



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

MARCELLA CARMARGO MARQUES

COMPOSTOS BIOATIVOS DE GUAJIRU E INFLUÊNCIA DA
EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS EM
ANTOCIANINAS DE DIFERENTES COMPLEXIDADES DE
DIFERENTES FONTES

Campinas

2016

MARCELLA CARMARGO MARQUES

COMPOSTOS BIOATIVOS DE GUAJIRU E INFLUÊNCIA DA
EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS EM
ANTOCIANINAS DE DIFERENTES COMPLEXIDADES DE
DIFERENTES FONTES

*Tese apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos da Universidade
Estadual de Campinas, como parte dos
requisitos para a obtenção do título de
Doutora em Ciência de Alimentos.*

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Z. Mercadante

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA
PELA ALUNA MARCELLA CAMARGO
MARQUES E ORIENTADA PELA
PROFA. DRA. ADRIANA ZERLOTTI
MERCADANTE

Campinas

2016

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES; CNPq, 132269/2011-2

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

M348c Marques, Marcella Camargo, 1984-
Compostos bioativos de guajiru e influência da extração assistida por micro-ondas em antocianinas de diferentes complexidades de diferentes fontes / Marcella Camargo Marques. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Adriana Zerlotti Mercadante.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Compostos bioativos. 2. Antocianinas. 3. Micro-ondas. I. Mercadante, Adriana Zerlotti. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Bioactive compounds from guajiru and effect of microwave-assisted extraction on anthocyanins from different sources with different complexity degrees

Palavras-chave em inglês:

Bioactive compounds

Anthocyanins

Microwave

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Doutora em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Adriana Zerlotti Mercadante [Orientador]

Juliana Azevedo Lima Pallone

Neuza Mariko Aymoto Hassimotto

Renata Aparecida Soriano Sancho

Veridiana Vera de Rosso

Data de defesa: 10-10-2016

Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Adriana Zerlotti Mercadante (Orientador)
FEA/UNICAMP (Titular)

Profa. Dra. Juliana Azevedo Lima Pallone
FEA/UNICAMP (Titular)

Profa. Dra. Neuza Mariko Aymoto Hassimotto
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS/USP (Titular)

Dra. Renata Aparecida Soriano Sancho
FEA/UNICAMP (Titular)

Profa. Dra. Veridiana Vera de Rosso
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO (Titular)

Profa. Dra. Alessandra Lopes de Oliveira
FZEA/USP (Suplente)

Profa. Dra. Célia Maria de Sylos
UNESP (Suplente)

Prof. Dr. Mario Roberto Marostica Junior
FEA/UNICAMP (Suplente)

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros titulares da comissão examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica da aluna Marcella Camargo Marques

AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual de Campinas (FEA-UNICAMP) pela infra-estrutura que possibilitou o desenvolvimento deste trabalho.

à CAPES pela bolsa de Doutorado e à CAPES e à FAPESP pelo apoio financeiro ao projeto.

À Prof.^a Dr.^a Adriana Zerlotti Mercadante pelo tempo e atenção dedicados a mim e ao trabalho, pelo exemplo profissional e pelos desafios propostos, que permitiram meu crescimento pessoal e como pesquisadora.

Ao Prof. Fabio Yamashita, pelo tempo, pela colaboração e atenção durante o desenvolvimento desse trabalho.

À Dr.^a Lilian Mariutti pela confiança, amizade e apoio nos momentos de dúvida. Pela participação intensa durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

À Prof.^a Dr.^a Neura Bragagnolo pela atenção, confiança e apoio técnico.

À banca examinadora pelas contribuições e correções realizadas.

À minha família, em especial:

Aos meus pais Olinda e Wolff, por todo amor e carinho dedicados. Por me apoiarem incondicionalmente e por me ampararem nas quedas.

À minha irmã Rafaella, pelo amor, amizade e apoio. Por ser um horizonte, por me inspirar e vibrar com as minhas conquistas.

Ao meu noivo Rodrigo, por acreditar mesmo quando eu duvidei, pelo amor, pelo sorriso, por ser minha paciência e por estar ao meu lado quando eu mais precisei.

Ao meu cunhado David, por ser um grande exemplo.

Aos meus queridos amigos de ontem, de hoje e de sempre. Cada um, a sua maneira, contribuiu para esta conquista:

À Daniele Bobrowski, pelo apoio constante, pela amizade sincera, pelo exemplo, pela generosidade dos atos, pelo ombro amigo e pelo carinho.

À Ana Augusta Odorissi Xavier, pela amizade, pelo incentivo e por sempre se fazer presente.

À Adélia Machado, pelo exemplo, pela amizade, e por me mostrar as belezas da pesquisa.

Aos colegas e amigos que fazem (ou fizeram) parte do Laboratório de Química de Alimentos da FEA/UNICAMP: Ádria Bentes, Aline Medina, Bruno Chacon, Camila Fernandes, Daniela Demasi, Débora Alves, Elaine Berger, Elisângela Madalozzo, Eliseu Rodrigues, Fabiane Petry, Fabíola Lima, Felipe Rodrigues, Fernanda Mandelli, Gilsandro Alves, Gislaine Faria, Hugo de Souza, Jéssica Grigoletto, Karla Nery, Lizziane Vissotto, Lucas Campos, Luiza Carvalho, Mery Yovana, Naira Poerner, Nathália Azevedo, Poliana Gurak, Renan Chisté, Regiane Palhares, Renata Sancho, Rosemar Sant'Anna, Sarah Gurgel, Viviane Miranda, Walkíria Ribeiro, Wanessa Silva.

Muito obrigada!

RESUMO GERAL

Compostos fenólicos, incluindo antocianinas, e carotenoides são encontrados em frutas e vegetais e têm sido associados a diversas ações benéficas em humanos. O guajiru (*Chrysobalanus icaco* L.) é uma fruta tropical, cuja casca pode ser rosa ou roxa. Dados sobre compostos bioativos e capacidade redutora desta fruta ainda são desconhecidos. As antocianinas monoméricas de guajiru (1015 ± 69 mg cianidina 3-glucosídeo/100 g base seca (BS)) e a capacidade redutora (1055 ± 83 mg ácido gálico/100 g BS) confirmaram o potencial comercial da fruta. O carotenoide majoritário, descrito pela primeira vez em guajiru, foi a all-*trans*-luteína ($188,64 \pm 9,36$ µg/100 g BS). O perfil antociânico de guajiru foi marcado pela presença das antocianidinas, delphinidina, petunidina, cianidina e peonidina, com petunidina 3-glucosídeo + delphinidina 3-(6"-acetil)galactosídeo ou delphinidina 3-(6"-oxalil)arabinosídeo como majoritárias. Os compostos fenólicos de guajiru foram identificados como derivados de ácido elágico, miricetina pentosídeo e derivado de quercetina. A extração de antocianinas é comumente realizada por extração sólido-líquido, esse processo é longo e requer o uso de grandes quantidades de solventes. Dentre as novas técnicas de extração destaca-se a extração assistida por micro-ondas (MAE), que utiliza aquecimento rápido por meio das micro-ondas para facilitar a extração. Para estudar a influência da concentração de ácido, tempo e temperatura na extração de antocianinas por MAE foi utilizado um planejamento fatorial e amostras que possuem antocianinas com diferentes graus de complexidade: antocianinas não aciladas (jabuticaba), antocianinas aciladas com ácidos alifáticos (cebola roxa) e antocianinas aciladas com ácidos cinâmicos (repolho roxo). A extração do total de antocianinas de casca de jabuticaba não foi mais eficiente por MAE do que pelos métodos tradicionais. Nenhuma das variáveis independentes apresentou efeito significativo na concentração total de antocianinas, de delphinidina 3-glucosídeo e de cianidina 3-glucosídeo de casca de jabuticaba. Por outro lado, a concentração de cianidina 3-glucosídeo de jabuticaba foi afetada positivamente pela concentração de ácido na solução extratora e pela temperatura de extração na faixa estudada. Em relação às antocianinas de cebola roxa e repolho roxo, a extração total das antocianinas foi mais eficiente por MAE do que pelos

métodos tradicionais. No entanto, as variáveis independentes afetaram o perfil das antocianinas nos níveis avaliados no planejamento experimental. Como era esperado, elevadas concentrações de HCl aumentaram a hidrólise do tecido vegetal e exerceram efeito positivo na extração de antocianinas totais e antocianinas não aciladas em todas as matrizes analisadas. Os elevados teores de antocianinas não aciladas parecem estar relacionado à hidrólise das antocianinas aciladas. Em cebola a hidrólise das antocianinas aciladas a ácido malônico foi mais intensa, por outro lado, todas as variáveis exerceram efeito positivo na extração de antocianinas aciladas a ácido succínico. Dentre as antocianinas de repolho roxo, antocianinas aciladas aos ácidos cafeico+ferúlico foram mais estáveis nas condições estudadas, enquanto as concentrações das antocianinas aciladas aos ácidos cafeico+cumárico foram menores em elevadas concentrações de ácido, provavelmente devido à hidrólise parcial. Não foram detectados compostos de baixo peso molecular que indicassem a degradação térmica das antocianinas de jabuticaba, cebola roxa e repolho roxo durante a MAE nas condições testadas.

SUMMARY

The bioactive compounds such as carotenoids, phenolic compounds and anthocyanins from fruits and vegetables have been associated to the prevention of several chronic-degenerative diseases in humans. Guajiru (*Chrysobalanus icaco* L.) is a tropical fruit with pink to dark purple peel. Information about bioactive compounds and reducing capacity of this fruit is not yet available. The monomeric anthocyanins content (1015 ± 69 mg cyanidin 3-glucoside/100 g dry weight (d.w.)) and reductive capacity (1055 ± 83 mg gallic acid equivalent/100 g d.w.) confirmed the great commercial potential of this fruit. The major carotenoid, found for the first time in guajiru, was all-*trans*-lutein (188.64 ± 9.36 μ g/100g d.w.). The anthocyanin profile of guajiru was characterized by the presence of different anthocyanidins: delphinidin, petunidin, cyanidin and peonidin, being petunidin 3-glucoside + delphinidin 3-(6''-acetyl)galactoside or delphinidin 3-(6''-oxaloyl)arabinoside the major ones. The phenolic compounds tentatively identified in guajiru were ellagic acid derivative, myricetin pentoside and quercetin derivative. Solid-liquid extraction is the most common method applied for anthocyanin extraction; however, it is time and solvent consuming method. Among the new extraction techniques, microwave-assisted extraction (MAE), which relies on fast heating generated by the microwaves to facilitated extraction, can be highlighted. To study the influence of acid concentration, time and temperature on anthocyanin extraction by MAE, factorial experimental design was applied with samples possessing anthocyanins with different degrees of complexity: non-acylated anthocyanins (jabuticaba), anthocyanins acylated with aliphatic acids (red onion) and anthocyanins acylated with cinnamic acids (red cabbage). The total extraction of anthocyanins from jabuticaba peel by MAE was not more efficient than that obtained by the traditional methods. None of the independent variables presented significant effect on the concentration of total anthocyanins, delphinidin 3-glucoside and cyanidin 3-glucoside from jabuticaba peel. On the other hand, cyanidin 3-glucoside concentration was positively affected by acid concentration contained in the extraction solution and by temperature of extraction in the studied range. Concerning red onion and red cabbage, the total extraction of anthocyanins was more efficient by MAE than by the traditional methods. However, the independent variables affected the anthocyanin profiles in the levels evaluated in

the factorial experimental design DCFC. As expected, high HCl concentrations increased hydrolysis of plant tissues and had a positive effect on the extraction of both total anthocyanins and non-acylated anthocyanins from the analyzed matrices. The high contents of non-acylated anthocyanins seem to be related to hydrolysis of the acylated anthocyanins. For onion, hydrolysis of anthocyanins acylated to malonic acid was more intense than those acylated to succinic acid; on the other hand, all variables had a positive effect on the extraction of anthocyanins acylated to succinic acid. Among red cabbage anthocyanins, those acylated to caffeic + ferulic acids were more stable under the conditions studied, whereas the concentrations of anthocyanins acylated to caffeic + coumaric acids were lower at high acid concentrations, probably due to partial hydrolysis. There was no evidence that anthocyanins from jabuticaba, red onion and red cabbage were degraded to low molecular weight compounds during MAE under the tested conditions.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	7
SUMMARY	9
INTRODUÇÃO GERAL	16
OBJETIVOS	19

CAPITULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Compostos bioativos e capacidade redutora	21
1.1. Compostos fenólicos	21
1.2 Carotenoides	23
1.3. Capacidade redutora	24
2. Antocianinas	25
2.1. Ocorrência em vegetais e frutas	31
2.2. Métodos de extração de antocianinas	35
3. Micro-ondas	37
3.1. Princípios e definições de micro-ondas	37
3.2. Extração assistida por micro-ondas (MAE) e fatores que influenciam a MAE.....	39
3.3. MAE de antocianinas.....	41
Referências Bibliográficas	43

CAPITULO II

IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE FRUTOS DE GUAJIRU (*Chrysobalanus icaco* L.)

Resumo	52
1. Introdução	53
2. Material e métodos	55
2.1. Reagentes e padrões	55
2.2. Amostra	55
2.3. Caracterização físico-química dos frutos	56
2.4. Análise de antocianinas	56
2.5. Compostos fenólicos não antociânicos	58
2.6. Determinação da capacidade redutora	59
2.7. Determinação de carotenoides	59
3. Resultados e discussão	61
3.1. Caracterização do fruto	61
3.2. Antocianinas monoméricas e capacidade redutora	61
3.3. Carotenoides de guajiru	62
3.4. Identificação das antocianinas	68
3.5. Identificação de compostos fenólicos não antociânicos	74
4. Conclusão	79
Referências Bibliográficas	79

CAPITULO III

EFEITO DA EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS EM ANTOCIANINAS DE CASCA DE JABUTICABA

Resumo	84
1. Introdução	85
2. Material e métodos	86
2.1. Amostra	86
2.2. Reagentes e padrões	86
2.3. Extração acelerada por agitação	87
2.4. Extração estática	87
2.5. Extração assistida por micro-ondas	87
2.6. Determinação de antocianinas por HPLC-DAD-MS/MS	89
2.7. Análise estatística	90
3. Resultados e discussão	90
3.1. Extração estática e por agitação	90
3.2. MAE	93
4. Conclusão	99
Referências Bibliográficas	99

CAPITULO IV

O PERFIL DE ANTOCIANINAS DE CEBOLA ROXA É ALTERADO PELAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO POR MICRO-ONDAS

Resumo	103
--------------	-----

1. Introdução	104
2. Material e métodos	106
2.1. Amostra	106
2.2. Reagentes e padrões	106
2.3. Extração acelerada por agitação	106
2.4. Extração estática	107
2.5. Extração assistida por micro-ondas	107
2.6. Determinação de antocianinas por HPLC-DAD-MS/MS	110
2.7. Análise estatística	111
3. Resultados e discussão	111
4. Conclusão	122
Referências Bibliográficas	123

CAPITULO V

EFEITO DA EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS EM ANTOCIANINAS ACILADAS COM ÁCIDOS CINÂMICOS DE REPOLHO ROXO

Resumo	126
1. Introdução	127
2. Material e métodos	129
2.1. Amostra	129
2.2. Reagentes e padrões	130
2.3. Extração acelerada por agitação	130
2.4. Extração estática	130
2.5. Extração assistida por micro-ondas	131
2.6. Determinação de antocianinas por HPLC-DAD-MS/MS	132

2.7. Análise estatística	133
3. Resultados e discussão	133
3.1. Identificação de antocianinas de repolho roxo	133
3.2. Extração estática <i>versus</i> acelerada por agitação	137
3.3. MAE	140
4. Conclusão	147
Referências Bibliográficas	147
 DISCUSSÃO GERAL	 150
CONCLUSÃO GERAL	155
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	157
 APÊNDICE 1: ESPECTROS DE MASSAS DAS ANTOCIANINAS DE JABUTICABA	 167
 APÊNDICE 2: ESPECTROS DE MASSAS DAS ANTOCIANINAS DE CEBOLA ROXA	 170
 APÊNDICE 3: ESPECTROS DE MASSAS DAS ANTOCIANINAS DE REPOLHO ROXO	 178

INTRODUÇÃO GERAL

Compostos bioativos são constituintes naturais dos alimentos tipicamente presentes em baixas concentrações, que estão associados a efeitos benéficos à saúde humana. As classes de compostos bioativos podem variar largamente, sendo exemplos de compostos bioativos os carotenoides e os compostos fenólicos (Kris-Etherton et al., 2002), entre outros.

Carotenoides são pigmentos naturais lipossolúveis amplamente distribuídos no reino vegetal, animal e em microrganismos. No entanto, apenas as plantas superiores e micro-organismos são capazes de sintetizar esses pigmentos. Os carotenoides podem ser acumulados em diferentes partes das plantas, como folhas, raízes, flores, frutos e sementes. O conteúdo dos carotenoides pode variar bastante, por isso os alimentos são comumente classificados de acordo com o teor de carotenoides nutricionalmente importantes como boas fontes de carotenoides (Britton e Khachik, 2009). Os carotenoides podem estar relacionados à prevenção de algumas doenças crônico-degenerativas. Por exemplo, a luteína e a zeaxantina podem se acumular na retina humana atuando na prevenção da degeneração macular relacionada à idade e da formação da catarata (Whitehead et al, 2006).

Os compostos fenólicos são importantes metabólitos secundários encontrados em frutas e vegetais. Quantidades significativas de compostos fenólicos são rotineiramente consumidas na dieta humana (Leite-Legatti, et al., 2012). Há alegações que os compostos fenólicos exibem uma variedade de propriedades fisiológicas, tais como antialergênica, antiaterogênica, anti-inflamatória, antimicrobiana, antitrombótica, efeito cardioprotetor, vasodilatador e antioxidante (Benavente-Garcia et al., 1997). A funcionalidade destes compostos está relacionada a ações inibidoras ou ativadoras de uma ampla variedade de sistemas enzimáticos, quelantes de metais ou desativadores de radicais livres (Harborne et al., 1995). Em estudos *in vitro* com células tumorais, extratos ricos em antocianinas de casca de jabuticaba apresentaram efeito antiproliferativo em células de melanoma e NCI-ADR/RES de câncer de ovário (Leite-Legatti, et al., 2012).

Antocianinas são pigmentos classificados quimicamente dentro do grupo dos compostos fenólicos, e compreendem a maior classe de compostos dentro do subgrupo dos flavonoides (Giusti e Jing, 2008). A unidade básica das antocianinas é

comumente chamada de cátion flavilium, que quando está na forma de aglicona é denominada antocianidina. Antocianidinas livres não são comuns na natureza, mas podem ser encontradas em pequenas quantidades, como por exemplo, em soja preta e em acerola (Lee et al, 2009; De Rosso et al., 2008). De fato, mono, di e tri-sacarídeos estão normalmente ligados a antocianinas por ligações O-glicosídicas. Além disso, mais de 69% das antocianinas encontradas na natureza contém um ou mais ácidos cíclicos ou acíclicos ligados aos açúcares (Andersen e Jordheim, 2013). Dentre as antocianinas presentes na natureza pode-se destacar 6 antocianidinas mais comuns: a cianidina, a pelargonidina, a peonidina, a petunidina, a delphinidina e a malvidina (Mercadante e Bobbio, 2008).

A cor das antocianinas depende diretamente das condições de pH do meio. Isso acontece devido à mudança na concentração das quatro espécies que existem em equilíbrio: o cátion flavilium, bases quinonoidais, hemiacetais e chalconas (Mercadante e Bobbio, 2008). A conversão de uma espécie em outra é tipicamente acompanhada pela drástica mudança de estabilidade e de cor, dependendo da complexidade da estrutura. Por ser deficiente em elétrons, a forma mais estável, o cátion flavilium, é susceptível ao ataque nucleofílico pela água, peróxidos e dióxido de enxofre, enquanto as chalconas são mais instáveis e podem ser hidrolisadas em um aldeído e um ácido (Andersen e Jordheim, 2006). As antocianinas que possuem estruturas mais complexas, ou seja, aciladas com vários ácidos cinâmicos, são relativamente mais resistentes ao efeito do calor, luz e hidrólise quando comparadas às antocianinas não aciladas (Andersen e Jordheim, 2013).

Os frutos de jabuticaba possuem casca de cor roxa escura devido à presença de várias antocianinas, principalmente cianidina 3-glucosídeo (Wu et al., 2012). A cor da cebola roxa também se deve a presença de antocianinas, principalmente as derivadas mono e di-glicosiladas e malonil aciladas de cianidina (Fossen et al., 1996). O repolho roxo (*Brassica oleracea* L. var. *capita f. rubra*) é rico em antocianinas que podem apresentar mais de 2 açúcares além de ácidos cinâmicos, e foram identificadas cianidina-3-diglucosil-5-glucosídeo, cianidina-3-glucosil-5-glucosídeo, cianidina-3-triglucosil-5-glucosídeo acilada com ácido p-cumárico (Giusti et al., 1999). O guajiru (*Chrysobalanus icaco* L.) é uma fruta nativa do Brasil, cuja composição de antocianinas foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos e espectrometria de

massas (HPLC-DAD-MS²) (Sousa de Brito et al., 2007); no entanto, os carotenoides e compostos fenólicos ainda não foram determinados nesta fruta.

A extração estática sólido-líquido de antocianinas é o método mais comum para obtenção desses compostos a partir de material vegetal; porém, esse processo é demorado e requer o uso de grandes quantidades de solventes orgânicos (Revilla et al., 1998).

Nos últimos anos, houve um aumento no interesse em desenvolver e aplicar novas técnicas de extração sólido-líquida. Dentre as novas tendências tecnológicas pode-se destacar a extração assistida por micro-ondas (MAE), que utiliza o aquecimento rápido por meio das micro-ondas para facilitar a extração. Como efeito do aquecimento, a maior vantagem da utilização da MAE é a redução do tempo de extração em comparação ao método tradicional (Eskilsson e Björklund, 2000), onde, na maioria das vezes, o solvente escolhido interage fortemente com o campo a fim de aquecer a mistura. Alguns flavonoides como quercetina e isoflavonas se mostraram estáveis durante a MAE em temperaturas de até 100°C (Huang et al., 2004, Zhang et al., 2009). No entanto não está claro o efeito desse tipo de extração no perfil de antocianinas, pois, dependendo dos valores de pH do meio, pode ocorrer degradação térmica das antocianinas (Andersen e Jordheim, 2013).

OBJETIVOS

Objetivo geral

Considerando o exposto anteriormente, este estudo apresenta os seguintes objetivos: determinar a composição de antocianinas, carotenoides e compostos fenólicos em guajiru e estudar a influência da extração assistida por micro-ondas (MAE) no perfil de antocianinas de diferentes fontes e com múltiplos graus de complexidade.

Objetivos específicos

- a) Determinar as antocianinas, os compostos fenólicos e carotenoides, por HPLC-DAD-MSⁿ, de guajiru preto;
- b) Determinar as antocianinas por HPLC-DAD-MSⁿ de extratos de cebola roxa (aciladas com ácidos alifáticos), jabuticaba (não aciladas) e repolho roxo (aciladas com ácidos cinâmicos);
- c) Utilizando planejamento experimental fatorial e HPLC-DAD-MSⁿ, avaliar a influência da concentração de ácido, tempo e temperatura na extração por MAE de antocianinas não aciladas (jabuticaba), antocianinas aciladas com ácidos alifáticos (cebola roxa) e antocianinas aciladas com ácidos cinâmicos (repolho roxo).

CAPITULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Compostos bioativos e capacidade redutora

1.1. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são importantes metabólitos secundários encontrados em frutas e vegetais. As classes de compostos fenólicos mais importantes são os ácidos fenólicos, ácidos hidroxicinâmicos, xantonas, estibenos, lignanas, cumarinas e flavonoides. Dentre os flavonoides estão classificadas as subclasses das antocianinas, os flavanóis, flavanonas, flavonas, isoflavonas e flavonóis (Andersen e Jordheim, 2006; Bravo, 1998). As estruturas básicas dos principais compostos fenólicos estão ilustradas na Figura 1.

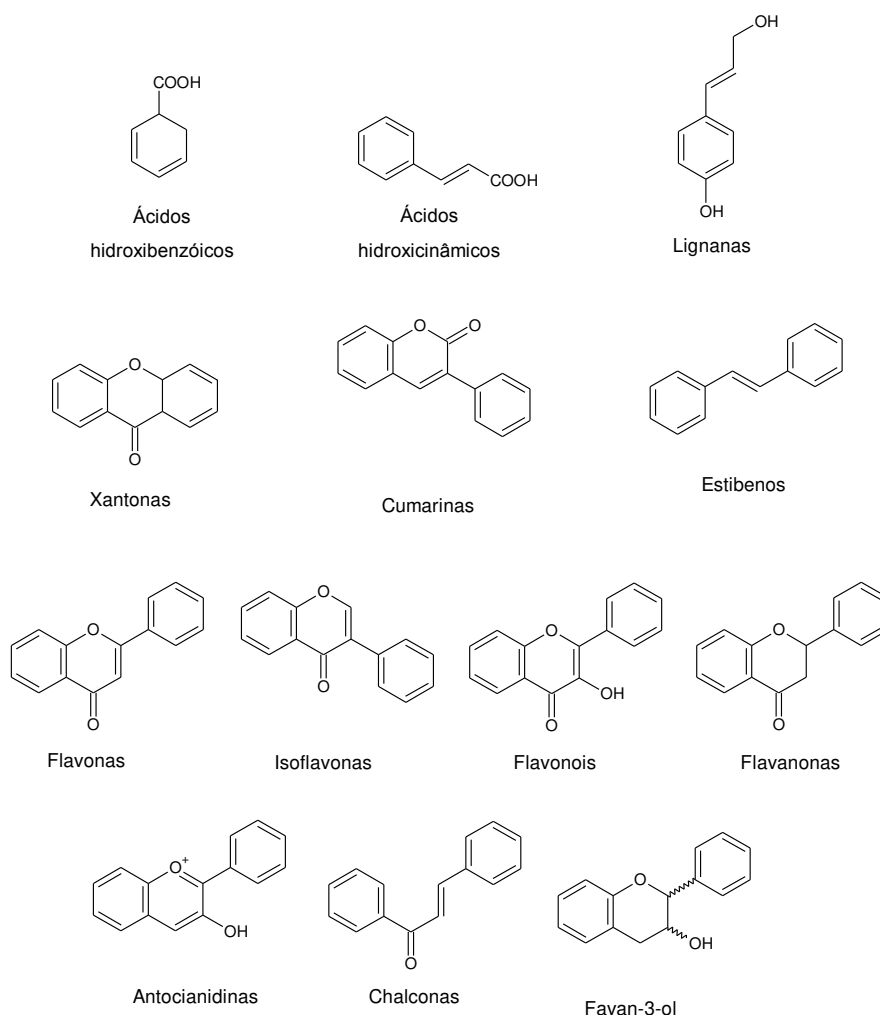


Figura 1: Estrutura molecular das principais classes de compostos fenólicos.

Os compostos fenólicos simples estão distribuídos amplamente entre diferentes espécies de plantas, mas não estão distribuídos uniformemente dentro os tecidos vegetais. Os ácidos fenólicos como os ácidos ferúlico e cumárico e seus derivados são considerados comuns tanto em plantas superiores quanto em pteridófitas e podem ser encontrados ligados a polissacarídeos da parede celular (Bravo, 1998).

Os flavonoides estão distribuídos por todo o reino vegetal com exceção de algas e fungos. Esses compostos também são mais comumente encontrados nas formas glicosiladas podendo ser tanto ligações O-glicosídicas quanto C-glicosídicas. As ligações C-glicosídicas, formadas pela ligação covalente carbono-carbono entre o carbono anomérico do açúcar e o carbono do anel A dos flavonoides são mais estáveis e por isso não sofrem hidrólise ácida (Kammerer et al., 2012).

O teor de compostos fenólicos em alimentos de origem vegetal pode variar em muitos graus de magnitude. Em leguminosas e cereais, o teor de compostos fenólicos pode variar de 1 a 10% em base seca, e os compostos mais abundantes são os flavonoides, ácidos fenólicos e taninos. Sementes são comumente ricas em compostos fenólicos devido à atividade antimicrobiana. Nas frutas, os fenólicos tendem a se acumular nas partes mais externas como a casca devido à capacidade de absorção de radiação UV de alguns desses compostos. Antocianinas e flavonóis são os principais compostos encontrados na casca, enquanto os derivados de catequina concentram-se na polpa das frutas (Bravo, 1998).

Os compostos fenólicos constituem uma das classes de antioxidantes mais conhecidas recebendo muita atenção dos pesquisadores, consumidores e das indústrias de alimentos. Estudos apontam correlação positiva entre o consumo de alimentos ricos em compostos fenólicos e a redução do risco de doenças crônico-degenerativas (Gomes et al., 2008; Harborne et al., 1995). A funcionalidade destes compostos está correlacionada com suas ações inibidoras ou ativadoras de uma ampla variedade de sistemas enzimáticos, como quelantes de metais ou desativadores de radicais livres (Harborne et al., 1995; Erlund, 2004).

1.2. Carotenoides

Os carotenoides são pigmentos lipossolúveis encontrados no reino vegetal, animal e em micro-organismos, com coloração variando entre amarelo e vermelho. Apenas as plantas superiores e microrganismos são capazes de sintetizar esses pigmentos, enquanto que nos animais, a presença de carotenoides deve-se à sua ingestão por meio da dieta (Britton et al, 1995).

Esses pigmentos apresentam como estrutura básica um tetraterpeno e são classificados em dois grandes grupos: carotenos e xantofilas. Os carotenos são quimicamente definidos como hidrocarbonetos, compostos exclusivamente de átomos de carbono e de hidrogênio, como por exemplo, o β -caroteno e licopeno, enquanto que as xantofilas são compostos oxigenados, que possuem em sua estrutura grupos hidroxílicos, carboxílicos ou epóxidos, por exemplo, a violaxantina e a luteína (Weedon e Moss, 1995). As estruturas de alguns carotenoides está apresentada na Figura 2.

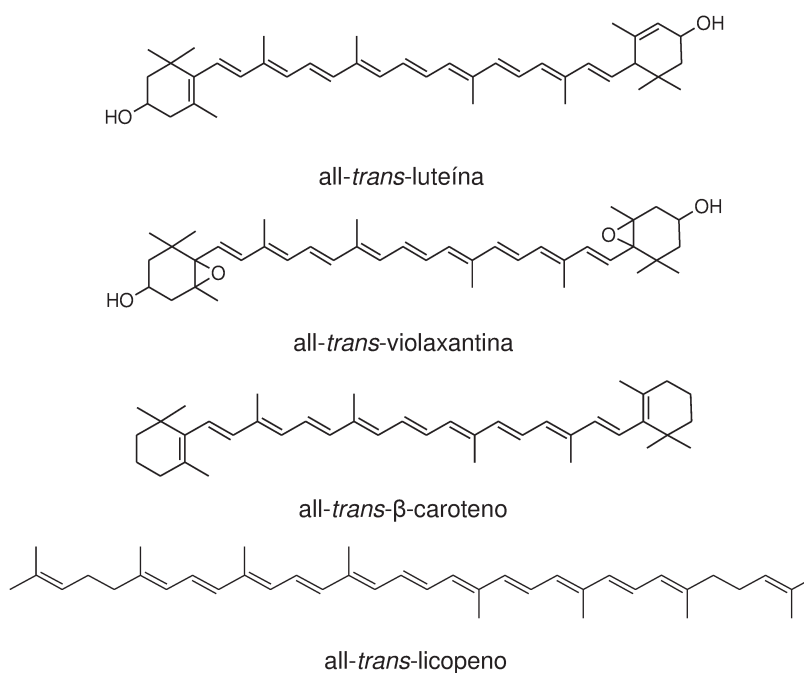


Figura 2: Estrutura molecular dos carotenoides: all-*trans*-luteína, all-*trans*-violaxantina, all-*trans*- β -caroteno e all-*trans*-licopeno.

A capacidade de sintetizar e acumular carotenoides em plantas é determinada por fatores genéticos, mas a composição e o teor de carotenoides depende de fatores ambientais, como composição do solo, incidência solar, estresse climático, estágio de maturação, idade da planta, etc (Britton e Khachik, 2009). Por exemplo, o perfil de carotenoides encontrados nos cloroplastos é praticamente constante e marcado pela presença de β -caroteno, luteína, violaxantina e neoxantina. Embora o conteúdo varie bastante, a grande concentração de cloroplastos está geralmente relacionada a altos teores de carotenoides (Gross, 1991). Isso pode ser observado em vegetais de folhas escuras, como a couve e o espinafre, que apresentam altos teores de carotenoides (Britton e Khachik, 2009).

Muitos dos alimentos com altos teores de carotenoides não são verdes. Dentre eles destacam-se frutos, flores, raízes e sementes. Os alimentos podem ser classificados de acordo com o teor de carotenoides nutricionalmente importantes como boas fontes de carotenoides. Assim, pode-se dizer que um alimento apresenta baixo teor de carotenoides quando os valores de carotenoides variam de 0 - 0.1 mg/100 g de peso úmido, moderado teor (0.1 - 0.5 mg/100 g), alto teor (0.5 - 2 mg/100 g) e muito alto (maior que 2 mg/100 g) (Britton e Khachik, 2009). Frutas amarelas como a manga, o mamão, ameixa e abóbora apresentam altos teores de carotenos e xantofilas.

Apesar de serem de famílias diferentes, frutas com aparência similar a do guajiru apresentam baixo teor de carotenoides, como por exemplo, o jambolão (*Syzygium cumini*) (Faria et al., 2011) e o camu-camu (*Myrciaria dubia*) (Zanatta e Mercadante, 2007).

1.3. Capacidade redutora

A determinação da capacidade redutora também é descrita na literatura como determinação de compostos fenólicos totais. A reação com reagente de Folin-Ciocalteu foi desenvolvida em 1927 para determinação de tirosina. O reagente consiste em uma mistura de molibdato de sódio e tungstato de sódio e outros reagentes. No reagente, o molibdênio se encontra no estado de oxidação +6, e quando reage com um agente redutor o molibdênio passa para o estado +5.

O mecanismo de reação do reagente de Folin-Ciocalteu com o ácido gálico está apresentado na Figura 3 (Everette et al., 2010). Neste exemplo, o padrão ácido

gálico gera os ânions fenolatos em meio básico, e a partir dele ocorre uma reação de oxirredução entre o ânion fenolato e o molibdato de sódio, onde o meio reacional passa de amarelo, devido ao Mo^{6+} , para azul (Mo^{5+}) com absorção máxima em 765 nm. A quantificação é realizada em comparação com uma curva padrão, em que o ácido gálico é o mais comumente utilizado (Prior e Wu, 2005).

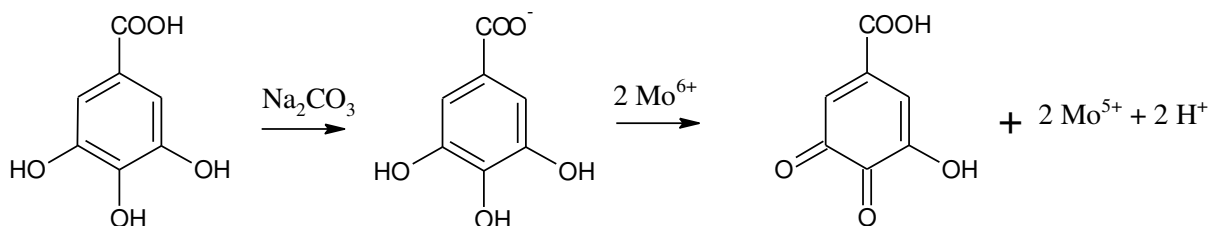


Figura 3: Reação do reagente de Folin-Ciocalteu com o ácido gálico em meio básico (Everette et al., 2010).

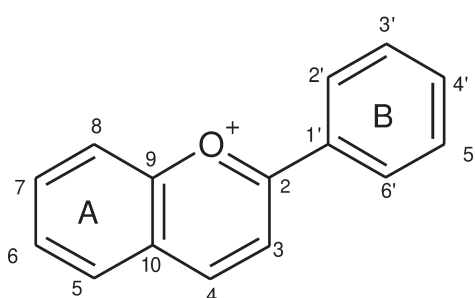
A utilização do reagente de Folin-Ciocalteu para determinação de compostos fenólicos totais se baseia no fato de que os compostos fenólicos são os compostos que podem doar hidrogênio mais abundantes em plantas (Prior e Wu, 2005). No entanto, vários interferentes não fenólicos já foram descritos, entre eles podemos destacar a vitamina C, além dos amino ácido tirosina, triptofano e cisteína (Everette et al., 2010).

Frutos tropicais de casca escura como jabuticaba (31,6 mg GAE/g), jambolão (95 - 148 mg GAE/g), camu-camu (9,5 mg GAE/g) e grumixama (24,8 mg GAE/g) possuem elevada capacidade redutora (Faria et al., 2011; Reynertson et al., 2008; Reynertson et al., 2006).

2. Antocianinas

As antocianinas são classificadas quimicamente dentro do grupo dos compostos fenólicos, e compreendem a maior classe de compostos dentro do subgrupo dos flavonoides (Giusti e Jing, 2008). São pigmentos hidrossolúveis amplamente distribuídos pelo reino vegetal, conferindo cor de vermelha a azul a folhas, flores e frutos.

Esses pigmentos possuem como estrutura básica uma aglicona cujo esqueleto é composto por 15 carbonos (15C) ligados em forma de três anéis $C_6C_3C_6$ (Figura 4). As diferentes agliconas são diferenciadas apenas por ligantes nas posições 3', 4' e 5'. Dentre as antocianinas presentes na natureza, cerca de 90% são encontradas na forma glicosilada das 6 antocianidinas mais comuns: a cianidina, a pelargonidina, a peonidina, a petunidina, a delphinidina e a malvidina (Mercadante e Bobbio, 2008).



Antocianidina	3'	4'	5'	3	5	7
Pelargonidina	H	OH	H	OH	OH	OH
Cianidina	OH	OH	H	OH	OH	OH
Delphinidina	OH	OH	OH	OH	OH	OH
Peonidina	OCH ₃	OH	H	OH	OH	OH
Petunidina	OCH ₃	OH	OH	OH	OH	OH
Malvidina	OCH ₃	OH	OCH ₃	OH	OH	OH

Figura 4: Estrutura básica das antocianidinas mais amplamente encontradas na natureza.

Incluindo as 6 antocianidinas mais comuns, cerca de 27 diferentes antocianidinas baseadas no mesmo esqueleto 15C já foram isoladas de plantas. Também foram isoladas de plantas outras 19 antocianidinas que possuem um esqueleto 15C-estendido (Andersen e Jordheim, 2013).

As antocianinas são normalmente encontradas na natureza na forma monomérica. No entanto, podem ocorrer interações entre moléculas de antocianinas e formação de oligômeros, bem como formação de polímeros pela associação entre antocianinas e outros compostos. Heterodímeros formados por antocianinas e outros flavonoides podem ser encontrados em pequenas quantidades em frutas não processadas, como em morango (Fossen et al., 2004).

Antocianidinas livres foram anteriormente descritas como compostos naturalmente presentes em alguns alimentos, como por exemplo, em soja preta (Lee et al., 2009) e acerola (De Rosso et al., 2008). No entanto, as agliconas também podem ser artefatos de extração (Revilla et al., 1998).

Os açúcares, mono, di ou tri-sacarídeos, estão ligados às antocianidinas por ligações *O*-glicosídicas, normalmente na posição 3. Os açúcares mais encontrados são glucose, galactose, ramnose. A presença desses açúcares aumenta a solubilidade e a estabilidade das antocianinas (Andersen e Jordheim, 2013). Açúcares são também encontrados em outras posições, como por exemplo, em cebola roxa, em que foram encontrados elevados teores de cianidina 3-(glucosil 6-malonil glucosídeo)-4'-glucosídeo (Fossen et al., 2003).

Mais de 69% das antocianinas encontradas na natureza estão aciladas a um ou mais grupos ácidos. O grupo malonil é o mais frequentemente encontrado em antocianinas, tendo sido isolado em cebola roxa (*Allium cepa* L.), alface roxa (*Lactuca sativa*), e em rabanete vermelho (*Raphanus sativus*) (Giusti et al., 1998). Os ácidos acético, málico, oxálico, succínico e tartárico estão entre os outros ácidos alifáticos mais comuns. Já entre os ácidos cinâmicos podemos destacar a ocorrência dos ácidos *p*-cumárico, cafeico e ferúlico (Andersen e Jordheim, 2013). As estruturas químicas destes ácidos estão apresentadas na Figura 5.

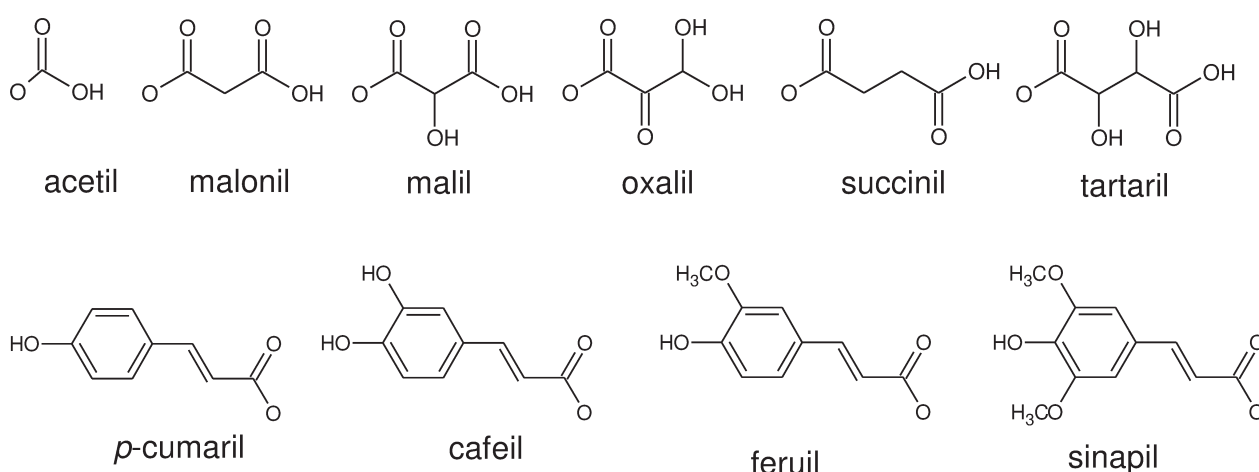


Figura 5: Estruturas dos ácidos alifáticos e cinâmicos frequentemente encontrados em antocianinas.

A cor das antocianinas depende das condições de pH do meio devido à mudança na concentração das quatro espécies em equilíbrio: o cátion flavilium, bases quinonoidais, pseudobases ou hemiacetais e chalconas (Figura 6). A estrutura das antocianinas permite uma variação na distribuição das cargas da molécula, o que altera o tamanho do cromóforo e, por conseguinte, gera uma variação de cor (Andersen e Jordheim, 2006).

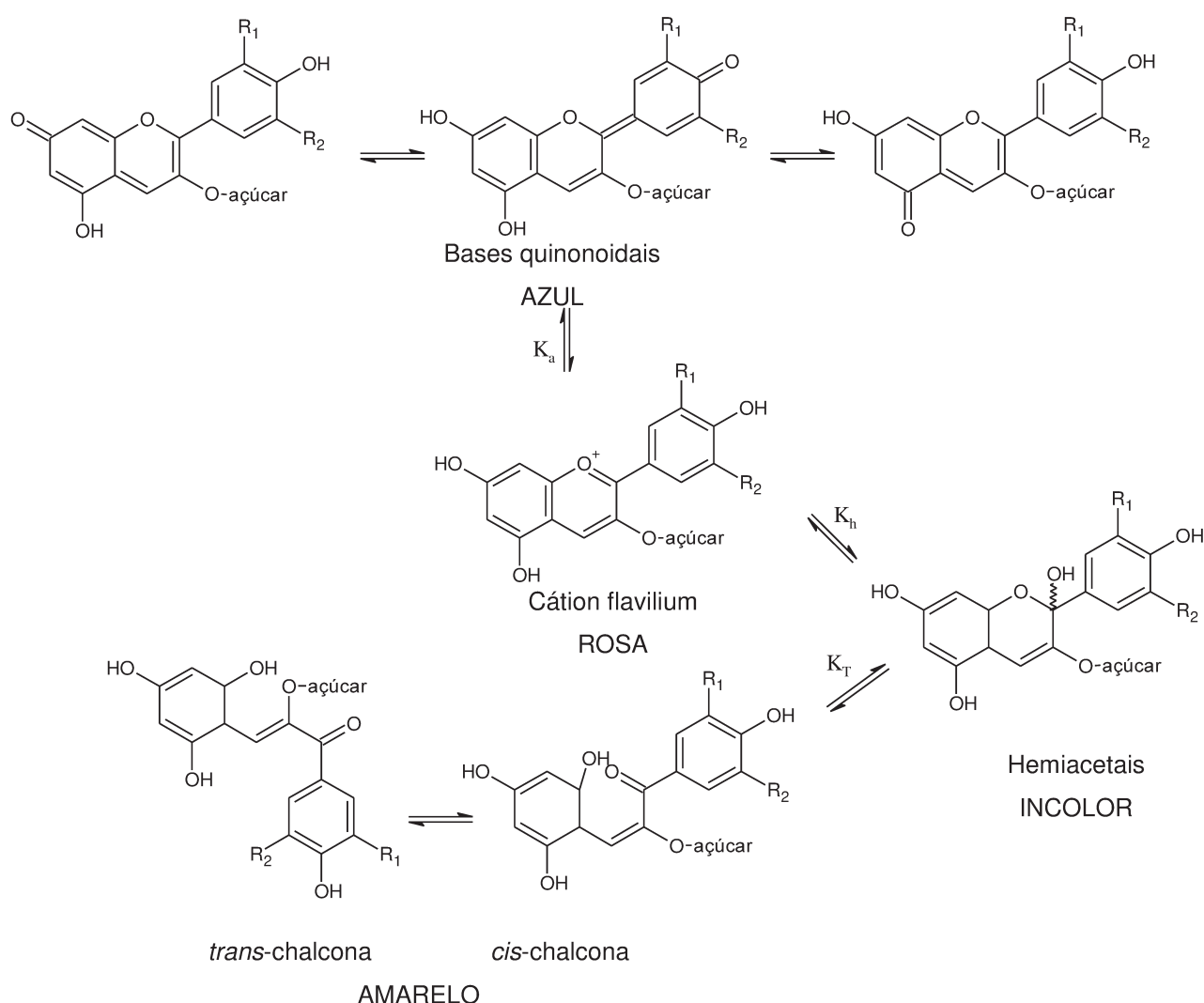


Figura 6: Transformações estruturais das antocianinas em solução aquosa (Andersen e Jordheim, 2013).

A conversão de uma espécie em outra é tipicamente acompanhada pela drástica mudança de estabilidade. Por ser deficiente em elétrons, o cátion flavilium é susceptível ao ataque nucleofílico pela água, peróxidos e dióxido de enxofre. A

velocidade de reação depende da estrutura química das antocianinas, isto é, do tipo, da posição e do número de substituintes ligados à aglicona (Andersen e Jordheim, 2013). Por exemplo, antocianidinas possuem uma hidroxila livre no carbono 3 o que torna a reação muito mais rápida em comparação a forma glicosilada da mesma antocianidina (Andersen e Jordheim, 2006).

As antocianinas que possuem estruturas mais complexas, ou seja, aciladas com ácidos cinâmicos são relativamente mais resistentes ao efeito do calor, luz e hidrólise quando comparadas às antocianinas não aciladas. Os ácidos cinâmicos são capazes de se dobrar sobre a estrutura da antocianina, permitindo a interação entre os anéis do ácido e da antocianina por pontes de Van der Waals. Esse tipo de interação é chamado co-pigmentação intramolecular (Mercadante e Bobbio, 2008).

Além dos fatores intrínsecos à estrutura, a estabilidade das antocianinas depende de fatores externos como presença de oxigênio, luz, condições de pH e temperatura (Torskangerpoll e Andersen 2005). A degradação térmica das antocianinas também depende das condições de pH do meio. O mecanismo de degradação desses compostos em meio ácido (Figura 7) é diferente do mecanismo em meio neutro. Quando em meio fortemente ácido, ocorre a clivagem dos açúcares e ácidos ligados à antocianina, a aglicona formada é posteriormente convertida em hemiacetal, e então há a abertura do anel e formação de *cis*-chalcona e *trans*-chalcona, gerando como produtos finais o 2,4,6-trihidroxibenzaldeído (Figura 7F) e ácido 3,4-dihidroxibenzoico (Figura 7G). Em meio neutro, a forma majoritária das antocianinas com estrutura simples é o hemiacetal e a partir dele são formadas as *cis*-chalcona e *trans*-chalcona, gerando os mesmos compostos finais (Andersen e Jordheim, 2006). O aumento da temperatura está relacionado ao deslocamento do equilíbrio no sentido da formação da *trans*-chalcona, o que aumenta a velocidade de degradação (Andersen e Jordheim, 2013).

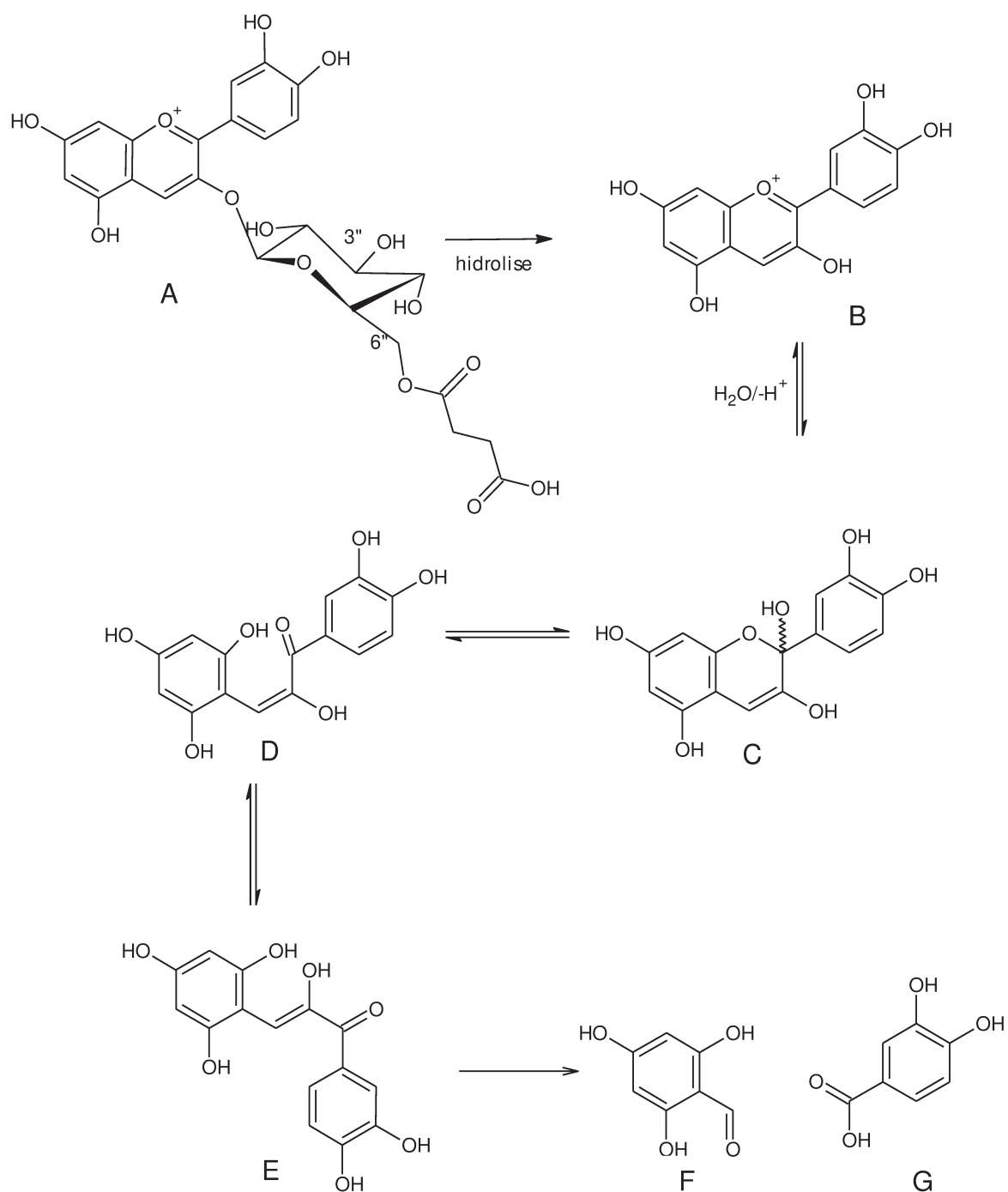


Figura 7: Mecanismo de degradação térmica em pH 1 em que a cianidina 3-succinil glucosídeo (A) é hidrolisada a cianidina (B), hemiacetais (C), *cis*-chalcona (D), *trans*-chalcona (E), 2,4,6-trihidroxibenzaldeído (F) e ácido 3,4-dihidroxibenzoico (G) (Andersen e Jordheim, 2013).

2.1. Ocorrência em vegetais e frutas

Cebola

A cebola (*Allium cepa* L.) pertence à família *Alliaceae*. Esse vegetal tem grande importância comercial, pois é um dos mais cultivados no mundo. Seu consumo se deve principalmente ao sabor único, pungente e à grande capacidade de aromatizar outros alimentos (Ng et al., 2000).

As folhas de cebola podem ser consumidas ao longo do ano, mesmo que o bulbo esteja no estado imaturo. Quando no estado maduro, o bulbo é colhido e seco. A casca mais externa seca se torna uma barreira física, protegendo fisicamente o bulbo do ataque por pragas e patógenos. A cor da casca, por exemplo da cebola roxa (Figura 8), é intensificada durante a secagem e é responsável pela aceitação do produto pelo consumidor (Olsson et al., 2010).



Figura 8: Aspecto interno e externo da cebola roxa (Foto: Marcella Marques).

Existem muitas cultivares de cebola, e essa diversidade proporciona diferenciação de tamanho, cor e sabor. O consumidor brasileiro prefere bulbos de tamanho médio com escamas externas de cor amarela e internas de cor branca e sabor pungente (Ferreira e Minami, 2000).

A cor da cebola roxa se deve à presença de antocianinas (48 mg/100g de peso fresco), principalmente derivados de cianidina e de peonidina (Wu et al, 2006). Já foram isoladas 10 antocianinas em cebola roxa. Dentre elas foram identificadas cianidina 3-glucosídeo, cianidina 3-(diglucosídeo), cianidina 3-(3''-malonoil) glucosídeo, cianidina 3-(6''-malonoil) glucosídeo e cianidina 3-(6''-malonoil) diglucosídeo (Fossen et al., 1996). Também foram encontradas as antocianinas raras: cianidina 4'-glucosídeo, cianidina 3,4'-glucosilglucosídeo, cianidina 3-(3''-

glucosil-6"-malonil- β -glucosídeo)-4'-glucosídeo, cianidina 7-(3"-glucosil-6"-malonil-glucosídeo)-4'-glucosídeo (Fossen et al., 2003). A identidade desses compostos foi confirmada por ressonância magnética nuclear.

Jabuticaba

A jabuticabeira (*Myrciaria cauliflora* ou *Myrciaria jaboticaba*) é uma árvore nativa do Brasil que pertence à família *Myrtaceae*. Os frutos (Figura 9) possuem casca de cor roxa escura e a polpa esbranquiçada é macia e succulenta, de sabor pouco ácido e adocicado; é consumida majoritariamente *in natura*, mas pode ser utilizada no preparo de geleias e licores. A frutificação acontece ao longo do tronco ou na axila das folhas. O período de comercialização pós-colheita é curto, pois há rápida alteração da aparência, decorrente da intensa perda de água, deterioração e fermentação da polpa (Mota et al., 2002).



Figura 9: Aspecto interno e externo da jabuticaba (Foto: Marcella Marques).

A casca da fruta apresenta altas concentrações de antocianinas, 1500 mg/100g de peso seco (Leite-Legatti et al., 2012). Apenas antocianinas mono glicosiladas foram encontradas em jabuticaba sendo a cianidina 3-glucosídeo o pigmento majoritário na fruta. Também foram identificadas delphinidina-3-glucosídeo (Leite-Legatti et al., 2012) e peonidina 3-glucosídeo (Trevisan et al., 1972).

Repolho roxo

O repolho roxo (*Brassica oleracea* L. var. *capita f. rubra*) é um vegetal nativo da Europa que hoje é amplamente cultivado em todas as regiões do mundo. A

família das crucíferas inclui diferentes tipos de repolho, dentre eles o verde e o roxo (Figura 10), além de couve-flor, brócolis, couve de Bruxelas e couve.



Figura 10: Aspecto externo e interno do repolho roxo (Foto: Marcella Marques).

O repolho roxo é rico em compostos fenólicos, principalmente antocianinas (322 mg/100g de peso fresco) (Wu et al., 2006). As antocianinas encontradas em repolho são muito mais complexas do que as presentes em jabuticaba ou cebola roxa, pois podem apresentar mais de 2 açúcares além de ácidos cinâmicos. Já foram identificadas 11 diferentes antocianinas derivadas de cianidina: cianidina-3-diglucosil-5-glucosídeo, cianidina-3-glucosil-5-glucosídeo, cianidina-3-triglucosil-5-glucosídeo acilada com ácido p-cumárico, cianidina-3-triglucosil-5-glucosídeo acilada com ácido ferúlico, cianidina-3-triglucosil-5-glucosídeo acilado com ácido sinápico, cianidina-3-diglucosil-5-glucosídeo acilada com ácido p-cumárico, cianidina-3-diglucosil acilada com ácido ferúlico, cianidina-3-diglucosil-5-glucosídeo acilada com ácido sinápico, cianidina-3-diglucosil-5-glucosídeo di-acilada com ácidos p-cumárico e sinápico, cianidina-3-diglucosil-5-glucosídeo di-acilada com ácidos ferúlico e sinápico, cianidina-3-diglucosil-5-glucosídeo di-acilada com ácido sinápico (Giusti et al., 1999).

No Japão, esse vegetal é utilizado para a produção de corante comercial vermelho termooestável, cuja patente descreve duas etapas de cromatografia do extrato hidrofílico rico em antocianinas, uma com resina polimérica e outra com troca aniônica, para remoção de odores indesejáveis. A adição de flavonoides, antioxidantes hidrossolúveis e fosfatos aumentam a estabilidade do corante (Bridle e Timberlake, 1997).

Guajiru

O guajiru (*Chrysobalanus icaco* L.) é uma fruta nativa da região costeira tropical e subtropical Atlântica, e ocorre desde a Flórida até o sudeste e sul do Brasil. Esta espécie também é conhecida por abajeru, ajiru ou *coco plum*. Os frutos (Figura 11) possuem formato ovóide, polpa de cor branca leitosa, uma semente central volumosa e a casca tem coloração variando desde rosa a roxa escura, quase negra devido a presença de antocianinas (958 mg/100g de peso seco) (Sousa de Brito et al., 2007). Os frutos de guajiru possuem sabor levemente doce e podem ser consumidos *in natura* ou, mais raramente, na forma de compotas e geleias. A semente central não é consumida e as folhas são utilizadas no preparo de chás, que são popularmente utilizados como hipoglicêmicos, enquanto as infusões de galhos e folhas podem ser utilizadas para tintura de redes de pesca (Sousa de Brito et al., 2007).



Figura 11: Aspectos externo e interno de frutos maduros de *Chrysobalanus icaco* L. (Foto: Marcella Marques).

Outras espécies de plantas pertencentes à família Chrysobalanaceae e também utilizadas popularmente como fitoterápicos são *Couepia impressa*, *Couepia rufa*, *Couepia uiti*, *Licania parviflora*, *Licania salzmannii* e *Licania tomentosa*. As espécies *Chrysobalanus icaco* e *Licania rigida* foram parcialmente caracterizadas com relação aos flavonoides, com identificação apenas de miricetina e de ácido pomólico em folhas de *C. icaco* (Feitosa et al., 2012).

Os frutos da família Chrysobalanaceae são pouco utilizados como alimento e pouco caracterizados. Ácido oleanólico foi isolado de frutos de *Licania tomentosa*; no

entanto, outros os compostos bioativos da fruta não foram descritos (Castilho e Kaplan, 2008). Não foram encontradas caracterizações de outras frutas da família do guajiru.

As antocianinas monoglicosiladas foram tentativamente identificadas em guajiru preto: delfinidina 3-hexosídeo e petunidina 3-hexosídeo, e os compostos acilados: delfinidina 3-(6"-acetil) galactosídeo, petunidina 3-(6"-acetil) galactosídeo delfinidina 3-(6"-acetil) glucosídeo, delfinidina 3-(6"-succinil) ramnosídeo, petunidina 3-(6"-acetil) glucosídeo, petunidina 3-(6"-succinil) ramnosídeo e peonidina 3-(6"-succinil) ramnosídeo (Sousa de Brito et al., 2007).

2.2. Métodos de extração de antocianinas

A extração pela imersão da amostra, fresca ou seca, em solvente orgânico acidificado para manter as antocianinas na forma de cátion flavilium é o método mais comum para obtenção desses compostos a partir de material vegetal. Neste método estático a mistura amostra-solução extratora permanece em repouso por um período de 4 a 48h (Degenhardt et al., 2000; Revilla et al., 1998). Uma desvantagem desse processo é que ele é demorado e requer o uso de grandes quantidades de solventes orgânicos.

Outro método comumente utilizado para a extração de antocianinas é a extração sob agitação (Faria et al., 2011; Sousa de Brito et al., 2007; Wu et al., 2004), também com solvente acidificado. A agitação é utilizada para acelerar o processo de extração e reduzir o tempo de análise (Wu et al., 2004).

