



CENTRO UNIVERSITÁRIO ESTADUAL DA ZONA OESTE

COLEGIADO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

**ISOLAMENTO E CONFIRMAÇÃO DA ANTOCIANINA
MALVIDINA-3,5-DIGLICOSÍDEO DA FLOR DE JAMBO
VERMELHO (*Syzygium malaccense* L.) POR CLAE-DAD**

Luciana Mouta de Oliveira

Rio de Janeiro

2012

LUCIANA MOUTA DE OLIVEIRA

Discente do curso de Farmácia

Matrícula n.º 0913800158

**ISOLAMENTO E CONFIRMAÇÃO DA ANTOCIANINA
MALVIDINA-3,5-DIGLICOSÍDEO DA FLOR DE JAMBO
VERMELHO (*Syzygium malaccense* L.) POR CLAE-DAD**

Trabalho de Conclusão de Curso, TCCII,
apresentado ao Curso de Graduação em
Farmácia da UEZO como parte dos requisitos
para a obtenção do grau de bacharel, sob a
orientação da **ANA CRISTINA MIRANDA SENNA
GOUVÊA**, M.Sc. em Ciência de Alimentos.

Rio de Janeiro

Dezembro de 2012

O48

OLIVEIRA, Luciana Mouta de.

Isolamento e confirmação da antocianina malvidina- 3,5- diglicosídeo da flor de jambo vermelho (*Syzygium malaccense* L.) por CLAE-DAD / Luciana Mouta de Oliveira. – 2012.

48 f.; 30 cm.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia)– Centro Universitário Estadual da Zona oeste, Rio de Janeiro, 2012.

Bibliografia: f. 30-37.

1. antocianinas. 2. CLAE. 3. Flor de jambo. 4. Malvidina 3,5- diglicosídeo. 5. . I. Título.

CDD 547.7

**ISOLAMENTO E CONFIRMAÇÃO DA ANTOCIANINA
MALVIDINA-3,5-DIGLICOSÍDEO DA FLOR DE JAMBO
VERMELHO (*Syzygium malaccense* L.) POR CLAE-DAD**

Elaborado por Luciana Mouta de Oliveira
Discente do Curso de Farmácia da UEZO

Este trabalho de Graduação foi analisado e aprovado com grau: 10

Rio de Janeiro, 13 de dezembro de 2012.

Ana Cristina Miranda Senna Gouvêa, (M.Sc.) (orientador)

Ronoel Luiz de Oliveira Godoy, (D.Sc) (coorientador)

Manuela Cristina Pessanha de Araujo Santiago, (M.Sc.)
(Embrapa Agroindústria de Alimentos-RJ)

Fernanda Marques Peixoto, (M.Sc.) (UEZO)

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Ana e Ricardo, por todo apoio e suporte durante a realização de todo o meu curso, possibilitando chegar até aqui. Nunca deixando faltar amor, carinho ou atenção.

Aos meus irmãos, Jansen, Julia e Maria Eduarda, por estarem sempre comigo, me apoiando e fazendo parte de todas as minhas realizações.

A toda a minha família, que sempre esteve torcendo por mim.

A minha orientadora, Ana Cristina M. S. Gouvêa, por toda atenção e tempo dedicados, e sempre se empenhando em me ensinar o necessário para a realização deste trabalho.

Ao meu coorientador e orientador de estágio, Ronoel Godoy, pela oportunidade de realizar estágio junto ao Laboratório de Cromatografia Líquida e a confiança em permitir que eu desenvolvesse este trabalho.

Aos analistas do Laboratório de Cromatografia Líquida, Manuela C. P. de A. Santiago e Sidney Pacheco, por todos os ensinamentos e ajuda prestados.

Aos estagiários do Laboratório de Cromatografia Líquida, Carolina Passos, Juliana Mouta, Allien Machado e Thiago Bacha, pela ajuda prestada sempre que possível, pelos momentos de descontração e por mostrar que às vezes a gente faz amigos onde nem se imagina.

E especialmente, a minha amiga, Raysa Valente, por me acompanhar desde o primeiro dia de faculdade, se tornando uma amiga para vida toda, compartilhando os momentos de felicidade e apoiando nos momentos difíceis, e nunca me deixando esquecer da minha capacidade.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE QUADROS E TABELAS.....	vii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	viii
RESUMO.....	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS.....	2
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	2
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
3.1. JAMBEIRO	2
3.1.1. Importancia nutricional.....	3
3.1.2. Atividade terapêutica.....	5
3.1.3. Flor de jambo	6
3.2. FLAVONOIDES.....	6
3.2.1. Antocianinas	8
3.2.1.1. Antocianinas em alimentos.....	10
3.2.1.2. Antocianinas em flores	11
3.2.1.3. Atividade antioxidante em antocianinas	13
3.2.1.4. Separação, identificação e quantificação	14
3.2.1.4.1. Cromatografia líquida de alta eficiência - clae	14
3.2.1.4.2. CLAE e antocianinas	16
3.2.1.4.3. Espectrofotometria de absorção na região do UV- Visível	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1. MATÉRIA-PRIMA.....	18
4.2. EXTRAÇÃO DAS ANTOCIANINAS	18
4.3. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA	19
4.4. ISOLAMENTO DA ANTOCIANINA	20
4.5. PURIFICAÇÃO DA ANTOCIANINA ISOLADA	20
4.6. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DA ANTOCIANINA ISOLADA	20

4.7. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DO EXTRATO METANÓLICO DE CASCA DE JAMBOLÃO	21
4.8. HIDRÓLISE ÁCIDA DA ANTOCIANINA ISOLADA.....	22
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	22
5.1. DETERMINAÇÃO DA ANTOCIANINA MAJORITÁRIA	22
5.2. ISOLAMENTO DA ANTOCIANINA DE INTERESSE	25
5.3. IDENTIFICAÇÃO DA ANTOCIANINA ISOLADA	26
5.4. HIDRÓLISE ÁCIDA DA ANTOCIANINA ISOLADA.....	28
6. CONCLUSÕES	30
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Flor do Jambuí

Figura 2: Frutos do Jambuí

Figura 3: Flavonoides, Estrutura química básica dos quatro grupos mais encontrados em alimentos

Figura 4: Cátion Flavílium

Figura 5: Estrutura básica das antocianinas.

Figura 6: Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência

Figura 7: Sistema básico de um cromatógrafo líquido

Figura 8: Espectros de absorção de antocianinas na região do UV-Vis.

Figura 9: Etapas de análise

Figura 10: Cromatograma do extrato de Flor de Jambuí a 520nm.

Figura 11: Espectros de absorção na região do UV-Vis das antocianinas majoritárias encontradas em flor de Jambuí

Figura 12: Espectros de absorção no UV-Vis a 520nm. (A) Espectro do pico IV (B) Espectro do pico V

Figura 13: Cromatograma da antocianina isolada

Figura 14: Perfil cromatográfico do Jambolão e identificação dos picos por espectrometria de massa. (adaptado de BRITO et al., 2007)

Figura 15: (A) Cromatogramas do extrato metanólico de Jambolão e da antocianina isolada sobrepostos. (B) Espectro de absorção no UV-Vis a 520nm da antocianina isolada. (C) Espectro de absorção no UV-Vis a 520nm do extrato metanólico de Jambolão

Figura 16: Cromatogramas do extrato metanólico de Jambolão e do extrato metanólico de Flor de Jambuí sobrepostos, identificação dos picos na figura 14

Figura 17: Cromatograma da antocianina isolada hidrolisada e espectros de absorção na região do UV-Vis dos picos encontrados

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1: Gradiente de Fase Móvel

Tabela 1: Composição Química e Valor Nutricional do Jambo

Tabela 2: Avaliação das características físicas e químicas da casca de jambo vermelho

Tabela 3: Substituintes nos carbonos da estrutura básica

Tabela 4: Exemplos de antocianinas glicosiladas e diglicosiladas identificadas em alimentos

Tabela 5: Exemplos de antocianinas glicosiladas e diglicosiladas identificadas em flores

Tabela 6: Condições Cromatográficas

Tabela 7: Área dos picos

Tabela 8: Antocianinas e seus espectros de absorção máximos no visível

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CLAE - cromatografia líquida de alta eficiência

DAD – Detetor de Arranjo de Diodos

ECZ - Eletroforese Capilar por Zonas¹⁹

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

IDR - Ingestão Diária Recomendada

EM - Espectrometria de Massas

RMN de ¹H - Ressonância Magnética Nuclear de prótons

RMN de ¹³C - Ressonância Magnética Nuclear de carbono

U.I. - Unidade Internacional

RESUMO

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) tem sido a técnica analítica mais utilizada e eficaz para análise de antocianinas, substâncias responsáveis pela coloração intensa em grande parte dos vegetais que apresentam pigmentos hidrossolúveis. Esta técnica, quando utilizadas condições adequadas, promove uma ótima separação, entre essas substâncias. Quando associada a outras ferramentas e/ou com a presença de padrões analíticos esta técnica é capaz de realizar identificação e quantificação destes pigmentos. A dificuldade de aquisição desses padrões, devido ao custo e a alta diversidade destes analitos, é que objetivou o presente trabalho a investigar novas fontes de aquisição. Portanto, o *Syzygium malaccense* L., conhecido popularmente no Brasil como jambeiro vermelho, uma árvore frutífera de origem asiática, dispõe em suas flores da antocianina malvidina-3,5-diglicosídeo, sendo uma promissora fonte desta antocianina. As flores do Jambeiro vermelho foram coletadas manualmente na Embrapa Agroindústria de Alimentos e submetidas aos processos de liofilização e moagem até formação de um pó de intensa coloração rosa. Do pó gerado, extraíram-se 5g com solução metanólica acidificada, sendo o extrato seco (sob fluxo de ar comprimido), ressuspenso em 4,5mL de solução de 5% de ácido Fórmico em água Milli-Q[®]/metanol (90:10, v/v), filtrado (filtro Millex[®] - 0,45µm), acondicionado em *vial*, então analisado em cromatógrafo líquido de alta eficiência Waters Alliance[®] 2695, acoplado ao detetor de arranjo de fotodiodos Waters[®] 2996, com coluna Symmetry[®] C₁₈ (150mm x 4,6mm; 3,5µm), um fluxo de 1,0mL/min e modo de eluição gradiente com acetonitrila e ácido fórmico. A análise gerou um cromatograma, cujo perfil apresentou cinco antocianinas com uma maior absorção a 520nm, destacando-se um pico que foi indicado, através de comparações com dados literários de valores observados do espectro de absorção na região do UV-Vis, ser a antocianina malvidina-3,5-diglicosídeo, que foi selecionada como candidata para ser isolada. Seu isolamento prosseguiu, utilizando um extrato mais concentrado, e com coleta automática através de uma válvula seletora de seis canais Rheodyne[®], adaptada como coletor de frações,

acoplada ao cromatógrafo. O isolamento por CLAE possibilitou a obtenção da antocianina malvidina-3,5-diglicosídeo com pureza de 93%. Para sua confirmação, foi utilizada como ferramenta, a comparação entre seu “ t_R ” e “espectro de absorção” com aqueles mesmos observados no cromatograma do extrato metanólico do pó da casca de Jambolão (*Syzygium cumini* L.), fonte esta que já apresentar a antocianina malvidina-3,5-diglicosídeo identificada por espectrometria de massas em trabalho literário. A comparação entre o perfil cromatográfico obtido nos cromatogramas dos extratos metanólicos da flor de Jambo e casca de Jambolão ainda possibilitou levantar a hipótese das duas matrizes apresentarem todas as mesmas antocianinas. Desta forma, com o presente trabalho, foi possível isolar e confirmar a antocianina malvidina-3,5-diglicosídeo em flor de jambo por uma técnica precisa e confiável (CLAE), a qual poderá ser utilizada como padrão analítico em futuras análises.

