

ISOLAMENTO DAS ANTOCIANINAS DO EPICARPO DE UVAS-PRETAS (*Vitis* spp.) POR CLAE/DAD E SUA IDENTIFICAÇÃO ATRAVÉS DO SISTEMA CLUE-QTOF-ESI /EM/EM

Isolation of black grapes (*Vitis* spp.) epicarp anthocyanins by HPLC/DAD and their identification through CLUE-QTOF-ESI/MS/MS system

Ana Cristina Miranda Senna Gouvêa¹, Manuela Cristina Pessanha de Araujo Santiago^{2*},
Luciana Mouta de Oliveira³, Ronel Luiz de Oliveira Godoy², Fernanda Marques Peixoto^{1,4},
Sidney Pacheco², Luzimar da Silva de Mattos do Nascimento², Renata Galhardo Borguini²

¹Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - BR 465, km 7, Seropédica, RJ, CEP: 238908-000, Brasil

²Embrapa Agroindústria de Alimentos - Avenida das Américas, 29501, Guaratiba, Rio de Janeiro, RJ, CEP: 23020-470, Brasil

³Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - Avenida Pasteur, 296, Urca, Rio de Janeiro, RJ, CEP: 22290-240, Brasil

⁴Centro Universitário Estadual da Zona Oeste (UEZO) - Av. Manuel Caldeira de Alvarenga, 1203 Campo Grande - Rio de Janeiro - RJ, 23070-200, Brasil

*Autor correspondente: manuela.santiago@embrapa.br

RESUMO

As antocianinas, flavonoides com intensa atividade antioxidante, são os pigmentos responsáveis pela coloração no epicarpo de vários tipos de uvas com tonalidade escura. A concentração e a variedade dos tipos de antocianinas é que determinam a intensidade da coloração dos vários cultivares e dos produtos obtidos a partir dos mesmos. Este trabalho teve como objetivo o isolamento e a identificação das antocianinas majoritárias presentes no epicarpo de uvas-pretas sem sementes (*Vitis* spp.) adquiridas em mercado local do Rio de Janeiro, provenientes do Chile (indicação do rótulo). A extração das antocianinas do fruto foi realizada com solução de metanol acidificado, sendo a amostra submetida às etapas de sonificação e centrifugação. Para a separação e isolamento das antocianinas foi utilizado um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) Alliance modelo 2690/5 da Waters[®], acoplado ao detetor de arranjo de fotodiodos Waters[®]. Na etapa de identificação, utilizou-se sistema CL-EM/EM Waters[®] composto por um Cromatógrafo Líquido de Ultra Eficiência (CLUE) e analisador de massas de alta resolução Q-TOF. A identificação das antocianinas majoritárias foi feita com base em dados existentes na literatura e pela comprovação através das suas respectivas massas moleculares exatas. Portanto, foi possível comprovar a presença das antocianinas delphinidina-3-glicosídeo, cianidina-3-glicosídeo, petunidina-3-glicosídeo, peonidina-3-glicosídeo e malvidina-3-glicosídeo, cujos íons precursores e seus fragmentos que correspondem à perda de uma massa de 162Da (hexose), liberando suas agliconas são, respectivamente: m/z 465,1078 e m/z 303,0616; m/z 449,1083 e m/z 287,0556; m/z 479,1168 e m/z 317,0746; m/z 463,1248 e m/z 301,0714; m/z 493,1349 e m/z 331,0864.

Palavras-chave: antocianinas monoglicosiladas, cromatografia líquida, espectrometria de massas.