Os solventes mais comuns para a extração de antocianinas são metanol, etanol e acetona, embora o uso de acetona esteja relacionado à formação de piroantocianinas como artefatos de extração (Andersen e Jordheim, 2013). Como o cátion flavilium é a forma mais estável das antocianinas, os solventes orgânicos utilizados para a extração são normalmente acidificados com ácidos orgânicos ou inorgânicos como ácido acético, fórmico, trifluoracético, clorídrico e fosfórico (Revilla et al., 1998). A extração é comumente realizada com metanol ou etanol contendo de 0,1 a 1% de HCl por apresentar melhores resultados de extração total de antocianinas (Takeoka e Dao, 2002).

A extração de antocianinas é claramente favorecida pelo uso de solventes acidificados, e é provável que a maior eficiência de extração em meio ácido esteja

relacionada à dissociação entre os compostos fenólicos e os constituintes da parede celular. Entretanto, sabe-se que a extração de antocianinas com solução ácida pode resultar na hidrólise dos grupos acilados à antocianina (Andersen e Jordheim, 2013). Essa hidrólise parece ser mais intensa quando ácidos alifáticos estão esterificados à antocianina (Revilla et al., 1998). A extração de malvidina 3-p-cumaril-glucosídeo de casca de uva é maior quando a solução de extração é acidificada, enquanto a extração de malvidina 3-O-acetil-glucosídeo é mais eficiente quando se utiliza solvente neutro (Revilla et al., 1998).

Nos últimos anos, pode-se observar um aumento no interesse em desenvolver e aplicar novas técnicas de extração sólido-líquido. Dentre as novas tendências tecnológicas destacam-se a extração assistida por micro-ondas (MAE), tratamento assistido por campo elétrico pulsado (PEF), extração utilizando fluido supercrítico (SFE) e extração com líquido a alta pressão (PLE). Essas técnicas têm sido utilizadas para extração de vários tipos de compostos como terpenóides, esteróis, óleos essenciais e compostos fenólicos (Beejmohun et al., 2007). Algumas dessas tecnologias se mostraram eficientes na extração de antocianinas e hoje são consideradas boas alternativas à extração convencional.

Na maioria das vezes estes métodos são mais rápidos e possibilitam um menor consumo de solvente em comparação à extração tradicional, pois se utiliza controle tanto de temperatura como de pressão na extração (Abdel-Aal et al., 2014; Liazid et al., 2011).

A MAE utiliza o aquecimento rápido por meio de micro-ondas para facilitar a extração. A maior vantagem da utilização da MAE é a redução do tempo de extração em comparação ao método tradicional (Eskilsson e Björklund, 2000). Essa técnica tem sido utilizada para a extração de moléculas de baixo peso molecular como compostos fenólicos. Alguns flavonoides como quercetina e isoflavonas se mostraram estáveis durante a extração em temperaturas de até 100°C (Huang et al., 2004; Zhang et al., 2009).

3. Micro-ondas

3.1. Princípios e definições de micro-ondas

Micro-ondas é a denominação coletiva para a radiação não ionizante com frequências do tipo ultra-alta entre 0.3 e 3 GHz, super-alta entre 3 e 30 GHz e extremamente alta de 30 a 300 GHz. Uma larga faixa de frequências de micro-ondas é utilizada para telecomunicações e radares (Figura 12). A frequência dos fornos domésticos e comerciais foi padronizada em 2,45 GHz, a fim de evitar interferências em outras aplicações (Mavandadi, 2007).

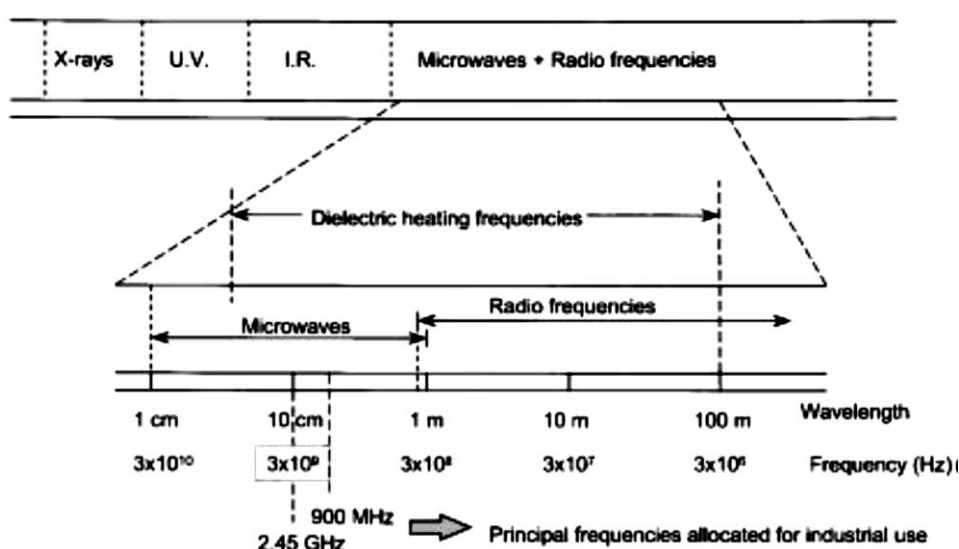


Figura 12: Espectro eletromagnético (Kaufmann e Christen, 2002).

O aquecimento por micro-ondas é conhecido há bastante tempo. Os fornos de micro-ondas domésticos existem a mais de 50 anos (Lidström et al., 2001), porém o forno de micro-ondas doméstico nunca deve ser utilizado para fins analíticos (Mavandadi, 2007).

As micro-ondas possuem duas componentes capazes de interagir com íons e moléculas que apresentem um dipolo permanente ou induzido: uma componente elétrica e uma componente magnética (Figura 13). O aquecimento devido à interação com a componente elétrica ocorre por dois mecanismos: rotação dipolar e condução iônica (Mavandadi, 2007). O campo elétrico oscilante faz com que os dipolos e íons tentem se realinhar sincronicamente ao campo. No caso da água essa oscilação ocorre $4,9 \times 10^9$ vezes em 1 min (Afoakwah et al., 2012). Devido a esse

processo uma parte da energia é convertida em calor devido à fricção e à perda dielétrica. A quantidade de calor gerada está relacionada a habilidade das moléculas e íons de interagir com o campo (Mavandadi, 2007).

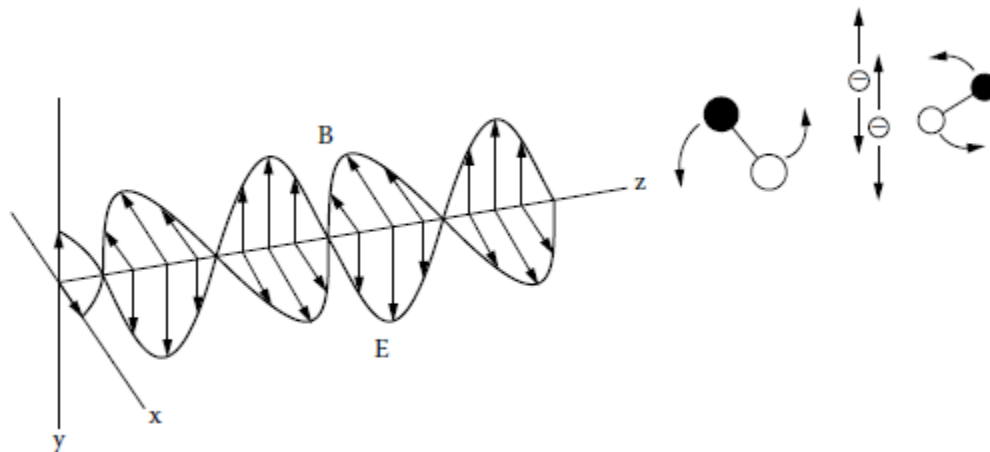


Figura 13: Moléculas dipolares e íons se movendo no campo oscilante (Mavandadi, 2007).

A quantidade de energia absorvida e transformada em calor depende da permissividade e da constante dielétrica da mistura. Quanto maior a permissividade, maior o calor liberado e mais rápido ocorre o aquecimento. A eficiência de aquecimento depende do fator de dissipação do material, $\tan \delta$ (Eq. 1), que relaciona a habilidade das moléculas de absorver a radiação de micro-ondas e a capacidade de dissipar essa energia na forma de calor (Lidström et al., 2001).

$$\tan \delta = \frac{\epsilon''}{\epsilon'} \quad (1)$$

Na equação 1, ϵ'' é a perda dielétrica, que indica a conversão da energia absorvida em calor, enquanto ϵ' é a constante dielétrica, que mede a habilidade de absorção das micro-ondas pelas moléculas (Lidström et al., 2001).

3.2. Extração assistida por micro-ondas (MAE) e fatores que influenciam a MAE

Os primeiros equipamentos de extração assistida por micro-ondas foram desenvolvidos no final da década de 1980 (Kaufmann e Christen, 2002). A instrumentação laboratorial de micro-ondas conta com dois tipos de equipamentos. O instrumento mais utilizado é o de extração em vaso fechado em que a extração

ocorre em temperatura controlada. No equipamento de extração a pressão atmosférica o tubo de extração é aberto (Kaufmann e Christen, 2002).

A MAE utiliza a radiação de micro-ondas como fonte de aquecimento da mistura amostra-solvente, proporcionando uma extração mais rápida. Na maioria das vezes o solvente escolhido para realizar a extração possui elevado fator de dissipação ($\tan \delta$) e interage mais intensamente com o campo a fim de aquecer a mistura. Esse foi o mecanismo de aquecimento utilizado na extração de antocianinas de casa de uva com metanol 80% (Liazid et al., 2011) e de cereja com solução de HCl 0,1% em metanol 80% (Garofulic et al., 2013). O mesmo princípio foi utilizado por Medina et al. (2015) para a extração de lipídeos de carne, em que a solução de acetato de etila:metanol (2:1, v/v) foi escolhida como solvente de extração por apresentar maior perda dielétrica e proporcionar maior recuperação de lipídeos.

Por outro lado, solventes com menor $\tan \delta$ são utilizados quando a molécula de interesse é termolábil ou apolar. Por exemplo, a extração de óleos essenciais de plantas pode ser feita utilizando o hexano como solvente de extração (Eskilsson e Björklund, 2000), assim a água presente no material vegetal interage com o campo e aquece mais intensamente o material vegetal enquanto as moléculas são extraídas para o solvente apolar e mais frio (Camel, 2001).

A eficiência da MAE depende fortemente das condições de operação como natureza da matriz, natureza do solvente, tempo de extração, temperatura e potência de extração.

Temperatura e potência de extração

A potência do equipamento e a temperatura estão relacionadas, pois altas potências de trabalho levam a altas temperaturas. A temperatura é controlada pela quantidade de energia de micro-ondas incidente (Veggi et al., 2012).

Altas temperaturas de extração aumentam a solubilidade dos compostos pois há maior interação intermolecular e maior mobilidade. O aumento da temperatura também causa um aumento da pressão celular o que pode resultar em ruptura dos tecidos. De forma geral, observa-se que a elevação da temperatura aumenta a eficiência de extração até um ponto ótimo. Essa temperatura ótima varia

de acordo com a proporção sólido/solvente e com o tipo de composto a ser extraído (Kaufmann et al., 2001).

Solvente de extração

A escolha do solvente deve levar em conta a solubilidade do composto de interesse e a sua capacidade de absorver micro-ondas. De forma geral, a capacidade de absorver energia de micro-ondas é maior quanto maior a constante dielétrica do solvente. Da mesma forma, uma perda dielétrica elevada faz com que o aquecimento do solvente seja mais intenso. Compostos mais polares interagem mais com o campo (Tabela 1) e estão associados a um aquecimento mais rápido.

Tabela 1: Constantes físicas e fator de dissipação ($\tan \delta$) para os principais solventes utilizados MAE.

Solvente	Constante dielétrica ϵ	$\tan \delta$	Ponto de ebulição (°C)	Viscosidade (cP)
Água	78,30	0,16	100	0,89
Metanol	32,60	0,64	65	0,54
Etanol	24,30	0,25	78	0,69
Acetona	20,70	0,56	56	0,30
2-Propanol	19,90	0,67	82	0,30
Acetato de etila	6,02	0,53	77	0,43

Fonte: Veggi et al. (2012).

As características do solvente devem ser escolhidas de acordo com o objetivo da extração e em alguns casos misturas de solventes são utilizadas para modificar as propriedades físico-químicas de solventes puros (Kaufmann e Christen, 2002). Por exemplo, pequenas quantidades de solventes polares com elevadas perdas dielétricas podem elevar a temperatura de toda a mistura o que possibilita o uso de solventes não polares (Lidström et al., 2001).

Não só a composição de solventes, mas também a presença de íons altera a eficiência do aquecimento. Tanto a adição de sais quanto a alteração do pH podem ser utilizadas para modificar o aquecimento (Routray e Orsat, 2012).

A extração de compostos termolábeis muitas vezes é realizada utilizando solventes com constantes dipolares menores e matrizes com maior teor de umidade. Assim, durante a extração o solvente se aquece mais lentamente e o analito é liberado para o meio mais frio, em relação à matriz, prevenindo a sua degradação térmica (Kaufmann e Christen, 2002).

Natureza da matriz

É amplamente conhecido que as características físicas e químicas da amostra também interferem no processo de MAE. Da mesma forma que para a extração convencional, quanto maior a superfície de contato maior a eficiência de extração dos compostos (Kaufmann et al., 2001). No entanto, partículas muito pequenas podem dificultar a posterior separação amostra-solvente por centrifugação ou filtração.

A umidade da amostra é um outro fator importante, pois na MAE a presença de água dentro das células promove aumento da temperatura de forma acelerada e com isso há um aumento da pressão e consequente ruptura dos tecidos. Ambos fenômenos facilitam a difusão dos analitos para o solvente (Paré et al., 1994).

3.3. MAE de antocianinas

A extração assistida por micro-ondas (MAE) de antocianinas mostrou ser mais eficiente para a extração de antocianinas de casca de uva do que o método de extração estática sob refrigeração por 5 h (Liazid et al., 2011). Nesse estudo, para avaliar a extração de antocianinas, foi realizado um planejamento experimental, variando em 2 níveis a concentração de metanol em água (50-80%), presença ou ausência da agitação, temperatura (50-100°C), potência do equipamento (100-500W), tempo de extração (5-20 min) e volume de solução extratora. Posteriormente, o efeito das variáveis temperatura, concentração de metanol em água e tempo de extração em 5, 4 e 6 níveis, respectivamente, foi individualmente avaliado (Liazid et al., 2011). Em todos os experimentos, as variáveis resposta foram: concentração de antocianinas totais e concentração da antocianina majoritária, determinadas por HPLC-DAD (Liazid et al., 2011). Como as concentrações individuais das antocianinas extraídas foram determinadas somente

pelo método otimizado de MAE e por extração estática, que foi realizada utilizando solvente acidificado com 5 % de ácido fórmico, não é possível verificar o efeito individual das variáveis avaliadas no planejamento experimental no perfil das antocianinas ou ainda isolar o efeito da MAE na extração das antocianinas.

Temperatura, potência do equipamento e tempo de irradiação foram avaliados utilizando planejamento experimental composto central para extração de antocianinas de cereja (*Prunus cerasus* var Marasca) por MAE (Garofulic et al., 2013). Os parâmetros fixos foram tempo para atingir a temperatura determinada, tempo de resfriamento, agitação, massa de amostra e solvente de extração (MeOH/H₂O 8:2 acidificado com 0,1 % de HCl). As concentrações individuais das antocianinas foram determinadas por HPLC-DAD, e as concentrações de antocianinas totais e da antocianina majoritária (cianidina-3glucosilrutinosídeo) foram utilizadas como respostas para otimização do método de extração. O método otimizado de MAE (60 °C, 400 W e 9 min) resultou em maior teor de antocianinas totais do que o método de extração convencional. A MAE não promoveu a alteração do perfil de antocianinas, ou seja, o teor relativo das antocianinas ligadas a diferentes açúcares foi constante em todos os experimentos do planejamento (Garofulic et al., 2013).

Outros estudos para a otimização da extração por MAE de antocianinas de amora *Rubus* (Wen et al., 2015) e *Morus atropurpurea* (Zou et al., 2012), de framboesas (Teng et al., 2013) e de milho roxo (Yang e Zhai, 2010) utilizaram métodos espectrofotométricos para determinação da concentração de antocianinas totais, utilizada como variável resposta. Desta forma, nesses estudos não foram avaliados o efeito da extração no perfil das antocianinas ou a possível degradação térmica dos compostos durante a extração.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Aal, E.S.M.; Akhtar, H.; Rabalski, I.; Bryan, M. 2014. Accelerated, Microwave-Assisted, and Conventional Solvent Extraction Methods Affect Anthocyanin Composition from Colored Grains. *Journal of Food Science*, 79: 138-146.

- Afoakwah, A.N.; Adomako, C.; Teye, E. 2012. Microwave assisted extraction (MAE) of antioxidant constituents in plant materials. *Global Journal of Bio-Science and Technology*, 1: 132-140.
- Andersen, Ø.M.; Jordheim, M.C. 2013. Basic Anthocyanin Chemistry and Dietary Sources. In: *Anthocyanins in Health and Disease*, ed. T.C. Wallace, M. Giusti. pp. 13-90. CRC Press.
- Andersen, Ø.M.; Jordheim, M.C. 2006. The anthocyanin. In: *Flavonoids chemistry, biochemistry and applications*, ed. Ø. M. Andersen. pp. 471-551. CRC Press.
- Beejmohun, V., Fliniaux, O., Grand, E., Lamblin, F., Bensaddek, L., Christen, P., Kovensky, J., Fliniaux, M., Mesnard, F. 2007. Microwave-assisted Extraction of the Main Phenolic Compounds in Flaxseed. *Phytochemical Analysis*, 18: 275-282.
- Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Marin, F. R., Ortuno, A., & Del Rio, J. A. 1997. Uses and properties of citrus flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 4505-4515.
- Bravo, L. 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance, *Nutrition Reviews*, 56: 317–333.
- Bridle, P.; Timberlake, C.F. 1997. Anthocyanins as natural food colours - Selected aspects, *Food Chemistry*, 58: 103-109.
- Britton, G., Khachik, F. 2009. Carotenoids in food, in *Carotenoids Volume 5: Nutrition and Health*, ed. G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander. pp. 45–66. Birkhäuser Verlag
- Britton, G.; Liaaen-Jesen, S.; Pfander, H. 1995. Carotenoids today and challenges for the future. In: *Carotenoids, Vol 1A: Spectroscopy*, ed. G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander. pp. 13-62. Birkhauser Verlag.
- Camel, V. 2001. Recent extraction techniques for solid matrices - supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls. *Analyst*, 126: 1182-1193.

Castilho, R.O., Kaplan, M.A. 2008. Constituintes químicos de *Licania tomentosa* Benth. (*Chrysobalanaceae*). *Química Nova*, 31: 66-69.

De Rosso, V.V.; Hillebrand, S.; Cuevas Montilla, E.; Bobbio, F.O., Winterhalter, P.; Mercadante, A.Z. 2008. Determination of anthocyanins from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) and açai (*Euterpe oleracea* Mart.) by HPLC-PDA-MS/MS. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21: 291-299.

Degenhardt, A.; Knapp, H.; Winterhalter, P. 2000. Separation and purification of anthocyanins by high-speed countercurrent chromatography and screening for antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 338-343.

Erlund, I. 2004. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research*, 24, 10: 851–874.

Eskilsson, C.S.; Björklund, E. 2000. Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 902: 227-250.

Everette, J.D., Bryant, QM; Green, AM; Abbey, YA; Wangila, GW; Walker, RB. 2010. Thorough Study of Reactivity of Various Compound Classes toward the Folin-Ciocalteu Reagent, *J Agric Food Chem.* 58: 8139–8144.

Faria, A.F.; Marques, M.C.; Mercadante, A.Z. 2011. Identification of bioactive compounds from jambolão (*Syzygium cumini*) and antioxidant capacity evaluation in different pH conditions. *Food Chemistry*, 126: 1571-1578.

Feitosa E.A.; Xavier, H.S.; Randau, K.P. 2012. Chrysobalanaceae: traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 22: 1181-1186.

Ferreira, M. D., Minami, K. 2000. Qualidade de bulbos de cebola em consequência de tratamentos pré-colheita. *Scientia agricola*, 57: 693-701.

- Fossen, T.; Andersen, Ø. M.; Øvstedal, D.O.; Pedersen, A.T.; Raknes, A. 1996. Characteristic Anthocyanin Pattern from Onions and other *Allium* spp. *Journal of Food Science*, 61: 703-706.
- Fossen, T.; Rayyan, S.; Andersen, Ø.M. 2004. Dimeric anthocyanins from strawberry (*Fragaria ananassa*) consisting of pelargonidin 3-glucoside covalently linked to four flavan-3-ols. *Phytochemistry*, 65: 1421-1428.
- Fossen, T.; Slimestad, R.; Andersen, Ø. M. 2003. Anthocyanins with 4'-glucosidation from red onion, *Allium cepa*. *Phytochemistry*, 62: 1367-1374
- Garofulic, I.E.; Dragović-Uzelac, V.; Jambrak, A.R.; Jukić, M. 2013. The effect of microwave assisted extraction on the isolation of anthocyanins and phenolic acids from sour cherry Marasca (*Prunus cerasus* var. Marasca). *Journal of Food Engineering*, 117: 437-442.
- Giusti, M.M.; Ghanadan, H.; Wrolstad, R.E. 1998. Elucidation of the structure and conformation of red radish (*Raphanus sativus*) anthocyanins using one- and two-dimensional nuclear magnetic resonance techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 4858-4863.
- Giusti, M.M.; Jing, P. 2008. Analysis of anthocyanins. In Food Colorants - Chemical and Functional Properties, ed C. Socaciu. pp. 479-506. CRC Press.
- Giusti, M.; Rodríguez-Saona, L.E.; Griffin, D.; Wrolstad, R.E. 1999. Electrospray and tandem mass spectroscopy as tools for anthocyanin characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 4657-4664.
- Gomes, A.; Fernandes, E.; Lima, J.L.F.C.; Mira, L.; Corvo, M.L. 2008. Molecular mechanisms of anti-inflammatory activity mediated by flavonoids. *Current Medicinal Chemistry*, 15: 1586-1605.
- Gross, J. 1991. Chlorophylls and carotenoids in Pigments in vegetables. ed. V. N. Reinhold, pp 75-278, Springer US.

Harborne, J.B.; Williams, C.A. 1995. Anthocyanins and other flavonoids. *Natural Product Reports*, 12: 639-657.

Huang, J.; Zhang, Z. 2004. Microwave-assisted extraction of quercetin and acid degradation of its glycosides in *Psidium guajava* leaves. *Analytical Sciences*, 20: 395-397.

Kaufmann, B.; Christen, P. 2002. Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochemical Analysis*, 13: 105-113.

Kaufmann, B.; Christen, P.; Veuthey, J.L. 2001. Parameters Affecting Microwave-assisted Extraction of Withanolides. *Phytochemical. Analysis*, 12: 327-331.

Kammerer, D.R.; Kramer, M.; Carle, R. 2012 Phenolic compounds, in Food analysis by HPLC, ed. L.M.L. Nollet, F. Toldra. pp. 717–756. CRC Press.

Kris-Etherton, P. M., Hecker, K.D., Bonanome, A., Coval, S.M., Binkoski, A.E., Hilpert, K.F., Griel, A.E., Etherton, T.D. 2002. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American Journal of Medicine*, Volume 113: 71-88.

Lee, J. H.; Kang, N. S.; Shin, S. O.; Shin, S. H.; Lim, S. G.; Suh, D. Y.; Baek, I. Y.; Park, K. Y.; Ha, T. J. 2009. Characterisation of anthocyanins in the black soybean (*Glycine max* L.) by HPLC-DAD-ESI/MS analysis. *Food Chemistry*, 112: 226-231.

Leite-Legatti, A. V.; Batista, A. G.; Dragano, N. R. V.; Marques, A. C.; Malta, L. G.; Riccio, M. F.; Eberlin, M. N.; Machado, A. R. T.; Carvalho-Silva, L. B.; Ruiz, A. L. T. G.; Carvalho, J. E.; Pastore, G. M.; Maróstica, M. R. 2012. Jaboticaba peel: Antioxidant compounds, antiproliferative and antimutagenic activities, *Food Research International*, 49: 596-603.

Liaqid, A.; Guerrero, R.F.; Cantos, E.; Palma, M.; Barroso, C.G. 2011. Microwave assisted extraction of anthocyanins from grape skins. *Food Chemistry*, 124: 1238-1243.

Lidström, P.; Tierney, J.; Wathey, B.; Westman, J. 2001. Microwave assisted organic synthesis – a review. *Tetrahedron*, 57: 9225-9283.

Mavandadi, F. 2007. Microwave Technology in Process Optimization. In: *Process Chemistry in the Pharmaceutical Industry, Volume 2 Challenges in an Ever Changing Climate*, ed. K. Gadamasetti; T. Braish. pp. 403-426, CRC Press, Boca Raton.

Mercadante, A.Z; Bobbio, F.O. 2008. Anthocyanins in foods: Occurrence and physicochemical properties. In: *Food colorants: Chemical and functional properties*, ed. C. Socaciu. pp.195-299. CRC Press.

Mota, W.F.; Salomao, L.C.C.; Pereira, M.C.T.; Cecon, P.R. 2002. Influência do tratamento pós-colheita com cálcio na conservação de jabuticabas. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 24: 49-52.

Ng, A.; Parker, M.L.; Parr, A.J.; Saunders, P.K.; Smith, A.C.; Waldron, K.W. 2000. Physicochemical Characteristics of Onion (*Allium cepa* L.) Tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 5612-5617.

Olsson, M.E.; Gustavsson, K.E.; Vågen, I.M. 2010. Quercetin and Isorhamnetin in Sweet and Red Cultivars of Onion (*Allium cepa* L.) at Harvest, after Field Curing, Heat Treatment, and Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 2323-2330.

Paré J.R.J.; Bélanger, J.M.R.; Stafford, S.S. 1994. Microwave-assisted process (MAP): a new tool for the analytical laboratory. *Trends Analytical Chemistry*, 13: 176-184.

Prior, R.; Wu, X. 2005. Schaich, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, 4290– 4302.

Revilla, E.; Ryan, J.M.; Martín-Ortega, G. 1998. Comparison of Several Procedures Used for the Extraction of Anthocyanins from Red Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 4592–4597.

Routray, W.; Orsat, V. 2012. Microwave-Assisted Extraction of Flavonoids: A Review. *Food and Bioprocess Technology*, 5: 409-424.

Reynertson, K.A.; Wallace, A.M.; Adachi, S.; Gil, R.R.; Yang, H.; Basile, M.J.; D'Armiento, J.; Weinstein, B.; Kennelly, E.J. 2006. Bioactive Depsides and Anthocyanins from Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*). *Journal of Natural Products*, 69: 1228-1230.

Reynertson, K.A.; Yang, H.; Jiang, B.; Basile, M.J.; Kennelly, E.J. 2008. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. *Food Chemistry*, 109: 883–890.

Sousa de Brito, E.; Pessanha de Araujo, M.C.; Alves, R.E.; Carkeet, C.; Clevidence, B.A.; Novotny, J.A. 2007. Anthocyanins present in selected tropical fruits: Acerola, jambolão, jussara, and guajiru. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 9389-94.

Takeoka, G. Dao, L. 2002. Anthocyanins in Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals, ed. W . Jeffrey Hurst, pp. 247-270. CRC Press.

Teng, H.; Lee, W.Y.; Choi, Y.H. 2013. Optimization of microwave assisted extraction for anthocyanins, polyphenols and antioxidants from raspberry (*Rubus coreanus* Miq.) using response surface methodology. *Journal of Separation Science*, 36: 3107–3114.

Torskangerpoll, K.; Andersen, Ø.M. 2005. Colour stability of anthocyanins in aqueous solutions at various pH values. *Food Chemistry*, 89: 427-40.

Trevisan, L. M.; Bobbio, F. O.; Bobbio, P. A. 1972. Carbohydrates, organic acids, and anthocyanins of *Myrciaria jaboticaba*. *Journal of Food Science*, 37: 818-19.

Veggi, P.C.; Martinez, J.; Meireles, M.A.A. 2012. Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds. In: *Fundamentals of Microwave Extraction. Food Engineering Series*, ed. F. Chemat; G. Cravotto, pp. 15-52.

Weedon, B.C.L.; Moss, G.P. 1995. Structure and nomenclature. In: Carotenoids, Vol 1A: Spectroscopy, ed. Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. Birkhauser, pp. 13-62.

Wen, Y.; Chen, H.; Zhou, X.; Deng, Q.; Zhao, Y.; Zhao, C.; Gong, X. 2015. Optimization of the microwave-assisted extraction and antioxidant activities of anthocyanins from blackberry using a response surface methodology. *RSC Advances*, 5: 19686–19695.

Whitehead, A., Mares, J.A.; Danis, R.P. (2006). Macular Pigment: A Review of Current Knowledge. *Archives of Ophthalmology*, 124:1038-1045.

Wu, S.; Dastmalchi, K.; Long, C.; Kennelly, E.J.. 2012. Metabolite Profiling of Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) and Other Dark-Colored Fruit Juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60: 7513-7525.

Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E., Prior, R.L. 2006. Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 4069-4075.

Wu, X., Gu, L., Prior, R.L., McKay, S. 2004. Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of *Ribes*, *Aronia*, and *Sambucus* and their antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 7846–7856.

Yang, Z.; Zhai, W. 2010. Optimization of microwave-assisted extraction of anthocyanins from purple corn (*Zea mays* L.) cob and identification with HPLC–MS. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11: 470–476.

Zanatta, C.F., Mercadante, A.Z. 2007. Carotenoid composition from the Brazilian tropical fruit camu–camu (*Myrciaria dubia*). *Food Chemistry*, 101: 1526–1532.

Zhang, F., Yang, Y., Su, P. and Guo, Z. 2009. Microwave-assisted extraction of rutin and quercetin from the stalks of *Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb. *Phytochemical Analysis*, 20: 33-37.

Zou, T.; Wang, W.; Gou, H.; Zhu, Y.; Luo, X.; Liu, F.; Ling, W. 2012. Optimization of microwave assisted extraction of anthocyanins in extract using HPLC-ESI-MS. *Journal of Food Science*, 71: 46–50.

.

CAPITULO II

IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE FRUTOS DE GUAJIRU (*Chrysobalanus icaco* L.)

Marcella C. Marques, Lilian R.B. Mariutti, Adriana Z. Mercadante

Os dados contidos neste capítulo foram submetidos como parte do artigo *Chrysobalanus icaco* L fruits inhibit NADPH oxidase complex and protect DNA against doxorubicin induced damage in Wistar male rats à *Journal of Toxicology and Environmental Health*

IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE FRUTOS DE GUAJIRU (*Chrysobalanus icaco* L.)

Resumo

Compostos fenólicos e carotenoides são compostos bioativos amplamente distribuídos em plantas superiores e estão relacionados à prevenção de algumas doenças crônico-degenerativas. Alguns destes compostos são pigmentos responsáveis pela cor de flores, vegetais e frutos também estão relacionados à prevenção de algumas doenças crônico-degenerativas. O *Chrysobalanus icaco* L., conhecido como guajiru, possui casca de cor roxa intensa, devido à presença de antocianinas, e embora pouco explorado, apresenta um grande potencial como fonte de compostos bioativos. Os carotenoides, compostos fenólicos e as antocianinas de guajiru foram identificados por HPLC-DAD- MSⁿ. Os elevados teores de antocianinas monoméricas da fruta (1015 ± 69 mg equivalente de cianidina 3-glucosídeo/100 g de fruta liofilizada) e a capacidade redutora (1055 ± 83 mg equivalente de ácido gálico/100 g de fruta liofilizada) confirmam o grande potencial comercial da fruta. Os carotenoides foram estudados pela primeira vez em guajiru, sendo a all-*trans*-luteína ($188,64 \pm 9,36$ µg de luteína/100g fruta liofilizada) o carotenoide majoritário. O perfil antociânico foi marcado pela presença de diferentes antocianidinas, delfinidina, petunidina, cianidina e peonidina, com petunidina 3-glucosídeo + delfinidina 3-(6''-acetil)galactosídeo ou delfinidina 3-(6''-oxalil)arabinosídeo como o pico mais intenso. Os compostos fenólicos não antociânicos foram identificados como derivado de ácido elágico, miricetina pentosídeo e derivado de quercetina.

Palavras chave: compostos biativos, antocianinas, compostos fenólicos, carotenoides, guajiru.

1. INTRODUÇÃO

Os carotenoides são pigmentos lipossolúveis encontrados no reino vegetal, animal e em microrganismos. Estes pigmentos apresentam coloração variando entre amarelo e vermelho. Apenas as plantas superiores e microrganismos são capazes de sintetizar esses pigmentos, enquanto que nos animais, a presença de carotenoides deve-se à sua ingestão por meio da dieta (Britton et al., 1995).

Os compostos fenólicos são importantes metabólitos secundários encontrados em frutas e vegetais e são classificados de acordo com a sua estrutura em várias classes, entre elas, ácidos fenólicos, como o ácido elágico e o ácido gálico, e os flavonoides, tais como as antocianinas e os flavanóis (Andersen e Jordheim, 2006). As antocianinas, com mais de 500 estruturas identificadas na natureza, são o mais numeroso grupo dentre os flavonoides e são responsáveis pela coloração azul, vermelha, violeta e púrpura em flores, raízes e frutos (Giusti e Jing, 2008).

A cor das antocianinas depende diretamente das condições de pH do meio, devido à mudança na concentração das quatro espécies em equilíbrio: cátion flavilium, bases quinonoidais, hemiacetais e chalconas. A estrutura das antocianinas permite uma variação nas cargas da molécula, o que altera o tamanho do cromóforo e, por conseguinte, gera uma variação de cor (Andersen e Jordheim, 2006).

Os compostos fenólicos, incluindo as antocianinas, constituem uma das classes de antioxidantes mais conhecidas e estudadas, recebendo muita atenção pois algumas pesquisas epidemiológicas têm associado o consumo de alimentos ricos em polifenóis com a redução do risco de câncer e de doenças degenerativas (Erlund, 2004). Cabe lembrar que quantidades significativas de compostos fenólicos são rotineiramente consumidas através da dieta humana. A funcionalidade destes compostos está correlacionada com suas ações inibidoras ou ativadoras de uma larga variedade de sistemas enzimáticos, como quelantes de metais ou como desativadores de radicais livres (Harborne et al., 1995).

A determinação da capacidade redutora é comumente utilizada como método de determinação de compostos fenólicos totais. Esse método colorimétrico é baseado na capacidade de doação de prótons para o molibdênio presente no reagente de Folin-Ciocalteu (Singleton e Rossi, 1965). Os compostos fenólicos são compostos notoriamente conhecidos por sua capacidade de ser oxidado doando

prótons. No entanto, outros compostos possuem a mesma habilidade, sendo capazes de reagir com o reagente de Folin-Ciocalteu, tais como vitamina C, vitamina A, tirosina, triptofano e cisteína, dentre outros (Singleton e Rossi, 1965).

O guajiru (*Chrysobalanus icaco* L.) é uma fruta nativa da região costeira tropical e subtropical Atlântica, e ocorre desde a Florida nos Estados Unidos até o sudeste do Brasil. Esta espécie também é conhecida por abajeru, ajiru ou *coco plum*. As folhas são utilizadas no preparo de chás, que são popularmente utilizados como hipoglicêmicos (Feitosa et al., 2012) e contra diarreia, disenteria e leucorreia (Adonizio et al., 2006). Os frutos de guajiru possuem sabor levemente doce e podem ser consumidos *in natura* ou, mais raramente, na forma de compotas e geleias. As frutas possuem formato ovóide, polpa de cor branca leitosa, uma semente central volumosa e a casca tem coloração variando desde rosa a roxa escura, quase negra, devido à presença de antocianinas (Sousa de Brito et al., 2007).

As antocianinas de guajiru preto já foram tentativamente identificadas, como as mono glicosiladas: delfinidina 3-hexosídeo e petunidina 3-hexosídeo; e as aciladas: delfinidina 3-(6''-acetil)galactosídeo, petunidina 3-(6''-acetil) galactosídeo, delfinidina 3-(6''-acetil) glucosídeo, delfinidina 3-(6''-succinil) ramnosídeo, petunidina 3-(6''-acetil) glucosídeo, petunidina 3-(6''-succinil) ramnosídeo e peonidina 3-(6''-succinil) ramnosídeo (Sousa de Brito et al., 2006). No entanto, a identidade dos açúcares ligados às antocianinas de guajiru não foi confirmada.

Em relação aos flavonoides não antociânicos, não foram encontrados estudos de caracterização em frutos de guajiru. Apenas miricetina e ácido pomólico foram identificados em folhas de guajiru (Feitosa et al., 2012).

O extrato aquoso de folhas de guajiru apresentou ação antígeno-tóxica. No entanto os compostos presentes neste extrato não foram identificados, assim não foi possível descrever o mecanismo dessa atividade (Presta et al., 2007). Extratos de folhas de guajiru em hexano, acetato de etila, metanol, butanol e diclorometano apresentaram atividade antimicrobiana frente ao *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*. Os extratos testados foram caracterizados e o composto majoritário em cada extrato foi, respectivamente, estigmasterol, sitosterol, campesterol, 7-O-metilcaemferol e ácido pomólico (Castilho e Kaplan, 2012). O ácido pomólico isolado a partir do extrato de folhas de *C. icaco* também apresentou atividade citotóxica frente a células tumorosas de leucemia, tanto para linhagens

sensíveis quanto para linhagens resistentes a múltiplas drogas (Fernandes et al., 2003).

Os carotenoides e compostos fenólicos não antociânicos de frutos de guajiru ainda não foram investigados. Assim, o trabalho tem como objetivo caracterizar os compostos bioativos de guajiru preto, tais como antocianinas, carotenoides e compostos fenólicos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Reagentes e padrões

Os reagentes de grau p.a. foram adquiridos da Labsynth (São Paulo, Brasil). Os solventes e reagentes grau cromatográfico (HPLC) foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha) e da Mallinckrodt Baker (Phillipsburg, EUA). A água ultra pura obtida utilizando sistema Milli-Q (Millipore, Billerica, EUA). Para as análises cromatográficas, as amostras e os solventes foram filtrados utilizando, respectivamente, membranas de 0,22 e 0,45 µm (Millipore, Billerica, EUA). Os padrões de ácido gálico, cianidina 3-glucosídeo, delphinidina 3-glucosídeo, peonidina 3-glucosídeo e petunidina 3-glucosídeo foram adquiridos de Extrasynthèse (Lyon Nord, França). A resina Amberlite-XAD 7 foi adquirida da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA).

2.2. Amostra

Os frutos maduros de guajiru preto *in natura*, aproximadamente 5 kg, foram coletados na praia do Farol (1° 7' 59.98" S, 48° 27' 33.98" W), na cidade de Belém (PA), em janeiro de 2011. Após transporte aéreo para o laboratório, uma porção de 100 g dos frutos inteiros foi reservada para análises físico-químicas. O restante teve a semente separada da polpa, que juntamente com a casca foram imediatamente congeladas através da imersão em nitrogênio líquido e liofilizadas (Liotop L101, Liobras, São Paulo, Brasil). A polpa liofilizada foi homogeneizada em multiprocessador doméstico, embalada a vácuo, e armazenada em freezer a -36°C até análise. Parte desta amostra liofilizada foi enviada para o Laboratório de

Nutrigenômica, do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP, onde foram realizadas análises do efeito protetor do DNA *in vivo* frente a dano induzido por doxorubicina.

2.3. Caracterização físico-química dos frutos

A altura e o diâmetro dos frutos foram medidos com paquímetro (n=15). As massas do fruto inteiro e da polpa e casca foram medidas em balança analítica (n=15). A umidade foi determinada através da secagem em estufa a 105 °C (n=3, AOAC, 1997). A composição centesimal da polpa liofilizada foi determinada no Laboratório Central do Departamento de Alimentos e Nutrição. A umidade da polpa liofilizada foi determinada em estufa a vácuo 70 °C até peso constante, o teor de cinzas foi determinado em mufla a 680 °C até peso constante, teor de lipídeos totais foi obtido pelo método de Bligh & Dyer (Bligh, e Dyer, 1959), o teor de proteínas pelo método de Kjeldahl utilizando fator 6,24 para cálculo (Kjeldahl, 1883), e o teor de carboidratos foi calculado por diferença.

2.4. Análise de antocianinas

2.4.1. Determinação de antocianinas monoméricas

Os extratos de antocianinas foram preparados, em triplicata, a partir de 50 mg de polpa liofilizada. A extração foi realizada com solução de metanol contendo 1% ácido clorídrico em repouso, sob refrigeração por dezesseis horas (Degenhardt et al., 2000). O sobrenadante foi separado por filtração, e a amostra foi submetida à nova extração sob refrigeração por 4 h, este procedimento foi repetido mais 2 vezes (Degenhardt et al., 2000). Os filtrados foram combinados e concentrado em evaporador rotativo até eliminação do metanol. O extrato concentrado foi suspenso em água ultrapura (Millipore) contendo 1% de ácido clorídrico em balão volumétrico de 10 mL.

As antocianinas monoméricas foram determinadas pelo método de pH diferencial (Lee et al., 2005), com medida da absorbância do extrato diluído em duas diferentes condições de pH. Após a determinação do fator de diluição, foram

preparadas duas soluções do extrato em tampão pH 1 e pH 4, foi aguardado o equilíbrio e a absorbância das soluções foi medida, respectivamente, nos comprimentos de onda de 520 e 700 nm em espectrofotômetro Agilent 8453 (Santa Clara, EUA). O resultado foi expresso em mg de equivalente de cianidina 3-glucosídeo/100g de fruta liofilizada.

2.4.2. Identificação de antocianinas

O extrato concentrado, obtido a partir de 0,5 g de polpa liofilizada conforme descrito acima, foi suspenso em água ultrapura (Millipore) contendo 1% de ácido clorídrico em balão volumétrico de 25mL. Uma alíquota de 15 g deste extrato foi diluída com 55 mL de solução aquosa de 10% de ácido fórmico. O extrato diluído foi então particionado três vezes em um funil de separação com 150 mL de acetato de etila e a fase aquosa foi recolhida. Para retirada de açúcares, a fase aquosa foi aplicada em coluna aberta de 25 x 3 cm recheada com resina Amberlite-XAD 7 (Sigma-Aldrich), seguido de lavagem com 1 L de água ultrapura. A eluição das antocianinas foi realizada com 500 mL de solução de metanol/ácido acético (19:1, v/v) (Degenhardt et al., 2000). O eluato foi liofilizado e armazenado a -36 °C até a análise.

Imediatamente antes da análise por HPLC-DAD-MS/MS, o extrato liofilizado foi suspenso na solução idêntica à fase móvel na condição inicial (90:10 de água/metanol ambos acrescidos de 5% de ácido fórmico) e filtrado em membrana 0,22 µm (Millipore).

A identificação das antocianinas foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada aos detectores de arranjo de diodos (modelo LC-20AD, Shimadzu, Japão) e ao espectrômetro de massas equipado com analisador de massa/carga *ion trap* (Amazon Speed, Bruker Daltonics, Alemanha). A separação foi realizada em uma coluna C₁₈ Luna (5µm, 250 mm x 4,6 mm, Phenomenex, EUA) utilizando como fase móvel um gradiente linear de água/metanol, ambos acrescidos de 5% de ácido fórmico, de 90:10 para 60:40 em 20 min, seguindo para 20:80 em 15 min e mantendo esta proporção por mais 5 min (Faria et al., 2011). O fluxo foi de 0,9 mL/min e a temperatura da coluna foi mantida em 29 °C (Faria et al., 2011). Os

espectros UV-visível foram adquiridos na faixa de 200 a 600 nm, e os cromatogramas foram processados a 520 nm.

Após a passagem pelo detector DAD, o fluxo foi dividido de forma que apenas 0,15 mL/min entrassem na fonte de ionização. A ionização foi realizada por *eletrospray* (ESI) no modo positivo e os parâmetros foram ajustados em: voltagem no capilar de 2,5 kV; voltagem de saída no capilar de 95,2 kV; energia de fragmentação de 1,2 V; temperatura do gás secante (N₂) foi de 350 °C, com fluxo de 8 L/min; nebulizador a 30 psi; *endplate offset* -500 V. Os espectros de massas foram adquiridos na faixa de valores de *m/z* entre 100 e 1000 e o MS/MS foi adquirido no modo automático com energia de fragmentação MS/MS de 1,2 V (Faria et al., 2011).

A identificação das antocianinas foi realizada com base na combinação dos seguintes parâmetros: ordem de eluição em coluna de fase reversa e características dos espectros de UV-vis e de massas em comparação com dados disponíveis na literatura (Wu e Prior, 2005; Sousa de Brito et al., 2007 ; Faria et al., 2011).

2.5. Compostos fenólicos não antociânicos

Os compostos fenólicos da polpa liofilizada foram extraídos utilizando solução de metanol:água (80:20 v/v) sob agitação em vortex por 5 min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi separado por centrifugação (Allegra 64R, Beckman Coulter, EUA) a 22000 *g*, por 5 min a 20 °C e coletado; a extração foi repetida mais 4 vezes (Rodrigues et al., 2013). Os sobrenadantes foram combinados, seguido de concentração em evaporador rotativo. O extrato de compostos fenólicos foi transferido para um balão volumétrico e o volume foi completado com água ultrapura. O extrato foi armazenado a -80 °C até análises posteriores.

Utilizando o equipamento descrito anteriormente, os compostos fenólicos foram separados em coluna C₁₈ Synergi HydroRP (4 µm, 250 mm × 4.6 mm, Phenomenex), utilizando como fase móvel um gradiente linear de água/metanol com 2 % (v/v) de ácido fórmico, de 93:7 para 86:14 em 25 min, seguindo para 80:20 em 10 min, para 70:30 em 7 min, para 20:80 em 13 min e mantendo esta proporção por 3 min com vazão de 0,9 mL/min e temperatura da coluna de 29°C (Chisté e Mercadante, 2012). Os espectros UV-visível foram adquiridos na faixa de 200 a 600

nm, e os cromatogramas foram processados nos comprimentos de onda de 280, 320 e 360 nm.

No espectrômetro de massas descrito no item 2.4.2 foi utilizada a fonte de ionização ESI, tanto no modo positivo quanto no modo negativo, com voltagem no capilar de 2,5 e 1,5 kV, respectivamente, e voltagem na saída do capilar de 120 V. Em ambos os modos as condições gerais foram: endplate offset -500 V, temperatura do gás de secagem (N_2) 325 °C e fluxo de 0,8 ml/min, nebulizador a 30 psi (Chisté e Mercadante, 2012). O MS^n foi adquirido no modo automático, aplicando energia de fragmentação de 1,2 V. A faixa de varredura para os espectros de massas foi de m/z 100 a 1000 (Chisté e Mercadante, 2012).

A identificação dos compostos fenólicos foi realizada com base na combinação dos seguintes parâmetros: ordem de eluição em coluna de fase reversa e características dos espectros de UV-vis e de massas em comparação com dados disponíveis na literatura (Rodrigues et al., 2013; Chisté e Mercadante, 2012; Faria et al., 2011).

2.6. Determinação da capacidade redutora

A capacidade redutora no extrato rico em compostos fenólicos obtido como descrito no item 2.5, foi determinada através da reação com o reagente de Folin-Ciocalteu, seguida de medida de absorbância em leitor de micro placas Synergy Mx (Biotek, USA) a 765nm (Singleton e Rossi, 1965, Vissotto et al., 2013). A reação foi conduzida em um volume final de 300 μ L tendo os seguintes reagentes: 150 μ L de água ultrapura, 25 μ L do extrato, 25 μ L do reagente Folin-Ciocalteu e 100 μ L de carbonato de sódio (7%). A quantificação foi realizada a partir de uma curva analítica com ácido gálico, nas concentrações de 12,5 a 150 $mg.L^{-1}$. Os resultados foram expressos em mg de equivalente a ácido gálico (GAE) g^{-1} de amostra seca.

2.7. Determinação de carotenoides

A extração de carotenoides da polpa liofilizada foi realizada por maceração em almofariz, utilizando acetona como solvente de extração. O extrato foi filtrado a vácuo em funil de Buchner e o retido foi submetido à nova maceração, esse

procedimento foi repetido até que o extrato separado por filtração estivesse incolor (Mercadante et al., 1997). Os filtrados foram combinados, transferido para uma mistura de éter de petróleo e éter etílico (1:1, v/v) e lavado com água até retirada da acetona. O extrato etéreo foi saponificado com 10% KOH em metanol por 16 h e em seguida foi lavado até completa eliminação do álcali (Mercadante et al., 1997). O extrato foi então concentrado em evaporador rotativo ($T < 40\text{ }^{\circ}\text{C}$), seco em N_2 e armazenado em freezer a $-36\text{ }^{\circ}\text{C}$ até as análises. A extração foi realizada em triplicata.

Os carotenoides foram separados em coluna C_{30} YMC (Waters, EUA), usando como fase móvel um gradiente linear de metanol/éter metil *terc*-butílico (MTBE) de 95:5 para 70:30 em 30 min, seguindo para 50:50 em 20 min, com fluxo de 0,9 mL/min e temperatura da coluna de $29\text{ }^{\circ}\text{C}$ (De Rosso e Mercadante, 2007a). Os espectros de absorção UV-visível foram adquiridos entre 250 e 650 nm e os cromatogramas foram processados em 280, 350 e 450 nm.

A identificação dos carotenoides foi realizada com base nos resultados combinados dos seguintes parâmetros: ordem de eluição na coluna C_{30} , características dos espectros UV-visível $\lambda_{\text{máx}}$, estrutura fina (%III/II) e intensidade do pico *cis* (% $A_{\text{B}}/A_{\text{II}}$) e de massas, comparando com padrões analisados nas mesmas condições e com informações disponíveis na literatura (De Rosso e Mercadante, 2007a).

No espectrômetro de massas descrito no item 2.4.2, foi utilizada fonte de ionização química a pressão atmosférica (APCI), operando no modo positivo, com as seguintes condições: corrente de 4,0 μA , temperatura da fonte de 450°C , temperatura do gás de secagem (N_2) 350°C e fluxo de $5\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, nebulizador a 60 psi. O espectro de MS^2 foi adquirido no modo automático, aplicando energia de fragmentação de 1,4 V. A faixa de varredura para os espectros de massas foi de m/z 100 a 700 (Chisté e Mercadante, 2012).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização do fruto

Os frutos de maduros de guajiru são pequenos, com altura de $23,33 \pm 1,65$ mm e diâmetro de $18,25 \pm 1,80$ mm. A fração comestível constituída pela combinação de polpa + casca apresentou massa média de $2,73 \pm 0,54$ g e umidade de $81,85 \pm 1,48$ g/100g, representando cerca de 60% da fruta inteira ($4,65 \pm 0,78$ g).

A polpa liofilizada de guajiru é constituída principalmente de carboidratos (90,6%, Figura 1) e apresenta baixos teores de proteínas (2,0%) e lipídeos (1,5%).

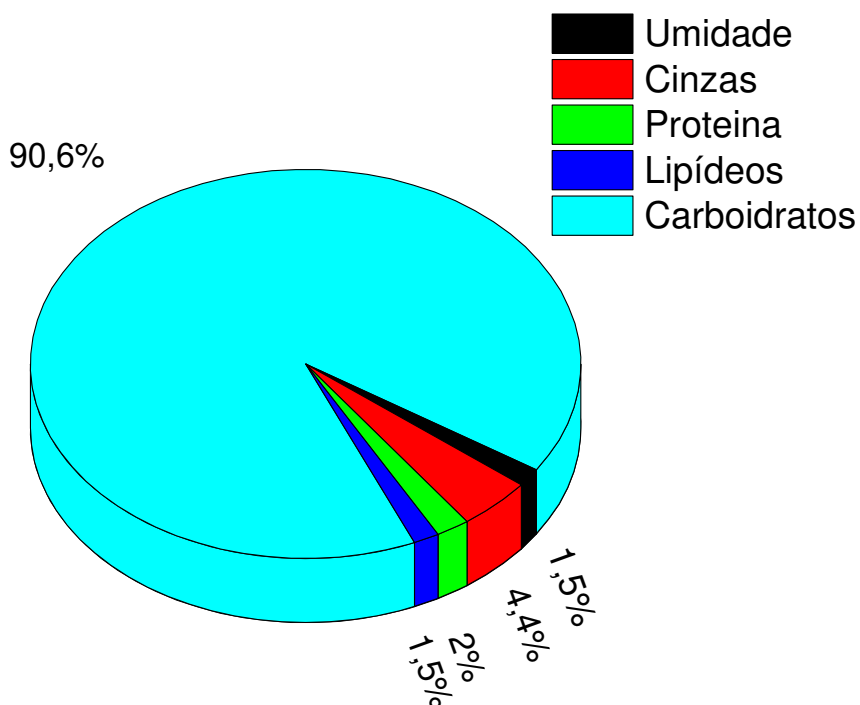


Figura 1: Composição centesimal de polpa liofilizada de guajiru preto.

3.2. Antocianinas monoméricas e capacidade redutora

O teor de antocianinas monoméricas encontrado em guajiru preto (1014,72 mg equivalente a cianidina-3-glucosídeo/100 g de fruta liofilizada) apresentado na é próximo ao valor descrito na literatura, 958 mg de equivalente a cianidina-3-glucosídeo/100 g de fruta liofilizada, para a fruta coletada no estado no Ceará

(Sousa de Brito et al., 2007). Esse valor também é próximo ao teor encontrado em outras frutas tropicais, tais como jambolão 211 mg de equivalente a cianidina-3-glucosídeo/100 g de fruta fresca (Faria et al., 2011), grumixama (*Eugenia brasiliensis*) 837 mg de equivalente a cianidina-3-glucosídeo/100 g e lipote (*Syzygium currani*) 1210 mg de equivalente a cianidina-3-glucosídeo/100 g, ambos em base seca (Reynertson et al., 2008).

Por outro lado, o guajiru apresentou maiores teores de antocianinas do que outras frutas tropicais como jabuticaba (*M. cauliflora*) e *M. vexator*, que apresentaram 278 e 684 mg de equivalente de cianidina-3-glucosídeo /100 g de fruta liofilizada, respectivamente. As frutas tropicais acima citadas foram alvo de estudos devido à presença de compostos fenólicos e antocianinas e capacidade antioxidante (Reynertson et al., 2006; Reynertson et al., 2008; Dastmalchi et al., 2012).

No entanto, o guajiru apresentou capacidade redutora (1055 ± 83 mg de equivalente a ácido gálico/100 g de fruta liofilizada) muito inferiores aos valores encontrados na literatura para outros frutos tropicais como jambolão, jabuticaba, camu-camu, grumixama, pequiá, cubiu, banana, cacuri e buriti (Reynertson et al., 2008; Barreto et al., 2009; Faria et al., 2011). Esse resultado pode estar relacionado ao baixo teor de compostos fenólicos não antociânicos.

3.3. Carotenoides de guajiru

Foram separados 6 carotenoides de guajiru em coluna C_{30} (Figura 2), que foram identificados com base nas características dos espectros UV-vis e de massas e comparação com padrões (Tabela 1). Os experimentos de MS/MS permitiram a confirmação da molécula protonada $[M+H]^+$ dos carotenoides.

Tabela 1: Características cromatográficas e dos espectros UV-Vis e de espectrometria de massas, obtidas por HPLC-DAD-MS/MS, dos carotenoides de guajiru.

Pico ^a	Carotenoide	t _R (min) ^b	λ _{max} (nm) ^c	%III/II	%A _B /A _{II}	[M+H] (m/z)	Íons Fragmentos(m/z)	Concentração (µg/100g polpa liofilizada)
1	all- <i>trans</i> -violaxantina ^{d,i}	7,5 – 7,6	415, 438, 468	88	0	601	583 [M+H-18] ⁺ , 565 [M+ H-18- 18] ⁺ , 509 [M+H-92] ⁺ , 491 [M+H-92-18] ⁺	75,76 ± 8,64
2	9'- <i>cis</i> - neoxantina ^{e,j}	8,8 – 8,9	418, 440, 467	64	7	601	583 [M+ H-18] ⁺ , 565 [M+ H-18-18] ⁺ , 509 [M+H- 2] ⁺ , 491 [M+H-92-18] ⁺	99,80 ± 10,93
3	9- <i>cis</i> -violaxantina ^{d,j}	10,6 – 10,8	325, 415, 435, 463	64	9	601	583 [M + H - 18] ⁺ , 565 [M + H - 18 - 18] ⁺ , 491 [M + H - 92 - 18] ⁺	76,72 ± 13,39
4	all- <i>trans</i> -luteína ^{f,i}	12,5 – 12,6	420, 443, 471	60	0	569	551 [M + H - 18] ⁺ , 533 [M + H - 18 - 18] ⁺ , 495 [M + H - 18 - 56] ⁺ , 477 [M + H - 92] ⁺	188,64 ± 9,36
5	all- <i>trans</i> -zeaxantina ^{g,i}	14,6 – 14,9	425, 450, 476	40	0	569	551 [M + H - 18] ⁺ , 533 [M + H - 18 - 18] ⁺ , 495 [M + H - 18 - 56] ⁺ , 477 [M + H - 92] ⁺	51,59 ± 5,06
6	all- <i>trans</i> -β-caroteno ^{h,i}	33,4 – 33,5	425, 451, 478	33	0	537	444 [M - 92] ⁺	79,21 ± 12,37
Total								571 ± 21

^a Numerado de acordo com o cromatograma apresentado na Figura 2

^b Intervalo de tempo de retenção em coluna C₃₀ YMC (5 µm, 250 mm × 4.6 mm, Waters, USA)

^c Gradiente linear de metanol/MTBE, de 95:5 a 70:30 em 30 min, então a 50:50 em 20 min, com essa proporção foi mantida por 5 min

Compostos quantificados como equivalente de all-*trans*-violaxantina^d, 9'-*cis*- neoxantina^e, all-*trans*-luteína^f, all-*trans*-zeaxantina^g and all-*trans*-β-caroteno^h

ⁱ Identificado com padrão

^j Tentativamente identificado

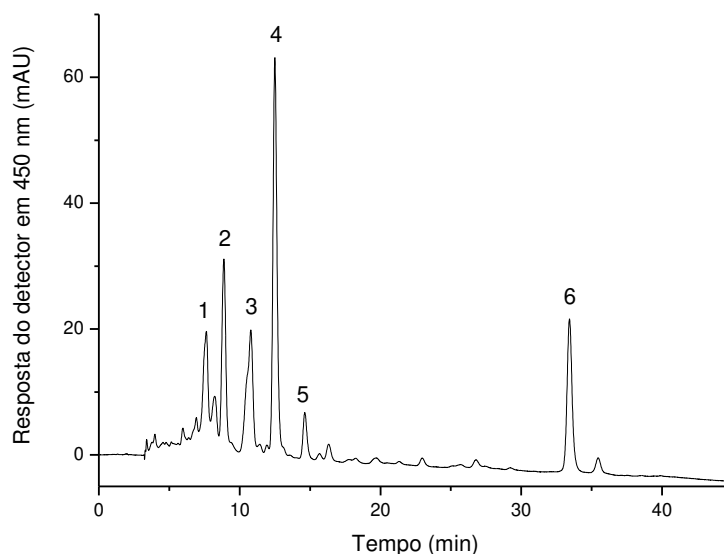


Figura 2: Cromatograma, obtido por HPLC-DAD, dos carotenoides de guajiru. Picos identificados de acordo com a Tabela 1. 1: all-*trans*-violaxantina, 2: 9'-*cis*-neoxantina, 3: 9-*cis*-violaxantina, 4: all-*trans*-luteína, 5: all-*trans*-zeaxantina, 6: all-*trans*-β-caroteno.

Todos os carotenoides identificados apresentam grupos hidroxilas, com exceção do all-*trans*-β-caroteno (pico 6). Como era esperado para coluna de fase reversa, este caroteno apresentou um tempo de retenção maior que o das xantofilas. Os carotenoides all-*trans*-violaxantina (pico 1), 9'-*cis*-neoxantina (picos 2) e 9-*cis*-violaxantina (pico 3), e all-*trans*-β-caroteno (pico 6) apresentaram espectros de UV-vis e de massas (Figura 3) similares aos encontrados na literatura (Britton, 1995; Chisté e Mercadante, 2012; Rodrigues et al., 2013). A identificação desses compostos foi confirmada pela comparação com padrões.