Palavras chaves: antocianinas, CLAE, flor de Jambo, malvidina-3,5-diglicosídeo.

1. INTRODUÇÃO

A etiologia de várias doenças tem sido relacionada a danos oxidativos induzidos em células e tecidos, incluindo doenças degenerativas tais como as cardiopatias, aterosclerose, problemas pulmonares e certos tipos de câncer. Estudos epidemiológicos demonstram uma redução destas doenças para consumidores de frutas e hortaliças, vegetais. Esta redução está relacionada à presença de compostos fenólicos, com atividade antioxidante, presente nestes alimentos. Dentre estas substâncias encontram-se as antocianinas, flavonoides com um espectro de cor que vai de azul a tons de púrpura, e que quando presentes nos alimentos além de conferir cor a estes, em sistemas biológicos propicia a prevenção contra auto-oxidação e peroxidação de lipídios.

Para o estudo destas atualmente a técnica mais utilizada, e uma das principais, para separação de antocianinas é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com fase reversa. Este tipo de cromatografia utiliza instrumentos sofisticados que podem ser totalmente automatizados. A identificação das antocianinas em alimentos e plantas por CLAE pode ser realizada através de uma comparação com padrões analíticos, tida como comparação direta, ou realizando-se uma conferência com dados da literatura, chamada comparação indireta. Muitos obstáculos são encontrados quando se utiliza o procedimento de comparação direta, um deles é quando há necessidade da utilização de padrões analíticos comerciais, devido à falta, a dificuldade de aquisição, e até mesmo ao alto custo destes padrões de pigmentos antociânicos, visto que estes apresentam baixa estabilidade e requerem um longo tempo para aquisição. Com o intuito de minimizar estes problemas, GOUVÊA *et al.* (2012) propõem a produção destes padrões a partir do isolamento por CLAE das antocianinas de matrizes naturais, resultando em padrões com alta pureza de maneira rápida.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é o isolamento, purificação e confirmação da antocianina malvidina-3,5-diglicosídeo em flores de *Syzygium malaccense* L..

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Este trabalho possui como objetivos específicos:

- Extração dos pigmentos antociânicos da amostra de flores de *Syzygium malaccense* L. liofilizada.
- Determinação do perfil cromatográfico dos pigmentos antociânicos da amostra.
- Isolamento da antocianina através de um sistema de CLAE acoplado a uma válvula de seis vias da Rheodyne®.
- Confirmação da antocianina majoritária por comparação com o perfil cromatográfico dos pigmentos antocianicos de amostra de Jambolão (*Syzygium cumini* L.).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. JAMBEIRO

O jambeiro (*Syzygium malaccense* L., Merr. & Perry), é uma fruteira pertencente à família Myrtaceae, uma família com aproximadamente 3.000 espécies de árvores e arbustos, largamente espalhadas nas florestas brasileiras e distribuídas em regiões tropicais e subtropicais do globo (VIEIRA *et al.*, 2004; DE OLIVEIRA *et al.*, 2005). Apesar de ser originário do sudoeste da Ásia, o jambeiro

pode ser encontrado facilmente nas regiões norte, nordeste e sudeste do Brasil, onde é cultivado tanto como fruteira quanto como planta ornamental, devido a forma piramidal de sua copa que alcança vinte metros de altura (IKARAM, 2009; ZAMBELLI *et al.*, 2006; FALCÃO *et al.*, 2002). Em certos locais pode ser encontrado o ano inteiro, podendo haver, no mesmo ano, dois períodos de abundância, geralmente, de abril a maio e de agosto ou setembro a novembro (CAVALCANTE, 1974). Sua inflorescência contém de uma a doze flores, com pedicelos curtos. As flores (figura 1) são hermafroditas, actinomorfas, diclamídias, possuem quatro pétalas com numerosos estames vermelhos ou rosa, raramente bancas (FALCÃO, 2002; WHISTLER & ELEVITCH, 2006). Os frutos (figura 2) do jameiro são piriformes e apresentam cor vermelho escuro, levemente adocicado, exalando aroma de rosas, persistente e bastante agradável ao olfato, podendo ser consumido *in natura*, em forma de compotas, doce em massa, geleias, licores e aguardente e ainda ser utilizado para a produção de corante, flavorizante e antioxidante natural para uso em vários segmentos da indústria (IKARAM, 2009; FALCÃO, 2002; AUGUSTA; *et al.*, 2010).



Figura 1: Flor de Jameiro

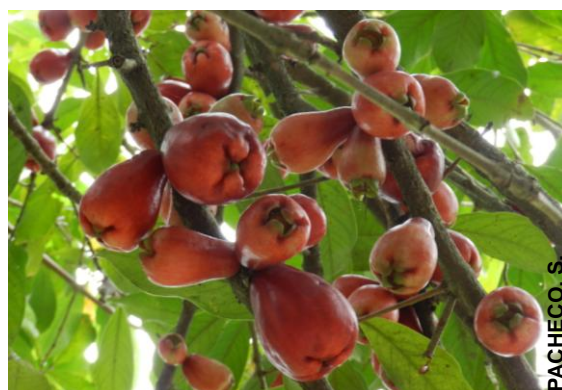


Figura 2: Frutos do Jameiro

3.1.1. IMPORTÂNCIA NUTRICIONAL

Em virtude da alta produção de frutos por árvore, curto período de produção, pequena vida útil do fruto *in natura* e da falta de conhecimento da

viabilidade tecnológica para a sua industrialização, grande parte dos frutos do jambeiro é desperdiçada na época da safra (CARDOSO, 1994). O conhecimento da composição nutricional do fruto permitiria a população consumir os nutrientes de acordo com a Ingestão Diária Recomendada (IDR); além do desenvolvimento de pesquisas que estabeleçam uma relação entre dieta e doenças uma vez que frutos e hortaliças são fontes importantes de nutrientes (vitaminas, minerais e flavonoides) na dieta humana, isso irá proporcionar um melhor planejamento agrícola e das indústrias de alimentos (GONDIM *et al.*, 2005).

Trabalhos científicos relatam que os frutos do jambeiro apresentam uma alta taxa de umidade e açúcares, além de níveis aceitáveis de acidez, lipídios e taninos (ENIDIOK & ATTAH, 2010). Em 1987, Morton descreveu a composição química e o valor nutricional (tabela1) relativos à porção comestível do jambo.

Tabela 1: Composição Química e Valor Nutricional do Jambo

	em 100g da área comestível
Umidade	90.3 – 91.6 g
Cinzas	0.26 – 0.39 g
Proteína	0.5 – 0.7 g
Lipídios	0.1 – 0.2 g
Fibras	0.6 – 0.8 g
Cálcio	5.6 – 5.9 mg
Fósforo	11.6 – 17.9 mg
Ferro	0.2 – 0.82 mg
Carotenóides	0.003 – 0.008 mg (3 – 10 U.I.*, Vitamina A)
Vitamina B1	15 – 39 mcg
Vitamina B2	20 – 39 mcg
Vitamina B3	0.21 – 0.40 mg
Vitamina C	6.5– 17.0 mg

* U.I. = Unidade Internacional. Fonte: MORTON, 1987.

Segundo a avaliação realizada por Augusta *et al.* (2010), a casca do jambo isolada apresenta alto teor de carboidratos, baixo valor energético, elevada acidez

e altas concentrações de ácido ascórbico, antocianinas e fibra alimentar (tabela 2).

Tabela 2: Avaliação das características físicas e químicas da casca de jambo vermelho

Características	Valores Médios
Umidade (g.100 g ⁻¹ de casca)	14,11 ± 0,4
Sólidos Solúveis Totais (°Brix)	3,00 ± 0,01
pH	3,50 ± 0,02
Acidez total titulável (ATT) (g ac. cítrico.100 g ⁻¹ de casca)	0,60 ± 0,11
Açúcares redutores (g.glicose.100 g ⁻¹ de casca)	3,04 ± 0,4
Açúcares não redutores (g aç. Totais.100 g ⁻¹ de casca)	ND**
Vitamina C (mg.100 g ⁻¹ de casca)	292,59 ± 0,80
Antocianina (mg.100 g ⁻¹ de casca)	300,54 ± 0,45
Carboidratos (g.100 g ⁻¹ de casca)	59,25 ± 0,15
Proteínas (g.100 g ⁻¹ de casca)	8,62 ± 0,23
Lipídios (g.100 g ⁻¹ de casca)	4,51 ± 0,10
Fibras (g.100 g ⁻¹ de casca)	9,34 ± 0,16
Cinzas (g.100 g ⁻¹ de casca)	4,17 ± 0,35
Cálcio (mg.100 g ⁻¹ de casca)	0,36 ± 0,72
Valor calórico total (kcal.100 g ⁻¹ de casca)	312,07 ± 0,90

**ND = Não detectado. Fonte: AUGUSTA *et al.*, 2010.

3.1.2. ATIVIDADE TERAPÊUTICA

O jambeiro possui um histórico no uso da medicina popular. Os chás de folhas, raízes e cascas são indicados como laxativo ou purgativo. Das sementes é extraído um fluído usado como antidiabético (ZAMBELLI, 2006). A literatura descreve ainda o uso de extratos das folhas e caule para o tratamento de dor de garganta, cortes, aftas, doenças venéreas, tuberculose e distúrbios do trato digestivo (KAAIAKAMANU & AKINA, 1922; NAGATA, 1971).

Em 1995, Loucher realizou estudos utilizando extratos de plantas

medicinais havaianas, dentre elas a *Syzygium malaccense* L., onde em extratos de folha e casca do caule constatou atividade biológica para inibição de quatro espécies de vírus, três espécies de fungos, além de algum efeito sobre a inibição do sistema complemento (proteínas de membrana plasmática participantes das defesas inatas e adquiridas). Oliveira (2006) descreve sua atividade moluscida em extratos de *Syzygium malaccense* L., além da presença do ácido gálico extraído das folhas, o que ainda não havia sido descrita nesta espécie anteriormente. Ao ácido gálico são atribuídas ações anticarcinogênica, antimutagênica, antioxidante, antialérgica, antiinflamatória, antifúngica e inibidor da enzima conversora de angiotensina (NEGI *et al.*, 2005; BARBOSA-FILHO *et al.*, 2006). Além dessas atividades, o ácido gálico é usado como protótipo, originando diversos derivados com importantes ações farmacológicas, tais como atividade antitumoral, inibidor do HIV-1, antioxidante e antimalarial (PELLEGRINA *et al.*, 2005).

3.1.3. FLOR DE JAMBO

As árvores do jambeiro começam a florescer quando possuem de 7 a 8 anos (WHISTLER & ELEVITCH, 2006). As flores são conhecidas pelo belo tapete vermelho, formado por seus estames, quando caem ao chão (FALCÃO *et al.*, 2002). Na Indonésia, as flores do jambeiro são utilizadas na alimentação, sob a forma de saladas, e na confecção de xaropes (MORTON, 1987).