ABSTRACT

Anthocyanins, flavonoids with strong antioxidant activity, are the pigments responsible for the epicarp color of various types of dark grapes. The concentration and the variety of anthocyanins types determine the color intensity of various cultivars and of products obtained from the same. This study aimed to characterize and identify the majority anthocyanins present in black grapes epicarp ink seeded, from Chile (*Vitis* spp.). The fruit anthocyanins extraction was performed with acidified methanol solution, and the sample was subjected to sonication and centrifugation steps. For the separation and isolation of anthocyanins it was used a High Performance Liquid Chromatography Alliance 2690/5 model from Waters™, coupled to a photodiode array detector Waters™. In the identification step, it was used a LC-MS/MS system with an Ultra Efficiency Liquid Chromatograph and a high resolution mass analyzer Q-TOF. The identification of the majority anthocyanins was performed according to data previously reported in the literature and to their respective exact molecular masses. Therefore, it was possible to confirm the presence of the anthocyanins delphinidin-3-glucoside, cyanidin-3-glucoside, petunidin-3-glucoside, peonidin-3-glucoside and malvidin-3-glucoside, whose precursor ions and their fragments corresponding to the loss of a mass of 162Da (hexose) releasing their aglycones are respectively: m/z 465.1078 and m/z 303.0616; m/z 449.1083 and m/z 287.0556; m/z 479.1168 and m/z 317.0746; m/z 463.1248 and m/z 301.0714; m/z 493.1349 and m/z 331,0864.

Keywords: mono-glycosylated anthocyanins, liquid chromatography, mass spectrometry

INTRODUÇÃO

A produção mundial de uvas comerciais, assim como de mesa, vem crescendo ano após ano. Apesar das videiras terem capacidade de adaptação em diferentes condições climáticas, o melhor desenvolvimento das mesmas ocorre em regiões de clima mediterrâneo (CHAVARRIA *et al.*, 2007). Relatório da *Food and Agriculture Organization* (FAO, 2011), das Nações Unidas, indica o Brasil ocupando a 12ª posição na produção mundial de uva, e China e a Itália como os maiores produtores mundial.

As antocianinas, flavonoides com intensa atividade antioxidante, são os pigmentos responsáveis pela coloração no epicarpo de vários tipos de uvas com tonalidade que varia do vermelho ao preto. Suas agliconas (antocianidinas) são altamente reativas e dificilmente são encontradas naturalmente, portanto, são menos estáveis quando comparadas aos seus respectivos glicosídeos (antocianinas). Consideradas metabólitos secundários, têm sido frequentemente usadas como marcadores químicos (em quimiotaxonomia). A presença de antocianinas em uvas tintas, além de conferir atributos de qualidade ao alimento eleva o potencial antioxidante desse fruto e seus produtos. Diversos trabalhos científicos atribuem ao consumo de alimentos que possuem essas substâncias, à redução do risco de desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis, tais como: cardiovasculares, cânceres, doenças neurodegenerativas e enfermidades inflamatórias (KUSKOSKI *et al.*, 2004; MARTÍNEZ-FLÓREZ *et al.*, 2005; ABE *et al.*, 2007).

A distribuição das antocianinas em uvas é complexa variando de acordo com o cultivar. Dentre as antocianinas monoglicosiladas encontradas em uvas, as principais são: delphinidina-3-glicosídeo; cianidina-3-glicosídeo; petunidina-3-glicosídeo; peonidina-3-glicosídeo e malvidina-3-glicosídeo. *Vitis vinifera* L., cultivar de coloração vermelha, é um dos exemplos aonde são encontradas somente as antocianinas monoglicosiladas acima citadas, assim como seus derivados acilados com ácido p-coumárico, cafeico e acético (RUSTIONI *et al.*, 2013).

A caracterização das antocianinas presentes na uva se torna imprescindível e aumenta o conhecimento sobre os diferentes cultivares, sejam eles naturais ou melhorados. Este tipo de conhecimento fornece subsídios para diferenciá-los entre si e pode trazer informações que permitam uma melhoria na sua constituição genética, visto que a concentração e a variedade dos tipos de antocianinas é que irão determinar a intensidade da coloração dos vários cultivares de uvas (POMAR *et al.*, 2005).

Na literatura há relatos sobre a identificação das antocianinas presentes em vinhos, mas há pouca informação sobre as uvas propriamente ditas, como no estudo realizado por ANDRADE *et al.* (2013). Sabe-se que a composição de antocianinas na bebida está relacionada à presença destes pigmentos no fruto (CÁCERES *et al.*, 2012), mas não é possível atribuir que tal perfil seja idêntico ao da matéria-prima, uma vez que os processos para obtenção e armazenamento do vinho podem acarretar alterações no perfil destes compostos.