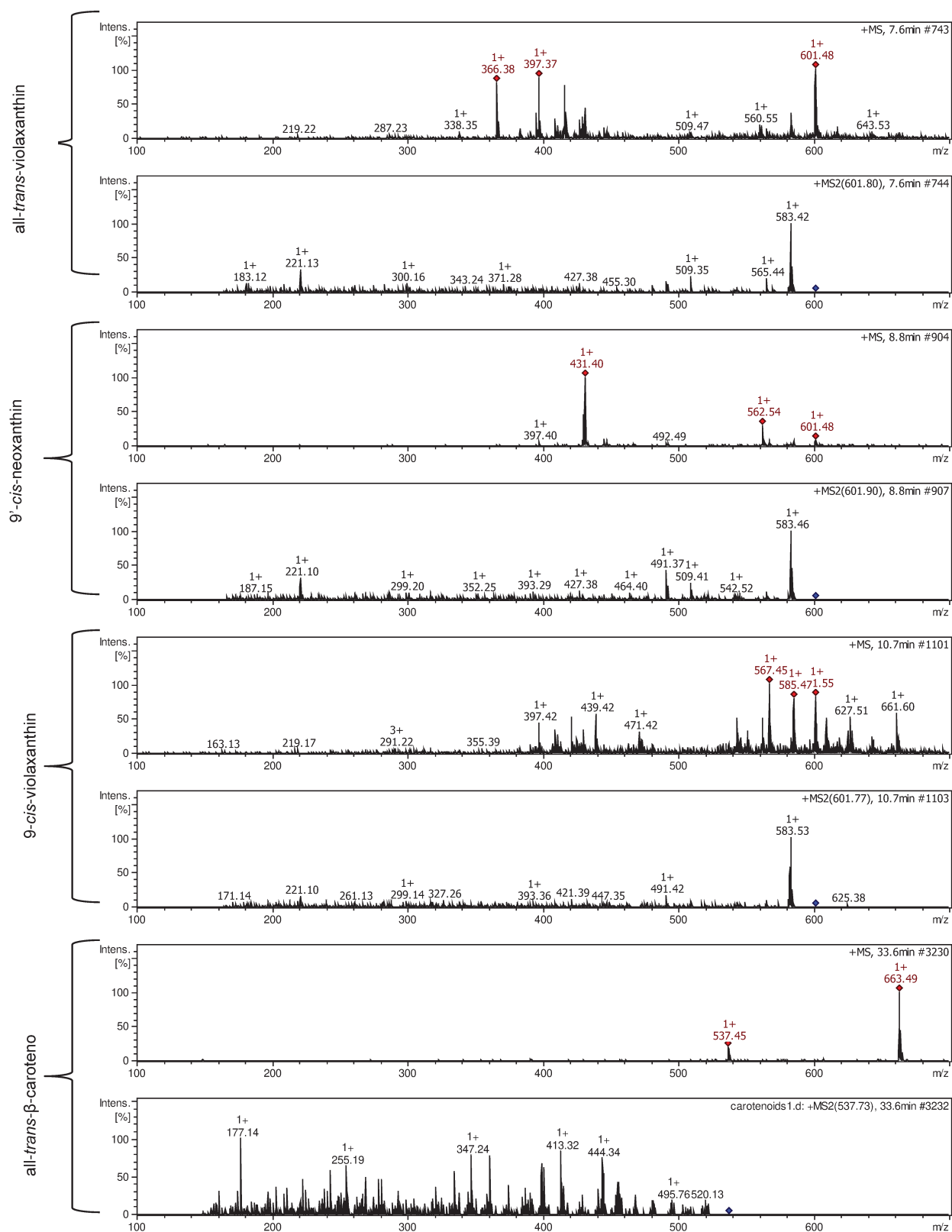


Figura 3: Espectros MS e MS/MS dos carotenoides *all-trans*-violaxantina (pico 1), *9'-cis*-neoxantina (picos 2), *9-cis*-violaxantina (pico 3) e *all-trans*-β-caroteno (pico 6).

A *all-trans*-luteína (pico 4) e *all-trans*-zeaxantina (pico 5) apresentam a mesma fórmula molecular ($C_{40}H_{56}O_2$), e portanto a mesma molécula protonada $[M+H]$ (m/z em 569). No entanto, estruturalmente esses compostos são diferentes (Figura 4), a luteína possui 10 ligações duplas conjugadas (l.d.c.), um anel β e um anel ϵ , cada um dos anéis com uma hidroxila, sendo que no anel ϵ a hidroxila está alílico à ligação dupla não conjugada ao sistema poliênico. Enquanto a zeaxantina possui dois anéis β , cada um com uma hidroxila e uma ligação dupla conjugada à cadeia poliênica, possuindo ao todo 11 l.d.c. Como esperado, a luteína apresentou espectro de absorção no UV-visível em comprimentos de onda menores do que a zeaxantina (Tabela 1) devido a essas diferenças estruturais. O espectro de massas (MS) da zeaxantina apresentou $[M+H]$ em m/z 569, e um íon com intensidade mais baixa em m/z 551 $[M+H-18]$, gerado pela fragmentação na fonte. O espectro da luteína mostra a mesma $[M+H]$ em m/z 569, mas o íon gerado na fragmentação na fonte em m/z 551 $[M+H-18]$ apresenta uma intensidade maior que o $[M+H]$. Nos espectros de massas (Figura 5) observa-se essa fragmentação mais intensa, que era esperada, pois a energia de fragmentação é menor quando a hidroxila está alílica à ligação dupla do anel ϵ , em relação à hidroxila isolada no anel β (De Rosso e Mercadante, 2007a,b). A identificação dos compostos foi confirmada pela comparação com padrões.

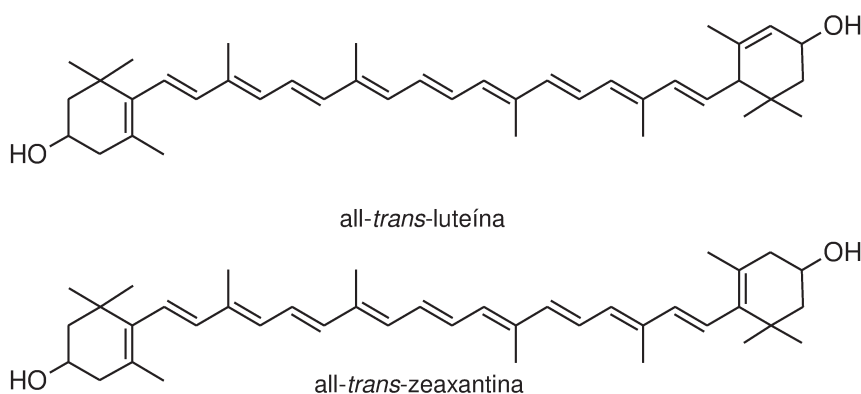


Figura 4: Estrutura molecular dos carotenoides *all-trans*-luteína e *all-trans*-zeaxantina.

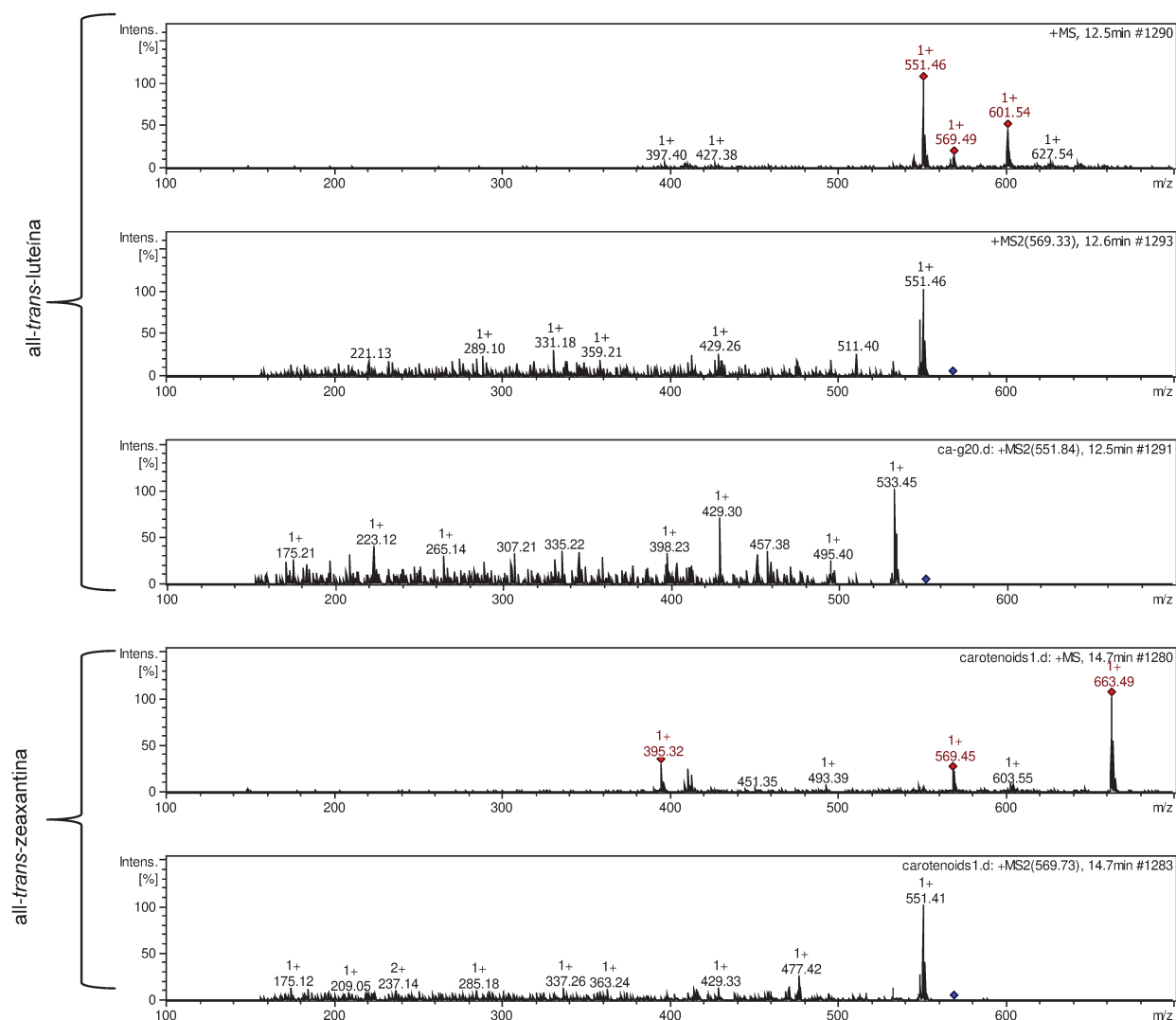


Figura 5: Espectros MS e MS/MS da *all-trans*-luteína e da *all-trans*-zeaxantina.

O teor total de carotenoides encontrado em guajiru ($571 \pm 21 \mu\text{g} / 100 \text{ g}$ de polpa liofilizada) foi inferior aos teores reportados na literatura para outras frutas tropicais como maná-cubiu (Rodrigues et al., 2013) e piquiá (Chisté et al., 2012). Por outro lado, o conteúdo de carotenoides de frutas com aparência similar a do guajiru que acumulam antocianinas na casca, como jambolão ($89,2 \mu\text{g} / 100 \text{ g}$ fruta fresca) e camu camu ($160.5 \pm 93.1 \mu\text{g} / 100 \text{ g}$ fruta fresca) foi próximo ao valor determinado por este estudo em guajiru ($103,50 \pm 10,80 \mu\text{g} / 100 \text{ g}$ de fruta fresca) (Faria et al., 2011, Zanatta e Mercadante, 2007).

3.4. Identificação das antocianinas

Foram identificadas 8 antocianinas em guajiru preto (Tabela 2). A Figura 6 apresenta o cromatograma de antocianinas processado em 520 nm. O perfil antociânico foi marcado pela presença de antocianinas derivadas de delphinidina, petunidina, cianidina e peonidina.

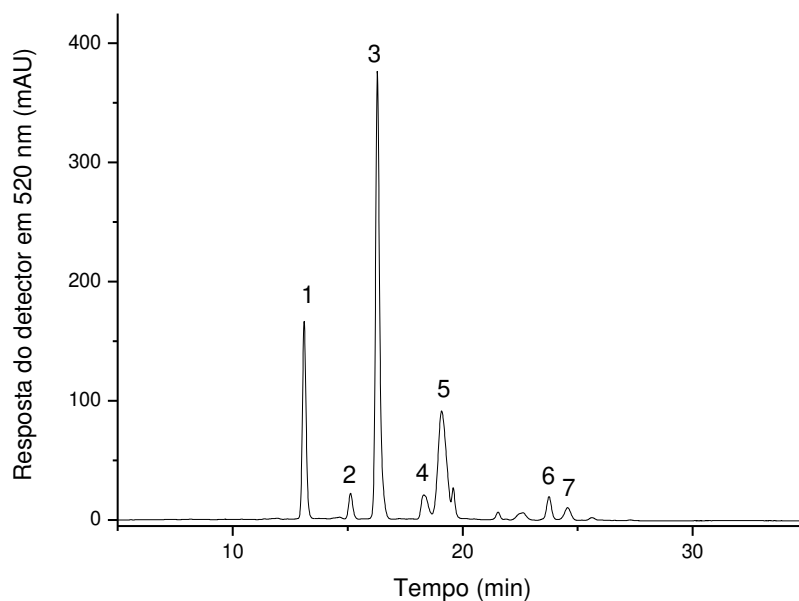


Figura 6: Cromatograma, obtido por HPLC-DAD, das antocianinas de guajiru. Picos identificados de acordo com a Tabela 2. 1: delphinidina 3-glucosídeo, 2: cianidina 3-glucosídeo, 3: petunidina 3-glucosídeo + delphinidina 3-(6''-acetil)galactosídeo ou delphinidina 3-(6''-oxalil)arabinosídeo, 4: peonidina 3-glucosídeo, 5: petunidina 3-(6''-acetil)galactosídeo ou petunidina 3-(6''-oxalil)arabinosídeo, 6: peonidina 3-(6''-acetil)glucosídeo ou peonidina 3-(6''-oxalil)arabinosídeo, 7: petunidina 3-(6''-acetil)glucosídeo ou petunidina 3-(6''-oxalil)arabinosídeo.

Tabela 2: Características cromatográficas e espectroscópicas, obtidas por HPLC-DAD-MS/MS, das antocianinas de guajiru.

Pico ^a	Antocianina	t _R (min) ^b	λ _{max} (nm) ^c	[M] ⁺ (m/z)	ions fragmentos (m/z)	Área %
1	Delfinidina 3-glucosídeo ^d	13,1 – 13,2	525	465	303 [M-162] ⁺	8,77
2	Cianidina 3-glucosídeo ^d	15,1 – 15,2	518	449	287 [M-162] ⁺	2,87
3A	Petunidina 3-glucosídeo ^d	16,3 – 16,5	524	479	317 [M-162] ⁺	47,26
3B	Delfinidina 3-(6"-acetil)galactosídeo ou delfinidina 3-(6"-oxalil)arabinosídeo ^e	16,3 – 16,5	524	507	303 [M-204] ⁺	
4	Peonidina 3-glucosídeo ^d	18,3 – 18,4	519	463	301 [M-162] ⁺	4,28
5	Petunidina 3-(6"-acetil)galactosídeo ou petunidina 3-(6"-oxalil)arabinosídeo ^e	19,1 – 19,2	524	521	317 [M-204] ⁺	22,43
6	Peonidina 3-(6"-acetil)galactosídeo ou peonidina 3-(6"-oxalil)arabinosídeo ^e	22,6 – 22,8	521	505	301 [M-204] ⁺	1,45
7	Petunidina 3-(6"-acetil)glucosídeo ou petunidina 3-(6"-oxalil)arabinosídeo ^e	23,7 – 24,0	528	521	317 [M-204] ⁺	2,94

^a Numerado de acordo com cromatograma apresentado na Figura 6^b Intervalo de tempo de retenção em coluna C₁₈ Luna (5 μm, 250 mm x 4.6 mm, Phenomenex, USA)^c Gradiente linear de água/metanol, ambos adicionados de 5%v/v ácido fórmico, de 90:10 a 60:40 em 20 min, então para 20:80 em 15 min, essa proporção foi mantida por 5 min^d Identificado com padrão^e Tentativamente identificado

Dentre as 8 antocianinas identificadas, 4 são antocianinas que se encontram na forma mono glicosilada não aciladas: delphinidina-3-glucosídeo (pico 1), cianidina 3-glucosídeo (pico 2), petunidina 3-glucosídeo (pico 3a) e peonidina 3-glucosídeo (pico 4). Duas antocianinas monoglicosiladas, a delphinidina 3-hexosídeo e a petunidina 3-hexosídeo, foram detectadas anteriormente, no entanto a identidade açúcar não tinha sido confirmada (Sousa de Brito et al., 2007). A antocianinas cianidina 3-glucosídeo (pico 2) e peonidina 3-glucosídeo (pico 4) foram detectadas pela primeira vez em guajiru preto, essa diferença no perfil antociânico provavelmente está relacionada a variações edafo-climáticas.

A identificação destas antocianidinas foi confirmada pela comparação com padrões e pela presença dos íons moleculares $[M]^+$ a m/z 465, m/z 449 (Figura 7), m/z 479 e m/z 469 (Figura 8), respectivamente. A presença de hexose nestes compostos foi observada devido à perda de 162 u no espectro de MS/MS. A identificação das hexoses como uma glucose foi baseada na ordem de eluição, na comparação com padrões e com dados da literatura (Faria et al., 2011).

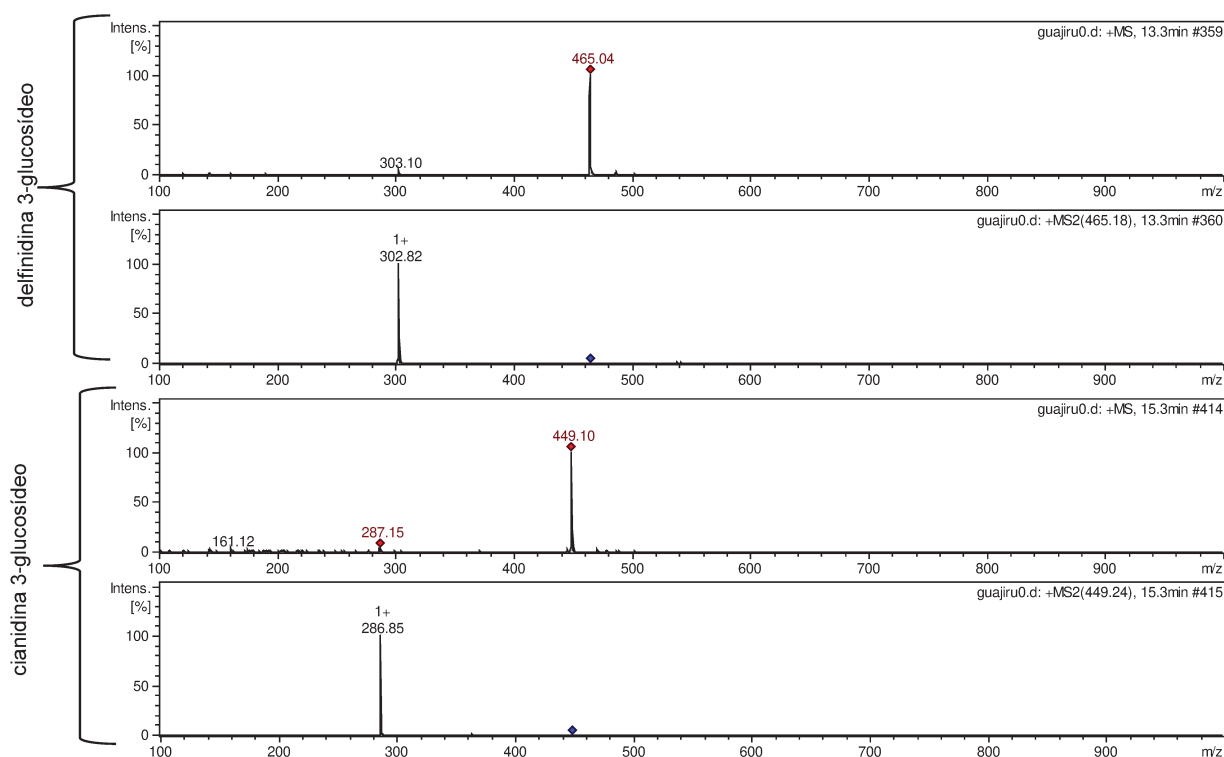


Figura 7: Espectros MS e MS/MS das antocianinas delphinidina 3-glucosídeo, cianidina 3-glucosídeo.

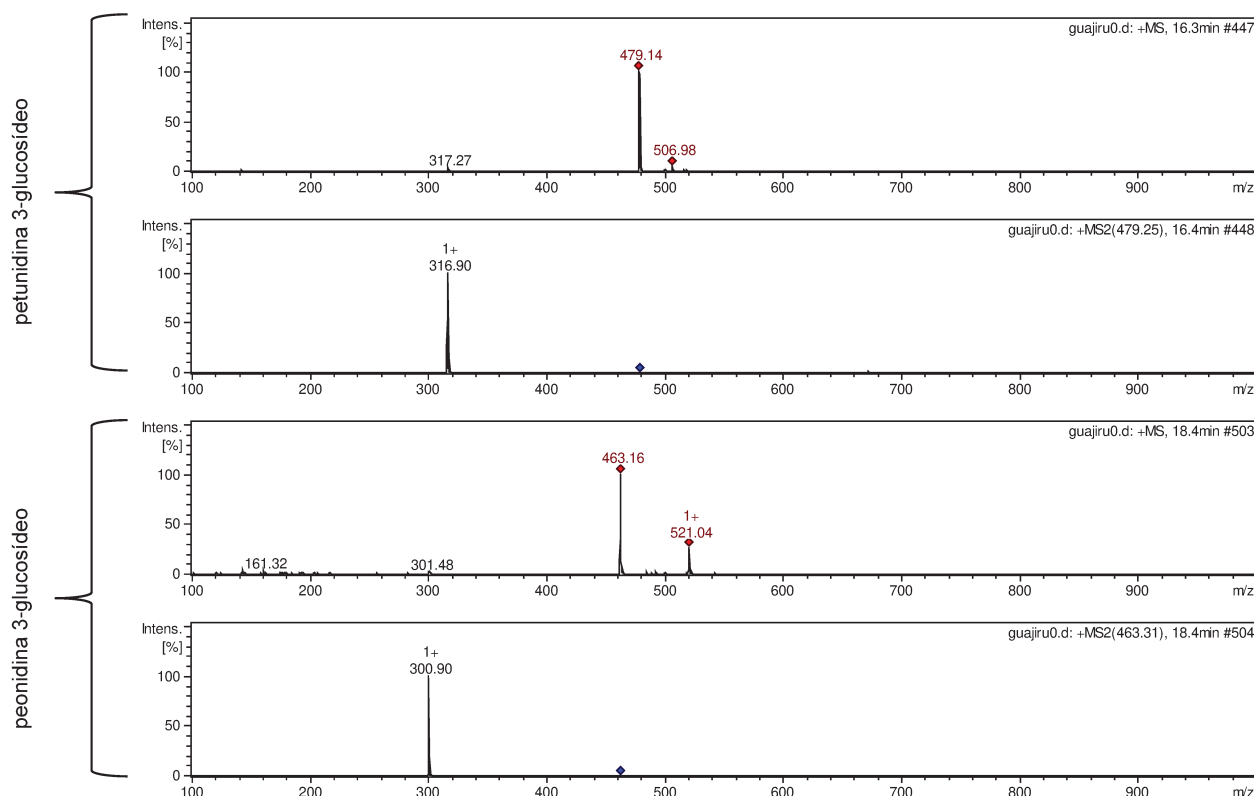


Figura 8: Espectros MS e MS/MS das antocianinas petunidina 3-glucosídeo, peonidina 3-glucosídeo.

As antocianinas presentes nos picos 5 e 7 foram tentativamente identificadas como petunidina 3-(6"-acetil)galactosídeo e petunidina 3-(6"-acetil)glucosídeo, respectivamente. Nos espectros de massas ambos os compostos apresentaram íon molecular a m/z 521 e perda de 204 u (Figura 9), sugerindo a liberação de uma hexose e de um grupo acetil na fragmentação $[M-162-42]^+$ a partir do íon molecular. Embora o grupo acetil seja mais comum em antocianinas do que o grupo oxalil, a perda de 204 u também pode ser justificada pela liberação de uma pentose e um grupo oxalil $[M-132-72]^+$. No entanto, utilizando apenas espectrometria de massas não é possível diferenciar estes dois compostos (Wu e Prior, 2005). Em estudos anteriores a mesma perda de 204 u foi identificada em derivados de delphinidina e petunidina (Sousa de Brito et al., 2007).

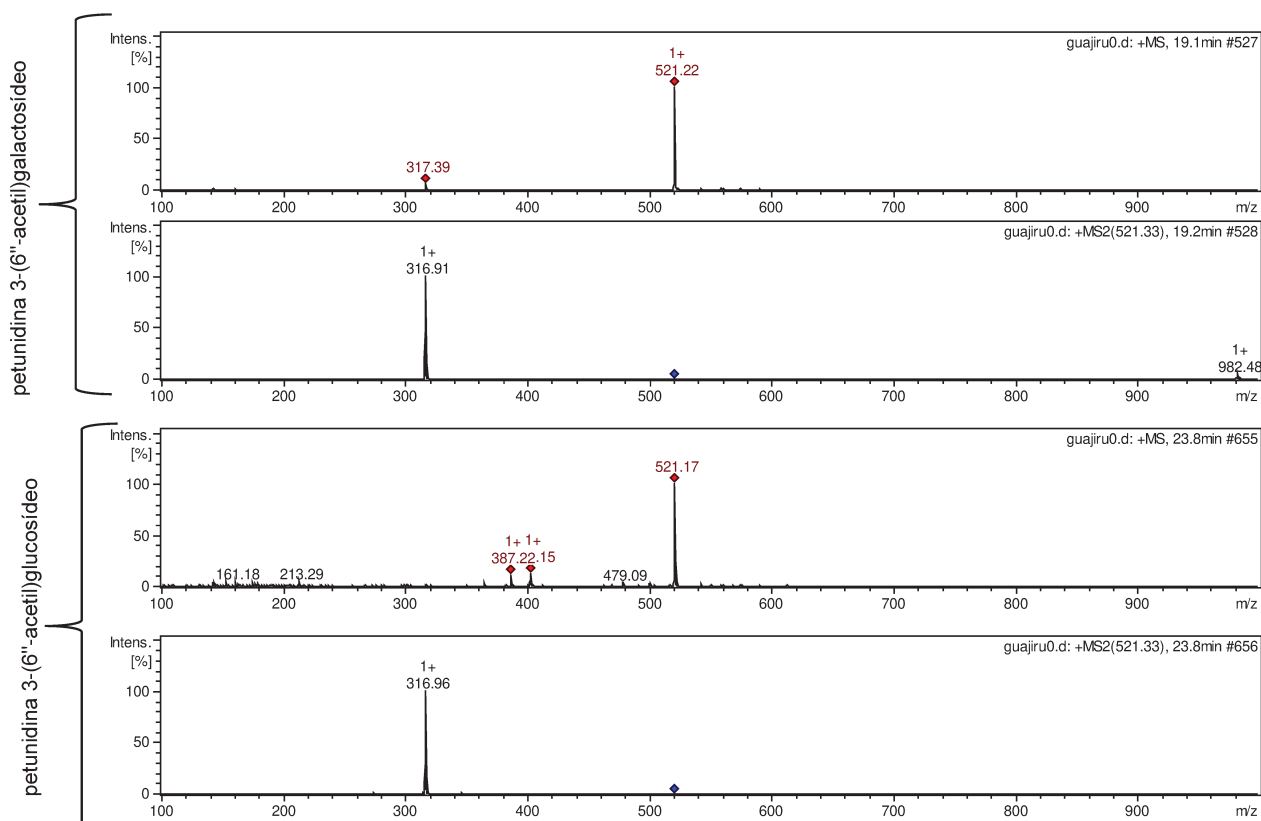


Figura 9: Espectros MS e MS/MS dos espectros MS e MS/MS dos compostos tentativamente identificados como petunidina 3-(6''-acetil)galactosídeo e petunidina 3-(6''-acetil)glucosídeo.

Os açúcares dos compostos presentes nos picos 5 e 7 foram tentativamente identificados como hexoses, pois essa classe de açúcar é mais comumente encontrada em antocianinas. Em virtude da ordem de eluição em coluna C_{18} , a hexose ligada ao composto presente no pico 5 foi tentativamente identificada como galactose, assim como a hexose ligada a antocianina do pico 7 foi tentativamente identificada como glucose (Wu e Prior, 2005).

A antocianina delfinidina 3-(6''-acetil)galactosídeo (pico 3b) foi tentativamente identificada devido à presença do íon molecular a m/z 507 e perda de 204 u (Figura 10). Como descrito anteriormente, a perda sugere a presença de uma hexose e de um grupo acetil $[M-162-42]^+$. A hexose do composto presente no pico 3b foi tentativamente identificada como galactose, em virtude da ordem de eluição em coluna C_{18} , pois essa antocianina possui tempo de retenção inferior ao da peonidina 3-glucosídeo (Wu e Prior, 2005).

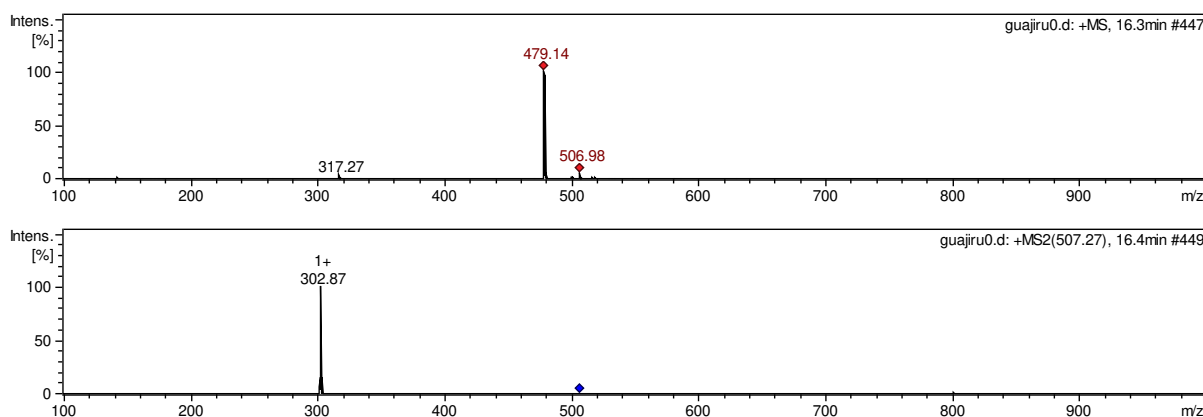


Figura 10: Espectros MS e MS/MS do composto tentativamente identificado como delfinidina 3-(6''-acetil)galactosídeo (pico 3b).

O antocianina presente no pico 6 foi tentativamente identificada como peonidina 3-(6''-acetil)glucosídeo, por apresentar o íon molecular a m/z 505 e fragmento MS/MS com perda de 204 u (Figura 11). Como descrito anteriormente, este fragmento se refere possivelmente à liberação de uma hexose e de um grupo acetil na fragmentação $[M-162-42]^+$. A hexose foi identificada como sendo uma galactose devido à ordem de eluição em coluna C_{18} , pois o composto apresentou tempo de retenção inferior ao composto do petunidina 3-(6''-acetil) glucosídeo (pico 7).

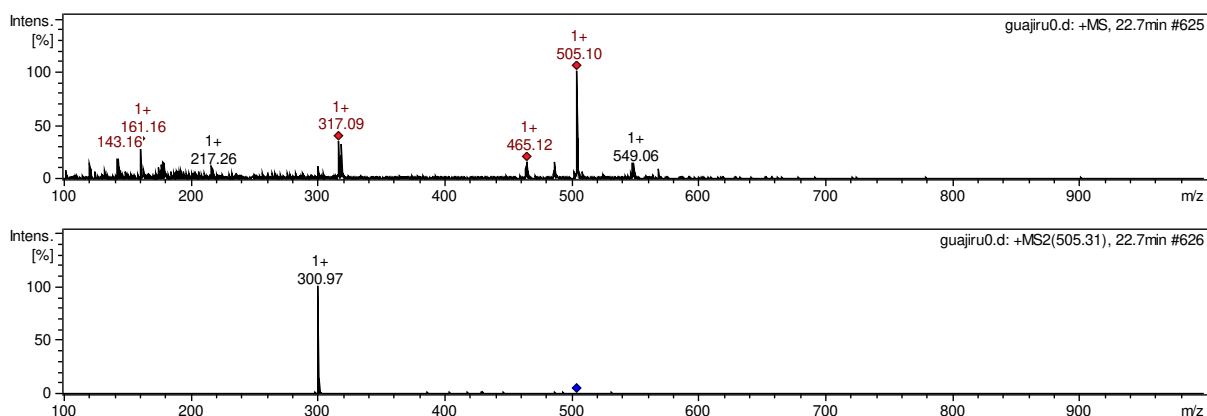


Figura 11: Espectros MS e MS/MS do composto tentativamente identificado como peonidina 3-(6''-acetil)glucosídeo (pico 6).

3.5. Identificação de compostos fenólicos não antociânicos

A separação dos compostos fenólicos de guajiru preto está apresentada na Figura 12, e as características de espectrometria de massas, UV-vis e ordem de eluição em coluna C₁₈ utilizadas para a identificação estão na Tabela 3. A presença das moléculas protonada $[M+H]^+$ e desprotonada $[M-H]^-$ permitiu a determinação da massa molecular dos compostos majoritários.

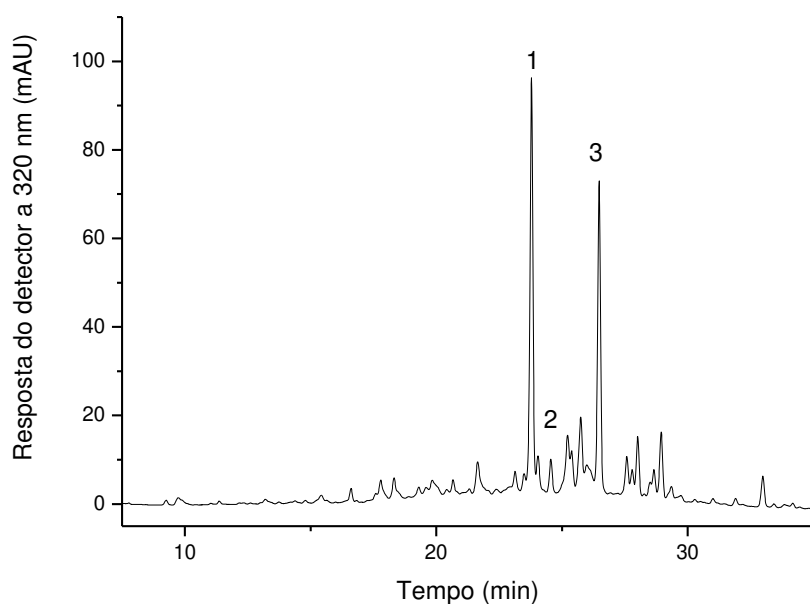


Figura 12: Cromatograma obtido por HPLC–DAD de compostos fenólicos de *C. icaco* (processado em 320 nm). Picos - 1: derivado de ácido elágico, 2: miricetina pentosídeo, 3: derivado de quercetina. Picos numerados segundo Tabela 3.

Tabela 3: Características cromatográficas e dos espectros UV-Vis e de massas, e conteúdo de compostos fenólicos de guajiru.

Pico ^a	Composto	t _R (min) ^b	λ _{max} (nm) ^c	[M+H] ⁺ (m/z)	MS ² (+) (m/z) ^c	MS ³ (+) (m/z)	[M-H] ⁻ (m/z)	MS ² (-) (m/z) ^c	MS ³ (-) (m/z) ^c	Concentração (mg/100g polpa liofilizada)
1	Derivado de ácido elágico ^d	23,7 – 23,8	220, 254, 356	549	303	272, 257 , 229	547	301	284, 271 , 257, 228, 213	152,27 ± 26,66 ^e
2	Miricetina pentosídeo ^d	24,5 – 24,6	270, 354	451	319	301, 273 , 445, 153	449	317	271 , 241, 179, 151, 137	16,62 ± 2,94 ^f
3	Derivado de quercetina ^d	26,4 – 26,7	232, 270, 354	479	303	285, 257, 229	477	301	273, 229, 179 , 151	66,65 ± 7,82 ^f
										213,33 ± 0,37

^a Numerado de acordo com o cromatograma apresentado na Figura 12

^b Intervalo de tempo de retenção em coluna C₁₈ Synergi Hydro (4 μm, 250 × 4.6 mm, Phenomenex, USA)

^c Gradiente linear de água/ácido fórmico (99.5:0.5, v/v) (solvente A) e acetonitrila/ácido fórmico (99.5:0.5, v/v) (solvente B) de A:B 99:1 a 50:50 em 50 min, de 50:50 a 1:99 em 5 min.

^d Tentativamente identificado

^e mg equivalente de ácido elágico /100 g fruta liofilizada

^f mg equivalente de quercetina /100 g fruta liofilizada

O composto presente no pico 1 foi tentativamente identificado como derivado de ácido elágico. O composto apresentou molécula desprotonada $[M-H]^-$ a m/z 547 e molécula protonada $[M+H]^+$ a m/z 549. A fragmentação MS/MS no modo negativo apresentou íon mais intenso a m/z 301, enquanto no modo positivo íon mais intenso a m/z 303. Tanto no modo positivo como no negativo, o espectro de MS³ apresentou o íon característico do ácido elágico. Os espectros de MS, MS² e MS³ no modo negativo e positivo do composto derivado do ácido elágico estão apresentados na Figura 13.

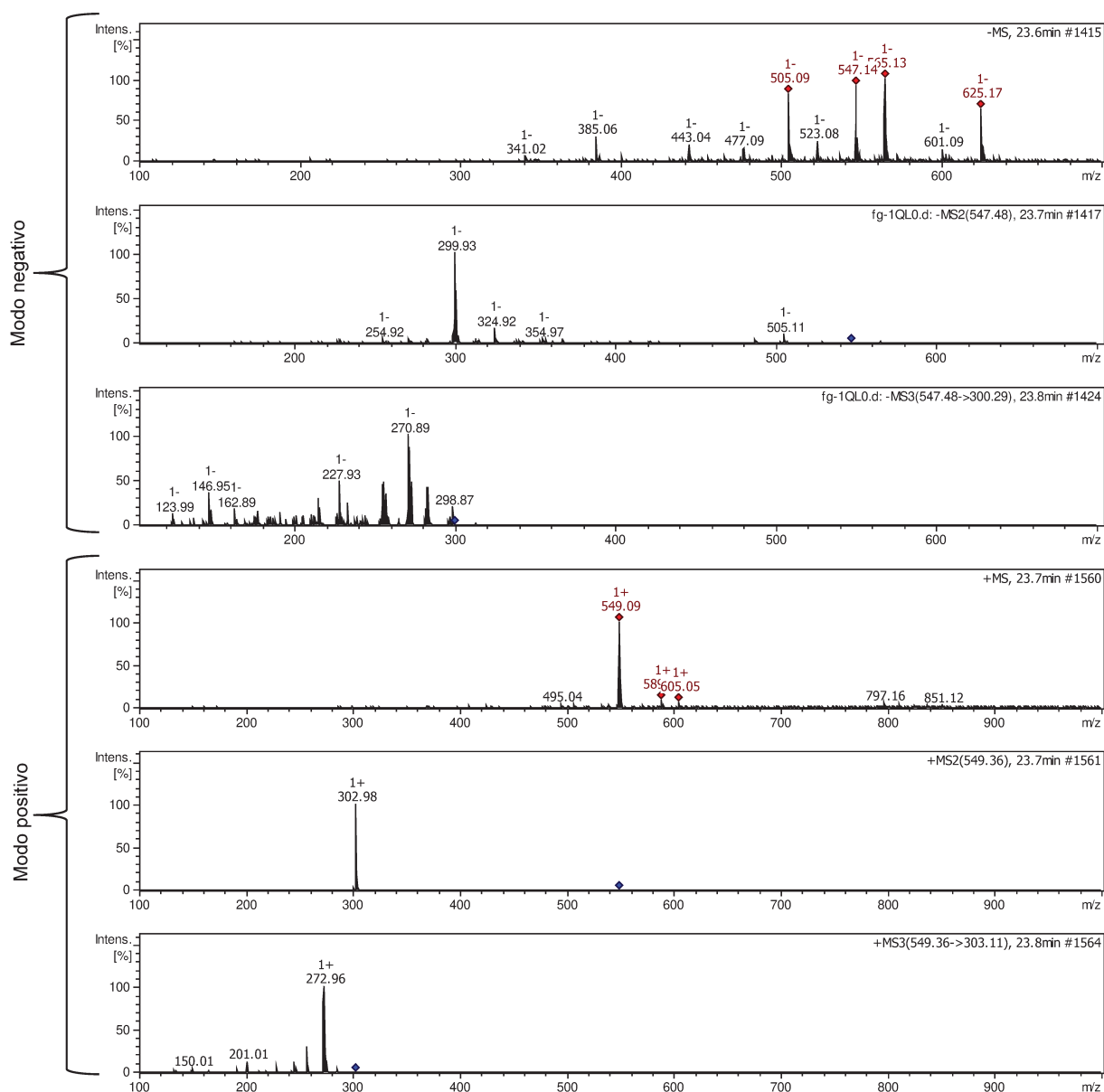


Figura 13: Espectros MS, MS² e MS³ nos modos negativo e positivo do composto derivado do ácido elágico (pico 1).

A miricetina pentosídeo (pico 2) foi detectada no espectro de massas no modo negativo a m/z 449 ($[M-H]^-$) e no modo positivo a m/z 451 ($[M+H]^+$). A fragmentação MS^2 apresentou íon mais intenso a m/z 317 no modo negativo e 319 no modo positivo, indicando a perda de 132 u, referente a uma pentose. O espectro de MS^3 mostrou o íon característico da miricetina. Os espectros de massas MS , MS^2 e MS^3 estão apresentados na Figura 14.

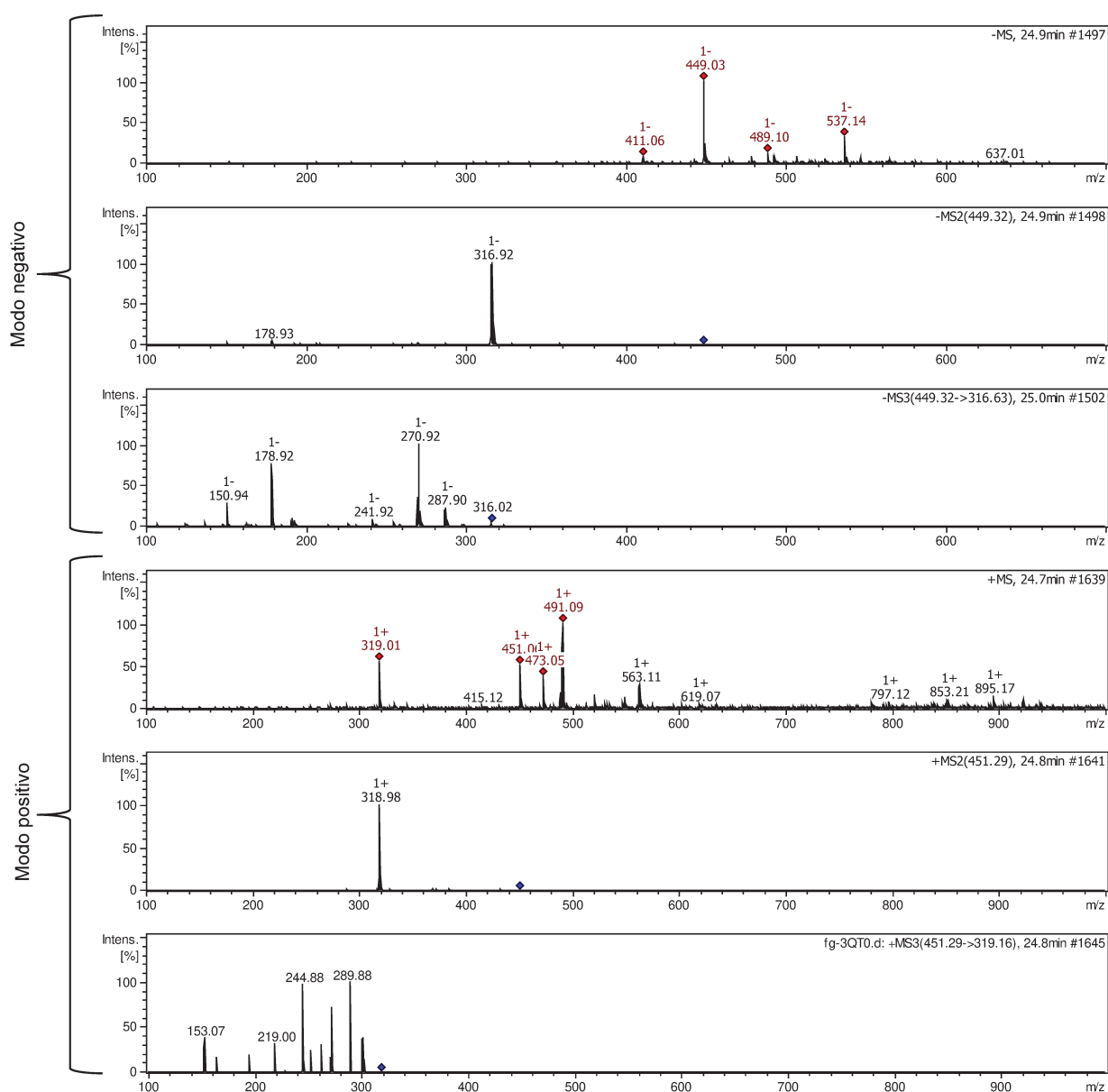


Figura 14: Espectros MS , MS^2 e MS^3 nos modos negativo e positivo da miricetina pentosídeo (pico 2).

O composto presente no pico 3 foi tentativamente identificado como derivado de quercetina. O composto apresentou molécula desprotonada $[M-H]^-$ a m/z 479 e molécula protonada $[M+H]^+$ a m/z 477. A fragmentação MS^2 apresentou íon mais intenso a m/z 301 no modo negativo e 303 no modo positivo. O espectro de MS^3 apresentou o íon característico da quercetina. Os espectros MS , MS^2 e MS^3 no modo negativo e positivo do composto derivado da quercetina estão apresentados na Figura 15.

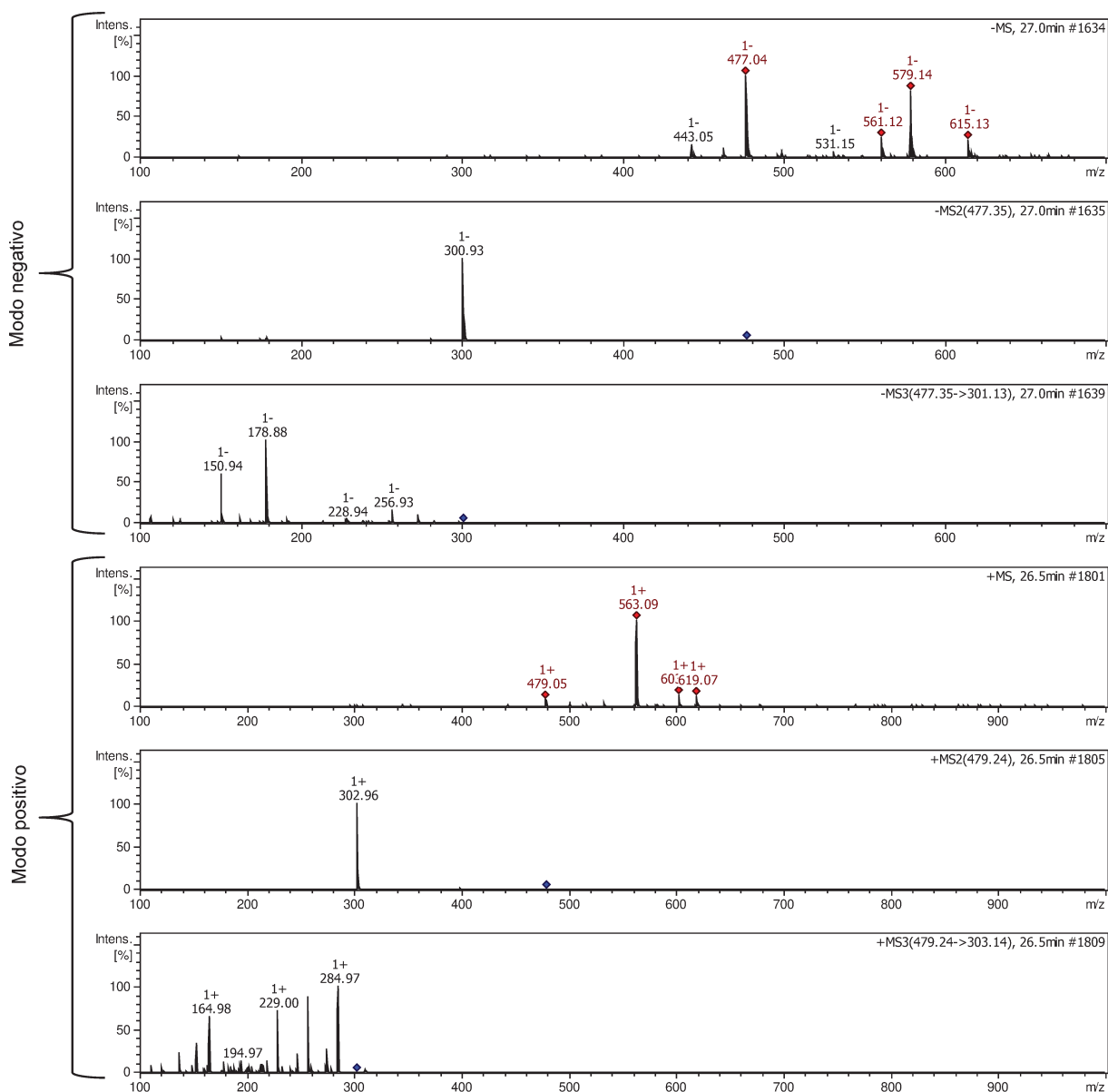


Figura 15: Espectros MS , MS^2 e MS^3 nos modos negativo e positivo do derivado de quercetina (pico 3).

4. Conclusão

A polpa de *Chrysobalanus icaco* L. possui um elevado potencial funcional devido ao seu alto teor de antocianinas. O teor de carotenoides encontrado foi semelhante ao de outras frutas tropicais ricas em antocianinas; no entanto, a capacidade redutora foi menor do que a de outras frutas topicais. As antocianinas delfinidina 3-glucosídeo, cianidina 3-glucosídeo, petunidina 3-glucosídeo e peonidina 3-glucosídeo foram positivamente identificadas pela primeira vez em guajiru preto, enquanto a cianidina 3-glucosídeo foi encontrada pela primeira vez em guajiru. A descrição dos carotenoides e compostos fenólicos de guajiru foi realizada pela primeira vez, o que é um avanço para o maior conhecimento da biodiversidade. Estudos complementares ainda podem ser realizados para elucidar as estruturas das antocianinas aciladas e dos compostos fenólicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adonizio, A.L.; Downum, K.; Bennett, B.C.; Mathee, K. 2006. Anti-quorum sensing activity of medicinal plants in southern Florida. *Journal of Ethnopharmacology*, 105: 427–435.
- Andersen, Ø. M.; Jordheim, M. C. 2006. The anthocyanin In: Ø. M. Andersen, Editor, *Flavonoids chemistry, biochemistry and applications*, CRC Press, Boca Raton, 471-551.
- AOAC. 1997. *Official Methods of Analysis of the Official Analytical Chemists*, 16th ed. AOAC: Gaithersburg, MD. Vol. 2.
- Barreto, G. P. M.; Benassi, M. T.; Mercadante, A. Z. 2009. Bioactive compounds from several tropical fruits and correlation by multivariate analysis to free radical scavenger activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 20: 1856–1861.
- Bligh, E. G.; Dyer, W. J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 37: 911-917.

Britton, G.; Liaaen-Jesen, S.; Pfander, H. 1995. Carotenoids today and challenges for the future. In: Carotenoids, Vol 1A: Spectroscopy, ed. Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. Birkhauser, Basel, pp. 13-62.

Castilho, R.O. Kaplan, M.A.C. 2012. Phytochemical study and antimicrobial activity of *Chrysobalanus icaco*. *Chemistry of Natural Compounds*, 1-2.

Chisté, R.C.; Mercadante, A.Z. 2012. Identification and Quantification, by HPLC-DAD-MS/MS, of Carotenoids and Phenolic Compounds from the Amazonian Fruit *Caryocar villosum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60: 5884-5892.

Dastmalchi, K.; Flores, G.; Wu, S.; Ma, C.; Dabo, A.J.; Whalen, K.; Reynertson, K.A.; Foronjy, R.F.; D'Armiento, J.M.; Kennelly, E.J. 2012. Edible Myrciaria avicarpa fruits: Bioactive phenolics for potential COPD therapy, *Bioorganic e Medicinal Chemistry*, 14: 4549-4555.

De Rosso, V. V.; Mercadante, A. Z. 2007a. Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 5062-5072.

De Rosso, V. V.; Mercadante, A. Z. 2007 b. HPLC-PDA-MS/MS of anthocyanins and carotenoids from dovyalis and tamarillo fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 9135-9141.

Degenhardt, A.; Knapp, H.; Winterhalter, P. 2000. Separation and purification of anthocyanins by high-speed countercurrent chromatography and screening for antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 338-343.

Erlund, I. 2004. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research*, 24: 851-874.

Faria, A. F.; Marques, M. C.; Mercadante, A. Z. 2011. Identification of bioactive compounds from jambolão (*Syzygium cumini*) and antioxidant capacity evaluation in different pH conditions. *Food Chemistry*, 126: 1571-1578.

Feitosa E.A., Xavier, H.S., Randau, K.P. 2012. Chrysobalanaceae: traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 22: 1181-1186.

Fernandes, J., Castilho, R.O., Costa, M.R., Wagner-Souza, K., Kaplan, M.A.C., Gattassa, C.R. 2003. Pentacyclic triterpenes from *chrysobalanaceae* species: cytotoxicity on multidrug resistant and sensitive leukemia cell lines. *Cancer Letters*, 190: 165-169.

Giusti, M.; Jing, P. Analysis of Anthocyanins. 2008. In: C. Socaciu, Editor, Food colorants: chemical and functional properties, CRC Press, Boca Raton, 195 -299.

Harborne, J.B., Williams, C.A. 1995. Anthocyanins and other flavonoids. *Natural Product Reports*, 12: 639-657.

Kjeldahl, J. 1883 Neue Methods zur Bestimmung des Stickstoffs in Organischen Korpern, *Zeitschrift für analytische Chemie*. 22:366–382.

Lee, J., Durst, R. W., Wrolstad, R. E. 2005. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative Study. *Journal of AOAC International*, 88: 1269–1278.

Mercadante A. Z.; Rodriguez-Amaya D.B.; Britton G. 1997. HPLC and mass spectrometric analysis of carotenoids from mango. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 120-123.

Presta, G.A.; Fonseca, A.S.; Bernardo-Filho, M. A. 2007. Chrysobalanus icaco extract alters the plasmid topology and the effects of stannous chloride on the DNA of plasmids. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 17: 331-335.

Reynertson, K.A.; Wallace, A.M.; Adachi, S.; Gil, R.R.; Yang, H.; Basile, M.J.; D'Armiento, J.; Weinstein, B.; Kennelly, E.J. 2006. Bioactive Depsides and Anthocyanins from Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*). *Journal of Natural Products*, 69: 1228-1230.

Reynertson, K.A.; Yang, H.; Jiang, B.; Basile, M.J.; Kennelly, E.J. 2008. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. *Food Chemistry*, 109: 883–890.

Rodrigues, E.; Mariutti, L.R.B.; Mercadante, A.Z. 2013. Carotenoids and phenolic compounds from *Solanum sessiliflorum*, an unexploited amazonian fruit, and their scavenging capacities against reactive oxygen and nitrogen species. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 61: 3022–3029.

Singleton, V.L., Rossi, J.A.Jr. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic–phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16: 144–158.

Souza de Brito, E. S.; de Araújo, M. C. P.; Alves, R. E.; Carkeet, C.; Clevidence, B. A.; Novotny, J. A. 2007. Anthocyanins present in selected tropical fruits: acerola, jambolão, jussara, and guajiru. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55: 9389–9394.

Zanatta, C.F., Mercadante, A.Z. 2007. Carotenoid composition from the Brazilian tropical fruit camu–camu (*Myrciaria dubia*). *Food Chemistry*, 101: 1526–1532.

Wu, X., Prior, R.L. 2005. Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common foods in the United States: Fruits and berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 2589–2599.

CAPITULO III

EFEITO DA EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR MICRO- ONDAS EM ANTOCIANINAS DE CASCA DE JABUTICABA

Marcella C. Marques, Lilian R.B. Mariutti, Adriana Z. Mercadante

A ser submetido à *Food Chemistry*

EFEITO DA EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS EM ANTOCIANINAS DE CASCA DE JABUTICABA

Resumo

Extração assistida por micro-ondas (MAE) tem como vantagens o baixo tempo de extração e baixo volume de solvente por utilizar aquecimento rápido que facilita a migração dos compostos da matriz para a solução extratora. Antocianinas são pigmentos hidrofílicos conhecidos por apresentarem baixa estabilidade tanto em altas temperaturas como em altos valores de pH. A extração por MAE de antocianinas de casca de jabuticaba liofilizada foi estudada através de um planejamento experimental DCFC (2^3) tendo como variáveis independentes a concentração da solução de HCl em metanol (0,3 - 0,7 %), a temperatura (90 a 110 °C) e o volume de solução extratora (28 - 42 mL). As variáveis resposta, determinadas por HPLC-DAD-MS/MS, foram as concentrações de antocianinas totais, de delphinidina 3-glucosídeo, de cianidina 3-glucosídeo e de cianidina 3-(succinil)glucosídeo. As amostras em solução foram submetidas a uma potência máxima de 850 W por 1 min para atingir a temperatura desejada, sendo mantida constante por 5 min em potencia máxima de 350 W. Os resultados mostraram que a extração de antocianinas por MAE não foi mais eficiente do que pelos métodos tradicionais. Além disso, as variáveis independentes (concentração de HCl, temperatura e volume de solução extratora) nos níveis avaliados no DCFC alteraram o perfil das antocianinas quando a extração foi realizada por MAE. A concentração de cianidina 3-glucosídeo foi positivamente influenciada pelos maiores níveis de temperatura de extração e concentração de ácido na solução extratora. Por outro lado, nenhuma dessas variáveis independentes apresentou efeito significativo na concentração total de antocianinas, de delphinidina 3-glucosídeo e de cianidina 3-glucosídeo. O volume de solução extratora não exerceu efeito significativo na extração das antocianinas de casca de jabuticaba. Não foram detectados produtos de baixo peso molecular que indicassem a degradação térmica das antocianinas durante a MAE nas condições testadas.

Palavras chave: antocianinas, extração assistida por micro-ondas, LC-MS/MS, jabuticaba

1. Introdução

Antocianinas são pigmentos hidrossolúveis distribuídos no reino vegetal, podendo ser acumuladas em folhas, flores, frutos e em partes subterrâneas das plantas, conferindo cor aos tecidos (Andersen e Jordheim, 2013).

A jabuticaba (*Myrciaria cauliflora* ou *Myrciaria jaboticaba*) é uma fruta nativa brasileira cuja casca possui cor roxa escura devido à alta concentração de antocianinas (1500 mg/100g de peso seco) (Leite-Legatti et al., 2012). Apenas antocianinas mono glicosiladas foram encontradas em jabuticaba, sendo a cianidina 3-glucosídeo o pigmento majoritário na fruta. Também foram identificadas delphinidina-3-glucosídeo (Leite-Legatti et al., 2012) e peonidina 3-glucosídeo (Trevisan et al., 1972).

Em um estudo comparativo, a extração assistida por micro-ondas (MAE) de antocianinas de casca de uva foi mais eficiente do que a extração estática sob refrigeração por 5 h (Liazid et al., 2011). A MAE foi otimizada utilizando metanol em água como solução extratora, enquanto a extração estática foi realizada utilizando metanol acidificado com 5 % de ácido fórmico. As variáveis resposta foram concentração de antocianinas totais e concentração da antocianina majoritária, determinadas por HPLC-DAD (Liazid et al., 2011). Porém, o efeito da MAE no perfil de antocianinas não foi avaliado.

Temperatura, potência do equipamento e tempo de irradiação foram avaliados utilizando planejamento experimental composto central para extração por MAE de antocianinas de cereja (Garofulic et al., 2013). Os parâmetros fixos foram tempo para atingir a temperatura determinada, tempo de resfriamento, agitação, massa de amostra e solvente de extração (MeOH 80% acidificado com 0,1 % de HCl). As concentrações individuais das antocianinas foram determinadas por HPLC-DAD. As concentrações de antocianinas totais e de cianidina-3glucosil-rutinosídeo, antocianina majoritária, foram utilizadas como respostas para avaliação do método de extração. O método otimizado de MAE (60 °C, 400 W e 9 min) também resultou em maior teor de antocianinas totais do que o método de extração convencional. Além disso, a MAE não alterou o perfil de antocianinas de cereja (Garofulic et al., 2013).

Em outros estudos para a otimização da extração por MAE de antocianinas de milho roxo (Yang e Zhai, 2010) e de frutas vermelhas, como amora (Wen et al., 2015; Zou et al., 2012) e framboesa (Teng et al., 2013), a concentração de antocianinas totais foi utilizada como variável resposta. Como nesses estudos a concentração foi determinada por métodos espectrofotométricos, não foi possível avaliar o efeito da MAE no perfil das antocianinas ou a possível degradação térmica dos compostos durante a extração.

A influência combinada da MAE e da concentração do ácido clorídrico da solução extratora no perfil de antocianinas derivadas de diferentes antocianidinas ainda não foi investigada. Utilizando casca de jabuticaba liofilizada como modelo, este estudo teve o objetivo de avaliar a influência combinada da temperatura da extração assistida por micro-ondas (MAE), volume e concentração de ácido em antocianinas mono-glicosiladas derivadas de diferentes antocianidinas.

2. Materiais e Métodos

2.1. Amostras

Foram adquiridos 3 kg de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) na central de abastecimento (CEASA) de Campinas, São Paulo, Brasil. Após transporte para o laboratório, os frutos foram lavados e cortados, a polpa e semente foram removidas manualmente. Em seguida as cascas foram congeladas através da imersão em nitrogênio líquido. As cascas congeladas foram liofilizadas (Liotop L101), homogeneizadas em multiprocessador doméstico e o pó resultante foi embalado a vácuo, e mantido em freezer a -36°C até análise.

2.2. Reagentes e padrões

Os padrões de cianidina 3-glucosídeo e delphinidina 3-glucosídeo (96% de pureza) foram adquiridos da Extrasynthèse (Lyon Nord, França). Os solventes e os reagentes grau cromatográfico (HPLC) foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha) e da Mallinckrodt Baker (Phillipsburg, EUA), os de grau p.a. da Labsynth (São Paulo, Brasil). A água ultrapura foi obtida em sistema Milli-Q (Millipore, Billerica, EUA).

