



FONTES NATURAIS DE ANTOCIANINAS PARA A OBTENÇÃO DE PADRÕES PARA ANÁLISE DE FRUTOS VERMELHOS E SEUS PRODUTOS.

NATURAL SOURCES ANTHOCYANINS FOR OBTAINING STANDARDS FOR ANALYSIS OF RED FRUITS AND THEIR PRODUCTS.

Ana Cristina Miranda Senna GOUVÊA¹; Manuela Cristina Pessanha de Araujo SANTIAGO²; Luciana Mouta de OLIVEIRA³; Ronoel Luiz de Oliveira GODOY²; Fernanda Marques PEIXOTO³; Sidney PACHECO²; Renata Galhardo BORGUINI²

¹Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro-e-mail: acristinagouvea@hotmail.com

²Embrapa Agroindústria de Alimentos – RJ, Brasil

³Centro Universitário Estadual da Zona Oeste (UEZO)

Palavras-chave: CLAE, padrões, espectrometria de massas de alta resolução, antocianinas.

Introdução

As antocianinas, pigmentos hidrossolúveis, presentes em alimentos de origem vegetal, apresentam efeitos bioativos que estão relacionados ao poder antioxidante proporcionado. Sendo assim, vários trabalhos científicos vêm relatando a importância do seu desempenho na redução ao risco de doenças: cardiovasculares; do sistema imunológico; do câncer e sua progressão (VOLP *et al.*, 2008, WAN *et al.* 1999). Nos últimos anos, o grande interesse por alimentos naturais, saudáveis e que possam trazer consigo a proposta de atuar como coadjuvante na redução do risco de doenças crônicas tem impulsionado o meio científico a identificar e quantificar os seus princípios ativos.

Para as análises de identificação e quantificação de antocianinas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), há necessidade de uso de padrões analíticos, mas, devido à grande diversidade de substituintes em sua estrutura, o desafio está em encontrar disponíveis comercialmente padrões de referência desses diversos compostos. Neste contexto, a obtenção destes padrões a partir de fontes naturais (PACHECO *et al.*, 2013; GOUVÊA *et al.*, 2012) poderá viabilizar a determinação, de forma mais precisa, as concentrações existentes dessas substâncias em alimentos que estejam na forma natural ou processados.

Este trabalho teve como objetivo selecionar matrizes que possam servir de fontes para obtenção de padrões antociânicos, utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência para seu isolamento. Assim sendo, esse fato, possibilitará a realização de análises cromatográficas que possam identificar e quantificar o teor de antocianinas, capacitando-a como ferramenta para avaliação da qualidade dos produtos.

Materiais e Métodos

O presente trabalho foi realizado no laboratório de Cromatografia Líquida da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro. Foram avaliadas as antocianinas em seis potenciais fontes para obtenção dos padrões: casca de maçã (*Malus doméstica*, cultivar "Fuji"), berinjela (*Solanum melongena*); mangostim (*Garcinia mangostana* L.), uva preta chilena (*Vitis vinífera* L.); fruto da amendoeira (*Terminalia catappa*) e morango (*Fragaria* spp.). Todos os solventes utilizados eram da Marca Tédia® grau CLAE, para extração e análise cromatográfica, e grau Massa para as análises no espectrômetro de massa.

As extrações das antocianinas nas respectivas cascas dos frutos e nos frutos foram realizadas com solução de metanol acidificado, onde as amostras foram trituradas, logo em



seguida, passaram por etapas de sonificação e centrifugação seguindo a metodologia proposta por Santiago *et al.* (2010). As análises cromatográficas foram realizadas em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) acoplado ao detetor de arranjo de fotiodos (DAD), coluna C₁₈ (100mm x 4,6mm; 2,4 μm), fluxo de 1,0mL/min, temperatura da coluna de 40°C e modo de eluição gradiente com acetonitrila e ácido fórmico (GOUVÊA & GODOY, 2011).

Alguns perfis cromatográficos e os espectros de absorção na região UV-Vis das antocianinas foram comparados com dados na literatura, além disso, suas identificações foram confirmadas através das suas respectivas massas moleculares exatas (EM/EM), utilizando como ferramenta o espectrômetro de massa de alta resolução Waters Synapt® Q-ToF, com fonte de ionização no modo electrospray positivo (ESI+), tempo de voo V, com as seguintes condições: temperatura da fonte igual a 120°C, gás de dissolvatação N₂ a 500°C, energia do capilar 3,0kV, cone fixado em 25,0V e energia de colisão de 8,0V.

Resultados e Discussões

Os perfis cromatográficos obtidos podem ser observados na Figura 1. A caracterização e a identificação das antocianinas nas matrizes estão relatadas no Quadro 1.