3.2. FLAVONOIDES

Encontrados em frutas, vegetais, sementes, cascas de árvores, raízes, talos, flores e em seus produtos de preparação (geleias, vinhos, chás, compotas, entre outros), os flavonoides são um grupo de compostos fenólicos de propriedades benéficas à saúde humana, tais como atividades antioxidante, anti-

inflamatória, anti-tumoral e inibidora da agregação plaquetária. Ainda, a ingestão de flavonoides está associada com a longevidade e redução na incidência de doenças cardiovasculares (VOLP *et al.*, 2008).

Estruturalmente os flavonoides são formados por 15 átomos de carbono em uma estrutura C6-C3-C6, composta por dois anéis aromáticos ligados por três carbonos e um átomo de oxigênio formando um anel heterocíclico oxigenado, denominado anel C (GOUVÊA,2010). Existem 13 subclasses de flavonoides, dentre a quais os 4 maiores grupos (figura 3) são: as flavonas, flavanonas, catequinas e antocianinas (TRUEBA, 2003; VOLP *et al.*, 2008; MARTÍNEZ-FLÓREZ, 2002).

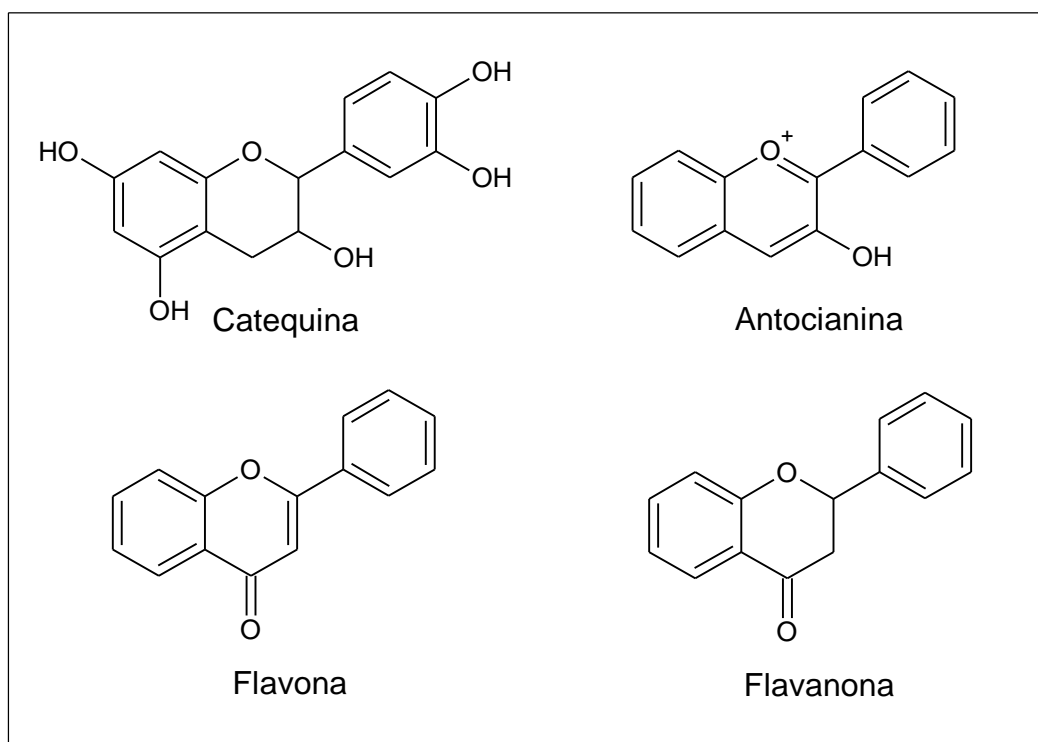


Figura 3: Flavonoides, Estrutura química básica dos quatro grupos mais encontrados em alimentos

3.2.1. ANTOCIANINAS

As antocianinas (do Grego *ánthos*, flor e *kýanos*, azul) são compostos fenólicos pertencentes ao grupo dos flavonoides (VOLP *et al.*, 2008; POPPI, MARÇO & SCARMINIO, 2008). Possuem a mesma origem biossintética dos outros flavonoides naturais, porém, ao contrário dos outros flavonoides, as antocianinas absorvem fortemente na região visível do espectro (BROUILLARD, 1982). Seu espectro de cor vai do vermelho ao azul, apresentando-se também como uma mistura de ambas as cores resultando em tons de púrpura.

A coloração de muitas frutas, folhas, flores e hortaliças são atribuídas à presença de antocianinas (MAZZA & MINIATI, 1993; DEGÁSPARI & WASZCZYNSKYJ, 2004). Após a clorofila, as antocianinas são o maior e mais importante grupo de pigmentos hidrossolúveis do reino vegetal (HARBORNE & GRAYER, 1988; BRIDLE & TIMBERLAKE, 1997). Estes pigmentos são glicosídeos que apresentam em sua estrutura química um resíduo de açúcar na posição 3, facilmente hidrolisado por aquecimento com HCl 2N. Como produtos desta hidrólise obtém-se o componente glicídico e a aglicona, denominadas antocianidinas (VOLP *et al.*, 2008).

As antocianidinas apresentam como estrutura fundamental o cátion flavílico (2-fenilbenzopirilium) (VOLP *et al.*, 2008), representado na Figura 4.

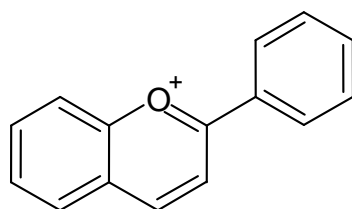


Figura 4: Cátion Flavílium

As antocianidinas não possuem grupos glicosídeos, e em sua maioria possuem hidroxilas nas posições 3, 5 e 7 (figura 5). Já nas antocianinas, uma ou mais destas hidroxilas estão ligadas a açúcares, sendo os mais comuns: glicose, xilose, arabinose, ramnose, galactose ou dissacarídeos constituídos por esses

açúcares, aos quais podem estar ligados ácidos fenólicos, como p-coumárico, cafêico, fenílico e vanílico (POPPI, MARÇO & SCARMINIO, 2008). A ligação deste diversos substituintes em variadas posições e com diferentes combinações permite a existência de uma grande variedade de antocianinas, além de conferir uma maior estabilidade à molécula (STRACK & WRAY, 1989).

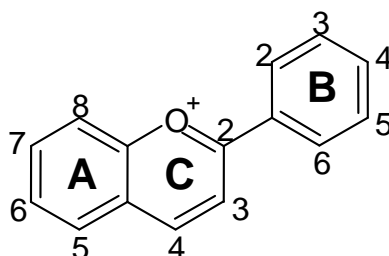


Figura 5: Estrutura básica das antocianinas

Tabela 3: Substituintes nos carbonos da estrutura básica.

Antocianidina	Substituição nos carbonos					
	3	5	6	7	3'	5'
Pelargonidina (Pg)	OH	OH	H	OH	H	H
Cianidina (Cy)	OH	OH	H	OH	OH	H
Peonidina (Pn)	OH	OH	H	OH	OMe	H
Delfinidina (Dp)	OH	OH	H	OH	OH	OH
Petunidina (Pt)	OH	OH	H	OH	OMe	OH
Malvidina (Mv)	OH	OH	H	OH	OMe	OMe

As antocianinas são solúveis apenas em meios aquosos e sofrem mudança de cor em função do pH. Sua estabilidade é maior sob condições ácidas, porém sua degradação pode ocorrer por vários mecanismos, iniciando com perda da cor, seguida do surgimento de coloração amarelada e formação de produtos insolúveis. A estabilidade da cor é dependente da estrutura e da concentração dos pigmentos, além de fatores como o pH, temperatura e presença de oxigênio (LOPES *et al.*, 2007).

3.2.1.1. ANTOCIANINAS EM ALIMENTOS

As antocianinas mais comumente encontradas em frutas e hortaliças são derivadas principalmente de seis antocianidinas: pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina e malvidina. A nomenclatura dos pigmentos é derivada da fonte (do vegetal) em que eles foram primeiramente isolados (HARBORNE, 1994). Frequentemente a glicosilação das antocianinas é observada nas posições dos carbonos 3 e 5, sendo também comum a forma de diglicosídeo nestas mesmas posições (Tabela 4).

Tabela 4: Exemplos de antocianinas glicosiladas e diglicosiladas identificadas em alimentos

Antocianinas	Alimentos
Cianidina-3-glicosídeo	Cerejas*, jambolão*, uvas*, morangos*, amoras vermelhas*, açai (E. oleracea) ***, juçara (E.edulis)**
Cianidina-3,5- diglicosídeo	Jambolão **
Peonidina-3-glicosídeo	Cerejas*, jabuticaba*, uvas*
Peonidina-3,5- diglicosídeo	Jambolão**
Malvidina-3- glicosídeo	Uvas*
Malvidina-3,5- diglicosídeo	Jambolão**
Pelargonidina-3-glicosídeo	Morangos*, juçara (E.edulis)**
Delfinidina-3,5-diglicosídeo	Berinjelas*, jambolão**
Delfinidina-3-galactosídeo ou glicosídeo	Guajiru **
Petunidina-3-glicosídeo	Uvas*
Petunidina-3-glicosídeo ou galactosídeo	Guajiru**
Petunidina-3,5- diglicosídeo	Jambolão**

Fonte: GOUVÊA, 2010 - * (BOBBIO & BOBBIO, 1995), ** (BRITO et al., 2007), *** (GALLORI et al., 2004).

3.2.1.2. ANTOCIANINAS EM FLORES

As cores das flores são determinadas por inúmeros compostos químicos, sendo os mais importantes os flavonoides e carotenoides. Dentre os flavonoides encontrados em flores, destacam-se as antocianinas. A presença das antocianinas confere as flores uma alta capacidade antioxidante, influenciando positivamente em seu consumo como alimento (ROP *et al.*, 2012). Algumas antocianinas e suas fontes são encontradas na tabela 5.

