



Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

**Estudo químico de antocianinas em raízes de aguapé  
(*Eichhornia crassipes*) submetidas a soluções de cádmio**

Camila Rodrigues Leite Esteves

Araraquara

2011



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

**Estudo químico de antocianinas em raízes de aguapé  
(*Eichhornia crassipes*) submetidas a soluções de cádmio**

Camila Rodrigues Leite Esteves

Orientadora: Profa. Dra. Isabele Rodrigues Nascimento

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, para obtenção do grau de Farmacêutico-Bioquímico.

Araraquara

2011

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por todas as oportunidades que tive na minha vida.

Agradeço a minha família pelo apoio, incentivo e amor.

Agradeço a Profa. Dra. Isabele Rodrigues Nascimento pela atenção, paciência e dedicação e pelos ensinamentos.

Agradeço minhas amigas e meus colegas de classe que me acompanharam durante os anos de graduação.

Agradeço a Profa. Dra. Lucia Maria Xavier Lopes, o Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro e Dr. Nivaldo Boralle pela colaboração para conclusão desse trabalho.

Agradeço o Convênio Santander – Unesp e a Reitoria pelas bolsas de iniciação científica.

# SUMÁRIO

RESUMO

LISTA DE ESQUEMAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
1.1. <i>Eichhornia crassipes</i> .....	13
1.2. Antocianinas.....	15
1.3. Análise de antocianinas em plantas.....	21
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>25</b>
<b>3. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....</b>	<b>26</b>
<b>4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>28</b>
4.1. Preparação dos extratos de <i>E. crassipes</i> .....	28
4.2. Análise por CLAE dos extratos Raiz s-Cd e Raiz c-Cd.....	29
4.3. Fracionamento do extrato Raiz s-Cd.....	30
4.4. Fracionamento do extrato Raiz c-Cd.....	31
4.5. Estudo sobre degradação de antocianinas.....	33
4.6. Estudo sobre provável complexação de antocianinas e íons Cd(II).....	33
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>34</b>
5.1. Preparação dos extratos de <i>E. crassipes</i> .....	34
5.2. Análise por CLAE-UV dos extratos Raiz s-Cd e Raiz c-Cd...34	
5.3. Fracionamento do extrato Raiz s-Cd.....	35

5.3.1. Análises por CLAE-DAD de Raiz s-Cd-4FR.....	37
5.3.2. Análises por CLAE-DAD-EM de Raiz s-Cd-4FR4.....	38
5.3.3. Análises por CLAE-DAD de Raiz s-Cd-4FR6.....	43
5.3.4. Análises por CLAE-DAD-EM de Raiz s-Cd-4FR6.....	44
5.4. Fracionamento do extrato Raiz c-Cd.....	47
5.4.1. Análises por CLAE-DAD de Raiz c-Cd-4FR6.....	49
5.4.2. Análises por CLAE-DAD de Raiz c-Cd-4FR8.....	49
5.4.3. Análises por CLAE-DAD de Raiz c-Cd-4FR10.....	51
5.5. Estudo sobre degradação de antocianinas.....	52
5.6. Estudo sobre provável complexação de antocianinas e íons Cd(II).....	53
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>55</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>57</b>

## RESUMO

A espécie *Eichhornia crassipes* (Pontederiaceae) é uma macrófita aquática conhecida popularmente como aguapé. É utilizada na descontaminação de ambientes aquáticos poluídos, pois possui alta capacidade de absorver e tolerar elevadas quantidades de íons metálicos. Segundo estudos, o cádmio é um dos metais mais absorvidos por essa espécie, que apresenta maior acúmulo em raízes em relação às partes aéreas.

