

COMUNICADO
TÉCNICO

234

Rio de Janeiro, RJ
Dezembro, 2018

Embrapa

Técnicas Combinadas para Purificação e Concentração de Antocianinas

Manuela Cristina Pessanha de Araujo Santiago¹
Ana Cristina Miranda Senna Gouvêa²
Ronoel Luiz de Oliveira Godoy³
Renata Galhardo Borguini⁴
Luzimar da Silva de Mattos do Nascimento⁵
Monalisa Santana Coelho de Jesus⁶
Sidney Pacheco⁷

Técnicas Combinadas para Purificação e Concentração de Antocianinas¹

¹ Engenheira Química, D.Sc. em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, analista da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ

² Farmacêutico, D.Sc. em Ciência e Tecnologia de Alimentos, bolsista Embrapa Café, Rio de Janeiro, RJ

³ Farmacêutico, D.Sc. em Química Orgânica, pesquisador da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

⁴ Engenheira Agrônoma, D.Sc. em Saúde Pública, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

⁵ Química, M.Sc. em Ciência e Tecnologia de Alimentos, técnica da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

⁶ Química, M.Sc. em Química, analista da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

⁷ Química, D.Sc. em Ciência e Tecnologia de Alimentos, analista da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

Introdução

A síntese artificial de antocianinas ainda não é um processo simples nem barato. Por isso, aplicações desses compostos envolvem sua extração a partir de espécies vegetais, principalmente frutas, nas quais o teor de antocianinas é mais alto. O custo de comercialização de antocianinas isoladas e quimicamente puras é muito alto e, dependendo do tipo de antocianina, um miligrama pode custar mais de US\$ mil dólares (Gouvêa, 2015). Portanto, é necessário expandir as possibilidades de sua obtenção em larga escala a partir de fontes naturais de forma sustentável, a fim de viabilizar o desenvolvimento de suas aplicações, com benefícios para a sociedade (Maia, 2011).

Quando se obtém um extrato antociânico de matrizes ricas nestes

pigmentos, o mesmo contém, além de antocianinas, outros compostos fenólicos, açúcares, polissacarídeos solúveis, proteínas, cátions e ácidos orgânicos (Campos, 2006). Métodos de extração em fase sólida (SPE – *Solid Phase Extraction*) podem ser utilizados para purificação prévia de extratos antociânicos. Os cartuchos C₁₈ ou Sephadex são habitualmente os mais usados para purificação de antocianinas por SPE, por meio da aplicação do extrato das antocianinas bruto no cartucho contendo o material sorbente. As antocianinas são sorvidas fortemente neste material (fase estacionária) por suas hidroxilas livres. Desta forma, as substâncias mais polares que as antocianinas, como açúcares e ácidos orgânicos, são primeiramente eluídas quando o cartucho é submetido à lavagem com água. Em seguida, as

antocianinas são eluídas com solvente alcoólico acidificado (Terci, 2004; Kong et al., 2008).

Considerando-se o custo e a dificuldade de se obter padrões analíticos de antocianinas com garantia de qualidade e alto grau de pureza, este documento tem como objetivo apresentar um método com técnicas combinadas para purificação e concentração de antocianinas extraídas a partir de matrizes vegetais, para este fim.

Metodologia utilizada

Como exemplo de aplicação da técnica de isolamento e purificação de antocianinas proposto no presente trabalho, utilizou-se o fruto da amendoeira liofilizado, submetendo-o às etapas de extração e às etapas de purificação detalhadas a seguir.

Obtenção do extrato antociânico

Para preparar o extrato antociânico deve-se pesar 0,2 g de frutos liofilizados em tubo (50 mL) de tampa com rosca apropriada para ser utilizado em centrifuga. Após, adicionar 2 mL da solução 1 (ácido fórmico/metanol; 10:90, v/v) ao tubo, seguido de agitação em vórtex durante 1 minuto e ultrassom por 10 minutos e, posteriormente, centrifugar a 6000 rpm por 10 minutos. Transferir o sobrenadante para um balão volumétrico de 10 mL. Repetir o processo de lavagem descrito acima com o resíduo que fica no tubo, até que o sobrenadante obtido não apresente mais

coloração. Ao final, completar o volume do balão com a solução 1. Microcentrifugar uma alíquota de 1,2 mL do extrato na velocidade de 8000 rpm por 3 minutos. A purificação do extrato antociânico obtido é realizada a partir da combinação de três técnicas de separação: coluna de vidro fase C₁₈, cartucho Oasis® (troca catiônica) e cartucho Sep Pak C₁₈.

