

DETECÇÃO DE ANTOCIANINAS EM EXTRATO DE DIFERENTES ESPÉCIES VEGETAIS ATRAVÉS DE CLAE

Yuri Correia Barreto ¹

Maria Eduarda Rosa ²

Helmoz Roseniaim Appelt ³

Resumo:

INTRODUÇÃO: Antocianinas são flavonoides naturais responsáveis pela coloração púrpura, vermelha e azul de uma grande variedade de plantas. Esses flavonoides são utilizados pela indústria para produção de fármacos naturais, fitoterápicos e corantes alimentícios. Além disso, nos últimos anos pesquisas demonstraram que esses flavonoides possuem atividade antioxidante, anti-inflamatória e anticancerígena. Revelando a importância de se detectar a presença de antocianinas, e de sua aplicabilidade biotecnológica e de estudos analíticos que envolvam extração, isolamento e purificação desses compostos. A técnica mais eficiente para detectar a presença de antocianinas é a cromatografia líquida de Alta Eficiência (CLAE) onde a análise é rápida e não há necessidade de elevada pureza dos extratos. O presente trabalho teve como objetivo demonstrar o uso da CLAE para detectar e comparar antocianinas presentes em extratos vegetais. **METODOLOGIA:** Foram utilizadas como amostras Berinjela (*Solanum melongena*), Beterraba (*Beta vulgaris* L.), Cebola Roxa (*Allium cepa* Cv IPA 10), Figo (*Ficus carica*), Manto-de-Víúva (*Tradescantia pallida purpurea*), Repolho Roxo (*Brassica oleracea* var. capitata f. rubra), Violeta Africana (*Saintpaulia ionantha* Wendl). O método de extração foi realizado segundo IKAN (2003) com modificações. A técnica de CLAE foi realizada com um equipamento Shimadzu Prominence. Foi usado como fase móvel metanol 80% durante os primeiros 5 min, e sucedeu-se com metanol 50% (10min) e metanol 30% (15min), com vazão de 1mL/min-1. As amostras foram lidas pelo detector A UV/VIS em 520nm, e o detector B Fluorescência em 350-450nm. **RESULTADOS E DISCUSSÃO:** Uma forma de identificar diferentes antocianinas é analisar e comparar o tempo de retenção das amostras. Principalmente quando a espectrofotometria é acoplada a técnica de CLAE. Sendo assim, foram selecionados os dez picos com maiores valores de retenção para realizar a análise comparativa entre as diferentes amostras vegetais. Ao analisarmos os dados foi possível inferir que as amostras que possuem o tempo de retenção próximos ou iguais, constituem-se da presença da mesma classe de antocianina. Os flavonóides sofrem substituições em posições específicas com açúcares, caracterizando diferentes moléculas. Essa característica das antocianinas explica o fato das amostras terem apresentado tempos diferentes de retenção, sugerindo então, a presença de diferentes classes de antocianinas. **CONCLUSÃO:** A CLAE demonstrou ser uma eficiente ferramenta para a detecção da

presença de compostos como antocianinas, que apresentam propriedades importantes para o campo da pesquisa. Portanto, a técnica de cromatografia líquida pode auxiliar na busca por mais fontes que forneçam moléculas com grande aplicabilidade biotecnológica.

Palavras-chave: Flavonóides; Cromatografia Líquida; Purificação; Corantes Naturais.

Modalidade de Participação: Iniciação Científica

DETECÇÃO DE ANTOCIANINAS EM EXTRATO DE DIFERENTES ESPÉCIES VEGETAIS ATRAVÉS DE CLAE

¹ Aluno de graduação. y.barreto9507@gmail.com. Autor principal

² Aluno de graduação. rosaedumaria@gmail.com. Co-autor

³ Docente. helmoz@gmail.com. Orientador



DETECÇÃO DE ANTOCIANINAS EM EXTRATO DE DIFERENTES ESPÉCIES VEGETAIS ATRAVÉS DE CLAE

1. INTRODUÇÃO

As antocianinas são biomoléculas pigmentosas responsáveis pela coloração de flores, frutos, folhas, caules e raízes de plantas. Essas cores variam de vermelho vivo ao azul escuro. Estes pigmentos de origem natural, são solúveis em água e suas tonalidades oscilam em diferentes condições de pH, temperatura e presença de oxigênio, permitindo assim, sua utilização na indústria alimentícia em substituição aos corantes sintéticos, visto o aumento das restrições e os malefícios à saúde causados por eles. Estes flavonóides também estão associados a hábitos alimentares saudáveis, por apresentarem atividade anticarcinogênica, antioxidante e anti-inflamatória. Revelando a importância de se detectar a presença de antocianinas, de sua aplicabilidade biotecnológica e de estudos analíticos que envolvam extração, isolamento e purificação desses compostos (JAIN e SESHADRI, 1975; MIRANDA, 2000; TEIXEIRA *et al*, 2008).