O objetivo desse trabalho foi verificar se a produção de antocianinas do aguapé é alterada pela presença de íons Cd(II) nos tecidos. Foram realizados experimentos *in vivo* submetendo os espécimes à solução nutritiva contendo ou não íons cádmio. Os extratos metanólicos acidificados com HCl das raízes foram analisados por CLAE-UV e fracionados por CC (C18 e Sephadex), seguidos por CLAE semipreparativa. Após as análises por CLAE-DAD-EM foi possível propor a estrutura de duas antocianidinas: delphinidina e delphinidina substituída por um grupo metoxílico ( $C_{16}H_{13}O_8$ , 333,0609).

## LISTA DE ESQUEMAS

- Esquema 1. Fracionamento do extrato obtido do experimento Raiz s-Cd.....31
- Esquema 2. Fracionamento do extrato obtido do experimento Raiz c-Cd.....32

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Eichhornia crassipes</i> (aguapé).....	13
Figura 2. Antocianinas isoladas de flores de <i>E. crassipes</i> . .....	15
Figura 3: Estrutura geral de antocianinas. R pode ser H ou OH, e R <sup>1</sup> e R <sup>2</sup> podem ser H ou açúcares.....	16
Figura 4. Estrutura das antocianidinas mais comuns.....	17
Figura 5. Possíveis transformações estruturais das antocianinas em meio aquoso em função do pH (MARÇO; POPPI; SCARMINIO, 2008).....	18
Figura 6. Cultivo da espécie <i>E. crassipes</i> no Instituto de Química de Araraquara...28	
Figura 7. Cromatograma obtido por CLAE-UV da fração enriquecida de antocianinas do extrato Raiz s-Cd. Detecção em 520 nm.....	35
Figura 8. Cromatograma obtido por CLAE-UV da fração enriquecida de antocianinas do extrato Raiz c-Cd. Detecção em 520 nm.....	35
Figura 9. Cromatograma obtido por CLAE-UV da fração Raiz s-Cd-4FR, indicando as sub-frações coletadas em CLAE semipreparativo. Detecção em 520 nm.....	36
Figura 10. Cromatogramas obtidos por CLAE-UV das sub-frações Raiz s-Cd-4FR4 e Raiz s-Cd-4FR6. Detecção em 520nm.....	37
Figura 11. Cromatograma obtido por CLAE-DAD da subfração Raiz s-Cd-4FR4. Detecção em 520,6 nm.....	38
Figura 12. Espectros de absorção das substâncias <b>II</b> , <b>I</b> e <b>III</b> , respectivamente.....	38
Figura 13. Cromatograma obtido por CLAE-DAD-EM de Raiz s-Cd-4FR4.....	39
Figura 14. Cromatograma de íons totais de Raiz s-Cd-4FR4.....	39
Figura 15. Espectro de ES/EM/EM da substância <b>I</b> (delfinidina).....	40
Figura 16. Proposta de fragmentação da substância <b>I</b> (delfinidina).....	41

Figura 17. Espectro de ES/EM/EM da substância <b>III</b> .....	42
Figura 18. Fragmentograma da antocianidina <b>II</b> .....	43
Figura 19. Cromatograma obtido por CLAE-DAD da subfração Raiz s-Cd-4FR6. Detecção em 329,9 e 520,6 nm.....	44
Figura 20. Espectros de absorção das substâncias <b>I</b> , <b>IV</b> e <b>III</b> .....	44
Figura 21. Cromatograma obtido por CLAE-DAD-EM de Raiz s-Cd-4FR6.....	45
Figura 22. Cromatograma de íons totais de Raiz s-Cd-4FR6.....	45
Figura 23. Fragmentograma da antocianidina <b>I</b> presente em Raiz s-Cd4FR6.....	46
Figura 24. Fragmentograma da antocianidina <b>III</b> presente em Raiz s-Cd4FR.....	47
Figura 25. Cromatogramas obtidos por CLAE-UV da fração Raiz c-Cd-4FR em 520 e 310 nm.....	47
Figura 26. Cromatogramas obtidos por CLAE-UV das sub-frações Raiz c-Cd-4FR6, Raiz c-Cd-4FR8 e Raiz c-Cd-4FR10. Detecção em 520 nm.....	48
Figura 27. (A) Cromatograma em CLAE-DAD da sub-fração Raiz c-Cd-4FR6. Detecção em 520,6 e 329,9 nm. (B e C) Espectros de absorção das substâncias em $t_R$ 28,2 e 30,2 minutos, respectivamente.....	49
Figura 28. Cromatograma obtido por CLAE-DAD da sub-fração Raiz c-Cd-4FR8. Detecção em 520 e 329,9 nm.....	50
Figura 29. Espectros de absorção das substâncias <b>I</b> e <b>III</b> , respectivamente.....	50
Figura 30. (A) Cromatograma obtido por CLAE-DAD da sub-fração Raiz c-Cd-4FR10. Detecção em 520,6 e 310,9 nm. (B e C) Espectros de absorção das substâncias em $t_R$ 29,8 e 27,6 minutos, respectivamente.....	51
Figura 31. Cromatograma obtido por CLAE-UV da fração Raiz (2) c-Cd. Detecção em 520 nm.....	52