Desta forma, este trabalho teve como objetivo isolar e identificar, através de uma técnica precisa, segura e de alta resolução, as antocianinas presentes no epicarpo de uvas-pretas (*Vitis* spp.) sem sementes provenientes do Chile, comercializadas em um mercado local na cidade do Rio de Janeiro, RJ.

MATERIAL E MÉTODOS

Matéria-prima

Os frutos de uva-preta (*Vitis* spp.) sem sementes provenientes do Chile foram comprados em mercado local no bairro do Recreio dos Bandeirantes, zona oeste do município do Rio de Janeiro, RJ. As bagas foram abertas e despulpadas manualmente e, cada 100 gramas de fruto deu origem a 11,32 gramas de “cascas” (epicarpos), tendo sido esta quantidade congelada e liofilizada durante 24 horas em liofilizador Líotop modelo L101 à temperatura de - 40°C. Do material liofilizado, obteve-se um pó utilizando o moinho IKA, modelo A1. O pó foi acondicionado em embalagens herméticas laminadas à temperatura ambiente, ficando, desta forma, a amostra protegida da luz e umidade do ar até o momento das análises.

Extração das antocianinas

Os pigmentos antociânicos do pó foram extraídos utilizando-se a metodologia de extração para antocianinas descrita por SANTIAGO *et al.* (2010), onde pesou-se 1g do liofilizado para obtenção de um extrato concentrado que possibilitou a coleta para identificar as antocianinas. A amostra foi acondicionada em um tubo de centrífuga de 50 mL, onde foram adicionados 2mL de solução de extração (ácido fórmico/ metanol-10:90, v/v), com subseqüentes etapas de agitação em vortex durante 1 minuto, sonificação por 10 minutos no ultrasson Cleanears, e centrifugação a 6000rpm por um período de 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um frasco, onde foi submetido à secagem sob fluxo de ar comprimido filtrado. Posteriormente, o sobrenadante seco foi diluído com 4mL de solução para injeção, 5% de ácido fórmico em água de Milli-Q[®]: metanol (90:10, v/v), e acondicionado em vial específico para o injetor do cromatógrafo.

Isolamento das antocianinas por CLAE

Para a separação e isolamento das antocianinas foi utilizado um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Waters[®], Alliance modelo 2690/5, acoplado ao detetor de arranjo de fotodiodos Waters[®] (DAD), modelo 2996, software Empower[®], coluna C₁₈ Thermo (100mm x 4,6mm; 2,4mm), 20 µL de injeção, fluxo de 1,0 mL.min⁻¹ e modo de eluição gradiente com acetonitrila (solvente A) e solução aquosa de ácido fórmico 5% (Solvente B). O gradiente inicia com 5% do solvente A e 95% do solvente B até 5 min, depois vai aumentando o solvente A até 13% durante 10 min, em seguida mantém o solvente A a 14% por 1 min, e após decresce o solvente A até chegar a 5% durante 2 min e 30 seg, e finalmente mantém o solvente A a 5% por 3 min 30 seg para reequilibrar a coluna. A análise foi realizada no comprimento de onda de 520nm, e foram necessárias seis injeções do extrato concentrado para recolhimento em concentração adequada de cada pico referente a cada uma das antocianinas para a obtenção das substâncias isoladas. As coletas das antocianinas foram realizadas manualmente diretamente da saída do detetor.

Purificação das antocianinas isoladas

Após a coleta foi realizado o *clean up* do extrato de cada antocianina isolada. A purificação foi realizada através da técnica de extração em fase sólida adaptada da metodologia descrita por RODRIGUEZ-SAONA & WROLSTAD (2001). Foram utilizados cartuchos Sep Pack C₁₈ Waters[®], previamente acondicionados com solução de metanol acidificado (ácido fórmico 0,1%). Esta técnica além de propiciar a remoção da antocianina da fase móvel em que se encontrava diluída, concentrando-a, também proporcionou a remoção de eventuais açúcares livres, e outros compostos polares que por ventura ali se encontravam diluídos. O extrato antociânico eluído foi então seco em temperatura ambiente sob fluxo de ar comprimido filtrado.

