UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química

GISELE ANDRÉ BAPTISTA CANUTO

(Dissertação de Mestrado)

**Caracterização, quantificação e estudo da relação
retenção-propriedade anti-oxidante (QRPR) de
antocianinas em extratos de morango (*Fragaria
vesca*) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.**

Versão corrigida da Dissertação conforme Resolução CoPGr 5890.
O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP.

São Paulo

29/03/2011

GISELE ANDRÉ BAPTISTA CANUTO

**Caracterização, quantificação e estudo da relação
retenção-propriedade anti-oxidante (QRPR) de
antocianinas em extratos de morango (*Fragaria
vesca*) por Cromatografia Líquida de Alta
Eficiência.**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências (Química).*

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Marina Franco Maggi Tavares

São Paulo
2011

Dedicatórias

Aos meus pais Gilson e Rozangela por todo amor,
dedicação e confiança, aos meus padrinhos, Sérgio e Tânia,
pai e mãe de coração, que tanto me apóiam e fazem jus ao
verdadeiro significado do batismo.

AGRADECIMENTOS

À Deus e aos guias espirituais, que me protegem e me dão forças para lutar a cada dia e superar todas as dificuldades.

Aos meus pais (Gilson e Rozangela), que eu amo incondicionalmente, que me estruturam, que me fortalecem, que me apóiam em todas as decisões, que me fazem querer sempre seguir em frente e que me ensinaram a nunca desistir e lutar pelos meus sonhos.

À minha irmã (Gislaine), que me faz querer sempre crescer mais, para que sinta orgulho e se espelhe para seguir com vitória em seu próprio caminho.

Aos meus padrinhos (Sérgio e Tânia) que cuidaram de mim tão bem quanto meus pais, que não apenas me deram casa ou comida, mas amor, atenção e companheirismo de pai e mãe.

À minha prima/irmã (Amanda) que me aguentou dividindo quarto, mas tantas foram as risadas, as conversas e as preocupações uma com a outra. Minhas primas/irmãs mais velhas (Andréia e Alessandra) pelos ótimos finais de semana, conversas, apoio e carinho.

Aos meus avós (José, Elvira e Isabel), que eu tanto amo e que sempre tinham uma palavra de apoio, além de sempre torcerem pelas minhas conquistas.

Aos demais tios e tias, que mesmo estando longe, sempre torceram por mim. Em especial meu tio Jorge (*In Memoriam*), sempre tão carinhoso e divertido.

Ao primo/sobrinho (Nicolas), benção de Deus em nossas vidas, que a cada sorriso, cada conquista orgulha a todos da família. Aos primos/cunhados (Rodrigo, Adriano e Marquinhos), pelas brincadeiras, conversas e pela torcida.

Ao meu namorado Tiago, que me ensinou o verdadeiro significado do amor. Obrigada pelo amor, apoio, atenção e por sempre estar ao meu lado em todos os momentos.

À Profa. Dra. Marina Franco Maggi Tavares, pela orientação, por confiar em minha capacidade para cumprir este projeto e por abrir portas para conquistas futuras.

Ao Prof. Dr. João Pedro Simon Farah, quase um orientador e posso dizer amigo. Que muitas vezes me deixou maluca com tantos cálculos, mas que muito me

ensinou e muito me ouviu durante o mestrado. Obrigada pelos ensinamentos e pela ajuda, seja nos cálculos, mecanismos reacionais ou ainda como ouvinte e bom conselheiro.

Ao Prof. Dr. Claudimir Lúcio do Lago, que gentilmente me aceitou como aluna, no período de afastamento da Profa. Marina e pelas boas sugestões para melhoramento do trabalho.

Ao meu querido amigo e posso dizer fundamental colaborador Daniel, meu muito obrigada! Sem o seu apoio; sua dedicação e vontade em ajudar ao próximo; sua inteligência, que tanto me ensinou e ajudou, não seria possível executar metade deste trabalho. Não há palavras ou dinheiro no mundo que pague tudo o que você fez por mim, posso apenas lhe oferecer minha eterna gratidão, amizade e admiração pelo incrível profissional e ser humano que você é.

Aos colegas do LACE (Laboratório de Cromatografia e Eletroforese Capilar) Aline K. e Karina, primeiras amigas que fiz no laboratório e que muito me ajudaram não apenas na adaptação ao novo ambiente, mas durante todo o mestrado e até mesmo com questões pessoais. Obrigada também a Aline V., Claudinei, Edgar, Grazielle, Maryane, Simone, Tatiana e Viviane, pelo apoio nas horas de dificuldade, pelas idéias nos momentos de dúvida e pelas conversas e risadas ao longo desses dois anos de convívio diário.

Aos amigos antigos da graduação e aos novos amigos que fiz no IQ, pessoas com as quais pude conviver um pouco nesses dois anos, dei muitas risadas e que sempre me fizeram bem.

Aos Professores do Instituto de Química que auxiliaram na minha formação.

Aos funcionários do Instituto de Química, especialmente os da secretaria de pós-graduação.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado.

À CAPES, Fapesp e Instituto de Química pelo auxílio financeiro, na forma de reserva técnica ou financiamento de projetos de pesquisa do LACE.

E a todas pessoas que de forma direta ou indireta auxiliaram na execução deste trabalho.

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer
um pode começar agora e fazer um novo fim”

(Chico Xavier)

(...) Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena
Acreditar nos sonhos que se tem
Ou que seus planos nunca vão dar certo
Ou que você nunca vai ser alguém (...)

(...) Se você quiser alguém em quem confiar
CONFIE EM SI MESMO
QUEM ACREDITA SEMPRE ALCANÇA (...)

Mais uma vez
(Legião Urbana)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	19
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	22
Resumo	24
Abstract	26
1. Introdução	28
1.1. Flavonoides.	29
1.2. Antocianinas.	31
1.2.1. Estabilidade das Antocianinas.	33
1.2.1.1. pH.	34
1.2.1.2. Temperatura.	37
1.2.1.3. Concentração e Efeito de Solvente.	38
1.2.1.4. Co-pigmentação e Íons Metálicos.	39
1.2.2. Efeitos Benéficos ao Organismo.	39
1.2.3. Técnicas para Análise de Antocianinas.	41
1.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.	43
1.3.1. Princípio.	43
1.3.2. Histórico.	44
1.3.3. Instrumentação.	45
1.3.4. Vantagens e Limitações da CLAE.	47
1.4. Aplicações da CLAE na Análise de Antocianinas.	49
1.5. <i>Referências Bibliográficas</i>	52
2. Objetivos	57
2.1. Objetivos Específicos.	58
3. Otimização da Separação	59

3.1.	<i>Introdução.</i>	60
3.1.1.	Separação de Antocianinas por CLAE.	60
3.1.2.	Mecanismo e Otimização da Separação em CLAE.	60
3.2.	<i>Objetivos.</i>	65
3.3.	<i>Parte Experimental.</i>	66
3.3.1.	Materiais e Equipamentos.	66
3.3.1.1.	Amostras e Reagentes.	66
3.3.1.2.	Equipamentos.	67
3.3.2.	Procedimentos Experimentais.	67
3.3.2.1.	Preparo de Soluções-padrão.	67
3.3.2.2.	Extração das Amostras.	67
3.3.2.3.	Otimização da Separação.	68
3.3.3.	Análises dos Resultados.	69
3.4.	<i>Resultados e Discussão.</i>	69
3.4.1.	Otimização da Separação.	69
3.4.2.	Identificação dos Compostos.	87
3.4.3.	Parâmetros Cromatográficos.	89
3.5.	<i>Conclusões.</i>	91
3.6.	<i>Referências Bibliográficas.</i>	92
4.	Otimização da Extração	95
4.1.	<i>Introdução.</i>	96
4.1.1.	Extração de Antocianinas.	96
4.1.1.1.	Extração Sólido-Líquido.	97
4.1.1.2.	Extração Líquido-Líquido.	98
4.1.1.3.	Extração em Fase Sólida – SPE.	99
4.1.2.	Solventes Extratores.	100
4.1.3.	Hidrólise de Antocianinas.	106
4.2.	<i>Objetivos.</i>	109
4.3.	<i>Parte Experimental.</i>	109
4.3.1.	Materiais e Equipamentos.	109
4.3.1.1.	Amostras e Reagentes.	109

4.3.1.2.	Equipamentos.	110
4.3.2.	Procedimentos Experimentais.	111
4.3.2.1.	Tratamento das Amostras.	111
4.3.2.2.	Extração das Amostras.	111
4.3.2.2.1.	Extração Sólido-Líquido.	112
4.3.2.2.2.	Extração Líquido-Líquido.	112
4.3.2.2.3.	Extração em Fase Sólida – SPE.	113
4.3.2.3.	Procedimentos de Hidrólise Ácida.	113
4.3.2.4.	Estudo da Estabilidade do Extrato.	114
4.3.2.5.	Análises Cromatográficas.	115
4.3.2.6.	Análise dos Resultados.	115
4.4.	<i>Resultados e Discussão.</i>	116
4.4.1.	Seleção da Amostra e Método para Extração.	116
4.4.2.	Otimização da Extração em Morango.	120
4.4.3.	Estabilidade do Extrato Otimizado.	136
4.4.4.	Otimização da Hidrólise.	143
4.5.	<i>Conclusões.</i>	161
4.6.	<i>Referências Bibliográficas.</i>	162
5.	Avaliação das Figuras de Mérito	167
5.1.	<i>Introdução.</i>	168
5.1.1.	Validação de Métodos Analíticos.	168
5.1.2.	Figuras de Mérito.	170
5.1.2.1.	Linearidade (curva de calibração).	170
5.1.2.2.	Sensibilidade e Limite de Detecção.	171
5.1.2.3.	Limite de Quantificação.	172
5.1.2.4.	Seletividade e Especificidade.	172
5.1.2.5.	Exatidão.	173
5.1.2.6.	Precisão.	174
5.1.2.7.	Robustez.	175
5.2.	<i>Objetivos.</i>	176
5.3.	<i>Parte Experimental.</i>	176

5.3.1.	Materiais e Equipamentos.	176
5.3.1.1.	Amostras e Reagentes.	176
5.3.1.2.	Equipamentos.	176
5.3.2.	Procedimentos Experimentais e Avaliação das Figuras de Mérito	177
5.3.2.1.	Preparo das Soluções-padrão.	177
5.3.2.2.	Extração da Amostra.	177
5.3.2.3.	Análises Cromatográficas.	178
5.3.3.	Avaliação das Figuras de Mérito do Método.	178
5.3.3.1.	Linearidade.	178
5.3.3.2.	Limites de Detecção e Quantificação.	179
5.3.3.3.	Seletividade e Especificidade.	180
5.3.3.4.	Exatidão.	180
5.3.3.5.	Precisão.	180
5.3.3.5.1.	Repetibilidade.	181
5.3.3.5.2.	Precisão Intermediária.	181
5.3.3.5.3.	Precisão Instrumental.	181
5.3.3.6.	Robustez.	181
5.3.4.	Análise dos Resultados.	182
5.4.	<i>Resultados e Discussão.</i>	183
5.4.1.	Linearidade – LD/LQ.	183
5.4.2.	Seletividade e Especificidade.	186
5.4.3.	Exatidão.	187
5.4.4.	Precisão.	188
5.4.5.	Robustez.	189
5.5.	<i>Conclusões.</i>	190
5.6.	<i>Referências Bibliográficas.</i>	191
6.	 Medida da Atividade Anti-oxidante	193
6.1.	<i>Introdução.</i>	194
6.1.1.	Anti-oxidantes.	194
6.1.1.1.	Mecanismo de Ação Anti-oxidante.	195
6.1.2.	Antocianinas como Anti-oxidantes.	195

6.1.3. Determinação da Atividade Anti-oxidante de Antocianinas.	198
6.1.3.1. Determinações <i>offline</i>	199
6.1.3.2. Determinações <i>online</i>	200
6.2. <i>Objetivos</i>	202
6.3. <i>Parte Experimental</i>	203
6.3.1. Materiais e Equipamentos.	203
6.3.1.1. Amostras e Reagentes.	203
6.3.1.2. Equipamentos.	203
6.3.2. Procedimentos Experimentais.	204
6.3.2.1. Preparo de Soluções-padrão.	204
6.3.2.2. Preparo da Solução de ABTS ^{•+}	204
6.3.2.3. Extração da Amostra.	205
6.3.2.4. Separação Cromatográfica e Medida de Atividade Anti-oxidante Pós- Coluna.	205
6.3.2.5. Análise dos Resultados.	207
6.4. <i>Resultados e Discussão</i>	208
6.4.1. Medida de Atividade Anti-oxidante.	208
6.4.2. Cálculos Teóricos de Correlação da Atividade Anti-oxidante.	217
6.5. <i>Conclusões</i>	224
6.6. <i>Referências Bibliográficas</i>	225
7. Conclusões Gerais	229
8. Perspectivas	231
SÚMULA CURRICULAR	233
FICHA DE ALUNOS EGRESSOS	235

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Estrutura básica dos flavonoides.	29
Figura 1.2. Estrutura básica de algumas subclasses de flavonoides.	30
Figura 1.3. Diferentes estruturas de antocianinas e antocianidinas.	32
Figura 1.4. Estruturas moleculares das antocianinas em diferentes valores de pH em solução aquosa.	36
Figura 1.5. Esquema de instrumentação para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.	45
Figura 1.6. Cromatógrafo a líquido utilizado no estudo da separação de antocianinas.	46
Figura 3.1. Mecanismo de separação por partição em cromatografia líquida.	61
Figura 3.2. Cromatogramas de estudos de separação, por eluição isocrática a fase móvel, de oito antocianinas. Condições cromatográficas: coluna C18 (150 x 4,6 mm; 0,40 μm d.i.), FM: A – água com HCl 0,1 % (v/v) e B - MeOH com HCl 0,1 % (v/v), volume de injeção 20 μL , vazão da FM 1,0 mL min^{-1} , coluna mantida à 25 $^{\circ}\text{C}$, λ = 522 nm. Eluição isocrática: A) 50 %B e B) 40 %B.	71
Figura 3.3. Cromatogramas obtidos a partir do fatorial 2^2 aplicado para otimização da separação das antocianinas. Condições cromatográficas: coluna C18 (150 x 4,6 mm; 0,40 μm d.i.), FM: A – água com HCl 0,1 % (v/v) e B - MeOH com HCl 0,1 % (v/v), volume de injeção 20 μL , vazão da FM 1,0 mL min^{-1} , coluna mantida à 25 $^{\circ}\text{C}$, λ = 522 nm. Especificação dos ensaios 1-4 na Tabela 3.2.	73
Figura 3.4. Cromatogramas obtidos a partir do fatorial aplicado para otimização da separação das antocianinas. Condições cromatográficas: coluna C18 (250 x 4,6 mm; 0,40 μm d.i.), FM: A – água com HCl 0,1 % (v/v) e B - MeOH com HCl 0,1 % (v/v), volume de injeção 20 μL , vazão da FM 1,0 mL min^{-1} , coluna mantida à 30 $^{\circ}\text{C}$, λ = 522 nm. Especificação dos ensaios 1-4 na Tabela 3.2.	75
Figura 3.5. Melhor condição cromatográfica de partida: coluna C18 (250 x 4,6 mm; 0,40 μm d.i.), FM: A – água com HCl 0,1 % (v/v) e B - MeOH com HCl 0,1 % (v/v), gradiente de eluição de 20 – 80 % B em 30 min, volume de injeção 20 μL , vazão da FM 1,0 mL min^{-1} , coluna mantida à 30 $^{\circ}\text{C}$, λ = 522 nm, para início da otimização da separação	

das antocianinas.	77
Figura 3.6. Cromatogramas obtidos a partir do fatorial aplicado para otimização da separação das antocianinas. Condições cromatográficas: coluna C18 (250 x 4,6 mm; 0,40 µm d.i.), FM: A – água com HCl 0,1 % (v/v) e B - ACN com HCl 0,1 % (v/v), volume de injeção 20 µL, vazão da FM 1,0 mL min ⁻¹ , coluna mantida à 30 °C, λ = 522 nm. Especificação dos ensaios 1-4 na Tabela 3.2.	78
Figura 3.7. Estruturas químicas das antocianinas utilizadas na separação por cromatografia líquida.	81
Figura 3.8. Cromatogramas de extratos de: A) acerola, B) amora e C) framboesa. Condições cromatográficas: coluna C18 (250 x 4,6 mm; 0,40 µm d.i.), FM: A – água com HCl 0,1 % (v/v) e B - MeOH com HCl 0,1 % (v/v), gradiente de eluição de 25 – 55 % B em 30 min, volume de injeção 20 µL, vazão da FM 1,0 mL min ⁻¹ , coluna mantida à 30 °C, λ = 522 nm.	83
Figura 3.9. Cromatogramas da separação dos padrões de antocianinas. Condições cromatográficas: coluna C18 (250 x 4,6 mm; 0,40 µm d.i.), FM: A – água com HCl 0,1 % (v/v) e B - MeOH com HCl 0,1 % (v/v), gradiente de eluição de 25 – 55 % B em 30 min, volume de injeção 20 µL, vazão da FM 1,0 mL min ⁻¹ , λ = 522 nm coluna mantida à A) 25 °C e B) 35 °C.	84
Figura 3.10. Cromatogramas da separação dos padrões de antocianinas. Condições cromatográficas: coluna C18 (250 x 4,6 mm; 0,40 µm d.i.), FM: A – água com HCl 0,1 % (v/v) e B - MeOH com HCl 0,1 % (v/v), gradiente de eluição de 25 – 55 % B em 30 min, volume de injeção 20 µL, coluna mantida à 30 °C, λ = 522 nm, vazão da FM A) 0,8 mL min ⁻¹ e B) 1,2 mL min ⁻¹	85
Figura 3.11. Cromatograma da separação otimizada de antocianinas. Condições cromatográficas: coluna C18 (250 x 4,6 mm; 0,40 µm d.i.), FM: A – água com HCl 0,1 % (v/v) e B - MeOH com HCl 0,1 % (v/v), gradiente de eluição de 25 – 55 % B em 30 min, volume de injeção 20 µL, vazão da FM 1,0 mL min ⁻¹ , coluna mantida à 30 °C, λ = 522 nm.	86
Figura 3.12. Espectros de absorção no UV-Vis dos padrões de: A) cianidina-3,5-O-glicosídeo, B) cianidina-3-O-glicosídeo, C) pelargonidina-3-O-glicosídeo, D) malvidina-3-O-glicosídeo, E) delphinidina, F) cianidina, G) pelargonidina e H) malvidina. Condições cromatográficas de obtenção dos espectros: coluna C18 (250 x 4,6 mm; 0,40 µm d.i.), FM: A – água com HCl 0,1 % (v/v) e B - MeOH com HCl 0,1 % (v/v), gradiente de eluição de 25 – 55 % B em 30 min, volume de injeção 20 µL, vazão da FM 1,0 mL min ⁻¹ , coluna mantida à 30 °C.	88

Figura 4.1. Esquema experimental de extração líquido-líquido.	98
Figura 4.2. Ilustração do funcionamento de extração por SPE – etapas empregadas.	100
Figura 4.3. Cromatogramas obtidos nas extrações testadas: A) extração sólido-líquido, B) SPE e C) extração líquido-líquido. Condições cromatográficas: coluna C18 (250 x 4,6 mm; 0,40 μ m d.i.), FM: A – água com HCl 0,1 % (v/v) e B - MeOH com HCl 0,1 % (v/v), gradiente de eluição de 25 – 55 % B em 30 min, volume de injeção 20 μ L, vazão da FM 1,0 mL min ⁻¹ , coluna mantida à 30 °C, λ = 522 nm.	118
Figura 4.4. Eficiência de extração de antocianinas em morango através da variação do tipo de solvente e ácido.	122
Figura 4.5. Eficiência de extração de antocianinas em morango através da variação da porcentagem de ácido clorídrico e tempo de ultrassom	124
Figura 4.6. Superfície de resposta de modelo linear sugerido pelo Design-Expert para análise da melhor condição de extração.	126
Figura 4.7. Superfícies de resposta para modelo quadrático do: A) planejamento 1; B) planejamento 2 e C) planejamento 3.	130
Figura 4.8. Resultado da superfície de resposta que indica a melhor condição para extração máxima de antocianinas em morango.	131
Figura 4.9. Cromatograma do extrato otimizado de morango: 5,5 % HCl em MeOH (1:10 m/v, massa de morango:solvente extrator), 10 minutos de ultrassom à 20°C, 5 repetições de procedimento de extração. Condições cromatográficas: coluna C18 (250 x 4,6 mm; 0,40 μ m d.i.), FM: A – água com HCl 0,1 % (v/v) e B - MeOH com HCl 0,1 % (v/v), gradiente de eluição de 25 – 55 % B em 30 min, volume de injeção 20 μ L, vazão da FM 1,0 mL min ⁻¹ , coluna mantida à 30 °C, λ = 522 nm. Antocianinas identificadas: 1) cianidina-3-glicosídeo, 2) pelargonidina-3-glicosídeo e 3) perlargonidina-3-rutinosídeo.	133
Figura 4.10. Efeito da temperatura no extrato de morango.	137
Figura 4.11. Gráfico do inverso da temperatura versus ln da constante de equilíbrio, dados plotados e energia de ativação obtida da equação da reta estão apresentados na Tabela 4.9.	138

Figura 4.12. Mecanismo de degradação térmica da pelargonidina-3-glicosídeo proposto em trabalho de Patras <i>et al.</i> (2010).	140
Figura 4.13. Efeito das condições de estocagem (diferentes ambientes com diferentes temperaturas) no extrato de morango.	141
Figura 4.14. Cromatogramas de monitoramento da hidrólise das antocianinas presentes no morango, utilizando HCl 1 mol L ⁻¹ para reação. Condições cromatográficas descritas na seção 4.3.2.4.	144
Figura 4.15. Cromatogramas de monitoramento da hidrólise das antocianinas presentes no morango, utilizando HCl 2 mol L ⁻¹ para reação. Condições cromatográficas descritas na seção 4.3.2.4.	147
Figura 4.16. Cromatogramas de monitoramento da hidrólise das antocianinas presentes no morango, utilizando HCl 3 mol L ⁻¹ para reação. Condições cromatográficas descritas na seção 4.3.2.4.	150
Figura 4.17. Cromatogramas de monitoramento da hidrólise das antocianinas presentes no morango, utilizando HCl 4 mol L ⁻¹ para reação. Condições cromatográficas descritas na seção 4.3.2.4.	153
Figura 4.18. Ligação glicosídica presente nas antocianinas.	156
Figura 4.19. Mecanismo de formação de acetais.	156
Figura 4.20. Equilíbrios de desprotonação da pelargonidina-3-glicosídeo.	157
Figura 4.21. Hidrólise das antocianinas.	159
Figura 4.22. Gráfico de log k _{obs} versus concentração de HCl em mol L ⁻¹	159
Figura 4.23. Cromatograma do extrato de morango hidrolisado. Condições de hidrólise: extrato:HCl 8 mol L ⁻¹ (1:1, v/v), 45 minutos à 100 °C. Condições cromatográficas: coluna C18 (250 x 4,6 mm; 0,40 µm d.i.), FM: A – água com HCl 0,1 % (v/v) e B - MeOH com HCl 0,1 % (v/v), gradiente de eluição de 25 – 55 % B em 30 min, volume de injeção 20 µL, vazão da FM 1,0 mL min ⁻¹ , coluna mantida à 30 °C, λ = 522 nm. (1) Cianidina e (2) Pelargonidina.	160
Figura 5.1. Curvas analíticas das antocianinas estudadas.	185
Figura 6.1. Estrutura básica das antocianinas, hidroxilas demonstradas aumentam a estabilidade do radical formado após reação de oxido-redução.	196
Figura 6.2. Esquema de instrumentação de medida de atividade antioxidante por detecção direta em cromatografia líquida de alta	

eficiência. Adaptada de Niederlander <i>et al.</i> (2008).	201
Figura 6.3. Esquema instrumental de detecção online para medida da atividade anti-oxidante desenvolvido no laboratório.	207
Figura 6.4. Reação de formação do radical $ABTS^{*+}$, a partir da reação com persulfato de potássio.	209
Figura 6.5. Curvas analíticas de: (A) cianidina-3,5-diglicosídeo, (B) cianidina-3-glicosídeo, (C) pelargonidina-3-glicosídeo, (D) malvidina-3-glicosídeo, (E) delphinidina, (F) cianidina, (G) pelargonidina, (H) malvidina e (I) Trolox.	211
Figura 6.6. Comparação cromatográfica da separação e medida de atividade anti-oxidante de oito antocianinas: 1) cianidina-3,5-diglicosídeo, 2) cianidina-3-glicosídeo, 3) pelargonidina-3-glicosídeo, 4) malvidina-3-glicosídeo, 5) delphinidina, 6) cianidina, 7) pelargonidina, 8) malvidina e 9) Trolox. (A) Condições cromatográficas: coluna C18 (250 x 4,6 mm; 0,40 μ m d.i.), FM: A – água com H_3PO_4 0,1 % (v/v) e B - MeOH com H_3PO_4 0,1 % (v/v), gradiente de eluição de 25 – 55 % B em 30 min, 100 % B em 50 min, volume de injeção 20 μ L, vazão da FM 1,0 mL min ⁻¹ , coluna mantida à 30 °C, λ = 522 nm. (B) Condições de medida de AA: radical $ABTS^{*+}$ com vazão de 1,27 mL min ⁻¹ misturado com componentes eluídos através da coluna cromatográfica com a FM em tubo "T" e reator (250 cm de comprimento e 0,80 mm de d.i.), detecção dos picos negativos em λ = 734 nm.	214
Figura 6.7. Comparação cromatográfica da separação e medida de atividade anti-oxidante de extrato de morango. (A) Condições cromatográficas: coluna C18 (250 x 4,6 mm; 0,40 μ m d.i.), FM: A – água com H_3PO_4 0,1 % (v/v) e B - MeOH com H_3PO_4 0,1 % (v/v), gradiente de eluição de 25 – 55 % B em 30 min, volume de injeção 20 μ L, vazão da FM 1,0 mL min ⁻¹ , coluna mantida à 30 °C, λ = 522 nm. (B) Condições de medida de AA: radical $ABTS^{*+}$ com vazão de 1,27 mL min ⁻¹ misturado com componentes eluídos através da coluna cromatográfica com a FM em tubo "T" e reator (250 cm de comprimento e 0,80 mm de d.i.), detecção dos picos negativos em λ = 734 nm.	216
Figura 6.8. Correlação entre o poder anti-oxidante e o fator de retenção (<i>k</i>) das antocianinas.	218
Figura 6.9. Estruturas químicas das antocianinas estudadas.	219
Figura 6.10. Ligação simples livre para rotações.	221
Figura 6.11. Gráfico de log do fator de retenção <i>versus</i> a média ponderada dos ângulos diedros dos confôrmeros do sistema	

conjugado.	222
Figura 6.12. Gráfico de poder anti-oxidante <i>versus</i> a média ponderada dos ângulos diedros dos confôrmers do sistema conjugado.	223

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Detectores mais comuns utilizados em CLAE.	47
Tabela 3.1. Características químicas e fontes naturais das antocianinas estudadas.	70
Tabela 3.2. Condições do fatorial 2^2 para otimização da separação de mistura oito antocianinas e antocianidinas, através de gradiente linear de eluição.	72
Tabela 3.3. Resoluções entre os picos cromatográficos dos quatro ensaios de fatorial aplicados em mistura dos oito padrões.	76
Tabela 3.4. Tempos de retenção de cada antocianina obtidos através da separação otimizada. Condições cromatográficas: gradiente de eluição de 25 – 55 % B em 30 min, volume de injeção 20 μ L, vazão da FM 1,0 mL min ⁻¹ , coluna mantida à 30 °C, λ = 522 nm.	87
Tabela 3.5. Parâmetros cromatográficos: tempo de retenção, fator de retenção e número de pratos.	89
Tabela 3.6. Parâmetros cromatográficos: fator de separação e resolução.	90
Tabela 4.1. Extração de antocianinas de diversas matrizes.	103
Tabela 4.2. Compilação de hidrólises realizadas em diversos extratos de antocianinas.	108
Tabela 4.3. Planejamento e concentrações obtidas no estudo da eficiência de extração de antocianinas em morango.	125
Tabela 4.4. Variáveis independentes e valores dos três níveis utilizados para otimização da extração.	127
Tabela 4.5. Design experimental: planejamento 1 para análise por MSR e concentrações obtidas no estudo da eficiência de extração de antocianinas em morango, mantendo-se constante a % de ácido da solução extratora (5,5 %) e variando-se o tempo e a temperatura de extração.	128
Tabela 4.6. Design experimental: planejamento 2 para análise por MSR e concentrações obtidas no estudo da eficiência de extração de antocianinas em morango, mantendo-se constante a temperatura do banho (30 °C) de ultrassom e variando-se o tempo de extração e a % de ácido da solução extratora.	128
Tabela 4.7. Design experimental: planejamento 3 para análise por MSR e concentrações obtidas no estudo da eficiência de extração de	

antocianinas em morango, mantendo-se constante tempo de extração (20 minutos) e variando-se a temperatura do banho de ultrassom e a % de ácido da solução extratora.	129
Tabela 4.8. Quantificação das antocianinas presentes no morango.	134
Tabela 4.9. Parâmetros cinéticos de degradação da pelargonidina-3-glicosídeo presente em extrato de morango quando submetido a diferentes temperaturas.	138
Tabela 4.10. Parâmetros cinéticos de degradação da pelargonidina-3-glicosídeo presente em extrato de morango quando estocados em diferentes temperaturas.	141
Tabela 5.1. Faixa de linearidade para avaliação das figuras de mérito da metodologia de separação cromatográfica de oito antocianinas.	179
Tabela 5.2. Planejamento das variações das condições cromatográficas para avaliação da robustez do método.	182
Tabela 5.3. Parâmetros de avaliação da linearidade do método de separação.	183
Tabela 5.4. Limites de detecção e quantificação das antocianinas estudadas.	184
Tabela 5.5. Parâmetros cromatográficos calculados: fator de retenção e número de pratos da separação otimizada - gradiente de eluição de 25 – 55 % B em 30 min, volume de injeção 20 μ L, vazão da FM 1,0 mL min^{-1} , coluna mantida à 30 $^{\circ}\text{C}$, $\lambda = 522 \text{ nm}$	186
Tabela 5.6. Parâmetros cromatográficos calculados: resolução e fator de separação da separação otimizada - gradiente de eluição de 25 – 55 % B em 30 min, volume de injeção 20 μ L, vazão da FM 1,0 mL min^{-1} , coluna mantida à 30 $^{\circ}\text{C}$, $\lambda = 522 \text{ nm}$	186
Tabela 5.7. Resultados de % de recuperação das antocianinas em extrato de morango.	187
Tabela 5.8. Avaliação da precisão através de análise da precisão instrumental, repetibilidade e precisão intermediária do método.	188
Tabela 5.9. Avaliação da robustez do método por variação das condições cromatográficas.	189
Tabela 6.1. Parâmetros das curvas analíticas de medida de atividade anti-oxidante das antocianinas e do padrão de referência (Trolox).	210
Tabela 6.2. Poder anti-oxidante, das antocianinas estudadas, obtidos a partir de medida de atividade anti-oxidante por derivatização pós-	

coluna e detecção <i>online</i>	212
Tabela 6.3. Dados de fator de retenção (<i>k</i>) e poder anti-oxidante das antocianinas estudadas.	217

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- α – fator de separação
- % B - porcentagem de solvente na fase móvel
- [pelarg-3-glic] – concentração de pelargonidina-3-glicosídeo
- AA – atividade anti-oxidante
- ABTS^{•+} – 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
- ACN – acetonitrila
- ANOVA – análise de variância
- BHA – terc-butil-4-hidroxianisol
- BHT – 2,6-di-terc-butil-4-metilfenol
- CE – eletroforese capilar
- CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência
- CLAE-DAD - cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos
- CLAE-FR - cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa
- CP – cromatografia em papel
- CV – coeficiente de variação
- DAD – detector de arranjo de diodos
- DPPH[•] – 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
- E_a – energia de ativação
- ERO – espécie reativa de oxigênio
- EtOH – etanol
- FE – fase estacionária
- FIA – análise por injeção em fluxo
- FM – fase móvel
- FRAP – poder anti-oxidante de redução do ferro
- Galac - galactose
- Glic - glicose
- HPLC - High Performance Liquid Chromatography
- k – constante de velocidade de reação
- k – fator de retenção
- K_a – constante de equilíbrio ácido

K_h – constante de hidratação
 k_{ox} – poder anti-oxidante
 K_T – constante de tautomerização
LC-MS - cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
LD – limite de detecção
LQ – limite de quantificação
MeOH – metanol
MS – espectrometria de massas
MSR – metodologia de superfície de resposta
ORAC – capacidade de absorver radical oxigênio
QRPR – relação quantitativa retenção-propriedade anti-oxidante
QSRR – relação quantitativa estrutura-retenção
 R^2 – coeficiente de determinação
RMN – ressonância magnética nuclear
 R_s – resolução
RSD – desvio-padrão relativo
S/R – relação sinal/ruído
SPE – extração em fase sólida
 $t_{1/2}$ – tempo de meia-vida
TEAC – capacidade anti-oxidante equivalente ao Trolox
TFA – ácido trifluoroacético
 t_M – tempo morto
 t_R – tempo de retenção
Trolox – ácido 6-hidróxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
UV-Vis – ultravioleta-visível

RESUMO

Canuto, G. A. B. **Caracterização, quantificação e estudo da relação retenção-propriedade anti-oxidante (QRPR) de antocianinas em extratos de morango (*Fragaria vesca*) por cromatografia líquida de alta eficiência.** 2011. 235p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências (Química). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Antocianinas são pigmentos solúveis em água, pertencente à classe dos flavonoides. Podem ser encontradas nas formas glicosiladas e não-glicosiladas. A diversidade destas ocorre devido ao número e à posição de hidroxilas, metoxilas e açúcares na cadeia carbônica. São altamente instáveis e suscetíveis de degradação. O interesse no estudo é decorrente dos possíveis efeitos anticarcinogênico, antimicrobiano, antimutagênico e anti-oxidante. A atividade anti-oxidante está associada à capacidade que possuem em doar hidrogênios e elétrons a radicais livres. A CLAE tem sido a técnica mais indicada para análise destes pigmentos e, acoplada ao detector de arranjo de diodos, obtêm-se espectros dos compostos separados, conseguindo-se alta seletividade.

Este trabalho tem como objetivos: otimizar a separação de oito antocianinas por CLAE-FR, otimizar a extração e estudar a hidrólise desses compostos em morango e medir a atividade anti-oxidante por derivatização pós-coluna, para estudo da relação retenção-propriedade anti-oxidante.

A separação foi otimizada avaliando-se a composição e vazão da fase móvel, tempo de retenção das antocianinas e temperatura da coluna. O ótimo foi obtido com gradiente de eluição (25-55 %B) por 30 minutos, sendo: A – água e B – metanol ambos com HCl 0,1 % (v/v), coluna C18 mantida à 30°C, vazão da fase móvel de 1,0 mL min⁻¹ e identificação dos pigmentos a 522 nm.

Extrações sólido-líquido, líquido-líquido e SPE foram testadas em amostras de morango. O processo também envolveu a seleção de solvente e

ácido. A extração sólido-líquido apresentou maior eficiência. Polpas de morangos foram misturadas com solução de MeOH:HCl 5,5 % (v/v) e levadas ao ultrassom (20 °C) por 10 minutos, procedimento repetido cinco vezes. A estabilidade do extrato foi avaliada por submissão do mesmo a altas temperaturas (80, 90 e 100 °C) durante longo tempo e estocagem em freezer, geladeira e temperatura ambiente, mostrando que a degradação das antocianinas segue cinética de reação de primeira ordem. Para obtenção das agliconas foram executados ensaios de hidrólise ácida. O mecanismo da hidrólise da pelargonidina-3-glicosídeo foi avaliado e chegou-se a ótima condição de: extrato/HCl 8 mol L⁻¹ (1:1, v/v) por 60 minutos a 100 °C.

No método desenvolvido, avaliou-se: linearidade, LD, LQ, exatidão, precisão e robustez. Por fim, desenvolveram-se estudos de medida da atividade anti-oxidante, por método de detecção *online*, acoplado um sistema de injeção em fluxo ao de separação, misturando uma solução de ABTS^{•+} (100 µmol L⁻¹) sob vazão de 1,27 mL min⁻¹ aos compostos eluídos pela coluna cromatográfica. O resultado de curvas de calibração das antocianinas comparado ao padrão de referência (Trolox) indicou que o poder anti-oxidante de cada substância diminui na ordem: cianidina-3-glicosídeo, pelargonidina-3-glicosídeo, malvidina-3-glicosídeo, cianidina-3,5-diglicosídeo, delphinidina, cianidina, malvidina e pelargonidina. Um estudo teórico, baseado neste poder e na retenção dos compostos demonstrou que uma diminuição da retenção, por aumento na polaridade da molécula, implica em diminuição do poder anti-oxidante e ainda, relacionou o poder às características de ressonância, afetada pelos ângulos entre os sistemas de conjugação, bem como solvatação de grupos hidroxilas ligados à estrutura carbônica.

Palavras-chave: antocianinas, atividade antirradical, ABTS, cromatografia líquida de alta eficiência, morango.

ABSTRACT

Canuto, G. A. B. **Characterization, quantification and study of the quantitative retention-property antioxidant relationship (QRPR) of anthocyanins in extracts of strawberry (*Fragaria vesca*) for high performance liquid chromatography.** 2011. 235p. Masters Thesis - Graduate Program in Chemistry Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Anthocyanins are water soluble pigments, belonging to the class of flavonoids. They can be found in glycosylated and non-glycosylated forms. The diversity of these compounds is due to the number and position of hydroxyl, methoxyl and sugars attached to the carbon chain. They are highly unstable and susceptible to degradation. Interest in the study of these compounds is due to the possible anticancer, antimicrobial, antimutagenic and antioxidant properties. The antioxidant activity is associated with the capacity they have to donate protons and electrons to free radicals. The HPLC technique has been the most suitable for the analysis of these pigments and, coupled to a diode array detector, on-line spectra of the separated compounds can be obtained, achieving high selectivity.

This work aims at optimizing the separation of eight anthocyanins by RP-HPLC, and developing methods for the extraction and hydrolysis of these compounds in strawberry; in addition, it includes the measurement of the antioxidant activity of anthocyanins by column post-derivatization, and the study of the quantitative relationship between retention and antioxidant property (QRPR).

The separation was optimized by evaluating the composition and mobile phase flow rate, retention time of the anthocyanins and column temperature. The optimum was obtained with gradient elution (25-55% B) for 30 minutes with: A - water and B - methanol, both with 0.1% HCl (v / v), C18 column kept at 30 °C and mobile phase flow rate of 1.0 mL min⁻¹; the identification of the pigments were carried out at 522 nm.

Solid-liquid extraction, liquid-liquid and SPE were tested on strawberry samples. The process also involved the selection of solvent and acid. The solid-liquid extraction showed greater efficiency. Strawberry pulps were mixed with a solution of 5.5% (v / v) MeOH HCl and cooled in ultrasound bath (20 °C) for 10 minutes; the procedure was repeated five times. The stability was evaluated by submitting the extract at high temperatures (80, 90 and 100 °C) for a long time and storage in a freezer, refrigerator and room temperature, showing that the degradation kinetics of anthocyanins followed a first order reaction. To obtain the aglycones, acid hydrolysis were performed. The mechanism of hydrolysis of pelargonidin-3-glucoside was evaluated and the best condition was: (1:1, v / v) extract : 8 mol L⁻¹ HCl in 60 minutes at 100 °C.

The proposed method was validated with respect to: linearity, LOD, LOQ, accuracy, precision and robustness. Finally, studies to measure online the antioxidant activity of extracts were developed, coupling in parallel a flow injection system to the separation system, where a solution of ABTS^{•+} (100 μmol L⁻¹) under a flow rate of 1.27 mL min⁻¹ was mixed with the compounds eluted from the separation column. The resulting calibration curves of anthocyanins compared to Trolox indicated that the antioxidant power of each substance decreased in the order: cyanidin-3-glucoside, pelargonidin-3-glucoside, malvidin-3-glucoside, cyanidin-3,5-diglucoside, delphinidin, cyanidin, malvidin and pelargonidin. A theoretical study based on the antioxidant power and the retention of the compounds showed a decrease in retention due to an increase in the polarity of the molecule, implying in decreased antioxidant capacity, also related to the molecule resonance characteristics, affected by the angles between the systems conjugation, as well as the solvation of hydroxyl groups linked to the structure carbon.

Keywords: anthocyanins, activity anti-radical, ABTS, high performance liquid chromatography, strawberry.

