução de água alcalina a quantidade da cis-norbixina aumenta [21]. Outra característica importante desse corante é que em pHs ácidos (menores que 4) não se encontra evidências de anato [24]. Devido a isso, nesse trabalho só foi estudada extração de anato em pHs acima de 5.

2.1.2. Antocianina

A antocianina é um pigmento da família dos flavonoides e é encontrada em diversas estruturas das plantas, dentre elas folhas, frutos e flores. Ela é responsável pelas cores vermelha, roxa e azul na vegetação e tem utilidade na polinização, foto proteção e papel antioxidante [25]. Em relação à coloração apresentada pelas antocianinas, essa é dependente do pH, da copigmentação junto a outros corantes, temperatura e da existência de alguns metais no ambiente [26]. Ademais, esse corante é muito estudado devido a suas características bioativas, na prevenção de doenças cardíacas e diabetes, e como um substituto para corantes sintéticos em aplicações de embalagens inteligentes e indicadores de pH [27].

Quanto à estrutura química, as antocianinas são antocianidinas glicosadas, isto é, possuem um açúcar ligado à cadeia básica do cátion flavílio, como mostrado na Figura 3.a [28]. Dentre os tipos de antocianidinas existentes na natureza, seis são mais comuns, sendo eles a pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina e malvidina [29]. Nesse sentido, a amostra de antocianina utilizada nesse trabalho tem em sua estrutura a cianidina (Figura 3.b), como mostrados em estudos desenvolvidos pelo GPOTM anteriormente [30]. Essa estrutura apresenta como características cores entre o vermelho e o roxo e é geralmente encontrada em

frutos e legumes [31].

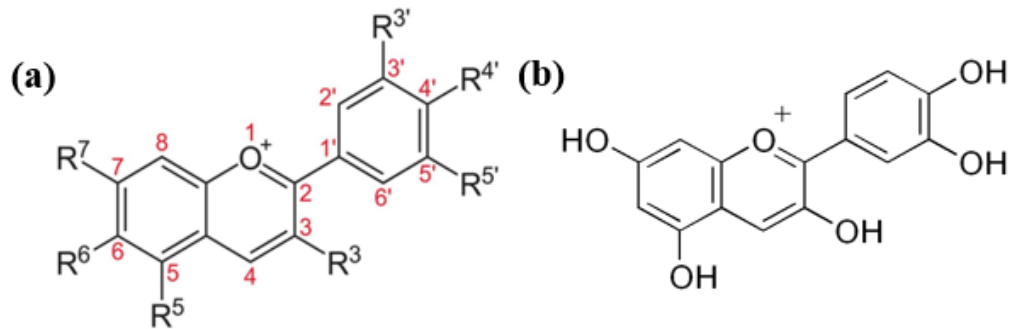


Figura 3: (a) Estrutura química do cátion flavílio e (b) da cianidina

Fonte: Adaptado de (KHOO et al., 2017).

Outro aspecto importante da antocianina a ser abordado é a mudança de sua coloração devido ao pH, que se deve à natureza iônica de sua estrutura. De forma geral, em valores de pH mais ácidos (1 - 3) a base estrutural das antocianinas é do cátion flavílio de cor vermelho e com a alteração do pH essa estrutura se torna uma pseudobase carbinol (sem cor), chalcona (sem cor/amarela), e base quinoidal (azul/roxa), como mostrado na Figura 4. Dessa forma, a cor apresentada pela substância vai depender de qual estrutura química está presente em determinadas amostras [31]. Ainda, estudos mostram que em valores de pH muito alcalino (>8) a antocianina pode sofrer degradação, dependendo dos grupos aos quais ela está ligada [32].

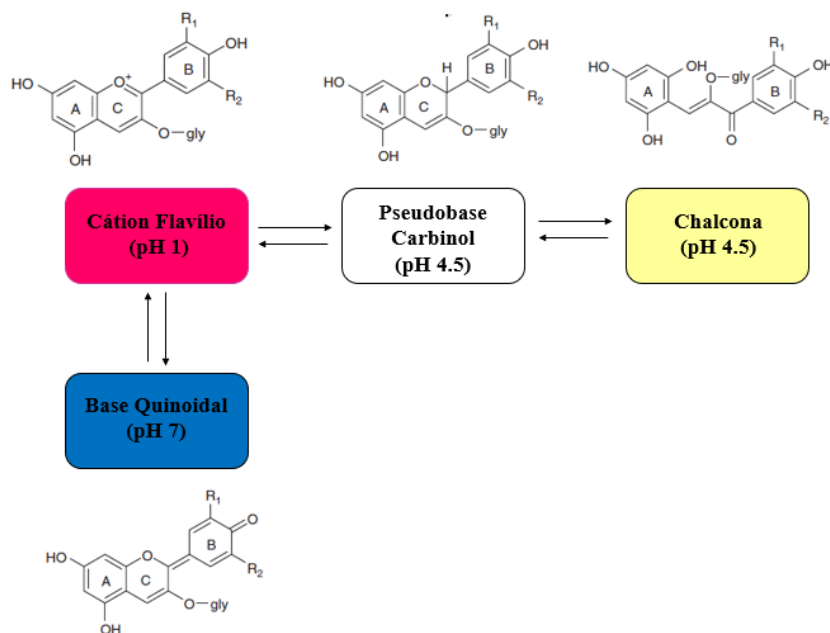


Figura 4: Fórmulas químicas presentes na antocianina quando exposta a diferentes pHs.

Fonte: Adaptada de (ROY; RHIM, 2020).

2.2. Espectroscopia

A espectroscopia é o estudo da interação entre radiação e matéria. Durante essa relação podem ocorrer diferentes fenômenos como a absorção, reflexão, fluorescência, emissão e espalhamento de luz por moléculas ou átomos. Dessa forma, para compreender os eventos espectroscópicos é importante estudar algumas características da luz e compreender como ela é capaz de afetar as moléculas de uma amostra [33].

A luz visível é um tipo de radiação eletromagnética e engloba comprimentos de onda (λ) de 180 nm no ultravioleta até 500 μ m no infravermelho. Suas características mais importantes, quando estudada como uma onda, são a frequência (ν) e o λ , se relacionando como mostrado na Equação 2.1, onde c é a velocidade da luz. Entretanto, a luz pode, ainda, se comportar como partícula, sendo que nessas condições seus fótons possuem determinada energia (E) (Equação 2.2, onde h é a constante de Plank). Dessa forma, é possível relacionar essas duas equações e obter qual a energia associada a um determinado comprimento de onda, Equação 2.3 [34].

$$c = \lambda \nu \quad (2.1)$$

$$E = h \nu \quad (2.2)$$

$$E = \frac{hc}{\lambda} \quad (2.3)$$

Outro fator importante a ser considerado é a constituição da matéria, tem-se que os átomos possuem orbitais com níveis de energia quantizados, sendo alguns ocupados e outros não. A partir disso, quando a organização dos elétrons se encontra na distribuição de menor nível de energia esse átomo está em seu estado fundamental. Considerando esses dois fatores, é possível excitar um átomo que se encontra em estado fundamental através da absorção da energia de fótons, o que permite aos elétrons ocuparem orbitais mais energéticos. Entretanto, essas transições ocorrem apenas quando a energia fornecida é igual àquela entre os dois orbitais [35].

Dessa forma, determinadas substâncias de uma amostra, chamados cromóforos, possuem uma absorção óptica característica, que depende dos elementos químicos de sua composição e das ligações entre eles. A partir disso, pode-se medir duas grandezas distintas quando se incide luz em uma amostra, sendo elas a intensidade emitida (I_0) pela fonte de luz e a intensidade transmitida (I) que chega ao detector após o feixe passar pela amostra. Esse fenômeno é a base da técnica da absorbância (Abs), visto que a comparação entre essas medidas apresenta quais comprimentos de onda foram absorvidos pela amostra. A lei de Lambert-Beer é apresentada na

Equação 2.4 e utiliza esses dados para o cálculo da absorbância. Além disso, essa lei também relaciona a concentração de cromóforos com a absorção de determinado λ . Sendo assim, a avaliação do espectro de absorbância de uma substância pode indicar a presença de determinadas moléculas na amostra analisada, permitindo sua caracterização e reconhecimento [36].

$$Abs = \log_{10} \frac{I_0}{I} \quad (2.4)$$

Outro fenômeno estudado pela espectroscopia é a fluorescência. Esse evento ocorre quando um elétron excitado, que pode estar no primeiro (S_1) ou segundo (S_2) nível energético, retorna a seu estado fundamental (nível S_0), através da liberação de energia em forma térmica e luminosa. Nesse sentido, a fluorescência é a emissão de fótons quando ocorre o relaxamento desses elétrons, como mostrado no diagrama da Figura 5. Esse método espectroscópico é utilizado para caracterização qualitativa e quantitativa de amostras, visto que determinados materiais (anéis aromáticos, clorofilas, morfina etc.) fluorescem em comprimentos de onda com valores específicos. Além disso, devido a sensibilidade dos agentes fluorescentes às condições de seu ambiente como pH, pressão e temperatura, ele também é utilizado para avaliação de mudanças em investigações de sistemas físico-químicos [37].

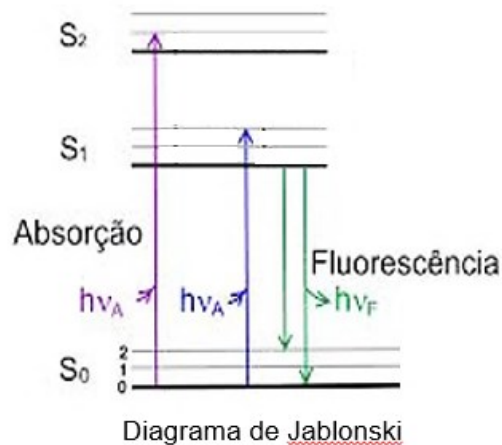


Figura 5: Diagrama de Jablonski, onde $h\nu_A$ = Energia de absorção e $h\nu_F$ = Energia de fluorescência.

Fonte: Adaptado de (GASPAR, 2017).

Ainda considerando a fluorescência, é possível analisar outra técnica espectroscópica, o tempo de vida da fluorescência (τ). Esse método se baseia na medida do tempo em que uma molécula permanece excitada antes de retornar ao seu estado fundamental. Ainda, pode-se

ressaltar que, como a emissão é um processo aleatório, o tempo de vida tem como resultado uma média de tempo. Dessa forma, em um único decaimento 63% das moléculas já retornaram ao nível fundamental antes do valor de τ e 37% ainda estão excitadas nesse momento [37]. Sendo assim, essa medida pode ser usada para análise qualitativa de amostras, pois fornece uma seletividade adicional para identificação de espécies fluorescentes, por considerar também o período em que ela permanece excitada [38].

Para as medidas de tempo de vida foi utilizada a técnica de contagem de fóton único correlacionada com o tempo (TCSPC). Essa técnica se baseia na emissão de vários pulsos de LED (diodo emissor de luz) em altas frequência, geralmente MHz, e na detecção de um único fóton resultante da emissão da amostra. Para isso, os equipamentos gravam o tempo entre pulsos (T) e o tempo de chegada do fóton (T_n) [39]. A partir dessas aquisições, é feito um histograma de pontos de intensidade de decaimento ($I_{p(t)}$), onde o eixo Y representa a quantidade de fótons detectados e o X é o intervalo de tempo de chegada, como mostrado na Figura 6.