Figura 32. Cromatograma obtido por CLAE-UV da fração Raiz (2) s-Cd. Detecção em 520 nm.....	53
Figura 33. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD. Detecção em 520 nm. (A) Fração Raiz (2) s-Cd. (B) Fração Raiz (2) s-Cd + solução de CdCl <sub>2</sub> . (C) Fração Raiz (2) c-Cd.....	54

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Íons pseudomoleculares atribuídos às substâncias <b>I-III</b> (Raiz s-Cd-4FR4).....	40
Tabela 2. Íons pseudomoleculares atribuídos às antocianinas <b>I</b> e <b>III</b> (Raiz s-Cd-4FR6).....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Abs	Absorbância
BAW	n-butanol : ácido acético : água
C18	Octadecilsilano
CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Detector de Arranjo de Diodos
CLAE-DAD-EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Detector de Arranjo de Diodos e à Espectrometria de Massas
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
EM	Espectrometria de Massas
EtOH	Etanol
MeOH	Metanol
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
TFA	Ácido trifluoracético
$t_R$	Tempo de retenção
UV	Ultravioleta
Vis	Visível
$\lambda$	Comprimento de onda
$\lambda_{m\acute{a}x}$	Comprimento de onda de máxima absorção

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. *Eichhornia crassipes*

A espécie *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms (Pontederiaceae) é uma macrófita aquática nativa do Brasil que possui grandes raízes (Figura 1). É conhecida popularmente como aguapé-de-flor-roxa ou jacinto d'água e possui como habitat natural lagos, rios e pântanos. Possui folhas emersas, em rosetas com pecíolos inflados quando flutuante ou pecíolos delgados quando enraizada (AMARAL et al., 2008). Varia de tamanho de acordo com seu habitat apresentando de 15 a 80 cm de altura (POTT; POTT, 2000).



Figura 1. *Eichhornia crassipes* (aguapé).

Devido à beleza de suas flores essa planta é considerada ornamental e foi introduzida em todos os continentes. Em alguns países é uma invasora aquática devido ao seu rápido crescimento: duplica sua biomassa a cada duas semanas (POTT; POTT, 2000).

O aguapé ocorre naturalmente na forma de esteiras densas que obstruem a passagem de luz, afetando plantas submersas e diminuindo a quantidade de

oxigênio dissolvido. Também pode causar a obstrução de corpos hídricos, prejudicando a fauna e flora. Essas plantas podem interferir na pesca, pois provocam diminuição da população de peixes e dificultam o acesso ao local. Também causam problemas em hidrelétricas, danificando turbinas e outros equipamentos (MALIK, 2007).