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Flavonoides

Flavonoides são pigmentos naturais responsáveis pelo aspecto colorido das folhas e flores, podendo ainda estar em outras partes da planta. Protegem o organismo humano do dano produzido por agentes oxidantes, como os raios ultravioletas, poluentes ambientais, substâncias químicas presentes nos alimentos, etc [1-3]. O efeito protetivo de frutas e vegetais contra doenças coronárias e o câncer tem sido atribuído à presença dos flavonoides [4,5]. Esses benefícios saudáveis dos flavonoides têm sido associados ao fato de serem anti-oxidantes, já que são doadores de hidrogênio, e ainda por suas habilidades como agente quelante [6,7].

São derivados biossinteticamente da fenilalanina [6]. Possuem uma estrutura básica constituída de dois anéis aromáticos ligados por uma cadeia de três átomos de carbono, formando um heterocíclico oxigenado (Figura 1.1) [2,7]. O organismo humano não é capaz de produzir esses compostos fenólicos, cabendo ao homem obtê-los por meio da alimentação [8]. Estão amplamente distribuídos em plantas, frutas, vegetais e em diversas bebidas, representando componentes substanciais da fração energética da dieta humana [2].

Figura 1.1. Estrutura básica dos flavonoides.

Já foram identificados mais de 8000 componentes da família dos flavonoides através de diversos métodos de separação e por absorção na região do ultravioleta e visível do espectro eletromagnético [6]. Conforme o estado de oxidação do anel pirano (heterocíclico oxigenado), tem-se diferentes subclasses: flavonóis, flavonas, flavanóis, flavanonas e antocianinas (Figura 1.2) [2,3,9,6].

Figura 1.2. Estrutura básica de algumas subclasses de flavonoides.

Os flavonoides podem ser encontrados na cerveja, vinho, chá verde, chá preto, além de frutas e verduras. Também são encontrados em grãos, como a soja; nesses alimentos e bebidas, podem ser consumidos na dieta humana de forma natural, mas também serem utilizados junto com vitaminas e minerais, na forma de suplementos alimentares [3].

1.2. Antocianinas

As antocianinas, pigmentos mais abundantes da classe de flavonoides, são moléculas únicas entre os compostos fenólicos encontrados na natureza [10-13]. Diferem dos demais flavonoides por possuírem uma carga positiva no anel pirano [14] (Figura 1.2).

São reconhecidas como contribuintes para o crescimento, desenvolvimento e reprodução das plantas [15]. As antocianinas estão presentes nas raízes, caules, folhas, flores e frutos em uma grande diversidade de plantas [16]; encontram-se dissolvidas na seiva das células, próximas às superfícies das plantas [17], e ainda no vacúolo de flores e frutos [18].

O termo antocianina, inventado por Marquart em 1853, é derivado do grego e significa flor azul (*anthos* = flores; *kianos* = azul) [19,20]. As antocianinas são responsáveis pelas cores rosa, vermelha, violeta e azul de flores e frutos [21-23]. A cor exibida é explicada por Pauling (1939), em que a ressonância do íon flavílio (estrutura na Figura 1.2) causa a intensidade da cor. As ligações duplas conjugadas presentes nesses compostos fazem com que absorvam fortemente na região de 500-600 nm [11,20].

Antocianinas são consideradas os pigmentos mais solúveis em água e sensíveis ao calor, apresentando-se, na maior parte das vezes, glicosiladas, que auxiliam na estabilização da molécula e ainda facilitam sua solubilidade [17,24-26]. As diferenças estruturais entre essa classe de flavonoides são o número de hidroxilas, a natureza e o número de açúcares ligados à estrutura flavílio, ligantes alifáticos ou carboxilatos aromáticos no açúcar da molécula e a posição dessas ligações [24,27-29].

Existem dois tipos de pigmentos: os glicosilados (chamados antocianinas), sendo os açúcares mais comumente encontrados: D-glicose, D-ramnose, D-galactose, D-xilose, rutinose e arabinose [25,30] (Figura 3), além de ácidos fenólicos (o p-cumárico, o cafêico e o ferrúlico [25]) como grupos

acilados presentes nesses pigmentos; e os não-glicosilados (agliconas, chamados antocianidinas), nos quais a diversidade se deve ao número e à posição de hidroxilas e metoxilas ao longo da cadeia carbônica [25,29,31]. Os grupos acil e os açúcares ligados à aglicona possuem um efeito significativo na estabilidade e reatividade das antocianinas [20].

Até o momento foram encontradas mais de 500 antocianinas diferentes e 23 antocianidinas, sendo as seis mais comuns demonstradas na Figura 1.3 [6,29].

ANTOCIANIDINA	R₁	R₂	R₃	R₄
Pelargonidina	H	H	OH	OH
Cianidina	OH	H	OH	OH
Peonidina	OCH ₃	H	OH	OH
Delfinidina	OH	OH	OH	OH
Petunidina	OCH ₃	OH	OH	OH
Malvinidina	OCH ₃	OCH ₃	OH	OH
ANTOCIANINA				
Malvina	OCH ₃	OCH ₃	OGlic	OGlic
Calistefina	H	H	OGlic	H
Queracianina	OH	H	ORut	H
Oenina	OCH ₃	OCH ₃	OGlic	OH
Cianina	OH	H	OGlic	OGlic
Curomanina	OH	H	OGlic	OH
Primulina	OCH ₃	OCH ₃	OGalac	OH

Figura 1.3. Diferentes estruturas de antocianinas e antocianidinas.

Alimentos como uva (vinho) [10,24,32-35], morango [17,18,36-38], framboesa [39,40,41] acerola [42,43], açaí [17,22,43-46], as chamadas “berries” [39,47,48], berinjela [17], cenoura [49], repolho roxo [17,31], entre outros, são caracterizados como potencializadores quanto ao conteúdo de antocianinas em sua composição química.

1.2.1. Estabilidade das Antocianinas

Antocianinas isoladas são altamente instáveis e muito suscetíveis de degradação [21]. Apresentam resistência diferenciada aos efeitos dos agentes de degradação, em razão das diferentes estruturas existentes [50]. O mecanismo exato de degradação ainda não é bem estabelecido; entretanto, acredita-se que a quebra de ligações covalentes por oxidação esteja envolvida [11].

Devido aos atrativos como cor, solubilidade em água e o potencial terapêutico, as antocianinas são muito estudadas e requeridas para a utilização em produtos alimentícios. O que limita seu uso, muitas vezes, é a instabilidade, que ainda precisa ser muito estudada [51].

Diversos fatores como pH, variação de temperatura, estrutura química, concentração, luz, oxigênio, solventes, presença de enzimas, íons metálicos, etc, afetam a estabilidade das antocianinas [21,52]. Wang *et al.* (2010) estudaram a estabilidade de antocianinas em mirtilo variando o pH do meio (1,0 – 9,0), a temperatura de estocagem (ambiente até 100°C) e incidência de luz. Os resultados apontaram que sob condições severas de pH, temperatura e incidência de luz, o conteúdo total de antocianinas em mirtilo diminuiu significativamente. Quanto à estrutura química desses compostos, sabe-se que quanto maior o número de hidroxilas na molécula, menor é a estabilidade dela, e quanto maior o número de metoxilas, maior é a sua estabilidade [20].

1.2.1.1. pH

Antocianinas podem ser encontradas em quatro diferentes formas químicas em solução aquosa: cátion flavílio, base quinoidal, pseudobase carbinol e chalcona, dependendo do pH do meio [16,18,21,53]. São mais estáveis em soluções ácidas que em neutras ou alcalinas [50].

Em valores de pH baixo, como 2,0, as antocianinas se apresentam na forma de cátion flavílio, exibindo cor vermelha. Quando o valor do pH aumenta, pode ocorrer uma reação de hidratação do cátion flavílio ou uma reação de transferência de próton. Enquanto, a primeira reação produz a pseudobase carbinol (incolor) (Equação 1), geralmente em pH 6,0, que pode ainda transformar-se em chalcona (Equação 2), também incolor (pH acima de 7,0); a segunda reação produz a base quinoidal (azul) (Equação 3), que encontra-se em co-equilíbrio com o cátion flavílio; esse equilíbrio ocorre em pH por volta de 3,0-4,0 [8,21,33,35,52,54]. Diferenças nas estruturas químicas das antocianinas em solução aquosa estão ilustradas na Figura 1.4.

Março e Scarminio (2007), através de um estudo cinético das transformações estruturais das antocianinas presentes em hibisco por análises quimiométricas de espectro UV-Vis, calcularam as constantes de equilíbrio por uso de concentração relativa [8], sendo:

$$K_h = a_{H^+} \frac{[B]}{[AH^+]} = 2,60 \pm 0,01$$

$$K_T = \frac{[C]}{[B]} = 0,14 \pm 0,01$$

$$K_a = a_{H^+} \frac{[A]}{[AH^+]} = 4,24 \pm 0,04$$

Figura 1.4. Estruturas moleculares das antocianinas em diferentes valores de pH em solução aquosa.

Conforme o pH do meio é alterado, ocorrem mudanças pronunciadas nos máximos de absorção no espectro UV-Vis das antocianinas. Isso porque, aumentando-se o pH, ocorre uma diminuição do número de ligações duplas conjugadas, que são responsáveis pelo aumento nos máximos de absorção das substâncias, pela protonação do cátion flavílio. Com a diminuição das ligações duplas conjugadas, os máximos de absorção das antocianinas tendem a se deslocarem para comprimentos de onda menores, o que caracteriza a perda de coloração [19,36].

Sendo assim, investigações sobre a estabilidade e a variedade de coloração das antocianinas influenciadas por alterações de pH concluem que as mudanças na coloração desses compostos são mais significativas em um meio alcalino devido a sua instabilidade estrutural [21].

1.2.1.2. Temperatura

O aquecimento é um fator que acelera a degradação das antocianinas [19]. A degradação térmica desses pigmentos pode resultar em uma grande variedade de espécies, dependendo da intensidade do aquecimento e da natureza química da antocianina [11]. Eventualmente, a degradação térmica resulta na formação de produtos com coloração castanho-marrom, especialmente na presença de oxigênio [20].

A temperatura também pode afetar na extração e resultar em outro composto [4]. Por isso, é necessário preocupar-se com a temperatura de trabalho, que pode acarretar em degradação ou perda total da antocianina.

O efeito da temperatura na estabilidade de antocianinas em alimentos tem sido estudado por muitos pesquisadores. Diversos autores relatam a existência de uma razão logarítmica entre a degradação da antocianina e o aumento da temperatura [11,50], como no trabalho de Patras *et al.* (2010).

Kirca *et al.* (2003), demonstraram que a degradação térmica de antocianinas segue uma relação linear entre concentração de antocianinas e

tempo de estoque em determinada temperatura, seguindo assim, uma reação de primeira ordem [55]. O mecanismo exato da degradação desses pigmentos em solução aquosa não é bem elucidado, mas acredita-se que elevadas temperaturas promovam a formação de chalconas (incolor), como o primeiro passo de degradação [11,50].

Morais *et al.* (2002) avaliaram a estabilidade de cinco antocianinas presentes em extratos de uva frente a mudanças na temperatura, tempo de estocagem e quantidade de luz incidida sobre os extratos. Observaram um aumento na decomposição quando se estoca um produto por muitos dias sob altas temperaturas [34].

Uma análise cromatográfica relatada por Villiers *et al.* (2009) afirmam que a degradação térmica de antocianinas apresenta dois caminhos: primeiro a transformação da espécie chalcona em um derivado de cumarina glicosilada com perda do anel aromático B (Figura 1.3); depois, hidrólise da ligação glicosídica [24]. Kirca *et al.* (2007) realizaram testes de degradação de antocianinas variando-se a temperatura, pH e conteúdo de sólidos solúveis presentes em amostras de "black carrot"; observaram que com o aumento dessas variáveis durante a estocagem do alimento houve aumento na degradação [49].

1.2.1.3. Concentração e Efeito de Solvente

Recentes estudos com antocianinas demonstram que modificando os solventes (natureza e concentração), observam-se mudanças na coloração desses pigmentos. Em solventes próticos, as antocianinas exibem cor vermelha; em apróticos, as soluções apresentam coloração amarelada. Esse fato tem sido explicado propondo-se que espécies vermelhas e amarelas correspondem a monômeros e dímeros, respectivamente; portanto, quando aumenta-se a concentração de antocianina, a coloração amarela é favorecida [21].

1.2.1.4. Co-pigmentação e Íons Metálicos

Se considerarmos a coloração apenas um fator do pH, pode-se chegar a inequívoca conclusão de que as plantas não deveriam ser coloridas, já que, na maior parte dos casos, o pH no qual as plantas se encontram é próximo à neutralidade. Sendo assim, o que se conclui é que as antocianinas (e sua coloração) são estabilizadas por fatores físico-químicos incomuns, como por exemplo, efeitos de co-pigmentação [56,57]. A co-pigmentação pode ocorrer intra ou intermolecularmente, sendo que a primeira ocorre quando o pigmento e o co-pigmento fazem parte da mesma molécula, e a segunda ocorre por mecanismos de forças de Van der Waals e efeitos hidrofóbicos em meio aquoso entre a antocianina e o co-pigmento (flavonoide, alcaloide, aminoácido) [27,58].

A variedade de cores nesses compostos foi também explicada pela formação de quelatos com sais flavílio e íons metálicos [21]. Os íons metálicos sozinhos não possuem coloração, mas associados às antocianinas conferem grande quantidade de cores e tons a esses compostos [27].

1.2.2. Efeitos Benéficos ao Organismo

Antocianinas têm sido demonstradas como papel muito importante na fisiologia das plantas, e são importantes para a indústria de alimentos e na saúde humana [31]. Não se encontra nenhum relato na literatura sobre a toxicidade desses compostos amplamente distribuídos no reino vegetal [59] e, por isso, o interesse por esses pigmentos como corantes naturais [39] se intensificou nos últimos anos, substituindo corantes sintéticos por apresentarem coloração atrativa e alta solubilidade em água, fazendo com que sejam facilmente incorporados aos sistemas aquosos [48].

Inúmeras pesquisas têm demonstrado que as antocianinas e suas respectivas agliconas (antocianidinas) são compostos bio-ativos e que, dentre os vários efeitos fisiológicos, possuem capacidade anti-oxidante [11,39,42,47,58,60,61] e propriedades anti-inflamatórias [39,42,43,62]. A eficiência protetiva das antocianinas depende de sua estrutura química, bem como do grau de glicosilação e do número de grupos hidroxilas ligados ao anel B (Figura 1.3) [43].

São consideradas anti-oxidantes mais potentes frente aos clássicos, como o BHA (*terc*-butil-4-hidroxianisol), BHT (2,6-di-*terc*-butil-4-metilfenol) e o α -tocoferol [62]. A atividade anti-oxidante desses compostos está associada à capacidade que possuem de doar hidrogênios e elétrons a radicais livres [5,28]. A eficiência da ação anti-oxidante das antocianinas depende da sua estrutura química e da concentração desses compostos presentes nos alimentos; entretanto, essa quantidade está diretamente relacionada às condições ambientais às quais os alimentos são submetidos, como pH do solo no qual foi cultivado, grau de maturação do alimento, etc [63].

Também são capazes de promover a vaso-dilatação [43,44], atuam na prevenção da hiperglicemia, estimulam a secreção de insulina, diminuem o risco de doenças cardiovasculares [11,43] melhoram a adaptação da visão noturna e previnem a fadiga visual [42]. Estudos também afirmam que esses compostos podem inibir a proliferação de células humanas cancerígenas, originadas em diferentes partes do corpo como: estômago, cólon, mama, pulmão e sistema nervoso central [11,33,42,58]. São tidos como compostos neuroprotetivos [62].

Diversos estudos epidemiológicos demonstraram que a morte por doenças coronárias tem diminuído significativamente pelo consumo moderado de vinho tinto. Nestes, é relatada a grande presença de compostos fenólicos, em sua maioria antocianinas; sendo assim, diversas discussões sobre os benefícios do consumo de alimentos e bebidas contendo essas poderosas substâncias são encontradas na literatura [62].

A qualidade dos produtos contendo antocianinas, natural ou industrialmente, aliada aos benefícios à saúde, têm levado ao interesse desses pigmentos a fazerem parte da dieta humana [45].

1.2.3. Técnicas para Análise de Antocianinas

A determinação exata de antocianinas é de importância significativa, principalmente quando estas são utilizadas para fins farmacêuticos [24]. Sua quantificação apresenta três problemas principais: a falta de estabilidade desses compostos, a possibilidade de estarem sob a forma de co-pigmentação e a interferência de outras moléculas na própria medida [44]. A análise de antocianinas em extratos vegetais deve ser realizada de acordo com o objetivo do estudo [19].

Inúmeras técnicas como cromatografia em papel (CP), espectrofotometria, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), eletroforese capilar (CE), espectrometria de massas (MS) e ressonância magnética nuclear (RMN) podem ser empregadas, em separado ou acopladas umas às outras, para identificação de antocianinas [19,64].

Quando se deseja realizar um estudo de detecção, a cromatografia em papel é mais que suficiente. Entretanto, a mesma não é muito utilizada por ser demorada e dificultar a quantificação, além da não especificidade [19,65]. Para um estudo mais elaborado, métodos baseados em medida de absorvância têm sido muito utilizados; inúmeros trabalhos sobre análise de degradação de antocianinas e medida de atividade anti-oxidante são realizados utilizando-se espectrofotometria [35,44,49,66-68], que apresenta boa repetibilidade na medida do total de antocianinas, e por isso é, geralmente, muito empregada em análises de rotina em laboratórios de controle de qualidade [4]. Todavia, apenas espectros de absorção no UV-Vis não proveem informação suficiente para uma investigação detalhada [24].

Por desejar-se conhecer mais profundamente a química desses compostos e ainda identificá-los e quantificá-los em matrizes complexas, como extratos vegetais, a cromatografia líquida de alta eficiência e a eletroforese capilar, ambas acopladas ou não à espectrometria de massas, são as técnicas mais indicadas [19,24,30]. A cromatografia acoplada à espectrometria de massas, como sistema de detecção, tem sido uma das ferramentas mais poderosas de identificação de antocianinas [22]; entretanto, em razão da falta de padrões de referência e/ou do elevado custo dos padrões disponíveis, torna-se inviável criar uma biblioteca de dados de espectro de massas para identificação desses compostos.

A análise de antocianinas por eletroforese capilar (CE) é possível em razão dessas espécies serem catiônicas em pH baixo, apresentando mobilidade quando submetidas a um campo elétrico [23]. Esta técnica vem sendo bastante explorada por ser considerada uma técnica ambiental, já que utiliza pequena quantidade de solventes, padrões e amostras [69], mas ainda é uma técnica pouco desenvolvida neste tipo de análise. Em um estudo comparativo entre HPLC e CE na análise de antocianinas em morango, realizado por Comandini *et al.* (2008), os autores verificaram boa performance de ambas as técnicas, tempos de eluição das antocianinas muito semelhantes; entretanto, afirmaram que a cromatografia demonstrou menores limites de detecção e quantificação [18], o que se torna viável quando se trata de análise de extratos vegetais, onde na maioria das vezes, os compostos são encontrados em quantidades ínfimas.

CLAE-FR (cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa) tem sido o método mais utilizado nos últimos anos para análise de antocianinas [30,45,70,71] e, acoplada com a detecção por arranjo de diodos (DAD), é possível obter espectros *online* dos compostos que estão sendo separados [23,30,39,45]. CLAE-DAD mostra-se ser uma boa técnica para identificação e quantificação de antocianinas individuais [64,72]. A fase reversa é utilizada em razão da estrutura química desses compostos, onde a retenção irá diminuir (ou

seja, reduz-se o tempo de análise) com o aumento da polaridade (com o aumento de hidroxilas ligadas ao núcleo flavílio). A presença de açúcares também diminui a retenção das antocianinas [30]. Essa metodologia oferece excelentes separações associadas com a alta sensibilidade, tornando-se a técnica preferida para a análise de pigmentos em matrizes complexas [4,23,45,65].

1.3. Cromatografia líquida de alta eficiência

1.3.1. Princípio

A cromatografia é um método físico-químico de separação de componentes de uma mistura complexa através do fracionamento desses componentes em duas fases que estão em contato íntimo. Uma delas permanece estacionária (FE), que pode ser um sólido, líquido ou gel; a outra move-se através da FE, chamada de fase móvel (FM), que percola através de uma coluna em uma direção definida. Durante a passagem da FM (geralmente um solvente orgânico, um gás inerte ou ainda um fluido supercrítico), os componentes da mistura são distribuídos pelas duas fases, de tal forma que cada um deles é seletivamente retido pela fase estacionária, de acordo com sua afinidade por ela e pela FM, o que resulta em migrações diferenciais dos diferentes componentes [73-76]. O registro obtido através da separação se dá através de um gráfico ou outro tipo de representação da resposta do detector, que demonstra a concentração de analito (eluído pela coluna cromatográfica) *versus* o volume ou o tempo de eluição da substância detectada [75].

Dos numerosos métodos de separação existentes, a cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE (do inglês – HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*) se destaca devido ao seu elevado poder de separação, uma

vez que separa misturas que contêm um grande número de compostos, além de identificá-los e quantificá-los. É uma técnica de procura generalizada, dada sua versatilidade e possibilidade de aplicação a separações de compostos não-voláteis ou instáveis em altas temperaturas [77].

A CLAE utiliza instrumentos que podem ser totalmente automatizados. É um tipo de cromatografia líquida que emprega colunas recheadas com materiais especialmente preparados e uma fase móvel, eluída sob altas pressões. Ela tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande variedade de compostos presentes em diversos tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos com boa sensibilidade, resolução e detectabilidade [78]. A eficiência de um sistema cromatográfico é traduzida por picos agudos no cromatograma, que lhes assegura excelentes resoluções (capacidade de separar componentes) [77].

1.3.2. Histórico

Os termos "cromatografia" (do grego, *chrom* – cor e *graphe* - escrever), "cromatograma" e "método cromatográfico" são atribuídos ao botânico russo Mikhael Semenovitch Tswett, que em 1906 os utilizou em dois trabalhos que descrevem suas experiências na separação de componentes de extratos vegetais [74]. Paralelamente ao trabalho desenvolvido por Tswett, Reed (na Inglaterra) e Day (nos Estados Unidos) desenvolveram a mesma técnica utilizando colunas recheadas e solventes orgânicos para separar sais orgânicos e componentes de petróleo, respectivamente [74,77].

Em 1952, um trabalho envolvendo cromatografia por partição, desenvolvido por Martin e Synge em 1941, ganhou o Prêmio Nobel [74]. Em 1956, van Deemter, Zwiderweg e Klinkenberg definiram os parâmetros operacionais da coluna cromatográfica (equação de van Deemter) [77]. Na

década de 1960, surgiu a cromatografia líquida de alta eficiência e, a partir daí, os trabalhos de aperfeiçoamento das colunas cromatográficas aumentaram consideravelmente [74].

A partir de 1968, a CLAE começou a ganhar espaço nas análises de separação. O avanço foi gradual e atingiu o nível atual de sofisticação que a CLAE apresenta, devido, principalmente, ao desenvolvimento tecnológico de sua aplicação. O desenvolvimento de detectores (espectrofotométricos, eletroquímicos e de massas) tem proporcionando melhor detectabilidade à técnica. Desenvolvimentos recentes em instrumentação controlada por microcomputadores também contribuem para melhorias no desempenho dos equipamentos [78].

1.3.3. Instrumentação

Um equipamento de cromatografia líquida consiste basicamente de um sistema de alta pressão, colunas pequenas empacotadas com partículas de diâmetro pequeno e um sistema de detecção *online* sensível [76,79]. Um esquema de instrumentação está demonstrado na Figura 1.5. Na Figura 1.6, encontra-se uma foto do cromatógrafo utilizado para desenvolvimento deste projeto de mestrado.

Figura 1.5. Esquema de instrumentação para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

Para este sistema ser considerado ideal, a FM deve ser bombeada sob pressão para dentro da coluna, com velocidade constante, para atingir boa eficiência durante toda a corrida cromatográfica. As colunas não devem ser grandes, para evitar diferenças elevadas nas pressões da FM durante sua entrada e saída da mesma. O empacotamento das colunas requer micropartículas rigorosamente uniformes. Uma coluna tipicamente utilizada possui dimensões de 250 x 4,6 mm. A amostra injetada na coluna deve apresentar volume pequeno (cerca de 10 – 100 μ L), que também permite boas resoluções [76,77]. O detector empregado é um dos maiores responsáveis pela alta eficiência da CLAE, e suas características para que seja considerado um detector ideal incluem: alta sensibilidade, resposta “universal” a todos os solutos, resposta linear para diversas ordens de concentrações, baixo valor de volume morto, natureza não destrutiva, insensibilidade à temperatura ou às mudanças de fluxo, operação contínua e conveniência de uso.

Figura 1.6. Cromatógrafo a líquido utilizado no estudo da separação de antocianinas.

Na Tabela 1.1, encontra-se uma compilação dos detectores mais utilizados em CLAE e suas respectivas características analíticas instrumentais [78].

Tabela 1.1. Detectores mais comuns utilizados em CLAE [80].

Detector	Sensibilidade	Faixa de Linearidade	Quantidade mínima detectável (g)
<i>Índice de Refração</i>	$3 \cdot 10^{-9} \text{ g s}^{-1}$	10^4	10^{-6}
<i>UV (fixo)</i>	$10^{-11} \text{ g s}^{-1}$	10^5	10^{-9}
<i>UV (espectral)</i>	$2 \cdot 10^{-11} \text{ g s}^{-1}$	10^5	10^{-9}
<i>Fluorescência</i>	$10^{-14} \text{ g s}^{-1}$	10^4	10^{-12}
<i>Radioatividade</i>	20 – 50 cpm	10^6	-
<i>Eletroquímico</i>	10^{-9} g s^{-1}	10^6	10^{-9}
<i>Infravermelho</i>	10^{-7} g s^{-1}	10^4	-
<i>Condutímetro</i>	10^{-9} g s^{-1}	10^6	10^{-8}

1.3.4. Vantagens e Limitações da CLAE [73,76,78,80]

Vantagens:

- Algumas separações são conseguidas em poucos minutos, devido ao elevado número de pratos da coluna (na faixa de 10^6 e à alta vazão da fase móvel através da coluna).
- É possível analisar misturas complexas, detectando-se centenas de compostos diferentes, desde que não haja preocupação com tempo de análise.

- Pode ser utilizada para fins qualitativos, mas também quantitativos através da comparação de tempos de retenção, onde a confirmação pode ser feita através do uso de detectores por arranjo de diodos ou espectrômetro de massas.
- Podem-se realizar análises em escala semipreparativa.
- Análises quantitativas são de fácil execução e grande precisão (erros relativos inferiores a 1 %).
- É possível detecção a níveis de 10^{-9} g e 10^{-12} g.
- Pode ser aplicada tanto na análise de compostos orgânicos como inorgânicos; as amostras podem ser líquidas ou sólidas, com tratamento prévio.
- O sistema pode ser totalmente mecanizado, injeção de inúmeras amostras sequencialmente, impressão dos resultados – tempo de retenção e integração das áreas.

Limitações:

- A aquisição da instrumentação requer alto investimento, além do elevado custo rotineiro: a fase móvel, que deve ser um solvente orgânico de alto grau de pureza e a fase estacionária e os diferentes tipos de recheios das colunas e manutenção contínua do sistema, com reposição periódica de componentes danificados.
- Há falta de um detector universal e sensível ao mesmo tempo, pois detectores por índice de refração e espectrômetro de massas possuem alto limite de detecção e elevado custo, respectivamente. Já os detectores de absorção ou emissão operam apenas em compostos com propriedades adequadas.
- Faz-se necessário um operador experiente para se obter o máximo de aproveitamento da técnica.

1.4. Aplicações da CLAE na Análise de Antocianinas

Não existe método global de análise de antocianinas; cada laboratório desenvolve um método específico de separação [30]. Hoje, na literatura, encontram-se inúmeros trabalhos utilizando a cromatografia líquida (CLAE) para caracterização dos alimentos quanto às antocianinas presentes e, ainda, para estudo de estabilidade [24,31,71].

Em 1992, Lee *et al.* revisaram métodos cromatográficos para análise de antocianinas. A cromatografia líquida de alta eficiência é a principal técnica de separação em análises de alimentos, especialmente de antocianinas. Por isso, tem sido o método escolhido para determinação destes compostos e continua sendo a técnica mais comumente usada para essa medida [23].

Hong e Wrolstad (1990) utilizaram CLAE-DAD para caracterização de antocianinas e antocianidinas (após hidrólise ácida) em oxicoco, “roselle” e morango. A separação dos pigmentos foi adequada com coluna à base de sílica quimicamente modificada (fase reversa), o DAD proporcionou informações quanto à base da antocianina e ao padrão de substituição de glicosilação; estas informações, aliadas aos tempos e perfis de eluição dos picos, possibilitaram a fácil caracterização de pigmentos presentes nas amostras estudadas [65].

Chandra *et al.* (2001) aplicaram métodos de LC-MS e LC-DAD para a identificação de antocianinas em cereja e “elderberry”. O método foi validado segundo os parâmetros de linearidade, especificidade, precisão e exatidão. O perfil dos espectros, obtidos pelo DAD, demonstrou excelente resultado para a identificação dos pigmentos presentes nessas frutas [81].

Mazza *et al.* (2002) estudaram as antocianinas presentes em sangue humano após o consumo de mirtilo. A cromatografia foi a técnica analítica utilizada para o estudo, onde foram detectadas diversas antocianinas intactas presentes no sangue, mesmo após 3 horas de ingestão do alimento [82].

Zhang *et al.* (2004) desenvolveram dois métodos de separação: um para antocianinas e outro para antocianidinas, para aplicação em extratos de "bilberry". A análise por CLAE proveu informações sobre o perfil das antocianinas e por isso é muito utilizada para análises de controle de qualidade. O uso de hidrólise ácida, para obtenção das agliconas (antocianidinas), facilitou a identificação e quantificação dos compostos. Os dois métodos desenvolvidos apresentaram boas precisão e exatidão, sendo possível ser facilmente aplicado em extratos botânicos [22].

Lee *et al.* (2008) utilizaram CLAE-FR na separação de antocianinas em suco de frutas e compararam o uso desta técnica de separação com o uso de métodos espectrofotométricos. Dos resultados demonstrados pelos autores, afirmam que o conteúdo de antocianinas medido pelas duas técnicas estão fortemente correlacionados, mas que a cromatografia líquida é, sem dúvidas, uma ferramenta inestimável para identificação e quantificação de antocianinas [64].

Koca e Karadeniz (2009) utilizaram a CLAE com detector UV-Vis para identificar as antocianinas presentes em amora preta e mirtilo e correlacioná-las (em %) com a atividade anti-oxidante medida espectrofotometricamente. Os resultados foram muito positivos: 12 antocianinas foram encontradas na amora preta e 15 no mirtilo. A atividade anti-oxidante desses alimentos mostrou-se considerável, mas os autores observaram que ela está mais correlacionada ao conteúdo total de fenólicos medidos do que com o total de antocianinas [83].

Villiers *et al.* (2009) estudaram a variação do tamanho da partícula da coluna de C18 e sua temperatura na separação de antocianinas em vinho tinto. Os resultados obtidos demonstraram um ganho em tempo na análise das antocianinas e aumento de eficiência, atingido pela diminuição do tamanho da partícula da coluna. O uso de altas temperaturas de análise também melhorou a velocidade cromatográfica ótima, e ainda levou a menor altura mínima de pratos [24].

Baseado em fatores como alta resolução (alto poder de separação), rapidez relativa, baixo limite de detecção e confiabilidade de análise, a cromatografia líquida de alta eficiência vem sendo o método mais aplicado para isolamento, identificação e quantificação de antocianinas em matrizes complexas, como alimentos e extratos botânicos [15,19,23,34]. A fase reversa é o modo de cromatografia adequado para separação desses compostos. Metanol (MeOH) e acetonitrila (ACN) são os solventes que, geralmente, compõem a FM. Ácidos inorgânicos (clorídrico, fosfórico e perclórico) e orgânicos (acético, fórmico) são adicionados em baixas concentrações à FM, para garantir a estabilidade da estrutura flavílio das antocianinas [23,32].

O desenvolvimento de um método simples de identificação e quantificação de antocianinas, e a análise das figuras de mérito, para garantir a confiabilidade do método, devem ser investigados para contribuição no aprimoramento do conhecimento químico desses pigmentos.

1.5. Referências bibliográficas

- [1] Oliveira, A.C. de; Valentim, I.B.; Goulart, M.O.F.; Silva, C.A.; Bechara, E.J.H.; Trevisan, M.T.S. **Quím. Nova**, 32 (2009) 689-702.
- [2] Volp, A.C.P.; Renhe, I.R.T.; Barra, K.; Stringueta, P.C. **Rev. Bras. Nutr. Clin.**, 23 (2008) 141-149.
- [3] Martínez-Flórez, S.; González-Gallego, J.; Culebras, J.M.; Tuñón, M.J. **Nutr. Hosp.**, 17 (2002) 271-278.
- [4] Cacace, J.E.; Mazza, G. **J. Agric. Food Chem.**, 50 (2002) 5939-5946.
- [5] Kuskoski, E.M.; Asuero, A.G.; García-Parilla, M.C.; Troncoso, A.M.; Fett, R. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 24 (2004) 691-693.
- [6] Merken, H.M.; Beecher, G.R. **J. Agric. Food Chem.**, 48 (2000) 577-599.
- [7] Heim, K.E.; Tagliaferro, A.R.; Bobilya, D.J. **J. Nutr. Biochem.**, 13 (2002) 572-584.
- [8] Março, P.H.; Scarminio, I.S. **Anal. Chim. Acta**, 583 (2007) 138-146.
- [9] Melo, E. de A.; Guerra, N.B. **Bol. SBCTA**, 36 (2002) 1-11.
- [10] Revilla, E.; Ryan, J.-M., Martín-Ortega, G. **J. Agric. Food Chem.**, 46 (1998) 4592-4597.
- [11] Patras, A.; Brunton, N.P.; O'Donnell, C.; Tiwari, B.K. **Trends in Food Science & Technol.**, 21 (2010) 3-11.
- [12] Davies, K. Plant pigments and their manipulation. **Annual Plant Reviews**, v.14, p. 92-115, 2004.
- [13] Byamukama, R.; Namukobe, j.; Kiremire, B. **African J. Pure Applied Chem.**, 3 (2009) 20-25.
- [14] Barnes, J.S.; Nguyen, H.P.; Shen, S.; Schug, K.A. **J. Chromatogr. A**, 1216 (2009) 4728-4735.
- [15] Phippen, W. B.; Simon, J.E. **J. Agric. Food Chem.**, 46 (1998) 1734-1738.
- [16] Yang, Z.; Fan, G.; Gu, Z.; Han, Y.; Chen, Z. **Eur. Food. Res. Technol.**, 227 (2008) 409-415.

- [17] Teixeira, L.N.; Stringheta, P.C.; Oliveira, F.A. de. **Ceres**, 55 (2008) 297-304.
- [18] Comandini, P.; Blanda, G.; Cardinali, A.; Cerretani, L.; Bendini, A.; Caboni, M.F. **J. Sep. Sci.**, 31 (2008) 3257-3264.
- [19] Março, P.H.; Poppi, R.J.; Scarmínio, I.S. **Quím. Nova**, 31 (2008) 1218-1223.
- [20] Cavacanti, R.N.; Santos, D.T.; Meireles, M.A.A. **Food Research Intern.** (2010) 10.1016/j.foodres.2010.12.007.
- [21] Castañeda-Ovano, A.; Pacheco-Hernández, Ma. de L.; Páez-Hernández, Ma. E.; Rodríguez, J.A.; Galán-Vidal, C.A. **Food Chem.**, 113 (2009) 589-871.
- [22] Zhang, Z.; Kou, X.; Fugal, K.; McLaughlin, J. **J. Agric. Food Chem.**, 52 (2004) 688-691.
- [23] Lee, H.S.; Hong, V. **J. Chromatog.**, 624 (1992) 221-234.
- [24] Villiers, A. de; Cabooter, D.; Lynen, F.; Desmet, G.; Sandra, P. **J. Chromatog. A**, 1216 (2009) 3270-3279.
- [25] Timberlake, C.F. **Food Chem.**, 5 (1980) 69-80.
- [26] Azevedo, J.; Fernandes, I.; Faria, A.; Oliveira, J.; Fernandes, A.; Freitas, V. de; Mateus, N. **Food Chem.**, 119, (2010), 518-523.
- [27] Mazza, G.; Brouillard, R. **Phytochem.**, 29 (1990) 1097-1102.
- [28] Kong, J.-M.; Chia, L.-S.; Goh, N.-K.; Chia, T.F.; Brouillard, R. **Phytochem.**, 64 (2003) 923-933.
- [29] Oren-Shamir, M. **Plant Sci.**, 177 (2009) 310-316.
- [30] Costa, C.T. da; Horton, D.; Margolis, S.A. **J. Chromatog. A**, 881 (2000) 403-410.
- [31] Wu, X.; Prior, R.L. **J. Agric. Food Chem.**, 53 (2005) 3101-3113.
- [32] Wulf, L.W.; Nagel, C.W. **Am. J. Enol. Vitic.**, 29 (1978) 42-49.
- [33] Borkowski, T.; Szymusiak, H.; Gliszcznska-Swiglo, A.; Rietjens, I.M.C.M.; Tyrakowska, B. **J. Agric. Food Chem.**, 53 (2005) 5526-5534.
- [34] Morais, H.; Ramos, C.; Forgács, E.; Cserhádi, T.; Oliveira, J. **J. Chromatog. B**, 770 (2002) 297-301.

- [35] Vanini, L.S.; Hirata, T.A.; Kwiatkowski, A.; Clemente, E. **Braz. J. Food Technol.**, 12 (2009) 213-219.
- [36] Bordignon Jr., C.L.; Francescato, V.; Nienow, A.A.; Calvete, E.; Reginatto, F.H. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 29 (2009) 183-188.
- [37] Silva, F.L. da; Escribano-Bailón, M.T.; Alonso, J.J.P.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Santos-Buelga, C. **LWT**, 40 (2007) 374-382.
- [38] Jin, P.; Wang, S.Y.; Wang, C.Y.; Zheng, Y. **Food Chem.**, 124 (2011) 262-270.
- [39] Tian, Q.; Giusti, M.M.; Stoner, G.D.; Schwartz, S.T. **J. Chromatog. A**, 1091 (2005) 72-82.
- [40] Ling, Y.; Mallery, S.R.; Ugalde, C.M.; Pei, P. Saradhi, U.V.R.V.; Stoner, G.D.; Chan, K.K.; Liu, Z. **J. Chromatogr. B**, 877 (2009) 4027-4034.
- [41] Tian, Q.; Giusti, M.M.; Stoner, G.D.; Schwartz, S.J. **Food Chem.**, 94 (2006) 465-468.
- [42] Lima, V.L.A.G. de; Pinheiro, I.O.; Nascimento, M.S. do; Gomes, P.B.; Guerra, N.B. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 26 (2006) 927-935.
- [43] Rosso, V.V. de; Hillebrand, S.; Montilla, E.C.; Bobbio, F.O.; Winterhalter, P.; Mercadante, A.Z. **J. Food Compos. and Anal.**, 21 (2008) 291-299.
- [44] Albarici, T.R.; Pessoa, J.D.C.; Forim, M.R. (2006) **Comunicado Técnico**.
- [45] Froytlog, C.; Slimestad, R.; Andersen, O.M. **J. Chromatog. A**, 825 (1998) 89-95.
- [46] Pacheco-Palencia, L.A.; Talcott, S.T. **Food Chem.**, 118 (2010) 17-25.
- [47] Longo, L.; Vasapollo, G. **Food Chem.**, 94 (2006) 226-231.
- [48] Nayak, C.A.; Srinivas, P.; Rastogi, N.K. **Food Chem.**, 118 (2010) 719-724.
- [49] Kirca, A.; Ozkan, M.; Cemeroglu, B. **Food Chem.**, 101 (2007) 212-218.
- [50] Brouillard, R. Anthocyanins as food colors. In. Cap. 1. Chemical structures of anthocyanins. Academic Press, New York, 1982.
- [51] Wang, B.C.; He, R.; Li, Z.M. **Food Technol. Biotechnol.**, 48 (2010) 42-49.
- [52] Markakis, P. Anthocyanins as food colors. In. Cap. 6. Stability anthocyanins in foods. Academic Press: New York, 1982.