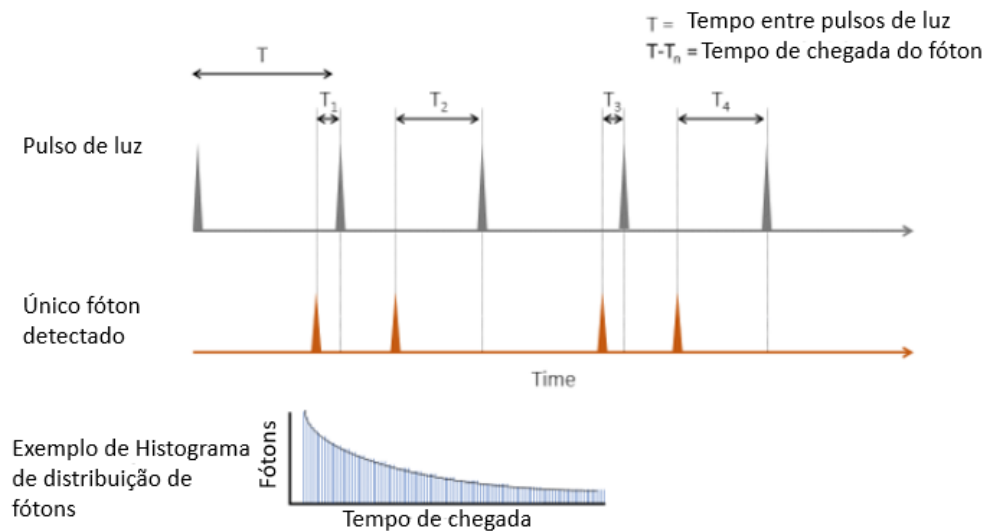


Figura 6: modelo de funcionamento do TCSPC

Fonte: adaptado de (Ultrafast Microspectroscopy Laboratory, s.d.).

Esses pontos serão apresentados em forma de curva de decaimento de fluorescência, utilizando a convolução entre uma função de resposta do instrumento (FRI) e a função de resposta do pulso ($I_{(t)}$). A FRI é a adquirida por uma medida em solução de espalhamento diluída, geralmente utiliza-se sílica coloidal (Ludox). Já a $I_{(t)}$ é apresentada na Equação 2.5, onde A e B são constantes e t é o tempo correspondente à determinada intensidade. Nesse sentido é importante ressaltar que essa equação é utilizada apenas para decaimentos únicos. Através dessa nova curva obtém-se o τ . Por fim é realizada a análise estatística e o cálculo do

χ^2 , como mostrado na Equação 2.6. Esse tem como função testar se a curva adquirida é consistente com as medidas obtidas, sendo que bons valores para esse parâmetro são aqueles em que $\chi^2 < 1,2$ [40].

$$I(t) = A + B \times e^{-t/\tau} \quad (2.5)$$

$$\chi^2 = \sum_{k=1}^n \frac{|I_p(t_k) - I(t_k)|^2}{I_p(t_k)} \quad (2.6)$$

2.3. Medidas e Indicadores de pH

O pH é uma grandeza que indica o nível de acidez ou alcalinidade de uma amostra. Seus valores mais comuns se encontram entre 0 e 14, mas podem variar acima ou abaixo desses extremos. Essa medida representa a concentração de íons de hidrogênio em uma solução e é muito utilizada nas áreas médica, ambiental e de alimentos, para garantir que substâncias (sangue, solo, leite, por exemplo) estão nas condições adequadas [41].

Nesse sentido, existem diferentes métodos de se aferir o pH, sendo o eletrodo de vidro o mais comum. Contudo, as técnicas ópticas, como absorção, fluorescência e tempo de vida, também são estudadas e utilizadas para esse fim. Para realização desse tipo de medida, são necessários indicadores que sejam afetados por mudanças no pH. Isto é, substâncias que apresentem modificações em seu espectro ou tempo de decaimento, dependendo do método escolhido para análise, com a variação dessa grandeza [41].

Como já apresentado anteriormente, ambos os corantes naturais estudados nesse trabalho possuem alterações em sua estrutura química dependendo do pH da solução na qual são extraídos ou as quais são adicionados. Sendo assim, as técnicas ópticas apresentadas podem ser usadas para avaliar o funcionamento desses corantes naturais como sensores de pH, colorimétricos ou fluorimétricos, em diferentes amostras. Isso porque, os resultados de suas medidas espectroscópicas podem caracterizar um pH específico de determinada amostra.

CAPÍTULO 3

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Nesse capítulo, serão apresentados os procedimentos de extração dos corantes naturais e da preparação das amostras de leite e corante natural em função do pH. Além disso, serão descritas as técnicas espectroscópicas usadas para a sua caracterização, sendo elas absorvância, fluorescência e tempo de vida. Assim como, os equipamentos utilizados para realização dessas medidas nas amostras.

3.1.Extração do Anato

O anato foi extraído das sementes de frutos de Urucum (*Bixa Orellana*), obtidos no estado de São Paulo, Brasil. O procedimento de extração do corante foi realizado como descrito abaixo:

- Pesar a massa de 25 mg de semente de Urucum;
- Adicionar o pó do Urucum em 5 ml da solução aquosa no pH de interesse;
- Homogeneizar a mistura em um agitador magnético por 1 h;
- Filtrar a solução resultante com filtro de papel;
- Centrifugar a amostra por 20 min (7200 rpm);

Após a finalização desse processo, o corante está pronto e pode ser armazenado no refrigerador (aprox. 5 °C).

3.2.Extração da Antocianina

A antocianina foi extraída da planta *Tradescantia pallida purpurea* encontrada no Campus Santa Mônica da UFU. O processo realizado para a extração do corante natural é descrito abaixo:

- Colher as plantas e lavar suas folhas com água;
- Secá-las com papel absorvente;
- Higienizar as folhas utilizando um papel com água destilada garantindo que não fique nenhuma impureza em sua superfície;
- Cortar as folhas em pedaços menores e medir a massa de 17 g das mesmas;
- Adicionar 20 ml de solução em pH específico, e macerar por 20 min;
- Peneirar a mistura resultante;

- Filtrar a solução utilizando um filtro de papel;
- Centrifugar o líquido final por 1 h e 30 min (7200 rpm).

Após esse processo, o corante é coletado utilizando uma pipeta, e foi armazenado em refrigerador (aprox. 5 °C) para sua conservação.

3.3. Variação do pH

A avaliação do comportamento da antocianina em diferentes valores de pH foi realizada através de sua extração em soluções com pH variando de ~3 – 11. Para o preparo das soluções ácidas foi utilizada água destilada com diferentes concentrações de ácido acético (AA) (Sigma-Aldrich, P.M. 69,85). Da mesma forma, para as soluções alcalinas utilizou-se o hidróxido de amônio (NH₄OH) (Synth, P.M. 30,05).

No caso do anato, foi realizada avaliação de seu comportamento apenas em meios alcalinos, com variação de pH entre ~5 – 11. Para isso, também foram utilizadas soluções de água destilada e diferentes concentrações de NH₄OH.

Por fim, as medidas de pH, em cada uma das amostras, foram realizadas utilizando um equipamento da marca Hanna (modelo HI 2221). Os resultados obtidos são apresentados nas tabelas apresentadas nos Anexos I-III.

3.4. Aplicação dos Corante Naturais em Leite

Os testes dos dois corantes naturais como indicadores de pH foram feitos utilizando dois tipos diferentes de leite. O primeiro tipo, foi leite em pó Nestlé Ninho (Nestlé Brasil Ltda, Ituiutaba, Minas Gerais, Brasil). Suas amostras foram preparadas usando 5 ml de água destilada e 625 mg de leite em pó (concentração recomendada pelo fabricante). Já o segundo tipo utilizado foi o leite UAT (ultra-alta temperatura) integral Itambé (Itambé Alimentos S/A, Patos de Minas, Minas Gerais, Brasil).

Em ambos os casos, foram adicionadas diferentes concentrações de NH₄OH e AA com o objetivo de tornar o pH do leite mais alcalino ou ácido, respectivamente. Isso foi feito para simular as características do leite fora das condições ideais para consumo. A partir dessas amostras, foram feitas fotos e as medidas em ambos os tipos de leite. Contudo, devido à proximidade dos resultados dos dois grupos, nos capítulos seguintes serão apresentados os resultados para leite UAT e nos Anexos IV-V aqueles para os corantes anato e antocianina inseridos em leite em pó diluído em água, respectivamente.

Ainda, o procedimento experimental utilizado para o anato difere daquele usado para antocianina. No caso do anato, o corante foi extraído diretamente nas amostras de leite, seguindo o mesmo processo descrito anteriormente, para que seu efeito pudesse ser observado. Por sua vez, a antocianina utilizada nos testes de leite, foi extraída em água destilada, e posteriormente adicionada às amostras de leite em diferentes valores de pH na concentração de 40%, para a fluorescência, e 20% para as medidas de tempo de vida da fluorescência.

3.5. Técnicas Espectroscópicas

3.5.1. Absorbância

Como já mencionado anteriormente, a absorbância é uma medida espectroscópica utilizada para determinar as moléculas presentes em determinadas amostras. Para sua realização, normalmente se utiliza uma fonte de emissão de luz na região do ultravioleta e visível, que passará pela amostra, geralmente contida em uma cubeta, e será detectado por um fotodiodo. Por fim, as medidas adquiridas serão processadas pelo sistema e exibidas em software. Abaixo, é mostrado um diagrama de blocos da instrumentação desse equipamento (Figura 7):

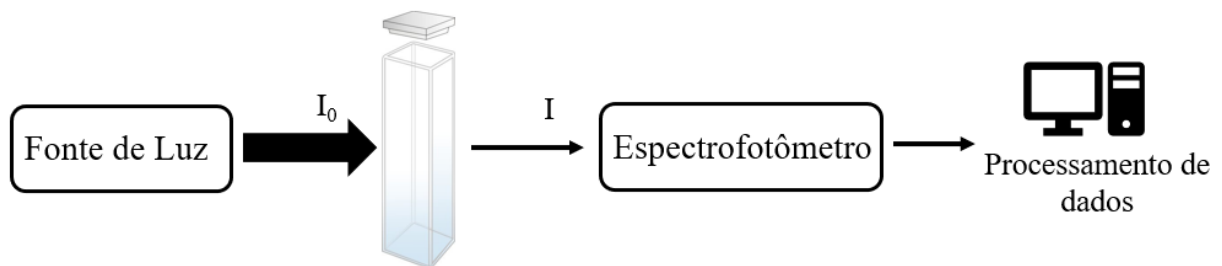


Figura 7: Diagrama de blocos da absorbância

O espectro de absorbância é mostrado como um gráfico que apresenta a absorbância em função do comprimento de onda (λ). Para as medidas desse trabalho foi utilizado o espectrômetro comercial (Ocean Optics 2000+), uma lâmpada de filamento de tungstênio e uma cubeta de 2 mm de quartzo.