Quanto a sua estrutura química básica, as antocianinas são derivados glicosilados do cátion 2-fenil benzopirílium, também denominado de cátion flavílico, mostrado na figura 1, que é substituído em posições específicas (R1, R2, R3...) com açúcares, mais comumente ligados à estrutura molecular central, em geral nas hidroxilas das posições 3, 5 e 7. Esses açúcares são monossacarídeos como glicose, galactose, arabinose, raminose, porém, podem apresentar-se também na forma de di e trissacarídeos, caracterizando, assim, as diferentes moléculas de antocianinas (CAMPOS, 2006).

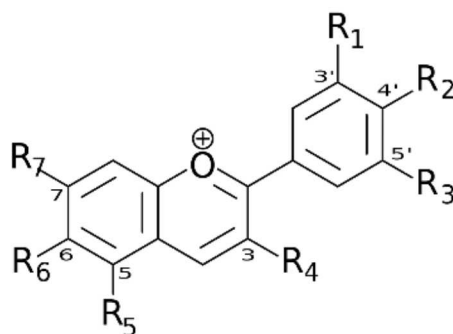


Figura 1. Estrutura genérica do cátion flavílico.

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) consiste em um método analítico que tem como objetivo a separação, pelo mecanismo de interação seletiva, de diferentes espécies químicas presentes em determinada amostra com as fases estacionária e móvel. A fase estacionária refere-se à coluna cromatográfica e a fase móvel ao solvente que flui pelo sistema, arrastando consigo a amostra (CHUST, 1990). O presente trabalho teve como objetivo demonstrar o uso da CLAE para detectar e comparar antocianinas presentes em extratos vegetais.

2. METODOLOGIA

a. *Amostras*: Berinjela (*Solanum melongena*), Beterraba (*Beta vulgaris* L.), Cebola Roxa (*Allium cepa* Cv IPA 10), Figo (*Ficus carica*), Manto-de-Viúva (*Tradescantia pallida purpurea*), Repolho Roxo (*Brassica oleracea* var. capitata f. rubra), Violeta Africana (*Saintpaulia ionantha* Wendl), esses vegetais foram escolhidos exclusivamente por apresentarem coloração roxa/violeta e serem de fácil acesso.

b. *Extração*: o método de extração foi realizado segundo IKAN (2003) com modificações. Foram cortados pequenos pedaços de casca das amostras, das herbáceas foram utilizadas as pétalas, (15g) e colocados em um béquer, em seguida, foi adicionado 100mL de água destilada. As amostras foram fervidas durante 15min, após foi feita a filtração com papel filtro para separação do extrato.

c. *Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)*: a técnica de cromatografia líquida foi realizada com um equipamento Shimadzu Prominence HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japan), equipado com bombas recíprocas Shimadzu LC-20AT conectadas a DGU 20A5 degasser e Integrador CBM 20A, com coluna cromatográfica C-18 250x4mm, tamanho de partícula 5µm (Shimadzu). Foi usado como fase móvel metanol 80% durante os primeiros 5 min, e sucedeu-se com metanol 50% (10min) e metanol 30% (15min), com vazão de 1mL/min⁻¹. As amostras foram lidas pelo detector A UV/VIS em 520nm, e o detector B Fluorescência em 350-450nm. Foram injetados 20µL de cada amostra.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre as técnicas para separação de antocianinas como, cromatografia contra-corrente, eletroforese, cromatografia de coluna aberta e cromatografia gasosa, prevalece a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, pois oferece excelentes separações, alta detectabilidade, tempo de análise curto e não necessita de extratos com elevada pureza (K-SCHAFHALTER et al., 1998).

Uma forma de identificar diferentes antocianinas é analisar e comparar o tempo de retenção das amostras. Principalmente quando a espectrofotometria é acoplada a técnica de CLAE. No presente estudo foi utilizado o detector A e B (UV/VIS e Inluorescência, respectivamente), pois, esses comprimentos de onda são padronizados para a detecção da presença de antocianinas. As análises realizadas com os resultados obtidos na CLAE foram feitas com base no tempo de retenção das amostras (CAMPOS, 2006).

A Figura 2 mostra um exemplo de cromatograma fornecido pela CLAE, onde é possível observar os picos de onde são calculados as áreas em porcentagem, que demonstra as retenções obtidas ao longo do tempo.