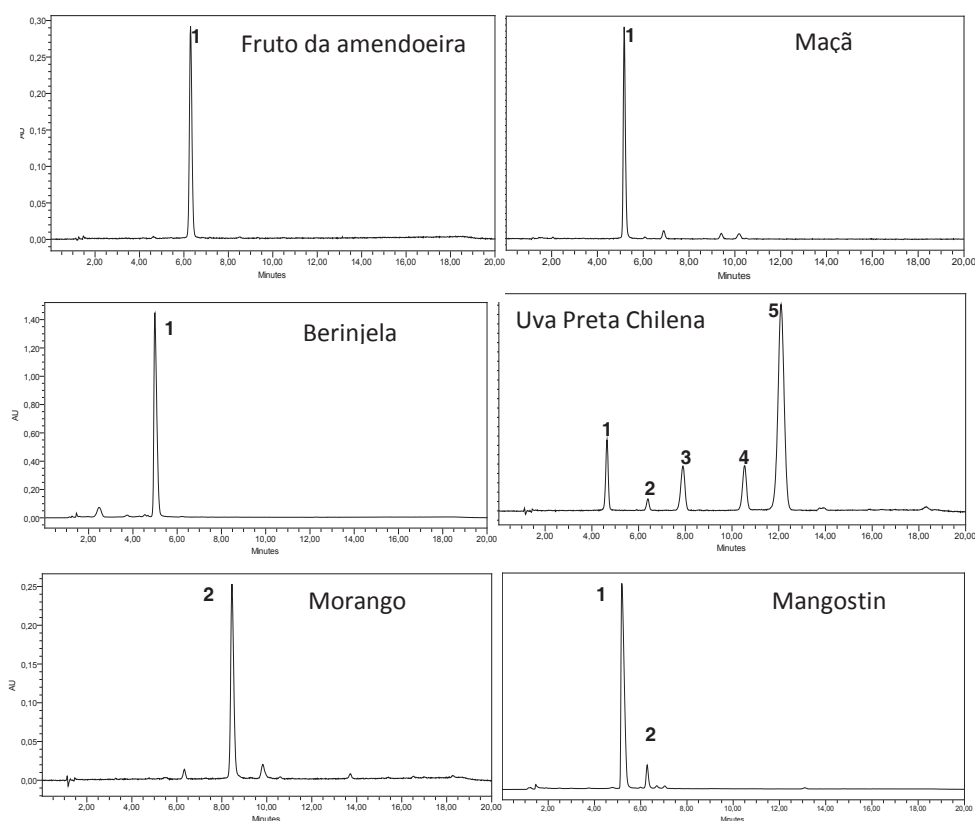


Figura 1: Perfil cromatográfico dos extratos metanólicos do fruto da amendoieira; casca da maçã; casca de berinjela; casca da uva preta Chilena; casca do mangostin e morango (picos numerados estão identificados no Quadro 1).

A numeração realizada foi referente aos analitos que puderam ser identificados pelo presente trabalho. Os que apresentaram concentração muito baixa, não entraram neste estudo, a não ser os que já apresentavam informações na literatura associado à análise espectrométrica (EM/EM). Seis antocianidinas, assim como, os açúcares encontrados nas



matrizes que foram observadas por este trabalho e seus respectivos pesos moleculares estão descritos na Tabela 1.

Quadro 1: Identificação das antocianinas numeradas nas amostras.

Matriz	Pico	λ (nm) ^a	t_R (min)	[M] ⁺ (m/z)	EM/EM (m/z)	Antocianina
Fruto da amendoeira	1	279/ 328/515	6,25	449,1083	287,0556	Cy-3-Glicosídeo
Maçã*	1	279/514	5,38	449,1112	287,0508	Cy -3-Galactosídeo
Berinjela*	1	277/343/525	5,12	611,1616	465,1037/303,0500	Dp-3-Rutenosídeo
Uva Preta Chilena	1	271/347/522	4,27	465,1078	303,0616	Dp-3-Glicosídeo
	2	279/362/515	6,21	449,1083	287,0556	Cy -3-Glicosídeo
	3	270/348/524	7,89	479,1168	317,0746	Pt-3-Glicosídeo
	4	279/330/517	10,29	463,1248	301,0714	Pn-3-Glicosídeo
	5	277/347/526	12,04	493,1349	331,0864	Mv-3-Glicosídeo
Morango*	2	267/328/431/501	8,09	433,1156	465,1037/303,05	Dp-3-Glicosídeo
Mangostim*	1	279/ 330/512	5,32	611,2424	287,0508	Cy -3-Diglicosídeo
	2	279/ 328/515	6,25	449,1001	287,0507	Cy -3-Glicosídeo

^a Solvente Fase móvel da análise cromatográfica (ácido fórmico 5%: metanol 10% / água Milli-Q®)

*Identificados somente os picos majoritários ou relatados na literatura.