3.5.2. Fluorescência

Outra técnica utilizada para identificar substâncias presentes nas amostras é a fluorescência, sendo ela considerada mais sensível do que a absorbância. Nesse trabalho, foi medido o espectro de emissão da fluorescência, ou seja, foi adquirido um espectro de intensidade de radiação emitida em função do comprimento de onda.

Para a realização dessa medida, foram utilizados três aparatos distintos. Primeiramente,

foi necessária uma fonte de luz para excitação dos elétrons da amostra. Para isso, foram utilizados dois tipos de laser com comprimentos de onda específicos, 532 nm e 408 nm, dependendo da posição da banda de interesse. Além disso, cubetas de quartzo de 1 cm serviram como recipientes para conter as amostras durante sua medida. Por fim, um espectrômetro (Ocean Optics 2000+) fez a captação e o processamento do sinal obtido, sendo o espectro resultante exibido em software.

3.5.3. Tempo de Vida

Para as medidas de tempo de vida foi utilizado um LED PLS 450 com $\lambda = 460 \pm 10$ nm (potência média de 40 μ W a 40 MHz e 800 ps) como fonte de luz. Além disso, uma cubeta de quartzo ($L = 1$ cm) foi usada para conter as amostras. O espectrômetro de fluorescência utilizado foi o FluoTime 100, da marca PicoQuant. A fluorescência resolvida no tempo foi adquirida em um detector fotomultiplicador pela técnica de TCSPC, já explicada na fundamentação teórica. Ademais, foi usado o Ludox como solução espalhadora para medição do FRI. Previamente às medições nas amostras de anato e antocianina, foram testadas em solução de fluoresceína de sódio (Synth, peso molecular 376,28) em solução aquosa alcalina (pH 11,24), a curva de decaimento foi bem ajustada com o valor de $\tau = 4,13 \pm 0,01$ ns e $\chi^2 = 1,03 \pm 0,01$ [42,43].

CAPÍTULO 4

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesse capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos com as técnicas experimentais, para as amostras de anato e antocianina. Também, serão apresentados os estudos realizados para avaliação da utilização desses corantes naturais como indicadores de pH em leite.

4.1. Anato

No caso do anato, foram preparadas cinco amostras em diferentes valores de pH, como apresentado na Tabela 2. Para cada solução de anato, foram medidos dez vezes os valores de pH (Anexo I), e determinado o valor médio e sua respectiva incerteza. Ainda, é importante ressaltar que a primeira amostra foi obtida extraíndo o anato em água destilada, e em seguida utilizando soluções com diferentes quantidades de hidróxido de amônio (NH_4OH).

Tabela 2: Medidas de pH das amostras de anato e a quantidade de NH_4OH em cada amostra.

Amostra	NH_4OH [μL]	pH anato
1	-	$5,39 \pm 0,01$
2	$1,0 \pm 0,5$	$8,130 \pm 0,007$
3	$5,0 \pm 0,5$	$9,460 \pm 0,005$
4	$100,0 \pm 0,5$	$11,330 \pm 0,005$
5	$500,0 \pm 0,5$	$11,390 \pm 0,004$

Assim, tem-se que o anato muda sua cor e estrutura química quando o pH do meio em que está inserido é alterado. Nesse sentido, a coloração do anato quando extraído em água destilada (pH próximo de 5) é amarela, e com o aumento da alcalinidade ele fica com a coloração mais forte e mais alaranjada, como mostrado na Figura 8. Sendo assim, a coloração inicial do anato se deve provavelmente à cis-norbixina e pouca quantidade dos isômeros trans, presentes pela extração em água e meios alcalinos [43,44]. Entretanto, a estabilidade da norbixina melhora com a elevação do pH aumentando sua concentração na amostra, o que dá ao anato coloração mais forte em meios alcalinos e aumenta a intensidade da absorbância, como será mostrado no próximo tópico [45-46].

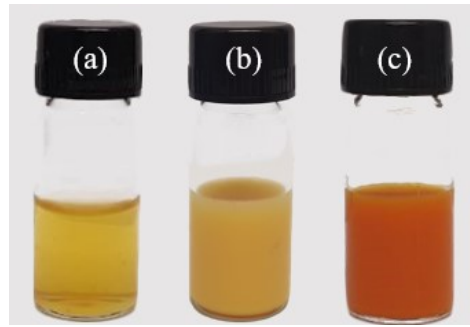


Figura 8: Amostras de anato (a) extraído em água, (b) extraído em leite pH 6,56 e (c) extraído em leite pH 10,52.

4.1.1. Absorbância

Após a extração do anato, foram medidos os espectros de absorbância para cada uma das cinco amostras, apresentados na Figura 9 [43]. Nessa, é possível observar que a extração do anato em água destilada (amostra 1), não há picos e a intensidade de absorção é relativamente pequena, considerando as outras medidas. Contudo, com a elevação do pH, ocorre o aumento da intensidade da absorção e ficam visíveis três picos distintos nos comprimentos de onda de 428 nm, 452 nm e 480 nm, aproximadamente. Os valores exatos dos comprimentos de onda onde ocorreram os picos ($\lambda_{\text{máx}}$) de cada amostra estão resumidos na Tabela 3 [43].

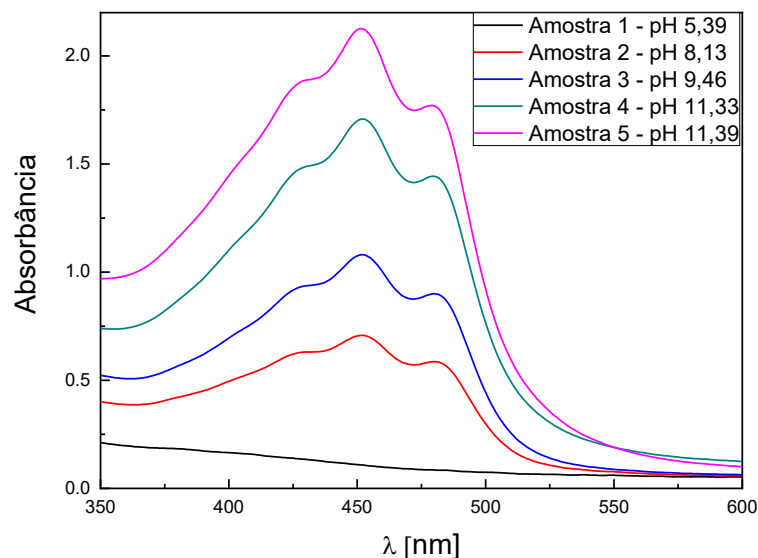


Figura 9: Espectro de absorbância das amostras de anato em função do pH [43].

Nesse sentido, os três picos aparentes nos espectros são apresentados na literatura como característicos da norbixina, indicando a presença desse cromóforo nas amostras [43,47]. A conformação do espectro se dá pela transição de elétron $\pi \rightarrow \pi^*$, isso porque esses elétrons estão deslocalizados e são facilmente excitados, o que produz uma banda de absorção na faixa

visível do espectro [36,43,48]. Além disso, a falta dos picos característicos dos carotenoides, entre 400 – 500 nm, exibida na amostra 1 se deve à agregação das moléculas de cor da amostra nesse pH, que causam mudanças em seu espectro de absorção [43,49].

Tabela 3: $\lambda_{\text{máx}}$ dos picos de absorbância das amostras de anato.

Amostra	$\lambda_{\text{máx}}$ [nm]		
	Pico 1	Pico 2	Pico 3
1	-	-	-
2	427	452	480
3	427	452	480
4	428	452	481
5	428	451	479

4.1.2. Fluorescência

Em seguida, foram obtidos os espectros de fluorescência para cada amostra de anato, excitando-as em $\lambda = 408$ nm. Essas curvas são apresentadas na Figura 10, e os espectros de fluorescências são apresentados normalizados por $\alpha L_{\text{ef}} = (1 - e^{-\alpha L})$. Sendo $e^{-\alpha L}$ obtido através das medidas de absorbância e da equação $I = I_0 \times e^{-\alpha L}$ [50]. Essa é uma correção importante, pois minimiza eventual influência de flutuação na concentração das amostras que afetariam essa medida [18].

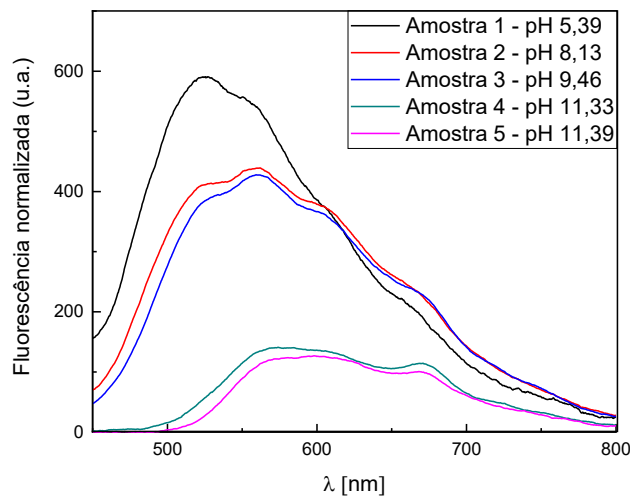


Figura 10: Espectro de fluorescência das amostras de anato em diferentes pHs.

A partir desses espectros, observa-se que houve redução da intensidade da fluorescência

com o aumento do pH das amostras. Esse resultado é condizente com a literatura [43,49], e também indicam que quanto maior a concentração de norbixina na solução menor será a intensidade da fluorescência [43,49]. Em relação a mudança no formato do espectro, observa-se que houve halocromismo positivo (deslocamento para o vermelho), isso pode indicar a modificação conformacional de cis para trans [43,50]. Os resultados dos cálculos dos comprimentos de onda de emissão médio (λ_{em}) de cada um dos espectros são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: λ_{em} dos espectros de fluorescência das amostras de anato.

Amostra	1	2	3	4	5
λ_{em} (nm)	576	591	598	630	631

4.1.3. Tempo de Vida

Neste tópico são apresentados os resultados das medidas de tempo de vida da fluorescência para as soluções de anato em função do pH. Na Figura 11 é apresentado a dinâmica temporal da fluorescência para amostra de anato (pH 8,130). O ajuste da curva de fluorescência foi feito utilizando a Equação 2.5, e os valores encontrados para τ são apresentados na Tabela 5 para todas as amostras de pH avaliadas. Os valores de χ^2 também são apresentados, e representam a adequação da curva ajustada aos pontos experimentais. Através desses valores, conclui-se que as medidas estão em uma faixa de confiabilidade adequada ($\chi^2 < 1,2$).

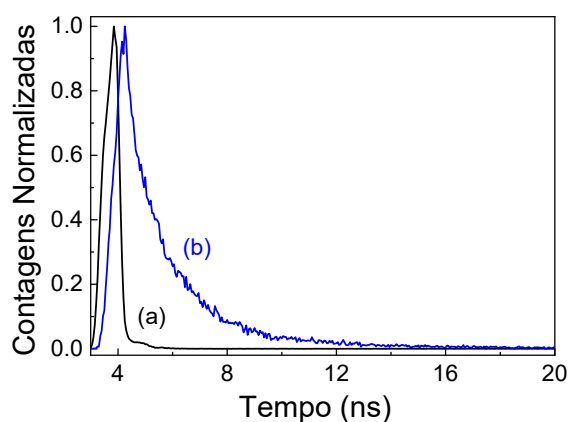


Figura 11: Fluorescência resolvida no tempo para o (a) Ludox e (b) anato pH 8,130. O ajuste da curva foi obtido com os valores de τ e χ^2 de 1.80 ns e 1.10, respectivamente [43].