Tabela 5: Exemplos de antocianinas glicosiladas e diglicosiladas identificadas em flores

Antocianias	Espécies
Cianidina-3-glicosídeo	<i>Feijoa sellowiana</i> L., <i>Callistemon phoenicicus</i> Lindl., <i>C lanceolatus</i> Sweet, <i>Calothammus oldfieldii</i> F. Muell., <i>C. quadrificus</i> R. Br., <i>C. torulosa</i> Schau., <i>C. villosa</i> R. Br., <i>Eucalyptus caesia</i> Benth., <i>Kunzea baxterii</i> Schau., <i>L. flavescens</i> Sm., <i>L. scoparium</i> Forst., <i>Meterosideros excelsa</i> Sol., <i>M. fulgens</i> Sol., <i>M. kermadecensis</i> W. R. B. Oliver, <i>Scholtzia capitata</i> F. Muell., <i>S. parviflora</i> F. Muell., <i>Thriptomene denticulata</i> Benth., <i>T. maisonervii</i> F. Muell., <i>Couropita guinensis</i> Hook., <i>Gynotroches axillaris</i> Bl., <i>Lumnitzera littorea</i> Voight, <i>Quisqualis indica</i> L., <i>M. sanguineum</i> Sims, <i>Oritrephes grandiflora</i> Ridl.
Malvidina-3-glicosídeo	<i>Rhodomyrtus tomentosa</i> Wight, <i>Lagerstroemia indica</i> L.
Peonidina-3-glicosídeo	<i>Calothammus oldfieldii</i> F. Muell., <i>C. villosa</i> R. Br., <i>L. scoparium</i> Forst., <i>Meterosideros excelsa</i> Sol., <i>M. kermadecensis</i> W. R. B. Oliver, <i>Lumnitzera littorea</i> Voight
Pelargonidina-3-glicosídeo	<i>C. villosa</i> R. Br., <i>Lumnitzera littorea</i> Voight
Delfinidina-3-glicosídeo	<i>Kunzea baxterii</i> Schau., <i>M. fulgens</i> Sol., <i>Chamelaucium uncinatum</i> Schau., <i>Pileanthus pendunculatus</i> Endl., <i>Couropita guinensis</i> Hook., <i>Lagerstroemia indica</i> L.
Cianidina-3,5-diglicosídeo	<i>C. ailesii</i> F. Muel., <i>M. steedmani</i> C. A. Gardn., <i>Scholtzia capitata</i> F. Muel., <i>S. parviflora</i> F. Muel., <i>Darwinia citriodora</i> Benth., <i>D. oldfield</i> Benth., <i>Verticordia monadelphpha</i> Turez., <i>V. picta</i> Endl., <i>Calothammus oldfieldii</i> F. Muell., <i>Memcylon amplexicaule</i> Robxb.
Malvidina-3,5-diglicosídeo	<i>Eugenia (syzygium) malaccensis</i> L., <i>Hypocalymma robustum</i> Endl., <i>K. jocunda</i> Diels, <i>Leptospermum erubescens</i> Schau., <i>L. seriaceum</i> Labill., <i>Melaleuca nesophila</i> F. Muell., <i>M. kermadecensis</i> W. R. B. Oliver, <i>Tryptomene denticulata</i> Benth., <i>L. speciosa</i> Pers., <i>Dissotis rotundifolia</i> Benth., <i>Melastoma malabathricum</i> L., <i>M sanguineum</i> Sims, <i>M. caeruleum</i> Jack
Peonidina-3,5-diglicosídeo	<i>Lumnitzera littorea</i> Voight., <i>Beaufortia squarrosa</i> Schau., <i>M kermadecensis</i> W. R. B. Oliver
Pelargonidina-3,5-diglicosídeo	<i>Beaufortia squarrosa</i> Schao., <i>Darwinia citriodora</i> Benth., <i>Punica granatum</i> St Lag., <i>Lumnitzera littrea</i> Voight
Delfinidina-3,5-diglicosídeo	<i>Verticordia monadelphpha</i> Turez.

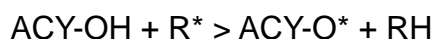
Fonte: adaptado de LOWRY, 1976.

3.2.1.3. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM ANTOCIANINAS

A ação antioxidante é a propriedade mais relatada das antocianinas (MARTÍNEZ-FLÓREZ *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 1999; NIJVELDT *et al.*, 2001). Durante seu trajeto pelo trato digestivo até a corrente sanguínea as antocianinas permanecem intactas (MIYAZAWA *et al.*, 1999) e exercem efeitos terapêuticos conhecidos que incluem redução de doença coronária, efeitos anticancerígenos, antitumorais, antiinflamatórios e antidiabéticos, além do melhoramento da acuidade visual e do comportamento cognitivo, efeitos estes relacionados à sua atividade antioxidante (ORTÍZ *et al.*, 2011).

O potencial antioxidante de uma antocianina está relacionado com as diferenças em sua estrutura química. Variações de posição e tipos de grupos químicos nos anéis aromáticos, bem como o número e posição de hidroxilas, alteram o potencial antioxidante das antocianinas (VOLP *et al.*, 2008).

As antocianinas possuem uma estrutura química adequada para a ação antioxidante, sendo capazes de doar elétrons ou átomos de hidrogênio para radicais livres (PRIOR, 2003). Esta ação antioxidante é resultante da habilidade que essas substâncias possuem em estabilizar espécies reativas de oxigênio através de sua reação com o componente reativo do radical, onde as antocianinas são oxidadas pelos radicais, resultando em um radical menos reativo e mais estável (NIJVELDT *et al.*, 2001). Esta reação pode ser observada abaixo:



Onde: ACY= antocianina, R*= radical livre e O*= radical livre de oxigênio.

No entanto, são necessários mais estudos para esclarecer os mecanismos pelo qual as antocianinas promovem esta atividade antioxidante, além de estudos sobre outras substâncias que possam estar presentes nos extratos antociânicos sendo responsáveis total ou parcialmente por esta atividade (ORTÍZ *et al.*, 2011).

3.2.1.4. SEPARAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

O estudo de antocianinas presentes em extratos vegetais pode ser realizado por diferentes técnicas, a escolha da técnica a ser empregada é dependente do objetivo da análise. Para fins de detecção da presença de antocianinas, pode ser utilizada a técnica de cromatografia em papel (CP), contudo esta deve ser encarada apenas como um teste preliminar pois, neste caso, existe a necessidade de purificação, melhor separação e isolamento das antocianinas; já quando deseja-se a identificação de antocianinas individuais, técnicas mais avançadas devem ser empregadas como uma melhor opção, sendo elas: a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), espectrometria de massas (MS), ressonância magnética nuclear de prótons (RMN de ^1H) e de carbono (RMN de ^{13}C), eletroforese capilar por zonas (ECZ – Capillary Zones Electrophoresis, CZE), além de equipamentos que combinam estas e outras técnicas (equipamentos hifenados) (POPPI, MARÇO & SCARMINIO, 2008).

3.2.1.4.1. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA - CLAE

A Cromatografia Líquida ocupa um lugar de destaque entre os métodos analíticos modernos, devido à facilidade em efetuar a separação de espécies químicas, possibilitando ainda sua identificação e quantificação quando há a presença de padrões externos (RUTZ, 2009). Sendo a cromatografia um método físico-químico, ela fundamenta-se na migração diferencial dos componentes de uma mistura, o que ocorre devido a diferentes interações entre duas fases imiscíveis, sendo uma fase estacionária que tem uma grande área superficial de contato, e a outra um fluido que se move através da fase estacionária sendo chamada de fase móvel (LANÇAS, 1993; DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998).

Nos últimos 40 anos, a CLAE foi à técnica analítica mais desenvolvida, difundida e empregada em laboratórios de análise de indústrias químicas e

farmacêuticas, em áreas médicas e em muitos outros campos da ciência e até em órgãos governamentais (MALDANER & JARDIM, 2009). A CLAE utiliza pequenas colunas, nas quais uma fase móvel líquida que é bombeada a alta pressão e elui sobre a fase estacionária que está em seu interior, assim, os solutos com maior afinidade com a fase móvel serão eluídos primeiro e posteriormente os que têm maior afinidade com a fase estacionária (RUTZ, 2009). Nas colunas utilizadas para CLAE a fase estacionária é formada de partículas com diâmetro de 2 a 10 μ m, o que promove uma maior eficiência de análise e permite a diminuição do tamanho da coluna, levando a um menor tempo de análise. Partículas menores que 2 μ m promovem uma maior eficiência, porém elevam a pressão do sistema a níveis não suportados pela CLAE, permitindo que este tamanho de partícula seja utilizado apenas na Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (MALDANER & JARDIM, 2009). O método de CLAE dispõe de diferentes mecanismos de separação podendo ser de: partição, adsorção, fase ligada, troca iônica ou exclusão de tamanho. Pode ser efetuada em fase normal, fase estacionária polar e fase móvel apolar, ou em fase reversa, fase estacionária apolar e fase móvel polar. O equipamento (figura 6) é dotado de um sistema de abastecimento e programadores da fase móvel, podendo esta ser isocrática ou de gradiente; bombas de alta pressão; injetor; coluna; e detectores, sendo o registro dos dados feito por um registrador, integrador ou mesmo um microcomputador (figura 7), que também é utilizado na programação de todas as etapas do processo (RUTZ, 2009).



Figura 6: Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência

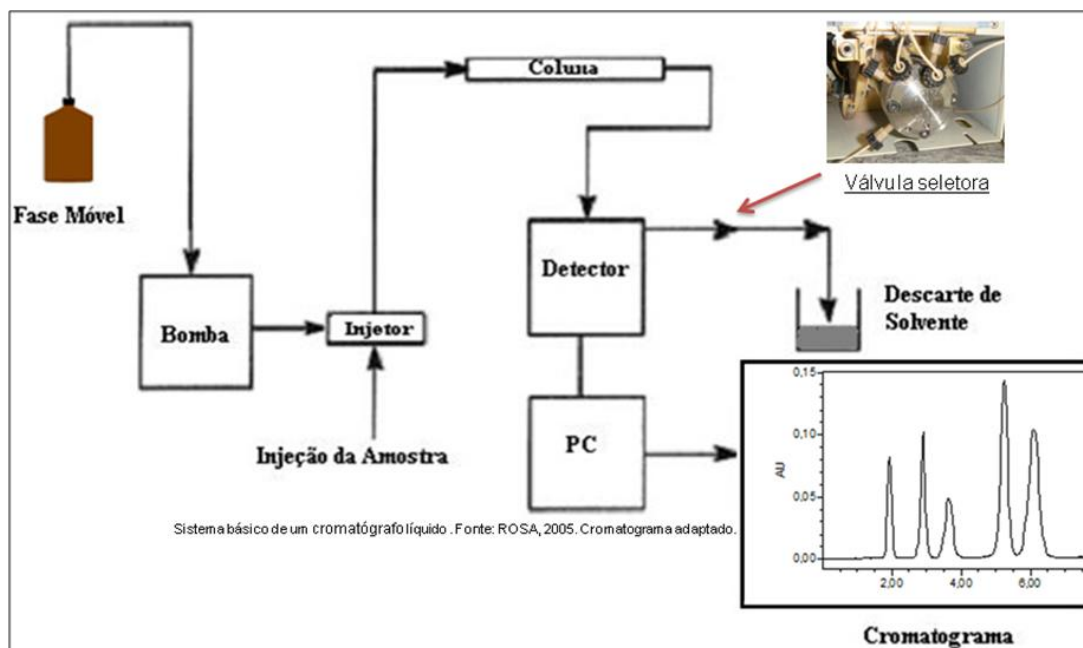


Figura 7: Sistema básico de um cromatógrafo líquido. Fonte: GOUVÊA, 2010.

3.2.1.4.2. CLAE E ANTOCIANINAS

A CLAE com fase reversa é uma das técnicas mais utilizadas, e uma das principais, na separação de antocianinas. Sem a necessidade de uma purificação excessiva dos extratos, a CLAE permite a separação e, quando há padrões disponíveis, as mesmas podem ser identificadas e quantificadas. Porém, na maioria das vezes, a técnica de CLAE é empregada apenas na separação dos pigmentos, pois devido à grande diversidade das antocianinas há falta de padrões disponíveis no mercado, tornando-se difícil a identificação das mesmas. Em 1999, Goiffon *et al* propuseram um método para identificação baseado nos parâmetros que afetam a retenção da cromatografia líquida, relacionando o tempo de retenção de várias antocianinas com o tempo de retenção de uma antocianina que está presente na maioria das frutas vermelhas: a cianidina-3-glicosídeo (POPPI, MARÇO & SCARMINIO, 2008).