- [53] Lima, J.C.; Vautier-Giongo, C.; Lopes, A.; Melo, E.; Quina, F.H; Maçanita, A.L. **J. Phys. Chem. A**, 106 (2002) 5851-5859.
- [54] Iacobucci, G.A.; Sweeny, J.G. **Tetrahedron**, 54 (1983) 3005-3038.
- [55] Kirca, A.; Cemeroglu, B. **Food Chem.**, 81 (2003) 583-587.
- [56] Stringheta, P.C.; Bobbio, P.A. **Biotechnol. Ciênc. & Desenvolvimento**, 14 (2000) 34-37.
- [57] Francis, F.J. Anthocyanins as food colors. In. Cap. 7. Analysis of anthocyanins. Academic Press: New York, 1982.
- [58] Flacão, L.D.; Barros, D.M.; Gauche, C.; Luiz, M.T.B. *Bol. CEPPA*, 21 (2003) 351-366.
- [59] Mondello, L.; Cotroneo, A.; Errante, G.; Dugo, G.; Dugo, P. **J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 23 (2000) 191-195.
- [60] Yang, Z.; Zhai, W. **Innovative Food Science and Emerging Technol.**, 1 (2010) 169-176.
- [61] Kahkonen, M.P.; Heinonen, M. **J. Agric. Food Chem.**, 51 (2003) 628-633.
- [62] Mazza, G. **Ann. Ist. Super. Sanità**, 43 (2007) 369-374.
- [63] Melo, E. de A.; Maciel, M.I.S.; Lima, V.L.A.G.; Leal, F.L.L.; Caetano, A.C. da S.; Nascimento, R.J. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 26 (2006) 639-644.
- [64] Lee, J.; Rennaker, C.; Wrolstad, R.E. **Food Chem.**, 110 (2008) 782-786.
- [65] Hong, V.; Wrolstad, R.E. **J. Agric. Food Chem.**, 38 (1990) 708-715.
- [66] Harbone, J.B. Spectral methods of characterizing anthocyanins. **J. Biochem.**, 70 (1958) 22-28.
- [67] Mulinacci, N.; Romani, A.; Pinelli, P.; Gallori, S.; Giaccherini, C.; Vincieri, F.F. **International J. Pharmaceutics**, 216 (2001) 23-31.
- [68] Lopez-Martinez, L.X.; Oliart-Ros, R.M.; Valerio-Alfaro, G.; Lee, C.-H.; Parkin, K.L.; Garcia, H.S. **LWT – Food Sci. Technol.**, 42 (2009) 1187-1192.
- [69] Petersson, E.V.; Puerta, A.; Bergquist, J.; Turner, C. **Electrophoresis**, 29 (2008) 2723-2730.

- [70] Castele, K.V.; Geiger, H.; Loose, R.; Van Sumere, C.F. **J. Chromatog.**, 259 (1983) 291-300.
- [71] Goiffon, J.-P.; Mouly, P.P.; Gaydou, E.M. **Anal. Chim. Acta.**, 382 (1999) 39-50.
- [72] Osawa, H. Anthocyanins as food colors. In. Cap. 3. Biosynthesis of anthocyanins. Academic Press, New York, 1982.
- [73] Collins, C.H.; Manfredi, J.E.; Valente, A.L.P.; Murta, A.L.M.; MacNair, H.M. **Quím. Nova**, 6 (1983) 46-49.
- [74] Collins, C.H. Fundamentos de Cromatografia. In. Cap 1. Princípios básicos de cromatografia. Editora da UNICAMP: Campinas, 2006.
- [75] Ettre, L.S. **Pure & Appl. Chem.**, 65 (1993) 819-872.
- [76] Snyder, L.R.; Kirkland, J.J.; Glajch, J.L. Practical HPLC method development. 2^aed. John Wiley & Sons: New York, 1997.
- [77] Valente, A.L.P.; Collins, C.H.; Manfredi, J.E. **Quím. Nova**, 6 (1983) 103-109.
- [78] Jardim, I.C.S.F.; Collins, C.H.; Guimarães, L.F.L. Fundamentos de Cromatografia. In. Cap 9. Cromatografia líquida de alta eficiência. Editora da UNICAMP: Campinas, 2006.
- [79] Cope, M.J.; Davidson, I.E. **J. Phys. E.: Sci. Instrum.**, 19 (1986) 763-775.
- [80] Murta, A.L.M.; Collins, C.H.; Collins, K.E.; McNair, H.M. **Quím. Nova**, 4 (1981) 92-94.
- [81] Chandra, A.; Rana, J.; Li, Y. **J. Agric. Food Chem.**, 49 (2001) 3515-3521.
- [82] Mazza, G.; Kay, C.D.; Cottrell, T.; Holub, B. **J. Agric. Food Chem.**, 50 (2002) 7731-7737.
- [83] Koca, I.; Karadeniz, B. **Scientia Horticulturae**, 121 (2009) 447-450.

Capítulo 2

OBJETIVOS

2. Objetivo Geral

O objetivo geral deste projeto de mestrado foi o estudo da atividade anti-oxidante de antocianinas através do desenvolvimento de um método de separação de oito antocianinas/antocianidinas, comumente presentes em alimentos, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos e um sistema de detecção *online* de derivatização pós-coluna dos pigmentos eluídos, através da reação com o radical ABTS^{•+}.

2.1. Objetivos Específicos

- 1) Desenvolver uma metodologia de extração das antocianinas em morango (*Fragaria vesca*).
- 2) Estudar parâmetros de estabilidade no extrato otimizado.
- 3) Estudar a cinética de reação da hidrólise das antocianinas.
- 4) Realizar cálculos teóricos, envolvendo otimização de geometria e análise conformacional, para o estudo de uma possível correlação da propriedade anti-oxidante com a retenção cromatográfica.

Capítulo 3

OTIMIZAÇÃO DA SEPARAÇÃO

3. Otimização da Separação

3.1. Introdução

3.1.1. Separação de Antocianinas por CLAE

Na seção 1.2.3 (Capítulo 1), foram discutidas inúmeras técnicas de análise de antocianinas e suas importâncias, sendo a cromatografia líquida de alta eficiência a de maior importância no entendimento da química das antocianinas. Na seção 1.4, foram demonstrados alguns trabalhos da literatura que utilizam esta técnica para estudo dos pigmentos.

A CLAE é caracterizada por ser uma técnica rápida e eficiente na separação de misturas de antocianinas, possuindo a vantagem de ser não destrutiva e permitindo, assim, que os compostos separados sejam utilizados para análises posteriores como, por exemplo, em espectroscopia de massas. Esta técnica pode separar e quantificar até microgramas de antocianinas sem a necessidade de um tratamento exaustivo prévio [1].

3.1.2. Mecanismo e Otimização da Separação em CLAE

A CLAE utiliza-se do mecanismo de partição na separação de antocianinas, em que a separação é baseada nas diferenças de afinidade dos analitos entre as fases móvel (FM) e estacionária (FE) [2]. No instante t_0 (ou t_M - tempo morto), a FM não retirou nenhum analito da FE. A partir daí que podem ser observadas as interações e as moléculas passam a ser retiradas da FE pela FM, solubilizando-se nesta, sendo então arrastadas através da coluna cromatográfica [3].

Assim, os analitos passam a se mover com a velocidade da FM, até encontrarem outra partícula da FE que os façam ficar retidos novamente. Por

fim, as velocidades médias dos analitos de uma mistura dentro da coluna serão diferentes (e menor que a velocidade média da FM) e a separação ocorre (Figura 3.1) [3].

Figura 3.1. Mecanismo de separação por partição em cromatografia líquida.

Quando a separação cromatográfica é bem sucedida, diz-se que o sistema possui boa resolução entre pares de analitos. A resolução é o resultado de um compromisso entre a *eficiência*, *retenção* e a *seletividade* [3]. A eficiência relaciona-se com o número de pratos, e pode ser caracterizada pela largura dos picos obtidos. A seletividade depende das composições das FM e FE, caracterizando-se pela separação dos picos [4].

A definição matemática de resolução (Equação 3.1 e 3.2) é muito simples e pode ser obtida a partir dos registros cromatográficos. Em termos práticos, resolução é a relação da distância entre os centros de duas bandas adjacentes e a média das larguras das bases das duas bandas, ou ainda a média das larguras das bases à meia altura das duas bandas (Equação 3.1) [4,5]:

$$R_s = 2 \frac{t_{R2} - t_{R1}}{(w_1 + w_2)} \quad \text{ou} \quad R_s = 1,177 \frac{t_{R2} - t_{R1}}{(w_{h1} + w_{h2})} \quad \text{Equação 3.1.}$$

Em que, t_{R1} e t_{R2} são os tempos de retenção das duas espécies (tempo que decorre do momento da injeção até o aparecimento dos máximos do picos), w_1 e w_2 são as larguras das bases dos picos e w_{h1} e w_{h2} são as larguras das bases à meia altura dos picos [4].

Outra fórmula matemática que calcula a resolução (Equação 3.2) é mais abrangente, relacionando a eficiência e a seletividade da separação:

$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} \left(\frac{k_2}{1 + k_2} \right) \left(\frac{\alpha + 1}{\alpha} \right) \quad \text{Equação 3.2.}$$

A B C

A Equação 3.2 relaciona a resolução com as condições de separação e é a partir dela que se iniciam os estudos preliminares sobre quais parâmetros devem ser ajustados para se obter melhor resultado durante o processo de otimização da separação cromatográfica [4].

O termo A é relativo ao número de pratos, que pode ser calculado pela Equação 3.3, relaciona o equilíbrio entre as fases móvel e estacionária e, obviamente, tem concordância com o comprimento da coluna. No termo B, encontra-se o fator de retenção (k), que é a razão entre o número de mols do soluto na FE e seu número de mols na FM. Na prática é medido pela razão entre o tempo que uma substância fica retida na coluna e o tempo que ela permanece dissolvida na FM (Equação 3.4) [4,5,6].

$$N = 5,545 \frac{t_R^2}{w_h^2} \quad \text{Equação 3.3.}$$

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

Equação 3.4.

No termo C da Equação 3.2, observa-se o fator de seletividade ou retenção relativa (α), que é uma medida da seletividade do sistema cromatográfico, isto é, da propriedade da FE reter as espécies diferenciadas. O fator de seletividade pode ser calculado pela Equação 3.5.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R2}}{t_{R1}}$$

Equação 3.5.

A otimização da separação deve proceder aumentando-se ou diminuindo-se a força do solvente (variando-se k), modificando valores de vazão da FM ou trocando-se a coluna cromatográfica (alterando-se N) e modificando a composição da FM (tipo de solvente ou pH) ou ainda, alterando-se a temperatura de trabalho (variando-se α) [4].

A força do solvente depende da escolha do modificador orgânico e sua concentração na FM (% B). Os solventes geralmente utilizados são metanol, acetonitrila ou tetrahidrofurano (para cromatografia em fase reversa) e hexano ou éter isopropílico (para cromatografia em fase normal) [7]. Substâncias com características mais apolares são usualmente separadas por cromatografia em fase reversa, enquanto que substâncias mais polares são separadas por fase normal [8].

Gradiente ou eluição isocrática estão intimamente relacionados às mudanças na separação por força de solvente, já que na eluição isocrática a composição da FM se mantém constante durante toda a corrida cromatográfica, enquanto que no gradiente a concentração orgânica da FM é alterada ao longo da corrida [2,7,9]. Entretanto, devido à complexidade das separações requeridas, eluição por gradiente é mais utilizada em CLAE, já que resulta em uma

separação mais adequada quando se tem um número grande de analitos, devido o aumento da força da FM (com relação à polaridade). Também se espera maior eficiência na separação, em razão de haver um efeito de compressão dos picos cromatográficos [9,10].

Antocianinas são separadas por fase reversa, geralmente em colunas à base de sílica quimicamente modificada (ODS-C18 – fase ligada), pois parte da sua estrutura molecular apresenta caráter apolar, permitindo separações por diferentes interações entre FE e FM [11-13], a eluição cromatográfica é baseada na polaridade da estrutura molecular, que é caracterizada por três seções das antocianinas: 1) a antocianidina (parte aglicona); 2) o número e tipo de açúcar ligado e 3) a presença ou não de grupos acil no açúcar [14].

Três características da coluna influenciam na retenção dos compostos: área superficial da coluna, tipo e concentração da fase ligada. A retenção, e consequentemente a seletividade, varia com a natureza da fase ligada e geralmente aumenta com o comprimento da cadeia ou hidrofobicidade do grupo da fase ligada [7]. Atualmente, inúmeros pesquisadores têm se dedicado ao estudo do uso de imobilização térmica de polímeros sobre o suporte cromatográfico. Como é o caso do trabalho de Collins *et al.* (2005), que desenvolveram fases estacionárias baseadas em polisiloxanos com cadeias laterais variadas, imobilizadas por tratamento térmico e, após a avaliação da separação de seis compostos orgânicos, verificaram o excelente desempenho cromatográfico das separações com o uso desses polímeros de cadeia mais longa [15].

A temperatura é outro fator que auxilia no controle da retenção, sendo que elevadas temperaturas aplicadas às colunas cromatográficas resultam em baixos tempos de análise [7]; entretanto, o uso de temperaturas excessivas pode levar a degradação das antocianinas. Acima de 50 °C, encontram-se altas constantes de degradação de antocianinas, de acordo com estudos cinéticos de Villiers *et al.* (2009). Devem-se evitar ainda baixas vazões, pois o tempo de

permanência das antocianinas na coluna cromatográfica aumenta e por mais tempo são submetidas à temperatura da coluna facilitando, e muitas vezes aumentando, a taxa de degradação [16].

Muitos são os métodos de caracterização de antocianinas; entretanto, para um estudo mais específico dos compostos individuais, a determinação cromatográfica é uma técnica, sem dúvida, muito precisa, exata e informativa [17].

A CLAE provê a separação de uma mistura de antocianinas porque possibilita a manipulação de variáveis, como tipo de modificador orgânico, pois quando se altera o tipo de solvente, e conseqüentemente, a força deste, pode ser obtido melhores resoluções entre os picos, mas a ordem de eluição das substâncias em estudo é alterada, devido às diferentes interações que esses solventes terão com os analitos [7]; a temperatura, vazão e tipo de coluna cromatográfica também podem ser variadas, para melhoramento da separação e diminuição do tempo de análise, sem gasto excessivo de tempo ou materiais para a otimização de uma separação.

3.2. Objetivos

O objetivo deste capítulo foi estudar e otimizar a separação de oito antocianinas/antocianidinas, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa e determinar os parâmetros cromatográficos obtidos na separação.

3.3. Parte Experimental

3.3.1. Materiais e Equipamentos

3.3.1.1. Amostras e Reagentes

Foram avaliados dez alimentos obtidos em mercado local, no período de outubro de 2009 a março 2010: ameixa (*Prunus domestica*), amora (*Morus nigra*), acerola (*Malpighia glabra* L.), beterraba (*Beta vulgaris*), cenoura (*Daucus carota* L.), framboesa (*Rubus idaeus*), "blueberry" - mirtilo (*Vaccinium myrtillum*), morango (*Fragaria vesca*), pimentão roxo (*Capsicum annuum* L.) e uva Brasil (*Vitis vinífera*).

Essas frutas e vegetais foram classificadas como maduras, através de uma análise visual e da consistência das mesmas. Foram armazenadas em freezer, com a finalidade de diminuir as alterações oxidativas, até a utilização para extração.

Os padrões de antocianinas utilizados foram: cloreto de cianidina, cloreto de malvidina, cloreto de pelargonidina, cloreto de delphinidina, cloreto de cianidina-3-O-glicosídeo, cloreto de cianidina-3,5-O-diglicosídeo, cloreto de malvidina-3-O-glicosídeo e cloreto de pelargonidina-3-O-glicosídeo, todos obtidos da Sigma Aldrich (P.A., São Paulo, Brasil) de alto grau de pureza, mantidos em freezer para evitar degradação. A fase móvel foi composta por metanol (grau HPLC, J. T. Backer, Xalostoc, México), água ultrapura (MilliQ® - marca Millipore, modelo Direct-quantum TMEX - Bedford, MA, USA) e ácido clorídrico (P.A., Synth, São Paulo, Brasil).

3.3.1.2. Equipamentos

Foi utilizado um cromatógrafo a líquido Shimadzu (Kyoto, Japão), operando com um sistema de bombeamento de solvente (bomba quaternária LC-10Avp) e válvula injetora manual Rheodyne, com alça de amostragem de 20 μL e forno Waters (Milford, MA, USA) mantido a 30 °C. O sistema está acoplado a um detector com arranjo de diodos Shimadzu (SPD-M10Avp), que operou na faixa de 300 a 600 nm, sistema controlador Shimadzu (SCL-10Avp) e software para aquisição e tratamento de dados, CLASS-VP.

Também foram utilizados no processo de extração: Ultra Turrax[®] (Labortechnik – modelo T25 - Suíça), balança analítica (Mettler Toledo – modelo AB204 – São Paulo - Brasil) ultrassom (Cole-Parmer – modelo 8890 – Illinois – USA) e centrífuga (Quimis[®] - Diadema - SP - Brasil).

3.3.2. Procedimentos Experimentais

3.3.2.1. Preparo de Soluções-padrão

Soluções estoque dos padrões de antocianinas e antocianidinas foram preparadas nas concentrações de 200 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sendo dissolvidas em solução aquosa de ácido clorídrico 0,1 % (v/v) e estocados em freezer à – 2°C até uso.

3.3.2.2. Extração das Amostras

Todas as frutas e vegetais foram devidamente tratados: cabos, folhas e sementes foram retirados e as frutas (no caso da uva, somente a casca) foram batidas em Ultra Turrax[®] até formarem uma polpa homogênea, sem adição de água.

Esta extração utilizada preliminarmente foi baseada nos trabalhos de Revilla *et al.* (1998) e Barnes *et al.* (2009), em que 10,0 g de amostra foram homogeneizadas em liquidificador (por 1 minuto) com 10,0 mL de uma solução de metanol com ácido clorídrico (99:1, v/v). Esta foi colocada em banho de ultrassom por 10 minutos. O produto obtido foi centrifugado a 3500 rpm por 20 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi recolhido e guardado em frasco âmbar. O resíduo foi submetido à nova extração com mais 10,0 mL de solvente extrator, repetindo o procedimento acima. O procedimento descrito foi repetido dez vezes e o extrato obtido foi acondicionado em freezer a – 2 °C até uso. Antes de ser injetado, o mesmo foi filtrado em membrana Millipore® 0,45 µm [14,18].

3.3.2.3. Otimização da Separação

Foi utilizada uma coluna cromatográfica C18 Phenomenex (250 x 4,6 mm; 0,40 µm d.i.) (Torrance, Califórnia, USA), em temperatura mantida constante a 30°C com a utilização de forno (Waters, Milford, MA, USA). Como fase móvel foram utilizados: A – água ultrapura com ácido clorídrico 0,1 % (pH 2,1) e B – metanol com ácido clorídrico 0,1 %. Essa pequena porcentagem de ácido foi adicionada à fase orgânica e aquosa da fase móvel devido à instabilidade das antocianinas, que em pH acima de 2,5 resultam em separação pobre, devido aos picos largos e, por isso, necessitam de meio ácido para manter-se na forma de cátion flavílio, aumentando a seletividade do método de separação [11,19,20]. O ácido foi adicionado na mesma quantidade nas duas fases para que se mantivesse constante durante toda a corrida cromatográfica, independentemente da proporção água/metanol. No início de cada dia, as fases móveis foram degaseificadas através do borbulhamento de gás Hélio. A vazão utilizada foi de 1,0 mL min⁻¹ e o volume injetado foi de 20,0 µL. O comprimento de onda utilizado na análise foi 522 nm.

3.3.3. Análises dos Resultados

Para integração das áreas dos picos cromatográficos, utilizou-se o programa Origin 5.0 (Microcal Inc.); para cálculos dos parâmetros cromatográficos foi utilizado o Excel (Microsoft Inc.).

3.4. Resultados e Discussão

3.4.1. Otimização da Separação

Poucos são os trabalhos encontrados na literatura que realizam separações de antocianinas a partir de padrões analíticos, devido à falta desses e ao elevado custo para compra em quantidades significativas [21-23]. Para desenvolvimento deste projeto, foram obtidos oito padrões de grau analítico para o estudo do comportamento cromatográfico e medida de atividade anti-oxidante. A Tabela 3.1 ilustra as características químicas básicas de cada substância estudada, bem como as fontes alimentícias mais comuns.

Tabela 3.1. Características químicas e fontes naturais das antocianinas estudadas [24,25].

Nome	Fórmula Molecular	Massa Molar (g mol⁻¹)	Cor	Absorção (nm)	Fontes Naturais
Cianidina-3,5-diglicosídeo	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₆	611.52	Vermelho - Violeta	522	Amora, uva.
Cianidina-3-glicosídeo	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	449.38	Vermelho	525	Morango, amora, uva.
Pelargonidina-3-glicosídeo	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀	433.38	Laranja - avermelhada	515	Morango, amora, acerola.
Malvidina-3-glicosídeo	C ₂₃ H ₂₅ O ₁₂	493.43	Violeta - vermelho	535	Uva, acerola, açai.
Delfinidina	C ₁₅ H ₁₁ O ₇	303.24	Vermelho - violeta	544	Uva, mirtilo.
Cianidina	C ₁₅ H ₁₁ O ₆	287.24	Vermelho magenta	535	Morango, amora, uva.
Pelargonidina	C ₁₅ H ₁₁ O ₅	271.24	Laranja - avermelhada	530	Morango, amora, acerola.
Malvidina	C ₁₇ H ₁₅ O ₇	331.29	Violeta - vermelho	542	Uva, acerola, açai.

Para estudo preliminar da otimização da separação, misturas dos oito padrões foram injetadas em condições isocráticas, utilizando uma coluna C18 de 15 centímetros de comprimento, com o intuito de verificar o comportamento desses compostos e analisar a possibilidade de se obter uma separação utilizando uma condição mais simples. Para iniciar um processo de separação cromatográfica, geralmente são realizadas corridas com eluição isocrática e uma corrida com gradiente amplo, para avaliar qual o método mais adequado para separação dos analitos em questão e, assim, escolher as melhores condições experimentais da separação [7]. Na Figura 3.2, estão ilustrados dois cromatogramas das análises preliminares sob duas condições isocráticas: 50 % B e 40 % B. A detecção dos oito padrões foi realizada a 522 nm, que mostrou ser um comprimento de onda adequado para identificação e quantificação dos oito pigmentos.

Figura 3.2. Cromatogramas de estudos de separação, por eluição isocrática a fase móvel, de oito antocianinas. Condições cromatográficas: coluna C18 (150 x 4,6 mm; 0,40 μm d.i.), FM: A – água com HCl 0,1 % (v/v) e B - MeOH com HCl 0,1 % (v/v), volume de injeção 20 μL , vazão da FM 1,0 mL min^{-1} , coluna mantida à 25 $^{\circ}\text{C}$, λ = 522 nm. Eluição isocrática: **A)** 50 %B e **B)** 40 %B.

Foram desenvolvidas outras proporções de metanol/água (v/v) para eluição isocrática. Os resultados, assim como os demonstrados na Figura 3.2, não foram satisfatórios, sendo observada a necessidade de se efetuar esta separação com um gradiente de eluição.

Gradiente de eluição é considerado o modo ideal para separação de pigmentos antociânicos, visto suas similaridades estruturais [11,26]; o pH da fase móvel deve permanecer baixo para que seja mantida a estabilidade da antocianina na solução (na forma de cátion flavílio) [26,27]. Gradiente é o modo mais comumente utilizado em cromatografia de fase reversa, pois provê excelentes resultados de separação [28], além de se obter maior simetria entre os picos, melhores resoluções e detectabilidade, em comparação com a eluição isocrática. Também é conhecida a alta repetibilidade entre as medidas realizadas com gradiente [29].

Para avaliação preliminar da separação por gradiente foi realizado um fatorial 2^2 , variando-se a porcentagem inicial de solvente na fase móvel e o tempo total do gradiente para que fosse atingido 80 % de solvente orgânico.

A organização do fatorial encontra-se na Tabela 3.2. Os cromatogramas resultantes nos quatro ensaios podem ser observados na Figura 3.3.

Tabela 3.2. Condições do fatorial 2^2 para otimização da separação de mistura oito antocianinas e antocianidinas, através de gradiente linear de eluição.

Ensaio	% Inicial de B	Tempo final (min)	% Inicial de B	Tempo final (min)
1	20	15	-	-
2	20	30	-	+
3	40	15	+	-
<u>4</u>	40	30	+	+

Figura 3.3. Cromatogramas obtidos a partir do fatorial 2^2 aplicado para otimização da separação das antocianinas. Condições cromatográficas: coluna C18 (150 x 4,6 mm; 0,40 μm d.i.), FM: A – água com HCl 0,1 % (v/v) e B - MeOH com HCl 0,1 % (v/v), volume de injeção 20 μL , vazão da FM 1,0 mL min^{-1} , coluna mantida à 25 $^{\circ}\text{C}$, $\lambda = 522 \text{ nm}$. Especificação dos ensaios 1-4 na Tabela 3.2.

Dos quatro ensaios testados, o que mostrou uma melhor separação foi o ensaio 2 (20 – 80 % B em 30 minutos de gradiente), no qual é possível serem observados sete picos com separação razoável; entretanto, ficou evidente a co-eluição total de dois picos. Para identificação dos mesmos, os padrões foram injetados separadamente na condição escolhida (ensaio 2). Assim, conheceu-se não apenas as substâncias co-eluídas, mas também a ordem de eluição dos pigmentos, uma vez que independentemente da rampa de gradiente utilizada na separação a ordem de eluição será a mesma, desde que se mantenha a FM com mesma composição. Como, a princípio, o metanol será mantido como modificador orgânico da fase móvel, este conhecimento prévio tornou-se válido para o estudo.

Após a injeção de cada padrão, constatou-se que as substâncias cianidina-3-glicosídeo e pelargonidina-3-glicosídeo é que estavam completamente co-eluídas, fato não observado visivelmente no cromatograma do ensaio 2 na Figura 3.3, no qual acreditava-se que havia oito picos, mas na realidade o pequeno pico situado entre os dois últimos maiores é advindo de uma possível degradação do padrão.

Para separação dessas duas substâncias foram realizados testes variando a % de solvente e vazão da FM ao longo do gradiente; entretanto, não houve êxito na separação da cianidina-3-glicosídeo e pelargonidina-3-glicosídeo, apenas algumas melhorias na co-eluição, tornando-se parcial em alguns casos. Como a separação ótima é obtida quando se consegue separar um par crítico [28], optou-se então por modificar o comprimento da coluna cromatográfica, para verificar se a mudança de coluna resultaria em uma resposta positiva para a separação e não afetaria de forma significativa o tempo de análise, pois um aumento no comprimento da coluna pode auxiliar na separação de analitos co-eluídos, mas também pode aumentar o tempo de análise [7]. Utilizou-se então uma coluna C18 idêntica à utilizada nos primeiros estudos, inclusive mesmo diâmetro interno e tamanho de partícula, mas de comprimento de 25 centímetros. Mais uma vez foi realizado o teste de fatorial inicial, descrito na Tabela 3.2, objetivando manter os tempos de análise já trabalhados (15 e 30 minutos), para ser avaliado se um aumento no comprimento da coluna resolveria o par crítico (cianidina-3-glicosídeo e pelargonidina-3-glicosídeo), mas não comprometeria o tempo de análise. Os resultados para os quatro novos ensaios estão demonstrados na Figura 3.4.

Figura 3.4. Cromatogramas obtidos a partir do fatorial aplicado para otimização da separação das antocianinas. Condições cromatográficas: coluna C18 (250 x 4,6 mm; 0,40 μm d.i.), FM: A – água com HCl 0,1 % (v/v) e B - MeOH com HCl 0,1 % (v/v), volume de injeção 20 μL , vazão da FM 1,0 mL min^{-1} , coluna mantida à 30 $^{\circ}\text{C}$, $\lambda = 522 \text{ nm}$. Especificação dos ensaios 1-4 na Tabela 3.2.

Para análise dos resultados obtidos nos ensaios com a coluna de 25 centímetros foram calculadas as resoluções entre os picos, utilizando a Equação 3.1. Os valores encontrados estão apresentados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3. Resoluções entre os picos cromatográficos dos quatro ensaios de fatorial aplicados em mistura dos oito padrões.

Ensaio	R_s						
	1-2	2-3	3-4	4-5	5-6	6-7	7-8
1	4,48	2,66	1,26	2,75	0	0	0
2	5,53	3,17	2,04	3,15	4,73	5,14	0,91
3	1,95	1,22	3,40	0	0	0	0,77
4	1,89	1,28	0	0	0	0	0

Através da análise visual dos cromatogramas demonstrados na Figura 3.4 e dos valores de resolução calculados (Tabela 3.3), observa-se que a melhor condição para a separação das antocianinas, mais uma vez, foi o segundo ensaio (eluição por gradiente: 20 – 80 % B em 30 minutos de corrida) (Figura 3.5), pois é possível observar no cromatograma a existência de oito picos com resoluções de 5,53 – 0,91. Exceção ao par 7-8, as resoluções obtidas nesta separação foram excelentes (acima de 1,5; valor considerado aceitável em separações) [7] e os picos apresentaram simetria razoável. Entretanto, ainda não foi possível obter uma separação em linha de base dos oito compostos. O par crítico que se tinha inicialmente (cianidina-3-glicosídeo e pelargonidina-3-glicosídeo) foi completamente separado, o que se observa agora é uma co-eluição dos dois últimos picos, que poderia ser facilmente corrigida através de manipulações na rampa do gradiente.

Figura 3.5. Melhor condição cromatográfica de partida: coluna C18 (250 x 4,6 mm; 0,40 μm d.i.), FM: A – água com HCl 0,1 % (v/v) e B - MeOH com HCl 0,1 % (v/v), gradiente de eluição de 20 – 80 % B em 30 min, volume de injeção 20 μL , vazão da FM 1,0 mL min^{-1} , coluna mantida à 30 $^{\circ}\text{C}$, $\lambda = 522 \text{ nm}$, para início da otimização da separação das antocianinas.

Pensou-se também em utilizar acetonitrila (ACN) como modificador orgânico da FM para ser analisado outra possibilidade de separação, já que muitos trabalhos da literatura utilizam este solvente [30-35]. Para isso, mais uma vez foi aplicado o fatorial descrito na Tabela 3.3, só que utilizando ACN no lugar de MeOH na FM. Os resultados cromatográficos encontram-se na Figura 3.6.

Figura 3.6. Cromatogramas obtidos a partir do fatorial aplicado para otimização da separação das antocianinas. Condições cromatográficas: coluna C18 (250 x 4,6 mm; 0,40 μ m d.i.), FM: A – água com HCl 0,1 % (v/v) e B - ACN com HCl 0,1 % (v/v), volume de injeção 20 μ L, vazão da FM 1,0 mL min⁻¹, coluna mantida à 30 °C, λ = 522 nm. Especificação dos ensaios 1-4 na Tabela 3.2.

Como observado na Figura 3.6, para as condições testadas, a ACN não mostrou ser um solvente muito apropriado para esta separação, já que em nenhum ensaio foi possível observar mais que quatro picos cromatográficos.

Snyder *et al.* (1996) afirmam que uma investigação cromatográfica com gradiente utilizando acetonitrila/água como FM é preferida no lugar de metanol/água, visto à baixa viscosidade e detecção abaixo de 190 nm da ACN [36,37]. Para a separação das antocianinas, verifica-se na literatura, que tanto MeOH quanto ACN provêem excelentes resultados [19]. Entretanto, no desenvolvimento deste trabalho, optou-se pelo uso de MeOH na FM, que apresentou melhores separações, além do fato de que as extrações das antocianinas geralmente são realizadas com MeOH [18,21,26,38,39], ficando assim facilitada a injeção direta do extrato, sem necessidade de uma evaporação de solvente, que poderia acarretar em perda significativa dos analitos; caso o solvente não fosse retirado do meio, poderia interferir na

separação cromatográfica. Quanto à absorção do MeOH (205 nm) [37], não há problemas na identificação das antocianinas, pois estas absorvem fortemente acima de 500 nm [11,40-42].

Assim, voltou-se ao estudo da separação com metanol como solvente e à condição do ensaio 2 do fatorial (Figura 3.5). Este fatorial aplicado serviu apenas como uma ferramenta ilustrativa para um prévio conhecimento do comportamento desses analitos frente à separação cromatográfica, utilizando gradiente de eluição. Um tratamento fatorial estatístico não se fez necessário neste caso, pois apenas pela visualização do perfil cromatográfico de cada análise e as resoluções calculadas fica claro que esta é a melhor condição a ser investigada e aperfeiçoada.

Novamente foram injetados cada padrão de antocianina em separado, na condição de 20 – 80 % MeOH em 30 min, para comprovação da ordem de eluição desses compostos.

Comprovou-se que a ordem de eluição dos pigmentos é: cianidina-3,5-O-glicosídeo – cianidina-3-O-glicosídeo – pelargonidina-3-O-glicosídeo – malvidina-3-O-glicosídeo – delphinidina – cianidina – pelargonidina – malvidina.

Essa ordem de eluição mostra-se condizente com as estruturas químicas de cada composto (Figura 3.7), onde as antocianinas diglicosiladas eluem antes que as monoglicosiladas e estas, antes das agliconas. Este comportamento de eluição é observado porque o composto diglicosilado apresenta maior interação com a FM, visto o maior número de hidroxilas (polares) em sua estrutura; seguindo em interação com a FM, vem as antocianinas monoglicosiladas, que também apresentam considerável número de hidroxilas. Dentre as glicosiladas com mesmo tipo de açúcar o que governa a ordem de eluição é a base aglicona, que cada uma possui, em que as antocianinas que apresentam maior número de hidroxilas eluem mais rapidamente pela coluna cromatográfica (C18 – mais apolar), pois interagem melhor com a fase móvel (mais polar); as que eluem em maior tempo são aquelas que possuem menor

número de hidroxilas em sua estrutura química, possuindo assim, maior interação com a fase estacionária e menor com a fase móvel. Por fim, eluem as substâncias que possuem grupos metoxilados. É por essa razão que se tem a ordem de eluição: delfinidina – cianidina – pelargonidina – malvidina. Por último são eluídas as antocianidinas (agliconas), que seguem a ordem padrão discutida acima.

Para desenvolvimento deste estudo, só estavam disponíveis para compra os padrões com glicose em sua composição estrutural; entretanto, em se tratando de açúcares, a ordem de eluição para a mesma antocianina seria: galactose – arabinose – glicose – rutinose – xilose [14,43].

Figura 3.7. Estruturas químicas das antocianinas utilizadas na separação por cromatografia líquida.

Os resultados obtidos na separação estão em concordância com os encontrados na literatura, quando se utiliza metanol como solvente modificador da fase móvel. Sendo o usual em fase reversa a eluição da delfinidina, cianidina, petunidina, pelargonidina, peonidina e malvidina, respectivamente, dentre os padrões de agliconas [11,14,20,43].

Após o entendimento do comportamento cromatográfico desses compostos, a otimização da separação prosseguiu de forma a observar as possíveis antocianinas presentes em alimentos, pois de nada adianta desenvolver um método de separação para os padrões disponíveis se este método não puder ser aplicado, com confiança, em diversas matrizes, já que estas deverão apresentar outras antocianinas em sua composição. Para isso, as amostras descritas no item 3.3.1.1 foram submetidas à extração descrita no item 3.3.2.2 e injetadas no cromatógrafo na condição preliminar estudada (20 – 80 %B – 30 minutos).

A partir dos resultados obtidos dessas injeções, a separação dos padrões foi realizada de modo que as antocianinas presentes nos alimentos eluíssem em tempos diferentes das oito antocianinas estudadas. Na Figura 3.8, estão apresentados três cromatogramas dos alimentos testados, onde picos de compostos não identificados foram marcados com um asterisco (*).

Figura 3.8. Cromatogramas de extratos de: **A)** acerola, **B)** amora e **C)** framboesa. Condições cromatográficas: coluna C18 (250 x 4,6 mm; 0,40 μm d.i.), FM: A – água com HCl 0,1 % (v/v) e B - MeOH com HCl 0,1 % (v/v), gradiente de eluição de 25 – 55 % B em 30 min, volume de injeção 20 μL , vazão da FM 1,0 mL min^{-1} , coluna mantida à 30 $^{\circ}\text{C}$, $\lambda = 522 \text{ nm}$.

Após esta análise, foram efetuadas manipulações na condição cromatográfica de partida e comparou-se a eluição dos compostos presentes nos alimentos com a eluição dos padrões utilizados no estudo da separação. Verificaram-se ainda os parâmetros cromatográficos do método para que se chegasse a uma separação com a maior eficiência e seletividade possível.

Por fim, a separação dos oito padrões foi obtida com êxito na condição: gradiente linear de eluição, de 25 a 55 % de metanol acidificado com HCl 0,1 % (v/v), em água ultrapura acidificada com HCl 0,1 % (v/v), tempo de gradiente 30 minutos, vazão 1,0 mL min^{-1} e coluna mantida a temperatura constante (30 $^{\circ}\text{C}$).

Para conseguir uma melhoria na separação, e até mesmo diminuição no tempo de análise, foram testadas duas condições de temperatura da coluna e vazão da fase móvel, mantendo a rampa de gradiente.

Primeiramente, testou-se 25 e 35 $^{\circ}\text{C}$ (mantendo a vazão de 1,0 mL min^{-1}), os cromatogramas obtidos podem ser verificados na Figura 3.9. Uma variação

na temperatura é importante para otimizar uma separação, pois geralmente sua variação afeta menos a retenção do que mudanças na composição da FM [28], sendo utilizada portanto, para um ajuste fino das condições obtidas.

Figura 3.9. Cromatogramas da separação dos padrões de antocianinas. Condições cromatográficas: coluna C18 (250 x 4,6 mm; 0,40 μm d.i.), FM: A – água com HCl 0,1 % (v/v) e B - MeOH com HCl 0,1 % (v/v), gradiente de eluição de 25 – 55 % B em 30 min, volume de injeção 20 μL , vazão da FM 1,0 mL min^{-1} , $\lambda = 522 \text{ nm}$ coluna mantida à **A)** 25 °C e **B)** 35 °C.

Como se observa na Figura 3.9. (A) a 25 °C, há um atraso na eluição dos picos das antocianinas, em 30 minutos são detectados apenas 6 compostos, os dois últimos demoram tempo maior, e ainda perde-se as boas resoluções entre os picos 3-4 e 4-5. Já a 35 °C (Figura 3.9. B), é possível eluir os 8 compostos em menos de 25 minutos de corrida, pois com o aumento da temperatura têm-se uma diminuição da viscosidade da FM e consequentemente um aumento na velocidade de percolação da mesma. Entretanto, ainda há comprometimento na separação entre os picos 3-4, 4-5 e, principalmente, 7-8. Os resultados obtidos são coerentes, pois uma mudança de 1 °C na temperatura de trabalho pode resultar em espaçamento ou junção das bandas cromatográficas e diminuir a retenção dos compostos de 1-2 % [7]. Como as duas temperaturas testadas não melhoraram a separação já obtida, manteve-se a temperatura de 30 °C no método.

A variação da vazão também foi estudada nas condições do método, testando-se 0,8 e 1,2 mL min⁻¹. Segundo Jandera (2006), mudanças na vazão da FM podem ser avaliadas para melhoria do método de separação após terem sido escolhidos tipo de solvente e sua % na FM [28]. Os resultados estão demonstrados na Figura 3.10.

Figura 3.10. Cromatogramas da separação dos padrões de antocianinas. Condições cromatográficas: coluna C18 (250 x 4,6 mm; 0,40 μ m d.i.), FM: A – água com HCl 0,1 % (v/v) e B - MeOH com HCl 0,1 % (v/v), gradiente de eluição de 25 – 55 % B em 30 min, volume de injeção 20 μ L, coluna mantida à 30 °C, λ = 522 nm, vazão da FM **A)** 0,8 mL min⁻¹ e **B)** 1,2 mL min⁻¹.

O efeito da vazão na separação cromatográfica também foi bastante significativo, como observado na Figura 3.10 (A), em que utilizando vazão menor (0,8 mL min⁻¹) houve co-eluição parcial dos picos 2-3 e 3-4, além de co-eluição quase total entre os picos 7-8, além de 30 minutos não serem suficientes para análise, mostrando esta não ser uma vazão interessante para esta separação, já que além de aumentar o tempo de análise, provocou diversas co-eluições entre os picos. Em (B), com vazão maior (1,2 mL min⁻¹), obteve-se uma melhoria na separação dos picos que apresentaram co-eluição quando se utilizou vazão de 0,8 mL min⁻¹, mas ainda não foram completamente separados, picos 2-3 e 3-4 apresentaram resoluções menores que 1,5 e os picos 7-8 apresentaram resolução menor que 1,0. A literatura afirma que uma boa separação, uma separação completa entre dois pares críticos, deve apresentar

resolução de no mínimo 1,5 [7]. Quanto ao tempo de análise, não houve diferença significativa.