2.3. Extração acelerada por agitação

A extração sólido-líquido de $0,12 \pm 0,002$ g de amostra liofilizada homogeneizada foi realizada, em triplicata, sob agitação em turrax durante 3 min com 25 mL de solução de metanol contendo 1% de ácido clorídrico. O sobrenadante foi separado por filtração em filtro de papel sob vácuo. O retentado foi re-extraído mais 4 vezes com 25 mL da mesma solução extratora, até que o filtrado estivesse incolor (Faria et al., 2011). Os filtrados foram combinados e concentrados em evaporador rotativo ($T < 40$ °C) (modelo R114, Büchi, Flawil, Suíça). O extrato concentrado foi diluído até volume conhecido em água contendo 1% de ácido clorídrico, e então armazenado em freezer a -80 °C até análise cromatográfica.

2.4. Extração estática

As antocianinas foram extraídas, em triplicata, também com solução de metanol contendo 1% de ácido clorídrico em repouso sob refrigeração (4 °C) por 16 horas. O sobrenadante foi separado por filtração a vácuo, e o retentado foi submetido à nova extração sob refrigeração por 4 h, este procedimento foi repetido mais 2 vezes até que o filtrado estivesse incolor (Degenhardt et al, 2000). Os extratos foram combinados, e em seguida foram concentrados em evaporador rotativo até eliminação do metanol, o extrato concentrado foi diluído em água com 1% de ácido clorídrico em volume conhecido e armazenado em freezer a -80 °C até análise.

2.5. Extração assistida por micro-ondas

A extração de antocianinas assistida por micro-ondas (Start-E, Milestone, Sorisole, Itália) foi realizada segundo um delineamento composto de face centrada (DCFC) 2^3 com 2 repetições no ponto central, totalizando 10 experimentos. As variáveis independentes foram concentração de HCl em MeOH, temperatura e volume de solução extratora. As faixas de valores para estas variáveis independentes (Tabela 1) foram escolhidas com base em e em testes preliminares e estudos publicados anteriormente (Liazid et al, 2011; Garofulic et al., 2013). Em todos os experimentos os parâmetros fixos foram massa da amostra ($0,12 \pm 0,002$ g), potência máxima do equipamento (850 W, por 40 s até atingir a temperatura de extração definida no planejamento, e 350 W a temperatura constante por 5 min),

agitação (240 rpm) e tempos de extração (5 min 40 s) e de resfriamento (30 min). Os experimentos foram realizados em ordem aleatória.

Tabela 1: Variáveis independentes codificadas e não codificadas, e seus respectivos níveis, usadas no DCFC.

Variáveis		Níveis		
	Codificada	-1	0	1
% HCl em MeOH	X1	0,3	0,5	0,7
Temperatura (°C)	X2	90	100	110
Volume (mL)	X3	28	35	42

Após adição da amostra e solução extratora, os tubos de teflon foram fechados e colocados no equipamento de micro-ondas para irradiação, que foi realizada em duas fases. Na primeira fase, aqui chamada de aquecimento, os tubos foram submetidos a uma potência máxima de 850 W por 40 s para que a solução + amostra atingisse a temperatura determinada no delineamento experimental. Na segunda fase, chamada de fase de extração, a temperatura estabelecida no planejamento foi mantida constante por 5 min utilizando potência máxima de 350 W.

A temperatura de extração foi medida durante todo o processo de extração por meio de um termopar inserido no centro do tubo de extração. Com base na medida de temperatura, o controlador utilizou a potência adequada (0 - 850 W) para que a solução atingisse a temperatura desejada no planejamento (90 - 110 °C) por 40 s. De forma similar, a potência aplicada para manter a temperatura de extração foi controlada pelo equipamento, variando entre 0 e 350 W durante 5 min de extração.

Após a irradiação, os tubos foram imediatamente colocados por 30 min em banho de gelo para acelerar o resfriamento. A seguir, o extrato foi filtrado em filtro de papel e o retentado foi lavado com até 20 mL de solução extratora, de modo que a solução filtrada e o retentado no papel estivessem incolores. Em seguida o extrato foi concentrado em evaporador rotativo com temperatura do banho < 40 °C. O extrato concentrado foi diluído com água ultrapura acidificada com 1% de HCl até volume conhecido e em seguida armazenado em freezer a -80 °C. Os extratos permaneceram a -80 °C por no máximo 5 dias até as análises cromatográficas.

2.6. Determinação de antocianinas por HPLC-DAD-MS/MS

A separação, identificação e quantificação das antocianinas foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (modelo SPD-M20A, Shimadzu, Japão) acoplado aos detectores de arranjo de diodos (DAD) e ao espectrômetro de massas (Amazon Speed, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), com interface "eletrospray" (ESI) e analisador de massas "ion trap". As antocianinas foram separadas em coluna C₁₈ Luna (5 µm, 250 mm x 4,6 mm, Phenomenex, Torrance, EUA) utilizando como fase móvel um gradiente linear de água/metanol, ambos acrescidos de 5% de ácido fórmico, de 90:10 para 60:40 em 20 min, seguindo para 20:80 em 15 min e mantendo esta proporção por mais 5 min, com vazão de 0,9 mL/min e temperatura da coluna mantida a 29 °C (Faria et al., 2011). Os cromatogramas foram processados em 520 nm. As antocianinas foram quantificadas individualmente utilizando um ponto de concentração 0,02 mg/mL de cianidina 3-glucosídeo, considerando que a curva analítica de cianidina 3-glucosídeo é linear nesta faixa de concentração (De Rosso e Mercadante, 2007). As concentrações de todas as antocianinas individuais foram expressas em equivalente de cianidina 3-glucosídeo.

Após a passagem pelo DAD, o fluxo da fase móvel foi dividido de forma que apenas 0,15 mL/min entrasse na fonte de ionização ESI. Os parâmetros do MS foram ajustados em: ionização no modo positivo, voltagem no capilar de 2,5 kV; voltagem de saída no capilar de 95,2 kV; energia de fragmentação de 1,2 V; temperatura do gás secante (N₂) de 350 °C com fluxo de 8 L/min; nebulizador a 30 psi; *endplate offset* -500 V. Os espectros de massas foram adquiridos na faixa de valores de *m/z* entre 100 e 1000 e o MS/MS foi adquirido no modo automático com energia de fragmentação de 1,2 V (Faria et al., 2011).

A identificação das antocianinas foi realizada com base na combinação dos seguintes parâmetros: ordem de eluição em coluna de fase reversa e características dos espectros de UV-vis e de massas em comparação com dados disponíveis na literatura (Leite-Legatti et al., 2012; Faria, et al., 2011; Wu e Prior, 2005).

2.7. Análise estatística

A análise estatística do planejamento experimental foi realizada com o software Statistica versão 7.0 (Statsoft, Tulsa, OK, USA). Os gráficos, média e desvio-padrão dos resultados das análises de antocianinas totais e teores das antocianinas individuais analisados HPLC foram calculados utilizando o software Origin versão 8.1. Os resultados obtidos foram comparadas através da análise de variância (ANOVA) utilizando um intervalo de confiança de 95 %.

3. Resultados e Discussão

3.1. Extração estática e por agitação

Três antocianinas foram identificadas em jabuticaba (Tabela 2). Como descrito na literatura foram encontradas as antocianinas delfinidina 3-glucosídeo (pico 1) e cianidina 3-glucosídeo (pico 2) (Leite-Legatti et al., 2012). A antocianina acilada cianidina 3-(succinil)glucosídeo (pico 3) foi identificada pela primeira vez em jabuticaba. A identificação dessa antocianidina foi realizada com base no espectro de massas. A cianidina 3-(succinil)glucosídeo apresentou perdas de 100 e 262 u no espectro de MS², referentes a perda, respectivamente, de um grupo succinil e do ligante succinil + hexose. A identificação da hexose como uma glucose se deu pela comparação com o tempo de retenção em coluna C₁₈.

Tabela 2: Características cromatográficas e espectroscópicas, obtidas por HPLC-DAD-MS/MS, de antocianinas de casca de jabuticaba.

Pico ^a	Composto	t _R (min) ^b	λ _{max} (nm) ^c	[M] ⁺	Íon fragmentos obtidos por MS ² (m/z)	Íon fragmentos obtidos por MS ³ (m/z)
1	Delfinidina 3-glucosídeo	13,0 – 14,1	525	465	303 [M-162] ⁺	n.d.
2	Cianidina 3-glucosídeo	14,8 – 15,4	517	449	287 [M-162] ⁺	n.d.
3	Cianidina 3-(succinil)glucosídeo	22,4 – 23,1	527	549	449 [M-100] ⁺ , 287 [M-262] ⁺	449 → 287 [M-100-162] ⁺

^a Picos numerados de acordo com os cromatogramas das figuras 1, 2, 3 e 5;

^b Intervalo de tempo de retenção em coluna C₁₈ Luna (5 μm, 250 mm x 4.6 mm, Phenomenex);

^c Gradiente linear de água/MeOH, ambos adicionados de 5%v/v ácido fórmico, de 90:10 a 60:40 em 20 min, então de 20:80 a 15 min, essa proporção foi mantida por 5 min.

n.d. não detectado

O perfil de antocianinas de jabuticaba obtido por extração estática foi muito similar ao do obtido por agitação (Figura 1).

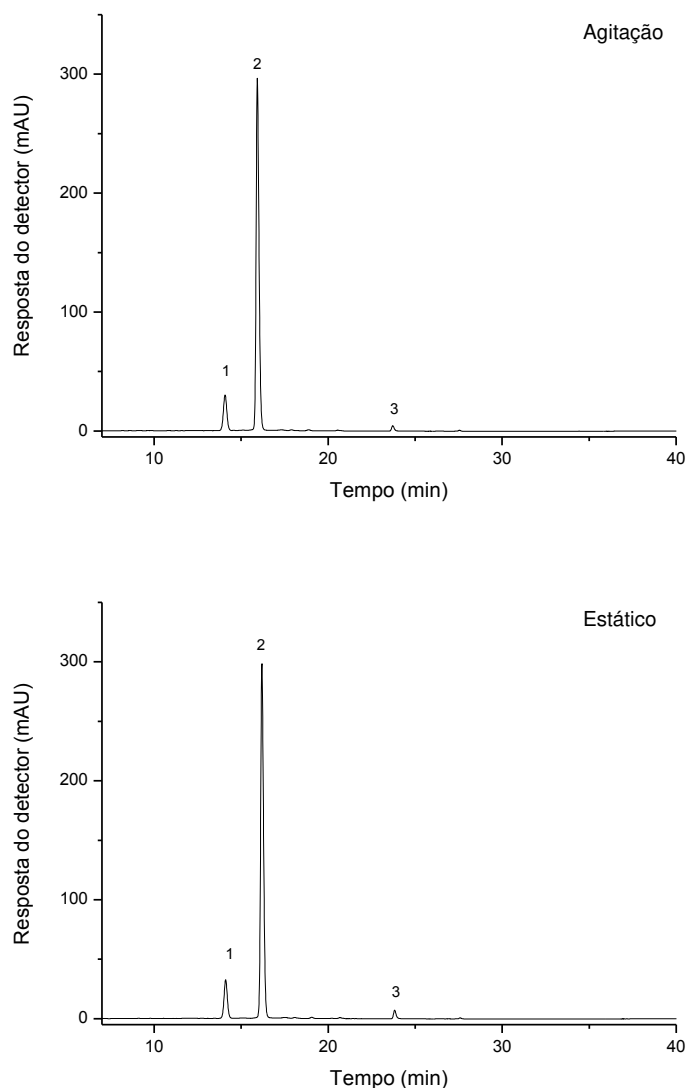


Figura 1: Cromatogramas processados a 520 nm, obtidos por HPLC-DAD, do extrato de antocianinas de jabuticaba obtido por extração acelerada por agitação e extração estática. Os picos foram numerados segundo a identificação apresentada na Tabela 2. Compostos: (1) delfinidina 3-glucosídeo, (2) cianidina 3-glucosídeo, (3) cianidina 3-(succinil)-glucosídeo.

As concentrações de antocianinas totais obtidas por extração estática e por agitação (Tabela 3) não foram significativamente diferentes ($p > 0,05$). No entanto, a concentração da cianidina 3-glucosídeo (pico 2) foi significativamente maior nos

extratos obtidos por extração estática, enquanto não houve diferença ($p>0,05$) na extração da delfinidina 3-glucosídeo e da cianidina 3(succinil)glucosídeo.

Tabela 3. Conteúdo de antocianinas de casca de jabuticaba em extratos obtidos por extração acelerada por agitação e por extração estática.

Pico ^a	Antocianina	Concentração (mg cianidina 3-glucosídeo/100 g casa de jabuticaba liofilizada) ^c	
		Agitação	Estático
1	Delfinidina 3-glucosídeo	166 ± 5 ^a	174 ± 2 ^a
2	Cianidina 3-glucosídeo	1338 ± 33 ^a	1392 ± 15 ^b
3	Cianidina 3-(succinil)glucosídeo	16 ± 6 ^a	14 ± 1 ^a
	Total	1530 ± 37 ^a	1583 ± 17 ^a

^{a, b} Médias ± desvio-padrão (n=3) significativamente diferentes com 95% de significância

^c. Compostos quantificados em HPLC-DAD como equivalente em cianidina 3-glucosídeo

Os resultados do presente estudo estão em consonância com um estudo de extração de antocianinas de casca de uva com solução acidificada (MeOH adicionado de 1% de HCl 12 N) por 9 e 20 h à temperatura ambiente. Os extratos obtidos por estes dois métodos apresentaram valores semelhantes de antocianinas totais ($91,3 \pm 5,6$ e $94,0 \pm 7,4$ mg de cianidina 3-glucosídeo/100 g de uva fresca), de delfinidina 3-glucosídeo (5,8 e 5,6 mg de cianidina 3-glucosídeo/100 g de uva fresca) e de cianidina 3-glucosídeo (0,5 mg de cianidina 3-glucosídeo/100 g de uva fresca em ambos os extrato) (Revilla et al., 1998). Embora os teores de antocianinas em casca de uva (79 - 114 mg de cianidina 3-glucosídeo/100 g de uva fresca) (Revilla et al., 1998) sejam menores do que em casca de jabuticaba (1114 - 1698 mg de cianidina 3-glucosídeo/100 g de casca de jabuticaba liofilizada), há similaridade no tipo de tecido. É possível que o tempo de contato com a solução extratora não tenha sido suficiente para aumentar a eficiência de extração das antocianinas nesse tipo de matriz nas faixas estudadas.

3.2. MAE

Todas as antocianinas identificadas nos extratos obtidos por extração estática e extração acelerada por agitação também foram detectadas nos extratos obtidos por MAE.

A análise dos dados do DCFC (Tabela 4) mostrou que a extração total das antocianinas não foi mais eficiente por MAE do que pelos métodos tradicionais. Além disso, as variáveis independentes (concentração de HCl, temperatura e volume de solução extratora), nos níveis avaliados no DCFC, mudaram o perfil das antocianinas quando comparado com os métodos tradicionais (Tabela 3).

Tabela 4: Concentração de antocianinas totais, delphinidina 3-glucosídeo, cianidina 3-glucosídeo e cianidina 3-(succinil)glucosídeo de extratos de casca de jabuticaba obtidos por MAE.

Concentração de antocianinas (mg cianidina 3-glucosídeo/100 g casca de jabuticaba liofilizada) ^a							
Experimento	Variáveis independentes			Total de antocianinas	Delphinidina 3-glucosídeo	Cianidina 3-glucosídeo	Cianidina 3-(succinil)glucosídeo
	% HCl em MeOH	Temperatura (°C)	Volume (mL)				
1	0,3	90	28	1481,7	146,9	1270,7	64,2
2	0,7	90	28	1415,1	135,6	1169,8	109,7
3	0,3	110	28	1346,3	90,7	1032,5	223,0
4	0,7	110	28	1365,2	76,4	894,0	394,8
5	0,3	90	42	1340,4	132,9	1146,6	60,9
6	0,7	90	42	1458,4	136,9	1194,2	127,4
7	0,3	110	42	1269,5	79,7	955,1	234,7
8	0,7	110	42	1698,0	121,8	1162,0	414,1
9	0,5	100	35	1468,8	120,5	1164,28	184,1
10	0,5	100	35	1450,2	120,2	1146,5	183,5

^a Compostos quantificados por curva analítica em HPLC-DAD como equivalente em cianidina 3-glucosídeo

Embora o efeito do aumento da concentração de HCl seja positivo na concentração das antocianinas totais, esse efeito não foi significativo nos teores de delphinidina 3-glucosídeo e cianidina 3-glucosídeo (Tabela 5).

A Tabela 4 mostra que extrações realizadas com maiores concentrações de ácido resultaram em maiores concentrações de cianidina 3-(succinil)glucosídeo. O efeito positivo significativo (Tabela 5- p-valor < 0,05) pode ser facilmente observado comparando os experimentos 5 e 6, que se diferenciam apenas pela concentração de ácido (Figura 2). O experimento 6, realizado utilizando 42 mL de solução 0,7% de HCl em metanol, a 90°C resultou em um extrato com 52% mais cianidina 3(succinil)glucosídeo do que o experimento 5, em que foi utilizada solução extratora 0,3% de HCl em metanol. Estes resultados não são esperados porque antocianinas aciladas a ácidos alifáticos são descritas na literatura como muito susceptíveis à hidrólise ácida (Andersen e Jordheim, 2013). Essa susceptibilidade deveria resultar em menores concentrações de antocianinas aciladas de jabuticaba quando a concentração de HCl fosse aumentada. É possível que o pouco tempo de contato das antocianinas de jabuticaba na MAE não tenha sido suficiente para a hidrólise da cianidina 3(succinil)glucosídeo. Outra hipótese é que a hidrólise do succinil ocorra mais lentamente do que a hidrólise dos grupos estudados anteriormente, como o acetil (Revilla et al., 1998).

Tabela 5: Efeito das variáveis concentração de HCl em MeOH (1), temperatura (2) e volume (3), efeito da curvatura, das interações entre as variáveis e nível de significância (p-valor) no DCFC na concentração de antocianinas obtidas por MAE.

	Efeito na extração de antocianinas (p-valor)				Interação entre as variáveis (p-valor)		
	% HCl (1)	Temperatura (2)	Volume (3)	Curvatura	1x2	1x3	2x3
Total de antocianinas	124,698 (0,42440)	-4,176 (0,97643)	39,510 (0,3154)	-443,191 (0,28364)	98,980 (0,51224)	148,548 (0,35746)	88,556 (0,55287)
Delfinidina	5,1246 (0,81085)	-45,8652 (0,13498)	5,4054 (0,80088)	-30,8578 (0,57019)	8,7791 (0,68662)	17,9285 (0,44114)	11,7986 (0,59458)
3-glucosídeo	3,780 (0,97588)	-184,418 (0,23788)	22,740 (0,85636)	-188,305 (0,55762)	-30,415 (0,80942)	123,493 (0,38094)	72,583 (0,57963)
Cianidina 3-glucosídeo	115,794 (0,00144)	226,108 (0,00037)	11,365 (0,12289)	-224,028 (0,00228)	59,796 (0,00537)	7,126 (0,24676)	4,175 (0,44289)
Cianidina 3-(succinil)glucosídeo							

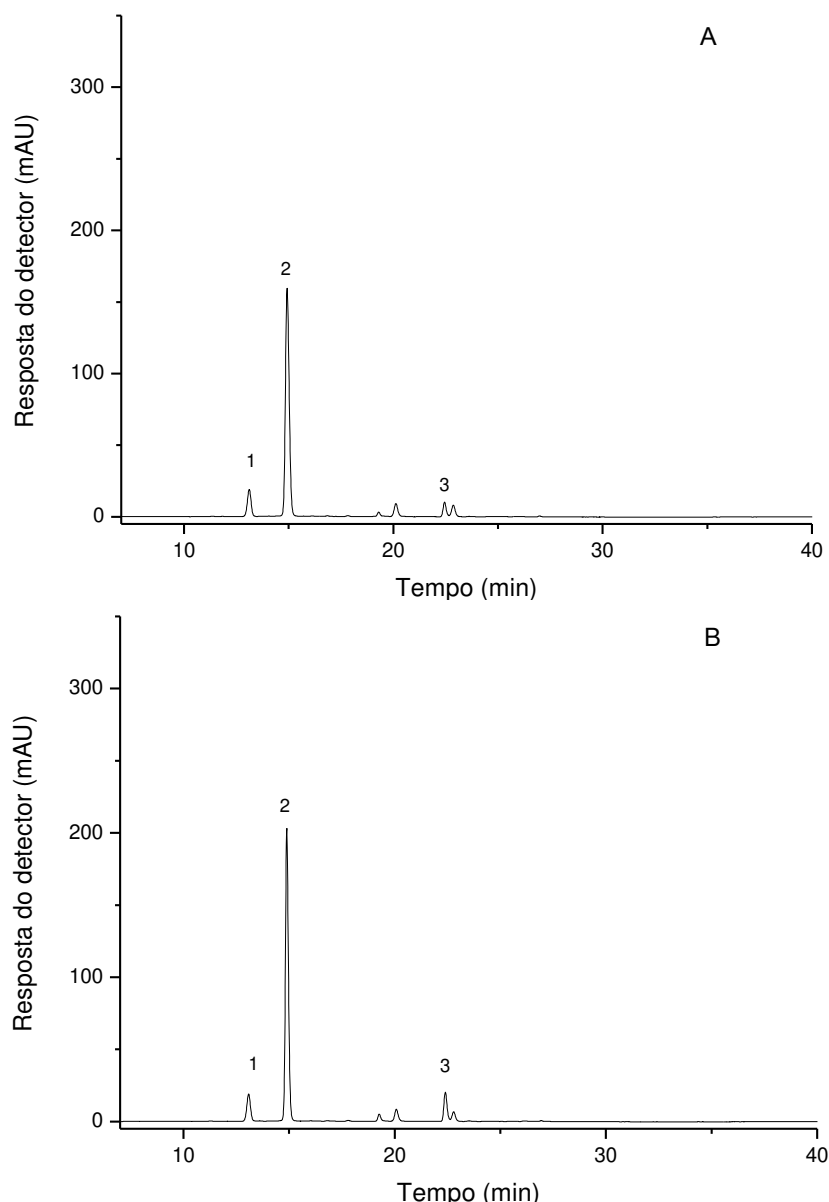


Figura 2: Cromatogramas processados a 520 nm, obtidos por HPLC-DAD, do extrato de antocianinas de jabuticaba obtido por MAE. A corresponde ao experimento 5 no DCFC, utilizando 42 mL de solução 0,3% de HCl em MeOH a 90°C, e B ao experimento 6 no DCFC, utilizando 42 mL de solução 0,7% de HCl em MeOH a 110°C. Picos numerados segundo identificação na Tabela 2: (1) delphinidina 3-glucosídeo, (2) cianidina 3-glucosídeo, (3) cianidina 3-(succinil)glucosídeo.

O aumento da temperatura teve efeito positivo e significativo na concentração de cianidina 3-(succinil)glucosídeo (Tabela 5). Por outro lado, o efeito da temperatura na concentração de cianidina 3-glucosídeo foi negativo, mas não significativo (p -valor $> 0,05$). Quando os experimentos 1 e 8 (Figura 3) são comparados, nota-se que

o efeito do aumento da temperatura é mais intenso quando a concentração de ácido é maior.

Conforme descrito na literatura, um dos efeitos do micro-ondas facilitador da extração é o rompimento do tecido vegetal, causado pelo aumento de pressão no interior das células promovido pelo aquecimento do solvente no interior do tecido vegetal (Chan et al., 2011). Esse rompimento é mais intenso em meio ácido (Andersen e Jordheim, 2013), o que justifica a interação positiva entre as variáveis temperatura e concentração de ácido.

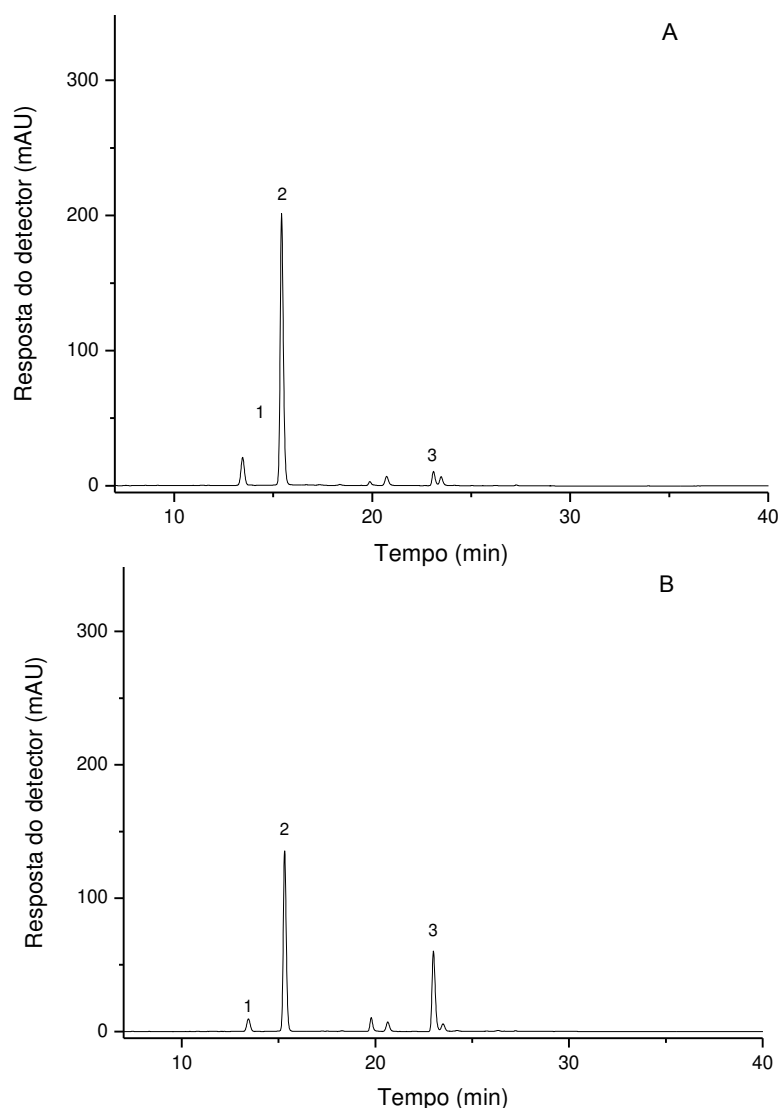


Figura 3: Cromatogramas processados a 520 nm, obtidos por HPLC-DAD, do extrato de antocianinas de jaboticaba obtido por MAE. A corresponde ao experimento 1 no DCFC, utilizando 28 mL de solução 0,3% de HCl em MeOH, a 90°C, e B ao experimento 8 no DCFC, utilizando 42 mL de solução 0,7% de HCl em MeOH, a 110°C. Picos numerados segundo identificação na Tabela 2: (1) delphinidina 3-glucosídeo, (2) cianidina 3-glucosídeo, (3) cianidina 3-(succinil)glucosídeo.

A maior intensidade do pico 3 (Figura 3B) está relacionada à interação positiva e significativa entre as variáveis concentração de HCl em metanol e temperatura na extração de cianidina 3-(succinil)glucosídeo. A superfície de resposta (Figura 4A) ilustra esse efeito. Por outro lado, ocorre uma interação negativa entre as variáveis concentração de HCl em metanol e temperatura na extração da cianidina 3-glucosídeo. Ou seja, altas concentrações de ácido e baixas temperaturas resultam em maiores teores de cianidina 3-glucosídeo (Figura 4B). Percebe-se que os maiores teores de antocianinas totais e de cianidina 3-(succinil)glucosídeo foram obtidos no experimento 8 (42 mL de solução 0,7% de HCl em MeOH a 110°C), possivelmente devido à hidrólise do tecido vegetal causada pela alta concentração de ácido associada à elevada temperatura. O menor teor de cianidina 3-glucosídeo, nesse caso, não pode ter sido causado pela degradação térmica, pois o teor desta mesma antocianina é semelhante ao obtida no experimento 6 (42 mL de solução 0,7% de HCl em MeOH a 90°C).

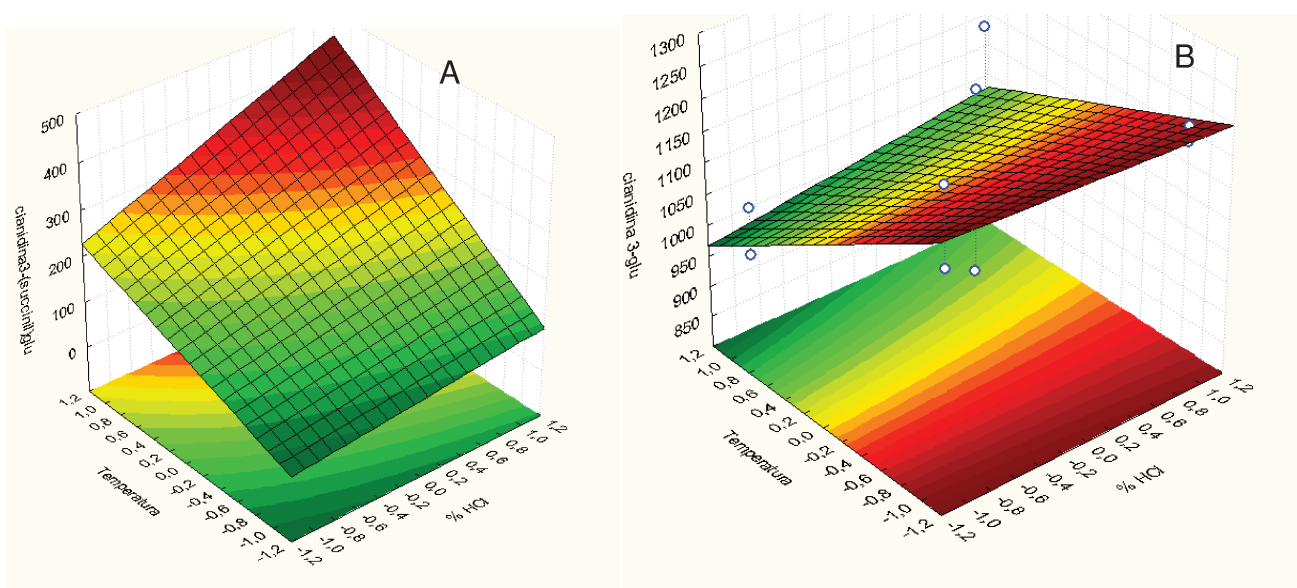


Figura 4: Superfície de resposta da concentração de cianidina 3(succinil)glucosídeo (A) e cianidina 3-glucosídeo (B) em função da % de HCl e da temperatura de extração.

O volume da solução extratora não exerceu efeito significativo sobre as variáveis respostas estudadas (Tabela 5). Este fato pode ser percebido quando comparamos os experimentos 3 e 8 (Figura 5, Tabela 4), observando-se que os picos 1, 2 e 3 apresentam concentrações similares nos dois experimentos.

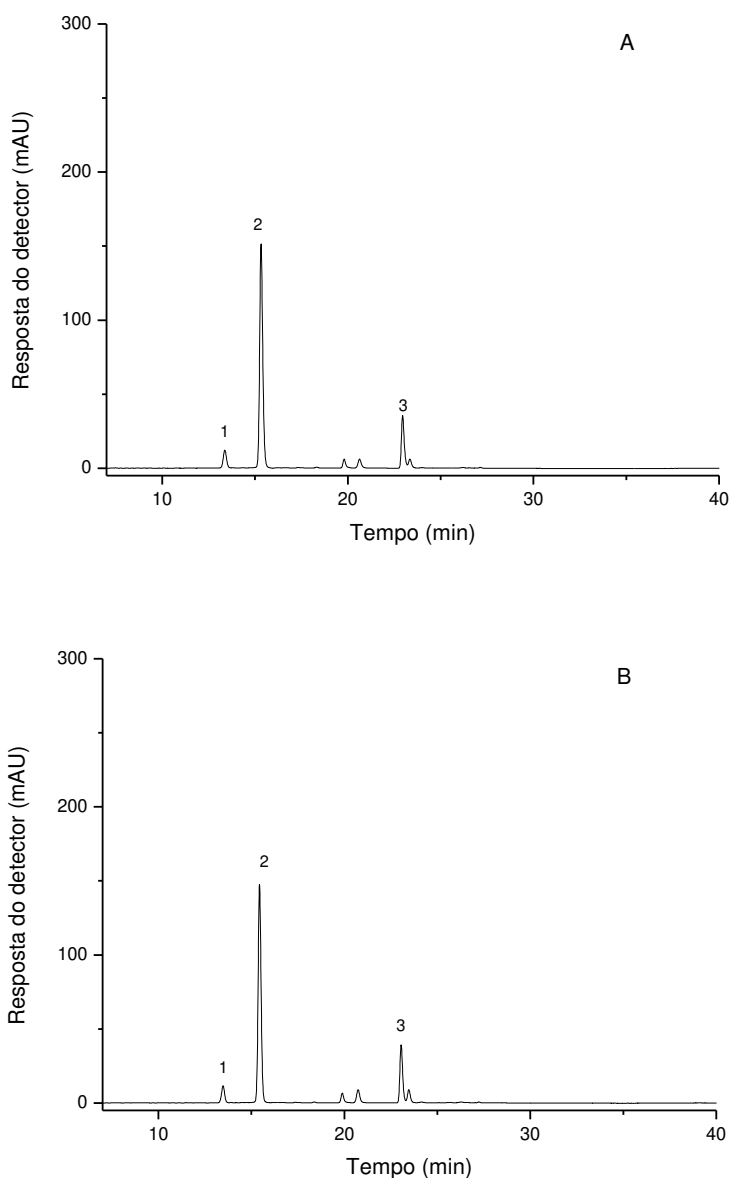


Figura 5: Cromatogramas processados a 520 nm, obtidos por HPLC-DAD, do extrato de antocianinas de jabuticaba obtido por MAE. A corresponde ao experimento 3 no DCFC, utilizando 28 mL de solução 0,3% de HCl em MeOH, a 110°C, e B ao experimento 7 no DCFC, utilizando 42 mL de solução 0,3% de HCl em MeOH, a 110°C. Picos numerados segundo identificação na Tabela 2: (1) delphinidina 3-glucosídeo, (2) cianidina 3-glucosídeo, (3) cianidina 3-(succinil)glucosídeo.

4. Conclusão

Para antocianinas de jabuticaba, a MAE não foi mais eficiente do que a sólido-líquido realizada por métodos tradicionais. Os resultados indicam ainda que não é possível otimizar um método de extração de antocianinas assistida por micro-ondas porque as condições exerceram efeito negativo na extração de antocianinas totais e cianidina 3-glucosídeo, composto majoritário em jabuticaba.

Os experimentos mostraram também que ocorre uma variação no perfil de antocianinas de acordo com as condições da MAE. Desta forma, o perfil obtido por MAE possivelmente não refletiu o perfil das antocianinas na forma nativa, embora as antocianinas monoglicosiladas derivadas de cianidina e delphinidina apresentaram comportamentos semelhantes. Os resultados obtidos por HPLC-DAD-MSⁿ indicam que o aquecimento por micro-ondas nas temperaturas avaliadas não induziu degradação das antocianinas, pois não foram observados compostos de baixo peso molecular nas condições estudadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andersen, Ø.M.; Jordheim, M.C. 2013. Basic Anthocyanin Chemistry and Dietary Sources. In: Anthocyanins in Health and Disease, ed. T.C. Wallace, M. Giusti., pp. 13-90. CRC Press, Boca Raton.

Chan, C. H.; Yosoff, R.; Ngoh, G. C.; Kung, F. W. L. 2011. Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants. *Journal of Chromatography A*. 1218: 6213 – 6225.

De Rosso, V.V.; Mercadante, A.Z. 2007. HPLC-PDA-MS/MS of anthocyanins and carotenoids from dovyalis and tamarillo fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 9135-9141.

Degenhardt, A.; Knapp, H.; Winterhalter, P. 2000. Separation and purification of anthocyanins by high-speed countercurrent chromatography and screening for antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 338-343.

Faria, A.F.; Marques, M.C.; Mercadante, A.Z. 2011. Identification of bioactive compounds from jambolão (*Syzygium cumini*) and antioxidant capacity evaluation in different pH conditions. *Food Chemistry*, 126: 1571-1578.

Garofulic, I.E.; Dragović-Uzelac, V.; Jambrak, A.R.; Jukić, M. 2013. The effect of microwave assisted extraction on the isolation of anthocyanins and phenolic acids from sour cherry Marasca (*Prunus cerasus* var. Marasca). *Journal of Food Engineering*, 117: 437-442.

Leite-Legatti, A. V.; Batista, A. G.; Dragano, N. R. V.; Marques, A. C.; Malta, L. G.; Riccio, M. F.; Eberlin, M. N.; Machado, A. R. T.; Carvalho-Silva, L. B.; Ruiz, A. L. T. G.; Carvalho, J. E.; Pastore, G. M.; Maróstica, M. R. 2012. Jaboticaba peel: Antioxidant compounds, antiproliferative and antimutagenic activities, *Food Research International*, 49: 596-603.

Liaqid, A.; Guerrero, R.F.; Cantos, E.; Palma, M.; Barroso, C.G. 2011. Microwave assisted extraction of anthocyanins from grape skins. *Food Chemistry*, 124: 1238-1243.

Revilla, E.; Ryan, J.M.; Martín-Ortega, G. 1998. Comparison of Several Procedures Used for the Extraction of Anthocyanins from Red Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 4592–4597.

Teng, H.; Lee, W.Y.; Choi, Y.H. 2013. Optimization of microwave assisted extraction for anthocyanins, polyphenols and antioxidants from raspberry (*Rubus coreanus* Miq.) using response surface methodology. *Journal of Separation Science*, 36: 3107–3114.

Trevisan, L. M.; Bobbio, F. O.; Bobbio, P. A. 1972. Carbohydrates, organic acids, and anthocyanins of *Myrciaria jaboticaba*. *Journal of Food Science*, 37: 818-19.

Wen, Y.; Chen, H.; Zhou, X.; Deng, Q.; Zhao, Y.; Zhao, C.; Gong, X. 2015. Optimization of the microwave-assisted extraction and antioxidant activities of

anthocyanins from blackberry using a response surface methodology. *RSC Advances*, 5: 19686–19695.

Wu, X.; Prior, R.L. 2005. Identification and characterization of anthocyanins by high-performance liquid chromatograph- electrospray ionization- tandem mass spectrometry in common foods in the United States: vegetables, nuts and grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 3101–3113.

Yang, Z.; Zhai, W. 2010. Optimization of microwave-assisted extraction of anthocyanins from purple corn (*Zea mays* L.) cob and identification with HPLC–MS. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11: 470–476.

Zou, T.; Wang, W.; Gou, H.; Zhu, Y.; Luo, X.; Liu, F.; Ling, W. 2012. Optimization of microwave assisted extraction of anthocyanins in extract using HPLC-ESI-MS. *Journal of Food Science*, 71: 46–50.

CAPITULO IV

O PERFIL DE ANTOCIANINAS DE CEBOLA ROXA É ALTERADO PELAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO POR MICRO-ONDAS

Marcella C. Marques, Lilian R.B. Mariutti, Fábio Yamashita, Adriana Z.
Mercadante

A ser submetido à *Food Chemistry*

O PERFIL DE ANTOCIANINAS DE CEBOLA ROXA É ALTERADO PELAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO POR MICRO-ONDAS

Resumo

As antocianinas são pigmentos hidrofílicos com cor variando do vermelho ao azul e amplamente conhecidas por apresentarem baixa estabilidade tanto a altas temperaturas como em altos valores de pH. Extração assistida por micro-ondas (MAE) utiliza o aquecimento rápido para facilitar a migração dos compostos de interesse da matriz para a solução extratora, tendo como vantagens o baixo tempo de extração e baixo volume de solvente. O efeito da MAE no perfil de antocianinas de cebola roxa liofilizada foi estudado através de um planejamento experimental DCFC (2³) tendo como variáveis independentes a concentração da solução de HCl em metanol (0,3 - 0,7 %), a temperatura (90 a 110 °C) e o volume de solução extratora (28 - 42 mL). Além disso, foi realizado um planejamento *steepest ascent* (SA) de 4 pontos com as mesmas variáveis nos seguintes níveis: concentração da solução de HCl em metanol 0,1 e 0,25%, temperatura de 70 e 85 °C e volume de solução extratora 45 e 54 mL. As variáveis resposta foram as concentrações de antocianinas totais, antocianinas aciladas a ácido succínico, antocianinas aciladas a ácido malônico e antocianinas não-aciladas, determinadas por HPLC-DAD-MS/MS. As amostras foram submetidas a uma potencia máxima de 850 W por 1 min, para que a solução atingisse a temperatura determinada, e em seguida, a temperatura foi mantida constante por 5 min em potencia máxima de 350 W. Maiores volumes de metanol acidificado exerceram efeito positivo na extração de antocianinas totais. Menores concentrações de HCl em metanol, menores temperatura e menores volumes resultaram em maior concentração de antocianinas aciladas a ácido malônico, enquanto alta concentração de HCl em metanol, altas temperaturas e elevados volumes resultaram em maiores concentrações de antocianinas aciladas a ácido succínico. Não foram detectados produtos de baixo peso molecular que indicassem a degradação térmica das antocianinas durante a MAE nas condições testadas.

Palavras chave: antocianinas, extração assistida por micro-ondas, LC-MS/MS

1. Introdução

Antocianinas são compostos fenólicos largamente distribuídos no reino vegetal, podendo ser acumulados em folhas, flores, frutos e em partes subterrâneas das plantas conferindo cor (Andersen e Jordheim, 2013). A cebola (*Allium cepa*) é um vegetal cultivado e consumido em grandes quantidades ao redor do mundo, e que pode apresentar cor branca, dourada e roxa. A cor da cebola roxa se deve à presença de antocianinas. Já foram separadas 10 antocianinas em cebola roxa: cianidina 3-glucosídeo, cianidina 3-diglucosídeo, cianidina 3-(3"-malonil)glucosídeo, cianidina 3-(6"-malonil)glucosídeo, cianidina 3-(6"-malonil)diglucosídeo, cianidina 3-(3',6"-dimalonil)glucosídeo, cianidina 4'-glucosídeo, cianidina 3,4'-diglucosídeo, cianidina 3-(3"-glucosil-6"-malonil- β -glucosídeo)-4'-glucosídeo, cianidina 7-(3"-glucosil-6"-malonil-glucosídeo)-4'-glucosídeo (Fossen et al., 2003; Fossen et al., 1996). A identidade desses compostos foi confirmada por ressonância magnética nuclear. A cianidina 3-(6"-malonil)glucosídeo foi descrita como majoritária em 3 cultivares de cebola roxa (Fossen et al., 1996)

A extração assistida por micro-ondas (MAE) de antocianinas foi estudada anteriormente, e se mostrou mais eficiente para a extração de antocianinas de casca de uva do que o método de extração estática sob refrigeração por 5 h (Liazid et al., 2011). Nesse estudo, para avaliar a extração de antocianinas, foi realizado um planejamento experimental, variando em 2 níveis a concentração de metanol em água (50-80%), presença ou ausência da agitação, temperatura (50-100°C), potência do equipamento (100-500W), tempo de extração (5-20 min) e volume de solução extratora. Posteriormente, o efeito das variáveis temperatura, concentração de metanol em água e tempo de extração em 5, 4 e 6 níveis, respectivamente, foi individualmente avaliado (Liazid et al., 2011). Em todos os experimentos, as variáveis resposta foram: concentração de antocianinas totais e concentração da antocianina majoritária, determinadas por HPLC-DAD (Liazid et al., 2011). Como as concentrações individuais das antocianinas extraídas foram determinadas somente pelo método otimizado de MAE e por extração estática, que foi realizada utilizando solvente acidificado com 5 % de ácido fórmico não é possível verificar o efeito individual das variáveis avaliadas no planejamento experimental no perfil das antocianinas ou isolar o efeito da MAE na extração das antocianinas.

Temperatura, potência do equipamento e tempo de irradiação foram avaliados utilizando planejamento experimental composto central para extração de antocianinas de cereja (*Prunus cerasus* var Marasca) por MAE (Garofulic et al., 2013). Os parâmetros fixos foram tempo para atingir a temperatura determinada, tempo de resfriamento, agitação, massa de amostra e solvente de extração (MeOH 80% acidificado com 0,1 % de HCl). As concentrações individuais das antocianinas foram determinadas por HPLC-DAD, e as concentrações de antocianinas totais e da antocianina majoritária (cianidina-3glucosilrutinosídeo) foram utilizadas como respostas para otimização do método de extração. O método otimizado de MAE (60 °C, 400 W e 9 min) resultou em maior teor de antocianinas totais do que o método de extração convencional. A MAE não promoveu a alteração do perfil de antocianinas, ou seja, o teor relativo das antocianinas ligadas a diferentes açúcares foi constante em todos os experimentos do planejamento (Garofulic et al., 2013).

Outros estudos para a otimização da extração por MAE de antocianinas de amora *Rubus* (Wen et al., 2015) e *Morus atropurpurea* (Zou et al., 2012), de framboesas (Teng et al., 2013) e de milho roxo (Yang e Zhai, 2010) utilizaram métodos espectrofotométricos para determinação da concentração de antocianinas totais, utilizada como variável resposta. Desta forma, nesses estudos não foram avaliados o efeito da extração no perfil das antocianinas ou a possível degradação térmica dos compostos durante a extração.

A influência combinada da MAE e da concentração do ácido clorídrico da solução extratora no perfil de antocianinas ainda não foi investigada. Porém, para extração sólido líquido de antocianinas de casca de uva já foi reportado que o teor de antocianinas totais foi 9% maior na extração com solvente acidificado que sem ácido (Revilla et al., 1998). Além disso, o perfil de antocianinas foi dependente do tipo de ácido ligado a estrutura e do ácido no solvente utilizado na extração. Por exemplo, a concentração da antocianina acilada a um ácido alifático (ácido acético) foi 6 vezes maior quando extraída com solvente não acidificado enquanto maiores teores de antocianinas aciladas ao ácido cinâmico (ácido p-cumárico). A modificação do perfil de antocianinas está relacionada ao grau de hidrólise ácida do grupo ácido ligado a antocianina. Enquanto o acetil é muito susceptível à hidrólise ácida, a antocianina acilada a ácido p-cumárico, é menos susceptível à hidrólise (Revilla et al., 1998).

Utilizando cebola roxa liofilizada como modelo, este estudo teve o objetivo de estudar a influência combinada da temperatura da MAE, volume e concentração de ácido em antocianinas com diferentes graus de complexidade.

2. Materiais e Métodos

2.1. Amostras

Foram adquiridos 20 kg de cebola roxa (*Allium cepa* L.) na central de abastecimento (CEASA) de Campinas, São Paulo, Brasil. Após transporte para o laboratório, a casca da cebola foi removida, a fração comestível foi cortada e imediatamente congelada através da imersão em nitrogênio líquido. A cebola congelada foi liofilizada (Liotop L101), homogeneizada em multiprocessador doméstico e o pó resultante foi embalado a vácuo, e mantido em freezer a -36°C até análise.

2.2. Reagentes e padrões

O padrão de cianidina 3-glucosídeo (96% de pureza) foi adquirido da Extrasynthèse (Lyon Nord, França). Os solventes e os reagentes grau cromatográfico (HPLC) foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha) e da Mallinckrodt Baker (Phillipsburg, EUA), os de grau p.a. da Labsynth (São Paulo, Brasil). A água ultrapura foi obtida em sistema Milli-Q (Millipore, Billerica, EUA).

2.3. Extração acelerada por agitação

A extração sólido-líquido de $0,4 \pm 0,02$ g de amostra liofilizada homogeneizada foi realizada, em triplicata, sob agitação em turrax durante 3 min com 25 mL de solução de metanol contendo 1% de ácido clorídrico. O sobrenadante foi separado por filtração em filtro de papel sob vácuo. O retentado foi re-extraído mais 4 vezes com 25 mL da mesma solução extratora, até que o filtrado estivesse incolor (Faria et al., 2011). Os filtrados foram combinados e concentrados em evaporador rotativo ($T <$

40 °C) (modelo R114, Büchi, Flawil, Suíça). O extrato concentrado foi diluído até volume conhecido em água contendo 1% de ácido clorídrico, e então armazenado em freezer -80 °C até análise cromatográfica.

2.4. Extração estática

As antocianinas foram extraídas, em triplicata, também com solução de metanol contendo 1% de ácido clorídrico em repouso sob refrigeração (4 °C) por 16 horas. O sobrenadante foi separado por filtração a vácuo, e o retentado foi submetido à nova extração sob refrigeração por 4 h, este procedimento foi repetido mais 2 vezes até que o filtrado estivesse incolor (Degenhardt et al, 2000). Assim como anteriormente, os extratos foram combinados, seguindo de concentração em evaporador rotativo até eliminação do metanol, diluído em água com 1% de ácido clorídrico em volume conhecido e armazenado em freezer -80 °C até análise.

2.5. Extração assistida por micro-ondas

A extração de antocianinas assistida por micro-ondas (Start-E, Milestone, Sorisole, Itália) (MAE) foi realizada segundo um delineamento composto de face centrada (DCFC) 2^3 com 2 repetições no ponto central, totalizando 10 experimentos. As variáveis independentes foram concentração de HCl em MeOH, temperatura e volume de solução extratora e as faixas de valores para estas variáveis independentes estão apresentadas na Tabela 1 e foram escolhidas com base em estudos publicados anteriormente (Liazid et al, 2011; Garofulic et al., 2013) e em testes preliminares. Os parâmetros fixos em todos os experimentos foram massa da amostra ($0,4 \pm 0,02$ g), potência máxima do equipamento (850 W, por 40 s até atingir a temperatura de extração definida no planejamento, e 350 W a temperatura constante por 5 min), agitação (240 rpm) e tempos de extração (5 min 40 s) e de resfriamento (30 min). Os experimentos foram realizados em ordem aleatória.

Tabela 1: Variáveis independentes codificadas e não codificadas usadas no DCFC e seus respectivos níveis.

Variáveis		Níveis		
	Codificada	-1	0	1
% HCl em MeOH	X1	0,3	0,5	0,7
Temperatura (°C)	X2	90	100	110
Volume (mL)	X3	28	35	42

Os tubos de teflon foram fechados e colocados no equipamento de micro-ondas para irradiação, que foi realizada em duas fases. Na primeira fase, aqui chamada de aquecimento, os tubos foram submetidos a uma potência máxima de 850 W por 40 s para que a solução+amostra atingisse a temperatura determinada no delineamento experimental. Na segunda fase, chamada de fase de extração, a temperatura estabelecida no planejamento foi mantida constante por 5 min utilizando potência máxima de 350 W.

A temperatura de extração foi medida durante toda a extração por meio de um termopar inserido no centro do tubo de extração. Com base na medida de temperatura, o controlador utilizou a potência adequada (0 - 850 W) para que a solução atingisse a temperatura determinada no planejamento (90 - 110 °C) por 40 s. De forma similar, a potência aplicada para manter a temperatura de extração foi controlada pelo equipamento, variando entre 0 e 350 W durante 5 min de extração.

Após a irradiação, os tubos foram imediatamente colocados por 30 min em banho de gelo para acelerar o resfriamento. A seguir, o extrato foi filtrado em filtro de papel e o retentado foi lavado com até 20 mL de solução extratora, até que a solução filtrada e o retentado no papel estivessem incolores (Figura 1). Em seguida o extrato foi concentrado em evaporador rotativo com temperatura do banho a temperatura < 40 °C. O extrato concentrado foi diluído com água ultrapura acidificada com 1% de HCl até volume conhecido e em seguida armazenado em freezer a -80 °C. Os extratos permaneceram a -80 °C por no máximo 5 dias até as análises cromatográficas.

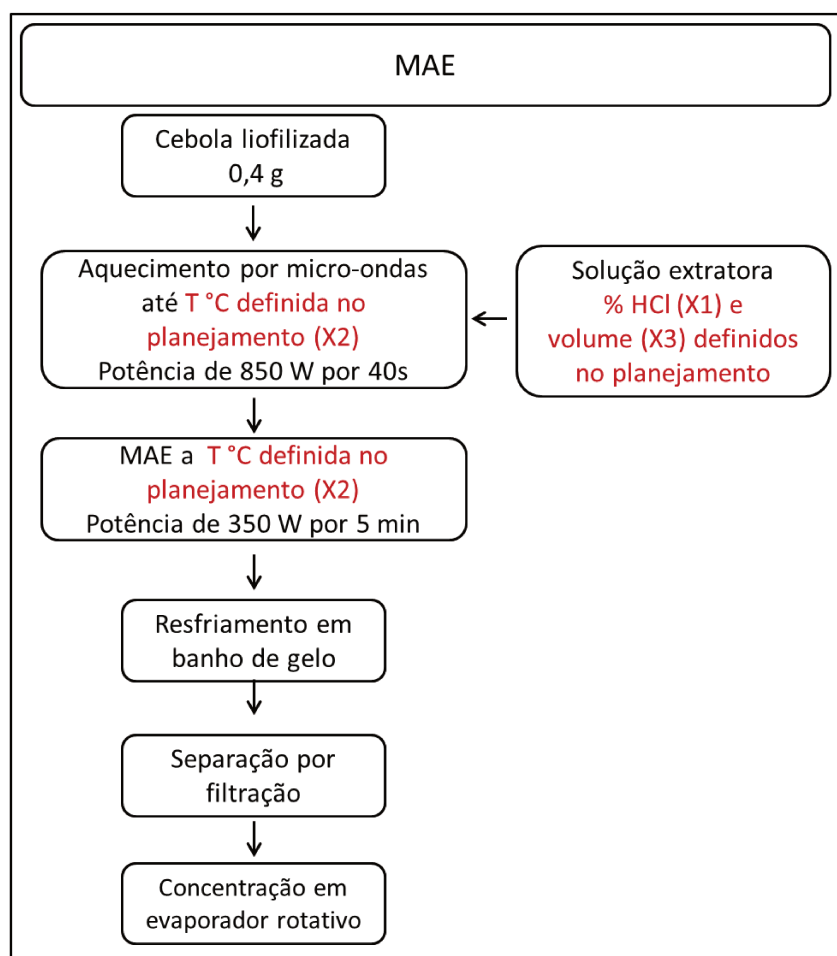


Figura 1: Fluxograma de extração assistida por micro-ondas de antocianinas, onde X são as variáveis independentes.

Após a análise estatística dos resultados do DCFC, foram realizados 4 experimentos complementares, *steepest ascent* (SA), utilizando as mesmas variáveis independentes do DCFC. O maior teor de antocianinas aciladas a ácido malônico foi utilizado como critério de escolha das condições de extração com menor modificação no perfil das antocianinas. Desta forma, no SA, a concentração de HCl em MeOH variou de 0,10 a 0,25%, a temperatura de 70 a 85 °C e o volume de solução variou de 45 a 54 mL.

2.6. Determinação de antocianinas por HPLC-DAD-MS/MS

A separação, identificação e quantificação das antocianinas foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (modelo SPD-M20A, Shimadzu, Japão) acoplado aos detectores de arranjo de diodos (DAD) e ao espectrômetro de massas (Amazon Speed, Bruker Daltonics, Bremen, Germany), com interface "eletrospray" (ESI) e analisador de massas "ion trap". As antocianinas foram separadas em coluna C₁₈ Luna (5 µm, 250 mm x 4,6 mm, Phenomenex, Torrance, EUA) utilizando como fase móvel um gradiente linear de água/metanol, ambos acrescidos de 5% de ácido fórmico, de 90:10 para 60:40 em 20 min, seguindo para 20:80 em 15 min e mantendo esta proporção por mais 5 min, com vazão de 0,9 mL/min e temperatura da coluna mantida a 29 °C (Faria et al., 2011). As antocianinas foram quantificadas individualmente utilizando um ponto de concentração 0,02 mg/mL de cianidina 3-glucosídeo, considerando que a curva analítica de cianidina 3-glucosídeo é linear (De Rosso e Mercadante, 2007). As concentrações de todas as antocianinas individuais foram expressas em equivalentes de cianidina 3-glucosídeo. Os cromatogramas foram processados em 520 nm.

Após a passagem pelo DAD, o fluxo da fase móvel foi dividido de forma que apenas 0,15 mL/min entrasse na fonte de ionização ESI no modo positivo. Os parâmetros do MS foram ajustados em: voltagem no capilar de 2,5 kV; voltagem de saída no capilar de 95,2 kV; energia de fragmentação de 1,2 V; temperatura do gás secante (N₂) de 350 °C com fluxo de 8 l/min; nebulizador a 30 psi; *endplate offset* - 500 V. Os espectros de massas foram adquiridos na faixa de valores de *m/z* entre 100 e 1000 e o MS/MS foi adquirido no modo automático com energia de fragmentação de 1,2 V (Faria et al., 2011).

A identificação das antocianinas foi realizada com base na combinação dos seguintes parâmetros: ordem de eluição em coluna de fase reversa e características dos espectros de UV-vis e de massas em comparação com dados disponíveis na literatura (Wu e Prior, 2005; Fossen et al., 2003; Fossen et al., 1997; Faria et al., 2011).

2.7. Análise estatística

A análise estatística do planejamento experimental foi realizada com o software Statistica versão 7.0 (Statsoft, Tulsa, OK, USA). Os gráficos, média e desvio-padrão dos resultados das análises de antocianinas totais e teores das antocianinas individuais analisados HPLC foram calculados utilizando o software Origin versão 8.1. Os resultados obtidos foram comparadas através da análise de variância (ANOVA) utilizando um intervalo de confiança de 95 %.

3. Resultados e Discussão

Nove antocianinas foram identificadas em cebola roxa, sendo 8 derivadas de cianidina e 1 derivada de peonidina (Tabela 2). Os compostos glicosilados não acilados (picos 1 a 4) e acilados a ácido malônico (picos 6 e 7) foram identificados anteriormente em cebola roxa (Wu e Prior, 2011; Fossen et al., 1996).

Tabela 2: Características cromatográficas e espectroscópicas, obtidas por HPLC-DAD-MS/MS, de antocianinas de cebola roxa.

Pico ^a	Composto	t _R (min) ^b	λ _{max} (nm) ^c	[M] ⁺	Íon fragmentos obtidos por MS/MS (m/z)
1	Cianidina 3,5-diglucosídeo	10,7 - 10,9	511	611	n.d.
2	Cianidina 3-glucosídeo	14,7 - 14,8	518	449	287 [M-162] ⁺
3	Cianidina 3-diglucosídeo	15,5 - 15,6	518	611	287 [M-324] ⁺
4	Peonidina 3-glucosídeo	17,5 - 17,6	519 - 521	463	301 [M-162] ⁺
5	Cianidina 3-(3"succinil)glucosídeo	19,0 - 19,1	520	549	287 [M-162-100] ⁺
6	Cianidina 3-(6"malonil)glucosídeo	19,6 - 19,7	520	535	287 [M-162-86] ⁺ ; 449 [M-86] ⁺
7	Cianidina 3-(6"malonil)diglucosídeo	20,4 - 20,5	521	697	287 [M-162-162-86] ⁺
8	Cianidina 3-(6"succinil)glucosídeo	22,3 - 22,4	521	549	287 [M-162-100] ⁺
9	Cianidina 3-(6"succinil)diglucosídeo	23,0 - 23,1	521	711	287 [M-162-162-100] ⁺ ; 449 [M-100] ⁺

^a Picos numerados de acordo com cromatograma da Figura 2;

^b Intervalo de tempo de retenção em coluna C₁₈ Luna (5 μm, 250 mm x 4.6 mm, Phenomenex);

^c Gradiente linear de água/MeOH, ambos adicionados de 5%v/v ácido fórmico, de 90:10 a 60:40 em 20 min, então de 20:80 a 15 min, essa proporção foi mantida por 5 min.

n.d. não detectado

As antocianinas aciladas ao ácido succínico (picos 5, 8 e 9) foram encontradas pela primeira vez em cebola roxa. A presença do ácido succínico na cianidina 3-(succinil)glucosídeo (picos 5 e 8) foi observada devido a presença do íon molecular $[M]^+$ a m/z 549 dos íons fragmentos a m/z 287 $[M-162-100]^+$ no espectro MS/MS. A perda de 100 u refere-se a uma unidade de ácido succínico, enquanto a perda de 162 u refere-se a perda de uma molécula de hexosídeo. O hexosídeo foi identificado como uma glucose devido à presença deste açúcar em todas as antocianinas de cebola (Fossen et al., 1996). A posição da ligação do ácido na cianidina 3-(3''succinil)glucosídeo foi determinada com base na ordem de eluição. Os compostos acilados na posição 3'' possuem menor tempo de retenção em coluna C18 em fase reversa, do que as antocianinas aciladas na posição 6'' (Wu e Prior, 2011).

A cianidina 3-(6''succinil)diglucosídeo (pico 9) apresentou $[M]^+$ a m/z 711 no espectro de MS e no MS/MS foram observados os íons fragmentos a m/z 287 $[M-162-162-100]^+$ e m/z 449 $[M-100]^+$.

O perfil de antocianinas da cebola roxa obtido por extração estática foi muito similar ao do obtido por agitação (Figura 2); porém, a concentração de antocianinas totais obtida por extração estática foi significativamente maior do que a da extração por agitação (Tabela 3). Durante a extração estática as antocianinas de cebola permaneceram em contato com o ácido da solução extratora por 24 h, tempo maior do que na extração por agitação. Este fato pode ser relacionado à ruptura do tecido vegetal e liberação das antocianinas para a solução, o que resulta em maior eficiência de extração (Andersen e Jordheim, 2013).