3.2.1.4.3. ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO UV-VISÍVEL

Substâncias dotadas de cor são, em geral, avaliadas por espectrofotometria (LOPES *et al.*, 2007). A identificação de antocianinas por CLAE com detecção espectrofotométrica foi incentivada com o desenvolvimento do arranjo de diodos (DAD), pois com ele é possível obter os espectros de absorção de cada substância (SAMPAIO, 2008). Assim como todos os flavonoides, as antocianinas demonstram uma alta absorbância na faixa de 250 a 280 nm (região UV) e, particularmente, têm uma intensa absorção na faixa de 520 a 560 nm (figura 8), região visível (LOPES *et al.*, 2007). Nas antocianinas, o espectro de absorção UV-Vis pode proporcionar informações a respeito da natureza da antocianina, o modelo de glicosilação e possibilidade de acilação (ORTÍZ *et al.*, 2011).

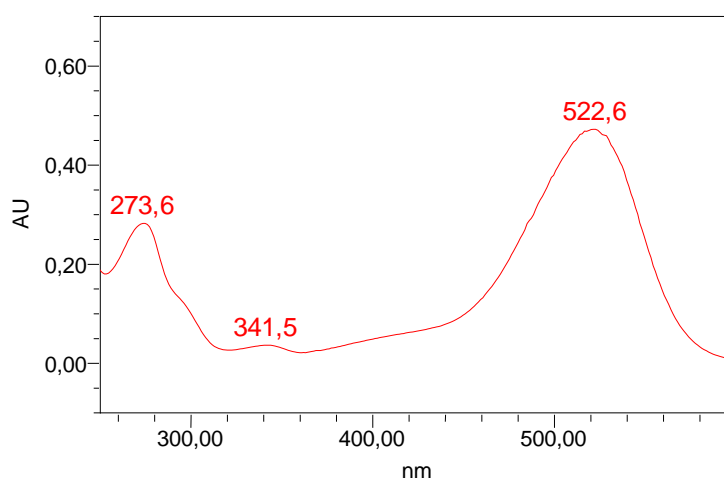


Figura 8: Espectros de absorção de antocianinas na região do UV-Vis (520nm), como exemplo a delfinidina-3,5-diglicosídeo.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATÉRIA-PRIMA

Como matéria prima foi utilizada pétalas e estames da flor do jambeiro (figura 9A), coletadas na Embrapa Agroindústria de Alimentos. As pétalas e estames foram separados das demais partes da flor, em seguida foram lavados, congelados e liofilizados por um período de 24 horas em liofilizador Liotop modelo L 101, à temperatura de -40°C. Da amostra liofilizada obteve-se um pó utilizando-se o moinho IKA modelo A11. Todos os solventes utilizados nas análises eram da marca Tédia, grau CLAE.

4.2. EXTRAÇÃO DAS ANTOCIANINAS

A extração das antocianinas (figura 9B) foi realizada segundo a metodologia adaptada de SANTIAGO *et al.* (2010). Nesta etapa, utilizou-se ±4g do pó da amostra liofilizada, para obtenção de um extrato concentrado que possibilitasse a coleta da antocianina de interesse. A amostra foi acondicionada em um tubo de Falcon de 50 ml, onde foram adicionados 2,0mL de solução ácido fórmico/metanol (10:90, v/v), agitado em Vortex durante 1 minuto, sonificado por 10 minutos no ultrasson Cleanears e, centrifugado a 6000 rpm por um período de 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um frasco, onde passou por uma secagem sob fluxo de ar comprimido filtrado (Millipore Millex-GV 0,22µm) e posteriormente foi ressuspensão em 10mL de solução para injeção, 5% de ácido Fórmico em água Milli-Q[®]:metanol (90:10, v/v), e acondicionado em *vial*.

Anteriormente a secagem sob fluxo de ar comprimido, o extrato teve de passar por centrifugação em microcentrífuga na velocidade de 14.000rpm por 5

minutos para evitar possíveis partículas em suspensão que pudessem danificar a coluna cromatográfica.

4.3. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

A análise cromatográfica (figura 9C) foi realizada em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Waters® Alliance modelo 2690/5, com detector de arranjo de fotodiodos Waters® modelo 2996, software Empower®, coluna C₁₈ Waters Symmetry® 3,5µm (150mm x 4,6mm) e 50µL de injeção. Na etapa cromatográfica foi utilizada a metodologia descrita para amostras liofilizadas proposta por Gouvêa & Godoy (2011), condições cromatográficas e gradiente de fase móvel utilizados estão demonstrados na tabela 6 e quadro 1, respectivamente.

Tabela 6: Condições Cromatográficas

Fluxo	1,0 mL/min
Fase Móvel (Solvente A)	Ácido Fórmico 5%
Fase Móvel (Solvente B)	Acetonitrila
Tempo de corrida	20 min.
Temperatura da coluna	40°C
Temperatura do vial	15°C

Quadro 1: Gradiente de Fase Móvel

Gradiente de Fase Móvel			
		Canais	
Tempo	Fluxo	A(%)*	B(%)**
0	1,0	95	5
15	1,0	87	13
16,5	1,0	86	14
18	1,0	95	5
20	1,0	95	5

* Ácido Fórmico 5%, ** Acetonitrila

4.4. ISOLAMENTO DA ANTOCIANINA

A coleta da antocianina de interesse (malvidina-3,5-diglicosídeo) (figura 9D), com a finalidade de seu isolamento, foi realizada com o mesmo sistema cromatográfico e seguindo as mesmas condições das análises descritas no item 4.3, com o diferencial do uso da válvula seletora de seis canais Rheodyne[®] adaptada como coletor de frações.

O extrato metanólico concentrado da amostra liofilizada foi injetado 150 vezes, automaticamente, com um volume de injeção de 50 μ L, onde em cada injeção coletou-se a antocianina de interesse.

4.5. PURIFICAÇÃO DA ANTOCIANINA ISOLADA

Após a coleta, é fundamental a realização da etapa de *clean up* da amostra (figura 9E). Etapa de limpeza onde a amostra, que se encontrava diluída em fase móvel, foi transferida e concentrada na solução de solução ácido fórmico/metanol (10:90, v/v).

Para esta etapa foi utilizado cartucho Sep-Pak C₁₈ Waters[®] previamente acondicionado com solução ácido fórmico/metanol (10:90, v/v). Após saturação do cartucho com o extrato antociânico obtido, o mesmo foi lavado com 10 mL da solução aquosa de HCl 0,01%. O pigmento antociânico isolado foi eluído do cartucho com solução de ácido fórmico/metanol (10:90, v/v).

4.6. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DA ANTOCIANINA ISOLADA

Para análise cromatográfica, 1mL do extrato isolado, purificado (*clean up*) e seco sob fluxo de ar comprimido filtrado, foi ressuspendido em 200 μ L de solução para injeção e acondicionado em *vial*.

A análise (figura 9F) foi realizada com um volume de injeção de 20 μ L, sob as mesmas condições cromatográficas do item 4.3.

4.7. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DO EXTRATO METANÓLICO DE CASCA DE JAMBOLÃO

As amostras de Jambolão (*Syzygium cumini* L.) foram liofilizadas, moídas e extraídas segundo a metodologia descrita no item 4.2. Para execução da análise, 1mL do extrato metanólico foi seco, sob fluxo de ar comprimido filtrado, ressuspensionado em 200 μ L de solução para injeção e acondicionado em *vial*.

A análise foi realizada com um volume de injeção de 10 μ L, sob as mesmas condições cromatográficas utilizadas no item 4.3.

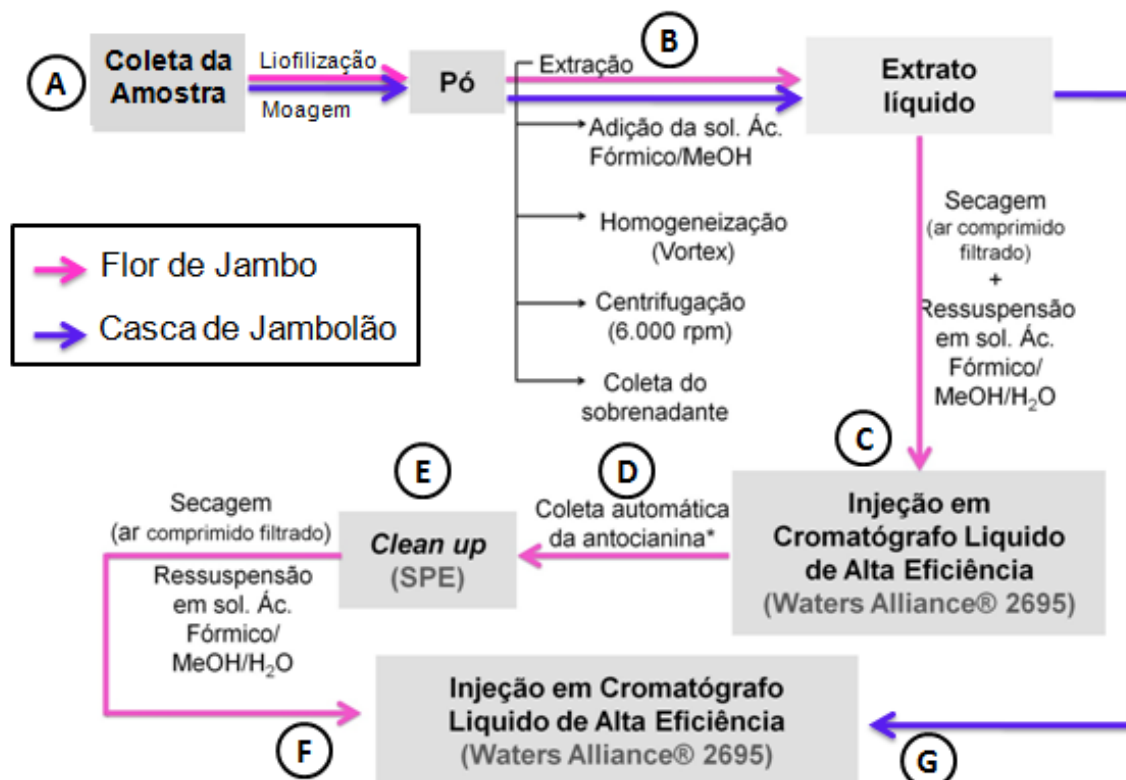


Figura 9: Etapas de análise

4.8. HIDRÓLISE ÁCIDA DA ANTOCIANINA ISOLADA

A hidrólise ácida foi realizada segundo metodologia adaptada de DRUST & WROLSTAD (2001).

Em tubos de vidro de tampa rosqueada, secou-se, sob fluxo de ar comprimido filtrado, 1ml da antocianina isolada purificada (obtida no item 4.5). Após a secagem, a amostra foi ressuspenida nas soluções de hidrólise, primeiramente em 60µL de solução Metanol/0,01% HCl e, depois foram acrescentados 10ml de solução de HCl 2M. A hidrólise foi então realizada em estufa a 90°C, após 1 hora e 30 minutos a amostra foi então resfriada em banho de gelo.