Análise das antocianinas por espectrometria de massas (EM)

As cinco amostras coletadas foram secas e, cada uma, isoladamente, foi diluída em 1mL de solução aquosa de ácido fórmico 0,1%. Para análise, 10 μ L do extrato antociânico foi diluído em 990 μ L de solução aquosa de ácido fórmico 0,1% / metanol (60:40, v/v). A análise de identificação de antocianinas foi realizada utilizando o sistema Acquity da Waters[®] composto por um Cromatógrafo Líquido de Ultra Eficiência (CLUE), com coluna C₁₈ (2,1 x 150mm; 1,7mm) Acquity CLUE BEH, modo de eluição gradiente com solvente A (solução aquosa de ácido fórmico 0,1%) e solvente B (acetonitrila), volume de injeção 1 μ L, fluxo 0,35mL/min e temperatura da coluna de 45°C. O cromatógrafo está acoplado ao Espectrômetro de Massas de alta resolução Waters Synapt[®] Q-TOF, com fonte de ionização no modo electrospray positivo (ESI+), tempo de voo V, com as seguintes condições: temperatura da fonte igual a 120°C, gás de dissolvatação N₂ a 500°C, energia do capilar 3,0kV, cone fixado em 25,0V e energia de colisão de 8,0V.

Todos os solventes utilizados foram da marca Tedia[®] grau CLAE, para extração e análise cromatográfica, e grau Massa para as análises no espectrômetro de massa.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise por CLAE, utilizando uma coluna de fase reversa com diâmetro de partícula de 2,4 μ m, possibilitou boa resolução entre os analitos (Figura 1). Esse fato tornou possível a coleta das substâncias de forma isolada com alto grau de pureza (acima de 98%), evitando-se desta forma a contaminação das mesmas com os outros analitos da amostra.

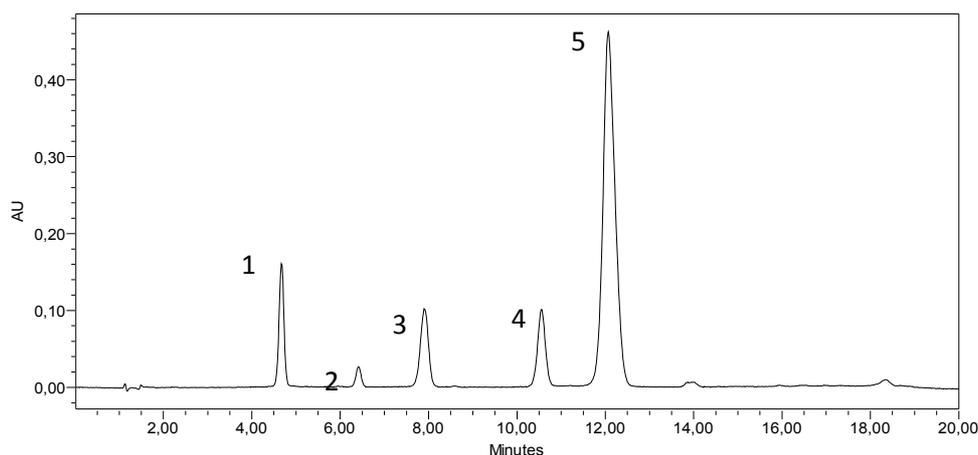


Figura 1: Perfil cromatográfico antociânico do extrato metanólico do epicarpo de uva preta chilena no comprimento de onda a 520nm. Pico 1= delphinidina-3-glicosídeo, pico 2= cianidina-3-glicosídeo, pico 3= petunidina-3-glicosídeo, pico 4= peonidina-3-glicosídeo e pico 5= malvidina-3-glicosídeo.