Tabela 5: Medidas de tempo de vida da fluorescência do anato e seus respectivos desvios estatísticos [43].

Amostra	τ [ns]	χ^2
1	$2,4 \pm 0,4$	$1,1 \pm 0,1$
2	$1,8 \pm 0,2$	$1,13 \pm 0,04$
3	$2,0 \pm 0,1$	$1,13 \pm 0,04$
4	$1,5 \pm 0,1$	$1,08 \pm 0,05$
5	$1,7 \pm 0,2$	$1,07 \pm 0,06$

Na Figura 12.A é apresentado um gráfico dos valores de tempo de vida em função do pH. Além disso, uma função linear tracejada foi apresentada para melhor visualização da relação entre os valores de tempo de vida em função do pH. Dessa forma, observa-se que há uma tendência de uma leve diminuição de τ com o aumento do pH. A partir disso, tem-se que o tempo de vida não é a medida adequada para o estudo do anato como indicador de pH, sendo as mudanças na fluorescência mais evidentes. Ainda, ao calcular a integral das curvas de fluorescência (Figura 12.B), percebe-se uma relação direta entre a intensidade dessa e o tempo de vida, havendo também uma redução da intensidade da fluorescência devido ao aumento do pH.

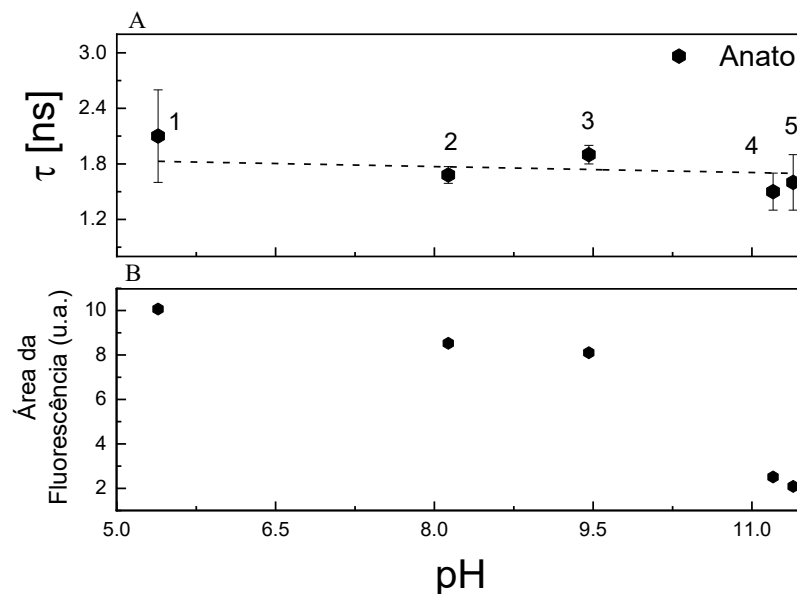


Figura 12: Medidas de (A) tempo de vida de fluorescência [43] e (B) da área das curvas das amostras de anato em função do pH.

4.2. Anato e Leite

Após a caracterização óptica do anato puro esse foi extraído em leite para avaliação da sua performance como indicador de pH colorimétrico e fluorimétrico. Para isso, foram preparadas cinco amostras de leite com diferentes quantidades de NH_4OH com o pH variando de 5 – 11, aproximadamente. Os valores medidos do pH das cinco amostras são apresentadas na Tabela 6, e os dez valores medidos, valor médio e desvio das medidas são apresentados no ANEXO Ii – tabelas de medidas de pH de anato extraído em leite. Dessa forma, visualmente é possível observar a mudança de cor das amostras de leite (amarelo até o laranja), como mostrado na Figura 13.

Tabela 6: Quantidade de base adicionada ao leite, medidas de pH das amostras de anato extraído em leite e λ_{em} dos espectros de fluorescência.

Amostra	NH_4OH [μL]	pH anato	λ_{em} (nm)
(a)	-	$5,39 \pm 0,01$	603
(b)	$5,0 \pm 0,5$	$8,130 \pm 0,007$	609
(c)	$20,0 \pm 0,5$	$9,460 \pm 0,005$	613
(d)	$30,0 \pm 0,5$	$11,330 \pm 0,005$	614
(e)	$100,0 \pm 0,5$	$11,390 \pm 0,004$	634

Em seguida, foram realizadas as medidas de absorção e fluorescência em todas as amostras. Entretanto, devido ao fato de o leite ser um centro espalhador, suas medidas de absorção não puderam ser aferidas com qualidade óptica suficiente. Os espectros de fluorescência são apresentados na Figura 13 normalizados pelo seu valor de pico. Observa-se, que com o aumento do pH houve um deslocamento do λ_{em} para a direita, assim como ocorreu na extração em água, esses valores são mostrados na Tabela 6. Sendo assim, o anato se mostra promissor para aplicação como indicador de pH visual e com a utilização de técnicas de fluorescência no leite, podendo ser estudado para inserção em outros tipos de materiais.

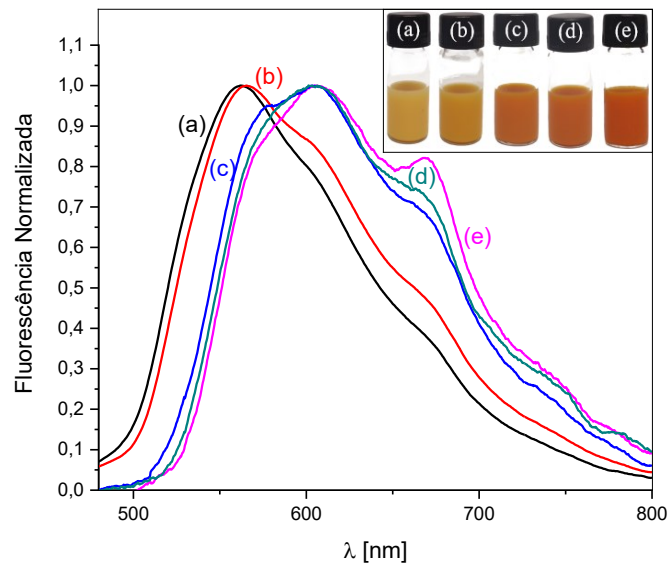


Figura 13: Fluorescência das amostras de anato extraídos em leite com diferentes pHs e os respectivos frascos são apresentados na parte superior.

4.3. Antocianina

Em relação ao segundo corante estudado, foram preparadas seis amostras de antocianina em diferentes valores de pH (entre 4 e 8). Os valores de pH obtidos nas soluções para extração e nas amostras de antocianina são apresentadas na Tabela 7. No Anexo III são apresentados os valores das dez medidas realizadas para cada solução, valores médios e incertezas obtidos. Das amostras de antocianina preparadas, quatro foram obtidas usando pHs ácidos (amostras de 1 - 4), um neutro (amostra 5) e um alcalino (amostras 6). Nesse contexto, é importante destacar que a amostra 3 foi extraída utilizando água destilada pura e serve como controle para comparação das medidas realizadas nas outras amostras. Lembrando que, as amostras 1 e 2 foram preparadas utilizando soluções com ácido acético (AA) e as demais amostras (4 - 6), usando o NH_4OH .

Tabela 7: pH das soluções aquosas utilizadas nas extrações e das amostras de antocianina extraídas nas mesmas.

Amostra	pH Solução	pH Antocianina
1	$2,870 \pm 0,005$	$3,960 \pm 0,005$
2	$3,660 \pm 0,005$	$5,280 \pm 0,005$
3	$5,970 \pm 0,005$	$5,450 \pm 0,004$
4	$10,050 \pm 0,005$	$6,000 \pm 0,005$
5	$10,300 \pm 0,005$	$6,830 \pm 0,005$
6	$10,800 \pm 0,005$	$8,020 \pm 0,005$

Dessa forma, a Figura 14 mostra as fotos dos frascos contendo o corante natural antocianina extraída nos diferentes valores de pH. Sabe-se que a modificação do pH afeta a estrutura química da antocianina, como visto também para o corante natural anato, alterando sua cor dependendo da acidez ou alcalinidade do ambiente em que essa está inserida. Assim, é possível observar sua variação de cor, sendo uma cor rosa viva no pH mais ácido, e ao aumentar o pH, as amostras se tornam mais vermelhas / arroxeadas e cada vez mais escuras.

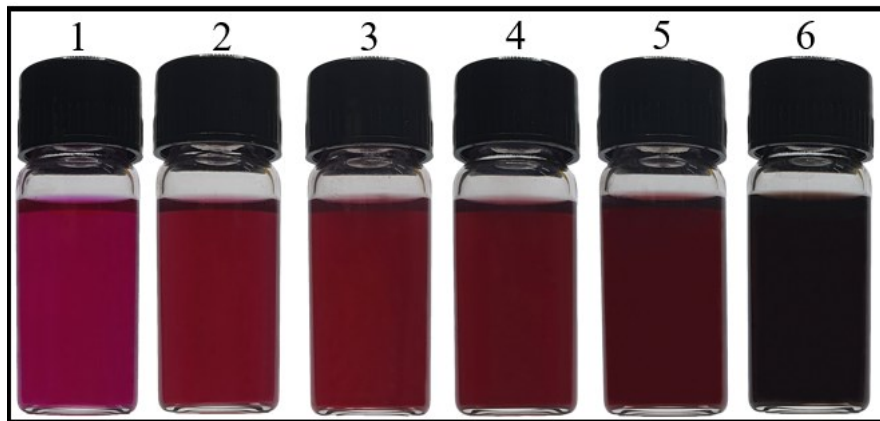


Figura 14: Frascos contendo as amostras de antocianina de diferentes pHs.

A partir disso, tem-se que a variação da cor da antocianina se deve a mudanças moleculares em sua estrutura química. Sendo que, nos pHs mais ácidos (1 - 3) tende a prevalecer o cátion flavílio que dá à amostra cor vermelha [51]. Então, com o aumento do pH ocorre a desprotonação dessa estrutura, o que forma base quinoidal roxa ou azul, pseudobase de carbinol e chalcona incolor ou amarela. Todas essas estruturas estão presentes nos valores de pH entre 4 – 6, o que resulta na cor violeta da antocianina nessa faixa [52]. Ainda, de acordo com Yoshida (2014, p. 88), em $\text{pH} < 7$ a base quinoidal roxa é predominante e quando o $\text{pH} < 8$, a base quinoidal azul escuro. Por fim, em pHs mais alcalinos a chalcona, que possui coloração amarela, fica em evidência.

4.3.1. Absorbância

Os espectros de absorbância da antocianina em diferentes pHs são apresentados na Figura 15. Com base no mesmo, é possível observar a presença de três picos nas amostras, descritos na Tabela 8. De acordo com Brouillard (1981, p.143), os três $\lambda_{\text{máx}}$ em 508 nm, 545 nm e 585 nm, são característicos da base quinoidal presente na *Tradescantia pallida purpurea* e essa estrutura estaria completamente formada em pHs acima 5,5. Entretanto, em valores mais ácidos o íon flavílio ainda está presente e seu $\lambda_{\text{máx}}$ característico é em 537 nm [53]. Isso explica os três

picos visíveis nas amostras 1 - 6 e porque nos valores de pH abaixo de 5,5 o primeiro pico não é tão definido.