A amostra então, passou por uma etapa de ajuste de pH, onde com a adição de 8ml de uma solução de NaOH 0,1M. o pH foi ajustado para aproximadamente 1,2.

O *Clean up* da amostra ocorreu segundo a metodologia descrita no item 4.5., em seguida foi realizado a análise cromatográfica sob as mesmas condições cromatográficas utilizadas no item 4.3.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. DETERMINAÇÃO DA ANTOCIANINA MAJORITÁRIA

A CLAE, acoplada ao detetor de arranjo diodo é atualmente a técnica mais utilizada para separação de antocianinas, a utilização desta técnica associada à metodologia de análise proposta por Gouvêa e Godoy (2011) mostrou-se eficaz, visto que proporcionou uma separação rápida e eficiente dos pigmentos antocianínicos presentes na matriz utilizada. Desta análise, se obteve o cromatograma observado na figura 10.

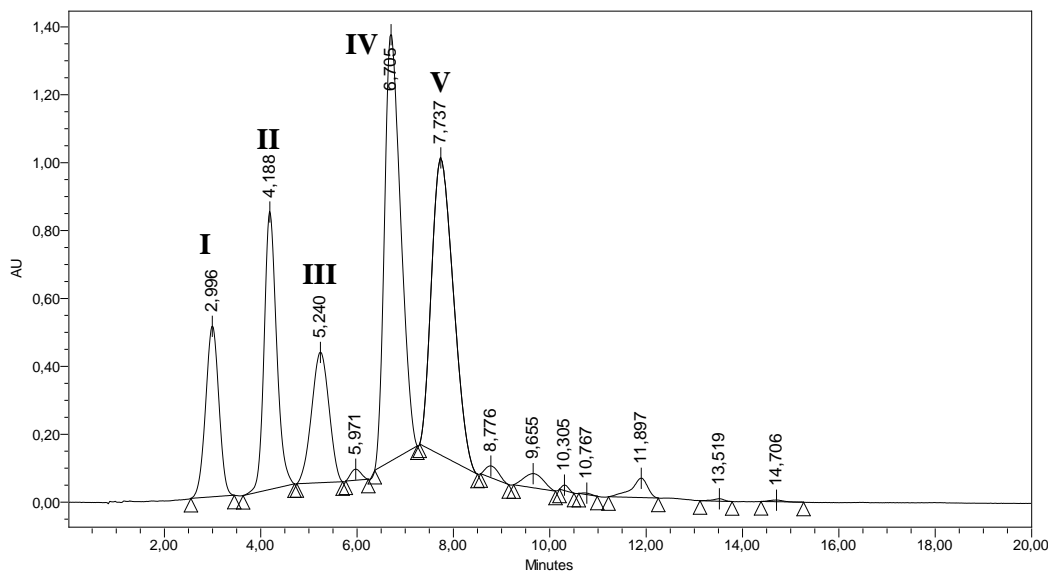


Figura 10: Cromatograma do extrato de Flor de Jambo a 520nm

Observando os espectros de absorção na região do UV-Vis (Figura 11), foi possível observar que os valores diferenciados nos seus respectivos espectros de absorção a 280 e 520nm, indicam a presença de cinco antocianinas distintas ainda não identificadas.

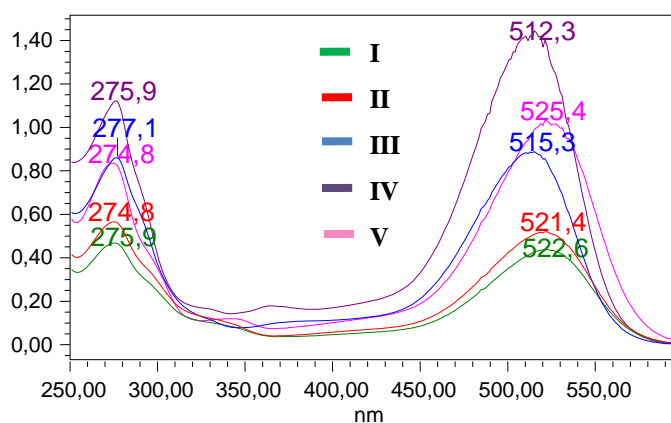


Figura 11: Espectros de absorção na região do UV-Vis das antocianinas majoritárias encontradas em flor de Jambo

Realizando uma relação entre as áreas dos picos (tabela 7), demarcados manualmente, se observou um percentual de área maior, porém bem próximos para os picos IV e V.

Tabela 7: Área dos picos

Picos	Tempo de Retenção	Área	% Área
I	2,996	9616562	10,14
II	4,188	14684532	15,48
III	5,24	9637467	10,16
IV	6,705	29280890	30,88
V	7,737	27528424	29,03

Hong & Wrolstad (1990) citaram um trabalho de Andersen (1987) onde a antocianina malvidina-3-glicosídeo em solução metanol acidificado (ácido fórmico) apresentava uma absorção, no comprimento de onda visível referente à banda B da estrutura, de 526nm. No mesmo trabalho eles citam Harborne (1958) que observou comprimentos de onda de 535 e 533nm para as antocianinas malvidina mono e diglicosiladas respectivamente, em solução de metanol acidificado (0,01% HCl) (tabela 8). Observando a pequena diferença entre a absorção da antocianina mono e diglicosilada em mesma solução, é de se esperar que em solução de metanol acidificado (ácido fórmico) ocorra o mesmo comportamento.

Tabela 8: Antocianinas e seus espectros de absorção máximos no visível

Antocianina	Solvente*	Vis $\lambda_{\text{máx}}$ nm	Referências
Malvidina-3-glicosídeo	A	535	Harborne, 1958
Malvidina-3,5-diglicosídeo	A	533	Harborne, 1958
Malvidina-3-glicosídeo	B	526	Andersen, 1987
Pico V	C	512	Observado
Pico VI	C	525	Observado

* (A) 0,01% HCl/MeOH, (B) Ác. Fórmico/MeOH/água (CLAE), (C) Fase móvel - Ác. Fórmico/acetoneitrila/água. Fonte: HONG & WROLSTAD, 1990.

Sendo assim, baseado nos dados observados na literatura, do espectro de absorção na região UV-Vis, escolheu-se para isolar o pico que apresentou no visível o $\lambda_{\text{máx}}$ de 525nm (Figura 12B). Pois, apresenta maior probabilidade de ser a malvidina-3,5-diglicosídeo.

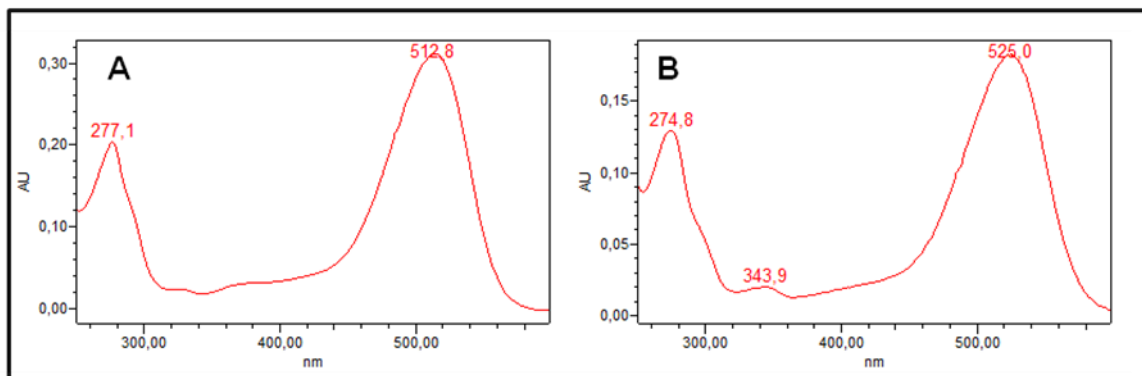


Figura 12: Espectros de absorção no UV-Vis a 520nm. (A) Espectro do pico IV (B) Espectro do pico V

5.2. ISOLAMENTO DA ANTOCIANINA DE INTERESSE

Após o isolamento da antocianina de interesse foi realizada a análise cromatográfica do analito isolado (Figura 13). Nesta análise foi observado que o pico isolado apresentou uma pureza de 93% a 520nm

Uma varredura abrangendo comprimentos de onda entre intervalos de 280-520, comprimento em que também ocorre a absorção de outros compostos fenólicos, demonstrou que não foram observados outros interferentes que comprometessem a pureza abaixo de 90%.

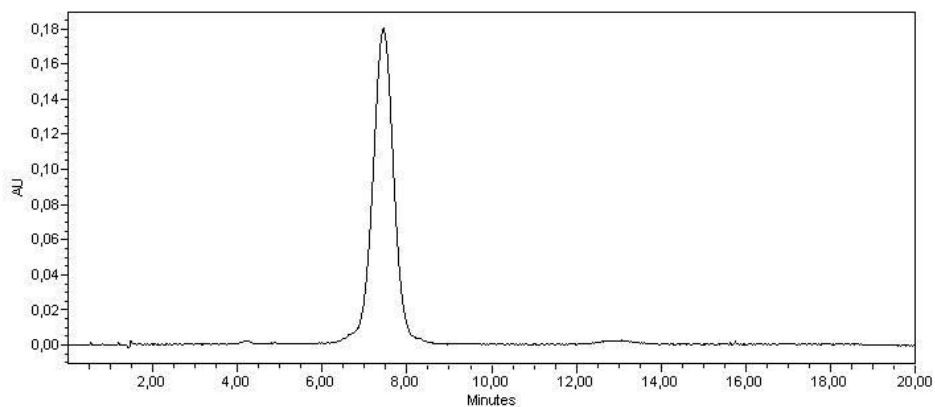


Figura 13: Cromatograma da antocianina isolada

5.3. IDENTIFICAÇÃO DA ANTOCIANINA ISOLADA

Lowry (1976) descreve antocianinas presentes em flores de algumas espécies da família das Mirtáceas, dentre estas está descrita a presença da antocianina malvidina-3,5-diglicosídeo em flores de *Syzygium malaccense* L.. Esta descrição foi utilizada como ponto de partida para investigação desta antocianina em extratos de flores de jambo. A antocianina malvidina-3,5-diglicosídeo está presente em extratos da casca de jambolão, como definido por Brito *et al.* (2007) que identificou as antocianinas demonstradas no perfil cromatográfico por espectrometria de massa (figura 14).

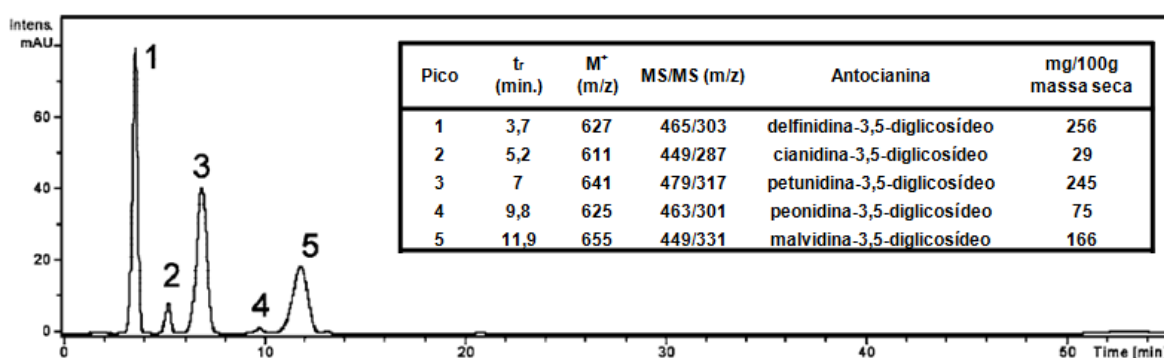


Figura 14: Perfil cromatográfico do Jambolão e identificação dos picos por espectrometria de massa. (adaptado de BRITO *et al.*, 2007)

Esta informação possibilitou a confirmação da antocianina de interesse através da comparação do tempo de retenção (t_r) e espectro de absorção no UV-Vis da antocianina de interesse e da malvidina-3,5-diglicosídeo presente no extrato metanólico de casca de Jambolão.