A identificação dos analitos foi baseada nos seus $t_{R's}$ e suas respectivas massas moleculares exatas, as quais foram confrontadas com dados existentes em trabalhos científicos (WU & PRIOR, 2005, BRITO *et al.*, 2007). Foi possível comprovar na amostra do extrato de casca de uva-preta Chilena, a presença das antocianinas: delfinidina-3-glicosídeo (pico 1) que foi sugerida devido ao seu espectro UV-visível que mostrou $\lambda_{m\acute{a}x}$ a 271 e 522nm característicos de derivados de delfinidina. Seu íon molecular $[M]^+$ apresentou m/z 465,1078 e fragmento m/z 303,0616 no EM/EM que corresponde à massa molecular da aglicona delfinidina devido à perda de um açúcar (162 Da), no caso glicose devido ao seu tempo de retenção (Tabela 1 e Figura 3A). O pico 2 foi identificado como cianidina-3-glicosídeo, pois, ao confrontar sob as mesmas condições cromatográficas, seu tempo de retenção com o tempo de retenção do pico 2 da juçara ou palmito-juçara (*Euterpe edulis*) (Figura 2), matriz já identificada na literatura por BRITO *et al.* (2007), foi possível sugerir tratar-se de cianidina-3-glicosídeo. A confirmação foi realizada ao se observar que seu íon $[M]^+$ apresentou m/z 449,1083 e fragmento m/z 287,0556 no EM/EM que corresponde à massa molecular da aglicona cianidina devido à perda de um açúcar (162 Da), no caso sugere-se ser a glicose devido ao seu t_R (Tabela 1 e Figura 3B). Pico 3 foi identificado como petunidina-3-glicosídeo através do seu íon molecular $[M]^+$ que apresentou m/z 479,1168 e fragmento m/z 317,0746 no EM/EM que corresponde à massa molecular da aglicona petunidina devido à perda de um açúcar (162 Da), no caso sugere-se ser a glicose devido ao seu t_R (Tabela 1 e Figura 3C). O pico 4, apesar de mostrar um comprimento de onda com valores próximos dos derivados de cianidina com $\lambda_{m\acute{a}x}$ de 517nm, quando aplicado uma energia de colisão de 8v em seu íon molecular $[M]^+$ m/z 463,1248 foi observado o fragmento m/z 301,0714 característico da aglicona peonidina devido à perda de um açúcar (162 Da), no caso sugere-se ser a glicose devido ao seu t_R (Tabela 1 e Figura 3D). O último pico, corresponde a antocianina majoritária dessa matriz. Apresentou espectro UV-visível com $\lambda_{m\acute{a}x}$ a 277 e 526 nm característicos de derivados de malvidina. Seu íon molecular $[M]^+$ apresentou m/z 493,1349 e fragmento m/z 331,0864d no EM/EM, devido à perda de um açúcar (162 Da), no caso sugere-se ser a glicose devido ao seu t_R (Tabela 1 e Figura 3E).

CONCLUSÕES

Com o presente trabalho pôde-se identificar de maneira inequívoca o perfil das antocianinas presentes no epicarpo das uvas-pretas sem semente (*Vitis* spp.) provenientes do Chile. O conhecimento da composição das antocianinas do fruto permite o monitoramento do comportamento destes pigmentos nas bebidas obtidas a partir desta matéria-prima, possibilitando maior controle de qualidade do produto final. Cabe ressaltar que o conhecimento do perfil antociânico das uvas, permite a diferenciação entre os diversos cultivares, já que a diferente coloração entre os mesmos está associado à variação da composição das antocianinas nas “cascas” (epicarpos).

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, pela bolsa concebida à Ana Cristina Miranda Senna Gouvêa.