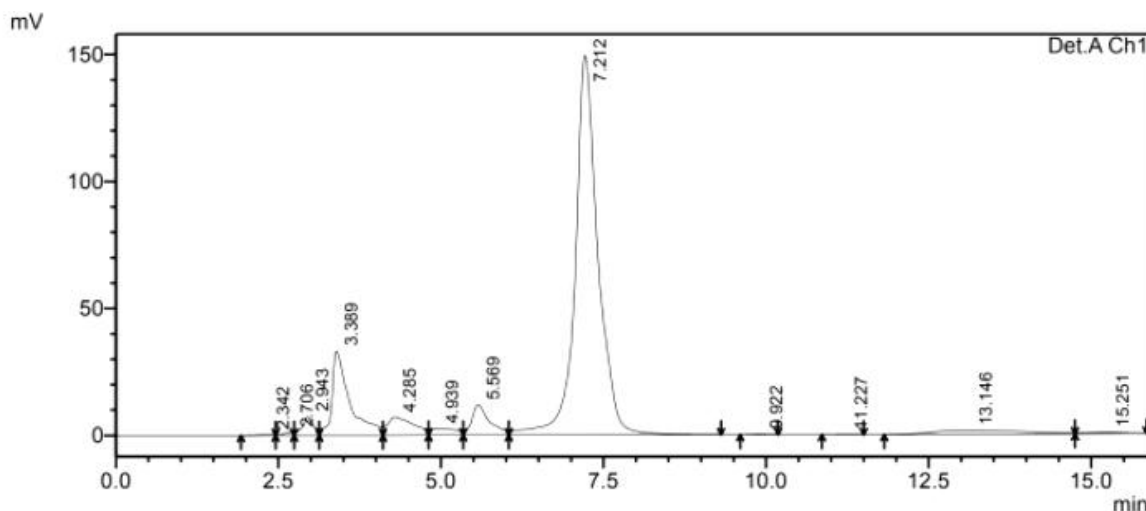


Figura 2. Cromatograma da Berinjela pelo detector A (UV/VIS), canal 1, em 520nm.

Foram selecionados os dez picos com maiores valores de retenção para realizar a análise comparativa entre as diferentes amostras vegetais, conforme demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1: Resultado da cromatografia líquida dos extratos vegetais.

Amostra	Tempo de Retenção (min)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Berinjela	2.828	3.136	4.004	4.364	5.050	5.714	5.986	6.792	9.107	10.495
Beterraba	2.665	3.064	3.227	3.556	3.995	4.194	4.979	7.693	9.877	14.292
Cebola	2.568	3.468	3.664	4.044	4.860	5.525	6.922	9.043	10.999	14.500
Figo	3.687	4.354	4.576	5.497	5.993	6.275	7.657	8.918	10.280	14.311
M. de Viúva	2.782	3.664	4.434	5.351	6.327	7.748	8.124	9.350	10.727	12.382
Repolho	7.23	9.09	10.45	3.329	3.765	5.217	5.542	6.583	7.969	13.221
V. Africana	2.239	2.686	3.654	4.525	5.634	6.134	6.868	7.709	9.045	14.182
Amostra	Área (%)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Berinjela	1.839	11.358	1.504	7.871	3.383	1.989	3.360	19.752	39.390	8.239
Beterraba	30.436	16.288	8.287	6.201	5.499	5.366	4.234	3.168	2.862	2.494
Cebola	6.633	2.141	2.238	3.148	4.766	3.848	4.313	6.566	40.226	10.572
Figo	12.842	2.128	2.823	2.053	1.771	55.794	2.384	5.567	5.171	1.671
M. de Viúva	1.949	5.159	6.413	2.468	49.795	1.375	1.829	9.950	2.499	12.254
Repolho	2.381	6.407	1.943	6.232	52.355	9.715	4.591	4.126	2.801	1.99
V. Africana	6.142	6.051	4.428	7.603	14.530	4.751	6.740	7.139	4.485	6.269

Ao analisarmos a Tabela 1, é possível inferir que as amostras que possuem o tempo de retenção próximos ou iguais representados pela mesma cor (ver Tabela 1), constituem-se da presença da mesma classe de antocianina. Pois, como mostrado na Figura 1 os flavonóides sofrem substituições em posições específicas com

açúcares, caracterizando diferentes moléculas. Essa característica das antocianinas explica o fato das amostras terem apresentado tempos diferentes de retenção, sugerindo então, a presença de diferentes classes de antocianinas.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A CLAE demonstrou ser uma eficiente ferramenta para a detecção da presença de compostos como antocianinas, que apresentam propriedades importantes para o campo da pesquisa. Portanto, a técnica de cromatografia líquida pode auxiliar na busca por mais fontes que forneçam moléculas com grande aplicabilidade biotecnológica.

5. REFERÊNCIAS

CAMPOS, D. D. P. Extração, Purificação e Isolamento de Antocianinas de Jambolão (*Syzygium cumini*) e Avaliação dos seus Efeitos Biológicos. Dissertação (Mestrado em química), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

CHUST, R. F. Introdução à Cromatografia de Líquidos (HPLC). Boletim SPQ, v. 39, 1990.

IKAN, R. Natural Products - A laboratory guide. 2.ed. San Diego, 2013, 316p.

JAIN, M.C.; SESHADRI, T.R. Anthocyanins of *Eugenia jambolana* fruits. Indian J. of Chem. 13, 20-23; 1975.

MIRANDA, M. A. Efeito de flavonóides na fosfoproteína tirosina fosfatase. Mecanismos cinéticos e relações estrutura atividade. Dissertação (Mestrado em biologia), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

TEXEIRA, L. N. *et al.* Comparação de métodos para quantificação de antocianinas. Ceres, v. 55, n. 4, p 297-304, 2008.