Portanto, optou-se por manter as condições de separação obtidas a princípio: 25 – 55 % MeOH em H₂O (ambos com 0,1 % HCl) em 30 minutos, vazão 1,0 mL min⁻¹ e coluna mantida a temperatura constante de 30 °C. O cromatograma do método de separação agora otimizado está demonstrado na Figura 3.11.

Figura 3.11. Cromatograma da separação otimizada de antocianinas. Condições cromatográficas: coluna C18 (250 x 4,6 mm; 0,40 µm d.i.), FM: A – água com HCl 0,1 % (v/v) e B – MeOH com HCl 0,1 % (v/v), gradiente de eluição de 25 – 55 % B em 30 min, volume de injeção 20 µL, vazão da FM 1,0 mL min⁻¹, coluna mantida à 30 °C, λ = 522 nm.

Como se observa na Figura 3.11 foi possível obter uma boa separação (em linha de base) dos oito compostos. O último pico, entretanto, apresenta leve distorção decorrente de pequena degradação do padrão utilizado. Esta possível degradação não é um fato inesperado, devido à alta instabilidade dessa classe de compostos [21,22,30,44]. Esta explicação foi confirmada pela injeção do padrão sozinho, sob as mesmas condições cromatográficas da otimização, e o mesmo perfil foi observado.

3.4.2. Identificação dos Compostos

Para identificação de cada pico foram injetados cada padrão em separado, sob as condições do método otimizado, obtendo-se assim o tempo de retenção exato e o espectro de absorção UV-Vis, na região de 300 a 600 nm (Figura 3.12).

Esta determinação exata possibilitou a criação de uma biblioteca de espectros de antocianinas pelo software do equipamento (CLASS-VP), facilitando a identificação das mesmas nas amostras. Os tempos de retenção de cada pigmento encontram-se listados na Tabela 3.4.

Tabela 3.4. Tempos de retenção de cada antocianina obtidos através da separação otimizada. Condições cromatográficas: gradiente de eluição de 25 – 55 % B em 30 min, volume de injeção 20 μ L, vazão da FM 1,0 mL min⁻¹, coluna mantida à 30 °C, λ = 522 nm.

Antocianina	Tempo de Retenção (min)
Cianidina-3,5-diglicosídeo	6,46
Cianidina-3-glicosídeo	11,33
Pelargonidina-3-glicosídeo	13,68
Malvidina-3-glicosídeo	15,40
Delfinidina	17,28
Cianidina	21,37
Pelargonidina	25,45
Malvidina	26,53

Figura 3.12. Espectros de absorção no UV-Vis dos padrões de: **A)** cianidina-3,5-O-glicosídeo, **B)** cianidina-3-O-glicosídeo, **C)** pelargonidina-3-O-glicosídeo, **D)** malvidina-3-O-glicosídeo, **E)** delphinidina, **F)** cianidina, **G)** pelargonidina e **H)** malvidina. Condições cromatográficas de obtenção dos espectros: coluna C18 (250 x 4,6 mm; 0,40 μ m d.i.), FM: A – água com HCl 0,1 % (v/v) e B - MeOH com HCl 0,1 % (v/v), gradiente de eluição de 25 – 55 % B em 30 min, volume de injeção 20 μ L, vazão da FM 1,0 mL min⁻¹, coluna mantida à 30 °C.

3.4.3. Parâmetros Cromatográficos

Para caracterização da separação otimizada, faz-se necessária a determinação dos parâmetros cromatográficos do método. Um dos primeiros parâmetros a ser calculado é o fator de retenção, que determina a interação do analito com as fases estacionária e móvel [7]. A Equação 3.4 foi utilizada para o cálculo dos fatores de cada antocianina. O número de pratos também foi determinado, utilizando-se a Equação 3.3. Os resultados estão ilustrados na Tabela 3.5, onde o tempo morto do método é igual a 2,90 min.

Tabela 3.5. Parâmetros cromatográficos: tempo de retenção, fator de retenção e número de pratos.

Ordem de eluição	Antocianina	t_R (min)	k	N
1	Cianidina-3,5-diglicosídeo	6,46	1,23	987,816
2	Cianidina-3-glicosídeo	11,33	2,91	6457,81
3	Pelargonidina-3-glicosídeo	13,68	3,71	13236,0
4	Malvidina-3-glicosídeo	15,40	4,31	6436,74
5	Delfinidina	17,28	4,96	29727,9
6	Cianidina	21,37	6,37	145332
7	Pelargonidina	25,45	7,78	86301,2
8	Malvidina	26,53	8,15	65553,6

* t_0 = 2,90 min.

Em um desenvolvimento de método de separação, é considerado adequado um fator de retenção na faixa $0,5 < k < 20$ e uma faixa ideal se encontraria em $1,0 < k < 10$, para otimizar as condições de separação [36,37,45,46]. Analisando o resultado obtido na separação aqui proposta, o método encontra-se dentro da faixa ideal de retenção, sendo: $1,23 < k < 8,15$.

Outros parâmetros que também devem ser determinados são a resolução (R_s) e o fator de separação (α). As Equações 3.1 e 3.5, respectivamente, são utilizadas para tais determinações. Esses parâmetros servem para demonstrar a seletividade e eficiência de separação do método

desenvolvido [4]. A Tabela 3.6 ilustra os valores obtidos para o método otimizado.

Tabela 3.6. Parâmetros cromatográficos: fator de separação e resolução.

Antocianinas Adjacentes	α	R_s
1 – 2	2,37	7,35
2 – 3	1,27	4,74
3 – 4	1,16	2,96
4 – 5	1,15	3,37
5 – 6	1,28	9,48
6 – 7	1,22	9,92
7 – 8	1,05	2,79

Valores do fator de separação maior que unidade, como os obtidos na Table 3.6, demonstram que as fases estacionária e móvel conseguem reter as antocianinas diferencialmente, por isso que é possível separá-las [4]. Sendo a resolução um critério para descrever a qualidade da separação, esta deve ser maior que 1,5 para que a integração das áreas dos picos cromatográficos seja confiável [28]. Assim, pode-se afirmar que este método de separação de antocianinas é confiável e adequado para seus fins, que é a determinação (identificação e quantificação) dos pigmentos em matrizes alimentícias.

3.5. Conclusões

A separação de oito antocianinas (glicosiladas e agliconas) utilizando cromatografia líquida foi estudada e obtida com êxito após escolha do solvente orgânico modificador da fase móvel, modo de eluição, temperatura da coluna cromatográfica e vazão da fase móvel. Juntamente, foram verificadas matrizes alimentícias, que apresentam antocianinas em sua composição, para otimizar a separação das substâncias disponíveis na forma de padrão analítico, para que não eluíssem ao mesmo tempo que outras antocianinas presentes nessas matrizes complexas.

As condições cromatográficas de melhor separação foram: gradiente de eluição de 25 – 55 % de MeOH em H₂O (ambos acidificados com 0,1 % HCl) durante 30 minutos, sendo 1,0 mL min⁻¹ de vazão da FM e coluna mantida a temperatura constante de 30 °C. O comprimento de onda de detecção das antocianinas foi 522 nm. Esta condição foi testada e mostrou ser a mais adequada.

Os parâmetros cromatográficos da separação, como fator de retenção, fator de separação e resolução, foram avaliados e os resultados obtidos demonstraram que o método apresenta excelente separação e fácil identificação desses pigmentos, podendo assim ser aplicado a diversas matrizes alimentícias para caracterização dos alimentos quanto à presença de qualquer uma dessas oito antocianinas estudadas, bem como a quantificação exata de cada uma.

3.6. Referências Bibliográficas

- [1] Malacrida, C.R.; da Motta, S. **Bol. CEPPA**, 24 (2006) 59-82.
- [2] Ettre, L.S. **Pure & Appl. Chem.**, 65 (1993) 819-872.
- [3] Valente, A.L.P.; Collins, C.H.; Manfredi, J.E. **Quím. Nova**, 6 (1983) 103-109.
- [4] Manfredi, J.E.; Collins, C.H.; Valente, A.L.P. **Quím. Nova**, 7 (1984) 132-137.
- [5] Huber, J.F.K.; Hulsman, J.A.R.J. **Anal. Chim. Acta**, 38 (1967) 305-313.
- [6] Martin, A.J.P.; Synge, R.L.M. **Biochem J.**, 35 (1941) 1358-1368.
- [7] Snyder, L.R.; Kirkland, J.J.; Glajch, J.L. Practical HPLC method development. 2^aed. John Wiley & Sons: New York, 1997.
- [8] De Smet, M.; Hoogewijs, G.; Puttermans, M.; Massart, D.L. **Anal. Chem.**, 56 (1984) 2662-2670.
- [9] Nikitas, P.; Pappa-Louisi, A.; Papachristos, K. **J. Chromatogr. A**, 1033 (2004) 283-289.
- [10] Miyabe, K. **J. Chromatogr. A**, 1194 (2008) 184-191.
- [11] Lee, H.S.; Hong, V. **J. Chromatog.**, 624 (1992) 221-234.
- [12] Goiffon, J.-P.; Mouly, P.P.; Gaydou, E.M. **Anal. Chim. Acta**, 382 (1999) 39-50.
- [13] Morais, H.; Ramos, C.; Forgács, E.; Cserhádi, T.; Oliveira, J. **J. Chromatog. B**, 770 (2002) 297-301.
- [14] Barnes, J.S.; Nguyen, H.P.; Shen, S.; Schug, K.A. **J. Chromatogr. A**, 1216 (2009) 4728-4735.
- [15] Tonhi, E.; Collins, K.E.; Collins, C.H. **Rev. Analytica**, 14 (2005) 58-61.
- [16] Villiers, A. de; Cabooter, D.; Lynen, F.; Desmet, G.; Sandra, P. **J. Chromatog. A**, 1216 (2009) 3270-3279.
- [17] Tabart, J.; Kevers, C.; Pincemail, J.; Defraigne, J.-O.; Dommès, J. **Food Chem.**, 120 (2010) 607-614.
- [18] Revilla, E.; Ryan, J.-M., Martín-Ortega, G. **J. Agric. Food Chem.**, 46 (1998) 4592-4597.

- [19] Costa, C.T. da; Horton, D.; Margolis, S.A. **J. Chromatog. A**, 881 (2000) 403-410.
- [20] Wulf, L.W.; Nagel, C.W. **Am. J. Enol. Vitic.**, 29 (1978) 42-49.
- [21] Castañeda-Ovano, A.; Pacheco-Hernández, Ma. de L.; Páez-Hernández, Ma. E.; Rodríguez, J.A.; Galán-Vidal, C.A. **Food Chem.**, 113 (2009) 589-871.
- [22] Março, P.H.; Poppi, R.J.; Scarmínio, I.S. **Quím. Nova**, 31 (2008) 1218-1223.
- [23] Zhang, Z.; Kou, X.; Fugal, K.; McLaughlin, J. **J. Agric. Food Chem.**, 52 (2004) 688-691.
- [24] The Merk Index. 12^a ed. Editora MERCK & CO: New Jersey, 1996.
- [25] Cavacanti, R.N.; Santos, D.T.; Meireles, M.A.A. **Food Research Intern.** (2010), 10.1016/j.foodres.2010.12.007.
- [26] Denev, P.; Ciz, M.; Ambrozova, G.; Lojek, G.; Yanakieva, I.; Kratchanova, M. **Food Chem.**, 123 (2010) 1055-1061.
- [27] Chandra, A.; Rana, J.; Li, Y. **J. Agric. Food Chem.**, 49 (2001) 3515-3521.
- [28] Jandera, P. **J. Chromatog. A**, 1126 (2006) 195-218.
- [29] Jandera, P.; Churacek, J.; Svoboda, L. **J. Chromatogr.**, 192 (1980) 37-51.
- [30] Patras, A.; Brunton, N.P.; O'Donnell, C.; Tiwari, B.K. **Trends in Food Science & Technol.**, 21 (2010) 3-11.
- [31] Yang, Z.; Zhai, W. **Innovative Food Science and Emerging Technol.**, 1 (2010) 169-176.
- [32] Nayak, C.A.; Srinivas, P.; Rastogi, N.K. **Food Chem.**, 118 (2010) 719-724.
- [33] Longo, L.; Vasapollo, G. **Food Chem.**, 94 (2006) 226-231.
- [34] Byamukama, R.; Namukobe, j.; Kiremire, B. **African J. Pure Applied Chem.**, 3 (2009) 20-25.
- [35] Lee, J.; Rennaker, C.; Wrolstad, R.E. **Food Chem.**, 110 (2008) 782-786.
- [36] Snyder, L.R.; Dolan, J.W. **J. Chromatogr. A**, 721 (1996) 3-14.
- [37] Collins, C.H. Fundamentos de Cromatografia. Editora da UNICAMP: Campinas, 2006.

- [38] Kong, J.-M.; Chia, L.-S.; Goh, N.-K.; Chia, T.F.; Brouillard, R. **Phytochem.**, 64 (2003) 923-933.
- [39] Dai, J.; Gupte, A.; Gates, L.; Mumper, R.J. **Food Chem. Toxicol.**, 47 (2009) 837-847.
- [40] Bordignon Jr., C.L.; Francescatto, V.; Nienow, A.A.; Calvete, E.; Reginatto, F.H. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 29 (2009) 183-188.
- [41] Wu, X.; Prior, R.L. **J. Agric. Food Chem.**, 53 (2005) 3101-3113.
- [42] Março, P.H.; Scarminio, I.S. **Anal. Chim. Acta**, 583 (2007) 138-146.
- [43] Castele, K.V.; Geiger, H.; Loose, R.; Van Sumere, C.F. **J. Chromatog.**, 259 (1983) 291-300.
- [44] Kirca, A.; Ozkan, M.; Cemeroglu, B. **Food Chem.**, 101 (2007) 212-218.
- [45] Lewis, J.A.; Snyder, L.R.; Dolan, J.W. **J. Chromatogr. A**, 721 (1996) 15-29.
- [46] Glajch, J.L.; Kirkland, J.J.; Squire, K.M.; Minor, J.M. **J. Chromatogr.**, 199 (1980) 57-79.

Capítulo 4

OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO

4. Otimização da Extração

4.1. Introdução

4.1.1. Extração de Antocianinas

Alimentos são uma mistura complexa de uma gama impressionante de substâncias químicas, o que torna difícil isolar e determinar analitos de interesse [1]. A extração de fitoquímicos a partir de material sólido (plantas e alimentos), usando solventes, constitui um importante passo no manufaturamento dos produtos ricos nesses fitoquímicos [2].

Frutas e vegetais da mesma variedade podem ter composições diferentes, ou a composição pode variar mesmo após a colheita. Essas modificações pós-colheita são maiores nos alimentos com maior teor de umidade. Dentre os fatores que influenciam na composição dos alimentos têm-se: variedade; condições de crescimento (solo, clima, irrigação, fertilização, temperatura); estágio de maturação; tempo e condições de estocagem e, ainda, parte do alimento que se extrai - casca ou polpa [3].

Amostragem é sempre importante em qualquer trabalho analítico, tornando-se crucial para a obtenção de resultados representativos [3]. Sendo assim, além de um bom método de extração, faz-se necessário uma amostragem, para que os resultados obtidos nos experimentos reflitam com a maior veracidade possível o conteúdo de fitoquímicos (no caso, antocianinas) presentes nessas matrizes complexas.

Inúmeras extrações podem ser realizadas para obter-se um extrato vegetal rico em antocianinas. Na análise de alimentos, as técnicas tradicionais de preparação de amostra são demoradas e consomem grande quantidade de reagente, além da necessidade de equipamentos sofisticados e pessoas qualificadas [1]; por isso, faz-se necessário um estudo do método e dos reagentes envolvidos no processo de extração, ainda mais que em alimentos os

vários componentes da matriz podem estar interferindo entre si [3].

Pesquisas de metodologias de extrações são utilizadas para desenvolver ou adaptar métodos analíticos exatos, precisos, sensíveis, eficientes, simples e de baixo custo na determinação de um dado composto de interesse. É desejável que o procedimento de extração escolhido não seja complexo (com grande número de etapas), demorado ou de custo elevado [4].

Antocianinas são totalmente instáveis quando se utiliza meio alcalino ou neutro e também quando expostas à luz. É conhecido que esses pigmentos apresentam uma alta estabilidade em meio ácido; entretanto, podem ser instáveis quando extraídas de uma fonte natural, pois parte de seus compostos podem ser degradados durante o processo de extração, sendo a degradação, muitas vezes, verificada pela cor do extrato obtido (cor acastanhada) [2,5].

A extração de antocianinas com solvente é o passo inicial para quantificação, purificação, separação e caracterização [6]. A utilização de solventes acidificados se faz necessária, pois as antocianinas encontram-se na seiva das células (próximas à superfície) e o ácido auxilia no rompimento da membrana celular do tecido, dissolvendo os pigmentos [7], além de servir para a prevenção da degradação de compostos não-acilados [5,8].

Em geral, extratos de matrizes vegetais possuem diversos compostos fenólicos e, por isso, o isolamento e purificação de antocianinas é bastante dificultado. Muitas vezes, para obter um extrato puro em antocianinas se faz necessária a combinação de diversas técnicas para extração e purificação desses pigmentos [9].

4.1.1.1. Extração Sólido-Líquido

Neste tipo de extração, a amostra é colocada em contato com o solvente extrator, filtrada/separada e então o resíduo sólido é re-extraído [10]. A extração mais estável envolve maceração ou imersão da amostra sólida em solventes

alcoólicos contendo certa quantidade de ácido mineral [4,10]. Macerar ou cortar a amostra aumenta a superfície de contato para acesso do solvente, melhorando o procedimento de extração [10]. Os dois conceitos fundamentais que definem este processo são equilíbrio e transferência de massa [2].

A extração sólido-líquido, em comparação com as outras técnicas, é de baixo custo em termos de materiais e equipamentos utilizados, seu modo de operação é contínuo, mas apresenta a desvantagem da utilização de grande quantidade de solventes, muitas vezes tóxicos [10].

4.1.1.2. Extração Líquido-Líquido

Este tipo de extração baseia-se na solubilidade relativa dos analitos presentes na amostra em dois solventes, idealmente imiscíveis. Em geral, o analito de interesse, juntamente com os interferentes, encontra-se em uma matriz líquida, como, por exemplo, a água (como é o caso de alimentos). Essa solução é colocada em um funil de separação ao qual se adiciona um solvente orgânico pouco miscível com a água. O sistema é agitado e o analito passa da fase aquosa para a orgânica, enquanto os interferentes permanecem, na sua maioria, na fase aquosa (Figura 4.1) [11].

Figura 4.1. Esquema experimental de extração líquido-líquido.

4.1.1.3. Extração em Fase Sólida – SPE

Muitas vezes os processos de extração não são seletivos para antocianinas, pois acabam extraindo outros compostos fenólicos, açúcares e ácidos orgânicos [12,13]. Algumas vezes, para se obter um extrato puro e rico em antocianinas, faz-se necessário o uso de técnicas de “clean-up” no fim do isolamento das antocianinas de interesse [12].

Um grande número de métodos tem sido utilizado com sucesso para o “clean-up” de extratos de antocianinas. Eles incluem extração em fase sólida com Sephadex, resina de troca iônica, precipitação básica conduzida por acetato ou extração solvente-solvente com n-butanol [14].

A extração em fase sólida (SPE) em cartucho C-18 ou Sephadex é uma prática rotineira [14], relativamente simples [13] e comumente usada para a purificação do extrato bruto de antocianina [6].

A SPE é baseada nos mecanismos de separação da cromatografia de baixa pressão, em que a solução contendo o analito de interesse é colocada no topo do cartucho de SPE e aspirada com vácuo, de forma a penetrar no mesmo. Depois de drenada toda a fase líquida, o analito retido no cartucho é eluído com um pequeno volume de solvente apropriado, para ser coletado em concentração apropriada para análise (Figura 4.2) [1,11,15].

As antocianinas são fortemente vinculadas aos adsorventes (fase quimicamente ligada – C-18) através de seus grupos hidroxil não substituídos e são separadas por uso de uma série de solventes com aumento de polaridade [8,16]; desta forma, obtêm-se a eliminação de impurezas polares seguidas das não-polares [13] e por fim as antocianinas propriamente [6].

Figura 4.2. Ilustração do funcionamento de extração por SPE – etapas empregadas.

Inúmeros pesquisadores vêm utilizando a SPE na extração e purificação de antocianinas (Tabela 4.1) [6,17-22]. Investigações de diferentes formas de extração em fase sólida provaram que SPE é um método de purificação bastante rápido e de alta eficiência para soluções de extrato de antocianinas. Os extratos resultantes dessa extração são quase que completamente livre de açúcares, alcoóis e proteínas [13].

4.1.2. Solventes Extratores

A escolha do solvente extrator é de vital importância para alcançar o máximo de eficiência [23]. Antocianinas são muito solúveis em água e em solventes polares [15,24]; na extração, devem-se utilizar soluções alcoólicas de metanol ou etanol contendo algum ácido, como o ácido acético ou clorídrico [16,24,25]. O ácido utilizado para extração previne a degradação de antocianinas e mantém a estrutura dos pigmentos na forma catiônica (flavílio) [23,24]. A extração utilizando metanol, geralmente, demonstra ser mais eficiente do que a realizada com etanol, com água pura ou água acidificada [12,26,27]. Entretanto, Vanini et al. (2009) testaram a estabilidade e rendimento de diversas

extrações de antocianinas em amostras de uva do tipo Benitaka. No trabalho, foram realizadas extrações com porcentagens diferentes de metanol e etanol, acidificados com ácido clorídrico e ácido cítrico em diferentes pHs. O resultado, ao contrário do que se encontra na maioria dos trabalhos na literatura, mostrou melhor rendimento de extração com solução de etanol:água (70:30 v/v) com HCl (pH 2,0) [28]. Já Bridgersa *et al.* (2010), através de um estudo com planejamento fatorial para avaliação da melhor condição de extração de antocianinas em batata doce, relatam que o metanol acidificado mostrou melhores rendimentos do que o etanol [29].

O tipo de solvente extrator de antocianinas é um assunto bastante discutido na literatura, pois as indústrias de alimentos dão preferência ao etanol nas extrações, devido à alta toxicidade do metanol [12,27]; há ainda uma discussão quanto ao uso do ácido clorídrico para extração, pois este é corrosivo, diminuindo o tempo de vida útil de uma coluna cromatográfica, por exemplo [30]. Entretanto, resultados de extração como os obtidos no trabalho de Yang, *et al.* (2008), são comumente encontrados. Os autores investigaram métodos de extração de antocianinas em “purple corn cob”, através de um fatorial $2^2 \times 2^3$, utilizando como variáveis metanol e etanol em diferentes porcentagens e ácidos acético e cítrico adicionados. Foi realizada uma extração sólido-líquido simples, sem etapas de purificação da amostra. O melhor resultado obtido, em termos de rendimento, foi a combinação de 80 % (v/v) de metanol e 1 % (v/v) de ácido cítrico. O tempo de extração também foi estudado e a conclusão foi que o procedimento realizado duas vezes é suficiente para extrair o máximo dos pigmentos (93,43 %) [5].

As diferenças de resultados obtidos sugerem que a extração deve ser desenvolvida e otimizada de acordo com a amostra em estudo e através de testes de rendimento, para escolha do método mais conveniente.

Alguns trabalhos relatam a extração de antocianinas utilizando água sulfurada. Esse método almeja uma redução significativa no uso de solventes

orgânicos, bem como uma diminuição no custo da extração [2]. Cacace *et al.* (2002) utilizaram este método para obtenção de antocianinas e outros compostos fenólicos em groselha e observaram que o uso de SO₂ aumenta significativamente o rendimento da extração [2]. Gao & Mazza (1996) testaram água contendo SO₂ em diferentes proporções e solventes acidificados. Os maiores rendimentos foram obtidos com água sulfurada em concentração relativamente baixa (o que facilita sua retirada do meio, antes da análise) e em curto tempo de extração [31].

Acredita-se que uma das possíveis razões para a melhoria na extração com SO₂ está na interação das antocianinas com os íons HSO₃⁻, os quais aumentam a solubilidade e difusão das antocianinas através da parede celular [30]. Entretanto, degradação térmica de pigmentos antociânicos com água sulfurada já foi relatada [2]. Frutas e vegetais conservados em quantidades moderadas de SO₂ perdem a antocianina, o que pode ser observado através da coloração; entretanto, após o processo de "dessulfurização", a reação de transformação da antocianina em outra espécie é revertida e obtêm-se novamente a antocianina em sua forma original. A utilização de SO₂ na extração de antocianinas se mostra bastante promissora; entretanto, um estudo elaborado de retirada desse SO₂ deve ser investigado.

Acetona também tem sido utilizada na extração de antocianinas [16]. Segundo Costa *et al.* (2000), em comparação com metanol acidificado em técnica de extração líquido-líquido, a acetona mostra ser bastante reprodutível [8]. Garcia-Viguera *et al.* (1998) também demonstraram bons resultados utilizando acetona como solvente extrator em comparação com MeOH/HCl e uma mistura de MeOH/H₂O/HCl [31]

Inúmeros solventes e métodos de extração são estudados para obtenção de antocianinas. Na Tabela 4.1 está demonstrada uma compilação de trabalhos desenvolvidos nos últimos 30 – 40 anos.

Tabela 4.1. Extração de antocianinas de diversas matrizes.

Amostra	Solução Extratora (volume)	Tempo	Temperatura	SPE	Referência
Mirtilo (<i>Vaccinium myrtillus</i> L.)	MeOH:H ₂ O (1:1) com 2 % HCl	20 min	ambiente	não	[26]
Groselha (<i>Ribes nigrum</i>)	MeOH:H ₂ O (1:1) com 0,1 % TFA	6 h	4 °C	não	[32]
Manjeriço (<i>Ocimum basilicum</i> L.)	MeOH com 0,1 % HCL	3 h	4 °C	não	[33]
Morango (<i>Fragaria x ananassa</i>), oxicoco (<i>Vaccinium macrocarpon</i>), roselle* (<i>Hibiscus sabdariffa</i>)	MeOH com 1 % HCl	toda noite	0 °C	C18	[34]
Uva (<i>Vitis vinífera</i>)	MeOH com 2 % ácido fórmico	-	ambiente	não	[35]
Framboesa preta e vermelha (<i>Rubus occidentalis</i> , <i>Rubus idaeus</i>), highbush blueberry* (<i>Vaccinium corymbosum</i>), uva (<i>Vitis vinífera</i>).	MeOH 90 % com 0,5 % ácido fórmico	1 h e 30 min	ambiente	C18	[36]
Uva (<i>Vitis vinífera</i> L.)	MeOH	20 h	15 °C	não	[25]
Acerola (<i>Malpighia emarginata</i> DC.), açai (<i>Euterpe oleracea</i> Mart.)	MeOH com 0,5 % HCl	toda noite	ambiente	não	[37]
Milho roxo (<i>Zea mays</i> L.)	MeOH	24 h	4 °C	não	[38]
Uva (<i>Vitis vinífera</i> L.)	EtOH 70 % com 0,1 % HCl (pH 2,0)	toda noite	4 °C	não	[28]

Continuação da Tabela 4.1.

Uva (<i>Vitis vinifera</i>)	Acetona, Acetona: H ₂ O (30:70), CH ₃ Cl	toda noite	ambiente	C18	[39]
Kokum* (<i>Garcinia indica</i> Choisy)	H ₂ O com 0,1 % HCl	-	ambiente	C18	[17]
Milho roxo (<i>Zea mays</i> L.)	MeOH 80 % com 1 % ácido cítrico	24 h	ambiente	não	[5]
Salsaparrilha (<i>Smilax áspera</i>)	MeOH com 0,1 % HCl	20 h	ambiente	C18	[40]
Milho roxo (<i>Zea mays</i> L.)	EtOH:H ₂ O (80:20) gelado	40 min	ambiente	não	[42]
Folha de mandioca (<i>Manihot esculenta</i> Crantz)	MeOH com 1 % TFA	-	ambiente	Amberlite XAD-7	[43]
Cereja (<i>Prunus cerasus</i> L.), elderberry* (<i>Sambucus nigra</i> L.)	H ₂ O, MeOH com 2 % HCl	25 min	ambiente	C18	[14]
Morango (<i>Fragaria x ananassa</i>)	MeOH com 1 % HCl, hexano	14 h	3 – 5 °C	C18	[18]
Morango (cv. Camarosa)	MeOH, MeOH 95 %	10 min	ambiente	C18	[19]
Morango (cv. Camarosa)	Acetona	-	ambiente	C18	[31]
Mirtilo (<i>Vaccinium corymbosum</i> L.)	MeOH:H ₂ O:HAc (24:24:1)	-	ambiente	C18	[20,21,44]
Mirtilo (<i>V darrowii</i> e <i>V corymbosum</i>)	MeOH:H ₂ O:TFA (70:29:1)	20 min	ambiente	não	[23]

Continuação da Tabela 4.1.

Amora (<i>Rubus fruticosus</i>)	EtOH com 0,01 % HCl	30 min	ambiente	não	[45]
Morango (<i>Fragaria x ananassa</i>)	MeOH 75 % com 0,1 % ácido fórmico	-	ambiente	não	[46]
Morango (<i>Fragaria x ananassa</i>)	ACN:HAc:H ₃ PO ₄ :H ₂ O (5:4:1,5:89,5)	-	ambiente	não	[47]
Morango (<i>Fragaria x ananassa</i>)	Acetona	-	ambiente	C18	[48]
Mirtilo vermelho (<i>V. vitis-idaea</i>), groselha (<i>R. nigrum</i> var), mirtilo (<i>V. myrtillus</i>)	ACN:TFA:H ₂ O (49,5:0,5:50)	-	ambiente	Amberlite XAD-7	[49]
Framboesa (<i>Rubus idaeus</i> L.)	EtOH:HCl (85:15)	200 s	40 °C	não	[50]
Amora (<i>Rubus fruticosus</i>)	MeOH:H ₂ O (1:1) Com HCl	24 h	ambiente	Gel de poliamida	[51]
Morango (<i>Fragaria x ananassa</i>)	MeOH com 0,1 % HCl	-	ambiente	não	[52]
Morango (<i>Arbutus unedo</i> L.)	MeOH com 0,5 % HCl	-	ambiente	C18	[22]
Batata roxa (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	EtOH 80 % co HCl 0,01 M	24 h	ambiente	não	[53]
	MeOH com 0,01 HCl	-	ambiente	não	

* não foi encontrada tradução pertinente ou literal para o português.

O que se observa é que não existe um método padrão e único para a extração das antocianinas, sendo necessário um estudo aprofundado da obtenção destas, adequando a extração às soluções disponíveis em cada local de trabalho, bem como os materiais a serem utilizados durante o processo.

4.1.3. Hidrólise de Antocianinas

O primeiro passo para a identificação de antocianinas é o preparo de um extrato rico nos pigmentos. Como as antocianinas são geralmente extraídas com solvente orgânico contendo certa porcentagem de ácido [27], é necessário tomar certo cuidado com a concentração do ácido [7], pois pode ocorrer uma quebra da ligação glicosídica da antocianina, resultando na extração da aglicona, se a concentração de ácido for elevada [12].

A hidrólise ácida é indicada quando não se tem padrões que permitam a identificação de antocianinas em matrizes complexas, obtendo-se assim, um perfil de antocianidina da matriz [34,54]. Em trabalho de Zhang *et al.* (2004), são realizadas extrações para análise direta e hidrólise ácida de antocianinas presentes em mirtilo. Foi observado que hidrólises de 1 e 2 horas são suficientes para obter o maior rendimento de extração. Os autores afirmaram que a hidrólise simplifica o perfil das antocianinas e as agliconas podem ser facilmente separadas por HPLC, sendo facilitada a quantificação dos pigmentos, já que os padrões das agliconas são de custo consideravelmente inferior, principalmente quando se deseja fazer ensaios de controle de qualidade, nos quais muitas vezes não se tem disponível aparato sofisticado para tais medidas [26].

Outro tipo de hidrólise encontrada na literatura é a alcalina. Segundo Nayak *et al.* (2010), a hidrólise alcalina não afeta na ligação glicosídica, ao contrario da hidrólise ácida, que libera a aglicona [9,14,16]. A hidrólise alcalina é responsável pela quebra das ligações ésteres com os grupos acilados presentes nos pigmentos [17]. Em trabalho realizado por Longo *et al.* (2006), são

demonstradas separações por HPLC-DAD-MS de extratos de *Smilax áspera* (um tipo de "berry"), em que um dos extratos purificados é tratado com hidrólise ácida e o outro com hidrólise alcalina. No trabalho é discutido que, através da análise pelo espectro UV-Vis e pelo espectro de massas, o resultado obtido após a hidrólise alcalina confirma que a amostra em questão não possui substâncias aciladas, já que o cromatograma obtido é idêntico ao registrado após a hidrólise ácida [40].

A Tabela 4.2 destaca ensaios de hidrólises ácidas descritas na literatura. O que pode ser facilmente observado é que parâmetros, como tempo e temperatura de hidrólise, não variam de forma significativa de uma metodologia para outra.

O que se conclui a respeito da hidrólise de antocianinas é que a alcalina é utilizada com finalidade comprobatória de identificação dos pigmentos obtidos em determinado extrato; ela é apenas um indício de que as substâncias previamente identificadas não possuem grupos acil em sua estrutura. A hidrólise ácida, por sua vez, possui um caráter de identificação de aglicona e a única certeza que se tem é o(s) tipo(s) de aglicona(s) presente(s) na matriz estudada, não apresentando informação pertinente quanto ao tipo de açúcar presente ou padrão de substituição.

A hidrólise ácida é uma metodologia viável e complementar para a caracterização de antocianinas presentes em determinada matriz, a quantificação de agliconas ou para a utilização em análises de controle de qualidade em laboratórios de análise de alimentos [24,26].

Tabela 4.2. Compilação de hidrólises realizadas em diversos extratos de antocianinas.

Amostra	Solução Extratora (volume)	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Referência
Mirtilo (<i>Vaccinium myrtillus</i> L.)	MeOH:H ₂ O:HCl 2 mol L ⁻¹ (50:33:17)	60	100	[26]
Kokum* (<i>Garcinia indica</i> Choisy)	HCl 2 mol L ⁻¹	60	100	[17]
Salsaparrilha (<i>Smilax áspera</i>)	HCl 2 mol L ⁻¹	60	100	[40]
Mirtilo (<i>Vaccinium myrtillus</i> L.)	HCl 3 %	60	95	[55]
Morango (<i>Arbutus unedo</i> L.)	HCl 4 mol L ⁻¹	90	100	[22]
Bebidas diversas: sucos de maçã, laranja, uva; vinho e chá verde.	HCl 1,2 mol L ⁻¹ , MeOH 50 %, 300 mg L ⁻¹ ácido ascórbico	60	100	[56]
Batata roxa (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	HCl 2 mol L ⁻¹	60	100	[53]

* não foi encontrada tradução pertinente para o português.

4.2. Objetivos

O objetivo deste capítulo é apresentar uma metodologia de extração de antocianinas em frutas e legumes, com estudo de estabilidade do extrato, para garantir a confiabilidade do método desenvolvido. Por fim, demonstrar um estudo da reação de hidrólise ácida para a conversão das antocianinas em suas respectivas agliconas.

4.3. Parte Experimental

4.3.1. Materiais e Equipamentos

4.3.1.1. Amostras e Reagentes

Foram avaliados dez alimentos obtidos em mercado local, no período de outubro de 2009 a março 2010: ameixa (*Prunus domestica*), amora (*Morus nigra*), acerola (*Malpighia glabra* L.), beterraba (*Beta vulgaris*), cenoura (*Daucus carota* L.), framboesa (*Rubus idaeus*), "blueberry" - mirtilo (*Vaccinium myrtillum*), morango (*Fragaria vesca*), pimentão roxo (*Capsicum annuum* L.) e uva Brasil (*Vitis vinífera*), para que se escolhesse um, no qual seriam realizados os estudos de extração e hidrólise. Esses alimentos foram classificados como maduros através de uma análise visual e da consistência dos mesmos. Foram armazenadas em freezer, com a finalidade de diminuir as alterações oxidativas, até a utilização para extração.

Como reagentes utilizou-se metanol (grau HPLC, J.T.Backer, Xalostoc, México), água ultrapura (MilliQ[®] - Millipore, modelo Direct-quantum TMEX - Bedford, MA, USA), álcool etílico (P.A., Synth, São Paulo, Brasil), éter de petróleo (Merck, Darmstadt, Alemanha), hexano (grau HPLC, Merck, Darmstadt, Alemanha), acetato de etila (P.A., Synth, São Paulo, Brasil), cloreto de sódio (P.A., CAAL, São Paulo, Brasil), ácido clorídrico (P.A., Synth, São Paulo, Brasil), ácido

acético glacial (P.A., Merck, Darmstadt, Alemanha) e ácido fórmico (P.A., Synth, São Paulo, Brasil).

4.3.1.2. Equipamentos

Foi utilizado um cromatógrafo a líquido Shimadzu (Kyoto, Japão), operando com um sistema de bombeamento de solvente (bomba quaternária LC-10Avp) e válvula injetora manual Rheodyne, com alça de amostragem de 20 μL e forno Waters (Milford, MA, USA) mantido a 30 °C. O sistema está acoplado a um detector com arranjo de diodos Shimadzu (SPD-M10Avp), que operou na faixa de 300 a 600 nm, sistema controlador Shimadzu (SCL-10Avp) e software para aquisição e tratamento de dados, CLASS-VP.

Também foram utilizados no processo de extração: Ultra Turrax[®] (Labortechnik – modelo T25 - Suíça), balança analítica (Mettler Toledo – modelo AB204 – São Paulo - Brasil), ultrassom (Cole-Parmer – modelo 8890 – Illinois – USA), centrífuga (Quimis[®] - Diadema - SP - Brasil), rotaevaporador (Fisaton – modelo 800 – São Paulo - Brasil), banho termostatizado (Fisaton – modelo 550 – São Paulo - Brasil), vortex mixer (Labnet International Inc., New Jersey, USA) e coluna de extração em fase sólida C-18, apresentando área superficial de 466 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$, partículas irregulares de sílica com 54 μm e poros 72 Å (Varian, São Paulo - Brasil).

4.3.2. Procedimentos Experimentais

4.3.2.1. Tratamento das amostras

Amostras sólidas (como frutas e vegetais), cujos constituintes diferem em textura, densidade e tamanho de partículas, devem ser moídas e misturadas [3]. Sendo assim, os alimentos utilizados neste trabalho foram devidamente manipulados de acordo com seus tamanhos.

Os alimentos de tamanho maior (ameixa, beterraba, pimentão vermelho, pimentão roxo e tomate) foram cortados ao meio e retirados cabos e sementes existentes e depois cortados em pequenos pedaços; da acerola, retirou-se a semente; do açaí e da uva, foram separadas as cascas; do morango, retirou-se folhas e cabo. Estes alimentos foram então homogeneizados em Ultra Turrax[®]. A framboesa e a amora foram simplesmente homogeneizadas em Ultra Turrax[®].

4.3.2.2. Extração das Amostras

Foram testados três tipos de extrações (sólido- líquido, líquido-líquido e em fase sólida) nos alimentos citados acima para a escolha da extração mais eficiente e seleção do alimento cujo conteúdo de antocianinas fosse compatível com os padrões disponíveis no laboratório. Escolhido o melhor tipo de extração, foram realizados diversos ensaios variando-se as condições de trabalho como: tipo de solvente, tipo de ácido, concentrações destes e ainda tempo de extração.

Por fim, foram testadas três hidrólises diferentes (no extrato inicial escolhido), baseadas em trabalhos da literatura, para identificação das agliconas presentes nesses alimentos e verificar a eficiência da hidrólise ácida.

4.3.2.2.1. Extração Sólido-Líquido

Baseada de trabalhos de Revilla *et al.* (1998) e Barnes *et al.* (2009), 5,0 g de polpa do alimento foram homogeneizadas com 10,0 mL de uma solução de metanol com ácido clorídrico (99:1, v/v); esta foi colocada em ultrassom por 10 minutos. A mistura foi centrifugada a 3500 rpm por 10-15 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi recolhido e guardado em frasco âmbar. O resíduo foi submetido à nova extração com mais 10,0 mL de solvente extrator, repetindo o procedimento acima por cinco vezes, sendo o extrato final obtido acondicionado em freezer a - 2 °C até uso. Antes de ser injetado, o mesmo foi filtrado em membrana Millipore® 0,45 µm [23,25].