Devido aos problemas ambientais que o aguapé pode causar, analisaram-se vários métodos para controlar sua disseminação, como por exemplo: remoção manual, aplicação de herbicidas e liberação de agentes de controle biológico. Cada uma dessas técnicas tem suas limitações e a escolha da técnica mais adequada depende, muitas vezes, de um local específico (MALIK, 2007).

Apesar da espécie *E. crassipes* ser considerada uma planta daninha, existem pesquisas que visam sua aplicação em diversas áreas. Devido ao seu conteúdo relativamente alto de hemicelulose e de proteína, ela pode ser utilizada como biomassa na produção de etanol. Existem estudos sobre a possibilidade dessa planta ser convertida em biogás. Além disso, analisa-se o potencial antioxidante do aguapé bem como o uso de seu caule para fabricação de cordas, cestos e papel (MALIK, 2007).

O aguapé tem capacidade de crescer em ambientes poluídos e de absorver e tolerar grandes quantidades de íons metálicos. Por esse motivo é utilizado na fitorremediação de ambientes aquáticos contaminados com nutrientes inorgânicos, poluentes orgânicos e metais (MALIK, 2007). A fitorremediação é o uso associado de sistemas vegetais e de microorganismos na descontaminação de ambientes poluídos.

Muitos estudos foram realizados para avaliar a capacidade de absorção de diferentes metais pelo aguapé. Zhu e colaboradores (1999) estudaram a habilidade

dessa planta em absorver e translocar seis elementos traços: As, Cd, Cr, Cu, Ni e Se. De acordo com os resultados, o cádmio é um dos metais que apresenta maior absorção, tendo maior acúmulo nas raízes do que nas partes aéreas.

O levantamento bibliográfico sobre as substâncias isoladas de *E. crassipes* revela a presença de esteróides (GOSWAMI et al., 1983; GRECA; MONACO; PREVITERA, 1991), poliaminas (HAMANA et al., 1994) e compostos aromáticos derivados do fenaleno e naftaleno (HÖLSCHER; SCHNEIDER, 2005; DELLAGRECA; PREVITERA; ZARRELLI, 2008, 2009; WANG, CAI; LUO, 2011) nas raízes e partes aéreas. Toki e colaboradores (1994, 2004) realizaram estudos fitoquímicos de flores dessa planta e isolaram duas antocianinas esterificadas com ácido malônico (Figura 2).

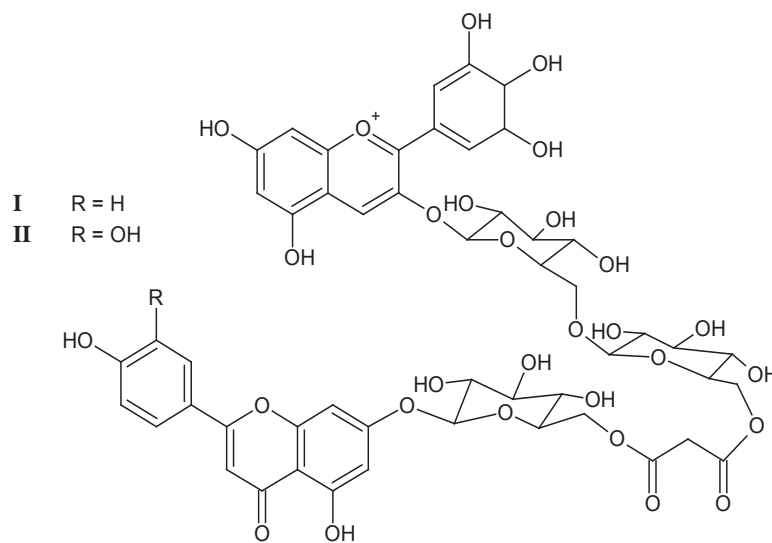


Figura 2. Antocianinas isoladas de flores de *E. crassipes*.