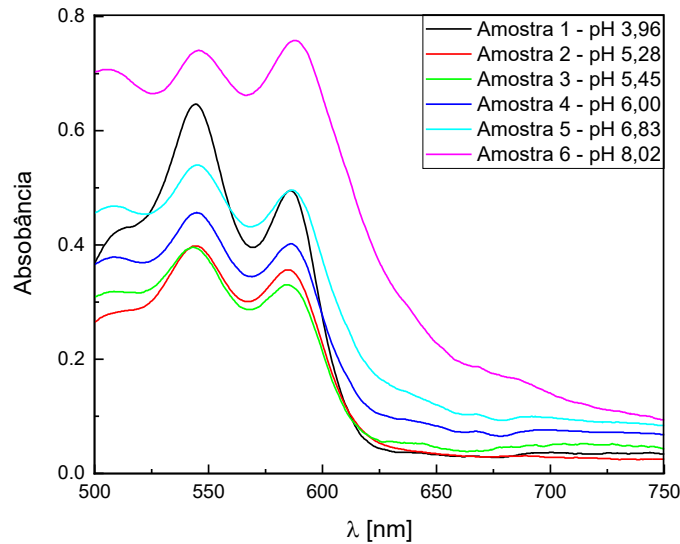


Figura 15: Espectro de absorvância das amostras de antocianina com variação de pH.

Em relação aos pHs mais alcalinos, estudos mostram a presença maior de duas substâncias químicas, sendo elas uma base quinoidal (azul escura) e a chalcona [52, 54]. Dessa forma, o deslocamento para o vermelho do $\lambda_{\text{máx}}$ do terceiro pico se deve à base quinoidal [55]. Entretanto, características do equipamento não permitiram medidas na faixa de 380-420 nm, onde estaria a faixa de absorção da chalcona.

Tabela 8: $\lambda_{\text{máx}}$ dos picos de absorção das amostras de antocianina.

Amostra	$\lambda_{\text{máx}}$ [nm]		
	Pico 1	Pico 2	Pico 3
1	512	544	586
2	507	544	585
3	508	543	585
4	508	545	586
5	508	545	586
6	507	546	588

4.3.2. Fluorescência

Após a realização da absorvância, foram medidos os espectros de fluorescência das

amostras, excitando-as em $\lambda = 532$ nm. A Figura 16 apresenta os espectros de fluorescência medidos para essas amostras. A partir dessas curvas, é possível observar a presença de dois picos nas amostras, sendo o primeiro em $\lambda \cong 610$ nm e o segundo em $\lambda \cong 660$ nm. Esses valores são condizentes com outros estudos, que apontam os picos de fluorescência em torno de 607 nm e 650 nm para a antocianina extraída da *Tradescantia pallida purpurea* em água destilada [30, 56]. Além disso, há uma redução da intensidade da fluorescência com o aumento do pH. Isso pode ser consequência da mudança nas estruturas químicas da antocianina, considerando a presença de elementos que não fluorescem em valores de pH mais alcalinos, como a chalcona [57].

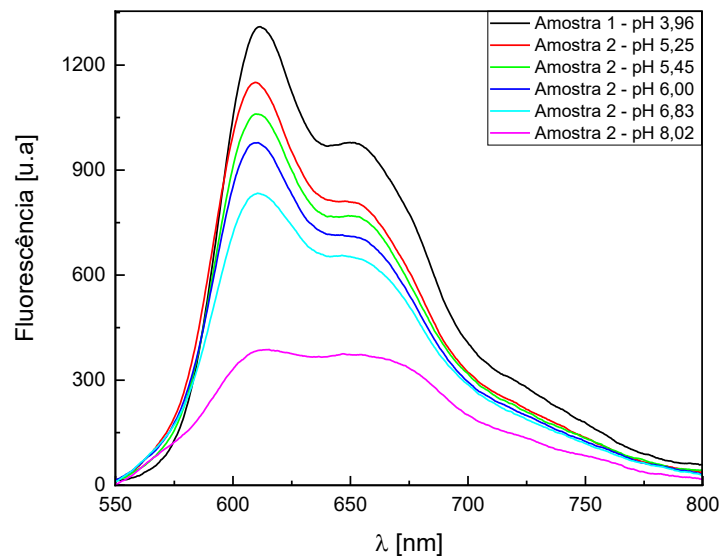


Figura 16: Espectro de fluorescência das amostras de antocianina com variação do pH excitadas em $\lambda = 532$ nm.

Ademais, foi calculado o λ_{em} de cada um dos espectros, mostrado na Tabela 9. Baseado nesses valores percebe-se que λ_{em} em função do pH é praticamente constante, sendo seu valor médio 651 ± 3 nm. Entretanto, observa-se que o primeiro pico em ~ 610 nm, diminui para as amostras de antocianina em valores de pH mais alcalinos.

Tabela 9: λ_{em} dos espectros de fluorescência das amostras de antocianina em função do pH.

Amostra	1	2	3	4	5	6
λ_{em} (nm)	654	649	651	649	651	654

4.3.3. Tempo de Vida

A terceira medida de caracterização óptica realizada nas amostras de antocianina em função do pH foi o tempo de vida da fluorescência. Na Figura 17 é apresentada o resultado da fluorescência resolvida no tempo para a antocianina no pH 5,45. Na Tabela 10 são apresentados os valores encontrados para τ e χ^2 para todas as amostras de antocianina extraídas em diferentes valores de pH [58]. A partir desses resultados, observa-se que o tempo de vida da antocianina está entre 2 – 4 ns, quando excitada em $\lambda = 460$ nm e que a confiabilidade das medidas está adequada, sendo todos os $\chi^2 < 1,2$. Ainda, em relação ao tempo de vida da antocianina, a literatura mostra que esse depende muito do λ de excitação, sendo encontrados $\tau = 17$ ns quando excitando o corante em $\lambda = 190$ nm [59].

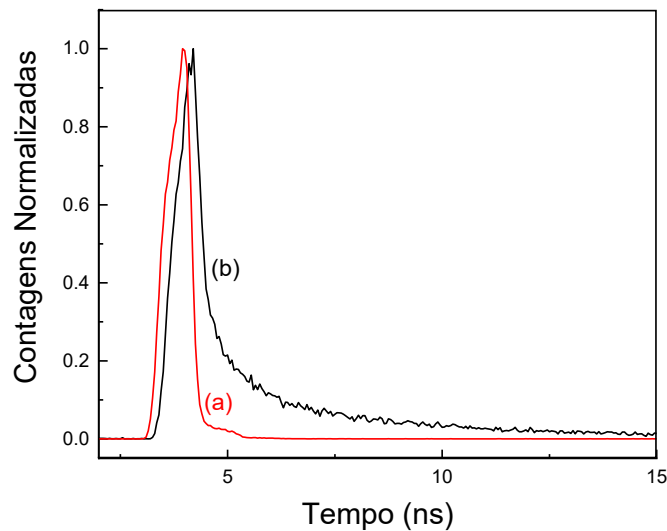


Figura 17: Fluorescência resolvida no tempo para o (a) Ludox e (b) antocianina pH 5,45. O ajuste da curva foi obtido com os valores de τ e χ^2 de 3,30 ns e 1,15, respectivamente [58].

Os resultados de τ em função do pH é apresentado na Figura 18.A. Uma função linear foi traçada para guia dos olhos. A partir disso, percebe-se que o aumento do pH na extração da antocianina promoveu uma redução do tempo de vida do estado excitado. Logo, é possível utilizar essa medida como um parâmetro para a caracterização da antocianina com diferentes níveis de acidez ou alcalinidade e sua avaliação como indicador de pH. Ademais, na Figura 18.B, é mostrada a área do gráfico dos espectros de fluorescência. Ao comparar ambos os gráficos, percebe-se que tanto intensidade da fluorescência como τ diminuem com o aumento do pH.

Tabela 10: Medidas de τ e χ^2 nas amostras de antocianina extraídas em função do pH [58].

Amostra	τ [ns]	χ^2
1	$3,68 \pm 0,06$	$0,99 \pm 0,04$

2	$3,24 \pm 0,05$	$1,11 \pm 0,06$
3	$3,30 \pm 0,06$	$1,15 \pm 0,05$
4	$3,17 \pm 0,06$	$1,11 \pm 0,05$
5	$2,74 \pm 0,04$	$1,10 \pm 0,04$
6	$2,39 \pm 0,03$	$1,07 \pm 0,07$

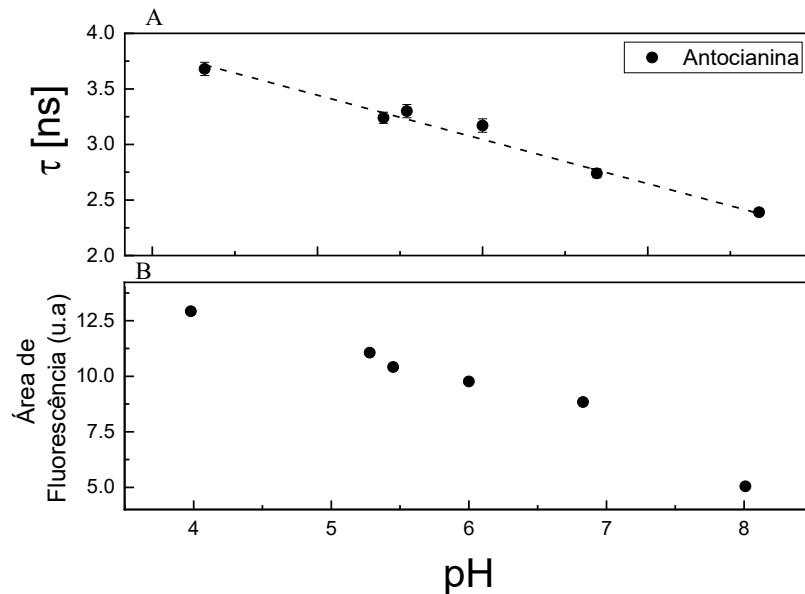


Figura 18: Resultados das medidas de (A) tempo de vida de fluorescência [58] e (B) da área dos espectros de fluorescências das antocianinas extraídas em função do pH.

4.4. Antocianina e Leite

Após a análise das modificações ópticas da antocianina extraída em água, foi testada sua aplicação no leite para o estudo desse corante como indicador de pH. Para isso, foram preparadas oito amostras de antocianina inseridas em leite adulterado com diferentes valores de pH. Três amostras (a – c) foram preparadas com leite adulterado com ácido acético (AA), uma preparada em leite fresco (amostra D), e três com leites adulterados com NH_4OH (f – h), todas as amostras com concentração de 40% de antocianina. Essas informações e os pHs medidos para cada amostra são apresentados na Tabela 11. No Anexo II são apresentados todos os valores medidos, suas médias e incertezas nas medidas de pH obtidas. Na Figura 19.A são apresentadas as fotos dos frascos de cada amostra. Observa-se que houve modificação da cor do leite com a variação do pH, tornando as amostras mais rosadas em pHs ácidos e cada vez mais esverdeada em pHs alcalinos. Dessa forma percebe-se que a utilização da antocianina

como indicador colorimétrico é possível, funcionando melhor para pHs alcalinos.