Dp= delfinidina, Cy = cianidina, Pg= pelargonidina, Pt= petunidina, Pn= peonidina e Mv= Malvidina

Tabela 1: Massas moleculares das seis antocianinas e dos açúcares que foram observados nas amostras estudadas por CLAE e EM/EM.

Substâncias	MW*	MW- H ₂ O
Antocianinas		
pelargonidina	271	-
cianidina	287	-
peonidina	301	-
petunidina	317	-
delfinidina	303	-
malvidina	331	-
Açúcares		
Galactose	180	162
Glicose	180	162
Rutinose	326	308

*MW= massa molecular calculada

Dentre as amostras analisadas, a amostra do fruto da amendoeira sobressaiu em relação às outras, pois, apresentou uma pureza acima de 99% para seu pico majoritário. O espectro de UV-visível mostrou $\lambda_{m\acute{a}x}$ a 279,5 e 515,3nm característicos de derivados de cianidina ou peonidina. Seu íon molecular [M]⁺ apresentou m/z 449,1083 e transição do EM/EM a m/z 287,0556 que corresponde à massa molecular da aglicona cianidina devido à perda de uma hexose (162Da). A antocianidina cianidina também foi identificada no pico majoritário (pico 1) do cromatograma da amostra de casca de maçã, apresentando o mesmo valor de perda no EM/EM (162 Da). A diferença entre essas duas substâncias foi baseada nos seus t_R , 6,25 e 5,28 minutos, a configuração da estrutura molecular da

galactose faz com que a molécula fique menor tempo retido na fase estacionária comparada à molécula que contém o açúcar glicose. Sendo assim, fica caracterizado, ser uma glicose, o açúcar ligado à aglicona para a substância que possui o maior tempo de retenção e galactose o de menor.

A amostra do extrato de berinjela apresentou uma absorção no comprimento de onda visível com $\lambda_{\text{máx}}$ de 525nm, característicos de derivados de delphinidina, petunidina e malvidina em solução de metanol acidificado (HONG&WROLSTAD, 1990). Seu íon molecular $[M]^+$ apresentou m/z 611,1616 e transição do EM/EM a m/z 465,1037 e m/z 303,0500 que corresponde à massa molecular com a perda de uma massa de 146Da (ramnose) e da sua aglicona delphinidina devido à perda de uma hexose (162Da). O dissacarídeo rutinose apresenta a particularidade de quando for submetido a uma energia de fragmentação liberar a ramnose (146Da) e em seguida a glicose (hexose-162Da) (FERREIRA, ROSSO & MERCADANTE, 2010).

Foi possível comprovar, na amostra do extrato de casca de uva Chilena, a presença das antocianinas delphinidina-3-glicosídeo, cianidina-3-glicosídeo, petunidina-3-glicosídeo, peonidina-3-glicosídeo e malvidina-3-glicosídeo, através dos seus íons moleculares e suas transições, sua aglicona quando ocorre a liberação do açúcar (Quadro 1). A resolução entre as substâncias eluídas torna essa matriz uma excelente candidata para ser utilizado como fonte de padrão, o quinto pico que corresponde a malvidina-3-glicosídeo apresenta uma boa concentração indicando que não haverá necessidade de muitas coletas.

O pico majoritário observado no cromatograma do extrato do morango apresentou espectro de UV-visível com $\lambda_{\text{máx}}$ a 267/328/431/501nm característicos de derivados de pelargonidina, a análise por espectrometria de massa confirmou através da obtenção dos valores de seu íon molecular $[M]^+$, m/z 433,1153 e transição do EM/EM a m/z 271,061 que corresponde à massa molecular da aglicona pelargonidina devido à perda de uma hexose (162Da).

O extrato de casca do mangostim apresentou um pico majoritário (pico1) correspondente a uma antocianina diglicosilada, esse fato pôde ser identificado através da sua respectiva massa molecular exata, onde seu íon molecular $[M]^+$, m/z 611,2424 e sua transição do EM/EM a m/z 287,0508 que corresponde à massa molecular da aglicona cianidina devido à perda de duas hexoses (162Da). A presença de apenas uma transição caracteriza a perda de um dissacarídeo.

Todas as amostras analisadas apresentaram boa resolução, esse fato pode ser atribuído ao desempenho da coluna utilizada nas análises (C_{18} 100mm x 4,6mm; 2,4 μ m). Dessa forma, o isolamento do analito poderá ser efetuado com alto índice de pureza, evitando assim, sua contaminação com os outros analitos da amostra.

