

Comunicado Técnico 162

ISSN 0103-5231
Dezembro, 2010
Rio de Janeiro, RJ

Adaptação de um método por cromatografia líquida de alta eficiência para análise de antocianinas em suco de açaí (*Euterpe oleraceae* Mart.)

Manuela Cristina P. de Araujo Santiago¹
Ana Cristina Miranda Senna Gouvêa²
Ronoel Luiz de Oliveira Godoy³
João Oiano Neto⁴
Sidney Pacheco⁵
Jeane Santos da Rosa⁶

Introdução

As antocianinas, subclasse dos flavonóides, constituem um grupo de pigmentos solúveis em água, responsáveis pela maioria das cores de flores e vegetais variando do vermelho ao azul (BROUILLARD, 1982). Devido às suas propriedades antioxidantes, as antocianinas possuem importante papel na prevenção ou no retardamento do aparecimento de várias doenças (DOWNHAM; COLLINS, 2000; KUSKOSKI et al., 2004; MARTÍNEZ-FLÓREZ et al., 2002).

Grande parte das pesquisas voltadas à extração, purificação, separação, identificação e quantificação

das antocianinas demanda equipamentos sofisticados, além de uma etapa longa de preparo da amostra. Os métodos utilizados na separação e identificação das antocianinas incluem cromatografia em papel, cromatografia em camada fina, cromatografia em coluna, extração em fase sólida, cromatografia contracorrente, espectrofotometria UV-visível, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), espectrometria de massas (MS) e espectroscopia de ressonância magnética e nuclear (RMN) (SKREDE; WROLSTAD, 2002; TAKEOKA; DAO, 2002).

As antocianinas são muito solúveis em solventes

¹Engenheira Química, M.Sc. em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, analista da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, manuela@ctaa.embrapa.br

²Farmacêutica, M. Sc. em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, acristinagouvea@hotmail.com

³Farmacêutico, D.Sc. em Química Orgânica, pesquisador da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, ronoel@ctaa.embrapa.br

⁴Químico, D.Sc. em Química Orgânica, pesquisador da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, oiano@ctaa.embrapa.br

⁵Químico, M.Sc. em Ciência e Tecnologia de Alimentos, analista da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, sidney@ctaa.embrapa.br

⁶Química, M.Sc. em Ciência e Tecnologia de Alimentos, analista da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, jeane@ctaa.embrapa.br

polares, sendo extraídas com facilidade em água, metanol e etanol. Com o intuito de prevenir a oxidação destes pigmentos, a extração é realizada em meio ácido (LEE; HONG, 1992).

Apesar da sua toxicidade, o metanol é o solvente mais utilizado na extração das antocianinas. Com o uso da mistura etanol e água, observa-se uma menor eficiência na extração destes pigmentos. Em termos quantitativos, o metanol é 20% mais eficiente que o etanol, sendo este utilizado somente quando o aspecto quantitativo não é importante (TERCI, 2004).

A metodologia implementada pelo laboratório para determinação das antocianinas é efetuada via CLAE, baseada no método descrito por Brito et al. (2007) para amostras liofilizadas. Como a maior demanda do laboratório é a análise de amostras líquidas, tornou-se necessário realizar algumas adaptações e alterações tanto na etapa de extração quanto na cromatográfica do método original, a fim de se adaptar o mesmo para a matriz de interesse.

Desta forma, este trabalho teve como objetivo descrever as modificações feitas no método original, tendo sido suco de açaí (*Euterpe oleraceae* Mart.) utilizado como a matriz testada durante os ensaios (Figura 1).

Foto: Virgínia Martins da Matta



Figura 1. Foto de açaí

Adaptações e alterações

No método descrito por Brito et al. (2007) são pesados, na etapa de extração, 100mg de amostra liofilizada em um tubo com tampa de rosca apropriado para utilização em centrifuga. Em seguida, adiciona-se ao tubo 2,0mL de solução de ácido fórmico 10% em metanol com agitação durante 1 minuto, leva-se ao ultrassom por 10 minutos e posteriormente centrifuga-se a 3000g e 20°C por 10 minutos. Transfere-se o sobrenadante para um balão volumétrico de 10,0mL, repetindo-se o processo de lavagem descrito acima com o precipitado obtido na centrifugação, até o sobrenadante obtido não apresentar a coloração característica. Segundo relatado no método, três lavagens são suficientes para a extração total das

antocianinas, podendo variar de acordo com a concentração das mesmas na matriz utilizada. Após as sucessivas extrações, completa-se para 10,0mL o volume do balão volumétrico com ácido fórmico 10% em metanol. Filtra-se 1,0 mL desta solução em membrana hidrofílica do tipo Millex® (0,45um), evapora-se o solvente sob fluxo de nitrogênio até a secura e em seguida ressuspende-se com a mesma quantidade (1,0mL) de metanol 10% em ácido fórmico 10%. O extrato ressuspendido é transferido para um vial e levado ao injetor do cromatógrafo.