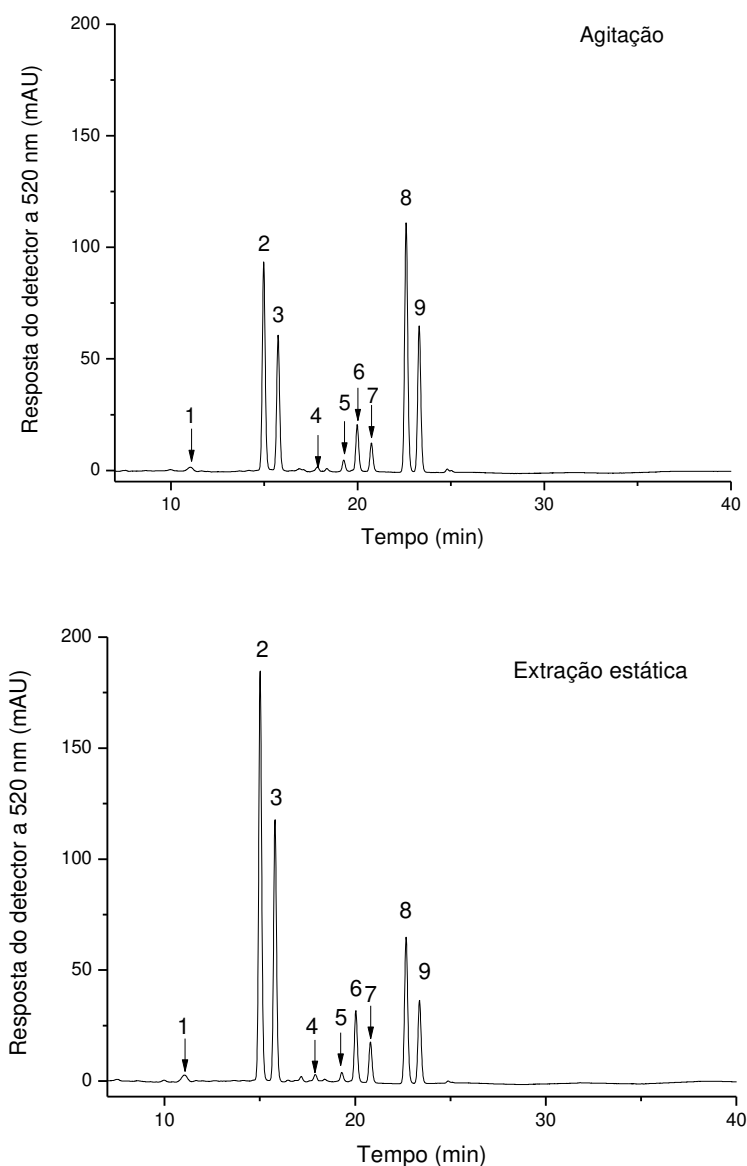


Figura 2: Cromatogramas processados a 520 nm, obtidos por HPLC-DAD, do extrato de antocianinas de cebola roxa obtido por extração acelerada por agitação e extração estática. Os picos foram numerados segundo a identificação apresentada na Tabela 2. Compostos: (1) cianidina 3,5-diglucosídeo, (2) cianidina 3-glucosídeo, (3) cianidina 3-diglucosídeo, (4) peonidina 3-glucosídeo, (5) cianidina 3-(3''succinil)glucosídeo, (6) cianidina 3-(6''malonil)glucosídeo, (7) cianidina 3-(6''malonil)diglucosídeo, (8) cianidina 3-(6''succinil)glucosídeo, (9) cianidina 3-(6''succinil)diglucosídeo.

Tabela 3. Conteúdo de antocianinas de cebola roxa em extratos obtidos por extração acelerada por agitação e por extração estática.

	Concentração (mg cianidina 3-glucosídeo /100 g cebola liofilizada) ^c	
	Agitação	Estático
Total de antocianinas	131,6 ± 3,8 ^a	146,1 ± 3,0 ^b
Antocianinas não aciladas	53,4 ± 0,2 ^a	92,3 ± 3,6 ^b
Antocianinas aciladas a ácido malônico	11,3 ± 1,4 ^a	11,4 ± 4,2 ^a
Antocianinas aciladas a ácido succínico	66,2 ± 4,7 ^a	42,2 ± 10,8 ^b
Antocianinas aciladas totais	77,5 ± 6,0 ^a	53,5 ± 7,2 ^b
Antocianinas derivadas de cianidina 3-glucosídeo	80,72 ± 2,1 ^a	89,6 ± 1,8 ^b
Antocianinas derivadas de cianidina 3-diglucosídeo	49,0 ± 1,6 ^a	54,0 ± 1,0 ^b

^{a, b} Médias ± desvio-padrão (n=3) significativamente diferentes com 95% de significância

^c Compostos quantificados em HPLC-DAD como equivalente em cianidina 3-glucosídeo

Total de antocianinas: somas de todos os picos observados na Figura 2

Antocianinas não aciladas: soma dos picos 1 a 4; antocianinas aciladas a ácido malônico: soma dos picos 6 e 7; antocianinas aciladas a ácido succínico: soma dos picos 5, 8 e 9; antocianinas aciladas: soma dos picos 6 a 9; antocianinas derivadas de cianidina 3-glucosídeo: soma dos picos 2, 5, 5 e 8; antocianinas derivadas de cianidina 3-diglucosídeo: soma dos picos 3, 7 e 9.

Os teores de antocianinas aciladas a ácido malônico não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$) nos extratos obtidos tanto pela extração acelerada por agitação quanto pela extração estática, no entanto, o teor total de antocianinas aciladas a ácido succínico foi 36% menor na extração estática em relação à acelerada por agitação. Desta forma, o teor de antocianinas aciladas totais foi significativamente mais baixo no extrato obtido por extração estática, fato este que pode ser explicado pela conversão das espécies aciladas em não aciladas, uma vez que o contato das antocianinas em solução com ácido está diretamente relacionado à hidrólise do grupo ácido e alteração do perfil das antocianinas (Andersen e Jordheim, 2013).

Revilla e colaboradores (1998) realizaram um estudo comparando diferentes métodos de extração de antocianinas de casca de uva. Neste trabalho os pesquisadores extraíram as antocianinas de cascas de uva por contato com solução extratora acidificada (MeOH adicionado de 1% de HCl 12 N) por 9 e 20 h em temperatura ambiente. Os extratos obtidos por estes métodos apresentaram valores semelhantes de antocianinas totais (91 e 94 mg de cianidina 3-glucosídeo /100 g de uva fresca), no entanto a extração de malvidina 3-(acetil)glucosídeo foi maior no extrato em que as cascas permaneceram em contato com a solução ácida por 20h.

Esse comportamento foi o oposto do observado para as antocianinas aciladas a ácido succínico em extratos de cebola roxa.

As estruturas vegetais da cebola e da casca de uva são distintas, e por isso é possível que a migração dos compostos para solução se dê em diferentes velocidades. O teor de antocianinas aciladas a ácido succínico em solução foi elevado em poucos minutos de contato, como pode-se perceber na extração acelerada por agitação. Provavelmente os compostos acilados foram hidrolisados quando em solução por um tempo prolongado.

Todas as antocianinas identificadas nos extratos de cebola roxa obtidos por extração acelerada por agitação e extração estática também foram detectadas nos extratos obtidos por MAE. As antocianinas derivadas de cianidina 3-glucosídeo representaram 61% das antocianinas extraídas de cebola roxa, enquanto as antocianinas derivadas de cianidina 3-diglucosídeo representaram 37% do total extraído, esses valores foram os mesmos tanto por extração acelerada por agitação quanto por extração estática.

A análise dos dados do DCFC mostrou que a extração total das antocianinas pode ser mais eficiente por MAE do que pelos métodos tradicionais. No entanto, as variáveis independentes (concentração de HCl, temperatura e volume de solução extratora) nos níveis avaliados no DCFC afetaram o perfil das antocianinas.

A Tabela 4 mostra que extrações realizadas com maiores concentrações de ácido resultaram em maiores teores de antocianinas não aciladas e de antocianinas aciladas a ácido succínico (experimentos 2, 4, 6 e 8). Esse efeito positivo foi significativo (Tabela 5- p -valor $< 0,05$). Por outro lado a concentração de HCl apresentou efeito significativo e negativo na concentração das antocianinas aciladas a ácido malônico e antocianinas aciladas totais (Tabela 5). Devido a estes efeitos opostos, a concentração de ácido não apresentou efeito significativo no teor de antocianinas totais, como pode ser facilmente percebido quando comparamos os experimentos 5 e 6 do DCFC (Tabela 4).

Tabela 4: Concentração de antocianinas totais, não aciladas, aciladas, malonil derivadas e succinil derivadas em extratos de cebola obtidos por MAE.

Concentração de antocianinas (mg cianidina 3-glucosídeo /100 g cebola liofilizada) ^a											
Experimento	Variáveis independentes			Total de antocianinas	Antocianinas não aciladas	Antocianinas aciladas a ácido malônico	Antocianinas aciladas a ácido succínico	Antocianinas aciladas totais	Antocianinas derivadas de cianidina 3-glucosídeo	Antocianinas derivadas de cianidina 3-diglucosídeo	
	% HCl em MeOH	Temperatura (°C)	Volume (mL)								
DCFC	1	0,3	90	28	137,19	40,07	60,55	36,57	97,12	90,78	43,82
	2	0,7	90	28	155,55	64,49	6,16	84,91	91,07	108,42	43,55
	3	0,3	110	28	161,38	48,64	44,05	68,69	112,74	111,21	46,97
	4	0,7	110	28	158,22	62,09	3,67	92,46	96,13	126,8	28,14
	5	0,3	90	42	167,73	55,09	45,32	67,32	112,64	110,8	52,78
	6	0,7	90	42	167,41	73,17	7,56	86,68	94,24	116,2	46,98
	7	0,3	110	42	158,18	51,93	21,81	84,44	106,25	113,49	41,14
	8	0,7	110	42	152,74	62,50	1,76	88,49	90,25	129,15	20,56
	9	0,5	100	35	133,08	47,33	13,95	71,8	85,75	94,18	36,1
	10	0,5	100	35	136,71	51,88	8,33	76,5	84,83	98,92	34,85
Steepest ascent	1	0,25	85	45	160,56	52,59	49,47	58,5	107,97	104,84	52,7
	2	0,2	80	48	161,20	49,85	71,81	39,54	111,35	104,98	53,01
	3	0,15	75	51	161,96	49,13	89,04	23,78	112,82	104,79	53,54
	4	0,1	70	54	161,58	45,89	105,66	10,03	115,69	105,25	54,33

^a Compostos quantificados por curva analítica em HPLC-DAD como equivalente em cianidina 3-glucosídeo

Total de antocianinas: somas de todos os picos

Antocianinas não aciladas: soma dos picos 1 a 4; antocianinas aciladas a ácido malônico: soma dos picos 6 e 7; antocianinas aciladas a ácido succínico: soma dos picos 5, 8 e 9; antocianinas aciladas: soma dos picos 6 a 9; antocianinas derivadas de cianidina 3-glucosídeo: soma dos picos 2, 5, 5 e 8; antocianinas derivadas de cianidina 3-diglucosídeo: soma dos picos 3, 7 e 9

Tabela 5: Efeito das variáveis e nível de significância (p-valor) concentração de HCl em MeOH (1), temperatura (2) e volume (3) e efeito da curvatura e das interações entre variáveis no DCFC na concentração de antocianinas obtidas por extração assistida por micro-ondas.

	Efeito na extração de antocianinas (p-valor)				Interação entre as variáveis (p-valor)		
	% HCl (1)	Temperatura (2)	Volume (3)	Curvatura	1x2	1x3	2x3
Total de antocianinas	2,3628 (0,854783)	0,6600 (0,959810)	8,4299 (0,528383)	-44,8126 (0,024115)	-6,6597 (0,613554)	-5,2409 (0,688393)	-12,7667 (0,360461)
Antocianinas não aciladas	16,62888 (0,028584)	-1,91547 (0,678611)	6,85019 (0,200559)	-15,2855 (0,057991)	-4,61958 (0,115394)	-2,30564 (0,312482)	-4,99978 (0,100974)
Antocianinas aciladas a ácido malônico	-38,1444 (0,002994)	-12,0747 (0,028723)	-9,49388 (0,045273)	-25,4406 (0,032178)	7,9291 (0,063080)	9,2404 (0,047613)	-2,5841 (0,342110)
Antocianinas aciladas a ácido succínico	23,8783 (0,001619)	14,6502 (0,006684)	11,0734 (0,014651)	23,8783 (0,001619)	-9,9693 (0,019505)	-12,1756 (0,011265)	-5,1828 (0,097382)
Antocianinas aciladas totais	-14,2661 (0,025304)	2,5754 (0,381473)	1,5797 (0,565207)	-29,5271 (0,029350)	-2,0402 (0,470862)	-2,9353 (0,332210)	-7,7669 (0,078427)
Antocianinas derivadas de cianidina 3-glucosídeo	13,5722 (0,038566)	13,6109 (0,038359)	8,1086 (0,098061)	-33,6166 (0,031767)	2,0504 (0,533022)	-3,0435 (0,383063)	-5,7902 (0,169438)
Antocianinas derivadas de cianidina 3-diglucosídeo	-11,3690 (0,004965)	-12,5785 (0,004062)	-0,2581 (0,778698)	-10,0330 (0,030664)	-8,3370 (0,009175)	-1,8204 (0,151888)	-1,8204 (0,015188)

Total de antocianinas: somas de todos os picos

Antocianinas não aciladas: soma dos picos 1 a 4; antocianinas aciladas a ácido malônico: soma dos picos 6 e 7; antocianinas aciladas a ácido succínico: soma dos picos 5, 8 e 9; antocianinas aciladas totais: soma dos picos 6 a 9; antocianinas derivadas de cianidina 3-glucosídeo: soma dos picos 2, 5, 5 e 8; antocianinas derivadas de cianidina 3-diglucosídeo: soma dos picos 3, 7 e 9

A maior concentração de antocianinas não aciladas (Tabela 4 - experimentos 2, 4, 6 e 8) não pode ser associada diretamente à maior eficiência de extração, pois há claramente uma conversão de antocianinas aciladas em não aciladas devido à hidrólise ácida (Figura 3). Desta forma, não podemos utilizar essa variável resposta como parâmetro de escolha para otimização de um método para extração de antocianinas.

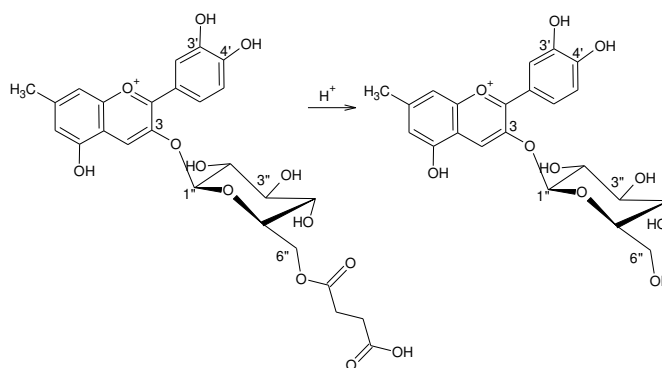


Figura 3: Hidrólise do grupo succinil e consequente conversão da cianidina 3-succinil glicosídeo em cianidina 3-glucosídeo.

O efeito da temperatura na extração de antocianinas totais, antocianinas não aciladas e antocianinas aciladas totais não foi significativo (Tabela 5). Por outro lado maiores temperaturas aumentaram significativamente as concentrações de antocianinas aciladas a ácido succínico. Quando compara-se os experimentos 1 e 3, 2 e 4 (Tabela 4), nota-se que o efeito do aumento da temperatura é mais intenso quando a concentração de ácido é menor. Esse comportamento é explicado pela interação negativa entre as variáveis temperatura e concentração de HCl em MeOH, como mostra a Tabela 5. Já o efeito na extração de antocianinas aciladas a ácido malônico foi negativo e significativo (Tabela 4 - experimentos 1, 3 e 5), embora o experimento 2 apresente baixa a concentração dessas antocianinas. Isso provavelmente está relacionado com a interação positiva entre a as variáveis temperatura e concentração de HCl (Tabela 5), isso quer dizer, menor temperatura associada a menor concentração de ácido estão relacionadas a maiores concentrações de antocianinas aciladas a ácido malônico. Assim como altas temperaturas e altas concentrações de ácido têm como resultante menores concentrações de antocianinas aciladas a ácido malônico, o que pode estar relacionado com à intensa hidrólise deste grupo acilado à antocianina.

Estes resultados sugerem que a hidrólise das antocianinas aciladas com ácido malônico pode ocorrer de forma mais intensa em menores concentrações de HCl e menores temperaturas do que a hidrólise das antocianinas succinil derivadas. Esse efeito é visualizado facilmente nos cromatogramas dos extratos obtidos nas

condições descritas para os experimentos 5 e 6 (Figura 4), observando-se os picos 8 (cianidina 3-(6''succinil)glucosídeo) e 9 (cianidina 3-(6''succinil)diglucosídeo). Os baixos teores de antocianinas aciladas ao ácido malônico nos extratos obtidos pelos métodos de extração estática e acelerada por agitação podem estar relacionados à hidrólise mais intensa desses compostos em solução contendo 1% de HCl.

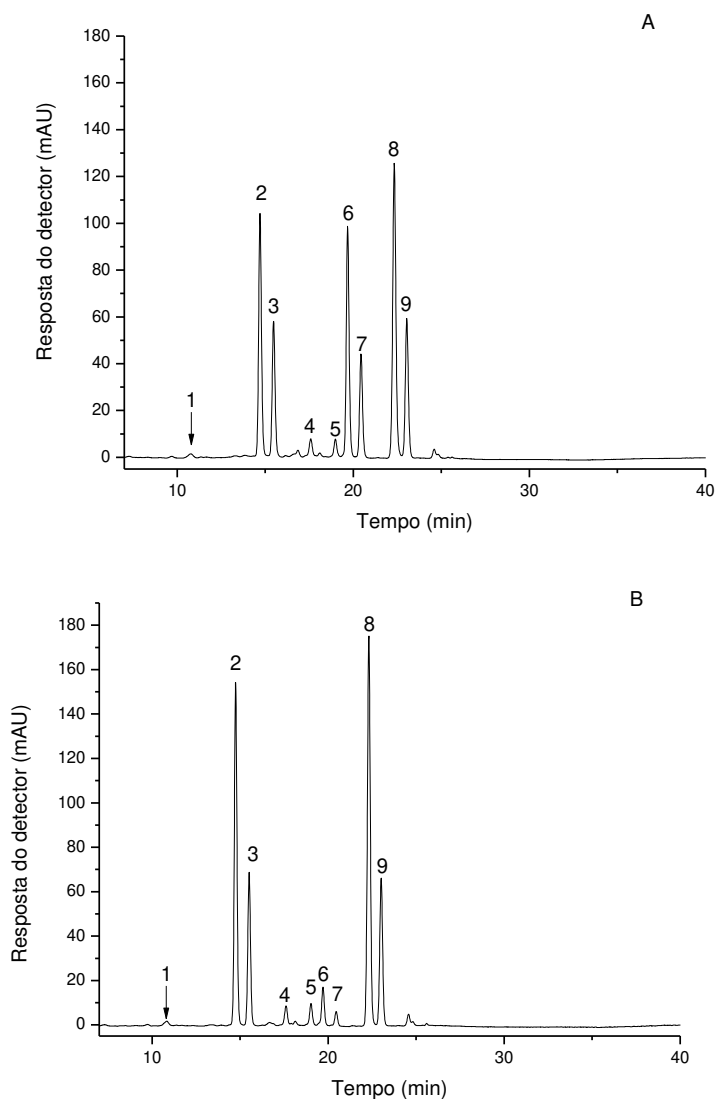


Figura 4: Cromatogramas processados a 520 nm, obtidos por HPLC-DAD, do extrato de antocianinas de cebola roxa obtido por MAE. A corresponde ao experimento 5 no DCFC, utilizando 42mL de solução 0,3% de HCl em MeOH, a 90°C, e B ao experimento 6 no DCFC, utilizando 42mL de solução 0,7% de HCl em MeOH, a 90°C. Picos numerados segundo identificação na Tabela 2: (1) cianidina 3,5-diglucosídeo, (2) cianidina 3-glucosídeo, (3) cianidina 3-diglucosídeo, (4) peonidina 3-glucosídeo, (5) cianidina 3-(3''succinil)glucosídeo, (6) cianidina 3-(6''malonil)glucosídeo, (7) cianidina 3-(6''malonil)diglucosídeo, (8) cianidina 3-(6''succinil)glucosídeo, (9) cianidina 3-(6''succinil)diglucosídeo.

A cinética de degradação térmica de antocianinas isoladas de cenoura roxa mostrou que esses pigmentos ligados a diferentes ácidos cinâmicos apresentam tempo de $\frac{1}{2}$ vida diferentes (Sadilova et al., 2006). Em outras palavras, que a hidrólise parcial, hidrólise total e a degradação completa da antocianidina dependem das características dos ácidos. Neste trabalho a antocianina acilada a ácido sinápico foi mais estável do que as antocianinas ligadas a ácido ferrúlico, que por sua vez foi mais estável que as com ácido coumárico. Os autores propõem que o grau de metoxilação do grupo acilado aumenta a estabilidade da cianidina (Sadilova et al., 2006).

Os menores teores de antocianinas aciladas a ácido malônico podem estar relacionados à degradação térmica, uma vez que o tempo de exposição a 1% de HCl não teve influência como discutido anteriormente. Embora o mecanismo de degradação térmica em meio ácido descrito na literatura mostre que a cianidina livre é um dos produtos intermediários da via (Andersen e Jordheim, 2013), a aglicona e seus derivados de baixo peso molecular não foram detectados por HPLC-DAD-MS/MS no presente estudo. A ausência de cianidina livre poderia indicar que na faixa de temperatura utilizada ocorreu apenas hidrólise parcial dos pigmentos ligados ao grupo malonil, no entanto altas temperaturas não elevaram o teor das antocianinas não aciladas.

Quando o volume de solução extratora foi maior, a concentração de antocianinas totais no extrato foi maximizada (Tabela 4 – experimentos 5 e 6), embora o efeito não tenha sido significativo. O volume exerceu o mesmo efeito positivo e não significativo sobre as antocianinas não aciladas, por outro lado, menores volumes de extração favoreceram a extração de antocianinas aciladas a ácido malônico (p-valor < 0,05).

Foram realizados 4 experimentos complementares, steepest ascent (SA), a fim de otimizar a extração as antocianinas de cebola. As condições dos experimentos do SA foram estabelecidas para minimizar as possíveis modificações na estrutura das antocianinas presentes na cebola.

Os resultados do SA mostram que em relação à concentração de ácido na solução extratora o comportamento das antocianinas aciladas a ácido malônico é o oposto daquela das aciladas a ácido succínico. Quanto menor a concentração de ácido, maior o teor de antocianinas aciladas a ácido malônico, enquanto a extração de derivados de ácido succínico é menor em concentrações próximas a 0,1%. Esse resultado (Figura 5) confirma os resultados obtidos no DCFC, ou seja, para uma melhor condição de extração de antocianinas aciladas a ácido succínico seria necessário uma maior concentração de ácido associada a uma maior temperatura e um menor volume de extração. Por outro lado, a concentração de ácido apresenta menor influência no total de antocianinas extraído. Isso pode ser explicado pela conversão das espécies aciladas em não aciladas em meio fortemente ácido.

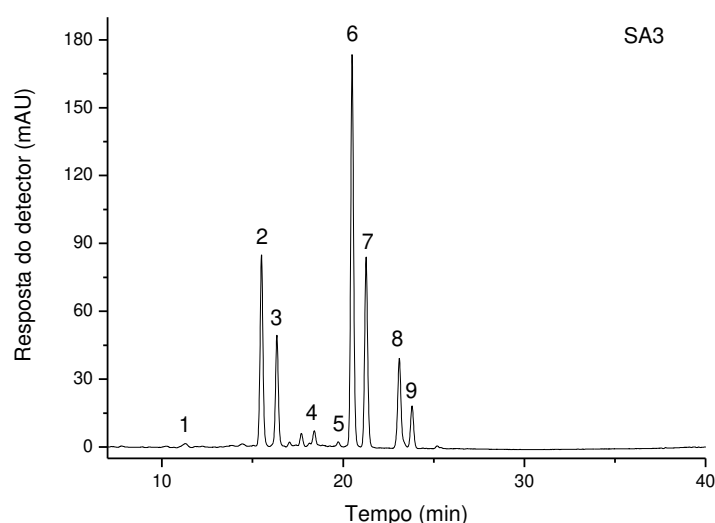


Figura 5: Cromatograma processado a 520 nm, obtido por HPLC-DAD, do extrato de antocianinas de cebola roxa obtido por MAE steepest ascende 3 utilizando 51mL de solução 0,15% de HCl em MeOH, a 75°C. Picos numerados segundo identificação na Tabela 2 Compostos: (1) cianidina 3,5-diglucosídeo, (2) cianidina 3-glucosídeo, (3) cianidina 3-diglucosídeo, (4) peonidina 3-glucosídeo, (5) cianidina 3-(3''succinil)glucosídeo, (6) cianidina 3-(6''malonil)glucosídeo, (7) cianidina 3-(6''malonil)diglucosídeo, (8) cianidina 3-(6''succinil)glucosídeo, (9) cianidina 3-(6''succinil)diglucosídeo.

Em relação ao teor de antocianinas totais, os resultados do SA confirmam que o aumento do volume de extração exerce um efeito positivo na extração, assim como a redução da temperatura.

Os resultados dos experimentos do SA resultaram em maiores concentrações de antocianinas aciladas a ácido malônico, provavelmente indicando uma hidrólise menos intensa e/ou uma maior extração desses compostos. Podemos afirmar isso porque o teor de antocianinas totais não foi maior nos experimentos do SA do que nos experimentos de DCFC, enquanto o teor de antocianinas aciladas a ácido malônico foi 74 % maior (Tabela 4 – SA 4) do que no DCFC (Tabela 4 – DCFC 1). No entanto, a eficiência de extração de antocianinas aciladas a ácido succínico foi desfavorecida o que reflete no desempenho global de extração.

4. Conclusão

Pode-se dizer que a grande novidade deste trabalho é a descoberta de que o comportamento das antocianinas aciladas a ácido malônico é oposto ao do das antocianinas aciladas a ácido succínico em relação à concentração de ácido na solução extratora. Além disso, é possível afirmar que o aquecimento por micro-ondas nas temperaturas avaliadas durante a extração não induz a degradação das antocianinas, pois a cianidina livre e seus derivados de baixo peso molecular não foram detectados.

Por outro lado, os resultados indicam a inviabilidade de otimização de um método de extração de antocianinas assistida por micro-ondas porque as condições que favorecem o aumento do teor de antocianinas totais também favorecem a hidrólise dos compostos acilados, e o perfil obtido não reflete a composição das antocianinas na forma nativa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andersen, Ø.M.; Jordheim, M.C. 2013. Basic Anthocyanin Chemistry and Dietary Sources. In: Anthocyanins in Health and Disease, ed. T.C. Wallace, M. Giusti., pp. 13-90. CRC Press, Boca Raton.

De Rosso, V.V.; Mercadante, A.Z. 2007. HPLC-PDA-MS/MS of anthocyanins and carotenoids from dovyalis and tamarillo fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 9135-9141.

Degenhardt, A.; Knapp, H.; Winterhalter, P. 2000. Separation and purification of anthocyanins by high-speed countercurrent chromatography and screening for antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 338-343.

Faria, A.F.; Marques, M.C.; Mercadante, A.Z. 2011. Identification of bioactive compounds from jambolão (*Syzygium cumini*) and antioxidant capacity evaluation in different pH conditions. *Food Chemistry*, 126: 1571-1578.

Fossen, T.; Andersen, Ø. M.; Øvstedal, D.O.; Pedersen, A.T.; Raknes, A. 1996. Characteristic Anthocyanin Pattern from Onions and other *Allium* spp. *Journal of Food Science*, 61: 703-706.

Fossen, T.; Slimestad, R.; Andersen, Ø. M. 2003. Anthocyanins with 4'-glucosidation from red onion, *Allium cepa*. *Phytochemistry*, 64: 1367-1374

Garofulic, I.E.; Dragović-Uzelac, V.; Jambrak, A.R.; Jukić, M. 2013. The effect of microwave assisted extraction on the isolation of anthocyanins and phenolic acids from sour cherry Marasca (*Prunus cerasus* var. Marasca). *Journal of Food Engineering*, 117: 437-442.

Liaqid, A.; Guerrero, R.F.; Cantos, E.; Palma, M.; Barroso, C.G. 2011. Microwave assisted extraction of anthocyanins from grape skins. *Food Chemistry*, 124: 1238-1243.

- Revilla, E.; Ryan, J.M.; Martín-Ortega, G. 1998. Comparison of Several Procedures Used for the Extraction of Anthocyanins from Red Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 4592–4597.
- Sadilova, E.; Stintzing, F.C.; Carle, R. 2006. Thermal degradation of acylated and nonacylated anthocyanins *Journal of Food Science* 71: 504-512.
- Teng, H.; Lee, W.Y.; Choi, Y.H. 2013. Optimization of microwave assisted extraction for anthocyanins, polyphenols and antioxidants from raspberry (*Rubus coreanus* Miq.) using response surface methodology. *Journal of Separation Science*, 36: 3107–3114.
- Wen, Y.; Chen, H.; Zhou, X.; Deng, Q.; Zhao, Y.; Zhao, C.; Gong, X. 2015. Optimization of the microwave-assisted extraction and antioxidant activities of anthocyanins from blackberry using a response surface methodology. *RSC Advances*, 5: 19686–19695.
- Wu, X.; Prior, R.L. 2005. Identification and characterization of anthocyanins by high-performance liquid chromatograph- electrospray ionization- tandem mass spectrometry in common foods in the United States: vegetables, nuts and grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 3101–3113.
- Yang, Z.; Zhai, W. 2010. Optimization of microwave-assisted extraction of anthocyanins from purple corn (*Zea mays* L.) cob and identification with HPLC–MS. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11: 470–476.
- Zou, T.; Wang, W.; Gou, H.; Zhu, Y.; Luo, X.; Liu, F.; Ling, W. 2012. Optimization of microwave assisted extraction of anthocyanins in extract using HPLC-ESI-MS. *Journal of Food Science*, 71: 46–50.

CAPITULO V

EFEITO DA EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR MICRO- ONDAS EM ANTOCIANINAS ACILADAS A ÁCIDOS CINÂMICOS DE REPOLHO ROXO

Marcella C. Marques, Lilian R.B. Mariutti, Adriana Z. Mercadante

A ser submetido à *Food Chemistry*

EFEITO DA EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS EM ANTOCIANINAS ACILADAS A ÁCIDOS CINÂMICOS DE REPOLHO ROXO

Resumo

A extração assistida por micro-ondas (MAE) utiliza o aquecimento rápido para facilitar a migração dos compostos de interesse da matriz para a solução extratora, tendo como vantagens o baixo tempo de extração e baixo volume de solvente. O perfil de antocianinas de repolho roxo liofilizado foi estudado através de um planejamento experimental DCFC (2^3) tendo como variáveis independentes a concentração da solução de HCl em metanol (0,3 - 0,7 %), a temperatura (90 a 110 °C) e o volume de solução extratora (28 - 42 mL). As variáveis resposta, determinadas por HPLC-DAD-MS/MS, foram as concentrações de antocianinas totais, antocianinas não aciladas e antocianinas aciladas aos ácidos cafeico e cumárico, aos ácidos cafeico e ferúlico, e aos ácidos cafeico e sinápico, além de antocianinas derivadas de cianidina 3-diglucosídeo-5-glucosídeo, derivadas de cianidina 3,5-diglucosídeo e derivadas de cianidina 3-glucosídeo. As amostras foram submetidas a uma potência máxima de 850 W por 1 min para que a solução atingisse a temperatura determinada, que foi mantida constante por 5 min em potência máxima de 350 W. Os resultados mostraram que a extração total das antocianinas foi mais eficiente por MAE do que pelos métodos tradicionais. No entanto, as variáveis independentes (concentração de HCl e temperatura) nos níveis avaliados no DCFC alteraram o perfil das antocianinas, apesar do teor total de antocianinas não ter sido afetado por nenhuma destas variáveis estudadas. Maiores concentrações de ácido resultaram em maiores teores de antocianinas não aciladas e de antocianinas aciladas aos ácidos cafeico e ferúlico. Por outro lado, essas condições tiveram um efeito negativo na concentração das antocianinas aciladas aos ácidos cafeico e cumárico. Maiores temperaturas aumentaram significativamente as concentrações de antocianinas não aciladas e antocianinas aciladas aos ácidos cafeico e ferúlico. O efeito do aumento da temperatura foi mais intenso quando a concentração de ácido foi maior. O volume de solução extratora não exerceu efeito significativo na extração das antocianinas de repolho. Não foram detectados compostos de baixo peso molecular que indicassem a degradação térmica das antocianinas durante a MAE nas condições testadas.

Palavras chave: antocianinas, extração assistida por micro-ondas, LC-MS/MS, repolho roxo

1. Introdução

Antocianinas são compostos fenólicos coloridos, largamente distribuídos no reino vegetal, podendo ser acumulados em folhas, flores, frutos e em partes subterrâneas das plantas (Andersen e Jordheim, 2013). O repolho roxo (*Brassica oleracea* L.) é um vegetal rico em compostos fenólicos, principalmente antocianinas (322 mg/100g de peso fresco) (Wu et al., 2005). As antocianinas encontradas em repolho são muito complexas, pois podem apresentar mais de 2 açúcares além de estarem aciladas a diferentes ácidos cinâmicos. Já foram separadas e identificadas 23 antocianinas em repolho roxo: cianidina 3-diglucosídeo-5-glucosídeo, cianidina 3,5-diglucosídeo, cianidina 3-(hidroxibenzil)(oxalil)diglucosil-5-glucosídeo, cianidina 3-(cafeil)diglucosil-5-glucosídeo, cianidina 3-(sinapil)diglucosil-5-glucosídeo, cianidina 3-(feruil)diglucosil-5-glucosídeo, cianidina 3-diglucosil-5-xilosil, cianidina 3-diglucosídeo, cianidina 3-(cafeil)(cumaril)diglucosil-5-glucosídeo, cianidina 3-(glicopiranosil)(feruil)diglucosil-5-glucosídeo, cianidina 3-(glicopiranosil)(sinapil)diglucosil-5-glucosídeo, cianidina 3-(sinapil)diglucosil-5-glucosídeo, cianidina 3-(cumaril)(sinapil)diglucosil-5-glucosídeo, cianidina 3-(cafeil)diglucosil-5-glucosídeo, cianidina 3-(sinapil)diglucosil-5-glucosídeo, cianidina 3-(cumaril)diglucosil-5-glucosídeo e cianidina 3-(sinapil)diglucosil-5-glucosídeo, cianidina 3-(sinapil)glucosil-5-glucosídeo, cianidina 3-(feruil)(feruil)diglucosil-5-glucosídeo, cianidina 3-(feruil)(sinapil)diglucosil-5-glucosídeo, cianidina 3-(sinapil)(sinapil)diglucosil-5-glucosídeo, cianidina 3-(sinapil)diglucosil-5-xilosídeo e cianidina 3-(sinapil)diglucosil-5-(sinapil)glucosídeo (Wu et al., 2005). As antocianinas cianidina 3-diglucosil-5-glucosídeo, cianidina 3-(cumaril)diglucosil-5-glucosídeo e cianidina 3-(sinapil)diglucosil-5-glucosídeo foram descritas como majoritárias em repolho roxo (Wu et al., 2005).

Os métodos de extração assistida por micro-ondas (MAE) têm sido descritos como eficientes, precisos, apresentam alta reprodutibilidade, e são indicados para uso analítico (Chan et al., 2001). A MAE vem sendo aplicada para a extração de diferentes classes de compostos bioativos, como compostos fenólicos (Hayat et al., 2009), flavonoides (Xiao et al., 2008) e antocianinas (Garofulic et al., 2013; Teng et al., 2013; Zou et al., 2012; Liaqid et al., 2011; Yang e Zhai, 2010). Um planejamento experimental foi realizado para avaliar a extração de antocianinas casca de uva, com

as seguintes variáveis independentes: concentração de metanol em água (50-80%), presença ou ausência da agitação, temperatura (50-100°C), potência do equipamento (100-500W), tempo de extração (5-20 min) e volume de solução extratora (25-50 mL) (Liazid et al., 2011). As variáveis resposta foram: concentração de antocianinas totais e concentração da antocianina majoritária, determinadas por HPLC-DAD (Liazid et al., 2011). O método otimizado de MAE foi mais eficiente do que o método de extração estática sob refrigeração por 5 h para a extração de antocianinas de casca de uva (Liazid et al., 2011). Porém, os solventes de extração utilizados na MAE e estática foram diferentes e como o perfil completo de antocianinas não foi relatado, não foi possível verificar o efeito das variáveis avaliadas no planejamento experimental no perfil das antocianinas ou isolar o efeito da MAE na extração das antocianinas.

Temperatura, potência do equipamento e tempo de irradiação foram também avaliados utilizando planejamento experimental composto central para extração de antocianinas de cereja (*Prunus cerasus* var *Marasca*) por MAE (Garofulic et al., 2013). Os parâmetros fixos foram tempo para atingir a temperatura determinada, tempo de resfriamento, agitação, massa de amostra e solvente de extração (MeOH:H₂O 8:2 acidificado com 0,1 % de HCl). As concentrações individuais das antocianinas foram determinadas por HPLC-DAD, e as concentrações de antocianinas totais e da antocianina majoritária (cianidina-3glucosil-rutinosídeo) foram utilizadas como respostas para otimização da MAE. O método otimizado de MAE (60 °C, 400 W e 9 min) resultou em maior teor de antocianinas totais do que o método de extração convencional. A MAE não promoveu a alteração do perfil de antocianinas, ou seja, o teor relativo de cada antocianina ligada a diferentes açúcares foi constante em todos os experimentos do planejamento (Garofulic et al., 2013).

Outros estudos para a otimização da extração por MAE de antocianinas de amora *Rubus* (Wen et al., 2015) e *Morus atropurpurea* (Zou et al., 2012), de framboesas (Teng et al., 2013) e de milho roxo (Yang e Zhai, 2010) utilizaram como variável resposta a concentração de antocianinas totais, determinada por espectrofotometria. Desta forma, nesses estudos não foi possível avaliar o efeito da

extração por MAE no perfil das antocianinas ou a possível degradação térmica dos compostos durante a extração.

Na extração de antocianinas de casca de uva por método sólido líquido tradicional, um teor de antocianinas totais 9% maior foi obtido com solvente acidificado do que sem ácido (Revilla et al., 1998). Além disso, o perfil de antocianinas foi dependente tanto do tipo de ácido acilado à antocianina como do ácido no solvente. A concentração da antocianina acilada ao ácido acético, alifático, foi 6 vezes maior quando extraída com solvente não acidificado enquanto maiores teores de antocianinas aciladas ao ácido p-cumárico, cinâmico, foram obtidos com solvente acidificado. A modificação do perfil de antocianinas está relacionada ao grau de hidrólise ácida do grupo ácido ligado à antocianina, enquanto o acetil é muito susceptível à hidrólise ácida, a antocianina acilada a ácido p-cumárico, é menos susceptível à hidrólise (Revilla et al., 1998).

A estabilidade térmica de antocianinas derivadas de cianidina ligadas aos ácidos cinâmicos cumárico, ferúlico e sinápico também parece estar relacionada com a estrutura química. Quando aquecidas a 95 °C em solução acidificada (pH=1), a cianidina 3-(sinapil)-xilossilgalactosídeo foi mais estável do que as antocianinas cianidina 3-(feruil)-xilossilgalactosídeo e cianidina 3-(cumaril)-xilossilgalactosídeo, respectivamente (Sadilova et al., 2006).

A influência combinada da MAE e da concentração do ácido clorídrico da solução extratora no perfil de antocianinas aciladas a ácidos cinâmicos ainda não foi investigada. Utilizando repolho roxo liofilizado como modelo, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência combinada da temperatura, volume e concentração de ácido na extração assistida por micro-ondas (MAE) de antocianinas aciladas com diferentes ácidos cinâmicos.

2. Materiais e Métodos

2.1. Amostras

Foram adquiridos 10 Kg de repolho roxo (*Brassica oleracea* L. var. *capita f. rubra*) na central de abastecimento (CEASA) de Campinas, São Paulo, Brasil. Após transporte para o laboratório, as folhas mais externas foram removidas e a fração

comestível foi cortada em cubos de 3 cm e imediatamente congelada através da imersão em nitrogênio líquido. O repolho congelado foi liofilizado (Liotop L101), homogeneizado em multiprocessador doméstico e o pó resultante foi embalado a vácuo, e mantido em freezer a -36°C até análise.

2.2. Reagentes e padrões

Os padrões de cianidina 3-glucosídeo e cianidina 3,5-diglucosídeo (96% de pureza) foram adquiridos da Extrasynthèse (Lyon Nord, França). Os solventes e os reagentes grau cromatográfico (HPLC) foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha) e da Mallinckrodt Baker (Phillipsburg, EUA), os de grau p.a. da Labsynth (São Paulo, Brasil). A água ultrapura foi obtida em sistema Milli-Q (Millipore, Billerica, EUA).

2.3. Extração acelerada por agitação

A extração sólido-líquido de $0,4 \pm 0,02$ g de amostra liofilizada homogeneizada foi realizada, em triplicata, sob agitação em turrax durante 3 min com 25 mL de solução de metanol contendo 1% de ácido clorídrico. O sobrenadante foi separado por filtração em filtro de papel sob vácuo. O retentado foi re-extraído mais 4 vezes com 25 mL da mesma solução extratora, até que o filtrado estivesse incolor (Faria et al., 2011). Os filtrados foram combinados e concentrados em evaporador rotativo ($T < 40$ °C) (Büchi, modelo R114, Flawil, Suíça). O extrato concentrado foi diluído até volume conhecido em água contendo 1% de ácido clorídrico, e então armazenado em freezer a -80 °C até análise cromatográfica.

2.4. Extração estática

As antocianinas foram extraídas, em triplicata, com solução de metanol contendo 1% de ácido clorídrico, em repouso sob refrigeração (4 °C) por 16 horas. O sobrenadante foi separado por filtração a vácuo, e o retentado foi submetido à nova extração sob refrigeração por 4 h, este procedimento foi repetido mais 2 vezes até que o filtrado estivesse incolor (Degenhardt et al, 2000). Os extratos foram combinados, seguido de concentração em evaporador rotativo até eliminação do metanol, diluído em água com 1% de ácido clorídrico em volume conhecido e armazenado em freezer a -80 °C até análise.

2.5. Extração assistida por micro-ondas

A extração de antocianinas assistida por micro-ondas (Start-E, Milestone, Sorisole, Itália) foi realizada segundo um delineamento composto de face centrada (DCFC) 2^3 com 2 repetições no ponto central, totalizando 10 experimentos. As variáveis independentes foram concentração de HCl em MeOH, temperatura e volume de solução extratora e as faixas de valores para estas variáveis independentes (Tabela 1) foram escolhidas com base em testes preliminares e em estudos publicados anteriormente (Liazid et al., 2011; Garofulic et al., 2013). Os parâmetros fixos em todos os experimentos foram massa da amostra ($0,04 \pm 0,002$ g), potência máxima do equipamento (850 W, por 40 s até atingir a temperatura de extração definida no planejamento, e temperatura constante por 5 min a 350 W), agitação (240 rpm) e tempos de extração (5 min 40 s) e de resfriamento (30 min). Os experimentos foram realizados em ordem aleatória.

Tabela 1: Variáveis independentes codificadas e não codificadas usadas no DCFC e seus respectivos níveis.

Variáveis	Níveis			
	Codificada	-1	0	1
% HCl em MeOH	X1	0,3	0,5	0,7
Temperatura (°C)	X2	90	100	110
Volume (mL)	X3	28	35	42

Após adição da amostra e solução extratora, os tubos de teflon foram fechados e colocados no equipamento de micro-ondas para irradiação, que foi realizada em duas fases. Na primeira fase, aqui chamada de aquecimento, os tubos foram submetidos a uma potência máxima de 850 W por 40 s para que a solução + amostra atingisse a temperatura determinada no delineamento experimental. Na segunda fase, chamada de fase de extração, a temperatura estabelecida no planejamento foi mantida constante por 5 min utilizando potência máxima de 350 W.

A temperatura de extração foi medida durante toda a extração por meio de um termopar inserido no centro do tubo de extração. Com base na medida de temperatura, o controlador utilizou a potência adequada (0 - 850 W) para que a solução atingisse a temperatura determinada no planejamento (90 - 110 °C) por 40

s. De forma similar, a potência aplicada para manter a temperatura de extração foi controlado pelo equipamento, variando entre 0 e 350 W durante 5 min de extração.

Após irradiação, os tubos foram imediatamente colocados por 30 min em banho de gelo para acelerar o resfriamento. A seguir, o extrato foi filtrado em filtro de papel e o retentado foi lavado com até 20 mL de solução extratora, até que a solução filtrada e o retentado no papel estivessem incolores. Em seguida, o extrato foi concentrado em evaporador rotativo (temperatura do banho < 40 °C). O extrato concentrado foi diluído com água ultrapura acidificada com 1% de HCl até volume conhecido e em seguida armazenado em freezer a -80 °C. Os extratos permaneceram a -80 °C por no máximo 5 dias até as análises cromatográficas.

2.6. Determinação de antocianinas por HPLC-DAD-MS/MS

A separação, identificação e quantificação das antocianinas foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (modelo SPD-M20A, Shimadzu, Japão) acoplado aos detectores de arranjo de diodos (DAD) e ao espectrômetro de massas (Amazon Speed, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), com interface "eletrospray" (ESI) e analisador de massas "ion trap". As antocianinas foram separadas em coluna C₁₈ Luna (5 µm, 250 mm x 4,6 mm, Phenomenex, Torrance, EUA) utilizando como fase móvel um gradiente linear de água/metanol, ambos acrescidos de 5% de ácido fórmico, de 90:10 para 60:40 em 20 min, seguindo para 20:80 em 15 min e mantendo esta proporção por mais 5 min, com vazão de 0,9 mL/min e temperatura da coluna mantida a 29 °C (Faria et al., 2011). Os cromatogramas foram processados em 520 nm. As antocianinas foram quantificadas individualmente utilizando um ponto de concentração 0,02 mg/mL de cianidina 3-glucosídeo, considerando que a curva analítica de cianidina 3-glucosídeo é linear na faixa utilizada (De Rosso e Mercadante, 2007). As concentrações de todas as antocianinas individuais foram expressas em equivalente de cianidina 3-glucosídeo.

Após a passagem pelo DAD, o fluxo da fase móvel foi dividido de forma que apenas 0,15 mL/min entrasse na fonte de ionização ESI. Os parâmetros do MS foram ajustados em: ionização no modo positivo, voltagem no capilar de 2,5 kV; voltagem de saída no capilar de 95,2 kV; energia de fragmentação de 1,2 V; temperatura do gás secante (N₂) de 350 °C com fluxo de 8 L/min; nebulizador a 30

psi; “endplate offset” -500 V. Os espectros de massas foram adquiridos na faixa de valores de m/z entre 100 e 2000 e o MS/MS foi adquirido no modo automático com energia de fragmentação de 1,2 V (Faria et al., 2011).

A identificação das antocianinas foi realizada com base na combinação dos seguintes parâmetros: ordem de eluição em coluna de fase reversa e características dos espectros de UV-vis e de massas em comparação com dados disponíveis na literatura (Murador et al., 2016; Wu e Prior, 2005; Giusti et al., 1999).

2.7. Análise estatística

A análise estatística do planejamento experimental foi realizada com o software Statistica versão 7.0 (Statsoft, Tulsa, OK, USA). Os gráficos, média e desvio-padrão dos resultados das análises de antocianinas totais e teores das antocianinas individuais analisados HPLC foram calculados utilizando o software Origin versão 8.1. Os resultados obtidos foram comparadas através da análise de variância (ANOVA) utilizando um intervalo de confiança de 95 %.

3. Resultados e Discussão

3.1. Identificação de antocianinas de repolho roxo

Vinte antocianinas derivadas de cianidina foram identificadas no repolho roxo (Tabela 2). Como descrito na literatura, os ácidos cafeico, cumárico, ferúlico e sinápico foram encontrados acilados a antocianinas de repolho roxo (Murador et al., 2016; Wu et al., 2005). As antocianinas não aciladas (picos 1, 2, 4 e 6), as antocianinas aciladas a ácido sinápico (pico 3), aos ácidos cafeico e cumárico (picos 7) e a dois ácidos sinápicos (picos 19) foram identificados anteriormente em repolho roxo (Murador et al., 2016; Wu et al., 2005, Giusti et al., 1999), embora a identificação destes compostos não tenha sido confirmada por ressonância magnética nuclear.

Tabela 2: Características cromatográficas e espectroscópicas, obtidas por HPLC-DAD-MS/MS, de antocianinas de repolho roxo.

Pico ^a	Composto	t _R (min) ^b	λ _{max} (nm) ^c	[M] ⁺	Íon fragmentos obtidos por MS ² (m/z)	Íon fragmentos obtidos por MS ³ (m/z)
1	cianidina 3-diglucosil-5-glucosídeo	10,1 – 10,6	514	773	611 [M-162] ⁺ , 449 [M-324] ⁺ , 287 [M-486] ⁺	611 → 287 [M-162-322] ⁺ , 449 → 287[M-324-162] ⁺
2 ^d	cianidina 3,5-diglucosídeo	11,3 – 11,6	514	611	449 [M-162] ⁺ , 287[M-324] ⁺	449 → 287 [M-162-162] ⁺
3	cianidina 3-(sinapil)diglucosil-5-glucosídeo	12,7 – 13,0	529, 334	979	817 [M-162] ⁺ , 449 [M-530] ⁺ , 287 [M-692] ⁺	817 → 287 [M-162-530] ⁺
4 ^d	cianidina 3-diglucosídeo	13,6 – 13,8	518	611	287 [M-324] ⁺	n.d.
5 ^d	cianidina 3-(sinapil)diglucosídeo	15,3 – 15,5	517	817	287 [M-530] ⁺	n.d.
6 ^d	cianidina 3-glucosídeo	16,1 – 16,4	518	449	287 [M-162] ⁺	n.d.
7	cianidina 3-(cafeil)(cumaril)diglucosil-5-glucosídeo	17,3 – 17,7	524	1081	919 [M-162] ⁺ , 449 [M-632] ⁺	919 → 757 [M-162-162] ⁺ , 919 → 287 [M-162-632] ⁺ ; 449 → 287 [M-632-162] ⁺
8	cianidina 3-(cafeil)(feruil)diglucosil-5-glucosídeo	17,6 – 18,0	524	1111	949 [M-162] ⁺ , 787 [M-324] ⁺ , 449 [M-662] ⁺	949 → 787 [M-162-162] ⁺ , 949 → 449 [M-162-500] ⁺ , 949 → 287 [M-662] ⁺ ; 787 → 287 [M-324-500] ⁺ ; 494 → 287 [M-662-162] ⁺
9	cianidina 3-(cafeil)(cumaril)(sinapil)diglucosil-5-glucosídeo	19,4 – 19,6	524	1287	1125 [M-162] ⁺ , 449 [M-838] ⁺	1125 → 919 [M-162-206] ⁺ ; 449 → 287 [M-838-162] ⁺ ()
10	cianidina 3-(cafeil)(sinapil)glucosil-5-glucosídeo	19,8 – 20,0	538	979	817 [M-162] ⁺ , 449 [M-530] ⁺ , 287 [M-692] ⁺	817 → 287 [M-162-530] ⁺ ; 449 → 287 [M-530-162] ⁺

11 ^d	cianidina 3-(feruil)(feruil)(sinapil)glucosil-5-glucosídeo	22,8 – 23,0	538, 321	1187	1025 [M-162] ⁺ , 993 [M-194] ⁺	1025 → 993 [M-162-32] ⁺ , 1025 → 819 [M-162-206] ⁺ , 1025 → 287 [M-162-738] ⁺ ; 1025 → 993 → 975 [M-194-18] ⁺ , 1025 → 287 [M-194-706] ⁺
12	cianidina 3-(cafeil)(cumaril)glucosil-5-glucosídeo	23,5 – 23,8	525, 321	919	757 [M-162] ⁺ , 449 [M-470] ⁺ , 287 [M-632] ⁺	449 → 287 [M-470-162] ⁺
13 ^d	cianidina 3-(cafeil)(sinapil)glucosil-5-glucosídeo	24,0 – 24,3	524	979	817 [M-162] ⁺ , 655 [M-324] ⁺ , 449 [M-530] ⁺ , 287 [M-692] ⁺	817 → 287 [M-162-530] ⁺ , 449 → 287 [M-530-162] ⁺
14 ^d	cianidina 3-(cafeil)(feruil)glucosil-5-glucosídeo	24,4 – 24,7	524, 327	949	787 [M-162] ⁺ , 449 [M-500] ⁺ , 287 [M-662] ⁺	787 → 287 [M-162-500] ⁺ , 449 → 287 [M-500-162] ⁺
15	cianidina 3-(cafeil)(sinapil)glucosídeo	24,9 – 25,1	536, 331, 297	817	655 [M-162] ⁺ , 449 [M-368] ⁺ , 287 [M-530] ⁺	655 → 287 [M-162-368] ⁺ , 449 → 287 [M-368-162] ⁺
16 ^d	cianidina 3-(sinapil)(sinapil)diglucosil-5-glucosídeo	25,6 – 26,0	530, 311	1185	1023 [M-162] ⁺ , 449 [M-736] ⁺	1023 → 287 [M-162-736] ⁺ , 449 → 287 [M-736-162] ⁺
17 ^d	cianidina 3-(cafeil)(sinapil)glucosídeo	26,3 – 26,5	526, 321	817	287 [M-530] ⁺	n.d.
18 ^d	cianidina 3-(cafeil)(feruil)glucosídeo	26,6 – 26,7	535, 328	787	287 [M-500] ⁺	n.d.
19 ^d	cianidina 3-(sinapil)(sinapil)diglucosídeo	26,7 – 27,0	526, 321	1023	287 [M-736] ⁺	n.d.
20 ^d	cianidina 3-(feruil)(feruil)diglucosídeo	27,0 – 27,3	526, 312	963	287 [M-676] ⁺	n.d.

^a Picos numerados de acordo com os cromatogramas das Figuras 1 e 3.

^b Intervalo de tempo de retenção em coluna C₁₈ Luna (5 µm, 250 mm x 4.6 mm, Phenomenex).

^c Gradiente linear de água/MeOH, ambos adicionados de 5%v/v ácido fórmico, de 90:10 a 60:40 em 20 min, então de 20:80 a 15 min, essa proporção foi mantida por 5 min.

^d Antocianinas presentes apenas nos extratos obtidos por MAE.

n.d. não detectado

Nos extratos obtidos por MAE foram identificadas 20 antocianinas, 12 delas não haviam sido detectadas nos extratos de repolho roxo obtidos por extração estática ou acelerada por agitação. As antocianinas detectadas apenas nos extratos obtidos por MAE foram: cianidina 3,5-diglucosídeo (pico 2), cianidina 3-diglucosídeo (pico 4), cianidina 3-(sinapil)diglucosídeo (pico 5), cianidina 3-glucosídeo (pico 6), cianidina 3-(feruil)(feruil)(sinapil)glucosil-5-glucosídeo (pico 11), cianidina 3-(cafeil)(sinapil)glucosil-5-glucosídeo (pico 13), cianidina 3-(cafeil) (feruil)glucosil-5-glucosídeo (pico 14), cianidina 3-(sinapil)(sinapil)diglucosil-5-glucosídeo (pico 16), cianidina 3-(cafeil)(sinapil)glucosídeo (pico 17), cianidina 3-(cafeil)(feruil)glucosídeo (pico 18), cianidina 3-(sinapil)(sinapil)diglucosídeo (pico 19) e cianidina 3-(feruil)(feruil)diglucosídeo (pico 20).

A identificação das antocianidinas cianidina 3,5-diglucosídeo e cianidina 3-glucosídeo foi confirmada pela comparação com padrões e pela presença dos íons moleculares $[M]^+$ a m/z 611 e m/z 449, respectivamente.

No espectro de MS^2 , as antocianinas aciladas ao ácido sinápico, ferúlico e cafeico apresentaram perda de 206 u, 176 u e 162 u, respectivamente. Apesar da eliminação de ácido cafeico ser numericamente igual à perda de uma hexose, o tempo de eluição em coluna C_{18} de uma antocianina ligada a um ácido cafeico é muito maior do que o apresentado por uma antocianina ligada a uma hexose (Wu et al., 2006). Na identificação das antocianinas aciladas ao ácido cumárico também foi analisada a combinação das características de espectro de massas e tempo de retenção. Os espectros de MS^2 apresentaram perda de 146 u referente à liberação do grupo ácido, essa perda é numericamente igual à eliminação de uma ramnose; no entanto, o tempo de retenção apresentado pela antocianina acilada é superior ao da não acilada.

A partir dos espectros de MS^3 , foram obtidas informações estruturais de antocianinas como a cianidina 3-(sinapil)(sinapil)diglucosil-5-glucosídeo. No MS^2 , esse composto apresentou perdas de 162 u e 736 u, referentes a eliminação de uma unidade de glucose e de dois grupos sinapil + duas glucoses, respectivamente. No entanto, no MS^2 não foi detectado o íon referente à cianidina livre a m/z 287, que foi detectado apenas no MS^3 .

3.2. Extração estática *versus* acelerada por agitação

Foram detectadas apenas 8 antocianinas nos extratos de antocianinas de repolho roxo obtidos por extração sólido-líquido tradicionais, sendo o perfil de antocianinas obtido por extração estática muito similar ao do obtido por agitação (Figura 1). As antocianinas cianidina 3-diglucosil-5-glucosídeo (pico 1), cianidina 3-(sinapil)diglucosil-5-glucosídeo (pico 3), cianidina 3-(cafeil)(cumaril)diglucosil-5-glucosídeo (pico 7), cianidina 3-(cafeil)(feruil)diglucosil-5-glucosídeo (pico 8), cianidina 3-(cafeil)(cumaril)(sinapil)diglucosil-5-glucosídeo (pico 9), cianidina 3-(cafeil)(sinapil)glucosil-5-glucosídeo (pico 10), cianidina 3-(cafeil)(cumaril)glucosil-5-glucosídeo (pico 12) e cianidina 3-(cafeil)(sinapil)glucosídeo (pico 15) foram detectadas nos extratos obtidos por agitação e por extração estática.

A concentração de antocianinas totais obtida por extração estática foi significativamente maior ($p < 0,05$) do que a por agitação (Tabela 3). A ruptura parcial do tecido vegetal devido ao longo período de contato com a solução acidificada na extração estática pode estar relacionada com o aumento da liberação das antocianinas para a solução (Andersen e Jordheim, 2013). A concentração das antocianinas aciladas ao ácido cafeico + cumárico (picos 7, 12) foi significativamente maior nos extratos obtidos por extração estática quando comparada com a concentração nos extratos obtidos por agitação. Por outro lado, não houve diferença ($p > 0,05$) na extração dos compostos acilados ao ácido cafeico + sinápico (picos 10 e 15) e cafeico + ferúlico (pico 8).

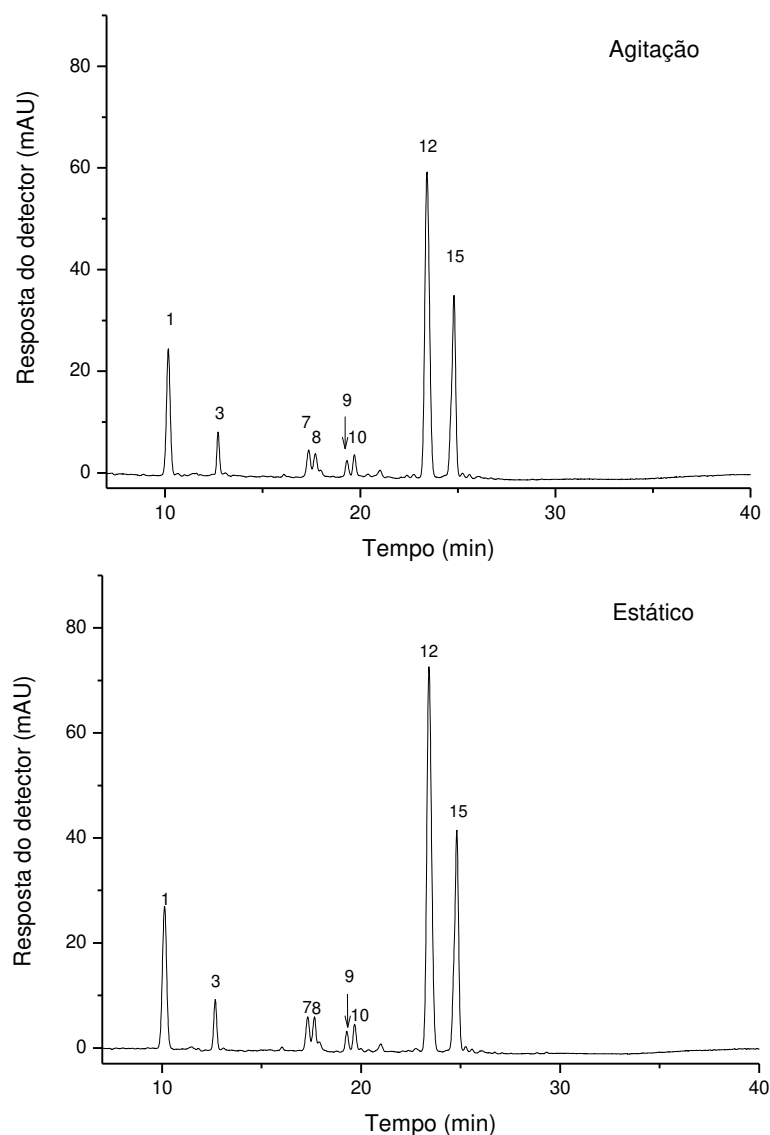


Figura 1: Cromatogramas processados a 520 nm, obtidos por HPLC-DAD, do extrato de antocianinas de repolho roxo obtido por extração acelerada por agitação e extração estática. Os picos foram numerados segundo a identificação apresentada na Tabela 2. Compostos: (1) cianidina 3-diglucosil-5-glucosídeo, (3) cianidina 3-(sinapil)diglucosil-5-glucosídeo, (7) cianidina 3-(cafeil)(cumaril)diglucosil-5-glucosídeo, (8) cianidina 3-(cafeil)(feruil)diglucosil-5-glucosídeo, (9) cianidina 3-(cafeil)(cumaril)(sinapil)diglucosil-5-glucosídeo, (10) cianidina 3-(cafeil)(sinapil)glucosil-5-glucosídeo, (12) cianidina 3-(cafeil)(cumaril)glucosil-5-glucosídeo, (15) cianidina 3-(cafeil)(sinapil)glucosídeo.