4.3.2.2.2. Extração Líquido-Líquido

10,0 g de amostra foram homogeneizadas em Ultra Turrax® com 50,0 mL de uma solução 50 % (v/v) de metanol e água acidificada (HCl 0,1 %, v/v) por 5 minutos. A amostra foi filtrada e o solvente evaporado em rotaevaporador (35°C). A solução concentrada foi colocada em um funil de separação e nela foram adicionados 50,0 mL de éter de petróleo; o conteúdo do funil foi agitado três vezes. Foi adicionada uma ponta de espátula de cloreto de sódio na solução, para diminuir a solubilidade dos interferentes na fase aquosa, processo chamado "*salting-out*" [57], o funil foi agitado mais duas vezes e deixado em repouso para que a solução se dividisse em três fases (orgânica, interface salina e aquosa). A fase aquosa foi retirada e o procedimento de extração utilizando éter de petróleo e cloreto de sódio foi repetido mais duas vezes. Após a execução das três etapas descritas, toda a fase aquosa obtida foi colocada novamente em um funil de separação e a ela foi adicionado hexano na proporção 1:1 (v/v), com a finalidade de remover as impurezas lipossolúveis [18]; o funil foi agitado, deixado em repouso, e finalmente a fase aquosa foi

retirada e separada. Este procedimento de extração com hexano foi repetido mais duas vezes. A fase aquosa foi concentrada em banho termostatzado (40 °C), filtrada em filtro Millipore® 0,45 µm e injetada no cromatógrafo.

4.3.2.2.3. Extração em Fase Sólida – SPE

O procedimento de extração em fase sólida (para purificação e concentração dos extratos) foi adaptado de trabalho de Longo *et al.* (2006), em que 3,0 mL do extrato obtido na extração sólido-líquido foram adicionados em uma coluna de extração em fase sólida C-18; esta foi previamente ativada com 3,0 mL de metanol, seguido por 3,0 mL de uma solução aquosa de HCl 0,01 % (v/v). As antocianinas presentes nos extratos foram adsorvidas ao cartucho, enquanto que açúcares, ácidos orgânicos e outros compostos solúveis em água foram eluídos com 6,0 mL de HCl 0,01 %; compostos polifenólicos foram eluídos com 3,0 mL de acetato de etila. As antocianinas foram finalmente eluídas com 3,0 mL de metanol acidificado (HCl 0,01 %, v/v). O metanol foi evaporado em rotaevaporador (35 °C) e os pigmentos foram dissolvidos em uma solução aquosa de HCl 0,01 %. O extrato final foi filtrado em filtro Millipore® 0,45 µm e injetado no cromatógrafo [40].

4.3.2.3. Procedimentos de Hidrólise Ácida

Foram testados três tipos de hidrólise ácida:

O primeiro procedimento baseou-se em trabalho de Nayak *et al.* (2010), em que foram adicionados 5,0 mL ácido clorídrico 2 mol L⁻¹ em 2,0 mL do extrato obtido nas extrações sólido-líquido e líquido-líquido; a solução foi colocada em tubo de ensaio e agitada em vortex mixer. Os pigmentos foram hidrolisados por 60 minutos a 100 °C e quando retirados do banho

termostatizado foram imediatamente colocados em banho de gelo. O extrato final foi filtrado em filtro Millipore® 0,45 µm e injetado no HPLC [17].

O segundo ensaio baseou-se em trabalho de Zhang *et al.* (2004), onde os extratos obtidos inicialmente foram misturados, na proporção 1:1 (v/v), com uma solução de MeOH/H₂O/HCl (50/33/17, v/v/v). A solução foi colocada em ultrassom por 20 minutos e hidrolisada em banho termostatizado (100 °C) por 60 minutos. Ao ser retirada do banho, a amostra hidrolisada foi imediatamente resfriada em banho de gelo, para cessar completamente a reação. O extrato final foi filtrado em filtro Millipore® 0,45 µm e injetado no HPLC [26].

O terceiro procedimento foi adaptado de trabalho de Ichiyaagi *et al.* (2001), em que os extratos foram misturados na proporção 1:1 (v/v) com uma solução de ácido clorídrico 1 % (v/v). A mistura foi colocada em banho termostatizado (95 °C) por 60 minutos, e em seguida em banho de gelo. O extrato final foi filtrado em filtro Millipore® 0,45 µm e injetado no HPLC [55].

4.3.2.4. Estudo da Estabilidade do Extrato

Com a finalidade de garantir a confiabilidade do método de extração, foram realizados dois experimentos para avaliação da estabilidade do extrato após o mesmo ter sido otimizado.

O primeiro ensaio foi o monitoramento das alterações do conteúdo de antocianinas quando o extrato é submetido a altas temperaturas; foram testadas 80, 90 e 100 °C, colocando o extrato em banho termostatizado e retirando alíquotas de 20 em 20 minutos, durante quatro horas, e medindo no cromatógrafo.

No segundo ensaio, acondicionou-se o extrato em três locais com temperaturas diferentes (ambiente, geladeira e freezer), todos hermeticamente fechados e ao abrigo da luz. O conteúdo de antocianinas foi determinado por cromatografia a cada 7 dias, durante 41 dias.

4.3.2.5. Análises Cromatográficas

Os extratos obtidos foram injetados em um cromatógrafo a líquido com detector de arranjo de diodos (DAD). Foi utilizada uma coluna cromatográfica C18 Phenomenex (250 x 4,6 mm; 0,40 μm d.i.) (Torrance, Califórnia, USA), com temperatura mantida constante (30 °C). A fase móvel foi composta por: A – água ultrapura com ácido clorídrico 0,1 % (pH 2,1) e B – metanol com ácido clorídrico 0,1 %. A vazão utilizada foi de 1,0 mL min⁻¹ e o volume injetado foi de 20,0 μL . O comprimento de onda utilizado na análise foi 522 nm. A análise das antocianinas presentes nas frutas se deu por separação otimizada (Capítulo 3) através do gradiente linear de eluição: 25 – 55 % B em 30 minutos.

4.3.2.6. Análise dos Resultados

A escolha dos métodos de extração se deu por identificação dos pigmentos presentes nos alimentos propostos, através da comparação do tempo de retenção e espectro UV-Vis da separação dos padrões das antocianinas, e quantificação das áreas destes. Com isso, escolheu-se não apenas o método de extração mais eficiente para ser otimizado, mas também a matriz que seria utilizada nesta otimização. Para tais análises utilizaram-se os programas Origin 5.0 (Microcal Inc.) e Excel (Microsoft Inc.).

Após escolha da matriz e método de extração, tanto de antocianinas quanto antocianidinas, foram realizados diversos ensaios, baseados em sua maioria em tratamento estatístico utilizando os programas Origin 5.0 (Microcal Inc.) e Design-Expert 7.0.0 Trial (Stat-Ease Inc.), para escolha da metodologia mais eficiente de obtenção das substâncias em estudo. Os cálculos foram desenvolvidos também no Excel (Microsoft Inc.).

4.4. Resultados e Discussão

4.4.1. Seleção da Amostra e Método para Extração

Partindo das extrações preliminares, escolheu-se o morango (*Fragaria vesca*) como matriz de estudo da extração, pois foi o alimento que apresentou antocianinas e suas respectivas agliconas disponíveis na forma de padrão analítico. Além disso, o morango é uma fruta bastante consumida e apreciada, bem como acessível à população em geral. É uma das "*berries*" mais populares e é frequentemente consumido na forma fresca ou como produtos processados (geléias, iogurtes, doces, etc.) [52]. É uma importante fonte de fitoquímicos; em particular, compostos fenólicos, que influenciam fortemente na sua qualidade, contribuindo para atributos organolépticos e sensoriais, além do seu alto valor nutricional [46], que vem sendo extensamente relatado na literatura [22,46,58,59].

As amostras de morango foram obtidas em diversos supermercados, sendo consideradas maduras, por sua consistência firme e cor vermelha acentuada; as caixas de morangos utilizadas no estudo não apresentavam mais que três dias de estocagem para venda. Foram misturadas duas ou três caixas para se obter uma amostragem mais significativa.

Através do método de separação desenvolvido (Capítulo 3) foi possível identificar duas antocianinas no morango: a cianidina-3-glicosídeo e a pelargonidina-3-glicosídeo. Uma terceira antocianina também foi obtida no método, e provavelmente é a pelargonidina-3-rutinosídeo, que foi assim identificada por comparação espectral UV-Vis (250 – 600 nm) demonstrada em trabalho de Longo *et al.* (2006), que identificou esta e outras antocianinas em um tipo de "*berry*" [40]. Diversos autores relatam a presença destas três antocianinas no morango [4,18,19,48,52,60,61].

Garcia-Viguera *et al.* (1998) analisaram 4 variedades de morango, identificaram e quantificaram estas três antocianinas [4]. Silva *et al.* (2007), analisaram 25 variedades de morango por LC-MS e, no geral, encontraram 18 derivados de pelargonidina, incluindo a 3-glicosídeo e 3-rutinosídeo, e 6 derivados de cianidina (incluindo 3-glicosídeo) [18], sendo que os maiores conteúdos quantificados de antocianinas são as três que foram identificadas neste trabalho.

Outras antocianinas vêm sendo relatadas na literatura, todas derivadas de pelargonidina e cianidina; entretanto, o conteúdo destas, geralmente, não é quantificado, pois se apresentam em quantidades ínfimas. É bastante comum encontrar na literatura a quantificação do conteúdo total de antocianinas presentes no morango [4,47,48,62], baseado no padrão de pelargonidina-3-glicosídeo, que é a antocianina em maior concentração e que, por isso, caracteriza o morango, conferindo sua atrativa coloração vermelha [63].

Dentre as três extrações estudadas (sólido-líquido, líquido-líquido e em fase sólida), observou-se que, conforme aumentava a complexidade da extração, a quantidade obtida de antocianinas diminuía significativamente, como se afirma na literatura [14]. Na Figura 4.3, estão apresentados os cromatogramas obtidos nas três extrações estudadas, onde pode-se observar que em (A) extração sólido-líquido, três picos são visíveis e o segundo pico, por exemplo, apresenta intensidade de aproximadamente 60 mAU. Em (B) extração em fase sólida aplicada no extrato obtido em (A), também têm-se três picos, mas as intensidades dos mesmos diminuem drasticamente, segundo pico apresenta intensidade de aproximadamente 3 mAU. Com o uso de extração líquido-líquido (C) também houve perda de pigmentos e ainda não foi possível observar três picos extraídos.

Figura 4.3. Cromatogramas obtidos nas extrações testadas: **A)** extração sólido-líquido, **B)** SPE e **C)** extração líquido-líquido. Condições cromatográficas: coluna C18 (250 x 4,6 mm; 0,40 μm d.i.), FM: A – água com HCl 0,1 % (v/v) e B - MeOH com HCl 0,1 % (v/v), gradiente de eluição de 25 – 55 % B em 30 min, volume de injeção 20 μL , vazão da FM 1,0 mL min^{-1} , coluna mantida à 30 $^{\circ}\text{C}$, $\lambda = 522 \text{ nm}$.

Pode-se observar na Figura 4.3 que as diferenças são significativas de uma extração para outra, observado pela intensidade dos picos (em unidade arbitrária), mostrando que o método mais simples, ou seja, a extração sólido-

líquido apresentou o melhor resultado, necessitando apenas serem variados alguns parâmetros para melhoramento da extração.

Na extração líquido-líquido, baseada em método de "*salting-out*", não houve o êxito esperado pela metodologia empregada, pois acredita-se que o método não retirou os interferentes da amostra de forma efetiva e acabou por reduzir o conteúdo das antocianinas, observado pela diminuição significativa de intensidade dos picos (Figura 4.3).

O uso da SPE, neste caso, também não foi satisfatório, pois resultou em perda do total de antocianinas extraídas. Chandra *et al.* (2001), compararam a extração direta com a SPE em antocianinas presentes em cereja e "*elderberry*" e não encontraram diferenças significativas nos conteúdos obtidos, mostrando que um processo de extração simples provê resultados satisfatórios de análise de antocianinas, sem a necessidade de um tratamento de amostra mais elaborado e de custo elevado, como a SPE [14].

O uso do ultrassom em tecnologia de alimentos tem sido um sistema em desenvolvimento evolutivo e é frequentemente utilizado em procedimentos analíticos como: extração, degaseificação, geração de reagentes, limpeza, dissolução etc. [64,65].

A extração assistida por ultrassom (sólido-líquido) é uma técnica que pode facilitar a transferência de massa entre a fase líquida e a superfície sólida da amostra, contribuindo para a aceleração da velocidade de reação [65,66]. O mecanismo de ação é o de cavitação acústica, para causar movimento molecular de solvente e amostra [50]. A cavitação é o crescimento e implosão de microbolhas de gás produzidas no centro de um líquido [64,66]. As microbolhas são produzidas através da absorção de grande quantidade de energia vibracional dentro de pequeno volume, com ou sem aquecimento associado [66].

A cavitação leva à melhor ruptura das células, permitindo melhor penetração da amostra pelo solvente, que continua a quebra da parede celular

[50,65]. Quando combinado à tratamento térmico, conhecido como termossonicação, pode acelerar as reações, além de ser considerado fundamental para a eficiência e reprodutibilidade da reação [64,65].

Chen *et al.* (2007), utilizaram o ultrassom na extração de antocianinas em framboesa; os resultados obtidos sugeriram que o tempo de extração e o poder ultra-sônico possuem efeito significativo no total de antocianinas. Com o uso do ultrassom, conseguiram reduzir significativamente o tempo de extração, comparando o método desenvolvido com os convencionais, obtendo o mesmo conteúdo de antocianinas [50].

O ultrassom oferece uma rede de vantagens em termos de produtividade, rendimento e seletividade [65]. Auxilia na redução significativa de tempo de reação/extração, redução da quantidade de reagentes utilizada, simplificação dos sistemas reacionais com automação da extração em alto nível, utilização de diferentes temperaturas para extração etc., obtendo produtos com altos rendimentos [50,65,66].

4.4.2. Otimização da Extração em Morango

Após escolha do método mais viável para extração, que foi a extração sólido-líquido com uso de ultrassom, descrito no item 4.3.2.2.1, foram realizados ensaios modificando alguns parâmetros. Condições de extração como: temperatura e tempo de incubação, tipo e concentração de solvente são importantes na estabilidade e obtenção de antocianina extraída, de acordo com Bridgersa *et al.* (2010) [29].

Inicialmente, optou-se por variar tipo de solvente e tipo de ácido. Para isso, testou-se além do metanol, etanol como solvente extrator e os ácidos clorídrico, acético e fórmico, já que solventes alcoólicos acidificados são mais eficientes na extração de antocianinas [31]. Seis combinações foram efetuadas, cada solvente com cada ácido. As extrações foram realizadas e os extratos

obtidos foram injetados no cromatógrafo. A resposta deste estudo foi a concentração obtida na extração, ou seja, a soma das quantidades obtidas (em mg/100 g de amostra) de cianidina-3-glicosídeo e pelargonidina-3-glicosídeo. Não foi considerado o conteúdo de pelargonidina-3-rutinosídeo, pois esta substância não estava disponível na forma de padrão.

De acordo com Kahkonen *et al.* (2003), a quantificação de antocianinas individuais baseada em um padrão de referência, como a cianidina-3-glicosídeo (comumente utilizada, provavelmente por ser o padrão de menor custo), é ilusória em razão das diferenças de absorvidade molar das diferentes antocianinas, por suas estruturas flavílio e ainda diferenças dos isômeros em equilíbrio [49]. Zhang *et al.* (2004), também relatam o problema de diferença de absorvidade molar entre as antocianinas, elucidando que a quantificação de cada pigmento presente, utilizando apenas um padrão, influenciará na exatidão dos resultados [26]. Alguns autores quantificam o total de pelargonidina-3-rutinosídeo pelo padrão de pelargonidina-3-glicosídeo, por se tratar da mesma aglicona [18]; entretanto, como o intuito deste trabalho foi a caracterização e a quantificação das antocianinas disponíveis na forma de padrão analítico, optou-se por não quantificar a pelargonidina-3-rutinosídeo no morango.

Na Figura 4.4, está apresentado um gráfico da eficiência de extração por avaliação de tipo de solvente e tipo de ácido, onde a avaliação das diferenças entre as medidas foi realizada através de uma análise de variância simples (one way ANOVA).

Figura 4.4. Eficiência de extração de antocianinas em morango através da variação do tipo de solvente e ácido.

A análise de variância mostrou que os resultados obtidos neste experimento são significativamente diferentes ($p < 0,01$). Pela análise do gráfico demonstrado na Figura 4.4, pode-se observar que o metanol foi o melhor solvente extrator e que, dentre os três ácidos estudados, o ácido clorídrico foi o que estabilizou melhor as antocianinas, garantindo maior extração. Este resultado concorda com alguns trabalhos encontrados na literatura, que afirmam que o metanol possui melhor extractabilidade frente ao etanol [5,23,29,45]. Sendo o metanol um solvente mais polar do que o etanol e as antocianinas apresentando um caráter mais polar, é plausível que o metanol irá solvatar melhor os pigmentos, pois é capaz de fazer ligações de hidrogênio com as hidroxilas ligadas à cadeia carbônica das antocianinas muito mais eficientemente do que o etanol.

Um problema identificado no resultado cromatográfico dos extratos obtidos com etanol foi uma mudança no tempo de retenção das antocianinas, bem como alargamento dos picos. Isso se dá em função da diferença de interação do etanol com a FM utilizada. Para corrigir tal problema, decidiu-se evaporar o etanol após a extração e ressuspender os pigmentos na própria FM.

Dois métodos de evaporação de solvente foram utilizados: uso de rotaevaporador e aplicação de gás nitrogênio.

A literatura afirma que o metanol é mais efetivo na extração de antocianinas; entretanto, este é utilizado com cautela nos alimentos, devido sua alta toxicidade [6,29]. Já o etanol é mais adequado para aplicação em análise de alimentos, mas é mais difícil de ser eliminado, principalmente em processos de purificação [6].

Nenhum dos dois métodos de evaporação foi bem sucedido. O uso de rotaevaporador causou perda significativa no conteúdo de antocianinas extraídas, mesmo não se usando uma temperatura relativamente alta para evaporação de solvente (40 - 45 °C), fazendo com que não fosse possível a obtenção de boa quantidade de pigmentos na extração, provavelmente porque ocorreu degradação dos mesmos. Já o uso de nitrogênio foi descartado logo no início, pois a evaporação do solvente mostrou-se extremamente demorada, comprovando que este método de evaporação não é viável em termos de tempo de procedimento experimental e ainda pelo gasto excessivo de gás nitrogênio, tornando-se um método de custo elevado.

Sendo assim, continuou-se com metanol e ácido clorídrico na extração e partiu-se para a escolha da melhor porcentagem de ácido e tempo de ultrassom utilizado para a maior extração das antocianinas. Foram estudadas três razões MeOH/HCl (v/v): 99/1, 95/5 e 90/10 e ainda três tempos de permanência da solução extratora com o morango no ultrassom: 10, 20 e 30 min, todos à temperatura ambiente. Cada razão MeOH/HCl e tempo de ultrassom foram testados e o resultado obtido está ilustrado na forma de gráfico na Figura 4.5.

Figura 4.5. Eficiência de extração de antocianinas em morango através da variação da porcentagem de ácido clorídrico e tempo de ultrassom.

A análise de variância simples (one way ANOVA) aplicada não demonstrou diferenças significativas nas extrações desenvolvidas. Avaliando-se a Figura 4.5, pode-se observar que não há um padrão de extração com relação ao tempo para as três razões solvente/ácido (v/v), onde se esperaria que maior tempo de extração resultasse em maior quantidade extraída, já que a temperatura manteve-se constante. Entretanto, o ultrassom quando utilizado continuamente e por tempo prolongado acarreta em aumento de temperatura durante o uso [65]. A temperatura pode afetar a extração de um dado composto por modificação no coeficiente de difusão ou na solubilidade do solvente no meio extrator. Aumentando-se a temperatura pode ocorrer um aumento no coeficiente de difusão e, deste modo, a razão de difusão conduz à redução no tempo de extração [2]. Sendo assim, as antocianinas presentes no morango, quando submetidas à temperatura cada vez maior e por um tempo prolongado (no caso 30 minutos), podem ter sido degradadas durante a extração, o que explica os resultados obtidos, em que no maior tempo de extração a quantidade de antocianinas obtidas foi menor. Para 10 e 20 minutos

de extração, não houve um padrão de variação da concentração de antocianinas com a quantidade de solvente/ácido utilizada.

Como este experimento não demonstrou nenhum resultado quanto à melhoria da extração, partiu-se para uma avaliação mais criteriosa, utilizando planejamentos e análises estatísticas mais elaboradas. Para isso, utilizou-se o software Design-Expert 7.0.0 Trial, para delineamento de um experimento de análise por superfície de resposta, com design de composição central, através de um planejamento fatorial 2^2 e cinco repetições do ponto central.

Na Tabela 4.3 está demonstrado o delineamento do experimento, bem como a ordem de realização de cada ensaio e as concentrações obtidas. Na Figura 4.6, estão apresentados os resultados na forma de gráfico 3D do experimento desenvolvido.

Tabela 4.3. Planejamento e concentrações obtidas no estudo da eficiência de extração de antocianinas em morango.

Ensaio	% HCl	Tempo (min)	% HCl	Tempo	Concentração (mg/100g)
6	10	20	+	0	14,3
9	10	30	+	+	13,5
5	5,5	20	0	0	13,7
13	5,5	20	0	0	15,2
4	1	20	-	0	13,5
12	5,5	20	0	0	15,2
10	5,5	20	0	0	14,7
1	1	10	-	-	16,5
2	5,5	10	0	-	14,8
8	5,5	30	0	+	14,9
3	10	10	+	-	13,7
7	1	30	-	+	15,2
11	5,5	20	0	0	14,5

Como resultado, o software sugeriu o modelo estatístico linear de resposta significativa deste experimento. A superfície de resposta está demonstrada na forma de gráfico 3D na Figura 4.6.

Figura 4.6. Superfície de resposta de modelo linear sugerido pelo Design-Expert para análise da melhor condição de extração.

Mais uma vez não houve um resultado significativo, ou seja, que se destacasse estatisticamente, para ser escolhido como o mais indicado para obtenção do maior conteúdo de antocianinas na extração. Pela superfície 3D demonstrada na Figura 4.6, observa-se que o modelo estatístico de análise não apresenta uma tendência de melhor condição experimental para maior conteúdo de antocianinas. Este resultado foi confirmado pela análise de variância (ANOVA) realizada, que não mostrou significância dos resultados com a resposta (concentração – mg/100g de amostra).

Por não se conseguir obter um resultado satisfatório de extração, optou-se por outro delineamento do experimento, também utilizando o software Design-Expert 7.0.0 Trial; como o objetivo era verificar a influência não apenas da porcentagem de ácido e do tempo de extração, mas também da

temperatura, foram planejados três experimentos através de um fatorial 2^2 também com design de composição central; em que uma das variáveis foi mantida constante, a nível zero, e as outras duas variadas em ± 1 (Tabela 4.4) para análise do resultado por metodologia de superfície de resposta, ferramenta estatística muito utilizada para otimização de processos complexos [67].

Com o intuito de diminuir o número de experimentos e ainda assim não perder informações, utilizou-se 5 repetições do ponto central, reduzindo o número de experimentos para 13 (em cada planejamento). Como variável de resposta, avaliou-se a concentração total obtida na extração (quantidade de cianidina-3-glicosídeo + pelargonidina-3-glicosídeo em mg/100 g de amostra).

Tabela 4.4. Variáveis independentes e valores dos três níveis utilizados para otimização da extração.

Variáveis Independentes	Unidades	Símbolo	Níveis		
			+1	0	-1
HCl	%	X_1	1	5,5	10
Tempo	min	X_2	10	20	30
Temperatura	°C	X_3	20	30	40

Os delineamentos dos três experimentos, mais as concentrações obtidas em cada ensaio estão apresentados nas Tabelas 4.5 – 4.7.

Tabela 4.5. Design experimental: planejamento 1 para análise por MSR e concentrações obtidas no estudo da eficiência de extração de antocianinas em morango, mantendo-se constante a % de ácido da solução extratora (5,5 %) e variando-se o tempo e a temperatura de extração.

Ensaio	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Tempo	Temperatura	Concentração (mg/100g)
12	20	30	0	0	9,23
13	20	30	0	0	10,1
9	20	30	0	0	9,33
10	20	30	0	0	10,4
5	10	30	-	0	9,68
11	20	30	0	0	9,81
7	20	20	0	-	10,9
1	10	20	-	-	11,7
4	30	40	+	+	10,6
6	30	30	+	0	9,07
8	20	40	0	+	10,4
2	30	20	+	-	11,7
3	10	40	-	+	9,32

Tabela 4.6. Design experimental: planejamento 2 para análise por MSR e concentrações obtidas no estudo da eficiência de extração de antocianinas em morango, mantendo-se constante a temperatura do banho (30 °C) de ultrassom e variando-se o tempo de extração e a % de ácido da solução extratora.

Ensaio	% HCl	Tempo (min)	% HCl	Tempo	Concentração (mg/100g)
3	1	30	-	+	9,47
2	10	10	+	-	9,68
4	10	30	+	+	9,79
1	1	10	-	-	8,80
7	5,5	10	0	-	10,8
10	5,5	20	0	0	9,76
9	5,5	20	0	0	9,30
11	5,5	20	0	0	10,7
6	10	20	+	0	9,96
8	5,5	30	0	+	7,59
13	5,5	20	0	0	8,56
12	5,5	20	0	0	9,02
5	1	20	-	0	9,51

Tabela 4.7. Design experimental: planejamento 3 para análise por MSR e concentrações obtidas no estudo da eficiência de extração de antocianinas em morango, mantendo-se constante tempo de extração (20 minutos) e variando-se a temperatura do banho de ultrassom e a % de ácido da solução extratora.

Ensaio	% HCl	Temperatura (°C)	% HCl	Temperatura	Concentração (mg/100g)
2	10	20	+	-	11,3
1	1	20	-	-	9,32
10	5,5	30	0	0	8,50
9	5,5	30	0	0	9,61
13	5,5	30	0	0	10,8
11	5,5	30	0	0	9,60
3	1	40	-	+	10,6
8	5,5	40	0	+	7,56
12	5,5	30	0	0	9,81
6	10	30	+	0	6,92
5	1	30	-	0	8,95
7	5,5	20	0	-	7,02
4	10	40	+	+	7,46

Utilizando a ferramenta estatística de planejamento experimental e análise de superfície de resposta, é possível investigar a influência de determinadas variáveis em um processo e a forma de interação entre elas, bem como obter o valor das variáveis que maximizem os resultados esperados [67].

Com os resultados experimentais obtidos (demonstrados nas Tabelas 4.5 – 4.7), é possível ajustar os dados para obter um modelo que relacione a concentração de antocianinas obtidas na extração aos parâmetros estudados. Para tais ajustes, o software recomendou o modelo quadrático para os três planejamentos. Para checar a adequação deste modelo foi aplicada uma análise de variância (ANOVA).

A superfície de resposta é a descrição gráfica do modelo, o que simplifica a interpretação dos resultados. Na Figura 4.7, estão representadas as três superfícies de resposta, para modelo quadrático, obtida para os três planejamentos.

Figura 4.7. Superfícies de resposta para modelo quadrático do: **A)** planejamento 1; **B)** planejamento 2 e **C)** planejamento 3.

O resultado da ANOVA, aplicado aos três planejamentos, indicou que apenas o primeiro (% HCl constante – 5,5 % e variação de tempo e temperatura de extração) apresentou significância estatística, em que: $p = 0,0375$ ($p < 0,05$, representa uma medida de significância global da equação de regressão múltipla) e $F = 4,49$ ($F > 1$, representa que a regressão é estatisticamente significativa, havendo relação entre as variáveis dependentes e independentes) [67].

A superfície de resposta serviu para verificar qual efeito (no caso, temperatura ou tempo de extração) mostrou-se mais significativo na extração. Pelo gráfico 3D (Figura 4.8) e resultados estatísticos da ANOVA, observa-se que a temperatura é o fator que mais afeta a extração ($p = 0,0222$). Já o tempo não mostrou influência tão significativa (estatisticamente falando), especialmente quando se usa altas temperaturas, pois ao invés de extrair as antocianinas, acaba degradando-as. Esses resultados estão em concordância com trabalho de Fan *et al.* (2008), onde os autores utilizam a MSR para avaliar a extração de antocianinas na batata doce e obtiveram a mesma significância estatística da temperatura com relação ao tempo de extração [68].

Figura 4.8. Resultado da superfície de resposta que indica a melhor condição para extração máxima de antocianinas em morango.

Além do solvente, que é crucial no processo de extração das antocianinas, temperatura e tempo também são muito importantes. Temperaturas altas aceleram o processo de extração por aumentar a solubilidade e difusão dos compostos para o solvente, mas altas temperaturas podem levar a degradação das antocianinas [45]. Os resultados obtidos pela análise estatística do Planejamento 1 concordam com esta afirmação, pois o melhor resultado foi obtido quando se utilizou a menor temperatura de extração. O uso de ultrassom se mostrou eficiente, por facilitar o acesso do solvente às células onde as antocianinas se encontram, fazendo com que não houvesse necessidade do uso de altas temperaturas.

O que se pode imaginar também é que o tempo de ultrassom seria indiferente para a concentração obtida, uma vez que a fruta é processada na forma de polpa (em Ultra Turrax[®]) e qualquer célula ou tecido, nos quais a antocianina poderia estar agregada, já foi rompido, facilitando sua extração e, conseqüentemente, diminuindo o tempo requerido para a quebra dessas células ou tecidos, sendo o ultrassom necessário apenas para facilitar o acesso do solvente ao material sólido, neste caso.

Na superfície de resposta (Figura 4.8), encontra-se o resultado, na forma de gráfico 3D, obtido para o Planejamento 1; deslocando-se para a máxima inclinação do modelo ajustado, que é a trajetória na qual a resposta varia de forma mais pronunciada, o resultado indica a melhor condição para máxima extração (destacado com a flecha vermelha).

Sendo assim, a melhor condição foi: uso de ultrassom durante 10 minutos, mantido à temperatura constante de 20 °C, repetição de extração 5 vezes, utilizando como solvente extrator metanol com 5,5 % de HCl (37 %) (v/v), sendo a razão massa de morango/solvente extrator (1/10, m/v).

O modelo de regressão quadrática estatisticamente predito está demonstrado na Equação 4.1.

$$Y = +23.25965 - 0.042559 X_2 - 0.81644 X_3 + 3.13715 \cdot 10^{-3} X_{23} - 1.01432 \cdot 10^3 X_2^2 + 0.011437 X_3^2 \quad (R^2 = 0,762) \quad \text{Equação 4.1.}$$

Onde Y é a concentração de antocianinas (somatório da quantidade, em mg/100 g de amostra, de cianidina-3-glicosídeo e pelargonidina-3-glicosídeo) obtida da extração, as variáveis codificadas como X_2 e X_3 são temperatura e tempo, respectivamente e estão especificadas na Tabela 4.4; termos de X_n elevados a 1 correspondem os termos lineares da equação, enquanto que termos de X_n elevados a 2 correspondem os termos quadráticos, X_{ji} representa o coeficiente de interação das variáveis independentes.

Na Figura 4.9, encontra-se ilustrado um cromatograma, obtido sob as condições de separação otimizadas no Capítulo 3, do extrato de morango.

Figura 4.9. Cromatograma do extrato otimizado de morango: 5,5 % HCl em MeOH (1:10 m/v, massa de morango:solvente extrator), 10 minutos de ultrassom à 20°C, 5 repetições de procedimento de extração. Condições cromatográficas: coluna C18 (250 x 4,6 mm; 0,40 μ m d.i.), FM: A – água com HCl 0,1 % (v/v) e B - MeOH com HCl 0,1 % (v/v), gradiente de eluição de 25 – 55 % B em 30 min, volume de injeção 20 μ L, vazão da FM 1,0 mL min⁻¹, coluna mantida à 30 °C, λ = 522 nm. Antocianinas identificadas: **1**) cianidina-3-glicosídeo, **2**) pelargonidina-3-glicosídeo e **3**) perlargonidina-3-rutinosídeo.

Após a otimização da extração, foi possível quantificar diversas amostras de morango para obter o conteúdo de cianidina-3-glicosídeo e pelargonidina-3-glicosídeo presentes nesta fruta. Como já foi destacado anteriormente, o conteúdo de pelargonidina-3-rutinosídeo não será determinado neste trabalho, pois não se tem disponível este pigmento na forma de padrão analítico. Os resultados obtidos na quantificação encontram-se na Tabela 4.8, onde estão representadas as médias $\pm$ desvio-padrão de 10 extratos de morango, com a finalidade de se obter um valor o mais significativo possível em termos de amostragem.

Tabela 4.8. Quantificação das antocianinas presentes no morango.

Antocianina	Quantidade ($\mu\text{g/g}$ de morango)
<i>Cianidina-3-glicosídeo</i>	5,18 $\pm$ 0,61
<i>Pelargonidina-3-glicosídeo</i>	63,4 $\pm$ 8,16

Os resultados apresentados na Tabela 4.8 estão em $\mu\text{g/g}$ de morango a fim de facilitar a comparação dos resultados obtidos com o apresentado por outros autores.

García-Viguera *et al.* (1999), encontraram valores de 6,01 e 6,69 μg de cianidina-3-glicosídeo/g de geléia de morango e 112,39 e 174,65 μg de pelargonidina-3-glicosídeo/g de geléia de morango [48]. Em trabalho anterior, García-Viguera *et al.* (1998), haviam encontrado 62,92 e 638,26 $\mu\text{g/g}$ de fruta congelada e 69,35 e 703,41 $\mu\text{g/g}$ de fruta fresca para cianidina-3-glicosídeo e pelargonidina-3-glicosídeo, respectivamente para ambas as faixas, afirmando que o conteúdo de antocianinas em fruta fresca ou congelada não varia significativamente se armazenada apropriadamente [4].

No mesmo trabalho, García-Viguera *et al.* (1998), analisaram o conteúdo de cianidina-3-glicosídeo e pelargonidina-3-glicosídeo em diferentes genótipos de morango congelado e encontraram valores de 9,60 – 66,38 µg/g de morango para a primeira antocianina e 153,91 – 652,00 µg/g de morango para a segunda antocianina [4]. Tulipani *et al.* (2008) analisaram diversos genótipos de morango e encontraram de 1,06 a 11,15 e 95,80 a 282,34 µg/g de morango de cianidina-3-glicosídeo e pelargonidina-3-glicosídeo, respectivamente [46], mostrando diferenças pronunciadas entre genótipos diferentes.

Silva *et al.* (2007), também analisando genótipos diferentes, chegaram a valores de 10 – 41 µg de cianidina-3-glicosídeo/g de morango e 162 – 468 µg de pelargonidina-3-glicosídeo/g de morango [18]. Comandini *et al.* (2008), através de uma comparação entre análises por CZE e HPLC, obtiveram pelo método cromatográfico quantidades em média de 11,37 µg de pelargonidina-3-glicosídeo/g de morango [19], conteúdo bem abaixo do que a maioria dos autores e este trabalho encontraram para este pigmento.

As quantidades aqui obtidas para cianidina-3-glicosídeo estão em concordância com alguns trabalhos; entretanto, as quantidades obtidas de pelargonidina-3-glicosídeo encontram-se bem abaixo do que a maioria dos autores relatam.

Resultados discrepantes entre autores são muito comuns nestas análises, já que as quantidades de antocianinas presentes na amostra são influenciadas pelos métodos de extração (tipo de solvente), que pode ser determinante [18], além dos fatores genéticos (variedades de morango) e ambientais (condições climáticas, tipo de solo) que afetam a produção e o acúmulo dos pigmentos [46,69].

4.4.3. Estabilidade do Extrato Otimizado

Alimentos que contêm antocianinas e altas concentrações de ácido ascórbico (como é o caso do morango) [37,46,58] não apresentam antocianidinas quando extraídas de forma direta, ou seja, sem processo de hidrólise [37]; os resultados aqui obtidos estão em concordância com a literatura, pois nenhuma aglicona foi identificada após a extração aqui desenvolvida (Figura 4.9). Entretanto, a literatura também afirma que elevadas concentrações de ácido durante a extração ou pré-concentração, com uso de elevadas temperaturas, pode levar à hidrólise das antocianinas [4,5,37].

Em razão de esta extração utilizar elevadas quantidades de ácido clorídrico (5,5 % em metanol – v/v, que corresponde a $0,67 \text{ mol L}^{-1}$), um estudo da estabilidade do extrato otimizado, avaliando-se os parâmetros da cinética da reação, foi desenvolvido com a finalidade de se comprovar que a extração é adequada e não acarretará na hidrólise ou mesmo degradação das antocianinas, que podem ser transformadas em outros compostos, como por exemplo a chalcona.

O desenvolvimento deste estudo está descrito na seção 4.3.2.4. A avaliação foi realizada calculando-se os parâmetros cinéticos de degradação da pelargonidina-3-glicosídeo, através do gráfico do logaritmo da concentração de pelargonidina-3-glicosídeo *versus* tempo, nas três temperaturas estudadas (Figura 4.10). Os resultados foram expressos em termos desta antocianina porque ela está presente em maior concentração no morango, assim como Seeram *et al.* (2006), Jin *et al.* (2011) e Hannum (2004) [52,62,70] também relatam. E por isso, a quantificação e a análise de sua degradação (pequenas ou grandes variações de concentração), quando submetida à temperatura elevada ou com o passar do tempo de estocagem, é facilitada, sendo o risco de uma quantificação errônea diminuído.

Figura 4.10. Efeito da temperatura no extrato de morango.

A relação linear entre o log [pelarg-3-glic] x tempo indica que a degradação térmica segue uma cinética de primeira ordem. Diversos estudos já evidenciaram esta cinética de degradação [20,45,71], como Kirca *et al.* demonstraram em 2003 no suco de laranja concentrado e em 2007 no suco de cenoura [72,73], Garzon & Wrolsdtdad (2002), em suco de morango [74], Morais *et al.* (2002), em uva [39] e Wang & Xu (2007), em suco de "blackberry" [75]. Patras *et al.* (2010), afirmam que a magnitude e duração do aquecimento possuem uma forte influência na estabilidade das antocianinas [61].

Os resultados dos parâmetros cinéticos para avaliação da degradação da pelargonidina-3-glicosídeo em termos de temperatura aplicada ao extrato são apresentados na Tabela 4.9; a constante de velocidade é obtida através do coeficiente angular da reta, para cada temperatura, e o tempo de meia-vida pode ser calculado utilizando a Equação 4.2.

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad \text{Equação 4.2.}$$

É conhecida a relação logarítmica entre a degradação das antocianinas e o aumento aritmético da temperatura, que foi também observado neste estudo; plotando-se um gráfico do inverso da temperatura *versus* o ln da constante de equilíbrio (Figura 4.11) é possível obter a energia de ativação, também apresentada na Tabela 4.9.

Figura 4.11. Gráfico do inverso da temperatura versus ln da constante de equilíbrio, dados plotados e energia de ativação obtida da equação da reta estão apresentados na Tabela 4.9.

Tabela 4.9. Parâmetros cinéticos de degradação da pelargonidina-3-glicosídeo presente em extrato de morango quando submetido à diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	k (10 ⁻³ min ⁻¹)	t _{1/2} (min)	R ²	Ea (KJ mol ⁻¹)	R ²
80	1,11	624,32	0,99	596,54	0,97
90	2,02	343,07	0,99		
100	5,03	137,77	0,98		

Sendo, k – constante de velocidade; t_{1/2} – tempo de meia-vida e Ea – energia de ativação.

Analisando os parâmetros cinéticos (Tabela 4.9) e o gráfico da Figura 4.10, conclui-se que com o aumento da temperatura [76,77], há um aumento na degradação da pelargonidina-3-glicosídeo, observado pela diminuição de sua concentração e pelos valores das constantes de velocidade, que variaram de (1,11 - 5,03) 10⁻³ min⁻¹, implicando que o aumento da temperatura está

intimamente relacionado ao aumento da velocidade de degradação do pigmento.

A energia de ativação é calculada para demonstrar a dependência de degradação das antocianinas com a temperatura [72]. O resultado obtido ($596,54 \text{ KJ mol}^{-1}$) é bastante alto em comparação com outros trabalhos [72,73], demonstrando que a degradação deste pigmento é muito sensível ao aumento da temperatura. Kirca *et al.* (2003), encontraram valores de E_a de 73,6; 84,5 e 89,5 em laranjas, considerando aquecimentos a 70, 80 e 90 °C [73]. Já em trabalho realizado em 2007, analisando a estabilidade térmica de extratos de “black carrot” nas mesmas temperaturas (70, 80 e 90 °C), estes mesmos autores encontraram valores de energia de ativação na faixa de $42,0 - 78,1 \text{ KJ mol}^{-1}$ [72].