Através da sobreposição dos cromatogramas obtidos do extrato metanólico do analito isolado e da casca de Jambolão (Figura 15 A), observou-se o mesmo tempo de retenção (8,26 min.) entre a antocianina isolada e a antocianina já identificada no cromatograma do extrato metanólico de casca de jambolão. Foi observada também a similaridade entre o espectro de absorção dos dois analitos comparados entre os dois cromatogramas (Figura 15 B e C).

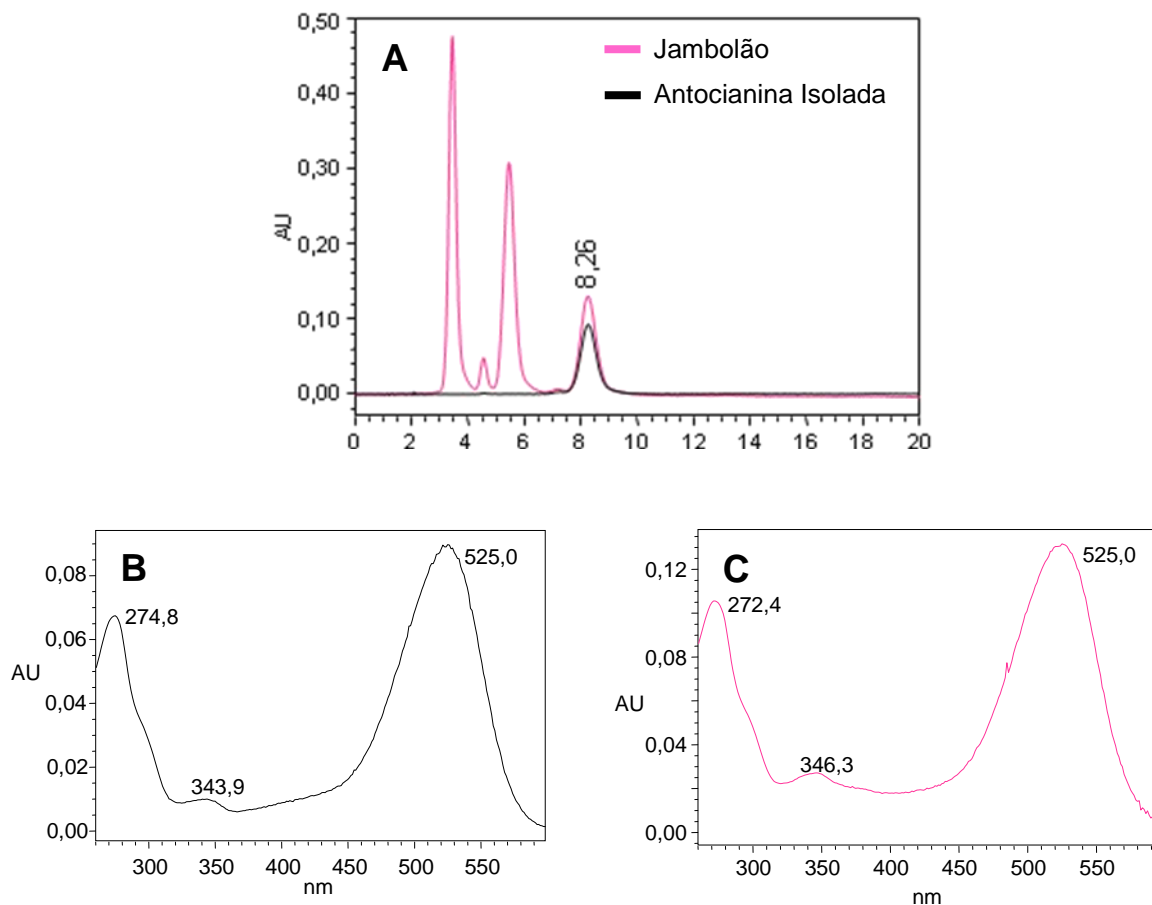


Figura 15: (A) Cromatogramas do extrato metanólico de Jambolão e da antocianina isolada sobrepostos. (B) Espectro de absorção no UV-Vis a 520nm da antocianina isolada. (C) Espectro de absorção no UV-Vis a 520nm do extrato metanólico de Jambolão

A sobreposição dos cromatogramas obtidos do extrato metanólico de cascas de Jambolão e da Flor de Jambo (figura 16), ainda apresentou como resultado a sobreposição das outras quatro antocianinas presentes no cromatograma das duas amostras, esta possibilidade sugere que as antocianinas presentes na flor de Jambo serem as mesmas do Jambolão, mas, este fato deverá ser confirmado com análises futuras.

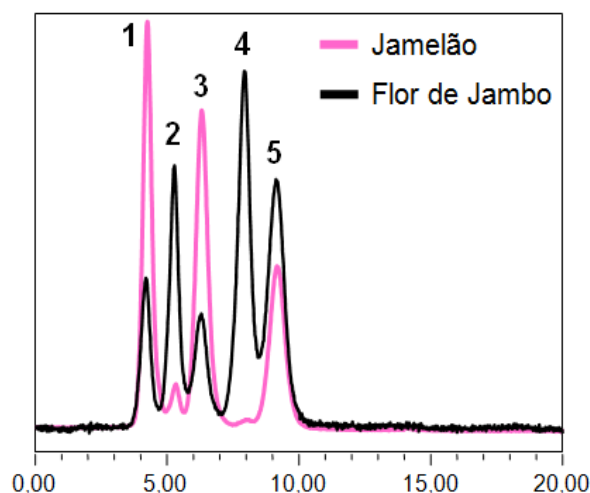


Figura 16: Cromatogramas do extrato metanólico de Jambolão e do extrato metanólico de Flor de Jambo sobrepostos, identificação dos picos na figura 14

5.4. HIDRÓLISE ÁCIDA DA ANTOCIANINA ISOLADA

A etapa de ajuste do pH utilizando uma solução de NaOH foi necessária, pois, durante a passagem do extrato hidrolisado pelo cartucho Sep-Pack C₁₈ (Clean up) percebeu-se que o analito não ficava retido..

A análise cromatográfica do analito isolado, submetido à hidrólise ácida, gerou um cromatograma com novo perfil, onde pôde ser visualizado a presença de novos picos (Figura 17), Comparando os espectros de absorção na região do UV-Vis (figura 16) dos cinco analitos gerados a partir da hidrólise da malvidina-3,5-diglicosídeo, àqueles que apresentaram um espectro de absorção similar ao da mesma, sugere-se serem os produtos originários da perda de uma unidade de glicose, sendo então os picos 2 (malvidina-3-glicosídeo) e 5 (malvidina-5-glicosídeo). O pico que apresenta o maior tempo de retenção no cromatograma, pico 6, indica ser a aglicona malvidina, pois, a perda das duas moléculas de glicose confere a molécula um aumento na sua apolaridade, deslocando assim o t_R . Os outros picos observados no cromatograma podem ser de outros tipos de antocianinas geradas durante a hidrólise, já que os espectros de absorção destes

não são característicos dos espectros de absorção da antocianina malvidina.

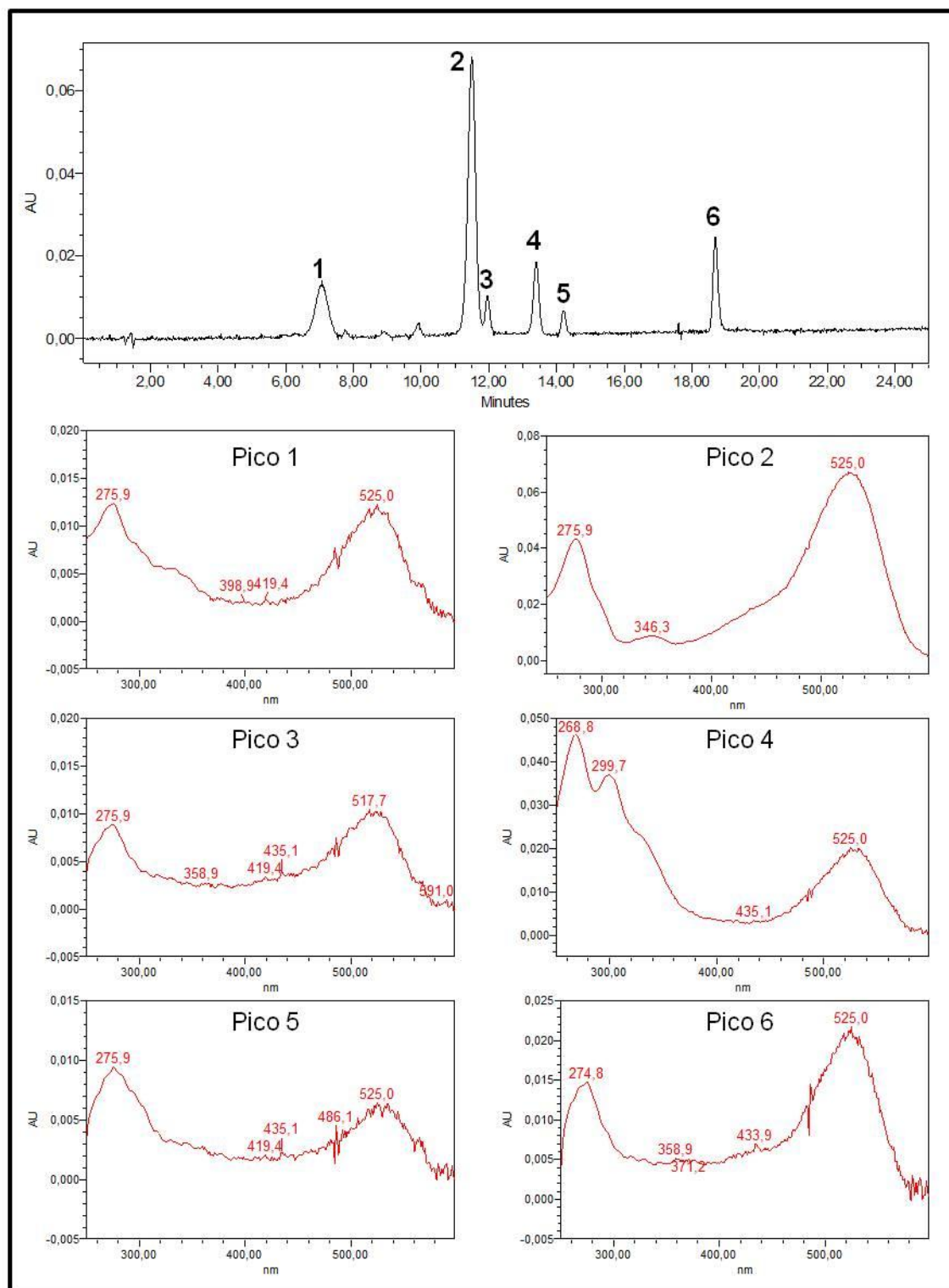


Figura 17: Cromatograma da antocianina isolada hidrolisada e espectros de absorção na região do UV-Vis dos picos encontrados