Tabela 3. Conteúdo de antocianinas de repolho roxo em extratos obtidos por extração sólido líquido acelerada por agitação e estática.

	Concentração (mg cianidina 3-glucosídeo/100 g repolho liofilizado)	
	Extração por agitação	Extração estática
Total de antocianinas	650,5 ± 25,6 ^a	701,5 ± 10 ^b
Total de antocianinas não aciladas	98,1 ± 3,8 ^a	110,8 ± 5,3 ^b
Total de antocianinas aciladas	552,4 ± 22,7 ^a	590,7 ± 5,0 ^b
Total de antocianinas aciladas aos ácidos cafeico e cumárico	336,9 ± 15,6 ^a	359,4 ± 3,8 ^b
Total de antocianinas aciladas aos ácidos cafeico e ferúlico	18,5 ± 1,3 ^a	19,4 ± 1,0 ^a
Total de antocianinas aciladas aos ácidos cafeico e sinápico	186,8 ± 12,1 ^a	194,7 ± 1,4 ^a
Total de antocianinas derivadas de cianidina 3-diglucosil-5-glucosídeo	173,0 ± 6,0 ^a	195,9 ± 8,6 ^b
Total de antocianinas derivadas de cianidina 3,5-diglucosídeo	318,0 ± 15,7 ^a	340,7 ± 4,6 ^b
Total de antocianinas derivadas de cianidina 3-glucosídeo	159,5 ± 10,7 ^a	164,9 ± 0,8 ^b

^{a, b} Letras diferentes na mesma linha indicam valores significativamente diferentes com 95% de significância.

Média ± desvio-padrão (n=3), compostos quantificados por HPLC-DAD como equivalente em cianidina 3-glucosídeo

Total de antocianinas: somas de todos os picos. Antocianinas não aciladas: soma dos picos 1, 2, 4 e 6; antocianinas aciladas totais: soma dos picos 3, 5, e 7 a 20; antocianinas aciladas aos ácidos cafeico e cumárico: soma dos picos 7, 9 e 12; antocianinas aciladas aos ácidos cafeico e ferúlico: soma dos picos 8, 14 e 18; antocianinas aciladas aos ácidos cafeico e sinápico: soma dos picos 9, 10, 13 e 15; antocianinas derivadas de cianidina 3-diglucosil-5-glucosídeo: somas dos picos 1, 3, 7, 8, 9 e 16; antocianinas derivadas de cianidina 3,5-diglucosídeo: soma dos picos 2, 10 a 14; antocianinas derivadas de cianidina 3-glucosídeo: soma dos picos 15 e 18.

Os teores de antocianinas não aciladas totais e de antocianinas aciladas totais foram maiores, respectivamente 10% e 6,5%, nos extratos obtidos por extração estática do que por acelerada por agitação. Desta forma, não é possível associar o aumento do teor de antocianinas não aciladas à hidrólise ácida durante a extração.

Em um estudo comparativo de diferentes métodos de extração de antocianinas de casca de uva, as antocianinas foram extraídas por contato com solução extratora acidificada (MeOH adicionado de 1% de HCl 12 N) por 9 e 20 h à temperatura ambiente. Os extratos obtidos por estes métodos apresentaram valores semelhantes de antocianinas totais (91 e 94 mg de cianidina 3-glucosídeo/100 g de uva fresca), e de aciladas aos diferentes ácidos cinâmicos (Revilla et al., 1998). O maior tempo em contato com a solução extratora não resultou em maior concentração dos compostos no extrato (Revilla et al., 1998), diferentemente do presente estudo.

3.3. MAE

A análise dos dados do DCFC mostrou que a extração total das antocianinas foi ser mais eficiente por MAE do que pelos métodos tradicionais. No entanto, as variáveis independentes (concentração de HCl, temperatura e volume de solução extratora) nos níveis avaliados no DCFC alteraram o perfil das antocianinas.

A Tabela 4 mostra que extrações realizadas com maiores concentrações de ácido resultaram em maiores teores de antocianinas não aciladas e de antocianinas aciladas aos ácidos cafeico e ferúlico (experimentos 4 e 8). Esse efeito positivo foi significativo (Tabela 5, p-valor < 0,05), indicando que o aumento da concentração de HCl em MeOH está relacionado a maiores extrações de antocianinas aciladas aos ácidos cafeico e ferúlico e de antocianinas não aciladas. Por outro lado, a concentração de HCl apresentou efeito significativamente negativo na concentração das antocianinas aciladas aos ácidos cafeico e cumárico e das antocianinas derivadas da cianidina 3-diglucosídeo-5-glucosídeo (Tabela 5). Devido a estes efeitos opostos, a concentração de ácido não apresentou efeito significativo no teor de antocianinas totais, como pode ser facilmente percebido quando comparamos os experimentos 3 e 4 do DCFC (Tabela 4).

Tabela 4: Concentração de antocianinas totais, total de não aciladas, total de aciladas, total de aciladas aos ácidos cafeico e cumárico, total de aciladas aos ácidos cafeico e ferúlico, total de aciladas aos ácidos cafeico e sinápico, total de derivadas de cianidina 3-diglucosil-5-glucosídeo, total de derivadas da cianidina 3,5-diglucosídeo e total de derivadas cianidina 3-glucosídeo de repolho roxo, obtidas por extração assistida por micro-ondas.

Concentração de antocianinas (mg cianidina 3-glucosídeo /100 g repolho liofilizado) ^a												
Experimento	Variáveis independentes			Total de antocianinas	Total de antocianinas não aciladas	Total de antocianinas aciladas	Total de antocianinas aciladas aos ácidos cafeico e cumárico	Total de antocianinas aciladas aos ácidos cafeico e ferúlico	Total de antocianinas aciladas aos ácidos cafeico e sinápico	Total de antocianinas derivadas de cianidina 3-diglucosil-5-glucosídeo	Total de antocianinas derivadas de cianidina 3,5-diglucosídeo	Total de antocianinas derivadas de cianidina 3-glucosídeo
	% HCl em MeOH	Temperatura (°C)	Volume (mL)									
1	0,3	90	28	749,6	133,2	616,4	373,4	21,0	195,7	172,7	363,9	201,3
2	0,7	90	28	725,5	156,4	569,1	306,5	23,7	185,3	171,3	356,6	192,0
3	0,3	110	28	694,2	155,3	538,9	229,7	53,9	158,1	116,8	320,4	236,5
4	0,7	110	28	718,0	185,0	533,0	148,8	99,6	148,2	76,8	327,5	252,8
5	0,3	90	42	586,3	133,2	453,1	361,0	27,9	149,9	170,5	376,2	34,7
6	0,7	90	42	739,5	160,8	578,7	305,0	30,6	179,9	173,6	356,8	193,5
7	0,3	110	42	673,9	150,8	523,1	237,7	51,0	157,3	101,9	314,7	228,5
8	0,7	110	42	691,4	182,1	509,2	119,8	105,8	136,2	71,6	300,9	256,0
9	0,5	100	35	741,2	151,4	589,7	277,2	58,3	171,4	138,2	356,2	217,6
10	0,5	100	35	728,1	155,4	572,7	262,6	60,3	169,9	139,9	347,1	221,3

^a Compostos quantificados por HPLC-DAD como equivalente de cianidina 3-glucosídeo

Total de antocianinas: somas de todos os picos do cromatograma. Total de antocianinas não aciladas: soma dos picos 1, 2, 4 e 6; total de antocianinas aciladas: soma dos picos 3, 5, e 7 a 20; total de antocianinas aciladas aos ácidos cafeico e cumárico: soma dos picos 7, 9 e 12; total de antocianinas aciladas aos ácidos cafeico e ferúlico: soma dos picos 8, 14 e 18; total de antocianinas aciladas aos ácidos cafeico e sinápico: soma dos picos 9, 10, 13 e 15; total de antocianinas derivadas de cianidina 3-diglucosídeo-5-glucosídeo: somas dos picos 1, 3, 7, 8, 9 e 16; total de antocianinas derivadas de cianidina 3,5-diglucosídeo: soma dos picos 2, 10 a 14; total de antocianinas derivadas de cianidina 3-glucosídeo: soma dos picos 15 e 18.

Tabela 5: Nível de significância (p-valor) do efeito das variáveis independentes concentração de HCl em MeOH (1), temperatura (2) e volume (3), efeito da curvatura e das interações entre variáveis no DCFC na concentração de antocianinas obtidas por extração assistida por micro-ondas.

	Efeito na extração de antocianinas (p-valor)				Interação entre as variáveis (p-valor)		
	% HCl (1)	Temperatura (2)	Volume (3)	Curvatura	1x2	1x3	2x3
Total de antocianinas	42,6000 (0,32342)	-5,8500 (0,87482)	-49,0500 (0,27328)	69,2500 (0,47741)	-21,9500 (0,57211)	42,7500 (0,32214)	25,6000 (0,51664)
Total de antocianinas não aciladas	27,9500 (0,00286)	22,4000 (0,00444)	-0,7500 (0,66634)	-32,4750 (0,01240)	2,5500 (0,23088)	1,5000 (0,42222)	-2,9500 (0,18781)
Total de antocianinas aciladas	14,6250 (0,69711)	-28,2750 (0,47648)	-48,3250 (0,27581)	101,7063 (0,32816)	-24,5260 (0,52967)	41,2250 (0,33274)	28,5250 (0,43133)
Total de antocianinas aciladas aos ácidos cafeico e cumárico	-80,425 (0,01487)	-152,475 (0,00420)	-8,725 (0,47176)	146,956 (0,02599)	-18,0195 (0,19582)	-6,525 (0,57817)	-1,775 (0,87444)
Total de antocianinas aciladas aos ácidos cafeico e ferúlico	26,4750 (0,00438)	51,7750 (0,00115)	4,2750 (0,13546)	-31,8938 (0,01755)	23,7750 (0,00542)	2,2750 (0,32476)	-2,6250 (0,27380)
Total de antocianinas aciladas aos ácidos cafeico e sinápico	-2,8500 (0,78462)	-27,7500 (0,09346)	-16,0000 (0,22203)	35,8875 (0,24831)	-12,6500 (0,30045)	7,3000 (0,50813)	9,6000 (0,40364)
Total de antocianinas derivadas de cianidina 3-diglucosídeo-5-glucosídeo	-17,1500 (0,00408)	-80,2500 (0,00019)	-5,0000 (0,04502)	70,3750 (0,00144)	-18,0000 (0,00370)	3,5500 (0,08385)	-5,0555 (0,04419)
Total de antocianinas derivadas de cianidina 3,5-diglucosídeo	-8,3500 (0,14450)	-47,5000 (0,00561)	-4,9500 (0,30028)	58,0625 (0,02176)	5,0000 (0,29670)	-8,2500 (0,14728)	-11,2000 (0,08850)
Total de antocianinas derivadas de cianidina 3-glucosídeo	48,3250 (0,22392)	88,0750 (0,08667)	-42,4750 (0,26572)	-21,5063 (0,78071)	-26,4250 (0,44171)	44,8250 (0,24781)	40,0750 (0,28574)

Picos numerados de acordo com os cromatogramas das Figuras 1 e 3.

Total de antocianinas não aciladas: soma dos picos 1, 2, 4 e 6; total de antocianinas aciladas: soma dos picos 3, 5, e 7 a 20; total de antocianinas aciladas aos ácidos cafeico e cumárico: soma dos picos 7, 9 e 12; total de antocianinas aciladas aos ácidos cafeico e ferúlico: soma dos picos 8, 14 e 18; total de antocianinas aciladas aos ácidos cafeico e sinápico: soma dos picos 9, 10, 13 e 15; total de antocianinas derivadas de cianidina 3-diglucosídeo-5-glucosídeo: somas dos picos 1, 3, 7, 8, 9 e 16; total de antocianinas derivadas de cianidina 3,5-diglucosídeo: soma dos picos 2, 10 a 14; total de antocianinas derivadas de cianidina 3-glucosídeo: soma dos picos 15 e 18.

Ao contrário do que acontece com as antocianinas aciladas a ácidos alifáticos, as antocianinas aciladas aos ácidos cafeico + ferúlico e aciladas aos ácidos cafeico + sinápico parecem ser pouco susceptíveis à hidrólise ácida. Por outro lado, as concentrações das antocianinas aciladas aos ácidos cafeico + cumárico são menores quando as concentrações de antocianinas não aciladas são maiores (tabela 4 - experimentos 2, 4, 6 e 8). Assim, os maiores teores de antocianinas não aciladas podem estar associados tanto à maior extração devido à hidrólise parcial do tecido vegetal como também à conversão de antocianinas aciladas aos ácidos cafeico + cumárico em não aciladas.

O efeito da temperatura na extração de antocianinas totais, antocianinas totais aciladas, antocianinas totais aciladas aos ácidos cafeico + sinápico e antocianinas totais derivadas de cianidina 3-glucosídeo não foi significativo (Tabela 5). Por outro lado, maiores temperaturas aumentaram significativamente as concentrações de antocianinas não aciladas e antocianinas aciladas aos ácidos cafeico + ferúlico. Pode-se verificar nos experimentos 3 e 4, 7 e 8 (Tabela 4) que o efeito do aumento da temperatura é mais intenso quando a concentração de ácido é maior (Figura 2). Esse comportamento é explicado pela interação significativa positiva entre as variáveis temperatura e concentração de HCl em MeOH, como mostra a Tabela 5. Já o efeito destas variáveis na extração de derivadas de cianidina 3-diglucosil-5-glucosídeo, derivadas de cianidina 3,5-diglucosídeo e antocianinas aciladas aos ácidos cafeico + cumárico foi negativo e significativo (Tabela 5).

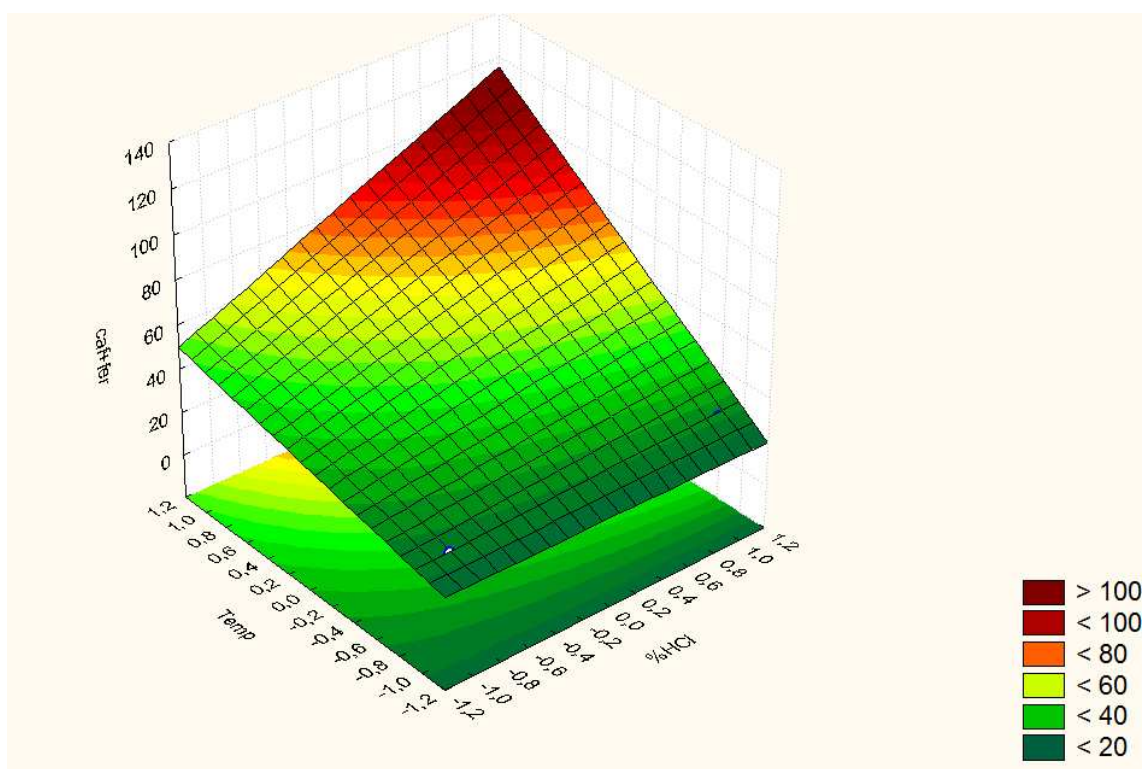


Figura 2: Superfície de resposta da concentração de antocianinas aciladas aos ácidos cafeico e ferúlico em função da % de HCl e da temperatura de extração.

Estes resultados sugerem que a hidrólise das antocianinas aciladas aos ácidos cafeico + cumárico pode ocorrer de forma mais intensa em menores concentrações de HCl e menores temperaturas do que a hidrólise das antocianinas aciladas aos ácidos cafeico + sinápico e aciladas aos ácidos cafeico + ferúlico. Esse efeito é visualizado facilmente nos cromatogramas dos extratos obtidos nas condições descritas para os experimentos 1 e 4 (Figura 3), observando-se os picos 6 (cianidina 3-glucosídeo), 12 (cianidina 3-(cafeil)(cumaril)glucosil-5-glucosídeo) e 14 (cianidina 3-(cafeil)(feruil)glucosil-5-glucosídeo). Percebe-se uma redução do pico 12 quando a extração é feita nas maiores concentrações de ácido e em maiores temperaturas, enquanto há um aumento da intensidade dos picos 6 e 14. O aumento da concentração da cianidina 3-glucosídeo (pico 6) pode estar relacionada à hidrólise das antocianinas aciladas e ligadas a mais de um açúcar.

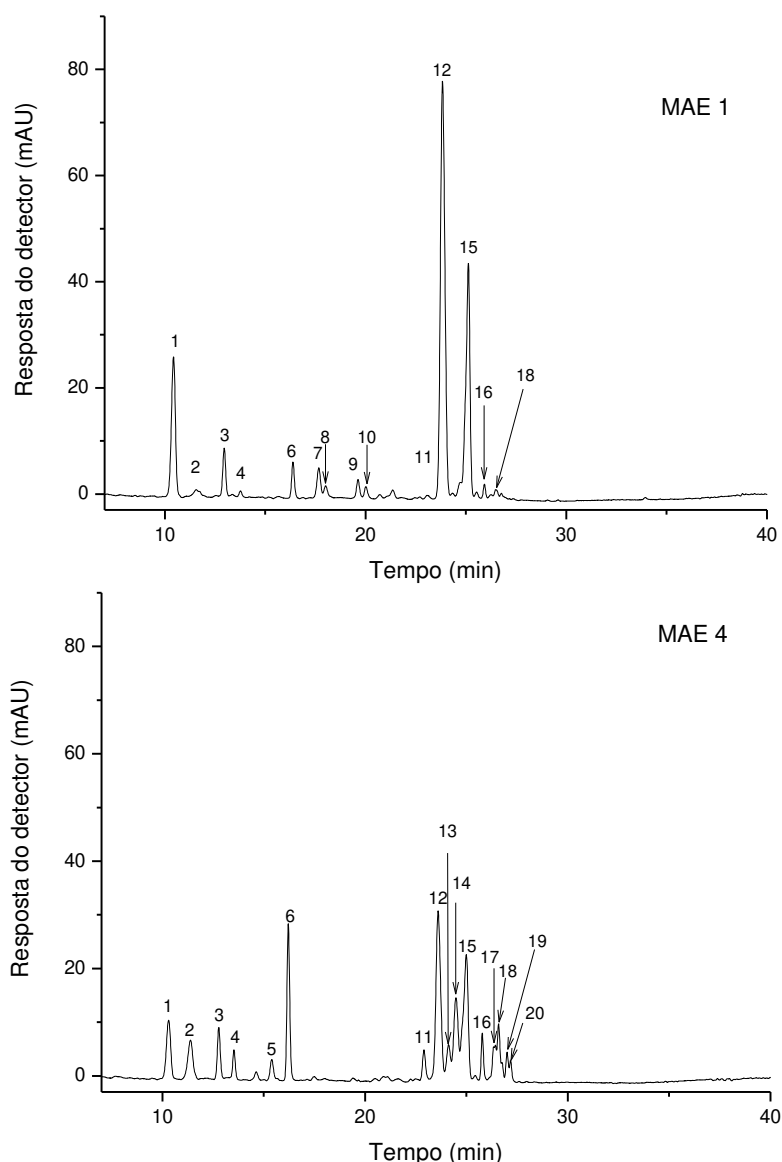


Figura 3: Cromatogramas processados a 520 nm, obtidos por HPLC-DAD, do extrato de antocianinas de repolho roxo obtido por MAE. A corresponde ao experimento 1 no DCFC, utilizando 28 mL de solução 0,3% de HCl em MeOH, a 90°C, e B ao experimento 4 no DCFC, utilizando 28 mL de solução 0,7% de HCl em MeOH, a 110°C. Picos numerados segundo identificação na Tabela 2: (1) cianidina 3-diglucosil-5-glucosídeo, (2) cianidina 3,5-diglucosídeo, (3) cianidina 3-(sinapil)diglucosil-5-glucosídeo, (4) cianidina 3-diglucosídeo, (5) cianidina 3-(sinapil)diglucosídeo, (6) cianidina 3-glucosídeo, (7) cianidina 3-(cafeil)(cumaril)diglucosil-5-glucosídeo, (8) cianidina 3-(cafeil)(feruil)diglucosil-5-glucosídeo, (9) cianidina 3-(cafeil)(cumaril)(sinapil)diglucosil-5-glucosídeo, (10) cianidina 3-(cafeil)(sinapil)glucosil-5-glucosídeo, (11) cianidina 3-(feruil)(feruil)(sinapil)glucosil-5-glucosídeo, (12) cianidina 3-(cafeil)(cumaril)glucosil-5-glucosídeo, (13) cianidina 3-(cafeil)(sinapil)glucosil-5-glucosídeo, (14) cianidina 3-(cafeil)(feruil)glucosil-5-glucosídeo, (15) cianidina 3-(cafeil)(sinapil)glucosídeo, (16) cianidina 3-(sinapil)(sinapil)diglucosil-5-glucosídeo, (17) cianidina 3-(cafeil)(sinapil)glucosídeo, (18) cianidina 3-(cafeil)(feruil)glucosídeo, (19) cianidina 3-(sinapil)(sinapil)diglucosídeo, (20) cianidina 3-(feruil)(feruil)diglucosídeo.

A cinética de degradação térmica de antocianinas isoladas de cenoura roxa mostrou que esses pigmentos ligados a diferentes ácidos cinâmicos apresentam tempo de meia-vida diferentes (Sadilova et al., 2006). Em outras palavras, a hidrólise parcial, hidrólise total ou a degradação completa da antocianina dependem das características dos ácidos. Dentre as antocianinas isoladas de cenoura, a antocianina acilada a ácido sinápico foi mais estável do que as antocianinas ligadas a ácido ferúlico, que por sua vez foi mais estável que as com ácido cumárico. Os autores propõem que o aumento do grau de metoxilação do grupo acilado aumenta a estabilidade da cianidina (Sadilova et al., 2006). Da mesma forma, no presente trabalho, dentre as antocianinas de repolho roxo extraídas por MAE, as antocianinas aciladas aos ácidos cafeico + cumárico foram mais facilmente hidrolisadas do que as aciladas aos ácidos cafeico + ferúlico e cafeico + sinápico.

Os menores teores da cianidina 3-(cafeil)(cumaril)glucosil-5-glucosídeo, observados nos experimentos 4 e 8, parecem estar relacionados à liberação dos grupos ácidos catalisada pela alta temperatura, uma vez que a exposição a 1% de HCl não teve influência como discutido acima.

Embora o mecanismo de degradação térmica em meio ácido descrito na literatura mostre que a cianidina livre é um dos produtos intermediários da via (Andersen e Jordheim, 2013), a aglicona não foi detectado por HPLC-DAD-MSⁿ no presente estudo. A ausência de cianidina livre poderia indicar que na faixa de temperatura utilizada ocorreu apenas hidrólise parcial dos pigmentos, liberando os ácidos cafeico e cumárico. Em altas temperaturas os teores das antocianinas aciladas aos grupos ácidos cafeico + ferúlico foram maiores do que as aciladas aos ácidos cafeico e cumárico, o que indica maior susceptibilidade desses compostos à hidrólise.

O volume de solução extratora exerceu efeito negativo na extração de antocianinas totais, antocianinas totais aciladas, antocianinas totais aciladas aos ácidos cafeico e sinápico e antocianinas totais derivadas de cianidina 3-glucosídeo (Tabela 5), embora o efeito não tenha sido significativo. Em outras palavras, menor volume de solução extratora resultou em maiores teores das antocianinas citadas acima.

4. Conclusão

Para amostras com antocianinas aciladas a diferentes ácidos cinâmicos, os resultados indicam que não é possível otimizar um método de extração de antocianinas assistida por micro-ondas porque as condições podem favorecer a hidrólise dos compostos acilados, e o perfil obtido não reflete o perfil das antocianinas na forma nativa.

Pode-se dizer que o aquecimento por micro-ondas nas temperaturas avaliadas durante a extração não induz a degradação das antocianinas a antocianidinas ou a compostos de menor peso molecular. No entanto, foi observada hidrólise parcial de antocianinas aciladas a ácidos cinâmicos, resultando no aumento das concentrações de antocianinas não aciladas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andersen, Ø.M.; Jordheim, M.C. 2013. Basic Anthocyanin Chemistry and Dietary Sources. In: Anthocyanins in Health and Disease, ed. T.C. Wallace, M. Giusti., pp. 13-90. CRC Press, Boca Raton.

Chan, C.H.; Yusoff, R. Ngoh, G.C.; Kung, F.W.L. 2011. Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants. *Journal of Chromatography A*, 1218 : 6213–6225.

De Rosso, V.V.; Mercadante, A.Z. 2007. HPLC-PDA-MS/MS of anthocyanins and carotenoids from dovyalis and tamarillo fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 9135-9141.

Degenhardt, A.; Knapp, H.; Winterhalter, P. 2000. Separation and purification of anthocyanins by high-speed countercurrent chromatography and screening for antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 338-343.

Faria, A.F.; Marques, M.C.; Mercadante, A.Z. 2011. Identification of bioactive compounds from jambolão (*Syzygiumcumini*) and antioxidant capacity evaluation in different pH conditions. *Food Chemistry*, 126: 1571-1578.

Garofulic, I.E.; Dragović-Uzelac, V.; Jambrak, A.R.; Jukić, M. 2013. The effect of microwave assisted extraction on the isolation of anthocyanins and phenolic acids from sour cherry Marasca (*Prunuscerasus* var. Marasca). *Journal of Food Engineering*, 117: 437-442.

Giusti, M.; Rodríguez-Saona, L.E.; Griffin, D.; Wrolstad, R.E. 1999. Electrospray and tandem mass spectroscopy as tools for anthocyanin characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 4657-4664.

Hayat, K.; Hussain, S.; Abbas, S.; Farooq, U.; Ding, B.; Xia, S.; Jia, C.; Zhang, X.; Xia, W. 2009. Optimized microwave-assisted extraction of phenolic acids from citrus mandarin peels and evaluation of antioxidant activity in vitro, *Separation and Purification Technology*, 70: 63-70.

Liaqid, A.; Guerrero, R.F.; Cantos, E.; Palma, M.; Barroso, C.G. 2011. Microwave assisted extraction of anthocyanins from grape skins. *Food Chemistry*, 124: 1238-1243.

Murador, D.C.; Mercadante, A.Z.; de Rosso, V.V. 2016. Cooking techniques improve the levels of bioactive compounds and antioxidant activity in kale and red cabbage, *Food Chemistry*, 196: 1101–1107.

Revilla, E.; Ryan, J.M.; Martín-Ortega, G. 1998. Comparison of Several Procedures Used for the Extraction of Anthocyanins from Red Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 4592–4597.

Sadilova, E.; Stintzing, F.C.; Carle, R. 2006. Thermal degradation of acylated and nonacylated anthocyanins *Journal of Food Science*, 71: 504-512.

Teng, H.; Lee, W.Y.; Choi, Y.H. 2013. Optimization of microwave assisted extraction for anthocyanins, polyphenols and antioxidants from raspberry (*Rubus coreanus*

Miq.) using response surface methodology. *Journal of Separation Science*, 36: 3107–3114.

Wen, Y.; Chen, H.; Zhou, X.; Deng, Q.; Zhao, Y.; Zhao, C.; Gong, X. 2015. Optimization of the microwave-assisted extraction and antioxidant activities of anthocyanins from blackberry using a response surface methodology. *RSC Advances*, 5: 19686–19695.

Wu, X.; Prior, R.L. 2005. Identification and characterization of anthocyanins by high-performance liquid chromatograph- electrospray ionization- tandem mass spectrometry in common foods in the United States: vegetables, nuts and grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 3101–3113.

Yang, Z.; Zhai, W. 2010. Optimization of microwave-assisted extraction of anthocyanins from purple corn (*Zea mays* L.) cob and identification with HPLC–MS. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11: 470–476.

Zou, T.; Wang, W.; Gou, H.; Zhu, Y.; Luo, X.; Liu, F.; Ling, W. 2012. Optimization of microwave assisted extraction of anthocyanins in extract using HPLC-ESI-MS. *Journal of Food Science*, 71: 46–50.

Xiao, W.; Han, L.; Shi, B. 2008. Microwave-assisted extraction of flavonoids from *Radix Astragali*, *Separation and Purification Technology*, 62: 614-618.

DISCUSSÃO GERAL

O presente trabalho avaliou frutos de guajiru preto (*Chrysobalanus icaco* L.) *in natura* coletados na cidade de Belém do Pará. Os frutos apresentaram altura de $23,33 \pm 1,65$ mm e diâmetro de $18,25 \pm 1,80$ mm; a fração comestível constituída pela combinação de polpa e casca apresentou massa média de $2,73 \pm 0,54$ g, representando cerca de 60% da fruta inteira ($4,65 \pm 0,78$ g). A parte comestível possui umidade de $81,85 \pm 1,48$ g/100g, e quando liofilizada mostrou 90,6% de carboidratos, 2,0% de proteínas e 1,5% de lipídeos.

A caracterização dos compostos bioativos de guajiru foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada aos detectores de arranjo de diodos e de espectrometria de massas (HPLC-DAD-MSⁿ). Foram identificados três compostos fenólicos não antociânicos: derivado de ácido elágico, miricetina pentosídeo e derivado de quercetina, descritos pela primeira vez em guajiru preto. Os carotenoides também foram estudados pela primeira vez nessa fruta, sendo identificados: all-*trans*-violaxantina, 9'-*cis*-neoxantina, 9-*cis*-violaxantina, all-*trans*-luteína, all-*trans*-zeaxantina e all-*trans*- β -caroteno. O teor de carotenoides na polpa foi semelhante ao apresentado por frutas locais ricas em antocianinas. Por outro lado, esse valor foi inferior aos conteúdos de carotenoides de frutos amazônicos de cor amarela. Foram detectadas 8 antocianinas em guajiru preto, dentre elas as antocianinas delfinidina-3-glucosídeo, cianidina 3-glucosídeo, petunidina 3-glucosídeo e peonidina 3-glucosídeo foram positivamente identificadas por comparação com padrões. As antocianinas aciladas foram tentativamente identificadas como petunidina 3-(6"-acetil)galactosídeo e petunidina 3-(6"-acetil)glucosídeo. Foram detectados os íons a m/z 521 [M⁺] e 317 [M-162-42]⁺, porém a perda de 204 u sugere tanto a liberação de uma hexose e de um grupo acetil como também pode estar relacionada com a liberação de uma pentose e um grupo oxalil [M-132-72]⁺. Desta forma, utilizando apenas espectrometria de massas não é possível diferenciar estes dois compostos. De forma análoga, as antocianinas delfinidina 3-(6"-acetil)galactosídeo ou delfinidina 3-(6"-oxalil)arabinosídeo, peonidina 3-(6"-acetil)glucosídeo ou peonidina 3-(6"-oxalil)arabinosídeo também foram tentativamente identificadas em guajiru.

Três antocianinas foram identificadas por HPLC-DAD-MSⁿ em jabuticaba: delfinidina 3-glucosídeo, cianidina 3-glucosídeo e cianidina 3-(succinil)glucosídeo, sendo a antocianina acilada identificada pela primeira vez em jabuticaba. Todas as antocianinas identificadas foram detectadas nos extratos obtidos por extração estática, extração acelerada por agitação e extração assistida por micro-ondas (MAE). A concentração da cianidina 3-glucosídeo foi significativamente maior nos extratos obtidos por extração estática, enquanto a concentração de antocianinas totais obtida por extração estática não foi significativamente diferente da obtida por agitação ($p > 0,05$). Esses resultados possivelmente estão relacionados à complexidade do tecido vegetal da casca da jabuticaba, assim, o tempo de contato com a solução extratora parece influenciar a eficiência de extração de antocianinas nesse tipo de matriz. A análise dos dados do delineamento composto de face centrada (DCFC) mostrou que as condições utilizadas na MAE alteraram o perfil das antocianinas quando comparado com os métodos tradicionais de extração. A extração das antocianinas totais não foi mais eficiente por MAE do que pelos métodos tradicionais. Por outro lado, na MAE o aumento da concentração de HCl na solução extratora e a elevação da temperatura aumentaram significativamente a concentração de cianidina 3-(succinil)glucosídeo. Foi observada uma interação positiva dessas variáveis, ou seja, o efeito do aumento da temperatura foi mais intenso quando a concentração de ácido foi maior. Essa maior concentração de cianidina 3-(succinil)glucosídeo não era esperada, pois antocianinas aciladas a ácidos alifáticos são muito susceptíveis à hidrólise ácida. Possivelmente as antocianinas derivadas de ácido succínico são menos susceptíveis à hidrólise do que as derivadas de outros ácidos alifáticos, e o baixo tempo em contato com ácido na MAE pode não ter sido suficiente para promover a hidrólise desses pigmentos.

Nove antocianinas foram identificadas por HPLC-DAD-MSⁿ em cebola roxa: cianidina 3,5-diglucosídeo, (2) cianidina 3-glucosídeo, cianidina 3-diglucosídeo, peonidina 3-glucosídeo, cianidina 3-(3"succinil)glucosídeo, cianidina 3-(6"malonil)glucosídeo, cianidina 3-(6"malonil)diglucosídeo, cianidina 3-(6"succinil)glucosídeo, cianidina 3-(6"succinil)diglucosídeo. Todas as antocianinas identificadas nos extratos de cebola roxa obtidos por extração acelerada por agitação e extração estática também foram detectadas nos extratos obtidos por MAE. O teor de antocianinas totais foi significantemente maior no extrato obtido por

extração estática em comparação com a extração acelerada por agitação. Por outro lado, os teores de antocianinas aciladas totais e de antocianinas aciladas a ácido succínico foram significativamente menores na extração estática em relação à acelerada por agitação, fato este que pode ser explicado pela conversão das espécies aciladas em não aciladas, uma vez que o contato das antocianinas por longo tempo em solução com ácido provavelmente promoveu a hidrólise do grupo ácido, alterando o perfil das antocianinas. Surpreendentemente os teores de antocianinas aciladas a ácido malônico não diferiram estatisticamente entre extração estática e acelerada por agitação, possivelmente porque as antocianinas aciladas a ácido malônico sejam mais susceptíveis à hidrólise ácida, e o curto tempo de contato com o ácido durante a extração acelerada por agitação tenha sido suficiente para promover a hidrólise.

Diferentemente do observado com jabuticaba, para cebola roxa a extração total das antocianinas foi mais eficiente por MAE do que pelos métodos tradicionais. No entanto, as variáveis independentes (concentração de HCl, temperatura e volume de solução extratora) nos níveis avaliados no DCFC alteraram o perfil das antocianinas. Como era esperado, as extrações realizadas utilizando maiores concentrações de HCl resultaram em menores concentrações de antocianinas aciladas a ácido malônico e antocianinas aciladas totais. Por outro lado, elevadas concentrações de HCl exerceram efeito positivo significativo no teor de antocianinas não aciladas e de antocianinas aciladas a ácido succínico. A maior concentração de antocianinas não aciladas está relacionada à conversão de antocianinas aciladas em não aciladas devido à hidrólise ácida e por isso esse parâmetro não pode ser associado diretamente à maior eficiência de extração. A interação das variáveis concentração de HCl e temperatura foi positiva, ou seja, quando a extração foi realizada em menor temperatura e em menor concentração de ácido foram obtidas maiores concentrações de antocianinas aciladas a ácido malônico. Por outro lado, maiores temperaturas resultaram em maiores concentrações de antocianinas aciladas a ácido succínico.

Ainda em cebola roxa, os resultados do experimento *steepest ascent* (SA) mostraram que em relação à concentração de ácido na solução extratora o comportamento das antocianinas aciladas a ácido malônico é o oposto daquela das aciladas a ácido succínico. Em outras palavras, quanto menor a concentração de

ácido, maior o teor de antocianinas aciladas a ácido malônico, enquanto a extração de derivados de ácido succínico é menor em concentrações baixas, próximas a 0,1%. Como descrito anteriormente no estudo de MAE de antocianinas de casca de jabuticaba, estes resultados sugerem que a hidrólise das antocianinas aciladas com ácido malônico ocorre de forma mais intensa em menores concentrações de HCl e menores temperaturas do que a hidrólise das antocianinas succinil derivadas.

As antocianinas de repolho roxo são mais complexas do que as antocianinas presentes em jabuticaba e cebola roxa. Nos extratos de antocianinas de repolho roxo obtidos por extração acelerada por agitação e por extração estática foram identificadas por HPLC-DAD-MSⁿ 8 antocianinas: cianidina 3-diglucosil-5-glucosídeo, cianidina 3-(sinapil)diglucosil-5-glucosídeo, cianidina 3-(cafeil)(cumaril)diglucosil-5-glucosídeo, cianidina 3-(cafeil)(feruil)diglucosil-5-glucosídeo, cianidina 3-(cafeil)(cumaril)(sinapil)diglucosil-5-glucosídeo, cianidina 3-(cafeil)(sinapil)glucosil-5-glucosídeo, cianidina 3-(cafeil)(cumaril)glucosil-5-glucosídeo e cianidina 3-(cafeil)(sinapil)glucosídeo. O perfil de antocianinas obtido por extração estática foi muito similar ao do obtido na acelerada por agitação, possivelmente porque as antocianinas aciladas a ácidos cinâmicos são menos susceptíveis à hidrólise ácida devido à interação intramolecular possível de ocorrer neste tipo de estrutura química.

Em repolho roxo, doze das antocianinas identificadas nos extratos obtidos por MAE não foram detectadas nos extratos obtidos pelos métodos tradicionais. As antocianinas detectadas apenas nos extratos obtidos por MAE foram: cianidina 3,5-diglucosídeo, cianidina 3-diglucosídeo, cianidina 3-(sinapil)diglucosídeo, cianidina 3-glucosídeo, cianidina 3-(feruil)(feruil)(sinapil)glucosil-5-glucosídeo, cianidina 3-(cafeil)(sinapil)glucosil-5-glucosídeo, cianidina 3-(cafeil)(feruil)glucosil-5-glucosídeo, cianidina 3-(sinapil)(sinapil)diglucosil-5-glucosídeo, cianidina 3-(cafeil)(sinapil)glucosídeo, cianidina 3-(cafeil)(feruil)glucosídeo, cianidina 3-(sinapil)(sinapil)diglucosídeo e cianidina 3-(feruil)(feruil)diglucosídeo. Assim como observado em cebola roxa, o teor de antocianinas totais de repolho roxo foi maior quando o extrato foi obtido por MAE do que pelos métodos tradicionais, embora as variáveis independentes não tenham exercido efeito significativo no teor de antocianinas totais nas faixas estudadas. Esse resultado, associado à extração de um maior número de antocianinas pode indicar que os métodos de extrações

tradicionais podem não ter sido eficientes na ruptura do tecido vegetal do repolho e com isso a extração das antocianinas não foi completa. Por outro lado, as variáveis independentes nos níveis avaliados no DCFC alteraram o perfil das antocianinas na MAE. Maiores concentrações de HCl em MeOH resultaram em maiores teores de antocianinas aciladas aos ácidos cafeico + ferúlico e de antocianinas não aciladas. O aumento da concentração de ácido não teve efeito significativo na concentração de antocianinas aciladas aos ácidos cafeico + sinápico. Por outro lado, o efeito da concentração de ácido na solução foi negativo e significativo na concentração das antocianinas aciladas aos ácidos cafeico + cumárico.

Os resultados obtidos para MAE de antocianinas de repolho roxo sugerem que tanto as antocianinas aciladas aos ácidos cafeico + ferúlico e aciladas aos ácidos cafeico + sinápico são pouco susceptíveis à hidrólise ácida. De fato, as concentrações das antocianinas aciladas aos ácidos cafeico + cumárico são menores quando as concentrações de antocianinas não aciladas são maiores, fato este que pode estar associado tanto à conversão de antocianinas aciladas aos ácidos cafeico + cumárico em não aciladas como também à maior extração devido à hidrólise parcial do tecido vegetal. . Além disso, maiores temperaturas causaram aumento significativo das concentrações de antocianinas não aciladas e antocianinas aciladas aos ácidos cafeico + ferúlico, sendo o efeito do aumento da temperatura mais intenso quando a concentração de ácido foi maior. Por outro lado, o efeito destas variáveis na extração de derivadas de cianidina 3-diglucosil-5-glucosídeo, derivadas de cianidina 3,5-diglucosídeo e antocianinas aciladas aos ácidos cafeico + cumárico foi significativamente negativo.

A concentração de ácido, tempo e temperatura na extração de antocianinas por MAE influenciou de forma diferente amostras com antocianinas com diferentes graus de complexidade: antocianinas não aciladas (jabuticaba), antocianinas aciladas com ácidos alifáticos (cebola roxa) e antocianinas aciladas com ácidos cinâmicos (repolho roxo).

CONCLUSÃO GERAL

Neste estudo, pela primeira vez, foi realizada a avaliação dos carotenoides e compostos fenólicos de guajiru (*Chrysobalanus icaco* L.) representando um importante avanço no conhecimento da biodiversidade das frutas disponíveis no Brasil. O teor de carotenoides (571 ± 21 µg eq. a β-caroteno/100 g de polpa liofilizada) encontrado foi semelhante ao de outras frutas tropicais ricas em antocianinas; no entanto, a capacidade redutora (1055 ± 83 mg eq. a ácido gálico/100 g de polpa liofilizada) foi menor do que a de outras frutas tropicais. Os resultados mostram que a polpa de guajiru possui um elevado potencial funcional devido ao seu alto teor de antocianinas (1015 ± 69 mg eq. cianidina 3-glucosídeo/100 g de fruta liofilizada). As antocianinas delphinidina 3-glucosídeo, petunidina 3-glucosídeo e peonidina 3-glucosídeo foram positivamente identificadas pela primeira vez em guajiru preto. A cianidina 3-glucosídeo foi detectada e identificada pela primeira vez em guajiru.

Os resultados indicam ainda que, para antocianinas de jabuticaba, a extração assistida por micro-ondas (MAE) apresentou eficiência semelhante aos métodos utilizados tradicionalmente. As condições avaliadas de temperatura, concentração de ácido e volume da solução extratora exerceram efeito negativo na extração de antocianinas totais e cianidina 3-glucosídeo, composto majoritário em jabuticaba, embora a MAE tenha favorecido a extração da cianidina 3-(succinil)glucosídeo.

A concentração de antocianinas totais em cebola roxa e repolho roxo foi ser maior quando obtida por MAE do que pelos métodos de extração tradicionais. Porém, nas condições avaliadas na MAE, foi observada hidrólise parcial de antocianinas aciladas a ácidos alifáticos e cinâmicos, resultando no aumento das concentrações de antocianinas não aciladas em ambas as matrizes. Por este motivo, não foi possível otimizar um método de extração de antocianinas por MAE porque o perfil obtido muito provavelmente não reflete o perfil das antocianinas na forma nativa.

Pode-se dizer que a grande novidade deste trabalho é a descoberta de que o comportamento das antocianinas aciladas a ácido malônico é oposto ao do das antocianinas aciladas a ácido succínico em relação à concentração de ácido na

solução extratora. Além disso, é possível afirmar que o aquecimento por micro-ondas nas temperaturas avaliadas durante a extração não induz a degradação das antocianinas a compostos de baixo peso molecular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Aal, E.S.M.; Akhtar, H.; Rabalski, I.; Bryan, M. 2014. Accelerated, Microwave-Assisted, and Conventional Solvent Extraction Methods Affect Anthocyanin Composition from Colored Grains. *Journal of Food Science*, 79: 138-146.
- Adonizio, A.L.; Downum, K.; Bennett, B.C.; Mathee, K. 2006. Anti-quorum sensing activity of medicinal plants in southern Florida. *Journal of Ethnopharmacology*, 105: 427–435.
- Afoakwah, A.N.; Adomako, C.; Teye, E. 2012. Microwave assisted extraction (MAE) of antioxidant constituents in plant materials. *Global Journal of Bio-Science and Technology*, 1: 132-140.
- Andersen, Ø. M.; Jordheim, M. C. 2006. The anthocyanin In: Ø. M. Andersen, Editor, *Flavonoids chemistry, biochemistry and applications*, CRC Press, Boca Raton, 471-551.
- Andersen, Ø.M.; Jordheim, M.C. 2013. Basic Anthocyanin Chemistry and Dietary Sources. In: *Anthocyanins in Health and Disease*, ed. T.C. Wallace, M. Giusti., pp. 13-90. CRC Press, Boca Raton.
- AOAC. 1997. *Official Methods of Analysis of the Official Analytical Chemists*, 16th ed. AOAC: Gaithersburg, MD. Vol. 2.
- Barreto, G. P. M.; Benassi, M. T.; Mercadante, A. Z. 2009. Bioactive compounds from several tropical fruits and correlation by multivariate analysis to free radical scavenger activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 20: 1856–1861.
- Beejmohun, V., Fliniaux, O., Grand, E., Lamblin, F., Bensaddek, L., Christen, P., Kovensky, J., Fliniaux, M., Mesnard, F. 2007. Microwave-assisted Extraction of the Main Phenolic Compounds in Flaxseed. *Phytochemical Analysis*, 18: 275-282.
- Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Marin, F. R., Ortuno, A., & Del Rio, J. A. 1997. Uses and properties of citrus flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 4505-4515.

- Bligh, E. G.; Dyer, W. J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 37: 911-917.
- Bravo, L. 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance, *Nutrition Reviews*, 56: 317–333.
- Bridle, P.; Timberlake, C.F. 1997. Anthocyanins as natural food colours - Selected aspects, *Food Chemistry*, 58: 103-109.
- Britton, G., Khachik, F. 2009. Carotenoids in food, in Carotenoids Volume 5: Nutrition and Health, ed. G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander. pp. 45–66. Birkhäuser Verlag
- Britton, G.; Liaaen-Jesen, S.; Pfander, H. 1995. Carotenoids today and challenges for the future. In: Carotenoids, Vol 1A: Spectroscopy, ed. Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. Birkhauser, Basel, pp. 13-62.
- Camel, V. 2001. Recent extraction techniques for solid matrices - supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls. *Analyst*, 126: 1182-1193.
- Castilho, R.O. Kaplan, M.A.C. 2012. Phytochemical study and antimicrobial activity of *Chrysobalanus icaco*. *Chemistry of Natural Compounds*, 1-2.
- Castilho, R.O., Kaplan, M.A. 2008. Constituintes químicos de *Licania tomentosa* Benth. (*Chrysobalanaceae*). *Química Nova*, 31: 66-69.
- Chan, C. H.; Yosoff, R.; Ngoh, G. C.; Kung, F. W. L. 2011. Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants. *Journal of Chromatography A*. 1218: 6213 – 6225.
- Chisté, R.C.; Mercadante, A.Z. 2012. Identification and Quantification, by HPLC-DAD-MS/MS, of Carotenoids and Phenolic Compounds from the Amazonian Fruit *Caryocar villosum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60: 5884-5892.

Dastmalchi, K.; Flores, G.; Wu, S.; Ma, C.; Dabo, A.J.; Whalen, K.; Reynertson, K.A.; Foronjy, R.F.; D'Armiento, J.M.; Kennelly, E.J. 2012. Edible Myrciariavexator fruits: Bioactive phenolics for potential COPD therapy, *Bioorganic e Medicinal Chemistry*, 14: 4549-4555.

De Rosso, V. V.; Mercadante, A. Z. 2007a. Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 5062-5072.

De Rosso, V. V.; Mercadante, A. Z. 2007 b. HPLC-PDA-MS/MS of anthocyanins and carotenoids from dovyalis and tamarillo fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 9135-9141.

De Rosso, V.V.; Hillebrand, S.; Cuevas Montilla, E.; Bobbio, F.O., Winterhalter, P.; Mercadante, A.Z. 2008. Determination of anthocyanins from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) and açai (*Euterpe oleracea* Mart.) by HPLC-PDA-MS/MS. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21: 291-299.

Degenhardt, A.; Knapp, H.; Winterhalter, P. 2000. Separation and purification of anthocyanins by high-speed countercurrent chromatography and screening for antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 338-343.

Erlund, I. 2004. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research*, 24: 851-874.

Eskilsson, C.S.; Björklund, E. 2000. Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 902: 227-250.

Everette, J.D., Bryant, QM; Green, AM; Abbey, YA; Wangila, GW; Walker, RB. 2010. Thorough Study of Reactivity of Various Compound Classes toward the Folin-Ciocalteu Reagent, *J Agric Food Chem*. 58: 8139–8144.

Faria, A. F.; Marques, M. C.; Mercadante, A. Z. 2011. Identification of bioactive compounds from jambolão (*Syzygiumcumini*) and antioxidant capacity evaluation in different pH conditions. *Food Chemistry*, 126: 1571-1578.

Feitosa E.A., Xavier, H.S., Randau, K.P. 2012. Chrysobalanaceae: traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 22: 1181-1186.

Fernandes, J., Castilho, R.O., Costa, M.R., Wagner-Souza, K., Kaplan, M.A.C., Gattassa, C.R. 2003. Pentacyclic triterpenes from *chrysobalanaceae* species: cytotoxicity on multidrug resistant and sensitive leukemia cell lines. *Cancer Letters*, 190: 165-169.

Ferreira, M. D., Minami, K. 2000. Qualidade de bulbos de cebola em consequência de tratamentos pré-colheita. *Scientia agricola*, 57: 693-701.

Fossen, T.; Andersen, Ø. M.; Øvstedal, D.O.; Pedersen, A.T.; Raknes, A. 1996. Characteristic Anthocyanin Pattern from Onions and other *Allium* spp. *Journal of Food Science*, 61: 703-706.

Fossen, T.; Rayyan, S.; Andersen, Ø.M. 2004. Dimeric anthocyanins from strawberry (*Fragaria ananassa*) consisting of pelargonidin 3-glucoside covalently linked to four flavan-3-ols. *Phytochemistry*, 65: 1421-1428.

Fossen, T.; Slimestad, R.; Andersen, Ø. M. 2003. Anthocyanins with 4'-glucosidation from red onion, *Allium cepa*. *Phytochemistry*, 64: 1367-1374

Garofulic, I.E.; Dragović-Uzelac, V.; Jambrak, A.R.; Jukić, M. 2013. The effect of microwave assisted extraction on the isolation of anthocyanins and phenolic acids from sour cherry Marasca (*Prunuscerasus* var. Marasca). *Journal of Food Engineering*, 117: 437-442.

Giusti, M.; Jing, P. Analysis of Anthocyanins. 2008. In: C. Socaciu, Editor, Food colorants: chemical and functional properties, CRC Press, Boca Raton, 195 -299.

- Giusti, M.; Rodríguez-Saona, L.E.; Griffin, D.; Wrolstad, R.E. 1999. Electrospray and tandem mass spectroscopy as tools for anthocyanin characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 4657-4664.
- Giusti, M.M.; Ghanadan, H.; Wrolstad, R.E. 1998. Elucidation of the structure and conformation of red radish (*Raphanus sativus*) anthocyanins using one- and two-dimensional nuclear magnetic resonance techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 4858-4863.
- Gomes, A.; Fernandes, E.; Lima, J.L.F.C.; Mira, L.; Corvo, M.L. 2008. Molecular mechanisms of anti-inflammatory activity mediated by flavonoids. *Current Medicinal Chemistry*, 15: 1586-1605.
- Gross, J. 1991. Chlorophylls and carotenoids in Pigments in vegetables. ed. V. N. Reinhold, pp 75-278, Springer US.
- Harborne, J.B., Williams, C.A. 1995. Anthocyanins and other flavonoids. *Natural Product Reports*, 12: 639-657.
- Hayat, K.; Hussain, S.; Abbas, S.; Farooq, U.; Ding, B.; Xia, S.; Jia, C.; Zhang, X.; Xia, W. 2009. Optimized microwave-assisted extraction of phenolic acids from citrus mandarin peels and evaluation of antioxidant activity in vitro, *Separation and Purification Technology*, 70: 63-70.
- Huang, J.; Zhang, Z. 2004. Microwave-assisted extraction of quercetin and acid degradation of its glycosides in Psidium guajava leaves. *Analytical Sciences*, 20: 395-397.
- Kammerer, D.R.; Kramer, M.; Carle, R. 2012 Phenolic compounds, in Food analysis by HPLC, ed. L.M.L. Nollet, F. Toldra. pp. 717–756. CRC Press.
- Kaufmann, B.; Christen, P. 2002. Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochemical Analysis*, 13: 105-113.

Kaufmann, B.; Christen, P.; Veuthey, J.L. 2001. Parameters Affecting Microwave-assisted Extraction of Withanolides. *Phytochemical. Analysis*, 12: 327-331.

Kjeldahl, J. 1883 Neue Methods zur Bestimmung des Stickstoffs in Organischen Korpern, *Zeitschrift für analytische Chemie*. 22:366–382.

Kris-Etherton, P. M., Hecker, K.D., Bonanome, A., Coval, S.M., Binkoski, A.E., Hilpert, K.F., Griel, A.E., Etherton, T.D. 2002. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American Journal of Medicine*, Volume 113: 71-88.

Lee, J. H.; Kang, N. S.; Shin, S. O.; Shin, S. H.; Lim, S. G.; Suh, D. Y.; Baek, I. Y.; Park, K. Y.; Ha, T. J. 2009. Characterisation of anthocyanins in the black soybean (*Glycine max* L.) by HPLC-DAD-ESI/MS analysis. *Food Chemistry*, 112: 226-231.

Lee, J., Durst, R. W., Wrolstad, R. E. 2005. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative Study. *Journal of AOAC International*, 88: 1269–1278.

Leite-Legatti, A. V.; Batista, A. G.; Dragano, N. R. V.; Marques, A. C.; Malta, L. G.; Riccio, M. F.; Eberlin, M. N.; Machado, A. R. T.; Carvalho-Silva, L. B.; Ruiz, A. L. T. G.; Carvalho, J. E.; Pastore, G. M.; Maróstica, M. R. 2012. Jaboticaba peel: Antioxidant compounds, antiproliferative and antimutagenic activities, *Food Research International*, 49: 596-603.

Liaqid, A.; Guerrero, R.F.; Cantos, E.; Palma, M.; Barroso, C.G. 2011. Microwave assisted extraction of anthocyanins from grape skins. *Food Chemistry*, 124: 1238-1243.

Lidström, P.; Tierney, J.; Wathey, B.; Westman, J. 2001. Microwave assisted organic synthesis – a review. *Tetrahedron*, 57: 9225-9283.

Mavandadi, F. 2007. Microwave Technology in Process Optimization. In: *Process Chemistry in the Pharmaceutical Industry, Volume 2 Challenges in an Ever Changing Climate*, ed. K. Gadamasetti; T. Braish. pp. 403-426, CRC Press, Boca Raton.

Mercadante A. Z.; Rodriguez-Amaya D.B.; Britton G. 1997. HPLC and mass spectrometric analysis of carotenoids from mango. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 120-123.

Mercadante, A.Z; Bobbio, F.O. 2008. Anthocyanins in foods: Occurrence and physicochemical properties. In: *Food colorants: Chemical and functional properties*, ed. C. Socaciu. pp.195-299. CRC Press.

Mota, W.F.; Salomao, L.C.C.; Pereira, M.C.T.; Cecon, P.R. 2002. Influência do tratamento pós-colheita com cálcio na conservação de jabuticabas. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 24: 49-52.

Murador, D.C.; Mercadante, A.Z.; de Rosso, V.V. 2016. Cooking techniques improve the levels of bioactive compounds and antioxidant activity in kale and red cabbage, *Food Chemistry*, 196: 1101–1107.

Ng, A.; Parker, M.L.; Parr, A.J.; Saunders, P.K.; Smith, A.C.; Waldron, K.W. 2000. Physicochemical Characteristics of Onion (*Allium cepa* L.) Tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 5612-5617.

Olsson, M.E.; Gustavsson, K.E.; Vågen, I.M. 2010. Quercetin and Isorhamnetin in Sweet and Red Cultivars of Onion (*Allium cepa* L.) at Harvest, after Field Curing, Heat Treatment, and Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 2323-2330.

Paré J.R.J.; Bélanger, J.M.R.; Stafford, S.S. 1994. Microwave-assisted process (MAP): a new tool for the analytical laboratory. *Trends Analytical Chemistry*, 13: 176-184.

Presta, G.A.; Fonseca, A.S.; Bernardo-Filho, M. A. 2007. Chrysobalanus icaco extract alters the plasmid topology and the effects of stannous chloride on the DNA of plasmids. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 17: 331-335.

Prior, R.; Wu, X. 2005. Schaich, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, 4290– 4302.

Revilla, E.; Ryan, J.M.; Martín-Ortega, G. 1998. Comparison of Several Procedures Used for the Extraction of Anthocyanins from Red Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 4592–4597.

Reynertson, K.A.; Wallace, A.M.; Adachi, S.; Gil, R.R.; Yang, H.; Basile, M.J.; D'Armiento, J.; Weinstein, B.; Kennelly, E.J. 2006. Bioactive Depsides and Anthocyanins from Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*). *Journal of Natural Products*, 69: 1228-1230.

Reynertson, K.A.; Yang, H.; Jiang, B.; Basile, M.J.; Kennelly, E.J. 2008. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. *Food Chemistry*, 109: 883–890.

Rodrigues, E.; Mariutti, L.R.B.; Mercadante, A.Z. 2013. Carotenoids and phenolic compounds from *Solanum sessiliflorum*, an unexploited amazonian fruit, and their scavenging capacities against reactive oxygen and nitrogen species. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 61: 3022–3029.

Routray, W.; Orsat, V. 2012. Microwave-Assisted Extraction of Flavonoids: A Review. *Food and Bioprocess Technology*, 5: 409-424.

Sadilova, E.; Stintzing, F.C.; Carle, R. 2006. Thermal degradation of acylated and nonacylated anthocyanins *Journal of Food Science*, 71: 504-512.

Singleton, V.L., Rossi, J.A.Jr. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic–phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16: 144–158.

Sousa de Brito, E.; Pessanha de Araujo, M.C.; Alves, R.E.; Carkeet, C.; Clevidence, B.A.; Novotny, J.A. 2007. Anthocyanins present in selected tropical fruits: Acerola, jambolão, jussara, and guajiru. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 9389-94.

Souza de Brito, E. S.; de Araújo, M. C. P.; Alves, R. E.; Carkeet, C.; Clevidence, B. A.; Novotny, J. A. 2007. Anthocyanins present in selected tropical fruits: acerola, jambolão, jussara, and guajiru. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55: 9389-9394.

Takeoka, G. Dao, L. 2002. Anthocyanins in Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals, ed. W . Jeffrey Hurst, pp. 247-270. CRC Press.

Teng, H.; Lee, W.Y.; Choi, Y.H. 2013. Optimization of microwave assisted extraction for anthocyanins, polyphenols and antioxidants from raspberry (*Rubus coreanus* Miq.) using response surface methodology. *Journal of Separation Science*, 36: 3107-3114.

Torskangerpoll, K.; Andersen, Ø.M. 2005. Colour stability of anthocyanins in aqueous solutions at various pH values. *Food Chemistry*, 89: 427-40.

Trevisan, L. M.; Bobbio, F. O.; Bobbio, P. A. 1972. Carbohydrates, organic acids, and anthocyanins of *Myrciaria jaboticaba*. *Journal of Food Science*, 37: 818-19.

Veggi, P.C.; Martinez, J.; Meireles, M.A.A. 2012. Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds. In: *Fundamentals of Microwave Extraction. Food Engineering Series*, ed. F. Chemat; G. Cravotto, pp. 15-52.

Weedon, ;B.C.L.; Moss, G.P. 1995. Structure and nomenclature. In: *Carotenoids, Vol 1A: Spectroscopy*, ed. Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. Birkhauser, pp. 13-62.

Wen, Y.; Chen, H.; Zhou, X.; Deng, Q.; Zhao, Y.; Zhao, C.; Gong.; X. 2015. Optimization of the microwave-assisted extraction and antioxidant activities of

anthocyanins from blackberry using a response surface methodology. *RSC Advances*, 5: 19686–19695.