Avaliando a influência da temperatura no conteúdo total de antocianinas em mirtilo, Wang *et al.* (2010) encontraram que, ao serem submetidas a temperaturas acima de 80 °C por 2 horas, as antocianinas degradam significativamente. Entretanto, quando submetidas a temperaturas inferiores a 60 °C a taxa de degradação dos pigmentos não é tão significativa [20]. Os resultados obtidos neste trabalho estão em concordância com os apresentados aqui, pois a pelargonidina-3-glicosídeo só degradou de forma acentuada quando seu extrato foi submetido a altas temperaturas, evidenciando que mesmo utilizando uma concentração de ácido relativamente alta para extrair as antocianinas, o extrato é bastante estável, já que em análises químicas, os extratos não são submetidos a temperaturas extremas, a não ser quando se deseja conduzir uma reação de hidrólise.

O mecanismo de degradação cinética das antocianinas não é bem estabelecido; entretanto, acredita-se que envolva hidrólise, formação de agliconas, oxidação e até mesmo co-pigmentação [45,61]. Patras *et al.* (2010) propuseram um possível mecanismo de degradação térmica para a pelargonidina-3-glicosídeo (demonstrado na Figura 4.12) e para a cianidina-3-glicosídeo [61].

Figura 4.12. Mecanismo de degradação térmica da pelargonidina-3-glicosídeo proposto em trabalho de Patras et al. (2010).

Analisando as condições de estocagem, por diferentes temperaturas de armazenamento do extrato, a cinética de degradação da pelargonidina-3-glicosídeo segue, como esperado, cinética de primeira ordem. Na Figura 4.13, está demonstrado o gráfico do logaritmo da concentração de pelargonidina-3-glicosídeo versus o tempo de estocagem para os três ambientes analisados.

Figura 4.13. Efeito das condições de estocagem (diferentes ambientes com diferentes temperaturas) no extrato de morango.

Os parâmetros cinéticos obtidos na avaliação da degradação da pelargonidina-3-glicosídeo com o tempo de estocagem são apresentados na Tabela 4.10. A constante de velocidade foi obtida a partir do coeficiente angular das retas obtidas na Figura 4.13, o tempo de meia-vida foi calculado pela Equação 4.2.

Tabela 4.10. Parâmetros cinéticos de degradação da pelargonidina-3-glicosídeo presente em extrato de morango quando estocados em diferentes temperaturas.

Local	Temperatura de Armazenamento (°C)	k (dias ⁻¹)	t _{1/2} (dias)	R ²
Ambiente	25	8,60.10 ⁻³	80	0,98
Geladeira	4	2,10.10 ⁻³	330	0,99
Freezer	- 2	0,90.10 ⁻³	770	0,99

Sendo, k – constante de velocidade; t_{1/2} – tempo de meia-vida

Dai *et al.* (2009) demonstraram em um estudo com amoras o decaimento do conteúdo de cianidina-3-glicosídeo (em maior concentração nessa fruta) quando o extrato foi submetido a inúmeras condições de estocagem; os autores constataram a maior taxa de degradação do pigmento quando o extrato foi armazenado sob temperatura ambiente [45].

Patras *et al.* (2010), afirmam que a degradação de antocianinas com a estocagem pode ser explicada pela possibilidade que estes pigmentos têm de sofrer polimerização, que faz com que ocorram perdas das antocianinas monoméricas, que pode ocorrer em razão de fatores como atividade enzimática residual ou condensação com outros compostos fenólicos [61].

Os resultados obtidos neste estudo também concordam com a literatura, em que se observa que quando um extrato é estocado em altas temperaturas, no caso a maior seria a temperatura ambiente, a taxa de degradação da pelargonidina-3-glicosídeo é acelerada. Pelos resultados aqui demonstrados pode-se concluir que o extrato de morango (obtido com 5,5 % HCl) é bastante estável, principalmente quando estocado em freezer.

Este estudo foi desenvolvido para demonstrar a confiabilidade do solvente extrator proposto, para que não seja contestada a quantidade de ácido utilizado para a obtenção das antocianinas no morango. Obviamente pesquisas utilizando extrato de antocianinas não submeteriam estes a elevadas temperaturas durante tempo considerável, a não ser quando se pretende realizar um estudo de hidrólise ou estabilidade. E provavelmente, quando um extrato for armazenado para análise posterior, ele será guardado sob condições de baixas temperaturas; fica aqui comprovado que, estocando-se em freezer (-2 °C), é possível manter este extrato rico em antocianinas por mais de 30 dias.

4.4.4. Otimização da Hidrólise

Em razão do elevado custo dos padrões de antocianinas, é bastante comum quantificar seu conteúdo pela aglicona correspondente. Para isso, faz-se uma hidrólise ácida no extrato e obtêm-se a antocianidina [14,63].

Com o objetivo de estudar a hidrólise das antocianinas, presentes no morango, foram realizados experimentos baseados na metodologia descrita no item 4.3.2.3, em que os extratos otimizados (item 4.4.2) reagiram, na razão 1:1 (v/v), com quatro soluções de ácido clorídrico 37 % (1, 2, 3 e 4 mol L⁻¹), em banho termostatzado à 100 °C. Para monitoramento da velocidade de reação, foram retiradas alíquotas da mistura reacional de 1 em 1 minuto até cinco minutos, depois de 10 em 10 minutos até 100 minutos, colocadas em banho de gelo e medidas no cromatógrafo a líquido, de acordo com o método desenvolvido no Capítulo 3.

Essa metodologia foi utilizada para acompanhar o processo de formação da aglicona, utilizar os resultados em cálculos da velocidade de reação e entender o mecanismo da hidrólise das antocianinas e, assim, otimizar a hidrólise desses pigmentos no morango. Os cromatogramas obtidos em cada medida, para as diferentes concentrações de ácido, podem ser observados nas Figuras 4.14 a 4.17, onde os picos que aparecem (no decorrer do tempo de reação) no final do cromatograma são a cianidina e pelargonidina (agliconas), respectivamente.

Figura 4.14. Cromatogramas de monitoramento da hidrólise das antocianinas presentes no morango, utilizando $\text{HCl } 1 \text{ mol L}^{-1}$ para reação. Condições cromatográficas descritas na seção 4.3.2.4.

Continuação da Figura 4.14.

Continuação da Figura 4.14.

Figura 4.15. Cromatogramas de monitoramento da hidrólise das antocianinas presentes no morango, utilizando $\text{HCl } 2 \text{ mol L}^{-1}$ para reação. Condições cromatográficas descritas na seção 4.3.2.4.

Continuação da Figura 4.15.

Continuação da Figura 4.15.

Figura 4.16. Cromatogramas de monitoramento da hidrólise das antocianinas presentes no morango, utilizando HCl 3 mol L⁻¹ para reação. Condições cromatográficas descritas na seção 4.3.2.4.

Continuação da Figura 4.16.

Continuação da Figura 4.16.

Figura 4.17. Cromatogramas de monitoramento da hidrólise das antocianinas presentes no morango, utilizando HCl 4 mol L⁻¹ para reação. Condições cromatográficas descritas na seção 4.3.2.4.

Continuação da Figura 4.17.

Continuação da Figura 4.17.

A ligação glicosídica (C-O-C) das antocianinas, marcada em vermelho na estrutura genérica da Figura 4.18, faz com que estas substâncias se comportem como acetais durante sua hidrólise, que ocorrerá se o pigmento reagir com altas concentrações de ácidos inorgânicos (sendo os mais comuns HCl e H₂SO₄) por um longo tempo e submetidos a altas temperaturas (acima de 90 e 95 °C) [17,37].

Figura 4.18. Ligação glicosídica presente nas antocianinas.

O mecanismo da hidrólise de acetais prevê que a protonação ocorre antes da etapa lenta, que é o ataque nucleofílico da água. Os acetais são facilmente hidrolisados porque formam carbocátion estabilizado por ressonância. O mecanismo da hidrólise de acetais é oposto ao da formação destes (Figura 4.19) [78-80].

Figura 4.19. Mecanismo de formação de acetais.

É bem conhecido que a razão de hidrólise de acetais é dependente do pH e ocorre via protonação do oxigênio por uma quebra da ligação C-O [81]. A hidrólise de acetais é catalisada especificamente por um íon hidrogênio [82]. Geralmente, a velocidade da reação é de primeira ordem, mas o que governa sua ocorrência é a presença de doadores de elétrons ou substituintes no anel fenil [81], como no caso das antocianinas.

Na estrutura das antocianinas, o ataque do ácido ao oxigênio do acetal é o mais favorável, pois como pode ser observado na Figura 4.20 para a pelargonidina-3-glicosídeo, pode-se inferir que em solução aquosa as antocianinas apresentam equilíbrios de desprotonação, favorecido pela possibilidade de estabilização da molécula por ressonância com os elétrons das duplas conjugadas com o oxigênio do anel heterocíclico.

Figura 4.20. Equilíbrios de desprotonação da pelargonidina-3-glicosídeo.

Os resultados obtidos nos cálculos da cinética da reação de hidrólise concordam com os equilíbrios das antocianinas: em função dos oxigênios das hidroxilas retirarem elétrons do anel para se estabilizarem (Figura 4.20), seus pares de elétrons não estão tão disponíveis quanto o par de elétrons do oxigênio da ligação glicosídica, e por isso o H^+ , proveniente do ácido clorídrico,

é atacado pelos pares de elétrons do oxigênio da ligação glicosídica, já que estes não entram em ressonância com a cadeia carbônica da antocianina, pois o substituinte OGlicose encontra-se em posição meta com relação ao oxigênio do anel heterocíclico, facilitando o ataque nucleofílico da água, efetuando-se a hidrólise [79,80].

A reação de protonação das antocianinas pode ser esquematizada como:

Onde, (A) representa a antocianina. A velocidade dessa reação pode ser escrita como:

$$V = k' [H^+][A] \quad \textbf{Equação 4.3.}$$

Em que, $k'[H^+] = k_{obs}$, ou seja:

$$V = k_{obs} [A] \quad \textbf{Equação 4.4.}$$

O k_{obs} da Equação 4.4 pôde ser obtido experimentalmente através da inclinação da reta dos gráficos de logaritmo da concentração de aglicona formada (considerada até o ponto de concentração de estabilização do produto final), quando se utilizou concentrações de ácido clorídrico acima de 2 mol L^{-1} , *versus* o tempo de reação. Os perfis dos resultados apresentaram concordância com a teoria, demonstrando que a reação de hidrólise das antocianinas, demonstrada na Figura 4.21, segue cinética de primeira ordem.

Figura 4.21. Hidrólise das antocianinas.

Com os valores de k_{obs} obtidos para as três maiores concentrações estudadas na reação, foi possível plotar um gráfico (Figura 4.22) de $\log k_{obs}$ versus $[HCl]$.

Figura 4.22. Gráfico de $\log k_{obs}$ versus concentração de HCl em mol L⁻¹.

A partir da equação da reta obtida do gráfico, demonstrado na Figura 4.22, e da Equação 4.2 (de tempo de meia-vida), é possível prever o tempo requerido para que ocorra a hidrólise, pré-determinando a concentração de ácido.

O resultado obtido demonstrou que utilizando HCl 8 mol L⁻¹ na razão 1:1 (extrato/ácido, v/v), deixando a mistura reacional à 100 °C em banho termostatzado, seria possível obter a hidrólise total das antocianinas (Figura 4.23) em aproximadamente 60 minutos.

Figura 4.23. Cromatograma do extrato de morango hidrolisado. Condições de hidrólise: extrato:HCl 8 mol L⁻¹ (1:1, v/v), 45 minutos à 100 °C. Condições cromatográficas: coluna C18 (250 x 4,6 mm; 0,40 µm d.i.), FM: A – água com HCl 0,1 % (v/v) e B - MeOH com HCl 0,1 % (v/v), gradiente de eluição de 25 – 55 % B em 30 min, volume de injeção 20 µL, vazão da FM 1,0 mL min⁻¹, coluna mantida à 30 °C, λ = 522 nm. **(1)** Cianidina e **(2)** Pelargonidina.

Para mudanças no método da hidrólise, poderia ser diminuído o tempo de reação, aumentando-se a concentração de ácido. Elevar a temperatura não é recomendado, pois a probabilidade de degradação das agliconas aumenta consideravelmente. Tempos de reação acima de 60 minutos podem ser utilizados; entretanto, a literatura afirma que a taxa de conversão em agliconas não aumenta significativamente. Ichiyagi *et al.* (2001), afirmaram em seu trabalho que 60 minutos de reação (aproximadamente) parece ser o tempo ideal para se obter o máximo de agliconas [55].

4.5. Conclusões

Antocianinas são compostos extremamente complexos de se trabalhar, visto que são facilmente passíveis de degradação. Foi desenvolvido neste trabalho um método de extração de antocianinas em morango (*Fragaria vesca*) com o objetivo de se obter o máximo de pigmentos com mínimo gasto de tempo e solvente extrator. Após diversas metodologias, tipos e concentrações de solvente e ácido, chegou-se a melhor condição de extração das duas antocianinas que caracterizam o morango (cianidina-3-glicosídeo e pelargonidina-3-glicosídeo): solução MeOH/HCl (94,5:5,5 – v/v) deixada por 10 minutos com polpa de morango (1:10 – m/v) em banho de ultrassom mantido a temperatura de 20 °C.

A estabilidade do extrato obtido na otimização foi analisada: frente ao armazenamento do mesmo em diferentes temperaturas, mostrando que as antocianinas se mantêm estáveis quando o extrato é mantido em freezer e ainda; uma análise da estabilidade frente ao aquecimento prolongado por altas temperaturas, demonstrando que as antocianinas são facilmente degradadas acima de 80 °C e após 3 horas de aquecimento intermitente sofrem hidrólise parcial.

A hidrólise ácida das antocianinas também foi avaliada, visto muitas vezes as pesquisas desses pigmentos serem focadas nas agliconas das antocianinas, pelo menor custo destas na forma de padrão analítico. A hidrólise foi estudada a partir do mecanismo da reação, chegando-se à melhor condição de: extrato/HCl 8 mol L⁻¹ (1:1 – v/v) por 60 minutos à 100 °C em banho termostatizado.

Os resultados obtidos neste trabalho foram bastante satisfatórios, pois se utilizaram metodologias simples e rápidas para obtenção da maior quantidade de antocianinas em morango, sem afetar a estabilidade das mesmas, bem como a obtenção de suas agliconas por hidrólise ácida.

4.6. Referências Bibliográficas

- [1] Buldini, P.L.; Ricci, L.; Sharma, J.L. **J. Chromatog. A**, 975 (2002) 47-70.
- [2] Cacace, J.E.; Mazza, G. **J. Agric. Food Chem.**, 50 (2002) 5939-5946.
- [3] Cecchi, H.M. Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos. 2ª ed. Editora da UNICAMP: Campinas, 1999.
- [4] García-Viguera, C.; Zafrilla, P.; Tomás-Barberán, F.A. **Phytochem. Analysis**, 9 (1998) 274-277.
- [5] Yang, Z.; Fan, G.; Gu, Z.; Han, Y.; Chen, Z. **Eur. Food. Res. Technol.**, 227 (2008) 409-415.
- [6] Denev, P.; Ciz, M.; Ambrozova, G.; Lojek, G.; Yanakieva, I.; Kratchanova, M. **Food Chem.**, 123 (2010) 1055-1061.
- [7] Teixeira, L.N.; Stringheta, P.C.; Oliveira, F.A. de. **Ceres**, 55 (2008) 297-304.
- [8] Costa, C.T. da; Horton, D.; Margolis, S.A. **J. Chromatog. A**, 881 (2000) 403-410.
- [9] Cao, S-q.; Pan, S-y.; Yao, X-l.; Fu, H-f. **Agric. Sci. in China**, 9 (2010) 207-215.
- [10] Starmans, D.A.J.; Nijhuis, H.H. **J. Trends Food Sci. Technol.**, 6 (1996) 191-197.
- [11] Lanças, F.M. Validação de métodos cromatográficos de análise. Ed. Rima: São Carlos, 2004.
- [12] Castañeda-Ovano, A.; Pacheco-Hernández, Ma. de L.; Páez-Hernández, Ma. E.; Rodríguez, J.A.; Galán-Vidal, C.A. **Food Chem.**, 113 (2009) 589-871.
- [13] Kraemer-Schafhalter, A.; Fuchs, H.; Pfannhauser, W. **J. Sci. Food Agric.**, 78 (1998) 435-440.
- [14] Chandra, A.; Rana, J.; Li, Y. **J. Agric. Food Chem.**, 49 (2001) 3515-3521.
- [15] Lee, H.S.; Hong, V. **J. Chromatog.**, 624 (1992) 221-234.
- [16] Kong, J.-M.; Chia, L.-S.; Goh, N.-K.; Chia, T.F.; Brouillard, R. **Phytochem.**, 64 (2003) 923-933.
- [17] Nayak, C.A.; Srinivas, P.; Rastogi, N.K. **Food Chem.**, 118 (2010) 719-724.

- [18] Silva, F.L. da; Escribano-Bailón, M.T.; Alonso, J.J.P.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Santos-Buelga, C. **LWT**, 40 (2007) 374-382.
- [19] Comandini, P.; Blanda, G.; Cardinali, A.; Cerretani, L.; Bendini, A.; Caboni, M.F. **J. Sep. Sci.**, 31 (2008) 3257-3264.
- [20] Wang, B.C.; He, R.; Li, Z.M. **Food Technol. Biotechnol.**, 48 (2010) 42-49.
- [21] Lohachoompol, V.; Mulholland, M.; Srzednicki, G.; Craske, J. **Food Chem.**, 111 (2008) 249-254.
- [22] Pallauf, K.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Castillo, M.D. del; Cano, M.P.; Pascual-Teresa, S. de. **J. Food Compos. Anal.**, 21 (2008) 273-281.
- [23] Barnes, J.S.; Nguyen, H.P.; Shen, S.; Schug, K.A. **J. Chromatogr. A**, 1216 (2009) 4728-4735.
- [24] Março, P.H.; Poppi, R.J.; Scarminio, I.S. **Quím. Nova**, 31 (2008) 1218-1223.
- [25] Revilla, E.; Ryan, J.-M., Martín-Ortega, G. **J. Agric. Food Chem.**, 46 (1998) 4592-4597.
- [26] Zhang, Z.; Kou, X.; Fugal, K.; McLaughlin, J. **J. Agric. Food Chem.**, 52 (2004) 688-691.
- [27] Markakis, P. Anthocyanins as food colors. Academic Press: New York, 1982.
- [28] Vanini, L.S.; Hirata, T.A.; Kwiatkowski, A.; Clemente, E. **Braz. J. Food Technol.**, 12 (2009) 213-219.
- [29] Bridgersa, E.N.; Chinnb, M.S.; Truong, V-D. **Industrial Crops and Products**, 32 (2010) 613-620.
- [30] Watanabe, T.; Yamamoto, A.; Nagai, S.; Terabe, S. **Anal. Sci.**, 14 (1998) 839-844.
- [31] Mazza, G.; Gao, L. **J. Food Sci.**, 61 (1996) 600-6003.
- [32] Froytlog, C.; Slimestad, R.; Andersen, O.M. **J. Chromatog. A**, 825 (1998) 89-95.
- [33] Phippen, W. B.; Simon, J.E. **J. Agric. Food Chem.**, 46 (1998) 1734-1738.
- [34] Hong, V.; Wrolstad, R.E. **J. Agric. Food Chem.**, 38 (1990) 708-715.
- [35] Wulf, L.W.; Nagel, C.W. **Am. J. Enol. Vitic.**, 29 (1978) 42-49.

- [36] Tian, Q.; Giusti, M.M.; Stoner, G.D.; Schwartz, S.T. **J. Chromatog. A**, 1091 (2005) 72-82.
- [37] Rosso, V.V. de; Hillebrand, S.; Montilla, E.C.; Bobbio, F.O.; Winterhalter, P.; Mercadante, A.Z. **J. Food Composit. and Anal.**, 21 (2008) 291-299.
- [38] Yang, Z.; Zhai, W. **Innovative Food Science and Emerging Technol.**, 1 (2010) 169-176.
- [39] Morais, H.; Ramos, C.; Forgács, E.; Cserhádi, T.; Oliveira, J. **J. Chromatog. B**, 770 (2002) 297-301.
- [40] Longo, L.; Vasapollo, G. **Food Chem.**, 94 (2006) 226-231.
- [42] Lopez-Martinez, L.X.; Oliart-Ros, R.M.; Valerio-Alfaro, G.; Lee, C.-H.; Parkin, K.L.; Garcia, H.S. **LWT**, 42 (2009) 1187-1192.
- [43] Byamukama, R.; Namukobe, j.; Kiremire, B. **African J. Pure Applied Chem.**, 3 (2009) 20-25.
- [44] Lohachoompol, V.; Srzednicki, G.; Craske, J. **J. Biomedicine and Biotechnology**, 5 (2004) 248-252.
- [45] Dai, J.; Gupte, A.; Gates, L.; Mumper, R.J. **Food Chem. Toxicol.**, 47 (2009) 837-847.
- [46] Tulipani, S.; Mezzetti, B.; Capocasa, F.; Bompadre, S.; Beekwilder, J.; Vos, C.H.R. de; Capanoglu, E.; Bovy, A.; Battino, M. **J. Agric. Food Chem.**, 56 (2008) 696-704.
- [47] Yoshida, Y.; Tamura, H. **J. Japan Soc. Hort. Sci.**, 74 (2005) 36-41.
- [48] García-Viguera, C.; Zafrilla, P.; Romero, F.; Abellán, P.; Artés, F.; Tomás-Barberán, F.A. **J. Food Sci.**, 64 (1999) 243-247.
- [49] Kahkonen, M.P.; Heinamaki, J.; Ollilainen, V.; Heinonen, M. **J. Sci. Food Agric.**, 83 (2003) 1403-1411.
- [50] Chen, F.; Sun, Y.; Zhao, G.; Liao, X.; Hu, X.; Wu, J.; Wang, Z. **Ultrasonics Sonochem.**, 14 (2007) 767-778.
- [51] Azevedo, J.; Fernandes, I.; Faria, A.; Oliveira, J.; Fernandes, A.; Freitas, V. de; Mateus, N. **Food Chem.**, 119 (2010) 518-523.

- [52] Seeram, n.P.; Lee, R.; Scheuller, H.S.; Heber, D. **Food Chem.**, 97 (2006) 1-11.
- [53] Lachman, J.; Hamouz, H.; Sulc, M.; Orsák, M.; Pivec, W.; Hejmánková, A.; Dvorák, P.; Cepl, **J. Food Chem.**, 114 (2009) 836-843.
- [54] Lima, V.L.A.G. de; Pinheiro, I.O.; Nascimento, M.S. do; Gomes, P.B.; Guerra, N.B. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 26 (2006) 927-935.
- [55] Ichiyagi, T.; Oikawa, K.; Tateyama, C.; Konishi, T. **Chem. Pharm. Bull.**, 49 (2001) 114-117.
- [56] Tabart, J.; Kevers, C.; Pincemail, J.; Defraigne, J.-O.; Dommes, J. **Food Chem.**, 120 (2010) 607-614.
- [57] Leggett, D.C.; Jenkins, T.F.; Miyares, P.H. **Anal. Chem.**, 62 (1990) 1355-1356.
- [58] Patras, A.; Brunton, N.P.; Pieve, S. da, Butler, F. **Innovative Food Sci. Emerg. Technol.**, 10 (2009) 308-313.
- [59] Tulipani, S.; Marzban, G.; Herndl, A.; Laimer, M.; Mezzetti, B.; Battino, M. **Food Chem.**, 124 (2011) 906-913.
- [60] Goiffon, J.-P.; Mouly, P.P.; Gaydou, E.M. **Anal. Chim. Acta**, 382 (1999) 39-50.
- [61] Patras, A.; Brunton, N.P.; O'Donnell, C.; Tiwari, B.K. **Trends in Food Science & Technol.**, 21 (2010) 3-11.
- [62] Hannum, S.M. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 44 (2004) 1-17.
- [63] Merken, H.M.; Beecher, G.R. **J. Agric. Food Chem.**, 48 (2000) 577-599.
- [64] Korn, M.; Andrade, M.V.A.S. de; Borges, S. da S. **Analytica**, 3 (2003) 34-39.
- [65] Chemat, f.; Zill-e-Huma; Khan, M.K. **Ultrason. Sonochem.** (2011), doi:10.1016/j.ultsonch.2010.11.023.
- [66] Barboza, J.C. de S.; Serra, A.A. **Quím. Nova**, 15 (1992) 302-316.
- [67] Neto, B.B.; Scarmínio, I.S.; Bruns, R.E. Como fazer experimentos. 4ªed. Bookman: Porto Alegre, 2010.
- [68] Fan, G.; Han, Y.; Gu, Z.; Chen, D. **LWT**, 41 (2008) 155-160.
- [69] Mondello, L.; Cotroneo, A.; Errante, G.; Dugo, G.; Dugo, P. **J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 23 (2000) 191-195.

- [70] Jin, P.; Wang, S.Y.; Wang, C.Y.; Zheng, Y. **Food Chem.**, 124 (2011) 262-270.
- [71] Jimenez, N.; Bohuon, P.; Lima, J.; Dornier, M.; Vaillant, F.; Perez, A.M. **J. Agric. Food Chem.**, 58 (2010) 2314-2322.
- [72] Kirca, A.; Ozkan, M.; Cemeroglu, B. **Food Chem.**, 101 (2007) 212-218.
- [73] Kirca, A.; Cemeroglu, B. **Food Chem.**, 81 (2003) 583-587.
- [74] Garzon, G.A. Wrolstad, R.E. **J. Food Scie.**, 67 (2002) 1288-1299.
- [75] Wang, W.D.; Xu, S.Y. **J. Food Engineering**, 82 (2007) 271-275.
- [76] Villiers, A. de; Cabooter, D.; Lynen, F.; Desmet, G.; Sandra, P. **J. Chromatog. A**, 1216 (2009) 3270-3279.
- [77] Malacrida, C.R.; da Motta, S. Antocianinas **Bol. CEPPA**, 24 (2006) 59-82.
- [78] Smith, M.B.; March, J. March's advanced organic chemistry: reactions, mechanisms and structure. In. Cap. 10. Aliphatic substitution. 6^a ed. John Willey & Sons: New Jersey, 2007, p. 522-528.
- [79] Lowry, T.H.; Richardson, K.S. Mechanism and theory in organic chemistry. In. Cap. 8. Reactions of carbonyl compounds. 3^a ed. Harper International Edition: Ney York, 1987, p. 694-701.
- [80] Morrison, R.; Boyd, R. Química Orgânica. In. Cap. 6. Álcoois e éteres. 8^aed. Fundação Calouste Gulbenkian: Boston, 1983.
- [81] Chen, J.; Crooks, P.A.; Hussain, A. **Intern. J. Pharmac.**, 123 (1995) 95-101.
- [82] Belarmino, A.T.; Froehner, S.; Zanette, D.; Farah, J.P.S.; Bunton, C.A.; Romsted, L.S. **J. Org. Chem.**, 68 (2003) 706-717.

Capítulo 5

AVALIAÇÃO DAS FIGURAS DE MÉRITO

5. Avaliação das Figuras de Mérito

5.1. Introdução

5.1.1. Validação de Métodos Analíticos

A preocupação com o valor nutricional e os benefícios trazidos pelo consumo de alimentos têm feito parte da rotina das pessoas. Os consumidores deixaram de buscar alimentos apenas pelo seu aroma, cor, textura e sabor. Baseada nesta preocupação e no controle de qualidade, processamento e armazenamento, a análise de alimentos ganhou destaque e tornou-se uma área bastante requisitada. Indústrias de alimentos, institutos de pesquisa e órgãos governamentais buscam cada vez mais a utilização de métodos analíticos para análise e processamento dessas matrizes.

Sabe-se que um grande problema é a instabilidade dos alimentos frente à temperatura, incidência de luz, umidade e tempo de estocagem. Todos esses fatores podem influenciar na medida analítica; por isso, nos últimos anos, tem crescido a necessidade de demonstrar a qualidade de medições químicas através da comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade dos dados analíticos, sendo cada vez mais exigida a validação dos métodos [1,2].

Validação tem como definição: “ato ou efeito de validar, dar validade, tornar válido, tornar legítimo ou legal, visa a diminuir ou controlar os fatores que levam à importância ou inexatidão de um dado gerado” [3]. A validação de um método de investigação tem por objetivo saber se o propósito de análise do método é realizado, através da obtenção de resultados analíticos com um nível aceitável de incerteza [4].

A partir de iniciativas de instituições americanas, como o FDA (Food and Drug Administration) e a EPA (Environmental Protection Agency) criou-se o sistema chamado ISO/IEC-25 (International Standardization Organization/

International Electrotechnical Commission). Essas organizações criam protocolos de padronização de exigências a serem cumpridas por um laboratório ao se utilizar de um método de análise, para que o novo método desenvolvido apresente competência, confiabilidade e adequação à qualidade pretendida e para que os resultados apresentados sejam reconhecidos por diversos laboratórios no mundo todo [3,5].

No Brasil, existem duas agências que disponibilizam protocolos de validação de ensaios, que são a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). Existem ainda outros órgãos, nos quais inúmeros laboratórios brasileiros se baseiam para desenvolverem a validação de seus métodos: ICH (International Conference on Harmonization), IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), Eurachem, CEN (European Cooperation for Accreditation), USP (United States Pharmacopeia), AOAC (Association of Official Analytical Chemists), dentre outros [2,4].

O que se observa é que não existe um método único e padrão de validação, as agências que criam os protocolos possuem suas semelhanças, mas também suas particularidades. O que se pode fazer é adequar os procedimentos propostos e criar o próprio método do laboratório, que esteja em concordância com o instrumento utilizado para desenvolvimento do método e tipo de matriz na qual este irá se aplicar, sempre obedecendo aos princípios básicos que as agências credenciadas preconizam.

A validação de um método é um processo constante e crescente, que começa nas fases iniciais do desenvolvimento, antes que um equipamento seja colocado em uso e dados importantes sejam obtidos, e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência [6]. Durante o processo de validação, devem ser estabelecidas as características de desempenho, limitações, possíveis interferências e tipo de matriz para qual o método pode

ser aplicado [7]. Um método analítico pode ser validado intralaboratorialmente ou interlaboratorialmente [8].

As características de desempenho de método (parâmetros de validação ou ainda figuras de mérito) mais utilizadas para validação de métodos de separações são [2,5,7,9]:

- Linearidade (curva de calibração);
- Limite de detecção (detectabilidade);
- Limite de quantificação;
- Seletividade e especificidade;
- Exatidão;
- Precisão;
- Robustez.

A importância das características citadas acima vai depender do propósito para quais os dados obtidos, através do método desenvolvido, serão aplicados [10]. Ainda, dependendo do método escolhido, não se faz necessária a avaliação de todos os parâmetros acima citados; entretanto, uma análise das figuras de mérito bem definida e documentada oferece garantia de confiabilidade e seriedade no método desenvolvido [2,5,11].

5.1.2. Figuras de Mérito

5.1.2.1. Linearidade (curva de calibração)

É a capacidade de o método gerar resultados proporcionais à concentração do analito, enquadrados em uma faixa analítica especificada [9]. O resultado é expresso por uma equação da reta denominada curva analítica, que tem a forma de uma equação de primeiro grau (Equação 5.1):

$$y = ax + b$$

Equação 5.1

A Equação 5.1 só é válida em determinada faixa (chamada faixa linear dinâmica), o coeficiente angular (a) expressa a inclinação do gráfico em relação aos eixos e o coeficiente linear (b) expressa a interseção do gráfico com o eixo y. Um gráfico é construído, onde no eixo y são colocados os sinais analíticos (por exemplo, a área, em cromatografia) e no eixo x as concentrações estudadas. São desenhadas linhas paralelas à curva analítica, para 95 e 105 % da faixa linear; o método será considerado linear se os pontos obtidos na curva estiverem dentro deste intervalo de confiança estimado, que pode variar, dependendo da agência na qual se segue a avaliação dos parâmetros analíticos [2,3]. O coeficiente de correlação linear (R) também é utilizado como indicativo de linearidade e um valor maior que 0,90 é usualmente requerido [5].

ANVISA e ICH, recomendam que se determine, no mínimo, 3 repetições de 5 concentrações diferentes para linearidade; para a IUPAC, no mínimo 6 determinações. Estas concentrações devem seguir as quantidades presentes na matriz utilizada e dependem da aplicação pretendida do método [11-13].

Outro procedimento de avaliação da linearidade é o uso da construção de uma curva analítica com a adição de padrão à matriz em estudo, para eliminar possíveis erros de interferência. Adiciona-se padrão (em diferentes concentrações) à matriz e faz-se a medida no equipamento de desenvolvimento do método; constrói-se a curva com o sinal analítico versus a concentração de padrão adicionada [3].

5.1.2.2. Sensibilidade e Limite de Detecção

A sensibilidade de um método indica sua capacidade de discriminar concentrações próximas de um analito [3,14]. É um parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da concentração [5].

O limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, mas não necessariamente quantificado [2,11].

O LD pode ser calculado pela relação sinal/ruído, onde é realizada uma comparação entre os sinais medidos da amostra com as do branco. Uma razão sinal-ruído multiplicada por 3 é aceitável para estimar o LD [2,4,9].

5.1.2.3. Limite de Quantificação

O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas [11,14].

O LQ, assim como o LD, é expresso como concentração [2]. Sua determinação também pode ser feita pela relação sinal-ruído, utilizando a relação 10:1 (10 vezes a relação sinal-ruído) [2,4,9].

5.1.2.4. Seletividade e Especificidade

É a capacidade que o método possui em medir exatamente o composto de interesse na presença de interferentes, como impurezas, produtos de degradação, etc [11]. É a confirmação da identidade de um composto. Um método que produz resposta apenas para um analito é chamado específico e o que distingue a resposta de um analito dos outros é seletivo [4,5]. Um método somente será específico se ele for 100 % seletivo [4].

Não existe uma expressão que defina especificidade, ela somente pode ser demonstrada por ensaios que dependerão do objetivo do método e do tipo de analito [4]. Uma forma de avaliar a seletividade é utilizando uma matriz isenta do composto de interesse e adicionando padrão; nenhum interferente pode ser medido como se fosse o analito. No caso da cromatografia, não

poderá haver eluição de interferente no tempo de retenção da espécie em análise. Outra maneira é com uso de detectores modernos (DAD ou MS) que comprovam a pureza de pico. O método de adição de padrão também pode ser utilizado para avaliação da seletividade [2].

Para técnicas cromatográficas, além das comparações visuais dos cromatogramas, diferentes parâmetros devem ser calculados para descrever a seletividade, como: resolução, fator de retenção, fator de separação, fator de simetria, número de pratos [5].

5.1.2.5. Exatidão

É a concordância dos resultados obtidos pelo método em comparação com o valor aceito como verdadeiro ou de referência [3,5,11].

Os processos utilizados para avaliar a exatidão de um método são: uso de materiais de referência, comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação [5].

Ensaio de recuperação são avaliados em 3 níveis de fortificação da amostra com os padrões dos analitos de interesse, cada nível é repetido 3 vezes [9], resultando em 9 determinações. Os níveis de fortificação podem ser, por exemplo, próximo ao limite de detecção, próxima à concentração média da curva de calibração e próxima a concentração máxima permitida de linearidade do método. Os padrões devem ser adicionados à amostra antes da extração dos analitos [2,5]. O cálculo da recuperação pode ser efetuado utilizando a Equação 5.2.

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{A_{Am+Pad} - A_{Am}}{A_{Pad}} \cdot 100 \quad \text{Equação 5.2.}$$

Onde, A_{Am+Pad} é a área do pico da amostra com padrão adicionado, A_{Am} é a área da amostra sem adição de padrão e A_{Pad} é a área do padrão do analito.

Os intervalos aceitáveis de recuperação variam de acordo com a amostra em trabalho. Por exemplo, para análise de alimentos, a AOAC julga aceitável de 80 – 115 % de recuperação dos analitos [15]. Uma exatidão acima de 100 % indica uma tendência positiva, enquanto que abaixo de 100 %, indica uma tendência negativa. Erros sistemáticos típicos na exatidão dos resultados provêm de equipamentos não calibrados ou aferidos, interferentes na amostra, medidas volumétricas incorretas, seringas contaminadas, etc [3].

5.1.2.6. Precisão

É um termo que designa a dispersão dos resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas [5,11].

Pode ser expressa como desvio-padrão ou desvio-padrão relativo (RSD ou coeficiente de variação – CV – Equação 5.3) [2,5].

$$\%CV = \frac{\text{desvio-padrão}}{\text{média}} \cdot 100 \quad \textbf{Equação 5.3.}$$

A precisão pode ser determinada em condições de [3]:

- *Repetibilidade*: utiliza-se o mesmo método, amostra, laboratório, operador, equipamento em curto intervalo de tempo. Envolve várias medições em diferentes preparações, em 3 níveis, 3 medidas cada nível, resultado em 9 determinações [2,3,11].
- *Precisão Intermediária*: indica o efeito das variações dentro do mesmo laboratório. O ensaio é semelhante ao da repetibilidade, condições e

número de determinações, mas os ensaios de repetição de cada nível são realizados em dias diferentes [2,11].

- *Reprodutibilidade*: utiliza-se mesmo método e amostra, mas diferentes laboratórios, operadores e equipamentos. Deve ser utilizada quando se tem pretensão de incluir o procedimento desenvolvido em farmacopéias, procedimentos do CODEX, etc [2,3,11].

Em cromatografia, a precisão é sempre determinada por intermédio da injeção de padrões analíticos, não de amostras conhecidas [3].

5.1.2.7. Robustez

A robustez mede a sensibilidade que o método apresenta frente a pequenas alterações [2,5,11]. Indica a confiança do método durante o uso normal [11].

A robustez de um método cromatográfico é avaliada, por exemplo, por variações de parâmetros como concentração do solvente orgânico, pH, força iônica da fase móvel e/ou temperatura. Ou ainda alterando-se parâmetros da extração, como: temperatura, tempo, agitação, etc. [2].

A avaliação da robustez pode ser considerada durante o desenvolvimento e depende do processo em estudo. Os testes de robustez servem para indicar os fatores que podem influenciar, significativamente, a resposta do método analítico [6,9].

Um laboratório, ao utilizar métodos analíticos validados, cumpriu apenas uma etapa no seu controle de qualidade interno. Além de métodos confiáveis, terá que demonstrar que em seu dia-a-dia produz resultados confiáveis. Isto é conseguido com a inclusão de materiais de referência (que podem ser preparados pelo próprio laboratório), com a execução de análises em duplicata ou triplicata no trabalho de rotina e com a participação em estudos colaborativos para teste de proficiência do laboratório [8].

5.2. Objetivos

O objetivo deste capítulo é demonstrar o desempenho de um método de separação de oito antocianinas/antocianidinas, aplicadas à análise desses pigmentos em morangos, através da análise das figuras de mérito no desenvolvimento do método.

5.3. Parte Experimental

5.3.1. Materiais e Equipamentos

5.3.1.1. Amostras e Reagentes

Os padrões de antocianinas utilizados foram: cloreto de cianidina, cloreto de malvidina, cloreto de pelargonidina, cloreto de delphinidina, cloreto de cianidina-3-O-glicosídeo, cloreto de cianidina-3,5-O-diglicosídeo, cloreto de malvidina-3-O-glicosídeo e cloreto de pelargonidina-3-O-glicosídeo, obtidos de Sigma Aldrich (P.A., São Paulo, Brasil) de alto grau de pureza. A fase móvel foi composta por metanol (grau HPLC, J.T.Backer, Xalostoc, México), água ultrapura (MilliQ® - marca Millipore, modelo Direct-quantum TMEX - Bedford, MA, USA) e ácido clorídrico (P.A., Synth, São Paulo, Brasil). Amostras de morango (*Fragaria vesca*) foram obtidas em mercado local.

5.3.1.2. Equipamentos

Cromatógrafo a líquido Shimadzu (Kyoto, Japão), operando com um sistema de bombeamento de solvente (bomba quaternária LC-10Avp) e válvula injetora manual Rheodyne, com alça de amostragem de 20 µL e forno Waters (Milford, MA, USA) mantido a 30 °C. O sistema está acoplado a um detector

com arranjo de diodos Shimadzu (SPD-M10Avp), que operou na faixa de 300 a 600 nm, sistema controlador Shimadzu (SCL-10Avp) e software para aquisição e tratamento de dados, CLASS-VP.

Também foram utilizados, no processo de extração, um Ultra Turrax[®] (Labortechnik – modelo T25 - Suíça), uma balança analítica (Mettler Toledo – modelo AB204 – São Paulo - Brasil), um ultrassom (Cole-Parmer – modelo 8890 – Illinois – USA) e centrífuga (Quimis[®] - São Paulo - Brasil).

5.3.2. Procedimentos Experimentais e Avaliação das Figuras de Mérito

5.3.2.1. Preparo das Soluções-padrão

Soluções estoque dos padrões de antocianinas e antocianidinas foram preparadas nas concentrações de 200 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, em solução aquosa de ácido clorídrico 0,1% (v/v) e estocadas em freezer à -2°C até uso.