Tabela 11: Medidas de pH das amostras de antocianina em leite, suas quantidades de adulterante e λ_{em} .

Amostra	Adulterante ($\pm 0,05 \mu\text{L}$)	pH	λ_{em} (nm)
(a)	200,00 (AA)	$3,470 \pm 0,004$	638
(b)	80,00 (AA)	$4,180 \pm 0,007$	640
(c)	15,00 (AA)	$4,980 \pm 0,005$	640
(d)	–	$6,500 \pm 0,005$	641
(e)	20,00 (NH ₄ OH)	$6,710 \pm 0,005$	636
(f)	30,00 (NH ₄ OH)	$7,950 \pm 0,005$	635
(g)	60,00 (NH ₄ OH)	$8,860 \pm 0,005$	630
(h)	100,00 (NH ₄ OH)	$10,430 \pm 0,005$	628

Em seguida, foram realizadas medidas de fluorescência nessas amostras para teste da antocianina como indicador fluorimétrico. Os resultados são apresentados com espectros originais na Figura 19.B e normalizados pelo seu maior valor na Figura 19.C, para melhorar a visualização dos deslocamentos da banda de fluorescência ocorridos em função do pH. Os valores de λ_{em} das amostras são apresentados Tabela 11, e são aproximadamente constante no intervalo de pH investigado, o valor médio obtido é $\lambda_{em} = (636 \pm 8)$ nm. Porém, observa-se que o primeiro pico em ~ 610 nm diminui com o aumento do pH, e o pico em ~ 560 nm aumenta. (Figura 19.B).

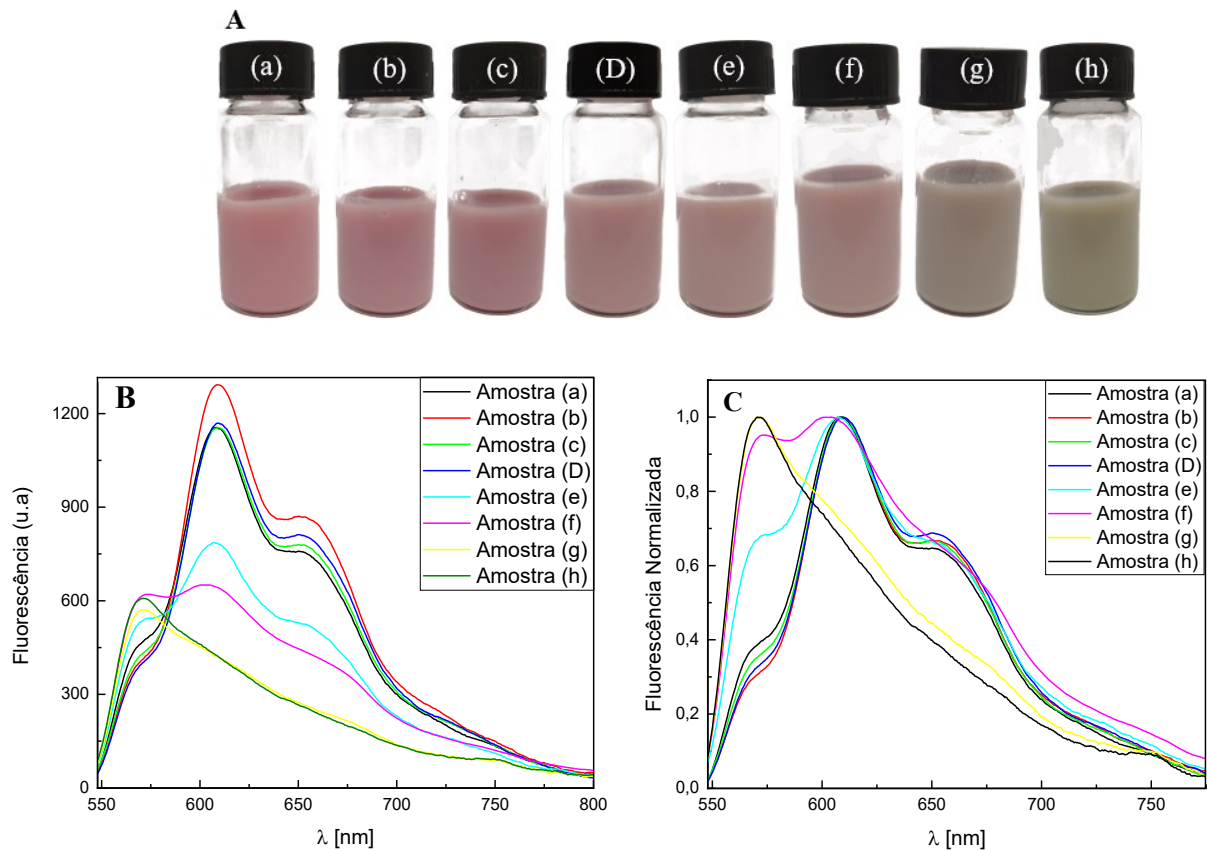


Figura 19: Amostras de antocianina em leite em diferentes pHs, sendo (A) foto dos frascos, (B) espectro de fluorescência e (C) espectro de fluorescência normalizado pelos maiores valores de cada curva.

Em seguida, devido aos resultados promissores do tempo de vida da antocianina em função do pH, foram realizadas medidas de tempo de vida da fluorescência no leite e antocianina na concentração de 20% em função do pH (Figura 20.A). Na Tabela 12 são apresentados os resultados de τ e χ^2 onde observa-se que os valores de confiabilidade são adequados. Com base nessas medidas, percebe-se que τ apresenta, inicialmente, um aumento do tempo de vida das amostras ácidas (a-c) até a amostra sem adulterante (D). Em seguida, das amostras D-h houve a diminuição do tempo de vida com o aumento da alcalinidade, em acordo com os resultados obtidos para as antocianinas extraídas em diferentes valores de pH. Ademais, foi realizado o gráfico da área das medidas de fluorescência do leite em função do pH e percebe-se que há um comportamento similar entre a fluorescência e o tempo de vida com o aumento do pH (Figura 20.B).

Tabela 12: Valores de τ e χ^2 para amostras de antocianina e leite em diferentes pHs.

Amostra	τ [ns]	χ^2
(a)	$3,79 \pm 0,07$	$1,04 \pm 0,03$
(b)	$3,95 \pm 0,04$	$1,03 \pm 0,04$
(c)	$4,06 \pm 0,05$	$1,02 \pm 0,01$
(D)	$4,04 \pm 0,07$	$1,02 \pm 0,02$
(e)	$4,11 \pm 0,03$	$1,01 \pm 0,02$
(f)	$3,98 \pm 0,08$	$1,04 \pm 0,02$
(g)	$3,63 \pm 0,15$	$1,02 \pm 0,02$
(h)	$3,10 \pm 0,07$	$1,08 \pm 0,04$

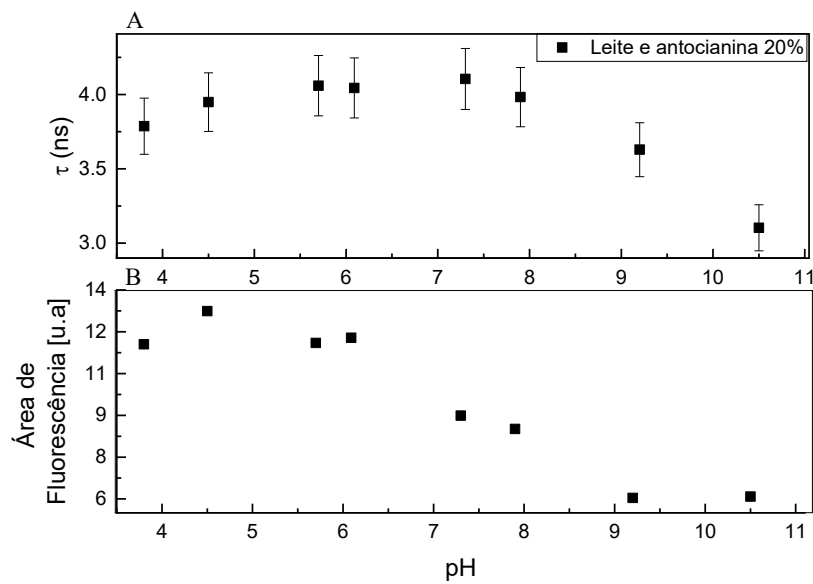


Figura 20: Resultados das medidas de (A) tempo de vida de fluorescência e (B) da área dos espectros de fluorescências das antocianinas inseridas em leite adulterado com diferentes valores de pH.

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi apresentada a relevância do estudo dos corantes naturais, anato e a antocianina, devido suas vantagens ambientais e características de interesse para diferentes aplicações na indústria. Dentre a gama de utilizações desses produtos, neste trabalho os corantes naturais foram avaliados como possíveis indicadores de pH. Esses indicadores são substâncias que alteram sua cor quando ocorrem alterações do pH do meio em que estão inseridas. Tendo isso como base, foram estudadas as características ópticas do anato e da antocianina em função do pH. Todos os resultados das medidas espectroscópicas (absorção, fluorescência e tempo de vida da fluorescência) de ambos os corantes quando extraídos em soluções mais ácidas ou alcalinas mostraram alteração, o que indica um potencial para utilização desses como indicadores.

Dessa forma, os indicadores de pH são muito utilizados como uma forma de monitorar e avaliar a qualidade de alimentos. Nesse sentido, o leite possui um valor de pH definido (entre 6,5 – 6,9) quando está em seu estado ideal de consumo, sendo valores de pH mais ácidos ou alcalinos indicativos de validade expirada, qualidade ruim ou adulteração. A partir disso, os corantes naturais estudados foram inseridos em leite com diferentes valores de pH e sua resposta colorimétrica e fluorimétrica foi avaliada. Os resultados se mostraram promissores, sendo que mesmo quando a mudança de cor não foi tão impactante, foi possível identificar mudanças no espectro de fluorescência advindas da variação do pH. Então, a partir do apresentado pode-se, em estudos futuros, avaliar-se a aplicação desses corantes em filmes ou nanofibras, para seu funcionamento como sensores de pH.