## 1.2. Antocianinas

Antocianinas (*anthos* em grego significa flor, e *kyanos* significa azul) são um grupo de pigmentos vegetais amplamente distribuídos na natureza, entre raízes,

flores e frutas (ARAPITSAS; SJÖBERG; TURNER, 2008; MARÇO; POPPI; SCARMINIO, 2008) e são responsáveis pelas suas cores vivas, que variam do vermelho à violeta e do azul ao preto (YOSHIDA; MORI; KONDO, 2009). Elas pertencem à classe dos flavonóides, apresentando como estrutura fundamental o cátion flavílico (2-fenilbenzopirilium) (Figura 3). Possuem intensa absorção na faixa de 520 a 560 nm (região da luz visível), atribuída ao pirano e ao anel B, e na faixa de 250 a 270 nm (região da luz UV) atribuída ao anel A (LOPES et al., 2007).

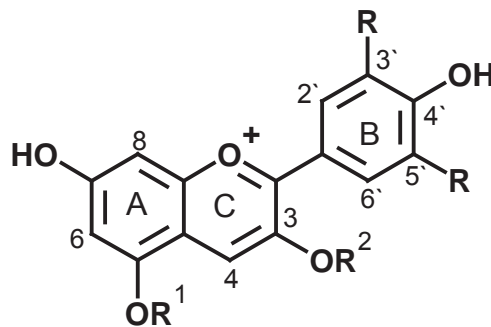
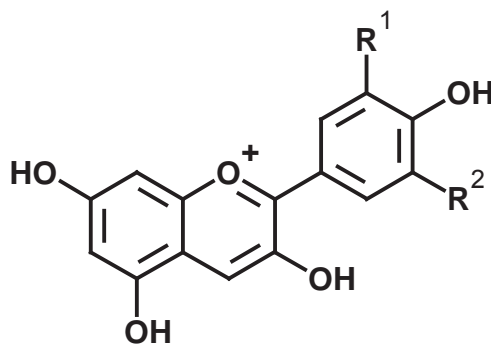


Figura 3. Estrutura geral de antocianinas. R pode ser H ou OH, e R<sup>1</sup> e R<sup>2</sup> podem ser H ou açúcares.

As antocianinas possuem moléculas de açúcares ligadas aos seus grupos hidroxílicos, diferenciando-se das antocianidinas (aglicona) que não possuem glicosilação. Esses açúcares conferem maior estabilidade e solubilidade a molécula e podem estar ligados a ácidos alifáticos ou aromáticos (MARÇO; POPPI; SCARMINIO, 2008). Como exemplo de ácidos fenólicos presentes pode-se citar: ácido p-cumárico, caféico, ferúlico, p-hidroxibenzóico e gálico. Os ácido alifáticos mais comuns são: ácido malônico, acético, málico, succínico, oxálico e tartárico (ANDERSEN; JORDHEIM. 2006). Diferenciam as antocianinas entre si pelo número

de hidroxilas; pelo tipo, quantidade e posição dos açúcares e pelos ácidos presentes na molécula (KONG et al., 2003; MARÇO; POPPI; SCARMINIO, 2008).

A maioria das antocianinas descoberta nos últimos anos é baseada em seis antocianidinas: pelargonidina, cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina e malvidina (Figura 4). Essas substâncias podem conter duas, três ou apenas uma unidade monossacarídica, sendo que as mais frequentemente encontradas na molécula são: glicose, galactose, ramnose, arabinose, xilose e ácido glicurônico (ANDERSEN; JORDHEIM, 2006).



R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Antocianidina
H	H	Pelargonidina
OH	H	Cianidina
OCH <sub>3</sub>	H	Peonidina
OH	OH	Delfinidina
OCH <sub>3</sub>	OH	Petunidina
OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	Malvidina

Figura 4. Estrutura das antocianidinas mais comuns.