5.3.2.2. Extração da Amostra

A extração de antocianinas em morango foi realizada de acordo com metodologia descrita no Capítulo 4: 5,0 g de polpa de morango (obtida a partir da mistura de caixas de morango trituradas em Ultra Turrax[®]) foram homogeneizadas com 10,0 mL de solução de metanol contendo 5,5 % de HCl (v/v) em ultrassom por 10 minutos à 20°C . A mistura foi centrifugada a 3500 rpm por 10-15 minutos em temperatura ambiente e o sobrenadante retirado e acondicionado em frasco âmbar após a etapa do ultrassom; este procedimento foi repetido mais quatro vezes. O extrato final obtido mantido em freezer a -2°C até uso. Antes de ser injetado, o mesmo foi filtrado em membrana Millipore[®] 0,45 μm .

5.3.2.3. Análises Cromatográficas

Os extratos obtidos foram injetados em um cromatógrafo a líquido com detector de arranjo de diodos (DAD), utilizando uma coluna cromatográfica C18 Phenomenex (250 x 4,6 mm; 0,40 μm d.i.) (Torrance, Califórnia, USA), com temperatura mantida constante (30 °C). A fase móvel foi composta por: A – água ultrapura com ácido clorídrico 0,1% (pH 2,1) e B – metanol com ácido clorídrico 0,1%. A vazão utilizada foi de 1,0 mL min⁻¹ e o volume injetado, 20,0 μL . O comprimento de onda utilizado na análise foi 522 nm. A análise das antocianinas presentes nas frutas e na forma de padrões, para avaliação das figuras de mérito, se deu por separação otimizada (Capítulo 3) através do gradiente linear de eluição: 25 – 55 %B em 30 minutos.

5.3.4. Avaliação das Figuras de Mérito do Método

5.3.4.1. Linearidade

A linearidade do método foi avaliada construindo-se uma curva de calibração para cada um dos oito padrões de antocianinas utilizados no desenvolvimento do método de separação. Na Tabela 5.1, encontram-se as faixas de medida da linearidade para cada padrão, onde a curva foi composta de seis pontos, medidos em triplicata cada um. A curta faixa estudada foi estipulada de acordo com a quantidade de padrão analítico disponível no laboratório. Cada padrão foi preparado diluindo-se as soluções estoque em metanol. A linearidade foi estimada a partir da regressão linear da curva de calibração (Equação 5.1) das áreas dos picos *versus* a concentração.

Tabela 5.1. Faixa de linearidade para avaliação das figuras de mérito da metodologia de separação cromatográfica de oito antocianinas.

Composto	Faixa de Linearidade (mmol L⁻¹)
Cianidina-3,5-diglicosídeo	23 – 62
Cianidina-3-glicosídeo	31 – 83
Pelargonidina-3-glicosídeo	21 – 75
Malvidina-3-glicosídeo	20 – 66
Delfinidina	118 – 192
Cianidina	124 – 202
Pelargonidina	33 – 114
Malvidina	27 – 95

5.3.4.2. Limites de Detecção e Quantificação

A estimativa dos limites de detecção e quantificação (LD e LQ, respectivamente) foi feita com base na relação sinal-ruído da amostra. Vinte injeções sucessivas de extrato de morango foram efetuadas em dias diferentes, e então foram calculados os desvios-padrão e as médias de uma faixa de tempo dos cromatogramas onde não há saída de nenhuma antocianina. A razão entre a média e o desvio-padrão das medidas é a relação sinal-ruído. Para cálculo do LD e LQ, utilizaram-se as equações 5.4 e 5.5, onde "S/R" é a relação sinal/ruído e "s" é a inclinação da curva analítica.

$$LD = 3. \frac{S/R}{s}$$

Equação 5.4.

$$LQ = 10. \frac{S/R}{s}$$

Equação 5.5.

5.3.4.3. Seletividade e Especificidade

A seletividade e especificidade foram avaliadas calculando-se alguns parâmetros cromatográficos, como: resolução, número de pratos, fator de retenção e fator de separação; através das Equações 3.1, 3.3, 3.4 e 3.5, respectivamente, apresentadas no Capítulo 3. Os cálculos desses parâmetros foram obtidos na separação otimizada de oito padrões de antocianinas.

5.3.4.4. Exatidão

A exatidão do método foi avaliada a partir de ensaios de recuperação, através do método de adição de padrão. Para isso, em 5,0 g de morango foram adicionados padrões de cianidina-3-glicosídeo e pelargonidina-3-glicosídeo, nas concentrações próximas dos pontos baixo, médio e alto da curva analítica de cada substância. Em seguida, efetuou-se a extração conforme descrita no item 5.3.2 e no “Capítulo 4 – Otimização da Extração”.

A amostra sem adição de padrão, os padrões nas concentrações adicionadas e as amostras com a adição nos três níveis de concentração foram analisados em triplicata nas condições otimizadas do método (item 5.3.3); a recuperação foi expressa em termos de porcentagem da quantidade medida da substância em relação à quantidade adicionada à matriz (Equação 5.2).

5.3.4.5. Precisão

A precisão do método foi avaliada em três níveis diferentes: repetibilidade; precisão intermediária e precisão instrumental. Todos os níveis foram avaliados através do desvio padrão relativo (RSD), também conhecido como coeficiente de variação (CV), em porcentagem (Equação 5.3).

5.3.4.5.1. Repetibilidade

A repetibilidade foi determinada através de três repetições de três níveis de concentração da curva de calibração, ou seja, foram repetidas injeções próximas ao primeiro ponto, próximas ao ponto intermediário e próximas ao ponto de maior concentração da curva analítica, resultando em nove determinações. As injeções foram realizadas no mesmo dia, nas mesmas condições cromatográficas (item 5.3.3) e pelo mesmo analista.

5.3.4.5.2. Precisão Intermediária

A precisão intermediária é determinada experimentalmente da mesma forma que a repetibilidade (três medidas de três níveis de concentração – nove determinações); entretanto, essas medidas foram feitas em dias diferentes, nas mesmas condições cromatográficas (item 5.3.3) e mesmo analista.

5.3.4.5.3. Precisão Instrumental

A precisão instrumental foi determinada através da repetição (dez injeções) de uma mistura dos oito padrões (em concentrações ao nível intermediário da curva analítica) realizadas no mesmo dia, nas mesmas condições cromatográficas (item 5.3.3) e mesmo analista.

5.3.4.6. Robustez

A robustez do método foi avaliada através da variação de três parâmetros cromatográficos: pH da fase móvel, temperatura da coluna e vazão da fase móvel. Foram realizadas sete injeções de extrato de morango, variando cada parâmetro para valores maiores ou menores do ótimo obtido, além de

uma medida da condição otimizada. O planejamento dos experimentos está descrito na Tabela 5.2. A avaliação da robustez é feita através do desvio-padrão do tempo de retenção dos analitos presentes no morango sob a condição variada e a condição otimizada.

Tabela 5.2. Planejamento das variações das condições cromatográficas para avaliação da robustez do método.

Ensaio	Variações		
	pH	T (°C)	Vazão (mL min ⁻¹)
1	2,1	30	0,95
2	2,1	30	1,05
3	2,1	29	1,00
4	2,1	31	1,00
5	2,0	30	1,00
6	2,2	30	1,00
7*	2,1	30	1,00

*Condição otimizada.

5.3.5. Análise dos Resultados

Os resultados obtidos na avaliação das figuras de mérito da metodologia aqui desenvolvida para separação das antocianinas, bem como os ensaios de recuperação e robustez desenvolvidos a partir de extratos de morango, foram analisados utilizando os softwares estatísticos Origin 5.0 (Microcal Software Inc.), R 2.12.1 (R Development Core Team) e Excel (Microsoft Inc.).

5.4. Resultados e Discussão

5.4.1. Linearidade – LD/LQ

A determinação da linearidade do método de separação foi obtida através da elaboração de curvas de calibração, para cada antocianina, em intervalos adequados de concentrações, com injeções em triplicata de cada ponto da curva (seis pontos). Os resultados da regressão e os dados estatísticos obtidos a partir das mesmas podem ser observados na Tabela 5.3.

Tabela 5.3. Parâmetros de avaliação da linearidade do método de separação.

Antocianinas	Faixa Linear (mmolL ⁻¹)	a	b	R ²	F	p
Cian-3,5-diglic.	23,00 – 62,00	121 ± 5	- 210 ± 200	0,995	724,9	1,94 10 ⁻⁵
Cian-3-glic.	31,00 – 83,00	67 ± 2	- 909 ± 94	0,998	1797	4,15 10 ⁻⁴
Pelarg-3-glic.	21,00 – 75,00	311 ± 8	- 1028 ± 398	0,998	1614	6,38 10 ⁻⁵
Malv-3-glic.	20,00 – 66,00	360 ± 12	- 265 ± 567	0,995	839,8	1,29 10 ⁻⁴
Delfinidina	118,0 – 192,0	67 ± 2	- 3416 ± 378	0,995	776,3	3,03 10 ⁻⁷
Cianidina	124,0 – 202,0	48 ± 1	- 1678 ± 110	0,999	5156	2,56 10 ⁻⁸
Pelargonidina	33,00 – 114,0	34 ± 1	+ 337 ± 56	0,999	5975	4,90 10 ⁻⁵
Malvidina	27,00 – 95,00	83 ± 1	- 336 ± 95	0,998	4269	3,35 10 ⁻⁴

a e b, coeficientes angular e linear, respectivamente da equação: $y = ax + b$, onde y = área do pico cromatográfico em unidade abstrata e x = concentração em mmol L⁻¹; R² = coeficiente de determinação (n = 6), F = teste de Fisher e p = coeficiente de variância.

As regressões apresentaram bons coeficientes de determinação (>0,99) dentro da faixa estudada e valores de F elevados, demonstrando significância da metodologia desenvolvida. Chandra *et al.* (2001) avaliaram a linearidade de cianidina-3-glicosídeo e cianidina-3-rutinosídeo, presentes em cereja e

"elderberry", e obtiveram ótimos coeficientes de determinação para estes pigmentos [16].

As curvas obtidas (Figura 5.1) demonstraram que os resultados do método desenvolvido (Capítulo 3) são diretamente proporcionais às concentrações das oito antocianinas, através da correlação com a área dos picos cromatográficos de cada analito.

O método de separação apresentou limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) satisfatórios. Os valores obtidos na ordem de $\mu\text{mol L}^{-1}$ ficaram entre 23 – 243 de LD e 75 – 808 de LQ, ambos para malvidina-3-glicosídeo e pelargonidina, respectivamente; estes resultados demonstram que o método apresenta boa detectabilidade. Os valores de LD e LQ, obtidos a partir da relação sinal/ruído das antocianinas, estão demonstrados na Tabela 5.4.

Tabela 5.4. Limites de detecção e quantificação das antocianinas estudadas.

Antocianinas	LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
Cianidina-3,5-diglicosídeo	67	224
Cianidina-3-glicosídeo	122	406
Pelargonidina-3-glicosídeo	26	87
Malvidina-3-glicosídeo	23	75
Delfinidina	121	404
Cianidina	170	566
Pelargonidina	243	808
Malvidina	98	327

LD – limite de detecção e LQ – limite de quantificação, 522 nm.

Figura 5.1. Curvas analíticas das antocianinas estudadas.

5.4.2. Seletividade e Especificidade

Os termos seletividade e especificidade relacionam-se à detecção do método e à confirmação da identidade de um composto. Os parâmetros cromatográficos (Tabelas 5.5 e 5.6) calculados a partir da separação otimizada de oito antocianinas/antocianidinas (Capítulo 3), garantem a seletividade e especificidade do método, pois o mesmo apresentou boas resoluções entre picos adjacentes; o fator de retenção encontra-se dentro da faixa considerada aceitável ($1 < k < 10$), mostrando que os analitos interagem bem tanto com a FM quanto com a FE. O método demonstra eficiência, pois além das ótimas resoluções, apresenta seletividade (bons valores de α).

Tabela 5.5. Parâmetros cromatográficos calculados: fator de retenção e número de pratos da separação otimizada - gradiente de eluição de 25 – 55 % B em 30 min, volume de injeção 20 μ L, vazão da FM 1,0 mL min⁻¹, coluna mantida à 30 °C, λ = 522 nm.

Eluição	Antocianina	<i>k</i>	N
1	<i>Cianidina-3,5-diglicosídeo</i>	1,23	987,816
2	<i>Cianidina-3-glicosídeo</i>	2,91	6457,81
3	<i>Pelargonidina-3-glicosídeo</i>	3,71	13236,0
4	<i>Malvidina-3-glicosídeo</i>	4,31	6436,74
5	<i>Delfinidina</i>	4,96	29727,9
6	<i>Cianidina</i>	6,37	145332
7	<i>Pelargonidina</i>	7,78	86301,2
8	<i>Malvidina</i>	8,15	65553,6

Tabela 5.6. Parâmetros cromatográficos calculados: resolução e fator de separação da separação otimizada - gradiente de eluição de 25 – 55 % B em 30 min, volume de injeção 20 μ L, vazão da FM 1,0 mL min⁻¹, coluna mantida à 30 °C, λ = 522 nm.

Par Crítico	α	<i>R_s</i>
1-2	2,37	7,35
2-3	1,27	4,74
3-4	1,16	2,96
4-5	1,15	3,37
5-6	1,28	9,48
6-7	1,22	9,92
7-8	1,05	2,79

5.4.3. Exatidão

A exatidão do método foi determinada através de ensaios de recuperação, efetuados durante a extração do morango. Os valores de recuperação média obtidos no estudo para cianidina-3-glicosídeo e pelargonidina-3-glicosídeo, bem como seus desvios-padrão, estão apresentados na Tabela 5.7.

Tabela 5.7. Resultados de % de recuperação das antocianinas em extrato de morango.

	% Recuperação	
	<i>Cianidina-3-glicosídeo</i>	<i>Pelargonidina-3-glicosídeo</i>
Ponto inicial	85 ± 4	98 ± 0
Ponto médio	84 ± 5	90 ± 1
Ponto final	83 ± 3	96 ± 1

A AOAC sugere que uma boa recuperação encontra-se na faixa de 80 – 115 % para alimentos [15]; a recuperação obtida neste trabalho ficou em média $84,09 \pm 3,89$ e $98,06 \pm 0,80$, para cianidina-3-glicosídeo e pelargonidina-3-glicosídeo, respectivamente. Tais valores de recuperação são aceitáveis, visto a matriz trabalhada ser bastante complexa. Os maiores desvios encontrados na cianidina-3-glicosídeo são compreensíveis, visto esta substância ser encontrada em quantidades significativamente menores, estando assim, mais sensível a erros aleatórios e/ou sistemáticos de quantificação.

As recuperações obtidas aqui, além de estarem dentro da faixa aceitável pela AOAC, são consideradas boas recuperações. Um fator que pode ter influenciado nestes resultados, segundo Bridgers *et al.* (2010), é a utilização de solventes acidificados no processo de extração, por conferirem maior estabilidade aos pigmentos extraídos [17].

5.4.4. Precisão

A precisão foi avaliada sob três níveis (Tabela 5.8), os resultados estão expressos em % CV, pois é um dos parâmetros de análise dos resultados que garante elevado grau de precisão, no sentido de confiabilidade [4].

Tabela 5.8. Avaliação da precisão através de análise da precisão instrumental, repetibilidade e precisão intermediária do método.

	Precisão Instrumental*	Repetibilidade **			Precisão Intermediária **		
		Baixa	Média	Alta	Baixa	Média	Alta
Cian-3,5	2,5	2,1	3,0	2,0	5,7	6,5	7,6
Cian-3	6,0	4,9	5,9	2,6	3,1	3,0	6,0
Pelarg-3	1,9	1,5	5,3	1,2	9,9	0,59	2,3
Malv-3	2,6	1,9	3,6	3,2	7,8	2,7	2,8
Delf	6,4	3,1	1,3	3,0	3,3	5,3	2,1
Cian	5,5	4,0	6,3	4,5	2,4	0,92	2,0
Pelarg	3,9	2,3	4,4	1,5	9,0	7,6	4,2
Malv	4,7	2,9	5,4	2,5	0,72	0,81	2,0

Valores em coeficiente de variação – CV (%). * n = 10 determinações, ** n = 9 determinações.

Segundo Horwitz (1982), para verificar se os valores obtidos de CV estão adequados ao tipo de amostra utilizada, basta verificar a ordem de magnitude dos analitos encontrados na amostra e comparar com uma curva de coeficientes de variação interlaboratorial, apresentadas em seu trabalho [10]. Para as antocianinas, que estão presentes no morango na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ (10^{-6}), como demonstrado na quantificação no Capítulo 4, o valor de % CV satisfatório é de 16 %. Analisando a Tabela 5.8, verifica-se que os coeficientes de variação encontram-se entre: 1,9 – 6,4 % para precisão instrumental; 1,5 – 4,9, 1,3 – 6,3 e 1,2 – 4,5 para repetibilidade (níveis baixo, médio e alto, respectivamente) e 0,72 – 9,9, 0,59 – 7,6 e 2,0 – 7,6 para precisão intermediária (níveis baixo, médio e alto, respectivamente). Estes valores encontram-se abaixo dos 16 %, considerado limite, mostrando então, que o método apresenta boa precisão.

5.4.5. Robustez

A robustez foi avaliada alterando-se as condições cromatográficas: pH, temperatura da coluna e vazão da FM. Os resultados obtidos (média $\pm$ desvio-padrão) dos tempos de retenção das três antocianinas identificadas no morango estão demonstrados na Tabela 5.9.

Tabela 5.9. Avaliação da robustez do método por variação das condições cromatográficas.

Ensaio	t_R (min)		
	Cian-3-glic	Pelarg-3-glic	Pelarg-3-rut
1	12,11 $\pm$ 0,050	13,62 $\pm$ 0,068	15,15 $\pm$ 0,076
2	11,65 $\pm$ 0,012	12,90 $\pm$ 0,070	14,42 $\pm$ 0,075
3	12,64 $\pm$ 0,095	14,29 $\pm$ 0,066	15,60 $\pm$ 0,076
4	10,75 $\pm$ 0,061	12,11 $\pm$ 0,053	13,80 $\pm$ 0,038
5	11,33 $\pm$ 0,100	13,06 $\pm$ 0,029	14,70 $\pm$ 0,090
6	10,90 $\pm$ 0,070	12,60 $\pm$ 0,082	14,09 $\pm$ 0,035
7*	11,30 $\pm$ 0,029	12,95 $\pm$ 0,079	14,44 $\pm$ 0,075

*Condição otimizada.

A variação destes parâmetros cromatográficos não mostrou variação significativa nos tempos de retenção das antocianinas, analisado através de teste-t, apresentando variâncias de 0,0338, 0 e 0,0162 para cianidina-3-glicosídeo, pelargonidina-3-glicosídeo e pelargonidina-3-rutinosídeo, respectivamente. Isso demonstra que o método aqui desenvolvido é robusto.

5.5. Conclusões

No estudo de antocianinas, não é muito comum encontrar uma validação completa e poucos são os trabalhos que desenvolvem uma avaliação dos parâmetros de validação como os descritos neste capítulo, em razão da dificuldade em se obter padrões de alta pureza desses pigmentos, já que estes são comercializados em quantidades muito baixas e sob elevados preços.

O método não foi completamente validado, mas a avaliação das figuras de mérito (linearidade – LD e LQ, seletividade e especificidade, exatidão, precisão e robustez), que foram passíveis de serem realizadas, dentro da maior limitação que foi a baixa quantidade de padrões disponíveis, demonstrou que o método desenvolvido nesta pesquisa é bastante confiável, apresentando linearidade nos intervalos de concentrações estudadas (com $R^2 > 0,99$ e altos valores de F) para cada antocianina; mostrou ser um método seletivo, em que a determinação de parâmetros cromatográficos como resolução, fatores de retenção e separação e número de pratos garantem a confiabilidade do método de separação de oito substâncias; robustez, num intervalo de confiança de 95 %, de acordo com, pequenas variações nas condições cromatográficas como pH e vazão da FM e temperatura da coluna cromatográfica; precisão para análises realizadas no mesmo dia e em dias diferentes; boa detectabilidade, com LD e LQ na ordem de $\mu\text{mol L}^{-1}$ e exatidão, com porcentagens de recuperação das antocianinas presentes no morango dentro dos níveis de aceitação da AOAC.

5.6. Referências Bibliográficas

- [1] Celeghini, R.M.S.; Sousa, I.M.O.; Silva, A.P. da; Rodrigues, R.A.F.; Foglio, M.A. **Quím. Nova**, 32 (2009) 875-878.
- [2] Ribani, M.; Bottoli, C.B.G.; Collins, C.H.; Jardim, I.C.S.F.; Melo, L.F.C. **Quím. Nova**, 27 (2004) 771-780.
- [3] Lanças, F.M. Validação de métodos cromatográficos de análise. Ed. Rima: São Carlos, 2004.
- [4] Taverniers, I.; De Loose, M.; Van Bockstaele, E. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. **Trends Anal. Chem.**, 23 (2004) 535-552.
- [5] INMETRO, Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. INMETRO, DOQ-CGCRE-008, 2003.
- [6] Swartz, M.E.; Krull, I.S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharmac. Technol.**, 3 (1998) 12-20.
- [7] EURACHEM, The fitness for purpose of analytical methods – A laboratory guide to method validation and related topics, Eurachem Guide, 1998.
- [8] Soares, L.M.V. Como obter resultados confiáveis em cromatografia. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60 (2001) 79-84.
- [9] Brito, N.M.; Amarante Junior, O.P; Polese, L.; Ribeiro, M.L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, 13 (2003) 129-146.
- [10] Horwitz, W. **Anal. Chem.**, 54 (1982) 67A – 76A.
- [11] ANVISA, Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, 2003.
- [12] International Conference on Harmonisation (ICH); Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2B (CPMP/ICH/281/95), 1995.
- [13] Thompson, M.; Ellison, S. L. R.; Wood, R.; **Pure Appl. Chem.**, 74 2002 835-855.

- [14] FAO, Validation of analytical methods for food control. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1998.
- [15] AOAC, International methods committee guidelines for validation of qualitative and quantitative food microbiological official methods of analysis, 2002.
- [16] Chandra, A.; Rana, J.; Li, Y. ***J. Agric. Food Chem.***, 49 (2001) 3515-3521.
- [17] Bridgersa, E.N.; Chinnb, M.S.; Truong, V-D. ***Industrial Crops and Products***, 32 (2010) 613–620.

Capítulo 6

MEDIDA DA ATIVIDADE ANTI-OXIDANTE

6. Medida da Atividade Anti-oxidante

6.1. Introdução

6.1.1. Anti-oxidantes

No organismo humano ocorrem reações metabólicas, naturalmente, que produzem espécies reativas de oxigênio (ERO's), também conhecidas como radicais livres, ou ainda moléculas ou fragmentos de moléculas que possuem elétron desemparelhado. Estas espécies são extremamente instáveis [1], atuando como mediadores da transferência de elétrons [2]. Por mais natural que seja a formação dessas, sabe-se que seu acúmulo ou produção em altas concentrações pode causar danos ao organismo, podendo induzir a destruição das estruturas celulares, incluindo membranas, lipídios, proteínas e ácidos nucléicos [2,3].

O consumo de frutas e vegetais está altamente associado com um estilo de vida saudável. Os consumidores se interessam por alimentos que contenham compostos que contribuam para melhoria na saúde [4]. Estudos epidemiológicos sugerem uma relação inversa entre o consumo de frutas e vegetais com a incidência de doenças crônico-degenerativas [5-7]. Entretanto, existem controvérsias a estas últimas afirmações e por isso, a atuação dos alimentos como retardadores do dano oxidativo vem sendo estudada [8,9].

Uma das causas apontadas ao efeito protetor dos alimentos é a presença de compostos anti-oxidantes [2]. Anti-oxidantes são substâncias que se opõem à oxidação ou a reações de inibição promovidas por oxigênio ou peróxido, sendo assim utilizadas na preservação de diversos produtos. São também as substâncias naturais ou sintéticas que são adicionadas a produtos com a finalidade de prevenir ou retardar a deterioração deste por ação do oxigênio do ar [6].

Dentre as substâncias presentes naturalmente nos alimentos, destacam-se como anti-oxidantes vitaminas (A, C e E) e polifenóis (ácidos fenólicos, flavonoides, antocianinas, carotenoides e tocoferóis) [1,2,10-12]. As propriedades anti-oxidantes de um composto são fortemente afetadas pelo tipo de fruta (espécie e variedade), das condições de cultivo da planta, bem como do tipo de solvente e processo de extração dos anti-oxidantes [1,2,13].

6.1.1.1. Mecanismo de Ação Anti-oxidante

O mecanismo de ação anti-oxidante, bem como a forma como os radicais livres atuam nas funções celulares não estão completamente elucidados [14]. Sabe-se que os anti-oxidantes podem agir no organismo por diferentes meios [2].

Os anti-oxidantes podem ser classificados como primários ou secundários, em que os primeiros interrompem a proliferação das espécies radicalares, por doação de elétrons ou hidrogênios aos radicais livres; já os anti-oxidantes secundários retardam a etapa de iniciação da autooxidação por quelação com metais, sequestro de oxigênio, decomposição de hidroperóxidos ou desativação de oxigênio singlete [1].

6.1.2. Antocianinas como Anti-oxidantes

Não existe um conhecimento claro dos fatores que influenciam a atividade anti-oxidante (AA) das antocianinas em sistemas biológicos [15], mas é conhecido que esses pigmentos são adequados para atuar como anti-oxidantes, devido a sua estrutura química, podendo doar elétrons ou hidrogênios a radicais livres, ou capturar esses radicais e movê-los através de sua estrutura de ressonância [14,16,17].

As diferentes estruturas químicas das antocianinas não dão somente diferentes colorações a estes compostos, mas também diferentes efeitos antioxidantes [18]. O que é sugerido na literatura é que essa atividade esteja relacionada às hidroxilas nas posições destacadas na Figura 6.1, que podem conferir elevada estabilidade ao radical formado [17]. No geral, a atividade antirradical dos pigmentos aumenta com o número de hidroxilas [19].

Figura 6.1. Estrutura básica das antocianinas, hidroxilas demonstradas aumentam a estabilidade do radical formado após reação de oxido-redução.

Juntos, os fatores estruturais modulam a estabilidade e a polaridade das antocianinas, bem como a habilidade que estes pigmentos possuem de agir como captadores de radicais e queladores de metais [20].

Estudos demonstram que as antocianinas possuem alta atividade antirradical [8,21,22], maior até que as vitaminas C e E [23]; por isso, têm sido evidenciadas como auxiliadoras na prevenção de doenças crônicas [21]. Os possíveis efeitos benéficos ao organismo, como redução no risco de doenças coronárias, atividade anticarcinogênica, efeitos anti-inflamatórios, dentre outros, têm sido associados à atividade antirradical das antocianinas e, desta forma, o interesse no estudo desses pigmentos tem aumentado ao longo dos anos [24].

Segundo Wrolstad (2004), pigmentos antociânicos são captadores efetivos de radicais livres, demonstrado por ensaios ORAC (capacidade de

absorver radical oxigênio) [24]. Yang *et al.* (2010), demonstraram que as antocianinas presentes em milho roxo são as grandes responsáveis pela capacidade anti-oxidante deste alimento [22].

Giovanelli & Buratti (2009) determinaram a atividade anti-oxidante em "*blueberries*" por diversos ensaios espectrométricos, constatando que essa fruta apresenta alta capacidade anti-oxidante e que esta se apresenta bem correlacionada com o conteúdo total de antocianinas e fenóis [25].

Patras *et al.* (2009), mostraram que antocianinas presentes no morango apresentam alta atividade antirradical; entretanto, constataram que quando esses alimentos são processados com tratamentos térmicos, sua atividade é diminuída em 25 % [26].

Tulipani *et al.* (2008) aplicaram uma metodologia de medida de atividade anti-oxidante *online* por cromatografia líquida, bem como medida *offline* pelo método FRAP (poder anti-oxidante de redução do ferro), evidenciando que os resultados obtidos nos dois ensaios demonstraram valores similares, sugerindo que são comparáveis e intercambiáveis. Uma correlação forte foi encontrada entre o conteúdo de fenóis, incluindo as antocianinas, e a atividade antirradical [27].

Inúmeros trabalhos na literatura relatam a forte atividade anti-oxidante das antocianinas mais comumente encontradas nos alimentos e plantas, e os autores atribuem às diferenças de atividade não apenas às diferenças estruturais das antocianinas, mas também ao tipo de cultivar do alimento que se está estudando, incluindo tempo de maturação, temperatura de cultivo e tipo de solo [21,28,29]. Do mesmo modo, o método de medida de anti-oxidante pode, na maioria das vezes, diferir dos resultados encontrados devido à variabilidade das condições experimentais e diferenças físico-químicas dos extratos [15,20,30].

6.1.3. Determinação da Atividade Anti-oxidante de Antocianinas

Diversos métodos são desenvolvidos para medir a eficiência dos anti-oxidantes, seja em compostos puros ou em alimentos [19,31]. Determinar a contribuição de anti-oxidantes individual ou total não é uma tarefa fácil [6,31].

São aproximadamente vinte métodos, nenhum deles universal [10], aplicando diferentes reagentes, padrões e avaliações analíticas para medida do poder ou atividade antirradical [30]. Esses métodos focam nos diferentes mecanismos de sistema de defesa anti-oxidante, tais como sequestro de radicais hidrogênio ou oxigênio, redução de radicais peróxi, inibição da peroxidação lipídica ou quelação com íons metálicos [19].

Dentre os ensaios mais comuns têm-se: ORAC, TEAC (capacidade anti-oxidante equivalente ao Trolox), TRAP (parâmetro total de anti-oxidante por sequestro de radicais) e FRAP [6,32]. Estes ensaios são baseados em reações de doação de elétrons ou doação de radicais hidrogênio [30]. O TEAC é o mais utilizado e, geralmente, para compor este ensaio se utilizam os radicais ABTS^{•+} (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) e DPPH[•] (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), em que a redução dos reagentes pelos anti-oxidantes leva à mudança significativa do espectro de absorção UV-Vis desses compostos [31].

Para melhoria de um método de medida de atividade ou potencialidade anti-oxidante, faz-se necessário o uso de derivatização. A derivatização é caracterizada como o uso de reagentes químicos e soluções e/ou métodos físico-químicos para converter a estrutura original do analito em outra molécula ou mistura de produtos de reação. É um método utilizado para melhorar a sensibilidade da detecção [33,34]. Existem dois tipos de derivatização: *offline* e *online*.

6.1.3.1. Determinações *offline*

As reações que ocorrem fora do sistema de separação (que pode ser HPLC ou CE, por exemplo) [33] ou ainda utilizando um simples espectrofotômetro são conhecidas como determinações *offline*. A utilização do espectrofotômetro é bastante comum para medida de atividade anti-oxidante total, principalmente em laboratórios de análise de rotina. Inúmeros autores utilizam desse tipo de medida para obtenção da atividade anti-oxidante de diversas matrizes, em que a medida pode ser total [13,18,25,26,35,36] ou correlacionar classes de compostos com a atividade [5,7,21,22,25,37].

Dai *et al.* (2009) avaliaram metodologias de extração de antocianinas e correlacionaram o conteúdo obtido com a capacidade anti-oxidante desses pigmentos, obtendo bons resultados [37].

Canuto *et al.* (2010) determinaram a AA de quinze polpas de frutas exóticas da região amazônica por medida espectrofotométrica e correlacionaram positivamente as atividades obtidas com o conteúdo de polifenóis e vitamina C [38].

O método convencional de medida anti-oxidante é indicado quando se deseja saber a potencialidade de um alimento frente à atividade antirradical, já que se faz uma medida total, ou ainda, quando se deseja correlacionar uma classe de compostos com a medida. Geralmente, a AA total de uma mistura de compostos apresenta efeitos aditivos, sinérgicos ou inibitórios entre os compostos [39]. Sendo assim, para uma análise mais exata e informativa acerca da potencialidade de um composto específico, este não é um método indicado, a menos que se tenha disponível cada composto para análise *offline* individual, o que muitas vezes não ocorre na maioria dos laboratórios de pesquisa.

Para se ter conhecimento dos compostos presentes em alimentos, por exemplo, que possuem atividade frente a radicais, métodos de detecção *online* direta de cada composto presente em uma matriz complexa têm sido

desenvolvidos. Essa técnica de medida foi desenvolvida também porque as medidas *offline* consumiam tempo de trabalho, com pouca elucidação da atividade, e eram consideradas tediosas [3].

6.1.3.2. Determinações *online*

A derivatização *online* é parte do sistema de separação, está integrada à instrumentação e análise, podendo ocorrer antes ou depois da coluna de separação. A derivatização pré-coluna pode melhorar a sensibilidade e a resposta cromatográfica de um método; os produtos são derivatizados e injetados no cromatógrafo [33], podendo ser considerado um método de medida *offline*.

Já a derivatização pós-coluna é essencialmente um método *online* e automatizado, que utiliza reatores que misturam o reagente químico ao eluente. Um atraso no tempo de análise é requerido (dependendo da reação) para converter o analito no produto. Esse tipo de derivatização é mais adequado à HPLC que à CE [33].

O sistema de separação acoplado com medida de anti-oxidante *online* mede os compostos que possuem atividade individualmente, de forma mais rápida e direta, baseado na separação cromatográfica [3,4,39]. A combinação da separação e a atividade medida exibem uma proeminente vantagem para a avaliação de anti-oxidantes sem a perda dos compostos bioativos [10,31,40]. A Figura 6.2, adaptada de trabalho de Niederlander *et al.* (2008), ilustra a montagem do sistema de detecção *online* com derivatização pós-coluna para medida de atividade antirradical [31].

Figura 6.2. Esquema de instrumentação de medida de atividade anti-oxidante por detecção direta em cromatografia líquida de alta eficiência. Adaptada de Niederlander *et al.* (2008).

Radicais relativamente estáveis, como o $ABTS^{•+}$ e o $DPPH^{•}$, são adicionados após a coluna de separação, e os anti-oxidantes são detectados por diminuição na absorvância dos radicais devido a sua conversão para a forma reduzida (incolor) na forma de picos negativos, que podem ser integrados para quantificação da medida [4,31,40]. O método é adequado para eluição por gradiente ou isocrática, usando pH de 3,0 – 14,0 [31].

Koleva *et al.* (2000) mostraram que o ensaio é mais sensível para o $ABTS^{•+}$ do que para o $DPPH^{•}$, pois o primeiro é mais solúvel em água e assim se aplica melhor a anti-oxidantes solúveis neste meio, como é o caso das antocianinas, e ainda dissolve melhor na FM [41]; também é comprovado que a cinética de reação do $DPPH^{•}$ pode ser mais lenta em comparação com o $ABTS^{•+}$ [3]. O radical $ABTS^{•+}$ é utilizado com maior frequência para análise de antocianinas porque possui absorção máxima em 600, 734 e 815 nm, onde não há interferências de absorção de solventes ou dos próprios pigmentos, ao contrário do radical $DPPH^{•}$, que absorve em 517 nm, comprimento de onda de absorção das antocianinas [31,39].

É possível encontrar alguns trabalhos de derivatização *online* para medida de atividade anti-oxidante na literatura [29,30], por exemplo, Beekwilder *et al.* (2005) monitoraram e identificaram compostos anti-oxidantes individuais

em framboesa para determinar a contribuição da AA e comparar com diferentes estágios e cultivares da fruta. Para a identificação dos anti-oxidantes, utilizaram um espectrômetro de massas acoplado a uma das linhas de saída dos compostos eluídos pela coluna cromatográfica através de um *split* [4].

Stalmach *et al.* (2006) separaram ácidos orgânicos presentes em amostras de café e mediram a AA destes frente ao ABTS^{•+} por detecção *online*, na qual os compostos eluídos também foram identificados por espectrometria de massas [38].

Li *et al.* (2007) compararam o método de detecção *online* com métodos *offline* (DPPH e β -caroteno) na análise de óleos essenciais, constatando que o primeiro método é muito mais eficiente e rápido para identificação e quantificação de substâncias anti-oxidantes [3].

He *et al.* (2010) também utilizaram HPLC-DAD-MS para identificação de anti-oxidantes em extrato de Gardenia (*Gardenia jasminoides Ellis*), obtendo excelentes resultados [40].

A alta resolução cromatográfica, aliada à rápida detecção anti-oxidante, faz desta uma ferramenta de fácil aplicação para análises de rotina de compostos anti-oxidantes [31]. Um laboratório que possua um equipamento de cromatografia líquida, facilmente consegue montar um sistema do tipo FIA (análise por injeção em fluxo) para segmentação da análise por detecção anti-oxidante *online*.

6.2. Objetivos

Desenvolver uma metodologia de separação acoplada (*online*) a um método de medida de atividade anti-oxidante. Medir o poder anti-oxidante das oito antocianinas estudadas e correlacionar esta propriedade com a característica cromatográfica de retenção e à estrutura.

6.3. Parte Experimental

6.3.1. Materiais e Equipamentos

6.3.1.1. Amostras e Reagentes

Amostras de morango (*Fragaria vesca*) obtidas em mercado local foram utilizadas para verificar a aplicabilidade do método de detecção anti-oxidante. Os padrões de antocianinas utilizados para análise do poder anti-oxidante foram: cloreto de cianidina, cloreto de malvidina, cloreto de pelargonidina, cloreto de delphinidina, cloreto de cianidina-3-O-glicosídeo, cloreto de cianidina-3,5-O-diglicosídeo, cloreto de malvidina-3-O-glicosídeo e cloreto de pelargonidina-3-O-glicosídeo, obtidos da Sigma Aldrich (P.A., São Paulo, Brasil) de alto grau de pureza, mantidos em freezer para evitar degradação. A fase móvel foi composta por metanol (grau HPLC, J. T. Backer, Xalostoc, México), água ultrapura (MilliQ[®] - marca Millipore, modelo Direct-quantum TMEX - Bedford, MA, USA) e ácido fosfórico (P.A., Synth, São Paulo, Brasil). Para medida de atividade anti-oxidante foram utilizados os padrões de ABTS^{•+} (2,2-Azinobis (3-etilbenzoatiazolina-6-sulfonado)) e de Trolox[®] (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), ambos obtidos da Sigma Aldrich (P.A., São Paulo, Brasil), além de sais de persulfato de potássio (Ecibra, São Paulo, Brasil), dihidrogeno fosfato de potássio (Merck, Darmstadt, Alemanha) e hidróxido de potássio (Merck, Darmstadt, Alemanha).

6.3.1.2. Equipamentos

Foi utilizado um cromatógrafo a líquido Shimadzu (Kyoto, Japão), operando com um sistema de bombeamento de solvente (bomba quaternária LC-10Avp) e válvula injetora manual Rheodyne, com alça de amostragem de 20

μL e forno Waters (Milford, MA, USA) mantido a 30 °C. O sistema está acoplado a um detector com arranjo de diodos Shimadzu (SPD-M10Avp), que operou na faixa de 450 a 750 nm, sistema controlador Shimadzu SCL-10Avp e software para aquisição e tratamento de dados, CLASS-VP.

O sistema de derivatização pós-coluna utilizou uma bomba peristáltica Ismatec – modelo ISM 9360 (USA), um misturador em formato de “T” e bobina de reação. As medidas foram adquiridas pelo software CLASS-VP e analisadas em λ de 734 nm ($\epsilon = 1,5 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [39,42] por detector com arranjo de diodos Shimadzu (SPD-M10Avp); para tratamento dos dados foi utilizado o programa Origin 5.0 (Microcal Inc.).

Também foram utilizados no processo de extração: Ultra Turrax® (Labortechnik – modelo T25 - Suíça), balança analítica (Mettler Toledo – modelo AB204 – São Paulo - Brasil), ultrassom (Cole-Parmer – modelo 8890 – Illinois – USA), centrífuga (Quimis® - São Paulo - Brasil).

6.3.2. Procedimentos Experimentais

6.3.2.1. Preparo de Soluções-padrão

Soluções estoque dos padrões de antocianinas e antocianidinas foram preparadas nas concentrações de 200 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sendo dissolvidos em solução aquosa de ácido clorídrico 0,1 % (v/v) e estocados em freezer à - 2 °C até uso.

6.3.2.2. Preparo da Solução de ABTS^{•+}

O cátion ABTS^{•+} foi produzido pela reação de 7,0 mmol L^{-1} de uma solução-estoque de ABTS com 2,5 mmol L^{-1} de persulfato de potássio. A mistura foi armazenada em frasco escuro, em temperatura ambiente, por 16 horas antes

do uso, para que se garanta a completa formação do radical ABTS^{•+}. A solução ABTS^{•+} foi então diluída com tampão fosfato (pH 7,4), de acordo com trabalhos de Re *et al.* (1999), Canuto *et al.* (2010) e Rufino *et al.* (2007) [10,42,43], para a concentração de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Uma curva de calibração, para comparação do poder anti-oxidante das antocianinas, foi feita utilizando soluções metanólicas de padrão Trolox[®] (ácido 6-hidróxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) nas concentrações: 0,125; 0,25; 0,50; 1,00; 2,00 e 3,00 mmol L^{-1} .