6. REFERÊNCIAS

- [1] S. Ul-Islam, Org., *Plant-based natural products: derivatives and applications*. Hoboken, NJ, USA : Beverly, MA: Scrivener Publishing : Wiley, 2017.
- [2] L. J. Rather, S. Akhter, e Q. P. Hassan, “Chemistry of Plant Dyes: Applications and Environmental Implications of Dyeing Processes”, p. 18, 2017.
- [3] S. Verma e G. Gupta, “Natural dyes and its applications: A brief review”, vol. 4, n° 4, p. 4, 2017.
- [4] J. Arora, P. Agarwal, e G. Gupta, “Rainbow of Natural Dyes on Textiles Using Plants Extracts: Sustainable and Eco-Friendly Processes”, *GSC*, vol. 07, n° 01, p. 35–47, 2017, doi: 10.4236/gsc.2017.71003.
- [5] M. Shahid, “Recent advancements in natural dye applications: a review”, *Journal of Cleaner Production*, p. 22, 2013.
- [6] P. M. A. Khan e M. Farooqui, “Analytical Applications of Plant Extract as Natural pH Indicator: A Review”, *Journal of Advanced Scientific Research*, vol. 2, n° 4, p. 20–27, nov. 2011.
- [7] A. Nair, A. Kelkar, S. Kshirsagar, A. Harekar, K. Satardekar, e S. Kakodkar, “Extraction of natural dye from waste flowers of Aster (*Aster chinensis*) and studying its potential application as pH indicator”, vol. 5, p. 5, 2018.
- [8] L. Van der Schueren e K. De Clerck, “Coloration and application of pH-sensitive dyes on textile materials: Coloration and application of pH-sensitive dyes”, *Coloration Technology*, vol. 128, n° 2, p. 82–90, abr. 2012, doi: 10.1111/j.1478-4408.2011.00361.x.
- [9] H. A. Shindy, “Fundamentals in the chemistry of cyanine dyes: A review”, *Dyes and Pigments*, vol. 145, p. 505–513, out. 2017, doi: 10.1016/j.dyepig.2017.06.029.
- [10] R. Madushan, J. K. Vidanarachchi, P. H. P. Prasanna, S. Werellagama, e H. Priyashantha, “Use of natural plant extracts as a novel microbiological quality indicator in raw milk: An alternative for resazurin dye reduction method”, *LWT*, vol. 144, p. 111221, jun. 2021, doi: 10.1016/j.lwt.2021.111221.
- [11] M. Moazami Goodarzi, M. Moradi, H. Tajik, M. Forough, P. Ezati, e B. Kuswandi, “Development of an easy-to-use colorimetric pH label with starch and carrot anthocyanins for milk shelf life assessment”, *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 153, p. 240–247, jun. 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.03.014.
- [12] V. A. Pereira, I. N. Q. de Arruda, e R. Stefani, “Active chitosan/PVA films with anthocyanins from *Brassica oleraceae* (Red Cabbage) as Time–Temperature Indicators for application in intelligent food packaging”, *Food Hydrocolloids*, vol. 43, p. 180–188, jan. 2015, doi: 10.1016/j.foodhyd.2014.05.014.
- [13] A. L. M. Terra, J. B. Moreira, J. A. V. Costa, e M. G. de Morais, “Development of time-pH indicator nanofibers from natural pigments: An emerging processing technology to monitor the quality of foods”, *LWT*, vol. 142, p. 111020, maio 2021, doi: 10.1016/j.lwt.2021.111020.
- [14] T. Liang e L. Wang, “A pH-Sensing Film from Tamarind Seed Polysaccharide with Litmus Lichen Extract as an Indicator”, *Polymers*, vol. 10, n° 1, Art. n° 1, jan. 2018, doi: 10.3390/polym10010013.
- [15] M. Lu *et al.*, “Milk Spoilage: Methods and Practices of Detecting Milk Quality”, *Food and Nutrition Sciences*, vol. 04, n° 07, Art. n° 07, jul. 2013, doi: 10.4236/fns.2013.47A014.
- [16] Y. Ma *et al.*, “Development and optimization of dynamic gelatin/chitosan nanoparticles incorporated with blueberry anthocyanins for milk freshness monitoring”, *Carbohydrate Polymers*, vol. 247, p. 116738, nov. 2020, doi: 10.1016/j.carbpol.2020.116738.
- [17] M. Weston, M. A. T. Phan, J. Arcot, e R. Chandrawati, “Anthocyanin-based sensors derived from food waste as an active use-by date indicator for milk”, *Food Chemistry*, vol. 326, p. 127017, out. 2020, doi: 10.1016/j.foodchem.2020.127017.
- [18] C. O’Connor, *Rural Dairy Technology*. ILRI (aka ILCA and ILRAD), 1995.
- [19] M. Kamthania, “Milk Adulteration: Methods of Detection & Remedial Measures”. maio 24, 2014. doi: 10.13140/2.1.2386.7524.
- [20] S. Tripathy, M. S. Reddy, S. R. K. Vanjari, S. Jana, e S. G. Singh, “A Step Towards Miniaturized Milk Adulteration Detection System: Smartphone-Based Accurate pH Sensing Using Electrospun Halochromic Nanofibers”, *Food Anal. Methods*, vol. 12, n° 2, p. 612–624, fev. 2019, doi: 10.1007/s12161-018-1391-y.

- [21] E. J. Kang, R. E. Campbell, E. Bastian, e M. A. Drake, “Invited review: Annatto usage and bleaching in dairy foods”, *Journal of Dairy Science*, vol. 93, n° 9, p. 3891–3901, set. 2010, doi: 10.3168/jds.2010-3190.
- [22] Shahid-ul-Islam, L. J. Rather, e F. Mohammad, “Phytochemistry, biological activities and potential of annatto in natural colorant production for industrial applications – A review”, *Journal of Advanced Research*, vol. 7, n° 3, p. 499–514, maio 2016, doi: 10.1016/j.jare.2015.11.002.
- [23] Y. Zhang e Q. Zhong, “Probing the binding between norbixin and dairy proteins by spectroscopy methods”, *Food Chemistry*, vol. 139, n° 1, p. 611–616, ago. 2013, doi: 10.1016/j.foodchem.2013.01.073.
- [24] P. Sharma, M. M. Bora, S. Borthakur, P. G. Rao, e N. N. Dutta, “Separation of norbixin from Bixa orellana seed raw dye by Aliquat-336”, *Environmental Progress & Sustainable Energy*, vol. 32, n° 1, p. 134–138, 2013, doi: <https://doi.org/10.1002/ep.10615>.
- [25] H. E. Khoo, A. Azlan, S. T. Tang, e S. M. Lim, “Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits”, *Food & Nutrition Research*, vol. 61, n° 1, p. 1361779, jan. 2017, doi: 10.1080/16546628.2017.1361779.
- [26] V. Freitas, “O mundo colorido das antocianinas”, *Rev. Ciência Elem.*, vol. 7, n° 2, jun. 2019, doi: 10.24927/rce2019.017.
- [27] T. C. Wallace, M. M. Giusti, “Anthocyanins—Nature’s Bold, Beautiful, and Health-Promoting Colors”, *Foods*, vol. 8, n° 11, p. 550, nov. 2019, doi: 10.3390/foods8110550.
- [28] A. Sinopoli, G. Calogero, e A. Bartolotta, “Computational aspects of anthocyanidins and anthocyanins: A review”, *Food Chemistry*, vol. 297, p. 124898, nov. 2019, doi: 10.1016/j.foodchem.2019.05.172.
- [29] M. Alizadeh-Sani, E. Mohammadian, J.-W. Rhim, e S. M. Jafari, “pH-sensitive (halochromic) smart packaging films based on natural food colorants for the monitoring of food quality and safety”, *Trends in Food Science & Technology*, vol. 105, p. 93–144, nov. 2020, doi: 10.1016/j.tifs.2020.08.014.
- [30] S. R. De Lima *et al.*, “Fluorescence quantum yield of natural dye extracted from *Tradescantia pallida* purpurea as a function of the seasons: Preliminary bioapplication as a fungicide probe for necrotrophic fungi”, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 200, p. 111631, nov. 2019, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2019.111631.
- [31] S. Roy e J.-W. Rhim, “Anthocyanin food colorant and its application in pH-responsive color change indicator films”, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, p. 1–29, jun. 2020, doi: 10.1080/10408398.2020.1776211.
- [32] A. Castañeda-Ovando, Ma. de L. Pacheco-Hernández, Ma. E. Páez-Hernández, J. A. Rodríguez, e C. A. Galán-Vidal, “Chemical studies of anthocyanins: A review”, *Food Chemistry*, vol. 113, n° 4, p. 859–871, abr. 2009, doi: 10.1016/j.foodchem.2008.09.001.
- [33] K. De Carvalho Teixeira, “Estudo das Propriedades Eletroluminescentes de Novos Complexos Tetrakis Beta-Dicetonatos de Európio Utilizados em Oleds”, Mestre em Física, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, 2010. doi: 10.17771/PUCRio.acad.16438.
- [34] E. A. C. Guevara, “Fotodegradação De Fenotiazinas E Seus Efeitos Estruturais Sobre A Na⁺, K⁺-Atpase: Estudo Através De Fluorescência”, p. 10, mar. 2010.
- [35] G. Lenz, *Métodos Fotométricos*. UFRGS, 1997.
- [36] P. Atkins, “Physical Chemistry for the Life Sciences”, p. 724, 2006.
- [37] B. Valeur, “Molecular Fluorescence Principles and Applications”, *Molecular Fluorescence*, p. 399, 2001.
- [38] D. A. Skoog, F. J. Holler, e S. R. Crouch, *Principles of instrumental analysis*, Seventh edition. Australia: Cengage Learning, 2018.
- [39] Ultrafast Microspectroscopy Laboratory, “Time Correlated Single Photon Counting – Ultrafast and Microspectroscopy Laboratories”. <https://uml.chemistry.unimelb.edu.au/research-2/technique-descriptions/time-correlated-single-photon-counting/> (acessado maio 21, 2021).
- [40] J. R. Lakowicz e B. R. Masters, “Principles of Fluorescence Spectroscopy, Third Edition”, *J. Biomed. Opt.*, vol. 13, n° 2, p. 029901, 2008, doi: 10.1117/1.2904580.
- [41] A. Steinegger, O. S. Wolfbeis, e S. M. Borisov, “Optical Sensing and Imaging of pH Values:

- Spectroscopies, Materials, and Applications”, *Chem. Rev.*, vol. 120, n° 22, p. 12357–12489, nov. 2020, doi: 10.1021/acs.chemrev.0c00451.
- [42] V. Pilla, A. Gonçalves, A. Dos Santos, e C. Lodeiro, “Lifetime and Fluorescence Quantum Yield of Two Fluorescein-Amino Acid-Based Compounds in Different Organic Solvents and Gold Colloidal Suspensions”, *Chemosensors*, vol. 6, n° 3, p. 26, jun. 2018, doi: 10.3390/chemosensors6030026.
- [43] T.T.S. Santos, L. R. Lourenço, S. R. De Lima, L. R. Goulart, D. N. Messias, A. A. Andrade, e V. Pilla, “Fluorescence Quantum Yields and Lifetimes of Annatto Aqueous Solutions Dependent on Hydrogen Potential: Applications in adulterated milk”, *Em Submissão*, 2021.
- [44] M. J. Scotter, L. A. Wilson, G. P. Appleton, e L. Castle, “Analysis of Annatto (*Bixa orellana*) Food Coloring Formulations. 1. Determination of Coloring Components and Colored Thermal Degradation Products by High-Performance Liquid Chromatography with Photodiode Array Detection”, p. 8, 1998.
- [45] A. Jahangiri *et al.*, “Incorporation of bixin in aqueous media: Self-formulation with sorbitol ester of norbixin”, *Food Chemistry*, vol. 294, p. 433–439, out. 2019, doi: 10.1016/j.foodchem.2019.05.075.
- [46] A. H. Møller *et al.*, “Effect of light, pH, metal ions and antioxidants on the colour stability of norbixin in aqueous solution”, *Int J Food Sci Technol*, vol. 54, n° 5, p. 1625–1632, maio 2019, doi: 10.1111/ijfs.14035.
- [47] M. J. Scotter, S. A. Thorpe, S. L. Reynolds, L. A. Wilson, e P. R. Strutt, “Characterization of the principal colouring components of annatto using high performance liquid chromatography with photodiode-array detection”, *Food Additives and Contaminants*, vol. 11, n° 3, p. 301–315, maio 1994, doi: 10.1080/02652039409374229.
- [48] D. D. Pratiwi, F. Nurosyid, A. Supriyanto, e R. Suryana, “Optical properties of natural dyes on the dye-sensitized solar cells (DSSC) performance”, *J. Phys.: Conf. Ser.*, vol. 776, p. 012007, nov. 2016, doi: 10.1088/1742-6596/776/1/012007.
- [49] A. H. Møller *et al.*, “Norbixin binding to whey protein isolate - alginate electrostatic complexes increases its solubility and stability”, *Food Hydrocolloids*, vol. 101, p. 105559, abr. 2020, doi: 10.1016/j.foodhyd.2019.105559.
- [50] V. M. Dias, V. Pilla, L. P. Alves, H. P. M. Oliveira, e E. Munin, “Optical Characterization in Annatto and Commercial Colorific”, *J Fluoresc*, vol. 21, n° 1, p. 415–421, jan. 2011, doi: 10.1007/s10895-010-0730-1.
- [51] C. M. P. Yoshida, V. B. V. Maciel, M. E. D. Mendonça, e T. T. Franco, “Chitosan biobased and intelligent films: Monitoring pH variations”, *LWT - Food Science and Technology*, vol. 55, n° 1, p. 83–89, jan. 2014, doi: 10.1016/j.lwt.2013.09.015.
- [52] B. Tang *et al.*, “Kinetic investigation into pH-dependent color of anthocyanin and its sensing performance”, *Dyes and Pigments*, vol. 170, p. 107643, nov. 2019, doi: 10.1016/j.dyepig.2019.107643.
- [53] R. Brouillard, “Origin of the exceptional colour stability of the Zebrina anthocyanin”, *Phytochemistry*, vol. 20, n° 1, p. 143–145, jan. 1981, doi: 10.1016/0031-9422(81)85234-X.
- [54] B. A. Cevallos-Casals e L. Cisneros-Zevallos, “Stability of anthocyanin-based aqueous extracts of Andean purple corn and red-fleshed sweet potato compared to synthetic and natural colorants”, *Food Chemistry*, vol. 86, n° 1, p. 69–77, jun. 2004, doi: 10.1016/j.foodchem.2003.08.011.
- [55] N. Ahmadiani, R. J. Robbins, T. M. Collins, e M. M. Giusti, “Molar absorptivity (ϵ) and spectral characteristics of cyanidin-based anthocyanins from red cabbage”, *Food Chemistry*, vol. 197, p. 900–906, abr. 2016, doi: 10.1016/j.foodchem.2015.11.032.
- [56] V. Mendes *et al.*, “Preliminary spectroscopic and thermo-optical characterization of anthocyanin unpurified crude extracted from *Tradescantia Pallida Purpurea*”, *Dyes and Pigments*, vol. 135, p. 57–63, dez. 2016, doi: 10.1016/j.dyepig.2016.06.020.
- [57] H. Oliveira, N. Basílio, F. Pina, I. Fernandes, V. de Freitas, e N. Mateus, “Purple-fleshed sweet potato acylated anthocyanins: Equilibrium network and photophysical properties”, *Food Chemistry*, vol. 288, p. 386–394, ago. 2019, doi: 10.1016/j.foodchem.2019.02.132.
- [58] S. R. De Lima, L. R. Lourenço, M. Thomaz, D. N. Messias, A. A. Andrade, e V. Pilla, pH-dependence on Fluorescence Quantum Yield and Lifetime of Natural Dye Extracted from

Tradescantia pallida purpurea (será submetido em 2021).

- [59] R. Vettumperumal, S. Kalyanaraman, G. T. Selvan, e P. M. Selvakumar, “Fluorescence analysis of natural dyes from *Plumeria rubra* (red and white) flowers”, *Optik*, vol. 159, p. 108–114, abr. 2018, doi: 10.1016/j.ijleo.2018.01.070.

ANEXO I – TABELA DE MEDIDAS DE PH ANATO

Tabela 13: Medidas em anato com adição de diferentes quantidades de NH₄OH em solução aquosa para variação do pH.

Amostras	Anato	1 µL	5 µL	100 µL	500 µL
pH	5,38	8,13	9,47	11,33	11,38
	5,38	8,13	9,46	11,33	11,38
	5,38	8,13	9,46	11,33	11,38
	5,39	8,13	9,46	11,33	11,38
	5,4	8,13	9,46	11,33	11,38
	5,4	8,12	9,46	11,34	11,39
	5,4	8,14	9,46	11,34	11,39
	5,41	8,14	9,46	11,33	11,39
	5,39	8,14	9,45	11,33	11,39
	5,39	8,14	9,45	11,33	11,39
Média	5,39	8,13	9,46	11,33	11,39
DPA	0,01	0,007	0,005	0,005	0,004

ANEXO IV – ANATO EXTRAÍDO EM LEITE EM PÓ, MEDIDAS DE FLUORESCÊNCIA E FOTO DAS AMOSTRAS

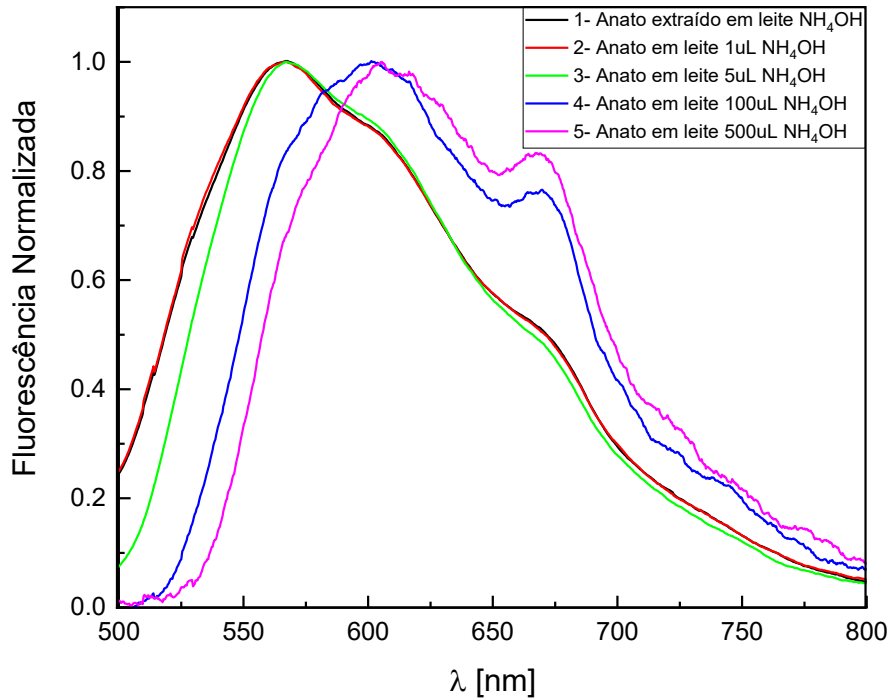


Figura 21: Espectro de fluorescência das amostras de anato extraídas em leite em pó com diferentes quantidades de NH₄OH. Os valores de pH das amostras são (1) $6,640 \pm 0,005$, (2) $6,80 \pm 0,01$, (3) $7,270 \pm 0,08$, (4) $10,620 \pm 0,007$ e (5) $10,860 \pm 0,007$

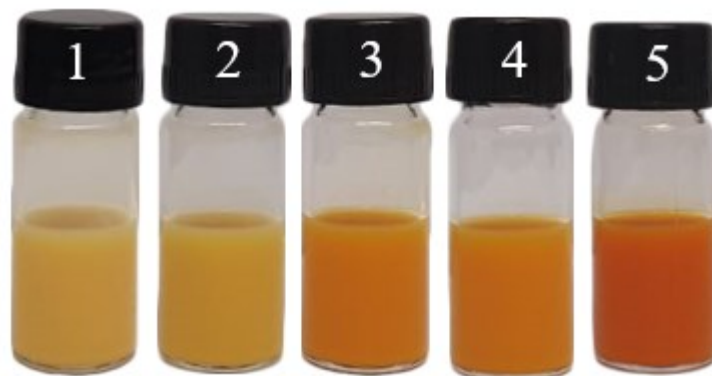


Figura 22: Amostras de anato extraído em leite em pó, numeração e pH equivalente às medidas de fluorescência.

ANEXO V – ANTOCIANINA ADICIONADA A LEITE EM PÓ, MEDIDAS DE FLUORESCÊNCIA E FOTO DAS AMOSTRAS

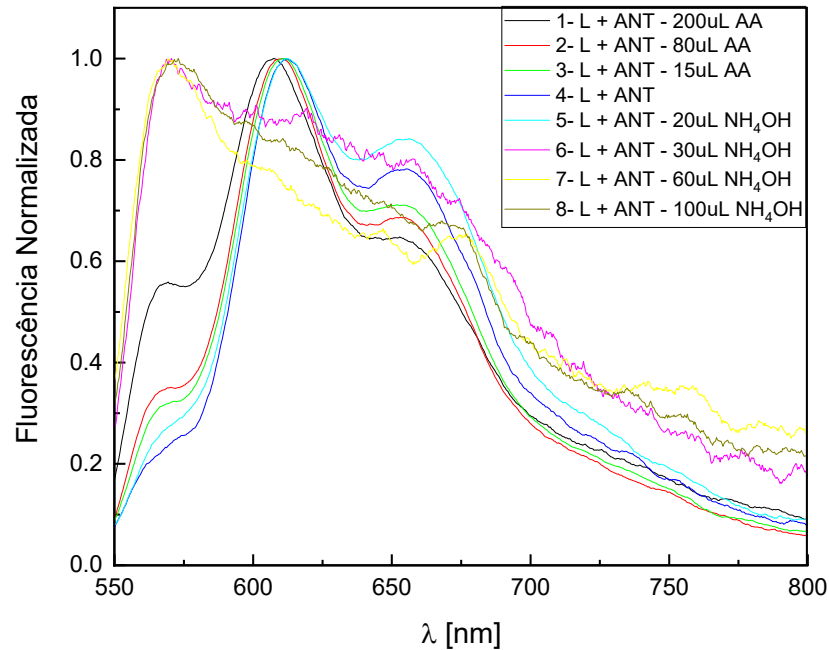


Figura 23: Espectro de fluorescência das amostras de antocianina adicionada a leite em pó (L + ANT) com diferentes quantidades de AA ou NH₄OH. Os valores de pH das amostras são (1) $3,500 \pm 0,004$ (2) $4,420 \pm 0,05$ (3) $5,320 \pm 0,06$ (4) $6,640 \pm 0,005$, (5) $6,920 \pm 0,005$ (6) $7,870 \pm 0,006$ (7) $9,340 \pm 0,012$ e (8) $10,540 \pm 0,006$



Figura 24: Amostras de antocianina adicionadas a leite em pó, numeração e pH equivalente à legenda dos espectros de fluorescência.