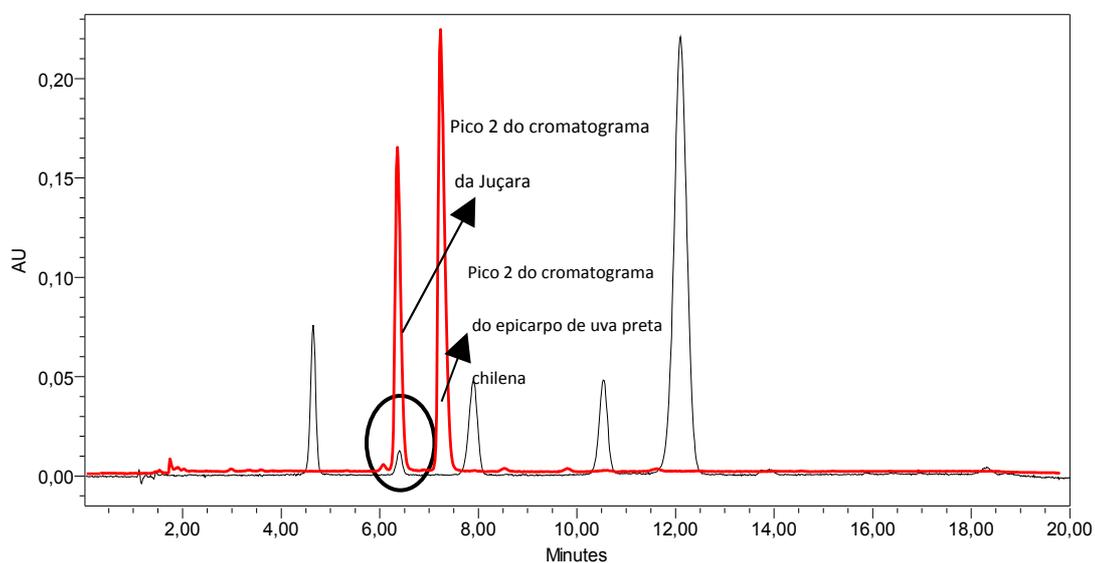


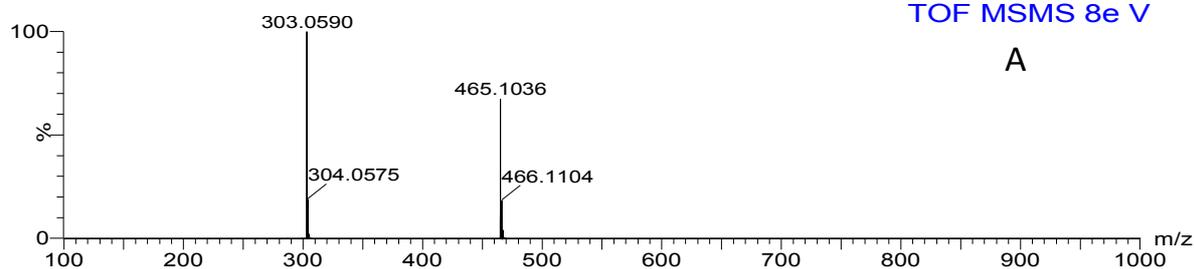
Figura 2: Sobreposição dos cromatogramas do epicarpo de uva preta chilena (em preto) e da juçara, *Euterpe edulis* (em vermelho), sob as mesmas condições cromatográficas. Pico 2 = cianidina-3-glicosídeo ($t_R = 6,21$)