6.3.2.3. Extração da Amostra

A extração de antocianinas em morango foi realizada de acordo com metodologia descrita no Capítulo 4: 5,0 g de polpa de morango (obtida a partir da mistura de caixas de morango trituradas em Ultra Turrax[®]) foram homogeneizadas com 10,0 mL de solução de metanol contendo 5,5 % de HCl (v/v) em ultrassom por 10 minutos a 20 °C. A mistura foi centrifugada a 3500 rpm por 10-15 minutos em temperatura ambiente e o sobrenadante retirado e acondicionado em frasco âmbar após a etapa do ultrassom; este procedimento foi repetido mais quatro vezes. O extrato final obtido mantido em freezer a -2°C até uso. Antes de ser injetado, o mesmo foi filtrado em membrana Millipore[®] 0,45 μm .

6.3.2.4. Separação Cromatográfica e Medida de Atividade Anti-oxidante Pós-coluna

As medidas de atividade anti-oxidante foram obtidas por método de separação acoplado a detecção online da reação dos componentes eluídos pelo sistema cromatográfico com o radical ABTS^{•+}. Extrato de morango e padrões de antocianinas, bem como o Trolox foram injetados em um cromatógrafo a

líquido com detector de arranjo de diodos (DAD). Foi utilizada uma coluna cromatográfica C18 Phenomenex (250 x 4,6 mm; 0,40 μm d.i.) (Torrance, Califórnia, USA), com temperatura mantida constante (30 °C). A fase móvel foi composta por: A – água ultrapura com ácido fosfórico 0,1 % e B – metanol com ácido fosfórico 0,1 %. A vazão utilizada foi de 1,0 mL min⁻¹ e o volume injetado foi de 20,0 μL . O comprimento de onda utilizado na análise foi 522 nm para as antocianinas e 290 nm para o Trolox. A medida se deu por separação otimizada (Capítulo 3) através do gradiente linear de eluição: 25 – 55 %B em 30 minutos.

A medida *online* do poder anti-oxidante foi realizada após a reação entre os compostos eluídos através da coluna cromatográfica com a FM (vazão 1,0 mL min⁻¹) e o radical ABTS^{•+} (vazão 1,27 mL min⁻¹); a reação procedeu-se com a mistura dos componentes em um misturador em formato de “T” e bobina de reação (250 cm de comprimento e 0,80 mm de diâmetro interno), até chegada dos analitos ao detector UV-Vis e registro dos sinais na forma de pico negativo, indicando uma potencialidade dos compostos separados como sequestrador de radicais.

O esquema da instrumentação está apresentado na Figura 6.3. É possível observar, comparando-se com o esquema da Figura 6.2, que não se fez um registro da separação simultaneamente à medida *online*, pois não haviam disponíveis dois detectores para medida de absorvância no visível, mostrando que mesmo com limitações experimentais é possível o desenvolvimento de uma metodologia de detecção *online* em qualquer laboratório. Sendo assim, procedeu-se experimentalmente como demonstrado na Figura 6.3, onde não houve nenhum tipo de problema na identificação dos picos negativos, visto que as medidas foram realizadas com os padrões e a ordem de eluição de cada um é bem conhecida (Capítulo 3) e o método de separação é bastante confiável, de acordo com a avaliação do desempenho do método (Capítulo 5).

Figura 6.3. Esquema instrumental de detecção online para medida da atividade anti-oxidante desenvolvido no laboratório.

6.3.2.5. Análise dos Resultados

A obtenção do poder anti-oxidante (denominado aqui como k_{ox} – coeficiente de oxidação) se deu pela razão entre o coeficiente angular da curva de calibração da substância analisada (a_s) pelo coeficiente angular da curva de calibração do padrão de referência Trolox (a_T) [39], de acordo com a Equação 6.1. A integração das áreas dos picos negativos das antocianinas e do Trolox foram realizadas utilizando os programas Origin 5.0 (Microcal Inc.) e Excel (Microsoft Inc.).

$$PoderAntioxidante = k_{ox} = \frac{a_s}{a_T} \quad \text{Equação 6.1.}$$

O estudo teórico da correlação do poder anti-oxidante com as características estruturais e de separação foi realizado utilizando os seguintes programas: Pc Spartan Pro 1.0.0.1 (Wavefunction Inc.), Openbabel 2.2.3. (GNV General Public License), amsol 7.0 (University of Minnesota) [44], gepol versão 8

(Universidad de Valencia) [45], R 2.12.1 (R Development Core Team), StatView 4 (Abacus Corporation) e ainda programas em C, perl e R desenvolvidos pelo Prof. Dr. João Pedro Simon Farah (IQ-USP). Foram realizadas análise conformacional (campo de força MMFF) para as oito antocianinas, seguida de otimização de geometria AM1 com análise de área de acesso do solvente (SASA) utilizando cargas CM2 para gerar descritores [46].

6.4. Resultados e Discussão

6.4.5. Medida de Atividade Anti-oxidante

Neste trabalho, optou-se por desenvolver as medidas de atividade anti-oxidante utilizando o radical $ABTS^{•+}$. O método ABTS tem sido utilizado tanto para materiais biológicos, compostos puros ou extratos de plantas de natureza hidrofóbica ou hidrofília [17]. O cromógeno ABTS apresenta coloração azul-esverdeada com absorção máxima em 342 nm, é bastante solúvel em água e quimicamente estável. Uma vez gerado o radical, passa a apresentar novas características espectroscópicas, com absorções máximas em 414, 645, 734 e 815 nm [17]. Para desenvolvimento desta medida, utilizou-se o comprimento de onda de 734 nm.

O radical $ABTS^{•+}$ é indicado para ensaios com pigmentos, como as antocianinas, por apresentar absorção máxima em comprimento de onda em que não se detectam as antocianinas, reduzindo os riscos de interferências [17].

O composto anti-oxidante reduz o radical $ABTS^{•+}$ (previamente formado com a adição de persulfato de potássio durante o preparo) (Figura 6.4) [6,43]. O $ABTS^{•+}$ é formado pela reação: $ABTS \longrightarrow ABTS^{•+} + e^-$, com doação de elétron ao persulfato (agente oxidante); o $ABTS^{•+}$ formado é incolor ou possui coloração verde mais clara. A redução da concentração do $ABTS^{•+}$ é linearmente dependente da concentração de anti-oxidante [22,30]. Re *et al.* (1999)

absorvância, como foi o caso. Por isso, optou-se em utilizar ácido fosfórico na FM para estas medidas, pois este ácido é capaz de deixar o pH da FM baixo, pH da fase aquosa igual a 2,7, mantendo a estabilidade das antocianinas e não afetar a absorção do ABTS^{•+}.

Após os inúmeros testes, conseguiu-se os resultados de decaimento de sinal nas condições descritas na parte experimental (bobina de reação de 250 cm de comprimento e 0,80 mm de diâmetro interno, vazão da solução 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ABTS^{•+} de 1,27 mL min⁻¹), não havendo necessidade de modificar nenhuma das condições de separação otimizadas neste trabalho (Capítulo 3).

Com a metodologia de medida de atividade anti-oxidante aqui desenvolvida, foi possível injetar as antocianinas e o padrão de referência (Trolox) em seis concentrações diferentes (Tabela 6.1) e, então, plotar gráficos de áreas dos picos negativos *versus* a concentração (Figura 6.5); com os resultados das equações da reta obtidas (Tabela 6.1) a partir da inclinação das curvas, calculou-se o poder anti-oxidante, utilizando a Equação 6.1. O resultado está apresentado na Tabela 6.2.

Tabela 6.1. Parâmetros das curvas analíticas de medida de atividade anti-oxidante das antocianinas e do padrão de referência (Trolox).

Substância	Faixa de Medida (mmol L ⁻¹)	a	b	R ²	F	p (10 ⁻⁶)
<i>Cian-3,5-diglic.</i>	115,89 – 309,0	401 ± 13	- 35212 ± 2880	0,99	959,70	6,46
<i>Cian-3-glic.</i>	154,9 – 413,0	897 ± 21	- 94493 ± 6350	0,99	1761,9	1,93
<i>Pelarg-3-glic.</i>	160,1 – 427,0	491 ± 15	- 57427 ± 4597	0,99	1075,32	5,16
<i>Malv-3-glic.</i>	141,8 – 378,0	428 ± 15	- 33776 ± 4163	0,99	782,28	9,72
<i>Delfinidina</i>	221,3 – 590,0	202 ± 7	- 31344 ± 3249	0,99	698,87	0,122
<i>Cianidina</i>	232,5 – 620,0	122 ± 5	+ 8307 ± 2102	0,99	672,69	0,131
<i>Pelargonidina</i>	244,6 – 652,2	21 ± 1	+ 522 ± 395	0,99	647,85	0,141
<i>Malvidina</i>	204,4 – 545,0	82 ± 3	+ 4322 ± 1264	0,99	642,23	0,143
<i>Trolox</i>	0,125 – 3,00	201028 ± 6437	+ 15340 ± 9948	0,99	975,24	6,27

a e b, coeficientes angular e linear, respectivamente da equação: $y = ax + b$, onde y = área do pico negativo em unidade abitrária e x = concentração em mmol L⁻¹; R² = coeficiente de determinação (n = 6), F = teste de Fisher e p = coeficiente de variância.

Figura 6.5. Curvas analíticas de: **(A)** cianidina-3,5-diglicosídeo, **(B)** cianidina-3-glicosídeo, **(C)** pelargonidina-3-glicosídeo, **(D)** malvidina-3-glicosídeo, **(E)** delphinidina, **(F)** cianidina, **(G)** pelargonidina, **(H)** malvidina e **(I)** Trolox.

Tabela 6.2. Poder anti-oxidante, das antocianinas estudadas, obtidos a partir de medida de atividade anti-oxidante por derivatização pós-coluna e detecção *online*.

Antocianina	a_S/a_T (10⁻⁶)
<i>Cianidina-3,5-diglicosídeo</i>	1995
<i>Cianidina-3-glicosídeo</i>	4460
<i>Pelargonidina-3-glicosídeo</i>	2439
<i>Malvidina-3-glicosídeo</i>	2129
<i>Delfinidina</i>	1006
<i>Cianidina</i>	608
<i>Pelargonidina</i>	106
<i>Malvidina</i>	406

Assim, pelo método aplicado, estabeleceu-se que a capacidade anti-oxidante das antocianinas estudadas apresenta a seguinte ordem decrescente: cianidina-3-glicosídeo > pelargonidina-3-glicosídeo > malvidina-3-glicosídeo > cianidina-3,5-diglicosídeo > delfinidina > cianidina > malvidina > pelargonidina.

O que se observa é que aumentando o número de hidroxilas, aumenta a capacidade anti-oxidante, ou seja, maior é o efeito de inibição oxidativa dos compostos; já a presença de grupos metoxila, substituindo as hidroxilas, reduz esta capacidade. Estas afirmações são comumente encontradas na literatura, como nos trabalhos de Mazza *et al.* (2002), Lachman *et al.* (2009), He *et al.* (2010), Azevedo *et al.* (2010) e Yi *et al.* (2010) [9,19,21,40,48].

Kahkönen & Heinonen (2003), em ensaios de medida de AA, relatam que a pelargonidina é a antocianina com a menor atividade, como encontrado nas medidas aqui demonstradas; dentre as glicosiladas, a ordem de atividade que concordou com os resultados obtidos neste trabalho, em que a cianidina-3-glicosídeo possui maior atividade do que a pelargonidina-3-glicosídeo e para as agliconas [20].

Os resultados obtidos neste trabalho corroboram com o obtido por Azevedo *et al.* (2010), que encontraram que a atividade anti-oxidante diminui na sequência: delfinidina > cianidina > malvidina e para as glicosiladas: cianidina-3-glicosídeo > malvidina-3-glicosídeo, mas os autores afirmam que a

capacidade das glicosiladas e agliconas não diferem significativamente (em valores) entre mesmos padrões (glicosiladas-agliconas) [19].

Já no trabalho de Lachman *et al.* (2009), os autores afirmam que atividade antirradical das antocianinas decresce na ordem: delphinidina > malvidina > cianidina > pelargonidina [21], não concordando totalmente com o encontrado nas medidas apresentadas neste.

Alta atividade antirradical está relacionada à grande estabilidade de deslocalização eletrônica e ligação de hidrogênio intramolecular entre flavonoides e antocianinas [49]. As posições 3' e 4' do anel B (Figura 6.1) são importantes na determinação do potencial oxidativo, pois participam da deslocalização de elétrons. Já substituintes, como OH ou OCH₃, na posição C3, podem afetar a planaridade da molécula, causando perda da coplanaridade do anel B com os anéis A e C (Figura 6.1); sabe-se que o ângulo de torção da ligação entre os anéis B e C está correlacionado com a atividade das antocianinas [48].

Alguns autores afirmam que a glicosilação diminui a capacidade de captura de radicais, em comparação com a aglicona, reduzindo a habilidade de deslocalização de elétrons e, por isso, a atividade anti-oxidante é diminuída [8,9,15,17,48]. Estes resultados, entretanto, não foram encontrados nas medidas desenvolvidas, bem como por autores destacados nos parágrafos anteriores. Entretanto, o que Yi *et al.* (2010) afirmam, e o estudo aqui desenvolvido demonstra concordância, é que as antocianinas monoglicosiladas exibem atividade maior do que as diglicosiladas [48].

Dados de medidas de atividade anti-oxidante de antocianinas obtidos da literatura são difíceis de interpretar, pois diferentes métodos são utilizados para determinar a potencialidade desses pigmentos, compostos da mesma classe reagem de forma diferente a ensaios diferentes de medida de atividade anti-oxidante. Os resultados podem ser significativamente diferentes de acordo com o método de investigação [12,15]. Essa grande variedade de interpretações

também pode ocorrer devido ao pH com que se desenvolvem as análises [6,15], já que diferentes formas de antocianinas existem, dependendo do pH do meio em que se trabalha [15,20]. Outro aspecto que diferencia uma medida da outra, mesmo sendo de uma mesma amostra, é o método de extração, o tratamento da amostra e, ainda, as condições nas quais o alimento foi cultivado (clima, temperatura, tipo de solo, época do ano, etc.) [21].

A Figura 6.6 apresenta os cromatogramas obtidos na separação dos padrões das antocianinas pela coluna C18 e a medida obtida através do sistema de detecção *online*, após reação com o $\text{ABTS}^{+\cdot}$.

Figura 6.6. Comparação cromatográfica da separação e medida de atividade anti-oxidante de oito antocianinas: 1) ciadina-3,5-diglicosídeo, 2) cianidina-3-glicosídeo, 3) pelargonidina-3-glicosídeo, 4) malvidina-3-glicosídeo, 5) delphinidina, 6) cianidina, 7) pelargonidina, 8) malvidina e 9) Trolox. (A) Condições cromatográficas: coluna C18 (250 x 4,6 mm; 0,40 μm d.i.), FM: A – água com H_3PO_4 0,1 % (v/v) e B - MeOH com H_3PO_4 0,1 % (v/v), gradiente de eluição de 25 – 55 % B em 30 min, 100 % B em 50 min, volume de injeção 20 μL , vazão da FM 1,0 mL min^{-1} , coluna mantida à 30 $^{\circ}\text{C}$, $\lambda = 522 \text{ nm}$. (B) Condições de medida de AA: radical $\text{ABTS}^{+\cdot}$ com vazão de 1,27 mL min^{-1} misturado com componentes eluídos através da coluna cromatográfica com a FM em tubo "T" e reator (250 cm de comprimento e 0,80 mm de d.i.), detecção dos picos negativos em $\lambda = 734 \text{ nm}$.

Para o extrato de morango, o resultado obtido da medida *online* encontra-se na Figura 6.7, onde a identificação da atividade, na forma de pico negativo, da cianidina-3-glicosídeo, da pelargonidina-3-glicosídeo e da pelargonidina-3-rutinosídeo pode ser observada, assim como outros picos negativos, visto esta matriz apresentar uma infinidade de compostos potencialmente anti-oxidantes, pois a atividade anti-oxidante dos alimentos não está associada a um único composto ou classe de compostos, mas sim, aos diversos componentes que conferem a complexidade dessas matrizes, assim como Tulipani *et al.* (2008) e Konic-Ristic *et al.* (2011) afirmam em seus trabalhos [7,27].

Em razão da identificação de grande quantidade de compostos em matrizes complexas algumas vezes ser dificultada, Exarchou *et al.* (2006) sugerem o uso de técnicas hifenizadas como a ressonância magnética nuclear ou a espectrometria de massas para identificação de todos os compostos anti-oxidantes [50].

Figura 6.7. Comparação cromatográfica da separação e medida de atividade anti-oxidante de extrato de morango. (A) Condições cromatográficas: coluna C18 (250 x 4,6 mm; 0,40 μm d.i.), FM: A – água com H_3PO_4 0,1 % (v/v) e B - MeOH com H_3PO_4 0,1 % (v/v), gradiente de eluição de 25 – 55 % B em 30 min, volume de injeção 20 μL , vazão da FM 1,0 mL min^{-1} , coluna mantida à 30 $^\circ\text{C}$, $\lambda = 522$ nm. (B) Condições de medida de AA: radical ABTS^{++} com vazão de 1,27 mL min^{-1} misturado com componentes eluídos através da coluna cromatográfica com a FM em tubo “T” e reator (250 cm de comprimento e 0,80 mm de d.i.), detecção dos picos negativos em $\lambda = 734$ nm.

O método desenvolvido, como se afirma na literatura [3,39,50], une a potencial eficiência da separação cromatográfica com a detecção pós-coluna, baseado em sistema de oxidação. O ABTS^{++} foi selecionado como reagente de medida por compor um método sensível, prático e rápido [17], proporcionando boas respostas [31].

6.4.2. Cálculos Teóricos de Correlação da Atividade Anti-oxidante

Os resultados obtidos experimentalmente (retenção cromatográfica e poder anti-oxidante – Tabela 6.3) foram utilizados para estudar uma possível correlação entre os mesmos.

Tabela 6.3. Dados de fator de retenção (k) e poder anti-oxidante das antocianinas estudadas.

Antocianina	k	$a_s/a_T (10^{-6})$
<i>Cianidina-3,5-diglicosídeo</i>	1,23	1994,8
<i>Cianidina-3-glicosídeo</i>	2,91	4459,9
<i>Pelargonidina-3-glicosídeo</i>	3,71	2439,4
<i>Malvidina-3-glicosídeo</i>	4,31	2128,6
<i>Delfinidina</i>	4,96	1006,0
<i>Cianidina</i>	6,37	607,63
<i>Pelargonidina</i>	7,78	106,13
<i>Malvidina</i>	8,15	406,11

Após análise conformacional das antocianinas e otimização de geometria, foram gerados descritores de acordo com trabalho de Stanton e Jurs (1990) [46], para então estudar a correlação entre a propriedade e o coeficiente de partição.

A Figura 6.8 mostra que existe uma correlação entre o poder anti-oxidante e a retenção cromatográfica, exceto para um ponto (cianidina-3,5-diglicosídeo).

Figura 6.8. Correlação entre o poder anti-oxidante e o fator de retenção (k) das antocianinas.

Uma tendência é observada no gráfico da Figura 6.8 e esta sugere que as propriedades que contribuem para o aumento no poder de oxidação, contribuem também para a interação soluto-solvente, demonstrando baixa retenção.

Analisando as estruturas moleculares (Figura 6.9) pode-se notar que as antocianinas que possuem glicose em sua estrutura são mais solúveis, em solventes polares, e a solubilidade é um fator bastante importante na retenção.

Figura 6.9. Estruturas químicas das antocianinas estudadas.

A solubilidade não é o único fator responsável pelo poder anti-oxidante. Certamente a conjugação entre os dois sistemas π também é muito importante. Estudos de relação entre estrutura-atividade de flavonoides afirmam que a capacidade de sequestrar radicais livres desses compostos está associada à conjugação dos sistemas π [47].

A conjugação pode ser afetada por: ângulo diedro, afetando a coplanaridade dos sistemas conjugados; efeito estérico de grupos substituintes na cadeia carbônica, que impedem a solvatação de hidroxilas ligadas a estrutura carbônica e conseqüentemente diminuem a ressonância do sistema e ainda, por interações intramoleculares (através de ligação de hidrogênio) entre hidroxilas ligadas a carbonos adjacentes, que também podem afetar a conjugação.

Um ponto fora da tendência observada na Figura 6.8 pode ser facilmente explicado. A cianidina-3,5-diglicosídeo é uma substância que não pode ser comparada com as demais, pois é a única que apresenta duas glicoses na estrutura e por isso se dissolve mais na FM, apresentando baixa retenção cromatográfica (elui primeiro pela coluna C18).

Excluindo-se a cianidina-3,5-diglicosídeo do gráfico da Figura 6.8 é possível obter um coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,80, com coeficiente de variância para o modelo linear ajustado de 0,00684, demonstrando assim, uma boa correlação entre o poder anti-oxidante e a retenção cromatográfica.

Diversos autores têm estudado parâmetros físico-químicos, como entalpia de formação e número de hidroxilas, para elucidar características biológicas, como a atividade antirradical [51-54]. Lien *et al.* (1999), através de estudos teóricos, onde criaram equações capazes de prever a potencialidade anti-oxidante de um composto fenólico, afirmam que a capacidade dos flavonoides e especificamente das antocianinas está intimamente correlacionada com a posição e número de hidroxilas alocados aos anéis aromáticos [47]. Li *et al.* (2007), analisaram 55 substâncias diferentes por QSRR

com membrana artificial imobilizada e encontraram 10 parâmetros físico-químicos que descrevem bem o sistema de medida [32].

Como dito acima, a conjugação também é afetada pela conformação da molécula, que está relacionada ao ângulo entre os sistemas conjugados, pois a ligação simples entre os dois sistemas π é livre para rotações (Figura 6.10), desde que não haja impedimentos estéricos, como por exemplo, a presença de açúcares ligados ao esqueleto carbônico. Dependendo do ângulo entre os sistemas conjugados haverá ou não a possibilidade de ressonância.

Figura 6.10. Ligação simples livre para rotações.

Analisando os ângulos diedros de cada confômero de cada antocianina, foram calculadas as médias ponderadas destes e plotou-se dois gráficos: um contra a retenção cromatográfica (Figura 6.11) e o outro contra o poder antioxidante (Figura 6.12).

Figura 6.11. Gráfico de log do fator de retenção *versus* a média ponderada dos ângulos diedros dos confômeros do sistema conjugado.

No gráfico da Figura 6.11 podem ser observadas duas tendências de decaimento da retenção quando o ângulo diedro é próximo de zero. Essas tendências são mais acentuadas para as moléculas glicosiladas (com exceção à diglicosilada, já discutida anteriormente). A presença de glicose dificulta a rotação da ligação entre os sistemas conjugados, mantendo o ângulo diedro médio mais próximo de zero, assim como o açúcar solubiliza a substância melhor na FM, por isso observa-se essa tendência no gráfico.

Figura 6.12. Gráfico de poder anti-oxidante *versus* a média ponderada dos ângulos diedros dos confôrmeros do sistema conjugado.

Já o poder anti-oxidante apresenta dependência aos ângulos contrária à retenção (Figura 6.12), demonstrando um aumento no poder com a proximidade de ângulo zero, pois os orbitais moleculares do sistema π se encontrarão paralelos, facilitando a conjugação.

Estes resultados são concordantes com estudos de Naseem *et al.* (2004) em ultravioleta [55] e com estudos preliminares (manuscritos em preparação e trabalhos apresentados em congressos – vide Súmula Curricular) do sítio de solubilização em SDS de flavonoides e antocianinas por MEKC/QSRR e dinâmica molecular, que também mostraram que a interação soluto-micela também depende da conjugação dos anéis.

Os resultados demonstrados aqui já apresentam boas conclusões a cerca da correlação entre a retenção e o poder anti-oxidante; entretanto, ainda há necessidade de um estudo mais detalhado dos descritores, considerando área de acesso do solvente e cargas parciais (por exemplo), para entender melhor o efeito do ângulo e das interações no poder anti-oxidante e na retenção dessas substâncias.

6.5. Conclusões

Foi possível adaptar um método eficiente de medida da capacidade anti-oxidante individual, através do acoplamento de um sistema em fluxo com a cromatografia líquida, reagindo os compostos eluídos pela coluna cromatográfica com um radical ($\text{ABTS}^{\bullet+}$) que mede a potencialidade anti-oxidante, através de reações de transferência de elétrons. Esta metodologia foi aplicada a padrões de antocianinas e extrato de morango. A grande vantagem deste sistema é a medida direta de compostos individuais e o baixo consumo de tempo e reagente para tais medidas. Um novo método de detecção, com uso de um único detector de absorvância UV-Vis, foi desenvolvido, mostrando que este apresenta mesma eficiência que os métodos descritos na literatura, além da facilidade de implementação em qualquer laboratório de pesquisa.

O resultado da medida, inibição do radical, é observado pela detecção a 734 nm de um pico negativo e o mesmo pode ser quantificado. Através da inclinação de curvas de calibração da medida de inibição é possível obter o poder anti-oxidante da substância estudada, correlacionando com o padrão de referência para a medida (Trolox), através do método TEAC.

A partir do poder anti-oxidante determinado experimentalmente é possível afirmar que o aumento deste está correlacionado com a diminuição da retenção cromatográfica das antocianinas e que os dois fatores estão intimamente relacionados ao efeito da conjugação dos sistemas π da molécula, afetado pelos sítios de solvatação, ângulos diedros e possibilidade de interações intramoleculares.

6.6. Referências Bibliográficas

- [1] Melo, E. de A.; Guerra, N.B. **Bol. SBCTA**, 36 (2002) 1-11.
- [2] Oliveira, A.C. de; Valentim, I.B.; Goulart, M.O.F.; Silva, C.A.; Bechara, E.J.H.; Trevisan, M.T.S. **Quím. Nova**, 32 (2009) 689-702.
- [3] Li, S.-Y.; Yu, Y.; Li, S.-P. **J. Agric. Food Chem.**, 55 (2007) 3358-3362.
- [4] Beekwilder, J.; Jonker, H.; Meesters, P.; Hall, R.D.; van der Meer, I.M.; Ric de Vos, C.H. **J. Agric. Food Chem.**, 53 (2005) 3313-3320.
- [5] Lopez-Martinez, L.X.; Oliart-Ros, R.M.; Valerio-Alfaro, G.; Lee, C.-H.; Parkin, K.L.; Garcia, H.S. **LWT**, 42 (2009) 1187-1192.
- [6] Huang, D.; Ou, B.; Prior, R.L. **J. Agric. Food Chem.**, 53 (2005) 1841-1856.
- [7] Konic-Ristic, A.; Savikin, K.; Zdunic, G.; Jankovic, T.; Juranic, Z.; Menkovic, N.; Stankovic, I. **Food Chem.**, 125 (2011) 1412-1417.
- [8] Mazza, G. **Ann. Ist. Super. Sanità**, 43 (2007) 369-374.
- [9] Mazza, G.; Kay, C.D.; Cottrell, T.; Holub, B. **J. Agric. Food Chem.**, 50 (2002) 7731-7737.
- [10] Canuto, G.A.B.; Xavier, A.A.O.; Neves, L.C.; Benassi, M.T. **Rev. Bras. Frutic.**, 32 (2010) 1196-1205.
- [11] Kahkonen, M.P.; Heinamaki, J.; Ollilainen, V.; Heinonen, M. **J. Sci. Food Agric.**, 83 (2003) 1403-1411.
- [12] Tabart, J.; Kevers, C.; Pincemail, J.; Defraigne, J.-O.; Dommès, J. **Food Chem.**, 120 (2010) 607-614.
- [13] Koca, I.; Karadeniz, B. **Scientia Horticulturae**, 121 (2009) 447-450.
- [14] Volp, A.C.P.; Renhe, I.R.T.; Barra, K.; Stringueta, P.C. **Rev. Bras. Nutr. Clin.**, 23 (2008) 141-149.
- [15] Borkowski, T.; Szymusiak, H.; Gliszcznska-Swiglo, A.; Rietjens, I.M.C.M.; Tyrakowska, B. **J. Agric. Food Chem.**, 53 (2005) 5526-5534.
- [16] Kong, J.-M.; Chia, L.-S.; Goh, N.-K.; Chia, T.F.; Brouillard, R. **Phytochem.**, 64 (2003) 923-933.

- [17] Kuskoski, E.M.; Asuero, A.G.; García-Parilla, M.C.; Troncoso, A.M.; Fett, R. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 24 (2004) 691-693.
- [18] Lohachoompol, V.; Mulholland, M.; Szrednicki, G.; Craske, J. **Food Chem.**, 111 (2008) 249-254.
- [19] Azevedo, J.; Fernandes, I.; Faria, A.; Oliveira, J.; Fernandes, A.; Freitas, V. de; Mateus, N. **Food Chem.**, 119 (2010) 518-523.
- [20] Kahkonen, M.P.; Heinonen, M. **J. Agric. Food Chem.**, 51 (2003) 628-633.
- [21] Lachman, J.; Hamouz, H.; Sulc, M.; Orsák, M.; Pivec, W.; Hejmánková, A.; Dvorák, P.; Cepl, J. **Food Chem.**, 114 (2009) 836-843.
- [22] Yang, Z.; Zhai, W. **Innovative Food Science and Emerging Technol.**, 1 (2010) 169-176.
- [23] Castañeda-Ovano, A.; Pacheco-Hernández, Ma. de L.; Páez-Hernández, Ma. E.; Rodríguez, J.A.; Galán-Vidal, C.A. **Food Chem.**, 113 (2009) 589-871.
- [24] Wrolstad, R.E. **Food Chem. and Toxicol.**, 69 (2004) C421-C425.
- [25] Giovanelli, G.; Buratti, S. **Food Chem.**, 112 (2009) 903-908.
- [26] Patras, A.; Brunton, N.P.; Pieve, S. da, Butler, F. **Innovative Food Sci. Emerg. Technol.**, 10 (2009) 308-313.
- [27] Tulipani, S.; Mezzetti, B.; Capocasa, F.; Bompadre, S.; Beekwilder, J.; Vos, C.H.R. de; Capanoglu, E.; Bovy, A.; Battino, M. **J. Agric. Food Chem.**, 56 (2008) 696-704.
- [28] Olsson, M. E.; Ekvall, J.; Gustavsson, K-E.; Nilsson, J.; Pillai, D.; Sjöholm, I.; Svensson, U.; Akesson, B.; Nyman, M. G. L. **J. Agric. Food Chem.**, 52 (2004) 2490-2498.
- [29] Nuengchamnong, N.; Ingkaninan, K. **LWT**, 42 (2009) 297-302.
- [30] Stratil, P.; Klejdus, B.; Kuban, V. **J. Agric. Food Chem.**, 54 (2006) 607-616.
- [31] Niederlander, H.A.G.; van Beek, T.A.; Bartasiute, A.; Koleva, I.I. **J. Chromatogr. A**, 1210 (2008) 121-134.
- [32] Wolfe, K.L.; Liu, R.H. **J. Agric. Food Chem.**, 56 (2008) 8404-8411.
- [33] Krull, I.S.; Deyl, Z.; Lingeman, H. **J. Chromatog. B**, 659 (1994) 1-17.

- [34] Ettre, L.S. **Pure & Appl. Chem.**, 65 (1993) 819-872.
- [35] Capocasa, F.; Scalzo, J.; Mezzetti, B.; Battino, M. **Food Chem.**, 111 (2008) 872-878.
- [36] Lee, J.; Rennaker, C.; Wrolstad, R.E. **Food Chem.**, 110 (2008) 782-786.
- [37] Dai, J.; Gupte, A.; Gates, L.; Mumper, R.J. **Food Chem. Toxicol.**, 47 (2009) 837-847.
- [38] Stalmach, A.; Mullen, W.; Nagai, C.; Crozier, A. **Braz. J. Plant Physiol.**, 18 (2006) 253-262.
- [39] Koleva, I.I.; Niederländer, H.A.G.; van Beek, T. A. **Anal. Chem.**, 73 (2001) 3373-3381.
- [40] He, W.; Liu, X.; Xu, H.; Gong, Y.; Yuan, F.; Gao, Y. **Food Chem.**, 123 (2010) 521-528.
- [41] Koleva, I.I.; Niederländer, H.A.G.; Van Beek, T.A. **Anal. Chem.**, 72 (2000) 2323-2328.
- [42] Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. **Free Radi. Biol. Medic.**, 26 (1999) 1231-1237.
- [43] Rufino, M.S.M.; Alves, R.E.; Brito, E.S.; Moraes, S.M.; Sampaio, C.G.; Pérez-Jiménez, J.; Saura-Calixto, F.D. **Comunicado Técnico**, julho, 2007.
- [44] Hawkins, G.D.; Giesen, D.J.; Lynch, G.C.; Chambers, C.C.; Rossi, I.; Storer, J.W.; Li, J.; Zhu, T.; Thomson, J.D.; Winget, P.; Lynch, B.J.; Rinaldi, D.; Litoard, D.A.; Cramer, C.J.; Truhlar, D.G. AMSOL – version 7.0, <http://comp.chem.umn.edu/amsol/>, 2004.
- [45] Pascual-Ahuir, J.L.; Silla, E.; Tunon, I. GEPOL 8 (Geometria Polihedro), Universidad de Valencia, Espanha, 1993.
- [46] Stanton, D.T.; Jurs, P.C. **Anal. Chem.**, 62 (1990) 2323-2329.
- [47] Lien, E. J.; Ren, S.; Bui, H.-H.; Wang, R. **Free Radical Biol. & Medicine**, 26 (1999) 285-294.

- [48] Yi, L.; Chen, C.; Jin, X.; Mi, M.; Yu, B.; Chang, H.; Ling, W.; Zhang, T. **FEBS Letters**, 584 (2010) 583–590.
- [49] Wolfe, K.L.; Liu, R.H. **J. Agric. Food Chem.**, 56 (2008) 8404–8411.
- [50] Exarchou, V.; Fiamengos, Y.C.; Van Beek, T.A.; Nanos, C.; Vervoot, J. **J. Chromatogr. A**, 1112 (2006) 293–302.
- [51] Shertzer, H.G.; Tabor, M.W.; Hogan, I.T.D.; Brown, S.J.; Sainsburg, M. **Arch. Toxicol.**, 70 (1996) 830–834.
- [52] Cao, G.; Sofic, E.; Prior, R.L. Free **Radi. Biol. Med.**, 22 (1997) 749–760.
- [53] Janero, D.R.; Cohen, N.; Burghardt, B.; Schaer, B.H. **Biochem. Pharmacol.**, 40 (1990) 551–558.
- [54] Mukai, K.; Fukuda, K.; Ajima, K.; Ishizu, K. **J. Org. Chem.**, 53 (1988) 430–432.
- [55] Naseem, B., Sabri, A., Hasan, A., Shah, S.S. **Coll. Surf. B**, 35 (2004) 7–13.

Capítulo 7

CONCLUSÕES GERAIS

7. Conclusões Gerais

A metodologia desenvolvida para separação de oito antocianinas, comumente encontradas em alimentos, por LC-DAD apresentou bons limites de detecção e quantificação, linearidade, precisão e robustez. O método pode ser facilmente aplicado em diversas matrizes.

A extração de antocianinas em morango também foi desenvolvida e os resultados obtidos apresentaram boas recuperações e alta eficiência para os dois pigmentos, que apresentavam padrão de referência disponível. Através de um estudo de estabilidade ficou comprovado que o teor de antocianinas não diminuiu significativamente, após submissão do extrato a condições severas de temperatura, bem como a avaliação por tempo e condições de estocagem.

O estudo da reação de hidrólise ácida comprovou uma cinética de primeira ordem para a reação e com tal estudo, foi possível estabelecer uma condição de ótimo de hidrólise, podendo esta ser alterada de acordo com a necessidade da análise, através da manipulação das equações que regem a velocidade de reação.

Um método de detecção *online* para estudo de compostos bioativos também foi desenvolvido, apresentando bons resultados. O método provou ser rápido e de fácil execução, tornando possível a análise direta desses compostos a partir da própria metodologia de separação. Com os resultados da análise anti-oxidante foi possível determinar a capacidade anti-oxidante de cada antocianina e correlacionar estas com a retenção cromatográfica, mostrando que a medida que aumenta a hidrofilicidade da antocianina, e consequentemente diminui a retenção cromatográfica, têm-se um aumento no poder anti-oxidante.

Capítulo 8

PERSPECTIVAS

8. Perspectivas

Para dar continuidade a este projeto de pesquisa poderia ser desenvolvida uma otimização mais criteriosa da metodologia de detecção *online* e então realizar uma validação do método, avaliando a robustez, precisão, seletividade, linearidade e sensibilidade; bem como aprimorar a técnica, acoplando-se um espectrômetro de massas em uma segunda linha de saída dos compostos eluídos através do sistema de separação, sendo possível uma investigação mais exata e precisa de todos os compostos que apresentam atividade antirradical frente ao radical ABTS⁺. E assim, aplicar o método a inúmeras matrizes, não apenas alimentícias, mas também extratos botânicos.

Poderiam ser avaliados outros compostos possuidores de atividade anti-oxidante, utilizando-se padrões analíticos, para avaliação de seu poder frente às características teóricas estudadas.

Avaliar outros parâmetros que possam descrever a retenção cromatográfica e a atividade anti-oxidante, como por exemplo, área de acesso do solvente, volume molar, cargas parciais, etc.

SÚMULA CURRICULAR

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Gisele André Baptista Canuto

Local e data de nascimento: São Caetano do Sul – 28/08/1986.

2. EDUCAÇÃO

USP – Universidade de São Paulo, São Paulo - SP, 2009 - atual.

Mestrado em Química (Química Analítica).

UEL – Universidade Estadual de Londrina, Londrina – PR, 2005-2008.

Bacharel em Química (com opção Tecnológica) e Licenciatura Plena em Química.

CEFET - Centro Federal de Educação Tecnológica do Paraná, Cornélio Procópio – PR, 2001-2003.

Ensino médio.

3. OCUPAÇÃO

Bolsista de Mestrado, CNPq, 03/2009 – 02/2011.

Bolsista de Iniciação Científica CNPq, 08/2006-12/2008.

4. PUBLICAÇÕES

Artigos Publicados:

CANUTO, G. A. B.; XAVIER, A. A. O.; NEVES, L. C.; BENASSI, M. T. Caracterização físico-química de polpas de frutos da amazônia e sua correlação com a atividade anti-radical livre. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, p. 1196-1295, 2010.

NICOLAU, R. M.; CANUTO, G. A. B.; DIAS, R. C. E.; BENASSI, M. T. . Teores de compostos bioativos em cafés torrados e moídos comerciais. **Química Nova**, v. 33, p. 885-890, 2010.

Trabalhos Apresentados em Congressos:

CANUTO, G. A. B.; TONIN, F. G.; FUZO, C.A.; DIAS, L.G.; FARAH, J. P. S.; TAVARES, M. F. M. Evaluation of the interaction between flavonoids and SDS by LSER/QSRR and molecular dynamics. In: *16th Latin-American Symposium LACE*, dez/2010.

CANUTO, G. A. B.; TONIN, F. G.; DIAS, L.G.; FUZO, C.A.; TAVARES, M. F. M.; FARAH, J. P. S. Avaliação por LSER/QSRR e dinâmica molecular da interação entre flavonoides e SDS. In: *II Encontro da Pós-Graduação do Instituto de Química da USP*, ago/2010.

CANUTO, G. A. B.; OLIVEIRA, D.R.; TAVARES, M. F. M. Otimização e validação de metodologia para separação de paracetamol, cafeína e ácido acetilsalicílico em fármacos por CLAE. In: *33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, maio/2010.

CANUTO, G. A. B.; TONIN, F. G.; CARPENTIERI, V. M.; TAVARES, M. F. M.; FARAH, J. P. S. QSRR Evaluation of the Interaction Between Flavonoids and SDS Micelles. In: *15th Latin-American Symposium LACE*, out/2009.

FICHA DE ALUNOS EGRESSOS

Nome: Gisele André Baptista Canuto

Telefone: +55 (11) 9205-9714

Endereço: Rua Lourenço de Barros, 42 – Vila Califórnia.

E-mail: gicanuto@usp.br

Home Page: <http://lattes.cnpq.br/5461238240289110>

Twitter:

Blog:

Facebook: www.facebook.com/profile.php?id=100001660203747

Msn: gi_canuto@hotmail.com

Observações e sugestões para CPG:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....