A estabilidade de antocianinas é influenciada por diversos fatores como: pH, luz, oxigênio, presença de metais e copigmentação (LOPES et al., 2007). Na Figura 5 observa-se as mudanças estruturais das antocianinas em função da alteração do pH do meio (MARÇO; POPPI; SCARMINIO, 2008). Em soluções extremamente ácidas (pH 1-2), apresentam predomínio do cátion flavílico de coloração avermelhada. Com elevação do pH, ocorre ionização dessas moléculas formando



A estabilidade de antocianinas é menor em temperaturas acima de 25 °C. A presença de oxigênio pode levar a oxidação dessas substâncias mesmo na ausência de luz, por mecanismos de oxidação direta e indireta. A presença de metais aumenta a estabilidade dos pigmentos antociânicos quando expostos a calor, mudança de pH e oxigênio. Isso é devido à formação de produtos insolúveis com cátions de ferro e, principalmente, de alumínio (LOPES et al., 2007).

A copigmentação é uma associação molecular entre pigmentos e outras moléculas (geralmente incolores) em solução. Pode ocorrer entre antocianinas (intramolecular) e entre antocianinas e outros compostos (intermolecular) como aminoácidos, ácidos orgânicos, flavonóides, derivados de flavonol, subgrupos de flavona, alcalóides e metais (BOULTON, 2001; LOPES et al., 2007). É responsável pelo aumento na intensidade da coloração (efeito hiperacrômico) e por um deslocamento no comprimento máximo de absorção para um comprimento de onda menor (efeito batocrômico). Além disso, a copigmentação devido à presença de flavonóides não antociânicos protege as antocianinas contra a degradação (LOPES et al., 2007). Isso também ocorre na presença de ácidos fenólicos (MARÇO; POPPI; SCARMINIO, 2008).

A complexação entre antocianinas e metais ocorre devido à formação de um arranjo orto-dihidroxil no anel B, de modo que cianidina, delphinidina e petunidina podem formar esses complexos e pelargonidina, peonidina e malvidina não podem formar, pois não possuem hidroxilas no anel B (Figura 4) (BOULTON, 2001).

Metaloantocianina é um pigmento supramolecular formado por um complexo que contém quantidades estequiométricas de antocianinas, flavonas e íons metálicos, em proporções fixas de 6:6:2, respectivamente. Como exemplo desse composto pode-se citar a comelinina, um pigmento azul isolado de pétalas de

*Commelina communis*. Existem estudos que associam a cor azul desenvolvida nas flores com a presença de metaloantocianinas (YOSHIDA; MORI; KONDO, 2009).

As antocianinas são encontradas em tecidos vegetais, dissolvidas no fluido das células cujo pH é levemente ácido (MARÇO; POPPI; SCARMINIO, 2008). Elas desempenham muitas atividades nas plantas. Devido a sua coloração viva, atraem agentes polinizadores e dispersores de sementes, como insetos e pássaros, sendo importantes para a reprodução. São agentes antioxidantes, atuam na proteção à luz, nos mecanismos de defesa e função biológica (LOPES et al., 2007).

As antocianinas podem ser utilizadas na área da saúde, devido à sua atividade antioxidante. São utilizadas também como indicadores de pH e aplicadas na indústria, para fabricação de vinhos e como corantes alimentícios. Entretanto, o seu uso é limitado, pois o poder corante dessas substâncias é reduzido quando comparado aos produtos sintéticos por apresentarem baixa estabilidade. Além disso, as dificuldades existentes nos processos de extração, purificação, separação e identificação limitam o uso dessas substâncias (MARÇO; POPPI; SCARMINIO, 2008).

Devido à atividade antioxidante apresentada pelas antocianinas, existem estudos sobre o uso dessas substâncias para prevenir várias doenças que são associadas ao estresse oxidativo. O consumo regular de antocianinas e outros polifenóis em frutas, verduras, vinhos, compotas e conservas está associado a provável redução dos riscos de doenças crônicas, como por exemplo doenças cardiovasculares e doença de Alzheimer (ANDERSEN; JORDHEIM, 2006).