Conclusão

Desta forma, conclui-se que através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência é possível caracterizar os perfis das matrizes apresentadas neste estudo, assim como, a espectrometria de massas de alta resolução tornou possíveis as identificações das antocianinas que serão promissoras fontes de padrões analíticos. Sendo assim, as matrizes apresentadas neste presente trabalho podem ser consideradas fontes das sete antocianinas glicosiladas mais encontradas em alimentos e, além de servirem para caracterizar a qualidade dos frutos vermelhos e seus produtos, também servirão para caracterizar a qualidade das próprias matrizes, visto que a perda da cor é um dos primeiros sinais de deterioração da qualidade do produto. Ressalta-se que as matrizes escolhidas são de fácil acesso e baixo custo, sendo o mangostim o que se apresenta mais oneroso dentre elas. Desse modo, espera-se realizar as análises por CLAE com mais qualidade e menor custo, viabilizando-a como mais uma ferramenta que possa contribuir para avaliação da qualidade dos produtos.

Agradecimentos: À Agência Financiadora CNPq, pela bolsa de estudos concedida à doutoranda Ana Cristina Miranda Senna Gouvêa.

Referências Bibliográficas

FERREIRA, D. S.; ROSSO, V. V. DE; MERCADANTE, A. Z. Compostos bioativos presentes em amora-preta (*Rubus spp.*). **Revista Brasileira Fruticultura**, vol.32 no.3, Jaboticabal Sept. 2010 Epub Oct 08, 2010

GIUSTI, M. M.; RODRÍGUEZ-SAONA, L. E.; GRIFFIN, D.; WROLSTAD, R. E. Electrospray and tandem mass spectroscopy as tools for anthocyanin characterization. **J. Agric. Food Chem.**, v. 47, n. 11, pg.4657-4664, 1999.

GOUVÊA, A. C. M. S.; GODOY, R.L.O. Redução do tempo de análise de antocianinas em amora-preta (*Rubus spp.*) por CLAE através de mudanças na fase móvel, pH e utilização de coluna com nova tecnologia. **IV Forum de Pós –Graduação**, UFRRJ, Seropédica, Rio de Janeiro, 2011.

GOUVÊA, A. C. M. S.; ARAUJO, M. P. de; SHULZ, D. F.; PACHECO, S.; GODOY, R.L.O.; CABRAL, L. M. C. Anthocyanins Standards (cyanidin-3-O-glucoside and cyanidin-3-O-rutenoside) isolation from freeze-dried açai (*Euterpe oleracea Mart.*) by HPLC. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v.32, n., p.1-4, 2012.

HONGX, V.; WROLSTAD, R.E. J. Use of HPLC Separation/Photodiode Array Detection for Characterization of Anthocyanins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.38, n. 3, 1990.

SANTIAGO, M., C., P., A. ; GOUVÊA, A., C., M., S. ; GODOY, R., L., de O. ; OIANO-NETO, J. ; PACHECO, S. ; ROSA, J., S. . Adaptação de um método por cromatografia líquida de alta eficiência para análise de antocianinas em suco de açai (*Euterpe oleraceae Mart.*). Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2010 [(**Comunicado técnico, 162**. Biblioteca: CTAA (FL CTE 0162 UMT)].

PACHECO, S. GODOY; R. L. O.; PEIXOTO, F. M.; GOUVÊA, A. C. M. S.; SANTIAGO, M. C. P. de A.; BORGUINI, R. G.; FELBERG, I. G. Preparation of high purity analytical standards using High Performance Liquid Chromatography in analytical scale. **Analytical Chemistry: An Indian Journal**, v.12, n.5, p.194-197, 2013.

TIAN, Q.; GIUSTI, M. M.; STONER, G. D.; SCHWARTZ, S. J. Screening for anthocyanins using high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry with precursor-ion analysis, product-ion analysis, common-neutral-loss analysis, and selected reaction monitoring. **Journal of Chromatography A**, v. 1091, pag. 72–82, 2005.

VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R. T.; BARRA, K.; STRINGUETA, P. C. Flavonoides antocianinas: característica e propriedades na nutrição e saúde. **Ver. Bras. Nutr. Clin.** n.32, v.2, p. 141-149, 2008.

WANG, H.; NAIR, M.G.; STRASBURG, G.M.; CHANG, Y.C.; BOOREN, A.M.; GRAY, J.I.; et al. Antioxidant and antiinflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyanidin, from tart cherries. **Journal of Natural Products**, v.62, n.2, p. 294-6, 1999.

Autor a ser contatado: Ana Cristina Miranda Senna Gouvêa. Doutoranda em Ciência e Tecnologia de Alimentos – UFRRJ/Seropédica-RJ- email: acristinagouvea@hotmail.com