Whitehead, A., Mares, J.A.; Danis, R.P. (2006). Macular Pigment: A Review of Current Knowledge. *Archives of Ophthalmology*; 124:1038-1045.

Wu, S.; Dastmalchi,K.; Long, C.; Kennelly. E.J.. 2012. Metabolite Profiling of Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) and Other Dark-Colored Fruit Juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60: 7513-7525.

Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E., Prior, R.L. 2006. Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 4069-4075.

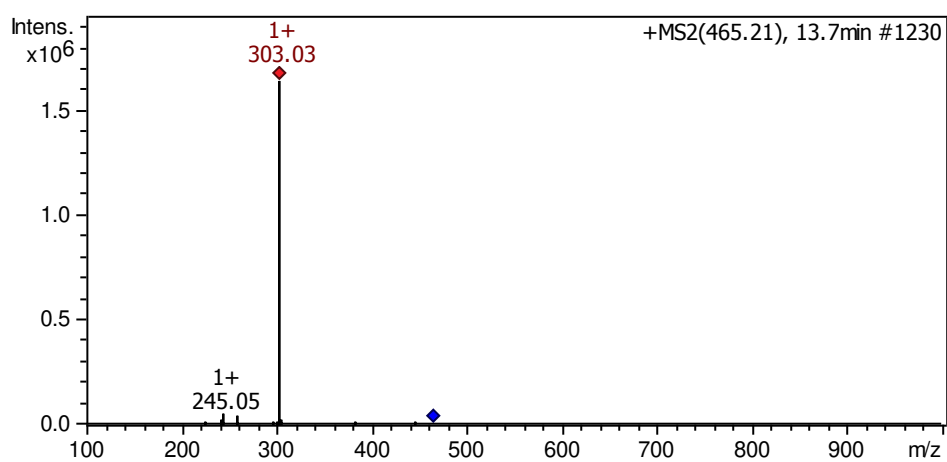
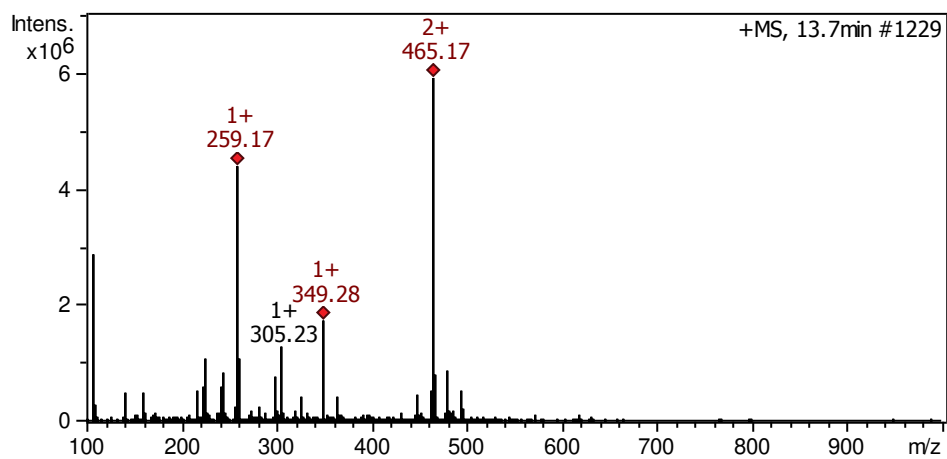
Wu, X., Gu, L., Prior, R.L., McKay, S. 2004. Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of *Ribes*, *Aronia*, and *Sambucus* and their antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 7846–7856.

Wu, X., Prior, R.L. 2005. Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common foods in the United States: Fruits and berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 2589–2599.

Apêndice 1: Espectros de massas das antocianinas de jabuticaba

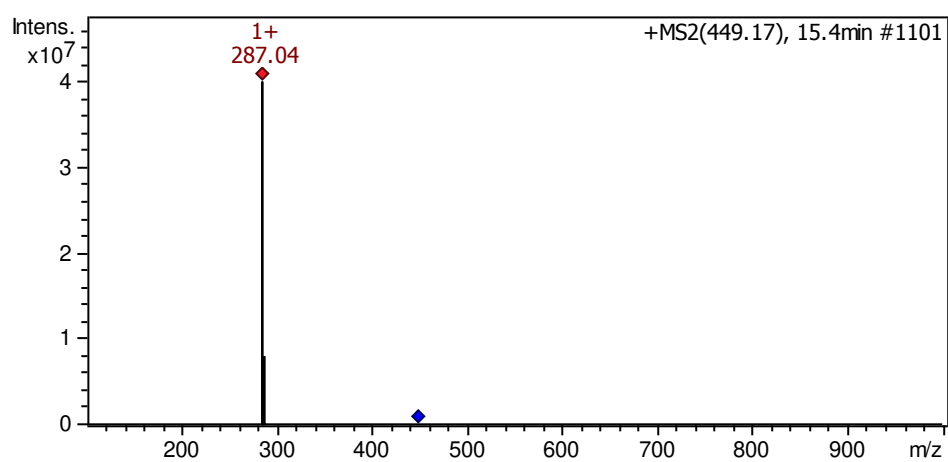
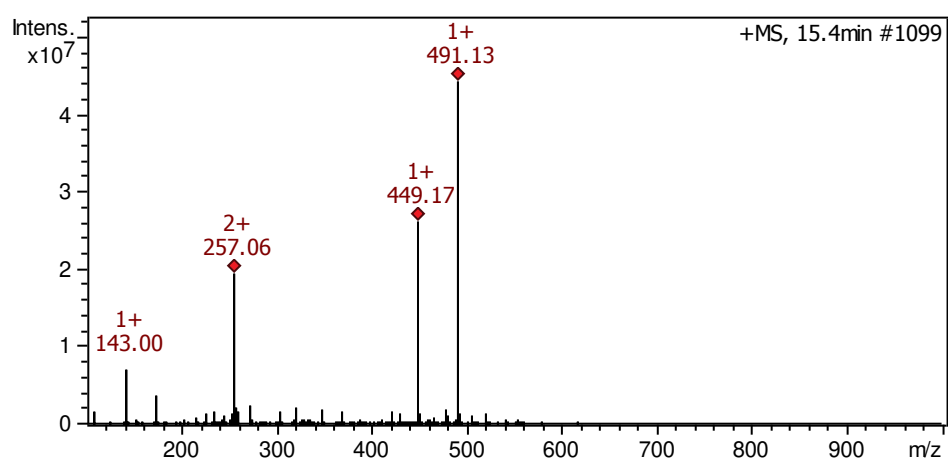
Pico 1

Delfinidina 3-glucosídeo



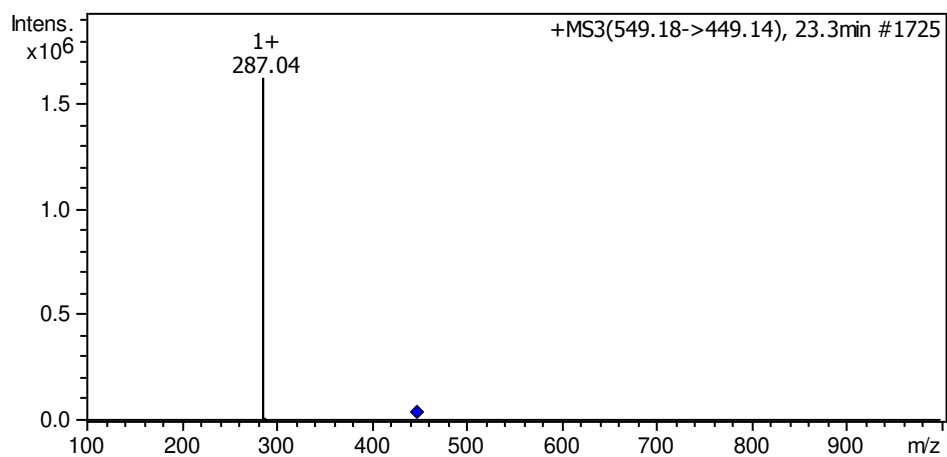
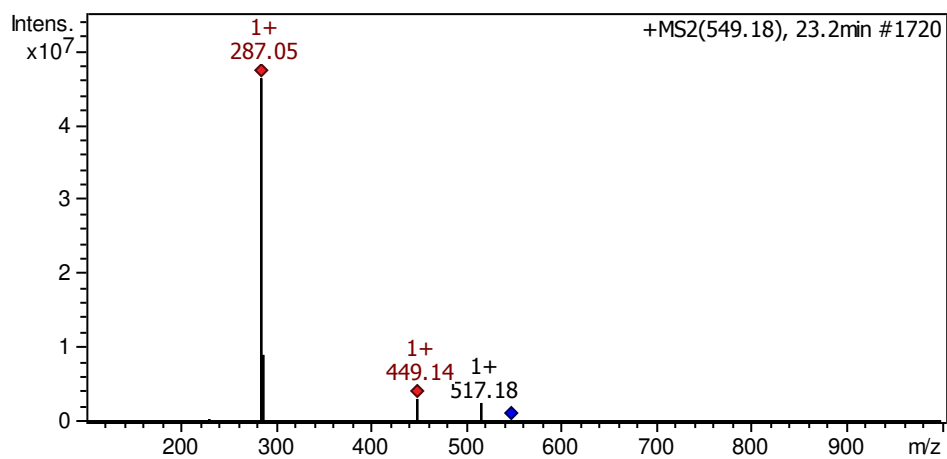
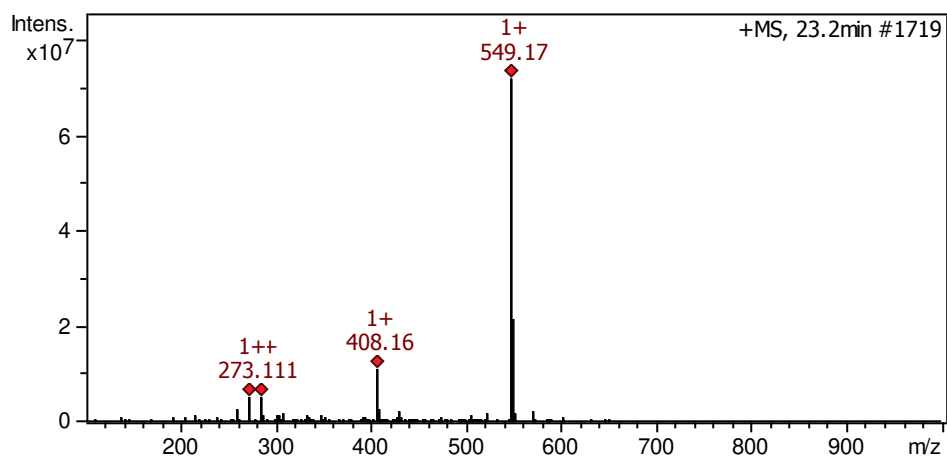
Pico 2

Cianidina 3-glucosídeo



Pico 3

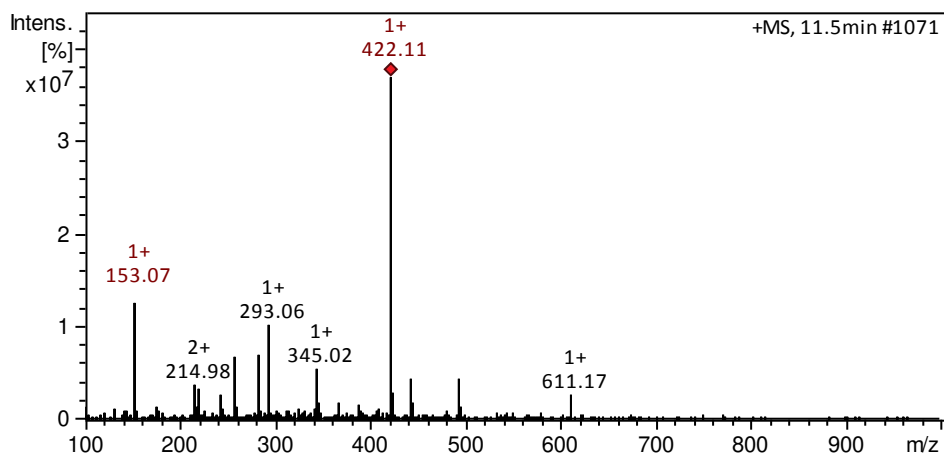
Cianidina 3-(succinil)glucosídeo



Apêndice 2: Espectros de massas das antocianinas de cebola roxa

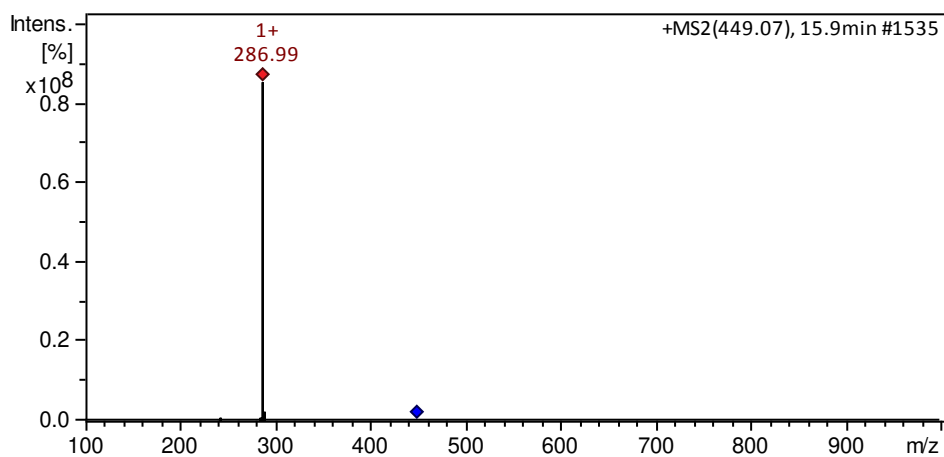
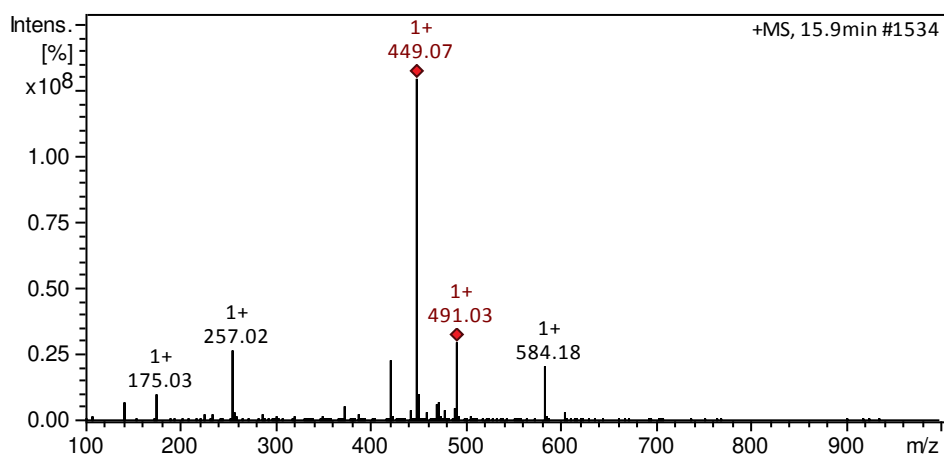
Pico 1

Cianidina 3,5-diglucosídeo



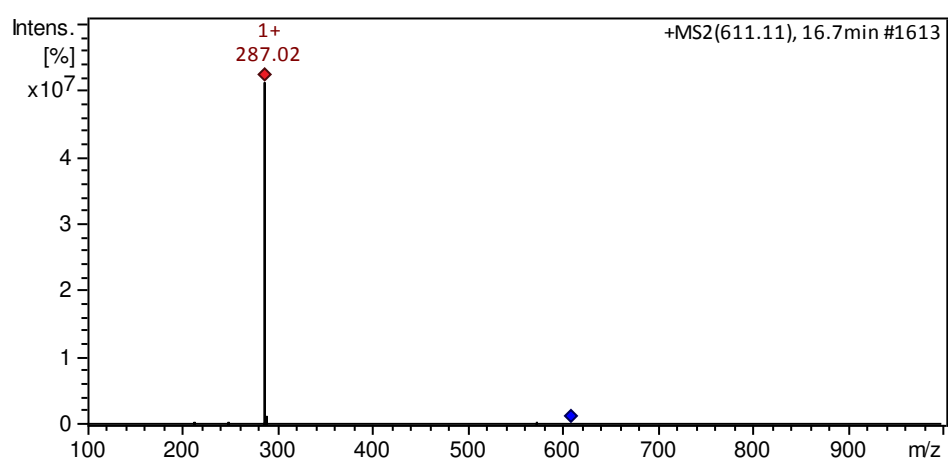
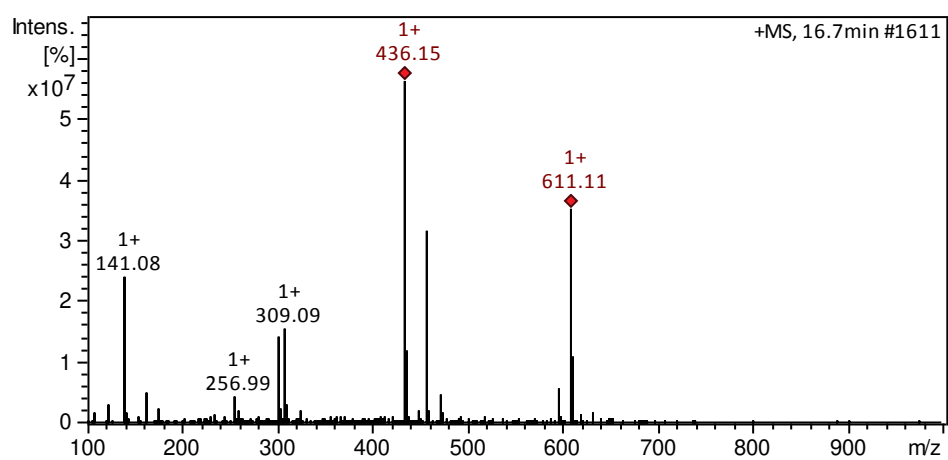
Pico 2

Cianidina 3-glucosídeo



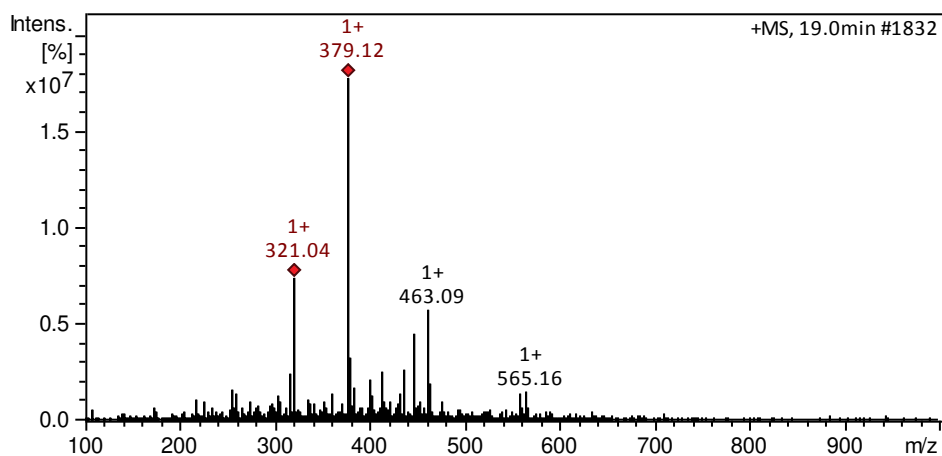
Pico 3

Cianidina 3-diglucosídeo



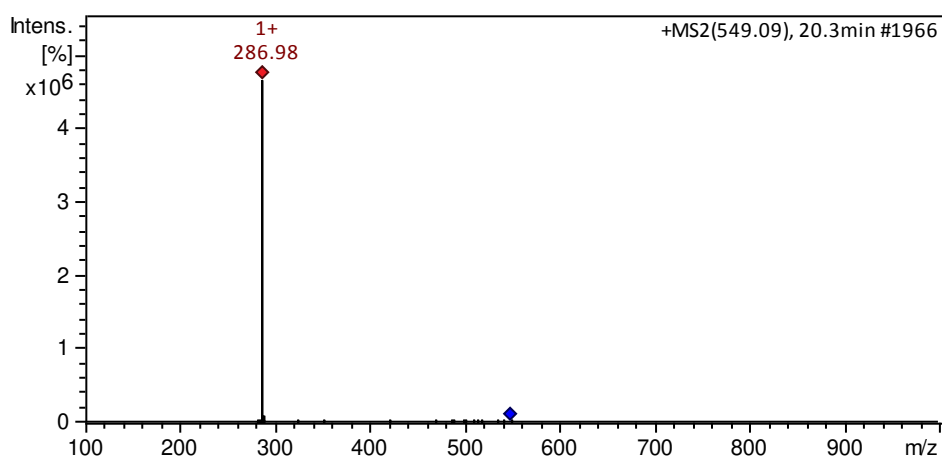
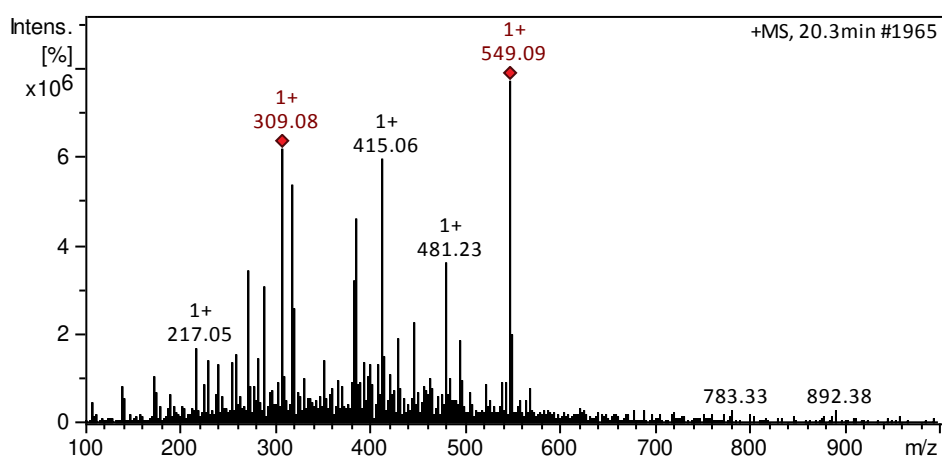
Pico 4

Peonidina 3-glucosídeo



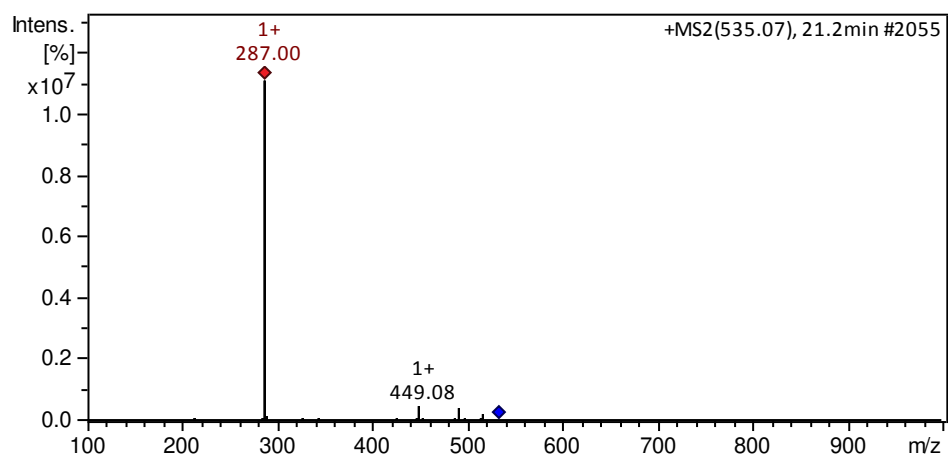
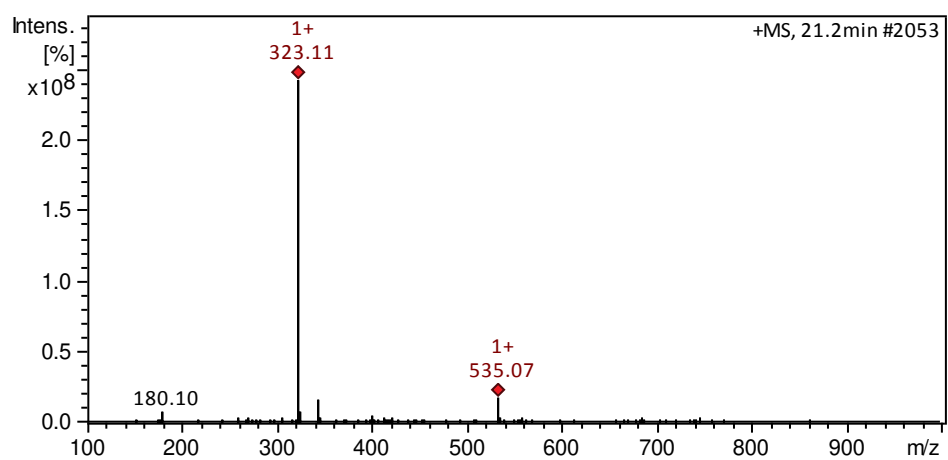
Pico 5

Cianidina 3-(3''succinil)glucosídeo



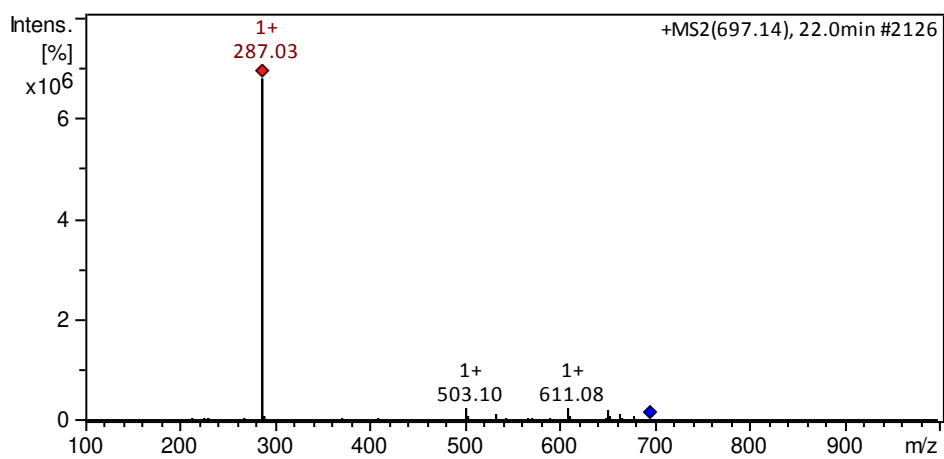
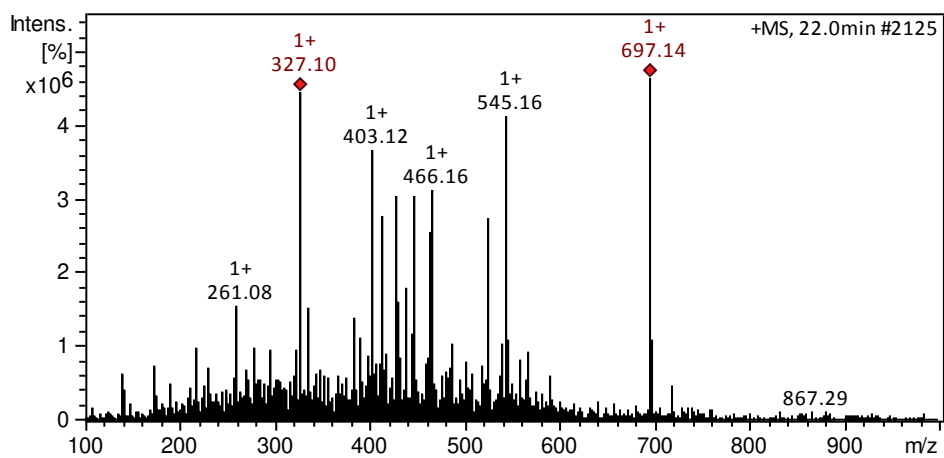
Pico 6

Cianidina 3-(6''malonil)glucosídeo



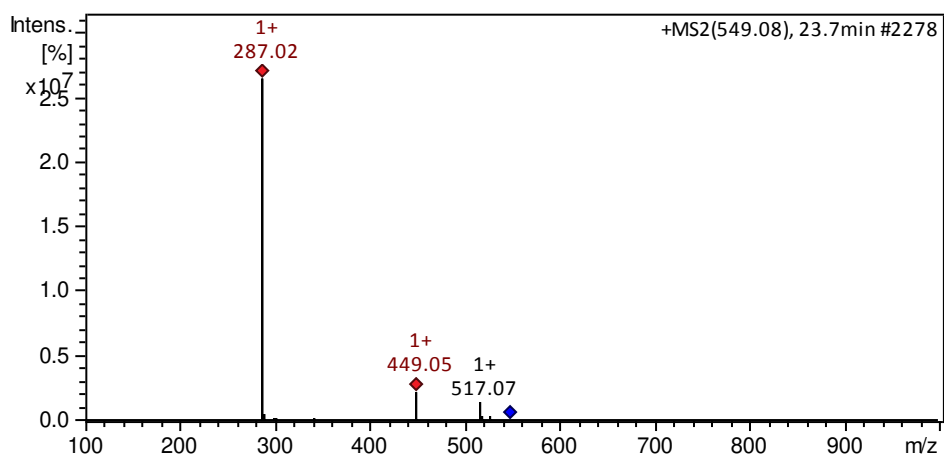
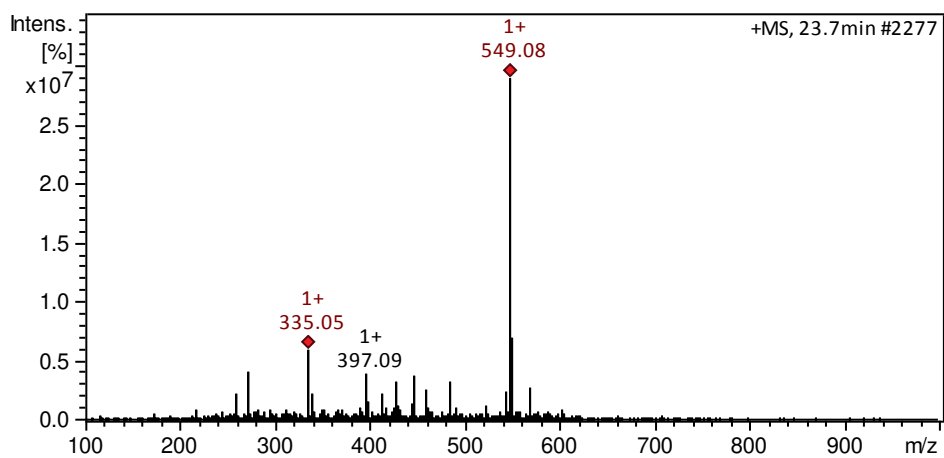
Pico 7

Cianidina 3-(6"malonil)diglucósídeo



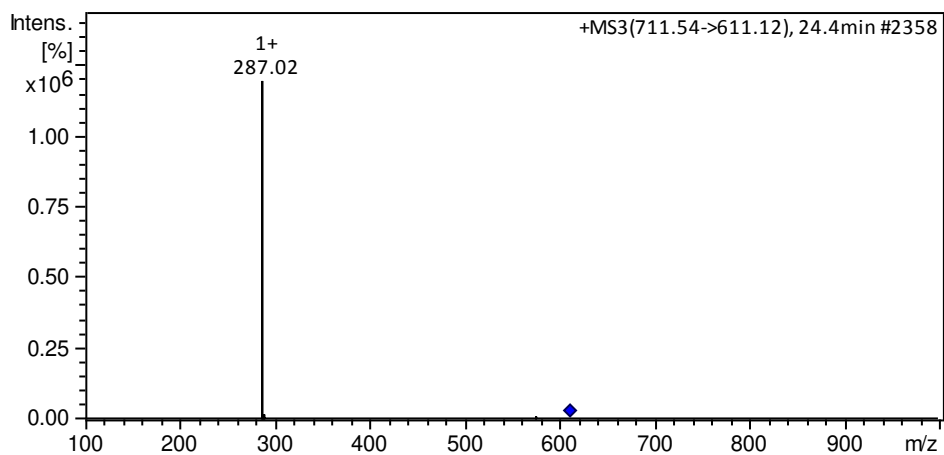
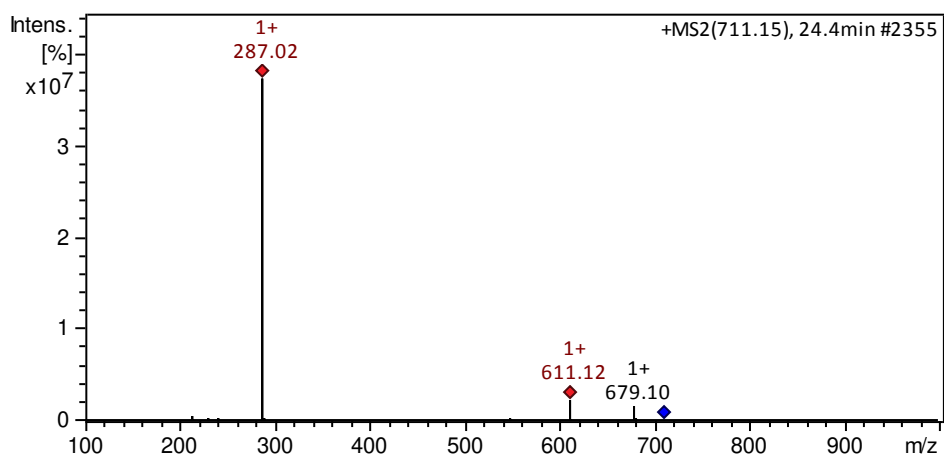
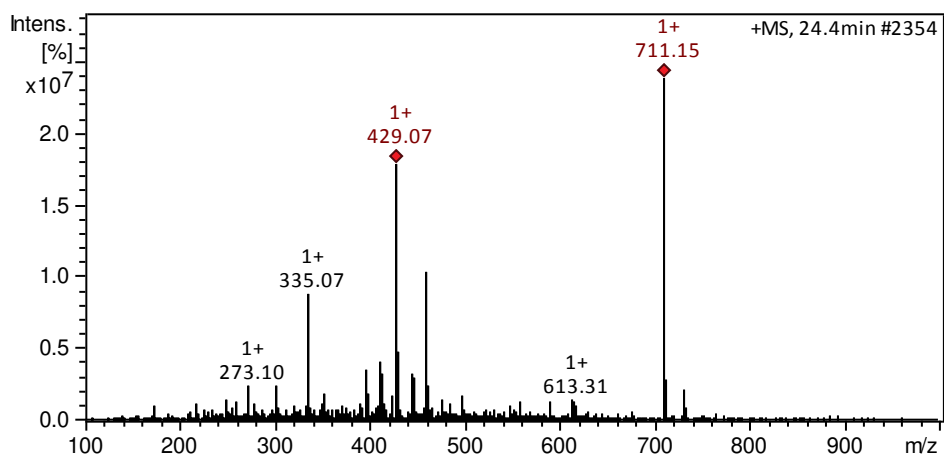
Pico 8

Cianidina 3-(6''succinil)glucosídeo



Pico 9

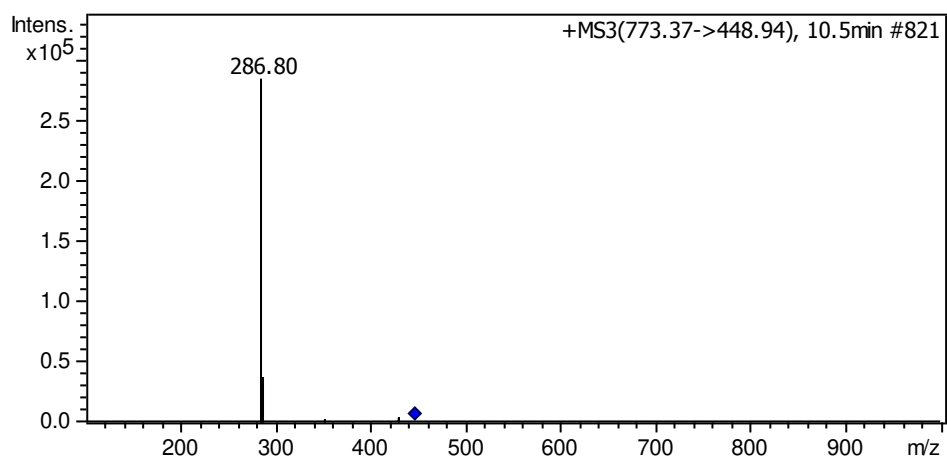
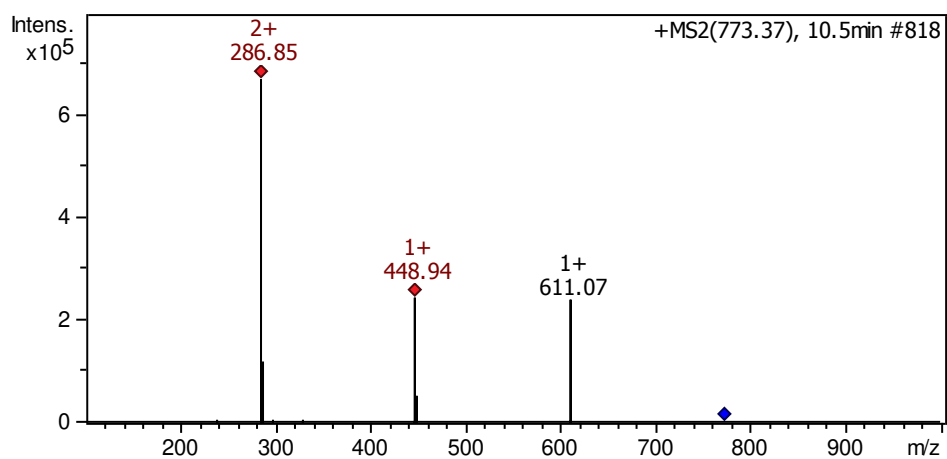
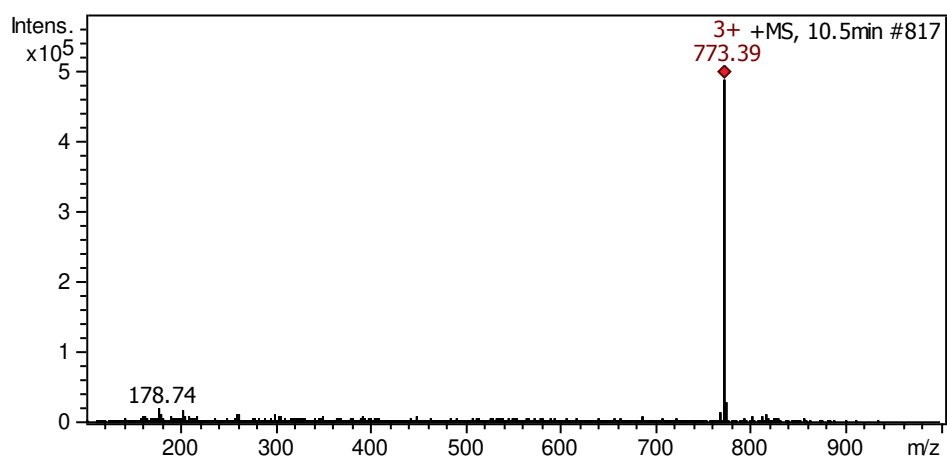
Cianidina 3-(6''succinil)diglucosídeo



Apêndice 3: Espectros de massas das antocianinas de repolho roxo

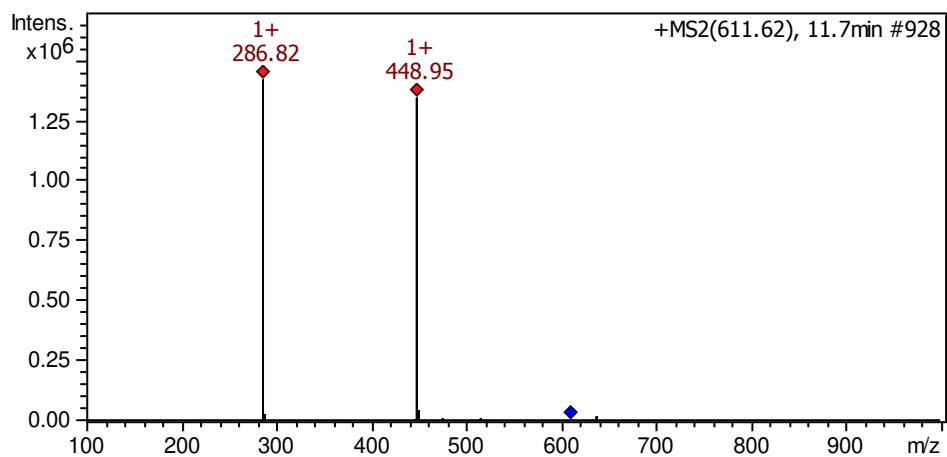
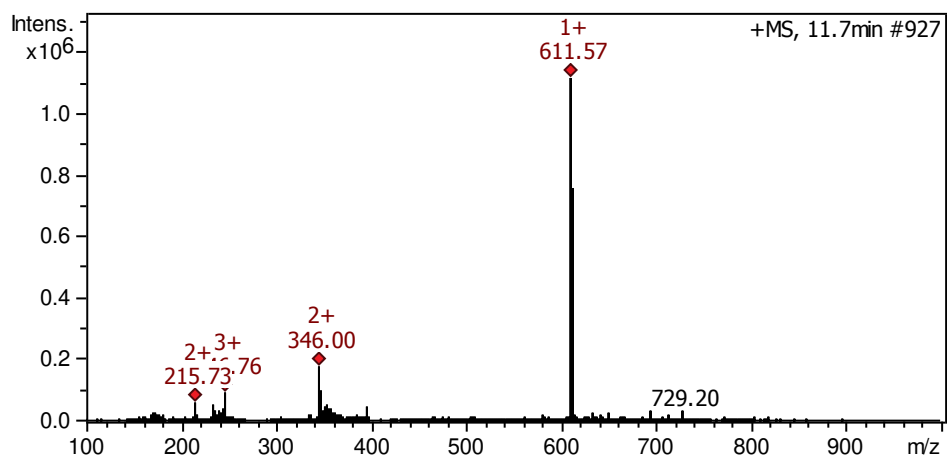
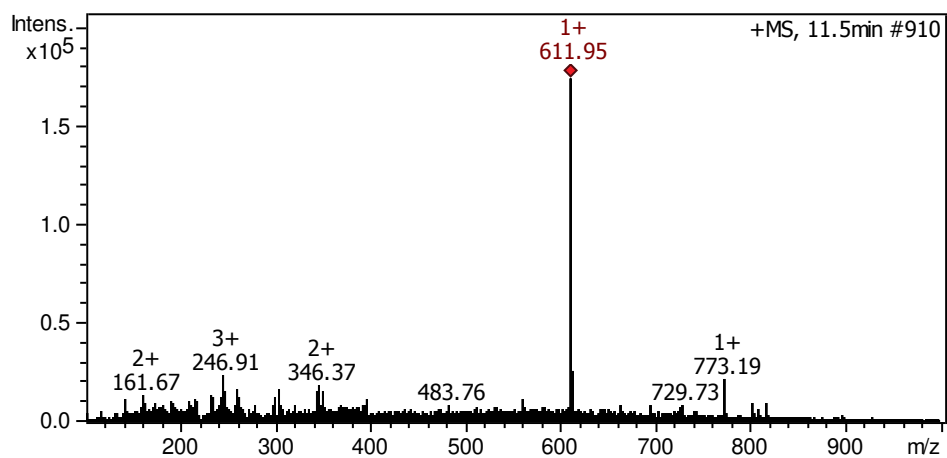
Pico 1

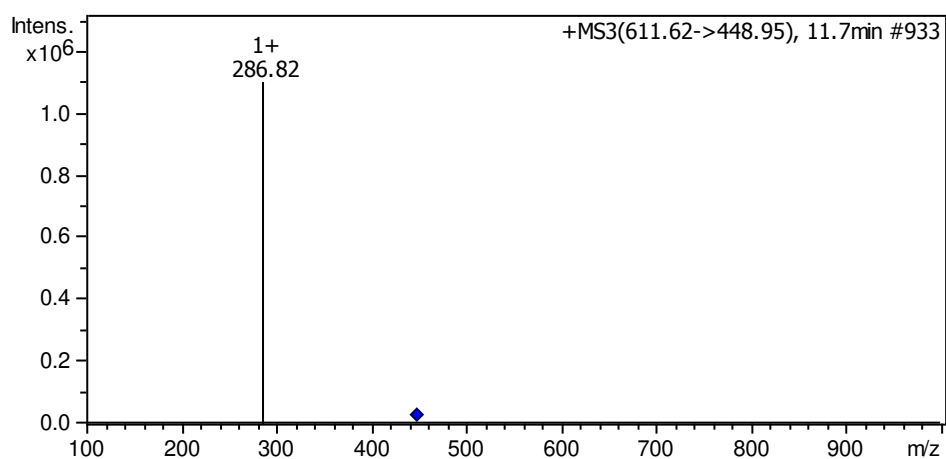
Cianidina 3-diglucosil-5-glucosídeo



Pico 2

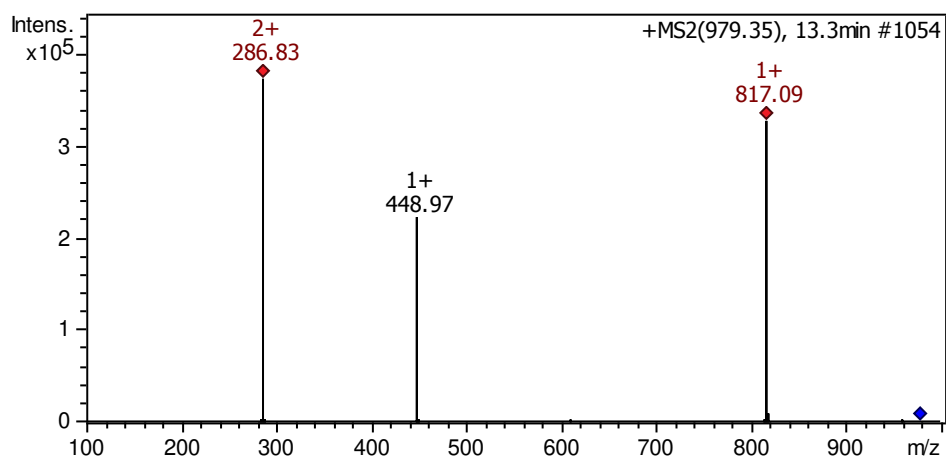
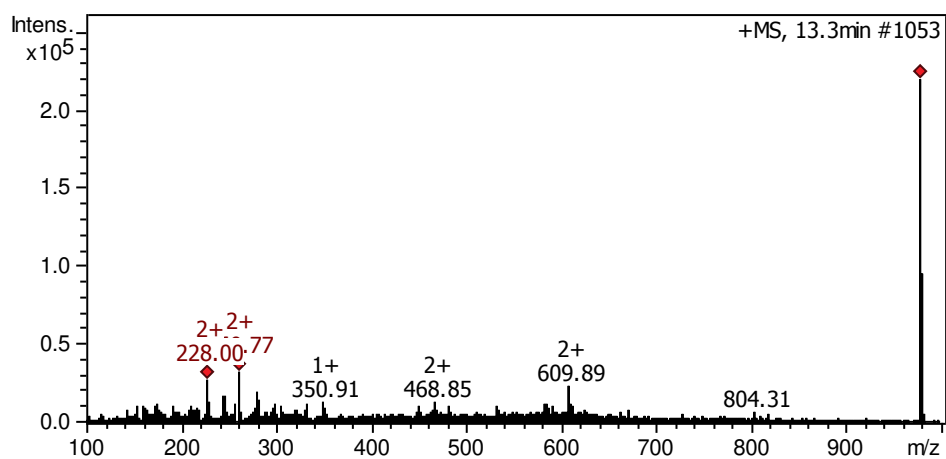
Cianidina 3,5-diglucosídeo

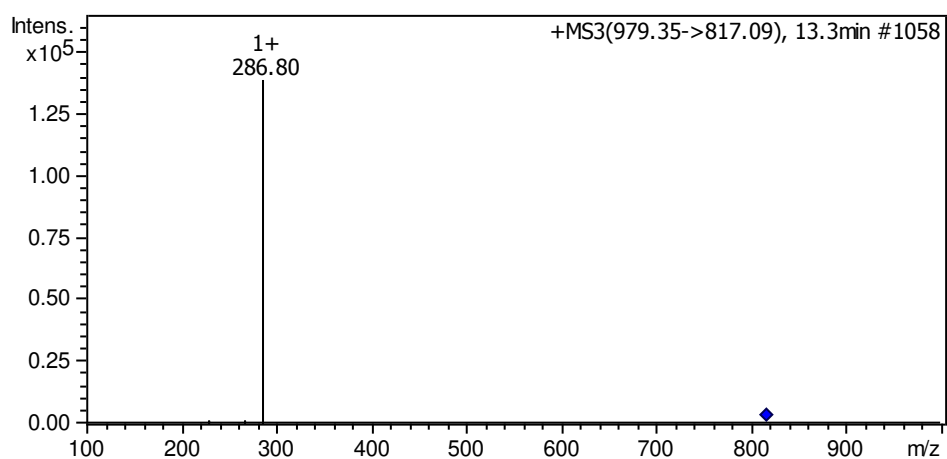




Pico 3

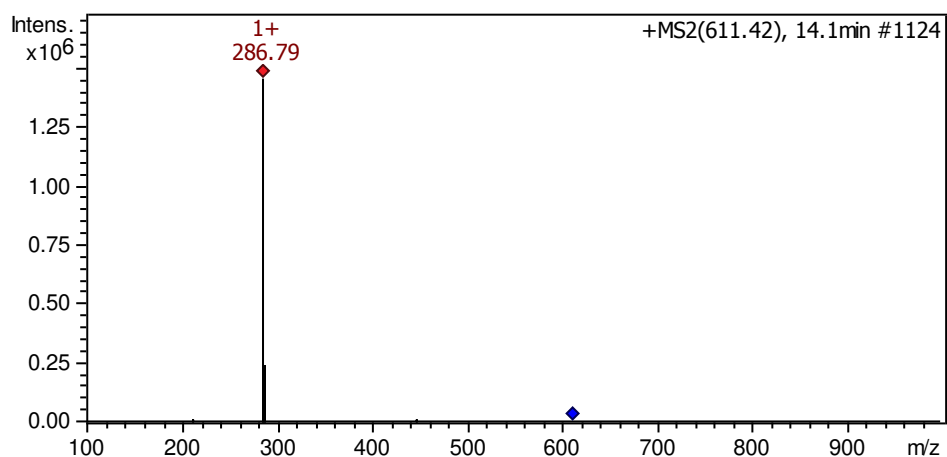
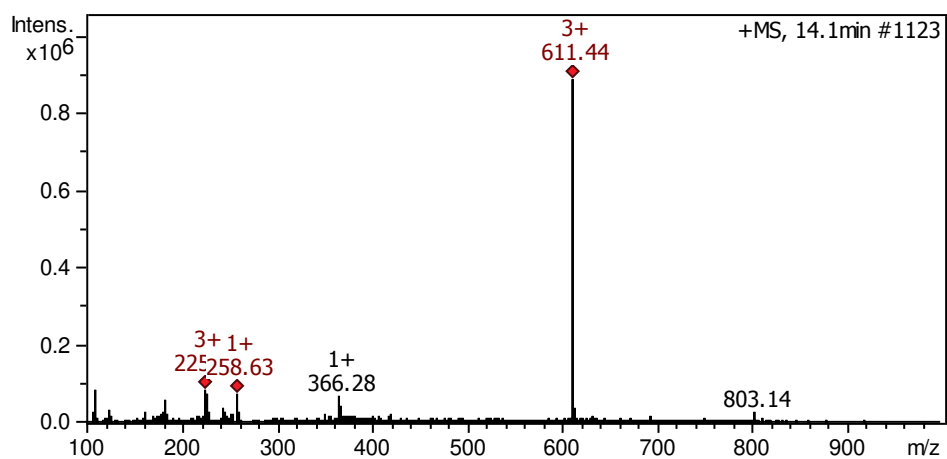
Cianidina 3-(sinapil)diglucosil-5-glucosídeo





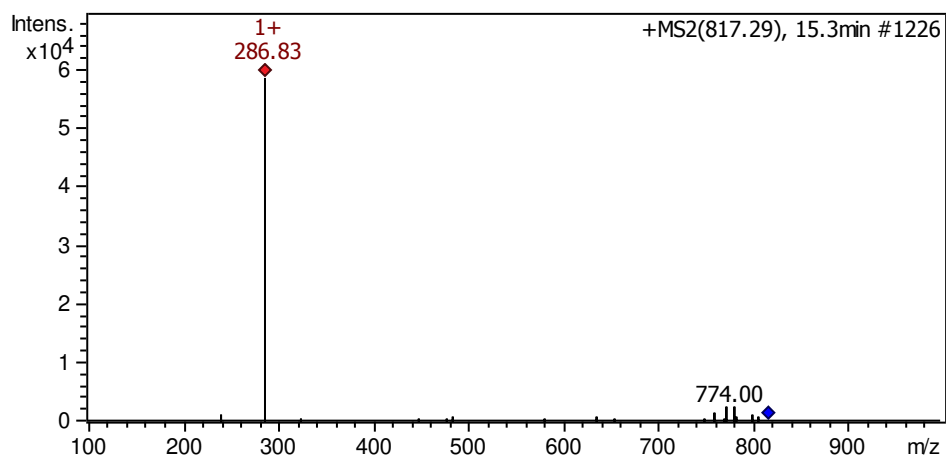
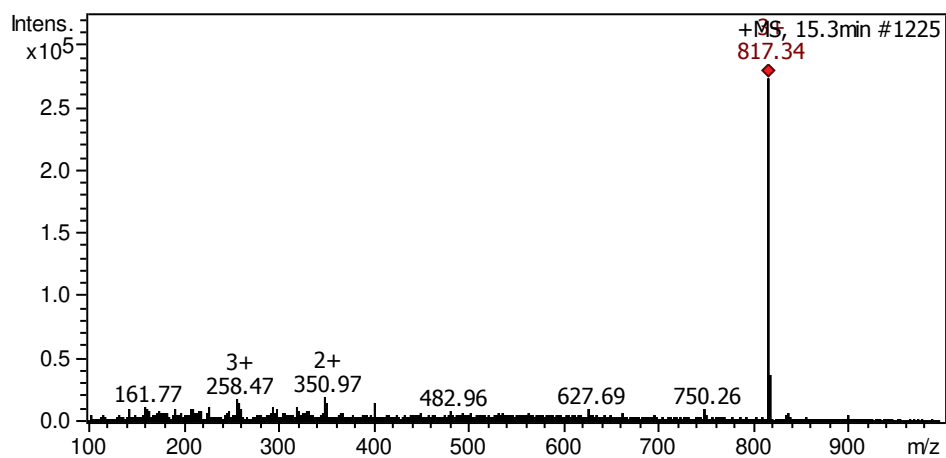
Pico 4

Cianidina 3-diglucosídeo



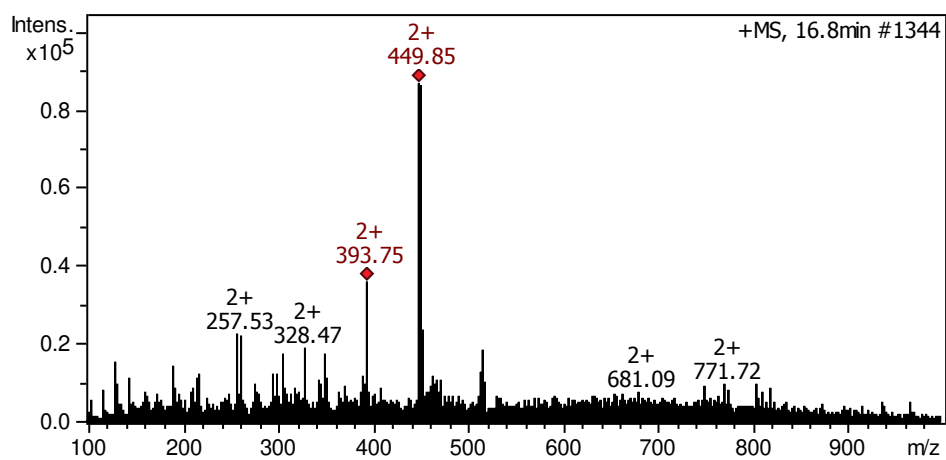
Pico 5

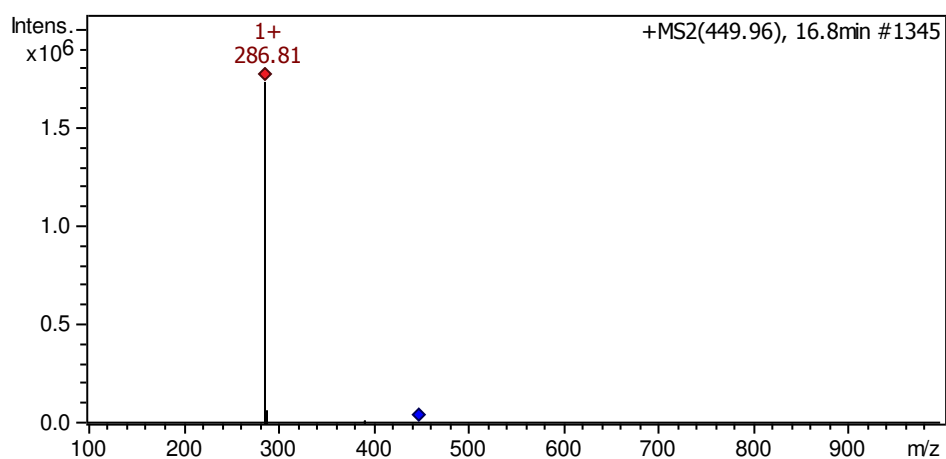
Cianidina 3-(sinapil)diglucosídeo



Pico 6

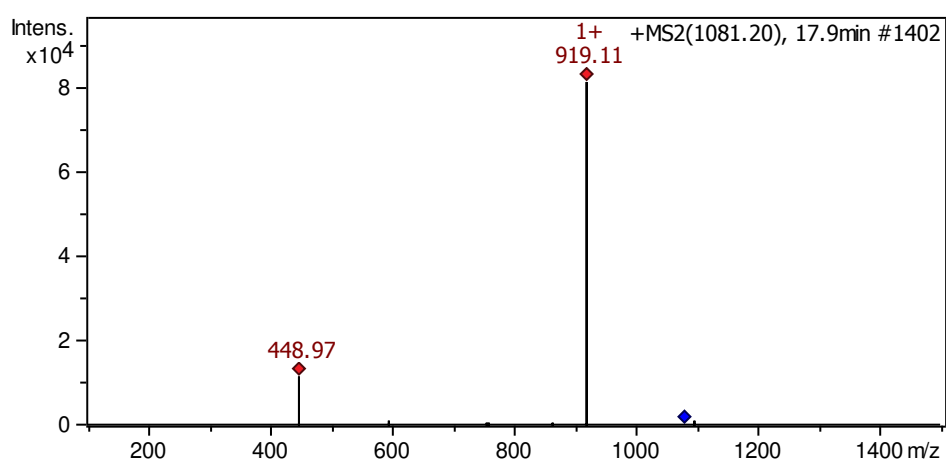
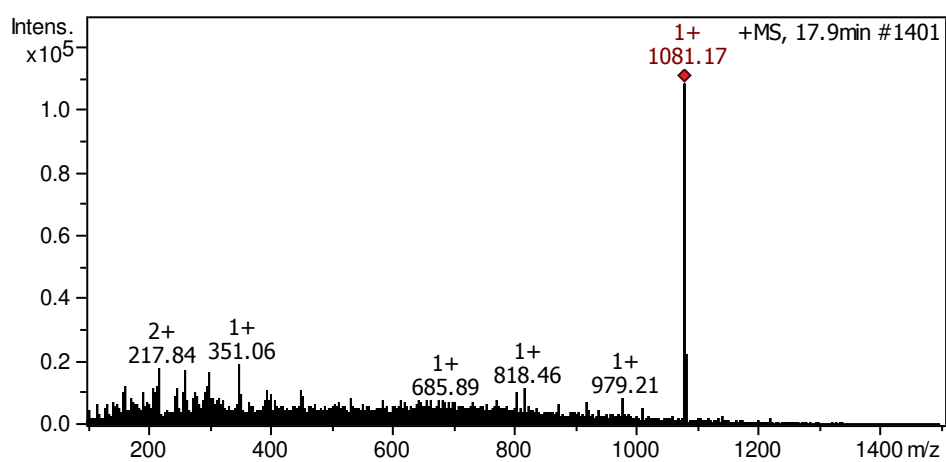
Cianidina 3-glucosídeo