### 1.3. Análise de antocianinas em plantas

Os pigmentos antociânicos são solúveis em solventes polares e são normalmente extraídos à frio utilizando-se metanol acidificado com pequenas quantidades de ácido clorídrico, ácido fórmico ou ácido trifluoroacético (KONG et al., 2003; ANDERSEN; JORDHEIM, 2006). Com a utilização dos ácidos ocorre diminuição do pH da solução, que é necessária para prevenir a degradação de pigmentos antociânicos não acilados. Entretanto a degradação desses compostos acaba sendo inevitável devido a concentração desses ácidos durante a evaporação do solvente. Pequenas quantidades de ácidos também podem causar hidrólise parcial ou total dos grupos acílicos de antocianinas aciladas (KONG et al., 2003).

A presença de antocianinas em extratos vegetais pode ser confirmada por meio de cromatografia em papel e pela utilização da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando coluna de fase reversa (C-18), observando-se principalmente na região de absorção em 520 nm, região esta característica desse tipo de substâncias (MARÇO; POPPI; SCARMINIO, 2008).

Para purificação dos extratos brutos de antocianinas, um dos métodos mais utilizado é a extração em fase sólida utilizando cartuchos de C-18 e Sephadex. O processo envolve a aplicação do extrato no cartucho, seguido da eluição dos componentes em solventes adequados. As antocianinas têm maior interação com a fase estacionária devido as suas hidroxilas não-substituídas; assim as impurezas como os açúcares e os ácidos orgânicos serão eluídos primeiramente com a água. Em seguida, metanol é utilizado para remover as antocianinas da fase estacionária por ter maior interação com essas substâncias (MARÇO; POPPI; SCARMINIO, 2008).

A técnica mais utilizada para separar as antocianinas presentes em extratos vegetais é a CLAE com fase reversa que possibilita a separação, identificação e quantificação dos pigmentos antociânicos (MARÇO; POPPI; SCARMINIO, 2008). Entretanto a pouca solubilidade dessas substâncias nos solventes mais utilizados na cromatografia pode ocasionar uma precipitação no começo da coluna, provocando má resolução, diminuição da vazão da fase móvel, ou até mesmo bloqueio da coluna. Além disso, essas substâncias assim como outros flavonóides tornam-se menos solúveis como produtos de sua purificação, o que dificulta as etapas seguintes na análise desses compostos. Na separação de antocianinas e frações ricas em antocianinas é aconselhável evitar o uso de ácido fórmico para impedir a formação de éster e evitar também acetonitrila que é um solvente de difícil evaporação (ANDERSEN; JORDHEIM, 2006).

Como existem várias formas estruturais de antocianinas em solução em função do pH e da temperatura (Figura 5), as análises em CLAE devem ser realizadas controlando o pH da fase móvel e a temperatura da coluna. O equilíbrio das antocianinas deve ser deslocado em direção ao cátion flavílio para obter bandas cromatográficas com melhor resolução. Os cátions flavílicos são coloridos e possuem absorção em 520 nm (região visível), sendo possível detectá-los seletivamente, evitando a interferência de outros fenólicos e flavonóides (ANDERSEN; JORDHEIM, 2006).

As antocianinas apresentam estruturas complexas e ocorrem em misturas dificultando o processo de isolamento. Melhorias contínuas nos métodos de análise e instrumentação, como, por exemplo, CLAE, Espectrometria de Massas (EM) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN), facilitaram os processos de separação e

elucidação estrutural de pigmentos antociânicos, sendo possível utilizar pequenas quantidades de material e obter ótima precisão (ANDERSEN; JORDHEIM, 2006).

O cromatógrafo líquido acoplado a detector DAD (Detecção de Arranjo de Diodos) é utilizado para a detecção de flavonóides em misturas, sendo empregado em análises quantitativas, e tem importante aplicação no estudo de antocianinas. Este tipo de detector permite a gravação simultânea de cromatogramas em comprimentos de onda diferentes (ANDERSEN; JORDHEIM, 2006).