Etapa 1 – Purificação das antocianinas em coluna de vidro com fase de C₁₈

- Preparar a coluna de vidro com fase estacionária C₁₈;
- Lavar a fase da coluna de vidro com 20 mL de solução de ácido fórmico/metanol (10:90, v/v);
- Lavar a fase da coluna de vidro com 10 mL utilizando solução de ácido fórmico/água Milli-Q® (1:99, v/v);
- Aplicar 5 mL do extrato antociânico do fruto da amendoeira;
- Lavar a coluna com os pigmentos adsorvidos utilizando 20 mL da solução de ácido fórmico/água Milli-Q® (1:99, v/v);
- Eluir os pigmentos com a solução de metanol/ácido fórmico/água Milli-Q® (10:0,9:89,1 v/v/v). Nesta etapa torna-se possível, caso seja de interesse, recolher separadamente cada antocianina presente no extrato;
- Cada 1 mL do extrato obtido deve ser diluído 10 vezes em água ultrapura a

fim de permitir sua utilização no cartucho OASIS® de troca catiônica.

Etapa 2 - Purificação das antocianinas em cartucho Oasis® (troca catiônica)

- Verter no cartucho 12 mL da solução aquosa da amostra obtida no item anterior (Etapa 1);

- Lavar com 12 mL de solução 0,1 % TFA (ácido trifluoroacético);

- Lavar com 12 mL de solução MetOH/0,1 % TFA; para eliminar a fração de fenólicos não antociânicos que apresentam a mesma polaridade das antocianinas;

- Lavar com 6 mL MetOH/1 % NH₄OH; e coletar fração do pigmento antociânico;

- Lavar com 6 mL da solução água:metanol (40:60, v/v) /1 % NH₄OH; e coletar o restante da fração do pigmento antociânico;

- A coleta da fração do pigmento antociânico é realizada em recipiente contendo 250 µL de ácido fórmico (99 %). Após, diluir com 20 mL da solução de ácido fórmico/água Milli-Q® (1:99, v/v).

Etapa 3 – Concentração das antocianinas purificadas com o uso de cartucho Sep Pak C₁₈

- Lavar o cartucho com 5 mL de solução de ácido fórmico/metanol (10:90, v/v);

- Lavar o cartucho com 10 mL de solução ácido fórmico/água Milli-Q® (1:99, v/v);

- Aplicar 20 mL do extrato aquoso obtido do cartucho de troca catiônica (Etapa 2);

- Lavar o cartucho com os pigmentos adsorvidos utilizando 20 mL da solução de ácido fórmico/água Milli-Q® (1:99, v/v);

- Eluir o pigmento com a solução de ácido fórmico/metanol (10:90, v/v) (5 mL).

Etapa 4 - Preparação da amostra para injetar no sistema cromatográfico

- Após a coleta, separar uma alíquota de 200 µL do pigmento purificado eluído acima e em seguida secar sob ar comprimido;

- Por fim, diluir com 200 µL de solução de ácido fórmico/água Milli-Q® (1:99, v/v).

Resultados

A análise do extrato antociânico purificado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector de arranjo de fotodiodos (CLAE/DAD) evidenciou, através da varredura nos comprimentos de onda (λ) de 250-700 nm (Max Plot), que a combinação das

técnicas permitiu o isolamento das antocianinas. Este fato foi evidenciado pela ausência de absorção em comprimentos diferentes de 520 nm (comprimento de onda médio de maior absorção das antocianinas).

Este procedimento possibilitou a obtenção de um extrato concentrado em antocianinas e sem outras substâncias, o que possibilita a utilização do mesmo como padrão analítico.

No caso específico do extrato antociânico do fruto da amendoeira,

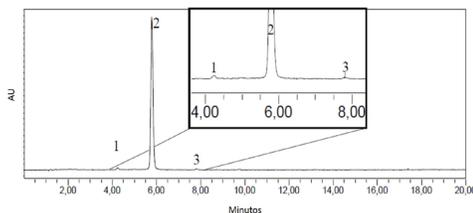


Figura 1. Cromatograma do extrato antociânico purificado do fruto da amendoeira (520 nm). Pico 1: delphinidina-3-O-glicosídeo; Pico 2: cianidina-3-O-glicosídeo; Pico 3: pelargonidina-3-O-glicosídeo.

após purificação e concentração o mesmo já estava apto para ser utilizado como padrão analítico, uma vez que apresentou a antocianina cianidina-3-O-glicosídeo com pureza de 99 %, superior a muitos padrões comerciais (Figura 1).

A utilização da coluna de vidro com recheio C_{18} proporcionou a retirada de substâncias que não possuíam afinidade com a fase reversa, como açúcares, lipídeos, proteínas, entre outras.

O cartucho Oasis contém um recheio que combina o mecanismo de troca catiônica forte (cátions) e a interação de fase reversa para bases (HE e GIUSTI, 2011). O adsorvente utilizado nesse cartucho é uma versão modificada do copolímero divinilbenzeno-vinilpirrolidona, onde um átomo de hidrogênio do anel benzênico foi substituído por um grupo sulfônico. Sendo assim, o anel benzênico pode formar uma forte interação com o anel da estrutura das antocianinas como também com as estruturas de outros compostos fenólicos. O uso do metanol acidificado proporcionou a eluição dos compostos fenólicos com exceção das antocianinas. A forte interação iônica que ocorreu com a antocianina carregada positivamente e o grupo sulfônico fez com que a mesma permanecesse adsorvida à fase estacionária do cartucho. O solvente básico utilizado (NH_4OH) permitiu sua desorção, pois ao ser adicionado à fase móvel elevou o pH acima de 9,5 causando a desprotonação das antocianinas e, portanto, cessando a interação iônica entre a antocianina e o grupo sulfônico.