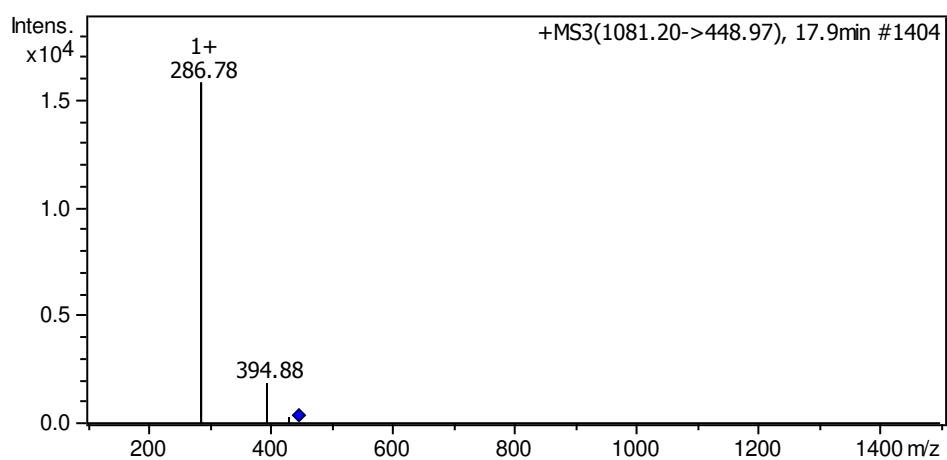
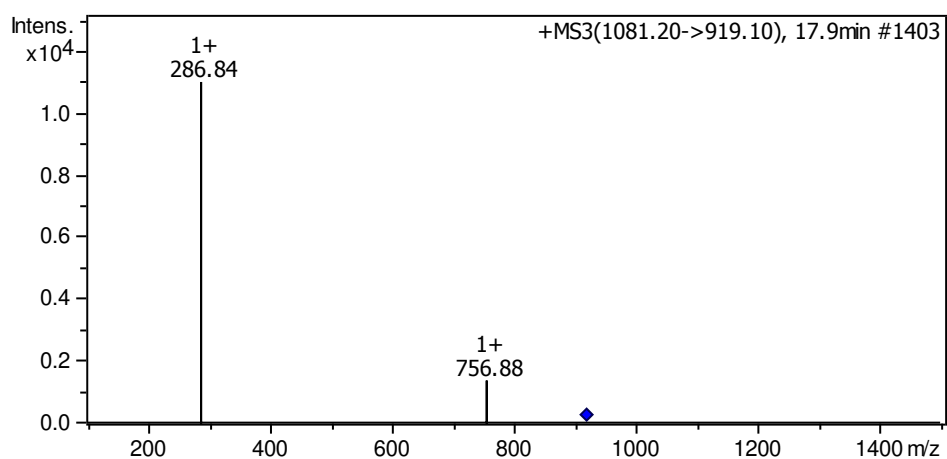




Pico 7

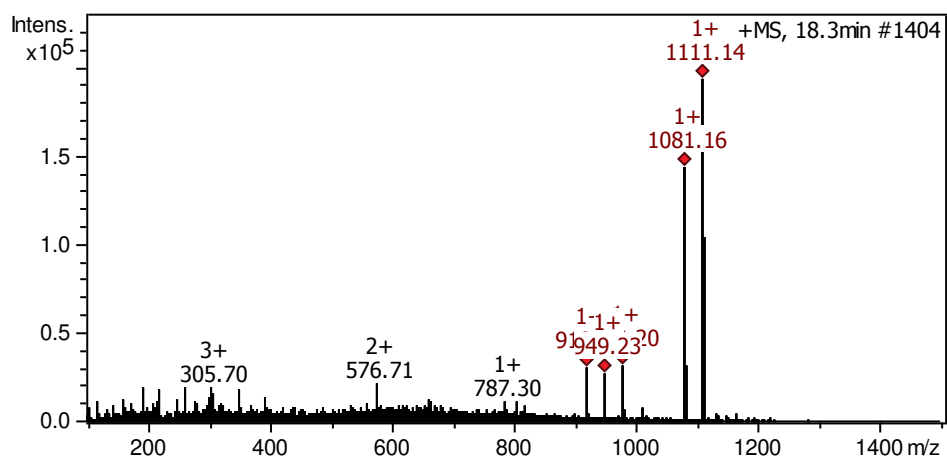
Cianidina 3-(cafeil)(cumaril)diglucosil-5-glucosídeo

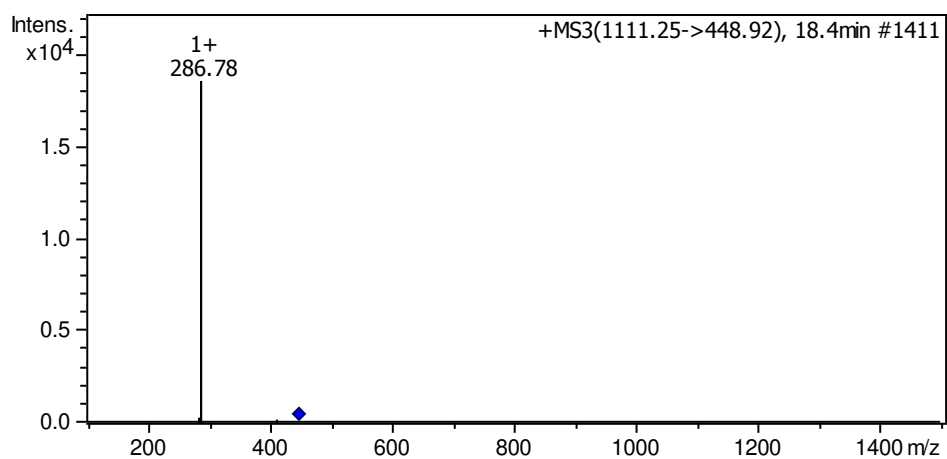
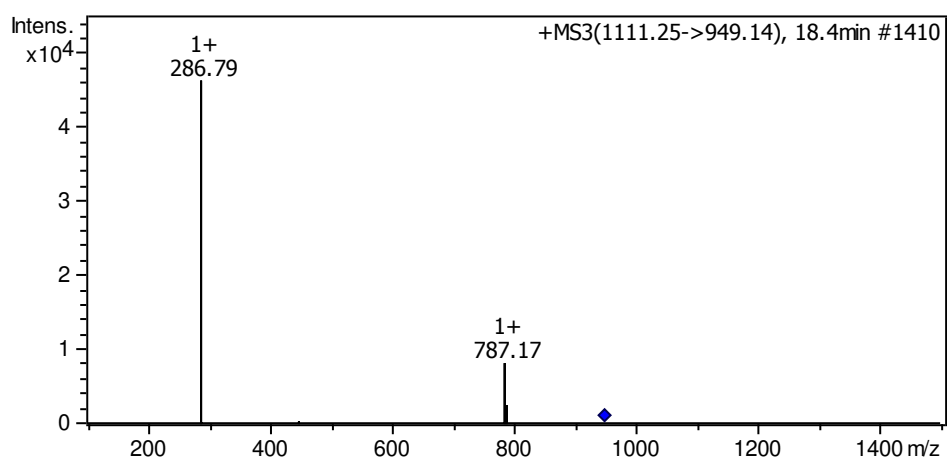
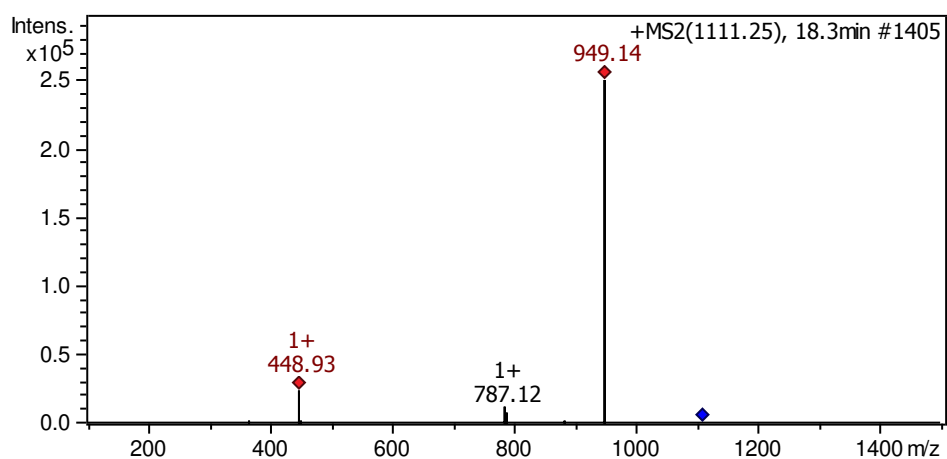




Pico 8

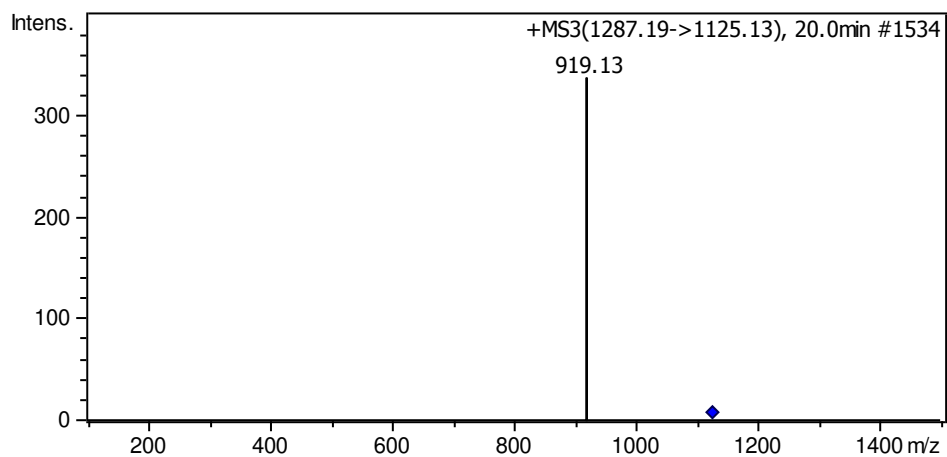
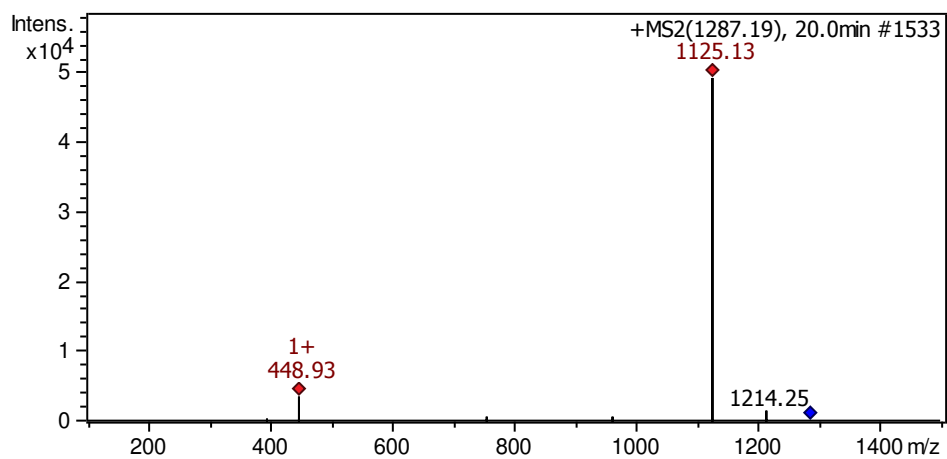
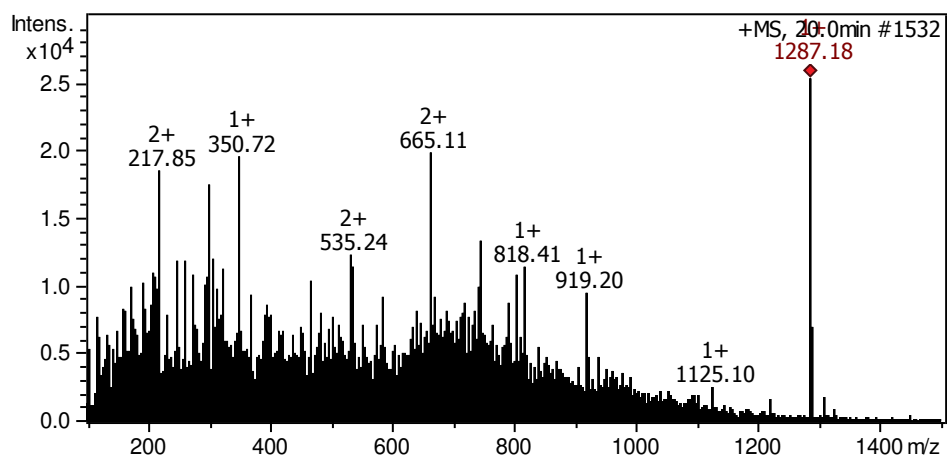
Cianidina 3-(cafeil)(feruil)diglucosil-5-glucosídeo

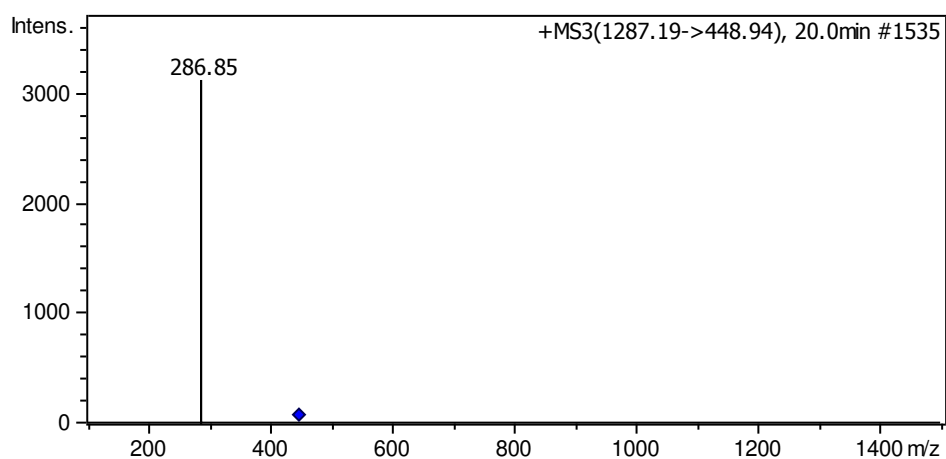




Pico 9

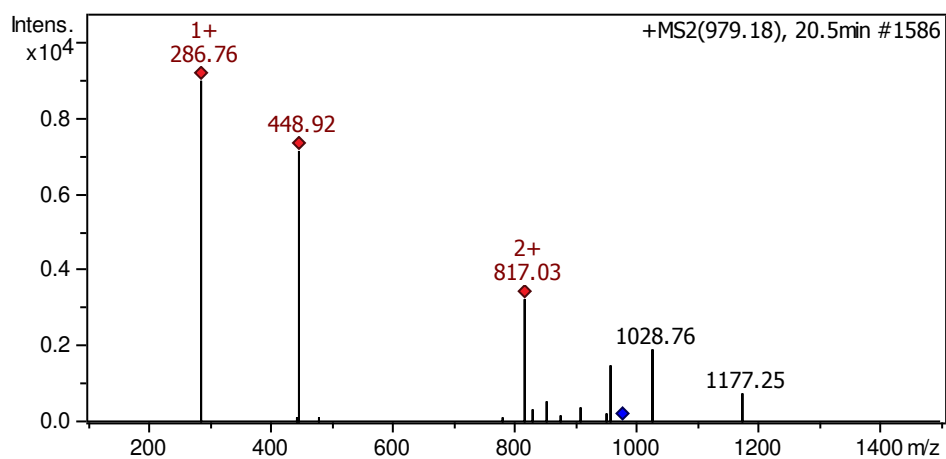
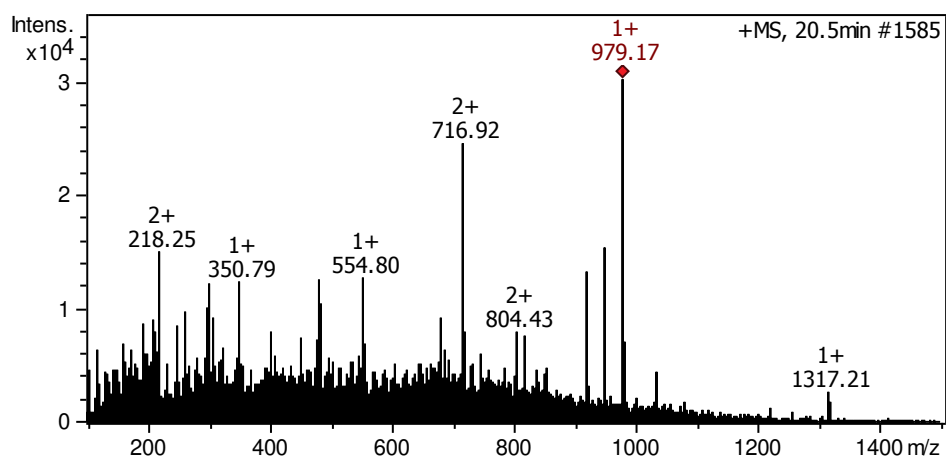
Cianidina 3-(cafeil)(cumaril)(sinapil)diglucosil-5-glucosídeo

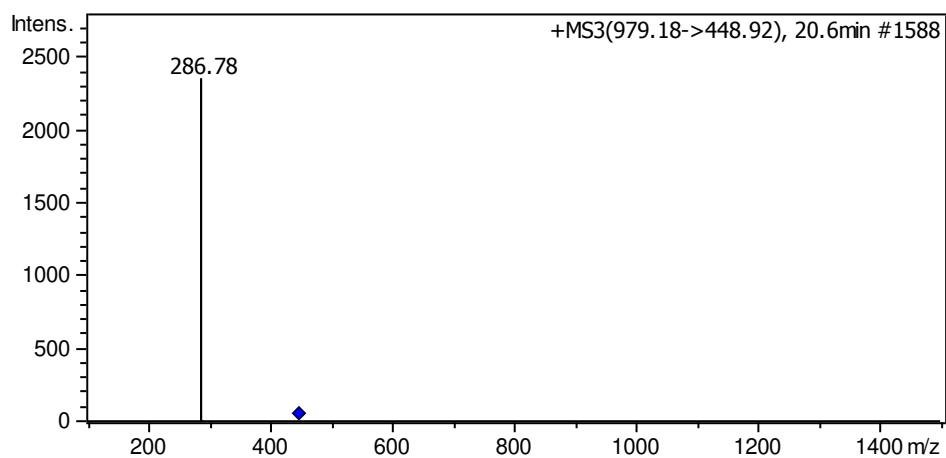
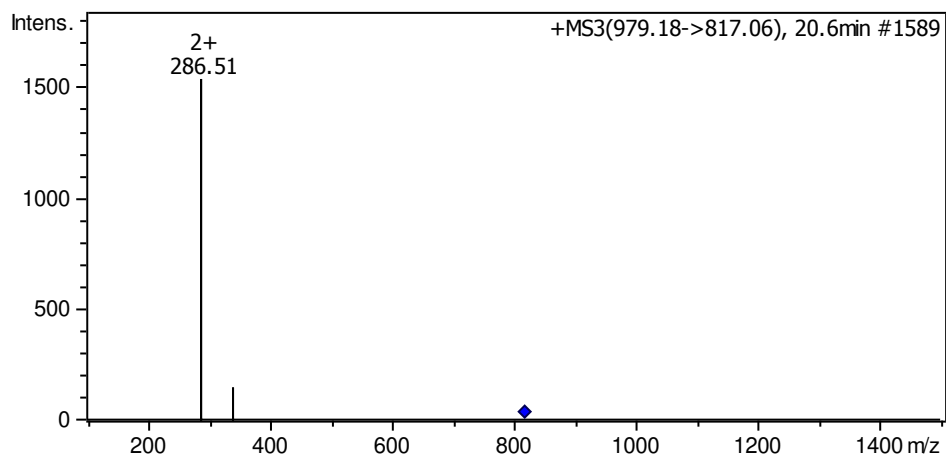




Pico 10

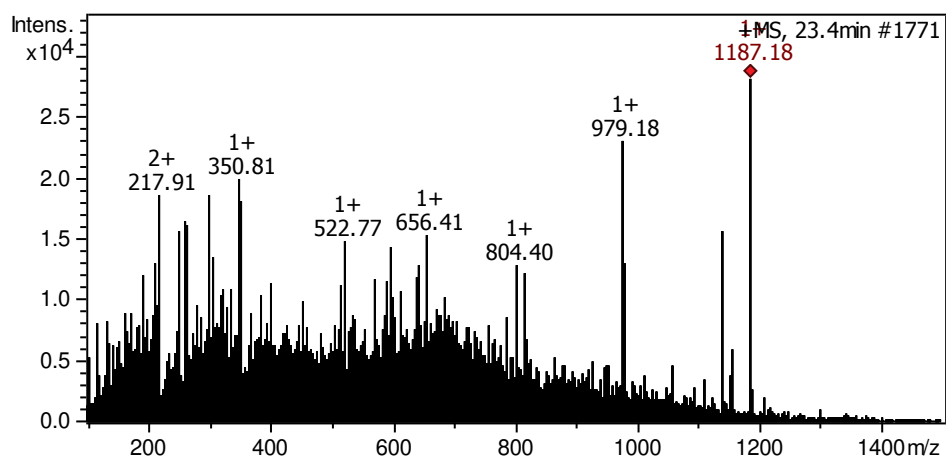
Cianidina 3-(cafeil)(sinapil)glucosil-5-glucosídeo

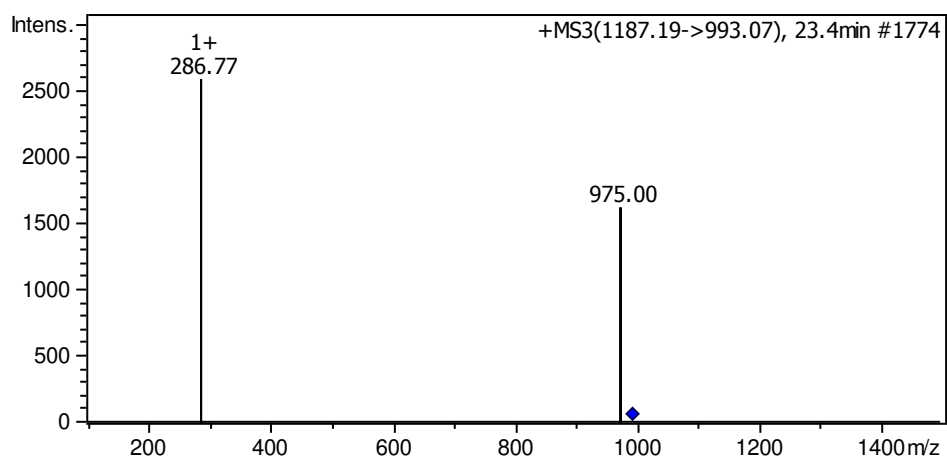
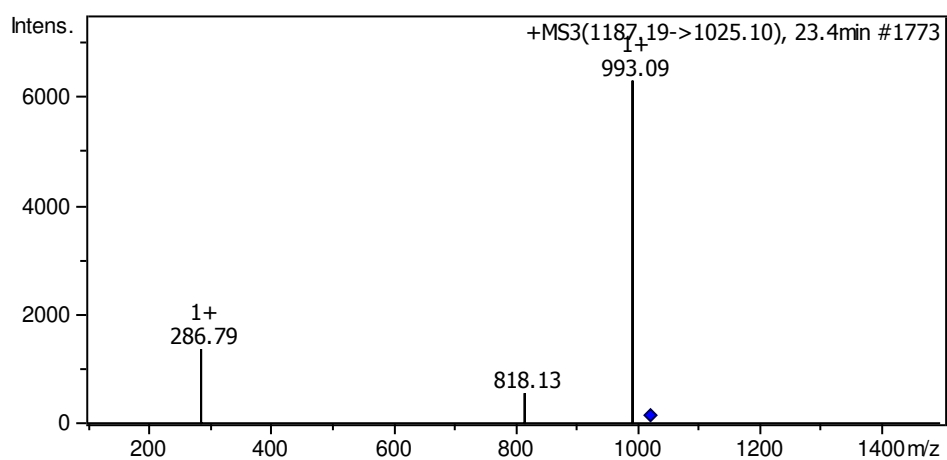
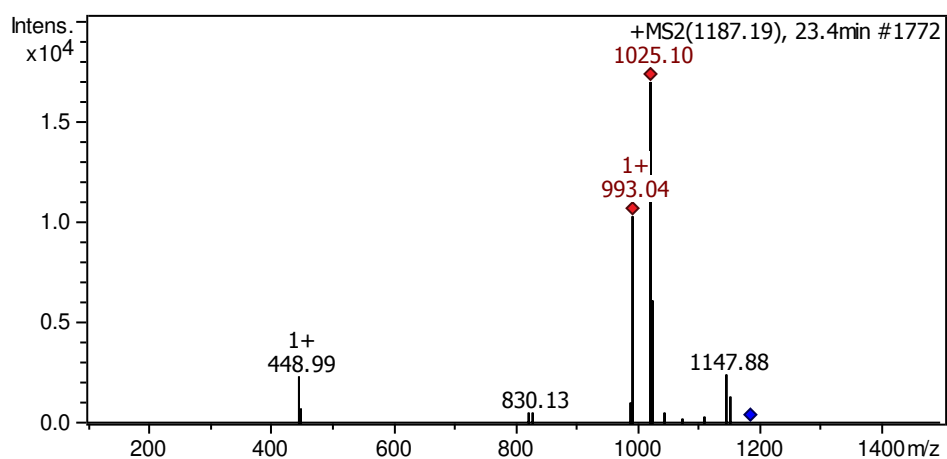




Pico 11

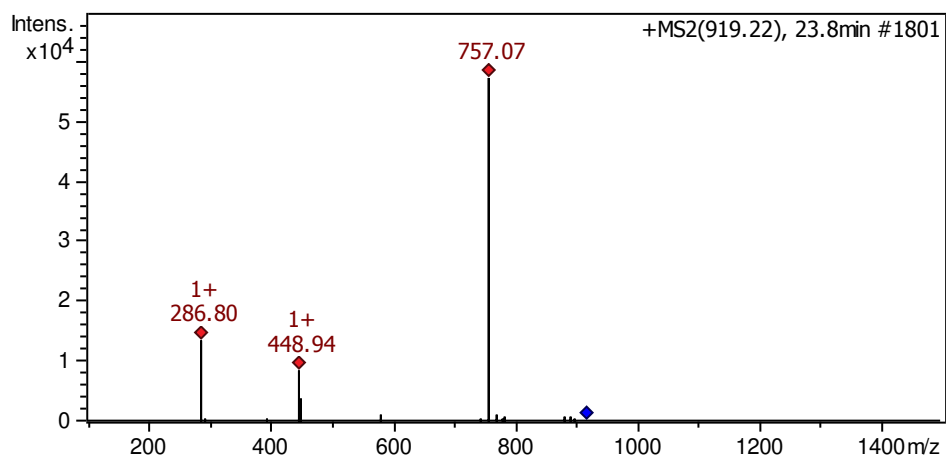
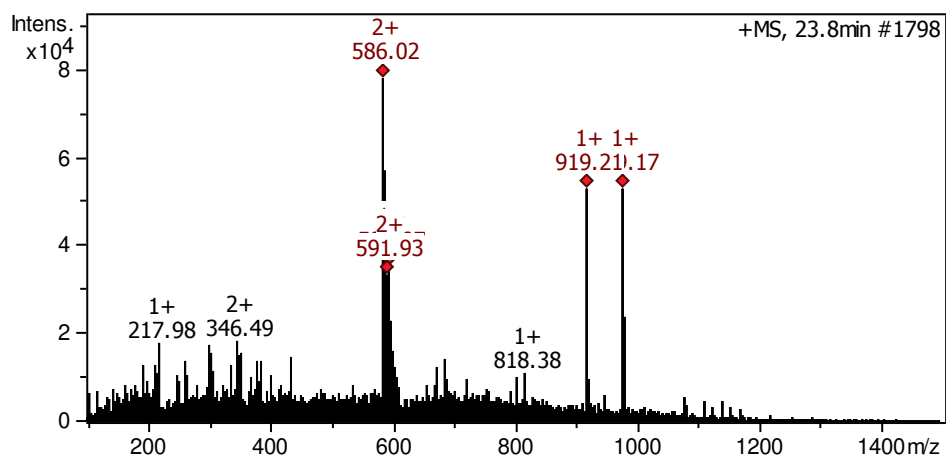
Cianidina 3-(feruil)(feruil)(sinapil)glucosil-5-glucosídeo





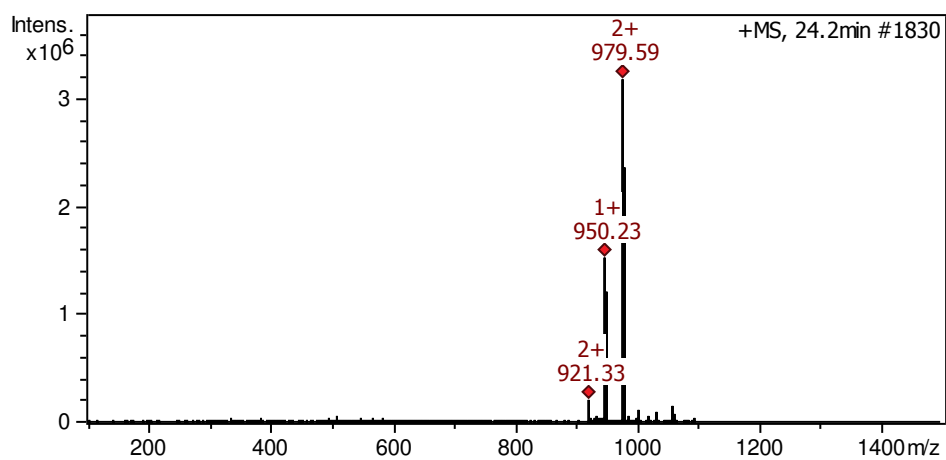
Pico 12

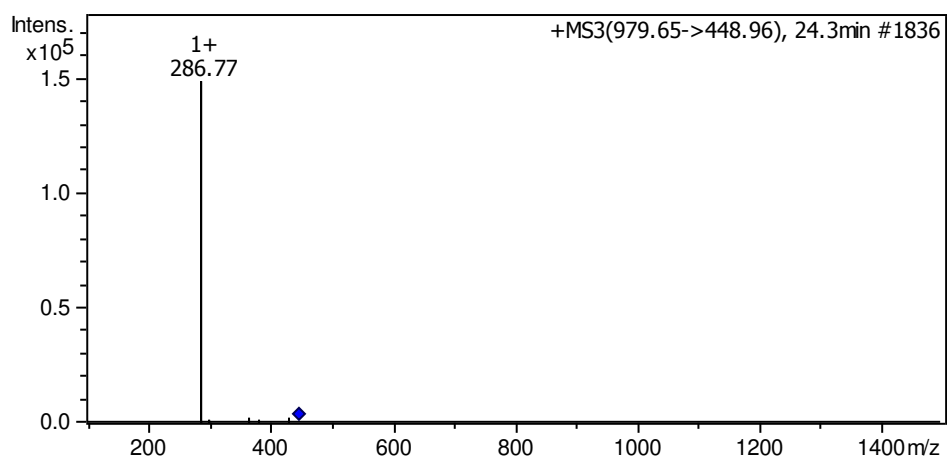
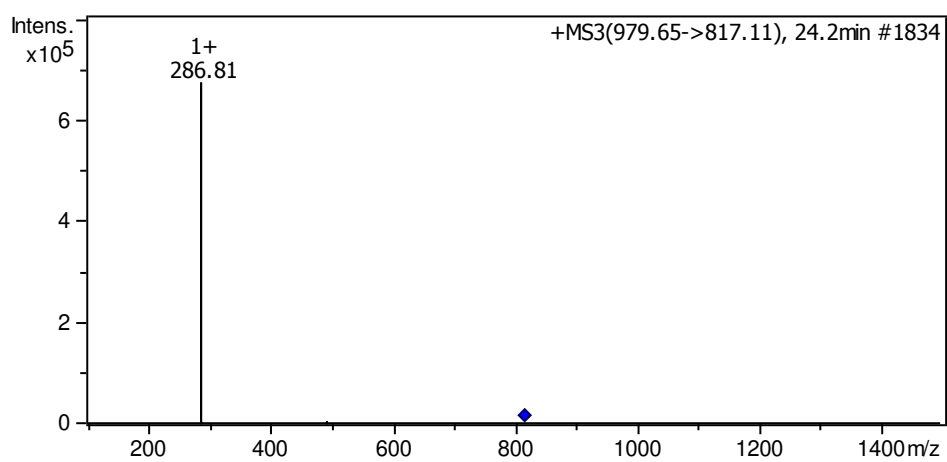
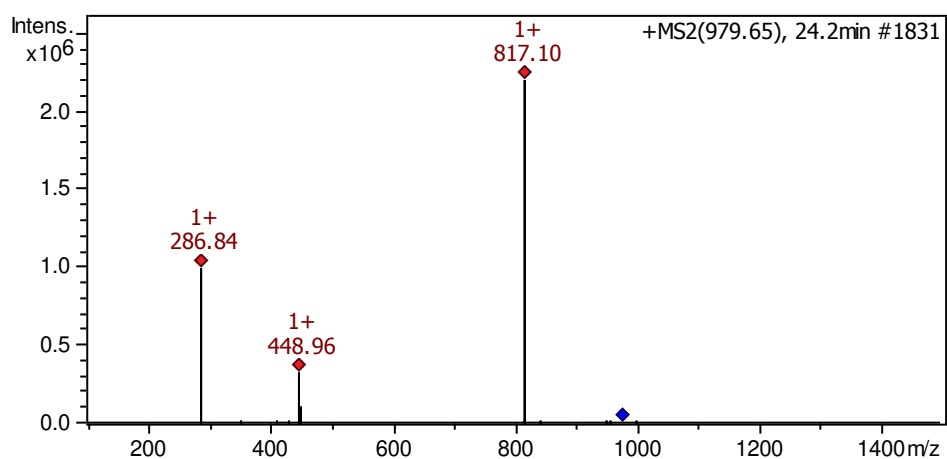
Cianidina 3-(cafeil)(cumaril)glucosil-5-glucosídeo



Pico 13

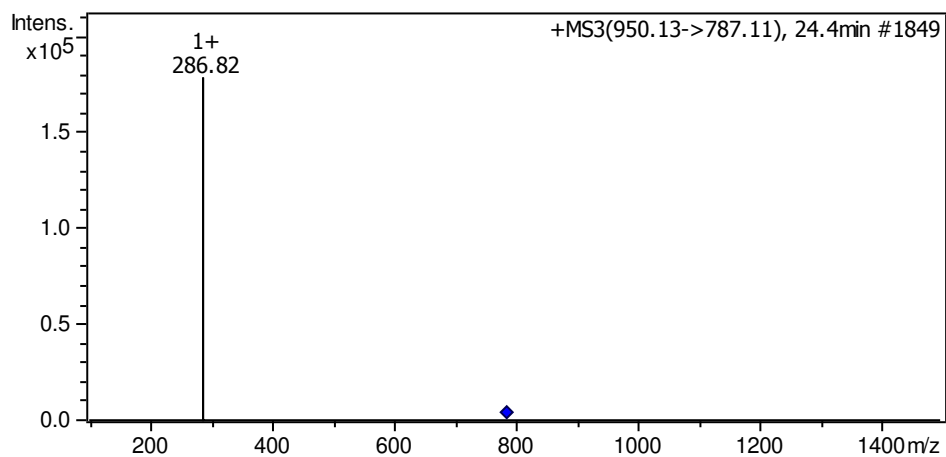
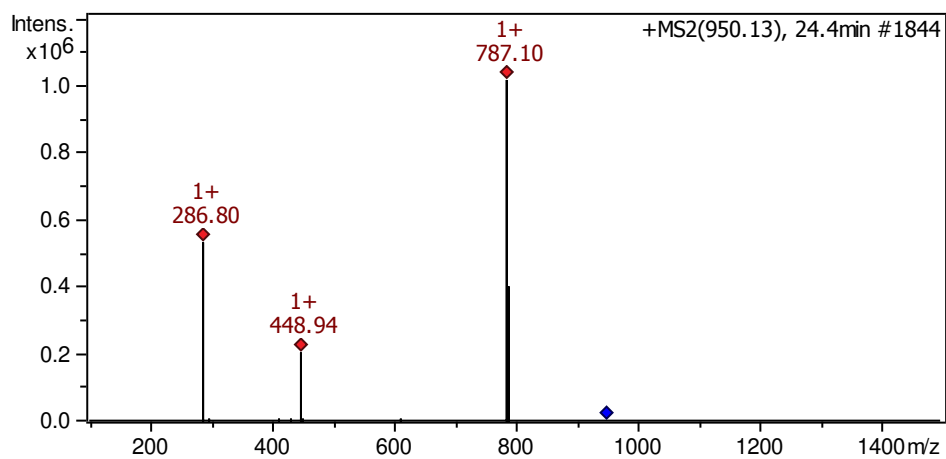
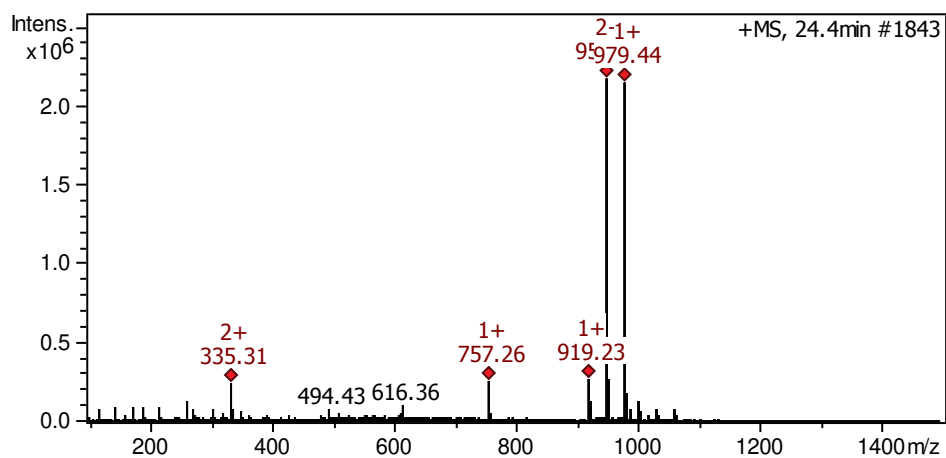
Cianidina 3-(cafeil)(sinapil)glucosil-5-glucosídeo

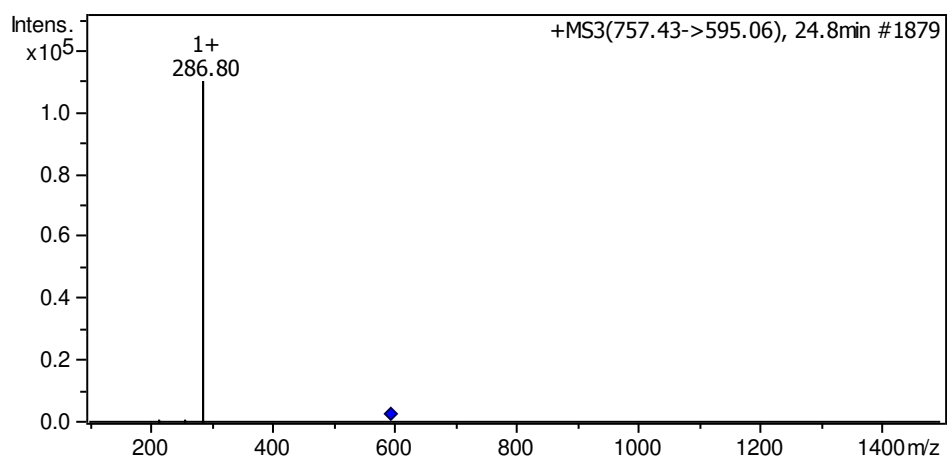
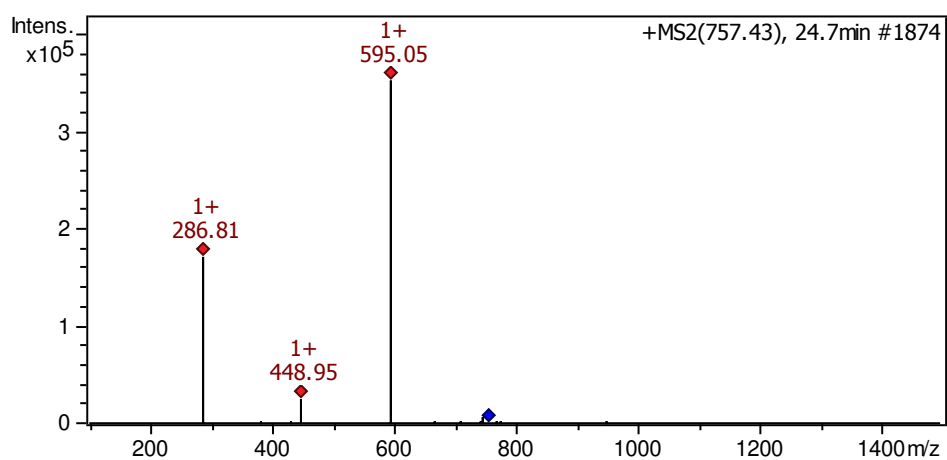
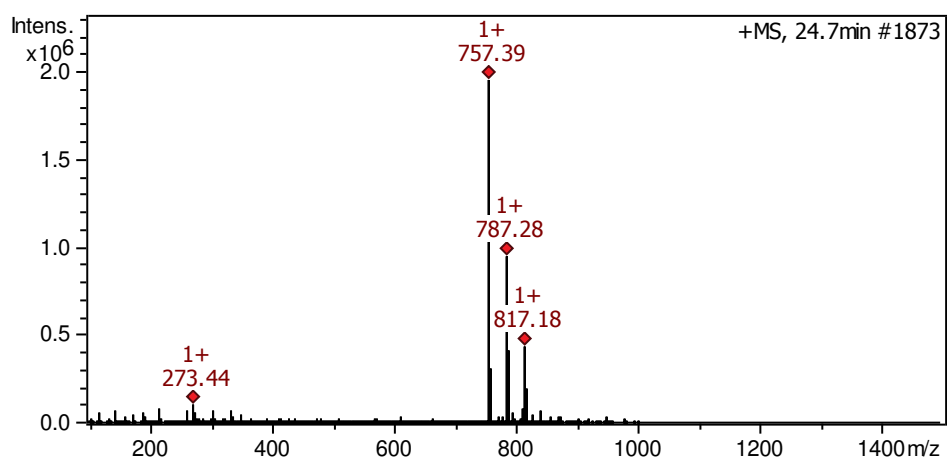




Pico 14

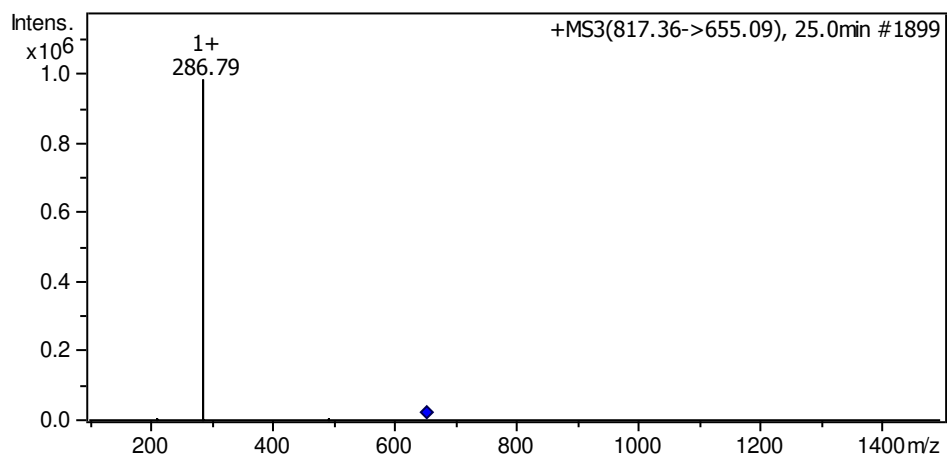
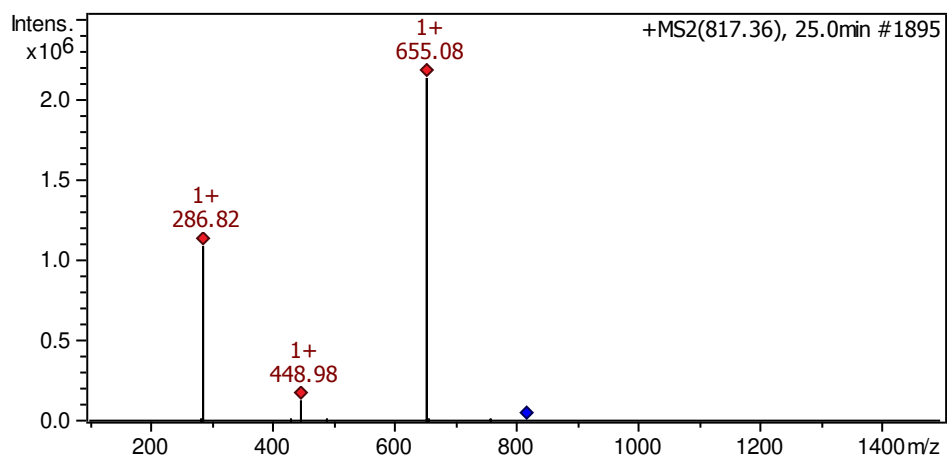
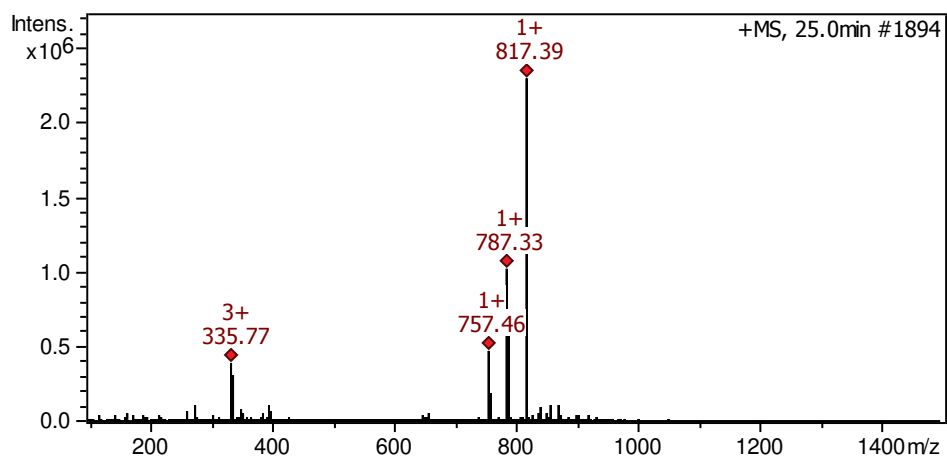
Cianidina 3-(cafeil)(feruil)glucosil-5-glucosídeo





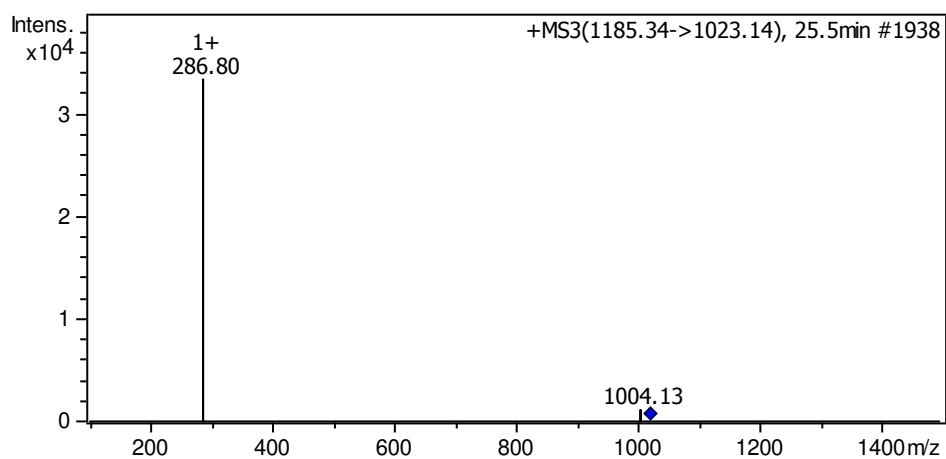
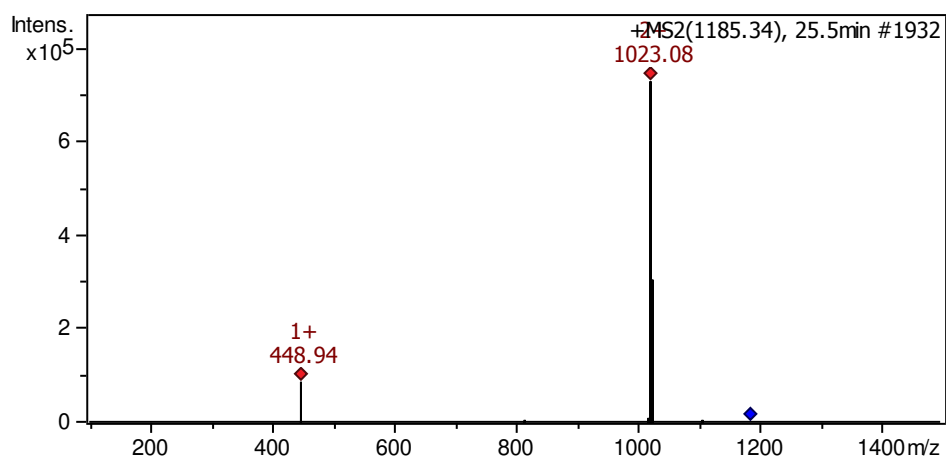
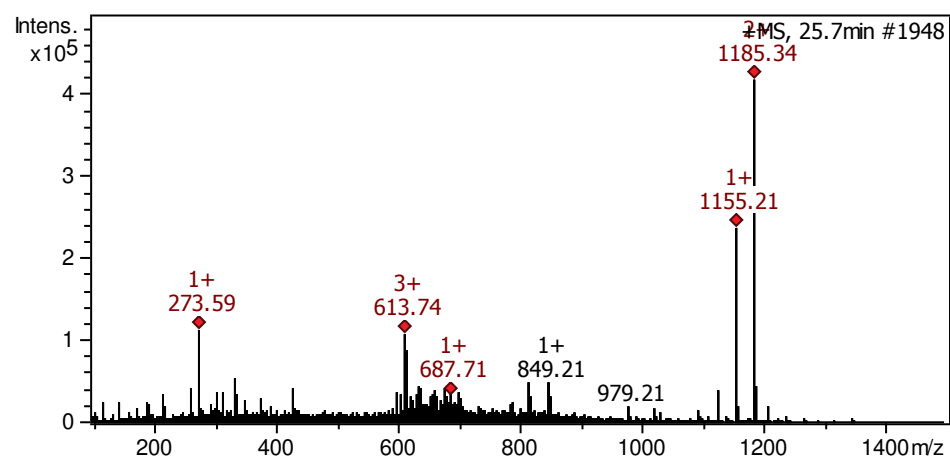
Pico 15

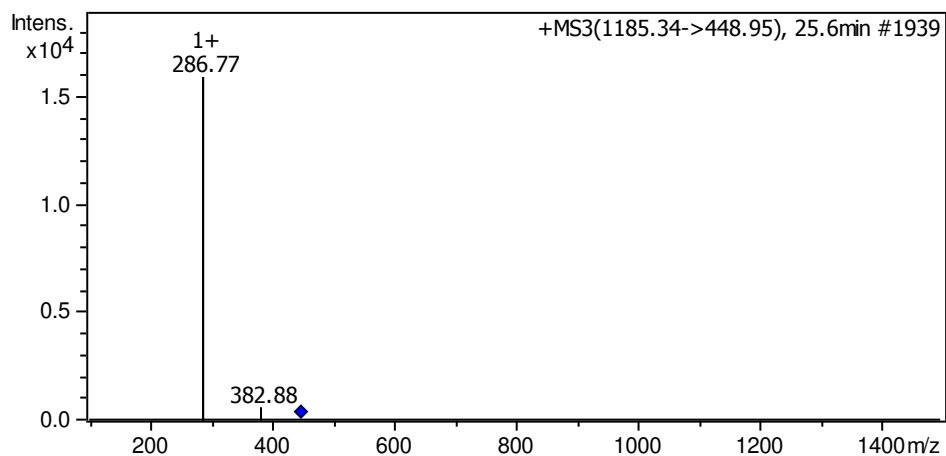
Cianidina 3-(cafeil)(sinapil)glucosídeo



Pico 16

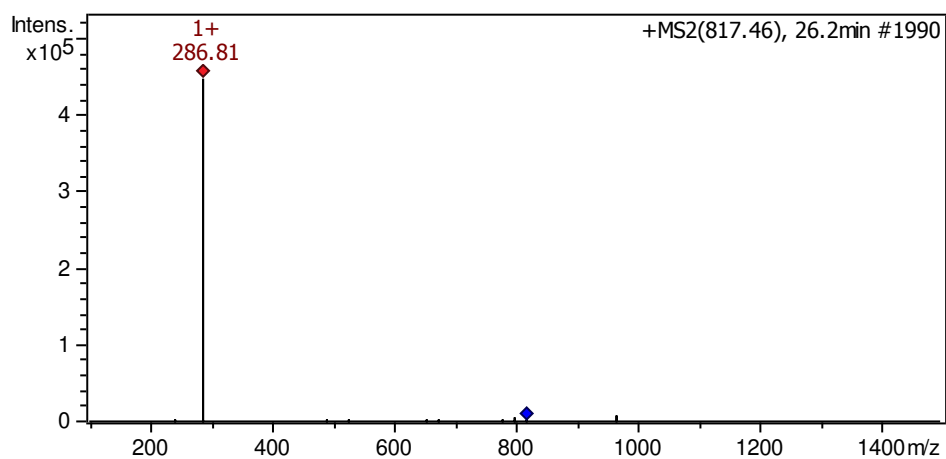
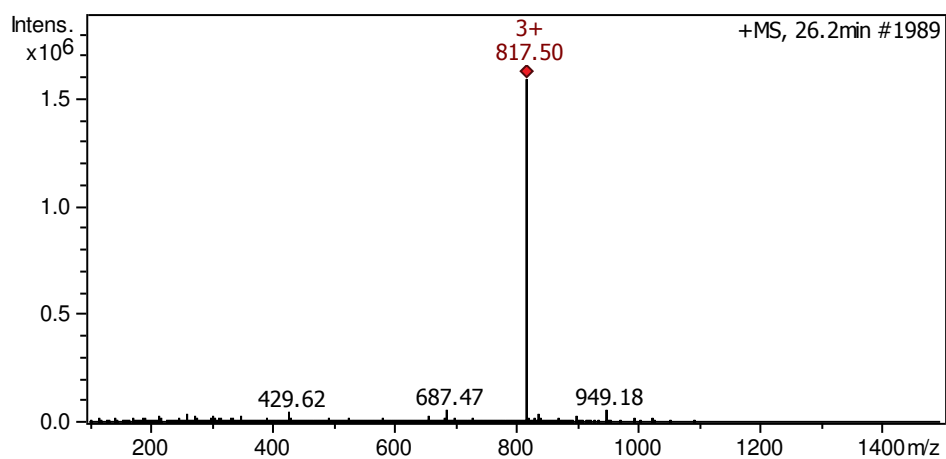
Cianidina 3-(sinapil)(sinapil)diglucosil-5-glucosídeo





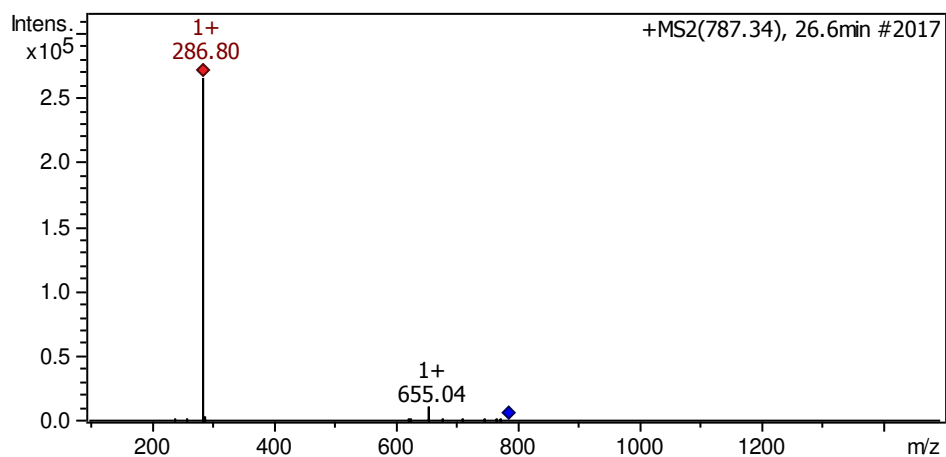
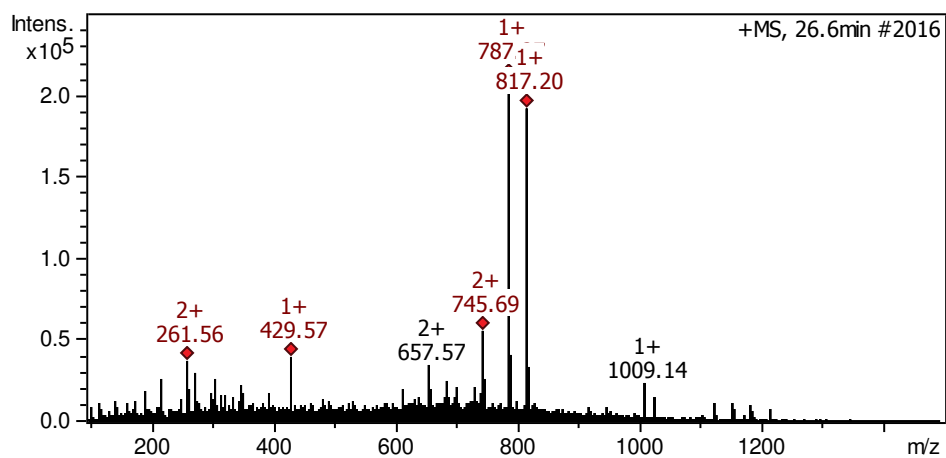
Pico17

Cianidina 3-(cafeil)(sinapil)glucosídeo



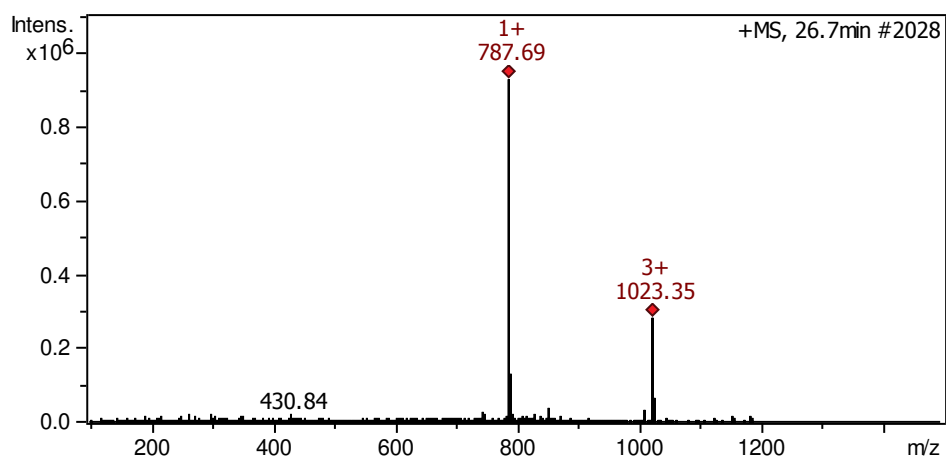
Pico 18

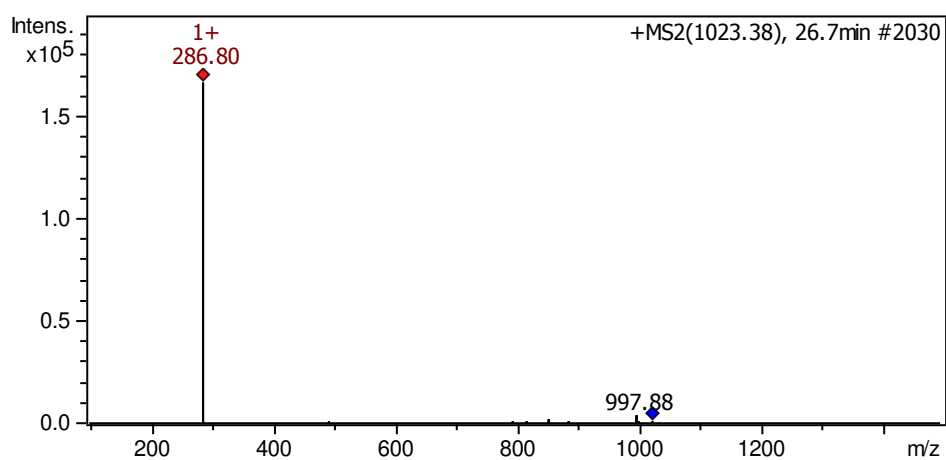
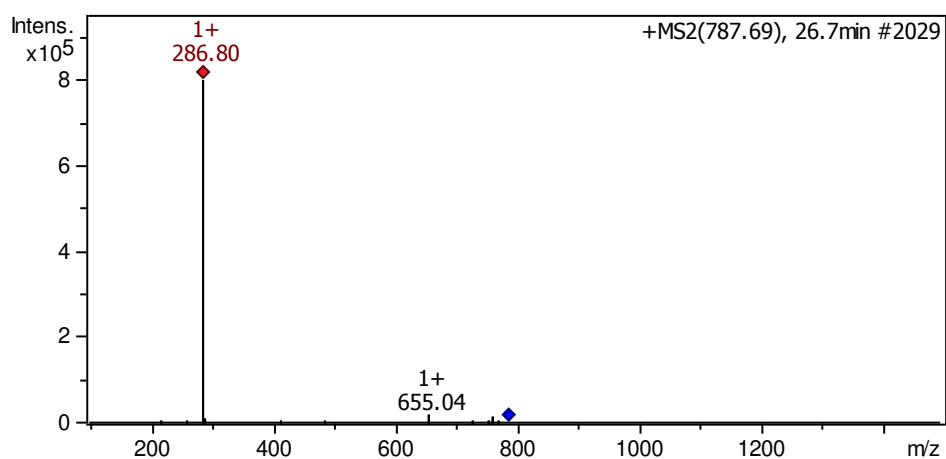
Cianidina 3-(cafeil)(feruil)glucosídeo



Pico 19

Cianidina 3-(sinapil)(sinapil)diglucosídeo





Pico 20

Cianidina 3-(feruil)(feruil)diglucósídeo

