

Identificação de antocianinas de extratos de frutas por HPLC com detecção espectrofotométrica e por HPLC-ESI-Q-TOF-MS.

Patrícia Gisela Sampaio¹ (PG)*, Adriana Vitorino Rossi (PQ)

¹IQ – UNICAMP, CP 6154, CEP 13083-970, Campinas-SP, Brasil e-mail: *patriciasampaio@iqm.unicamp.br

Palavras Chave: antocianinas, identificação, HPLC, ESI-Q-TOF-MS.

Introdução

Antocianinas (ACYS) podem ser identificadas por várias técnicas, sendo as mais utilizadas a espectrofotometria UV-Vis, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas (MS). Neste trabalho, para identificação das ACYS individuais, foram estudados procedimentos por HPLC com detecção espectrofotométrica e por MS^{1,2}. Um procedimento clássico é o método de Goiffon, Mouly & Gaydou³ (GMG), que propõe a identificação de ACYS por HPLC a partir de uma relação empírica entre o tempo de retenção (t_R) das ACYS presentes nos extratos de frutas com t_R de cianidina-3-glicosídeo, que está presente em quase todas as frutas vermelhas e acaba funcionando como referência para identificação das demais ACYS. Esse método é opção que minimiza as dificuldades da aquisição e o alto custo de padrões de ACYS, mas tem limitações. Problemas para interpretação de resultados do método GMG³ e a escassez de padrões de ACYS inspiraram o desenvolvimento de um estudo com HPLC-ESI-Q-TOF-MS (ionização por eletrospray em analisador quadrupolo e tempo de voo) para identificar ACYS de frutas da família das Rosaceae (amostra 1) e Myrtaceae (amostra 2).

Procedimento Experimental

Extração das ACYS: imersão das frutas em etanol 94% v/v, a 55°C por 24 h, seguindo-se secagem sob fluxo de ar (0,6 m/s) a temperatura ambiente até obtenção de pastas de ACYS.

1. GMG: Os cromatogramas foram obtidos em equipamento Shimadzu Prominence coluna C18 (Varian, Microsorb MV), detector *diode array* SPD-M20A, fase móvel H₂O deionizada:acetona:ácido fórmico (81:9:10 v/v/v) com vazão 1,0 mL min⁻¹, detecção em 525 nm, volume de injeção 20 µL e eluição isocrática. As pastas de ACYS foram solubilizadas em metanol com 0,01 % v/v de HCl.

2. HPLC-ESI-Q-TOF-MS: Para otimização das condições cromatográficas foi utilizada uma mistura de 8 padrões de ACYS. Os cromatogramas foram obtidos em equipamento Waters Alliance 2695 coluna C18 (Waters, XTerra®), fase móvel H₂O deionizada acidificada com ácido fórmico (90:10 v/v), e metanol eluição por gradiente (90:10; 70:30; 90:10 v/v) com vazão 0,250 mL min⁻¹ e volume de injeção 50 µL. Os espectros de massas foram obtidos em equipamento

Micromass QToF Micro. As pastas de ACYS foram solubilizadas em metanol com 0,01 % v/v de ácido acético. Trabalhou-se em condições de *tuning* otimizadas para ionização por eletrospray íon positivo⁴.

Resultados e Discussão

1. GMG: A partir do cálculo de α , foram identificadas as principais ACYS dos extratos de frutas. Porém 2 ACYS diferentes corresponderam a um único α_{tabelado} 1,29 (amostra 1) e faltava correspondência para $\alpha_{\text{calculado}} = 0,74$ (na tabela só constam α_{tabelado} 0,71 e 0,77, que poderiam identificar 2 ACYS diferentes) (amostra 2).

$$\alpha = \frac{t_R'}{t_R(\text{cianidina-3-glicosídeo})} \quad t_R' = t_R - t_0, \quad t_R = \text{tempo de retenção do produto}, \quad t_0 = \text{tempo de retenção de um produto não retido.}$$

2. HPLC-ESI-Q-TOF-MS: ACYS com $\alpha_{\text{calculado}}$ sem problemas para identificação por comparação com α_{tabelado} foram confirmadas. Para ACYS com $\alpha_{\text{tabelado}} = 1,29$ da amostra 1, detectou-se apenas um pico em ~ 24 min, com razão m/z ~ 595, correspondente à cianidina-3-rutinosídeo. Para ACYS da amostra 2 com valor de $\alpha_{\text{calculado}} = 0,74$, sem correspondência tabelada, no espectro de massas foi encontrado pico em ~ 15 min com razão m/z de ~ 611 pode ser atribuído à delfinidina-3-rutinosídeo, cujo valor de α_{tabelado} é 0,71.

Conclusões

O método GMG é uma boa opção para a identificação de ACYS, pois além de envolver procedimento simples em técnica acessível não requer o uso de padrões que são de alto custo. Mas para viabilizar ou confirmar a identificação em casos problemáticos, optar HPLC-ESI-Q-TOF-MS demonstrou ser adequado. ACYS identificadas na amostra 1 foram: cianidina-3-glicosídeo, cianidina-3-rutinosídeo e delfinidina-3-galactosídeo. Na amostra 2 apenas 1 ACYS foi identificada, delfinidina-3-rutinosídeo.

Agradecimentos

Ao CNPq pela bolsa, à FAPESP pelo financiamento para aquisição do equipamento Micromass e ao Grupo CentroFlora pelo convênio com o GPQUAE.

¹ Tian, Q; Aziz, RM; Stoner, GD; Schwartz, ST; J. Food Sci. **2005**, 70, 43.

² Sampaio, PG, Rossi, AV; Livro de Resumos 14º Encontro Nacional de Química Analítica, CR 083, **2007**.

³ Goiffon, JP; Mouly, PP; Gaydou, EM; Anal. Chim. Acta **1999**, 382, 39.

⁴ Nicoué, EE; Savard, S; Belkacemi, K; *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55, 5626.