Com o pH elevado, a estrutura das antocianinas passa de um cátion flavílio para uma base quinoidal, que possui caráter aniônico, repelindo negativamente a carga do grupo sulfônico da estrutura hidrofóbica da fase estacionária do cartucho. O excesso de NH_4 também concorre com os locais de ligação dos cátions

na resina, facilitando a dissociação da antocianina e grupo sulfônico.

Para evitar a degradação da antocianina é necessário que a solução seja acidificada imediatamente, pois estas substâncias são instáveis em pH mais elevado.

O cartucho Sep Pak C₁₈, utilizado na terceira etapa, permitiu a retirada do sal formado, assim como proporcionou a concentração da amostra. A troca do solvente aquoso pelo solvente orgânico acidificado também permitiu a secagem mais rápida da solução.

Desse modo, pode-se concluir que esses procedimentos permitiram a retirada, com êxito, de outras substâncias que estavam presentes no extrato antociânico da amostra. Em particular, o cartucho de troca iônica permitiu o fracionamento das substâncias fenólicas que apresentavam polaridade similar à das antocianinas.

Referências

CAMPOS, D. D. P. **Extração, Purificação e Isolamento de Antocianinas de Jambolão (*Syzygium cumini*) e Avaliação dos seus Efeitos Biológicos**. 2006. 113 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas. 2006.

MAIA, O. B. (Ed.) **Antocianinas: corantes naturais para alimentos, cosméticos, tintas e experiências para ensinar**

e aprender Química IBICT. **Canal Ciência**, 14 out. 2011. Texto. Disponível em: <http://www.canalciencia.ibict.br/pesquisa/0244-Antocianinas-quimica-corantes-naturais.html>. Acesso em: 10 dez. 2018. Pesquisadores responsáveis: Adriana Vitorino Rossi, Acácia Adriana Salomão, Aline Guadalupe Coelho, Daniela Brotto Lopes Terci, Daniela Dias Palombino de Campos, Gustavo Giraldo Shimamoto, Martha Maria Andreotti Favaro, Patrícia Gisela Sampaio, Tânia Aparecida Lopes Pinheiro, Willian Leonardo Gomes da Silva.

GOUVÊA, A. C. M. S. **Extração, isolamento e caracterização de antocianinas de fontes naturais e a sua aplicação na análise de alimentos por cromatografia líquida**. 2015. 198 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, RJ. 2015.

HE, J.; GIUSTI, M. M. High-purity isolation of anthocyanin mixtures from fruits and vegetables – a novel solid-phase extraction method using mixed mode cation exchange chromatography. **Journal of Chromatography, A** 1218, p. 7914-7922, 2011.

KONG, J.-M., CHIA, L.-S., GOH, N.-K, CHIA, T.-F, BROUILLARD, R. Corrigendum to “Analysis and biological activities of anthocyanins”. **Phytochemistry**, 69, p. 1039-1940, 2008.

TERCI, D. B. L. **Aspectos analíticos e didáticos de antocianinas extraídas de frutas**. 2004. 223 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de

Química, Universidade Estadual de
Campinas (UNICAMP), Campinas.
2004.

Exemplares desta edição
podem ser adquiridos na:

Embrapa Agroindústria de Alimentos

Av. das Américas, 29.501 - Guaratiba
23020-470, Rio de Janeiro, RJ
Fone: (0xx21) 3622-9600
Fax: (0xx21) 3622-9713
www.embrapa.br/agroindustria-de-alimentos
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

1ª edição

Publicação digitalizada (2018)



MINISTÉRIO DA
**AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO**



Comitê Local de Publicações
da Embrapa Agroindústria de Alimentos

Presidente

Virgínia Martins da Matta

Membros

*André Luis do Nascimento Gomes, Celma Rivanda
Machado de Araujo, Daniela De Grandi Castro
Freitas de Sá, Elizabete Alves de Almeida Soares,
Janine Passos Lima da Silva, Leda Maria Fortes
Gottschalk, Marcos de Oliveira Moulin, Otniel
Freitas Silva e Rogério Germani*

Supervisão editorial

Daniela De Grandi Castro Freitas de Sá

Revisão de texto

Virgínia Martins da Matta

Normalização bibliográfica

Celma Rivanda Machado de Araujo

Tratamento das ilustrações

Marcos de Oliveira Moulin

Projeto gráfico da coleção

Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica

Marcos de Oliveira Moulin

Foto da capa

Ana Cristina Miranda Senna Gouvêa

CGPE 15051