Para a utilização deste método com matrizes líquidas, no caso suco de açaí, foram testadas alíquotas de variados volumes na etapa de extração, a fim de se obter um extrato onde a concentração de antocianinas proporcionasse picos de boa magnitude na análise cromatográfica. Também era importante que a alíquota utilizada não dificultasse a etapa de lavagem do extrato com uma possível saturação do mesmo. Por fim, passou-se a utilizar alíquotas de 1mL do suco de açaí. Foi possível observar, que no caso de se trabalhar com sucos de outros frutos, esta alíquota variará de acordo com a concentração de antocianinas no meio.

A etapa de filtração do extrato por membrana descrita no método original foi retirada após avaliações visuais e cromatográficas que identificaram perdas de antocianinas neste processo (Figura 2). Diante do exposto, a etapa de filtração foi substituída por uma de microcentrifugação para retirar possíveis partículas em suspensão que pudessem danificar a coluna cromatográfica.

Foto: Ana Cristina Miranda Senna Gouvêa



Figura 2. Retenção das antocianinas em membrana do tipo Millex® (0,45um)

A análise cromatográfica foi realizada em um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência Waters® Alliance modelo 2690/5, com detector de arranjo de fotodiodos Waters® modelo 2996, software Empower®, coluna Symmetry® C₁₈ (4,6 x 150mm, 3,5µm), fluxo de 1,0mL/min e 50µL de injeção.

A etapa cromatográfica foi adaptada visando diminuir o tempo da análise, possibilitando assim a realização de um maior número de análises ao longo do dia. Além disto, também foram acrescentados procedimentos a esta etapa para preservação do sistema cromatográfico.

A primeira alteração ocorreu no gradiente utilizado na eluição, o qual foi adaptado para um tempo de análise igual a 45 minutos, enquanto que no método original era de 55 minutos (Tabela 1).

Ao longo dos testes, observou-se que os tempos de retenção dos picos apresentavam pequenas variações entre as injeções. Uma das explicações encontradas para tal fenômeno é o fato de que 5 minutos para retornar a coluna às condições iniciais da análise, isto é, composição da fase e equilíbrio da coluna, não eram suficientes. Com isto, no novo gradiente proposto, utilizou-se um tempo de 5 minutos para retornar às condições iniciais, além de 5 minutos de permanência nas mesmas condições para assegurar o equilíbrio da coluna.

Tabela 1. Adaptação do gradiente de composição da fase móvel

Solvente B (metanol)	Tempo de análise (minutos)
5-15%	0-20
15-25%	20-35
25-5%	35-40
5%	40-45

A temperatura da coluna foi outro fator alterado em relação ao método usado por Brito et al. (2007). A temperatura na qual a coluna é acondicionada passou de 20°C para 30°C. Nesta temperatura não ocorre degradação das antocianinas, além de influenciar na redução do tempo de retenção dos picos, por contribuir com o aumento da cinética de eluição. Vale ressaltar que manter a coluna a uma temperatura constante, sem oscilações, é extremamente importante para a estabilização da mesma.

A limpeza do sistema cromatográfico (tubulações,

válvulas, etc.), após o término de uma análise, é fundamental para a preservação do mesmo. Observou-se no decorrer das análises que o ácido fórmico, mesmo sendo indicado na literatura como um dos ácidos que menos agride o sistema cromatográfico, provocou a corrosão de algumas partes metálicas do sistema, gerando pontos de vazamentos. No método descrito por Brito et al. (2007), não é feita nenhuma menção quanto à limpeza do sistema. Com isso, adotou-se como procedimento, após o término de uma sequência de injeções, a limpeza do sistema por período longo (no mínimo 3 horas) com água grau Milli-Q, lavando-se em seguida o sistema com metanol grau HPLC.

A adaptação da etapa de extração para amostras líquidas mostrou-se satisfatória, uma vez que após três lavagens não se observou mais alteração na cor do extrato obtido, indicando que todas as antocianinas presentes foram extraídas até a terceira lavagem.

Além disso, os cromatogramas obtidos apresentaram excelente resolução e magnitude (Figura 3), viabilizando a aplicação das novas condições inclusive em separações preparativas. Desta forma, foi possível constatar que as adaptações e alterações feitas, tanto na etapa de extração quanto na análise cromatográfica, proporcionaram um bom resultado para este tipo de matriz.