6. CONCLUSÕES

Realizada a extração dos pigmentos antociânicos, foi determinado o perfil cromatográfico das antocianinas presentes em flores de Jambo. O isolamento da antocianina, com o uso da válvula Rheodyne[®], permitiu a obtenção de uma substância pura e concentrada de forma automática, rápida e eficiente, injeção após injeção, sem interrupção, ou seja, sem perda de tempo e solvente. Através do *Clean up*, com cartuchos Sep-Pak C₁₈ Waters[®], da antocianina isolada, foi realizada a eliminação de interferentes, a concentração do extrato e a retirada do mesmo da fase móvel para a solução que possibilitou a sua secagem de forma mais rápida e eficiente. Através da comparação entre o tempo de retenção (t_R) e espectro de absorção na região do UV-Vis, a 520nm, entre a antocianina isolada e a antocianina malvidina-3,5-diglicosídeo da matriz já identificada na literatura (casca de Jambolão), confirmou-se a presença desta antocianina em flores de *Syzygium malaccense* L., de forma confiável, sem a necessidade de aquisição de padrões analíticos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMES, B.N.; SHIGENAGA, M.K.; HAGEN, T.M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington DC, v.90, n.17, p.7915-7922, 1993.

AUGUSTA, I. M.; *et al.* Caracterização física e química da casca e polpa de jambo vermelho (*Syzygium malaccensis*, (L.) Merryl & Perry). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 30(4): 928-932, out.-dez. Campinas,2010.

WITZUM; J.L. The oxidative hypothesis of atherosclerosis. **Lancet**, London, v.344, n.8926, p.793-795, 1994.

BROUILLARD, R. Anthocyanins as food colors. Markakis, P., ed.; Academic Press: New York, cap. 1, 1982.

BRIDLE, P.; TIMBERLAKE, C.F. Anthocyanins as natural food colours – selected aspects. **Food Chemistry**, v.58, n.1-2, p.103-109, 1997.

BRITO, E.S.D.; ARAÚJO, M.C.P.D.; 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**, 55, 9389–9394, 2007.

CAVALCANTE, P. B. Frutas comestíveis da Amazônia. IMPA-Museu Paraense Emílio Goeldi. Belém, 1974.

COUTINHO, M.A.S.; MUZITANO, M.F.; COSTA, S.S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, 1 (3), 241-256, 2009.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia: um breve ensaio. *Atualidades em Química*, n.7, p.21-25, mai.1998.

DE OLIVEIRA, R. N.; DIAS, I. J. M; CÂMARA, C. A. G. Estudo comparativo do óleo essencial de *Eugenia puriciflora* (HQB) DC de diferentes localidades de Pernambuco. **Revista Brasileira de farmacognosia**, 15: 39 – 43. 2005.

DEGÁSPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. *Visão Acadêmica*, 2004;5(1):33-40.

DRUST, R. W.; WROLSTAD, R. E. Separation and characterization of anthocyanins by HPLC. In: WROLSTAD, R. E. (Ed.) *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. New York: John Wiley & Sons, p. FI 3.1-3.13, 2001.

ENIDIOK, S. E.; ATTAH, L. E. Chemical composition in relation to the quality of wines produced from Nigerian *Syzygium malaccenses* and *Eugenia owariensis* apples.. **African journal of food agriculture nutrition and development**, Vol. 10. N° 2. Fevereiro, 2010.

FALCÃO, M. A.; PARALUPPI, N. D.; CLEMENT, C. R. Fenologia e Produtividade do jambo (*Syzygium malaccensis*) Na Amazônia Cental. **Acta Amazônica**, 32(1): 3-8, 2002.

FILHO BARBOSA, J. M.; *et al.* Natural products inhibitors of the angiotensin converting enzyme (ACE). A review between 1980-2000. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 16: 421- 446. 2006.

GONDIM, J. A. M.; *et al.* Composição centesimal e de minerais em casca de frutas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 825-827, 2005.

GOUVÊA , A. C. M. S. **Quantificação das antocianinas majoritárias do açaí por cromatografia líquida de alta eficiência**. 2010. 75f. Dissertação (Mestrado em Ciência e tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2010.

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

HARBORNE, J.B.; GRAYER, R.J., The anthocyanins. In: The flavonoids: advances in research since 1980. Chapman & Hall, London, 1988, p. 1-20.

HARBORNE, J. B.; *The flavonoids: advances in research since 1986*, Chapman and Hall: New York, 1st ed., 1994.

HONGX, V.; WROLSTAD, R.E. J. Use of HPLC Separation/Photodiode Array Detection for Characterization of Anthocyanins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Vol. 38, No. 3, 1990.

IKARAM, E. H. K.; *et al.* Antioxidant capacity and total phenolic content of Malaysian underutilized fruits. **Journal of Food Composition and Analysis**, (22) 388–393. 2009.

KAAIKAMANU, D.K.; AKINA, J.K. Hawaiian herbs of medicinal value found among the mountains and elsewhere in the Hawaiian Islands, and known to the Hawaiians to possess curative and palliative properties most effective in removing physical ailments. **Territorial Board of Health**, Honolulu, Hawaii, 1922.

LANÇAS, Fernando M. Cromatografia em fase gasosa. São Carlos: Acta, 1993. 254p

LOCHER, C.P.; *et al.* Anti-microbial activity and anti-complement activity of extracts obtained from selected Hawaiian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology** (49) 23-32. 1995.

LOPES, T. J.; XAVIER, M. F.; QUADRI, M. G. N; *et al.* Antocianinas: uma breve revisão das características estruturais e da estabilidade. **Revista Brasileira de Agrocência**, Pelotas, v.13, n.3, p. 291-297, jul-set, 2007.

MALDANER, L.; JARDIM, I.C.S.F.O. A moderna arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Revista Química Nova**, Vol. 32, No. 1, 214-222, 2009.

MARTÍNEZ-FLÓREZ, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J.M.; TUÑÓN, M.J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutricion Hospitalaria**,17(6):271-8, 2002.

MAZZA, G.; MINIATI, E. Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains. CRC Press: London, 362 p., 1993.

MIYAZAWA, T.; NAKAGAWA, K.; KUDO, M.; MURAISHI, K.; SOMEYA, K. Direct intestinal absorption of red fruit anthocyanins, cyaniding-3-glucoside and cyaniding-3,5-diglucoside, into tracts and humans. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, 47, 1083-1091, 1999.

MORTON, J. 1987. Malay Apple. p. 378–381. In: Fruits of warm climates. Julia F. Morton, Miami, FL. Disponível em: <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/morton/malay_apple.html>. Acesso em: Nov/2012.

NAGATA, K.M. Hawaiian medicinal plants. **Economic Botany** 25, 245-254. 1971.

NEGI, A. S.; *et al.* Synthesis of a novel plant growth promoter from gallic acid. **Bioorg Med Chem Lett**, 15: 1243-1247. 2005.

NIJVELDT, R.J.; VAN NOOD, E.; VAN HOORN, D.E.; BOELEN, P.G.; VAN NORREN, K.; VAN LEEUWEN, P.A. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **American Journal of Clinical Nutrition**,74(4):418-25, 2001.

OLIVEIRA, A.M.; HUMBERTO, M.M.S; SILVA, J.M.; ROCHA, R.F.A.; SANT'ANA, A.E.G. Estudo fitoquímico e avaliação das atividades moluscida e larvicida dos extratos da casca do caule e folha de *Eugenia malaccensis* L. (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 16(Supl.): 618-624, Dezembro, 2006.

ORTÍZ, M.A.; VARGAS, M.D.C.R.; MADINAVEITIA, R.G.C.; VELÁZQUEZ, J.A.M. Propiedades funcionales de las antocianinas. **Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud**, Volumen XIII, Número 2, 2011.

PELLEGRINA, C. D.; *et al.* Anti-tumour potential of a gallic acid-containing phenolic fraction from *Oenothera biennis*. **Cancer Lett** 226: 17-25. 2005.

POPPI R. J.; MARÇO, P. H.; SACARMINIO I. S. Procedimentos Analíticos para identificação de antocianinas em produtos naturais. **Revista Química Nova**, Vol. 31, No. 5, 1218-1223, 2008

PRIOR, R.L. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. **American Journal of Clinical Nutrition**, 78(3 Suppl):570S-8S, 2003.

RIBOLI, E.; NORAT, T. Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk. **American Journal of Clinical Nutrition** 78 (3), 559S–569S. 2003.

ROP, O.; MLCEK, J.; JURIKOVA, T.; NEUGEBAUEROVA, J.; VABKOVA, J. Edible Flowers: A New Promising Source of Mineral Elements in Human Nutrition. **Molecules**, 17, 6672-6683 ,2012.

ROY, P.; KULKARNI, A.P. Oxidation of ascorbic acid by lipoxygenase: effect of selected chemicals. **Food Chemical Toxicology**, Oxford, v.34, n.6, p.563-570, 1996.

RUTZ, Josiane Kuhn. Avanços na cromatografia líquida. 2009. 41f. Trabalho acadêmico (Seminário em Alimentos) - Bacharelado em Química de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

SANTIAGO, M., C.,P., A.; GOUVÊA, A.,C., M., S.; GODOY, R., L., O.; OIANO, J.,N.;PACHECO, S.; ROSA, J.;S. Adaptação de um método por cromatografia de alta eficiência para análise de antocianinas em suco de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). Comunicado Técnico 162, Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2010.

STAHL, W.; SIES, H. Antioxidant defence: vitamins E and C and carotenoids. **Diabetes**, New York, v.46, p.S14-S18, Supplement 2. 1997.

STRACK, D.; WRAY, V. Anthocyanins. In:” Methods in plant biochemistry”. P.M Dey, J. B. Harborne (Eds.), Academic Press, New York, p. 325-356, 1989.

TRUEBA, L.G.P. Los flavonoides: oxidantes e prooxidantes. **Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas**, 22(1):48-57, 2003.

VIEIRA, T. R.; *et al.* Constituintes químicos de *Malaleuca alternifolia* (Myrtaceae). **Revista Química Nova**, 27: 536-539. 2004.

VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R. T.; BARRA, K.; STRINGUETA, P. C. Flavonoides antocianinas: características e propriedades na nutrição e saúde. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**,23(2):141-9. Viçosa, 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**, 62(2):294-6, 1999.

WHISTLER, W. A.; ELEVITCH, C. R. Species Profiles for Pacific Island Agroforestry: *Syzygium malaccense* (Malay apple). Disponível em: <www.traditionaltree.org>. Acesso em: abril/2006.

ZAMBELLI, A. R.; *et al.* Avaliação do potencial antioxidante e análise do teor de taninos totais de *Syzygium malaccense*. In: 58ª REUNIÃO ANUAL DA SBPC. Anais da 58ª Reunião Anual da SBPC, Florianópolis, SC. Julho/2006.