Tabela 1. Identificação das antocianinas numeradas na amostra

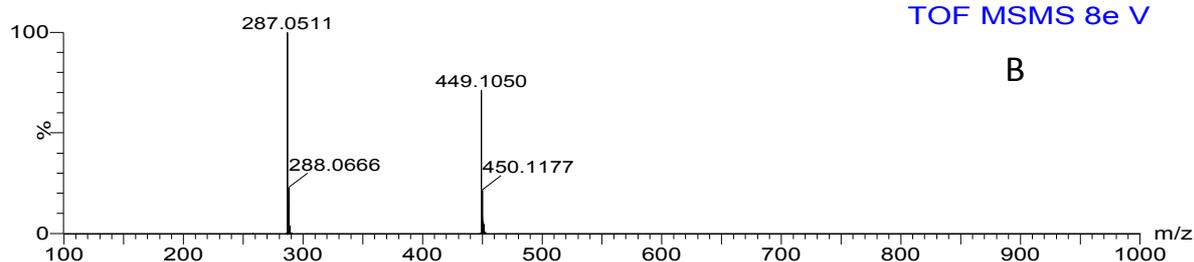
Matriz	Pico	$\lambda(\text{nm})^a$	t_R^a (min)	$[M]^+$ (m/z)	EM/EM (m/z)	Antocianina
Uva Preta Chilena	1	271/522	4,27	465,1078	303,0616	Dp-3-Glicosídeo
	2	279/515	6,21	449,1083	287,0556	Cy-3-Glicosídeo
	3	270/524	7,89	479,1168	317,0746	Pt-3-Glicosídeo
	4	279/517	10,29	463,1248	301,0714	Pn-3-Glicosídeo
	5	277/526	12,04	493,1349	331,0864	Mv-3-Glicosídeo

^a Solvente Fase móvel da análise cromatográfica (solução aquosa de ácido fórmico 5%: metanol 10% / água Milli-Q®)
Dp= delfinidina, Cy = cianidina, Pt= petunidina, Pn= peonidina e Mv=malvidina