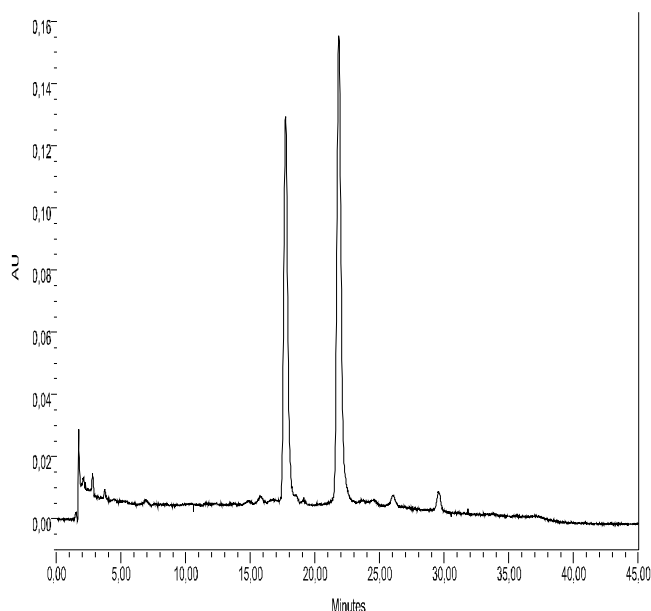


Figura 3. Cromatograma de amostra líquida de açai.

Referências

BRITO, E. S. de; ARAUJO, M. C. P. de; ALVES, R. E.; CARKEET, C.; CLEVIDENCE, B. A.; NOVOTNY, J. A. Anthocyanins present in selected tropical fruits:

acerola, jambolão, jussara, and guajiru. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 23, p. 9389-9394, 2007.

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

Anthocyanins as food colors. New York: Academic Press, 1982. p.1-40.

DOWNHAM, A.; COLLINS, P. Colouring our foods in the last and next millennium. **Journal of Food Science and Technology**, v. 35, n. 1, p. 5-22, 2000.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; GARCÍA-PARILLA, M. C.; TRONCOSO, A.M.; FETT, R. Actividad antioxidante de pigmentos antocianínicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 4, p. 691-693, 2004.

MARTÍNEZ-FLÓREZ, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J. M.; TUÑÓN, M. J. Los flavonoides:

propiedades y acciones antioxidantes. **Nutrición Hospitalaria**, v. 17, n. 6, p. 271-278, 2002.

LEE, H. S.; HONG, V. Chromatographic analysis of anthocyanins. **Journal of Chromatography A**, v. 624, n. 1-2, p. 221-234, 1992.

SKREDE, G.; WROLSTAD, R. E. Flavonoids from berries and grapes. In: SHI, J.; MAZZA, G.; LE MAGUER, M. (Ed.). **Functional foods: biochemical and processing aspects**. Boca Raton: CRC Press, 2002. v. 2, cap. 3, p. 71-133.

TAKEOKA, G.; DAO, L. Anthocyanins. In: HURST, W. J. (Ed.). **Methods of analysis for functional foods and nutraceuticals**. Boca Raton: CRC Press, 2002. cap. 5, p. 219-241.

TERCI, D. B. L. **Aplicações analíticas e didáticas de antocianinas extraídas de frutas**. 224 f. 2004. Tese (Doutorado) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

Comunicado Técnico, 162

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Agroindústria de Alimentos
Endereço: Av. das Américas, 29.501 - Guaratiba
 23020-470 - Rio de Janeiro - RJ
Fone: (0XX21) 3622-9600
Fax: (0XX21) 3622-9713
Home Page: <http://www.ctaa.embrapa.br>
E-mail: sac@ctaa.embrapa.br

1ª edição
 1ª impressão (2010): tiragem (50 exemplares)

Comitê de publicações

Presidente: *Virginia Martins da Matta*
Membros: *Marcos José de Oliveira Fonseca, Marília Penteadó Stephan, Renata Torrezan, Renata Galhardo Borguini, Daniela de Grandi Castro Freitas, Luciana Sampaio de Araújo, André Luis do Nascimento Gomes e Michele Belas Coutinho*

Expediente

Supervisão editorial: *Renata Galhardo Borguini*
Revisão de texto: *Edmar das Mercês Penha*
Normalização bibliográfica: *Luciana S. de Araújo*
Editoração eletrônica: *André Luis do N. Gomes e Marcos Moulin*