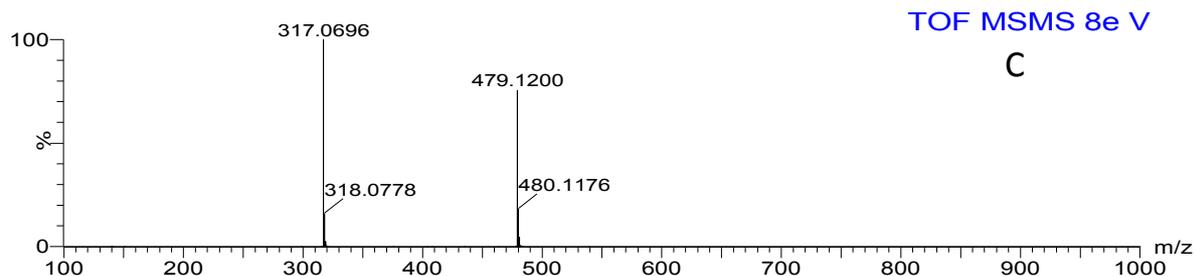
MSMS



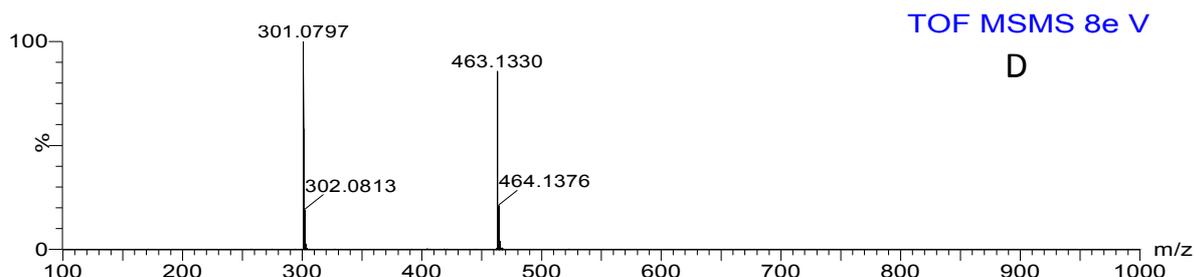
MSMS



MSMS



MSMS



MSMS

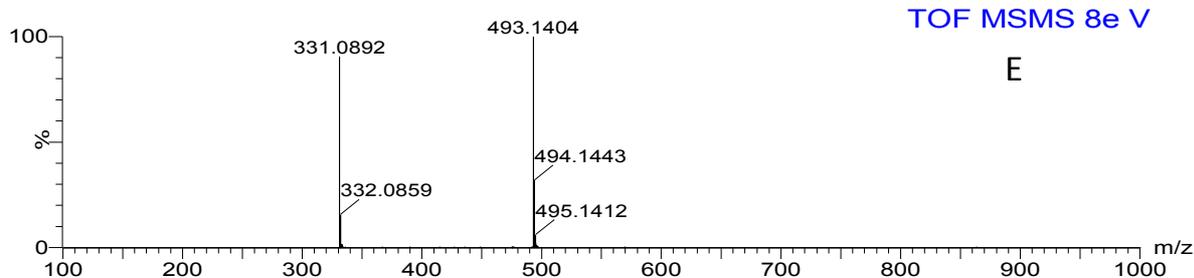


Figura 3: Espectros de massas das antocianinas isoladas da casca da uva-preta chilena (Espectro A: delphinidina-3-glicosídeo; espectro B: cianidina-3-glicosídeo; espectro C: petunidina-3-glicosídeo; espectro D: peonidina-3-glicosídeo; espectro E: malvidina-3-glicosídeo).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE L.T.; DA MOTA, R.V.; LAJOLO, F.M.; GENOVESE, M.I. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, **27**, 394-400, 2007.
- ANDRADE, R.H.S.; NASCIMENTO, L.S.; PEREIRA, G.E.; HALLWASS, F.; PAIM, A.P.S. Anthocyanic composition of Brazilian red wines and use of HPLC-UV-Vis associated to chemometrics to distinguish wines from different regions. **Microchemical Journal**, **110**, 256-262, 2013.
- BRITO, E.S.; ARAUJO, M.C.P.; ALVES, R.E.; CARKEET, C.; CLEVIDENCE, B.A.; NOVOTY, J. A. Anthocyanins Present in Selected Tropical Fruits: acerola, jambolão, jussara and guajiru. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, **55**, 9389-9394, 2007.
- CÁCERES, A.; PEÑA-NEIRA, A.; GALVEZ, A.; OBREQUE-SLIER, E.; LÓPEZ-SOLÍS, R.; CANALS, J.M. Phenolic compositions of grapes and wines from cultivar Cabernet Sauvignon produced in Chile and their relationship to commercial value. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, **60**, 8694-8702, 2012.
- CHAVARRIA, G.; SANTOS, H.P.; SÔNEGO, O.R.; MARODIN, G.A.B.; BERGAMASCHI, H.; CARDOSO, L.S. Incidência de doenças e necessidade de controle em cultivo protegido de videira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, **29**, 477-482, 2007.
- FAO. Statistical Databases. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 20 novembro de 2014.
- KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A.G.; GARCIA-PARILLA, M.C.; TRONCOSO, A.M.; FETT, R. Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, **24**, 691-693, 2004.
- MARTÍNEZ-FLÓREZ, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J.M.; TUÑÓN, M.J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutritional Hospital**, **17**, 271- 278, 2002.
- POMAR, F., NOVO, M., & MASA, A. Varietal differences among the anthocyanins profiles of 50 red table grape cultivars studied by high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, **1094**, 34-41, 2005.
- RODRIGUEZ-SAONA, L.E.; WROLSTAD, R.E. Extraction, isolation, and purification of anthocyanins. In: WROLSTAD, R. E. (Ed.) **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, New York: John Wiley & Sons, 2001. p.F1 1.1-1.11.
- RUSTIONI, L.; DI MEO, F.; GUILLAUME, M.; FAILLA, O.; TROUILLAS, P. Tuning color variation in grape anthocyanins at the molecular scale. **Food Chemistry**, **141**, 4349-4357, 2013.
- SANTIAGO, M.C.P.A.; GOUVÊA, A.C.M.S.; GODOY, R.L.O.; OIANO-NETO, J.; PACHECO, S.; ROSA, J.S. Adaptação de um método por cromatografia líquida de alta eficiência para análise de antocianinas em suco de açaí (*Euterpe oleraceae* Mart.). Rio de Janeiro: **Embrapa Agroindústria de Alimentos**, 2010 (Comunicado técnico, 162. Biblioteca: CTAA (FL CTE 0162 UMT)).
- WU, X.; PRIOR, R. L. Systematic Identification and Characterization of Anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in Common Foods in United States: Fruits and Berries. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, **53**, 2589- 2599, 2005.