Os dados espectrais de UV-Vis dão informações importantes sobre a natureza das agliconas e grupos acílicos. Antocianinas com unidades de açúcar no anel B ligadas nas posições 3'-, 4'- ou 5'- têm seu comprimento de onda de máxima absorção ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) na região do visível com valores menores (4-14 nm) do que o  $\lambda_{\text{máx}}$  dos 3-glicosídeos. A presença de acilação com ácido cinâmico pode ser deduzida pelo aparecimento de um pico ou ombro na região de 310-330 nm, enquanto que esse pico não é observado no caso de acilação com ácido benzóico, que têm a sua máxima absorção entre 270-290 nm (ANDERSEN, JORDHEIM, 2006). Os espectros de antocianinas aciladas com ácido p-cumárico apresentam duas bandas no ultravioleta em 289 e 310 nm devido a sobreposição da absorção do ácido cinâmico sobre a absorção da antocianina (HARBONE, 1957).

Com a utilização da EM é possível conhecer a fórmula molecular exata de uma antocianina sem a necessidade de grandes quantidades de amostra. Essa técnica consiste na geração de íons pela fragmentação das moléculas de interesse, e a detecção dos fragmentos é feita de acordo com a sua massa. Para a análise de antocianinas, geralmente emprega-se spray de elétrons (*Electrospray Ionization, ESI*), em que as amostras devem ser introduzidas na forma de solução. Isso permite

o acoplamento com muitas técnicas de separação, como por exemplo, a CLAE. Fontes de bombardeamento rápido de átomos (*Fast Atom Bombardment, FAB*) também podem ser utilizadas para gerar os fragmentos moleculares (MARÇO; POPPI; SCARMINIO, 2008).

A espectroscopia de RMN pode disponibilizar informações para a determinação da estrutura de um composto orgânico, mas sua utilização é limitada para misturas (MARÇO; POPPI; SCARMINIO, 2008). Para análise de antocianinas os solventes mais utilizados são hexadeuterodimetilsulfóxido (DMSO-d<sub>6</sub>) ou tetradeuterometanol (CD<sub>3</sub>OD) adicionados ao ácido deuterotrifluoroacético (CF<sub>3</sub>COOD) em várias proporções (2 a 20%) para assegurar a conversão para o cátion flavílico. Os espectros obtidos para antocianinas apresentam uma baixa resolução devido à carga dessas substâncias, limitando o uso de RMN para identificação de pigmentos antociânicos (ANDERSEN; JORDHEIM, 2006).

A combinação de técnicas como CLAE, RMN e EM pode trazer informações suficientes para a completa elucidação estrutural de uma antocianina. (MARÇO; POPPI; SCARMINIO, 2008).

## 2. OBJETIVOS

Considerando a capacidade de absorção e acúmulo de cádmio pelas raízes do aguapé e a possibilidade de complexação de antocianinas e metais, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de antocianinas por *E. crassipes* em função da concentração de Cd(II) em solução nutritiva, utilizando técnicas cromatográficas, o isolamento e a identificação dessas substâncias.

### 3. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Os materiais e equipamentos utilizados foram:

- Evaporador rotatório Buchi (R-114), equipado com bomba de vácuo (B-169) e banho ultratermostático Quimis Q214M;
- Balança analítica Denver Instrument APX-200;
- Banho ultrassônico Unique USC750;
- Cromatógrafos Líquidos de Alta Eficiência para uso em escala analítica:
  - Equipamento 1 – CLAE-UV: Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Shimadzu (controlador SPD-10 Avp, bomba LC-10 AD, detector SPD-10AV), equipado com coluna Varian C18 (5  $\mu$ m, 250  $\times$  4.6 mm);
  - Equipamento 2 – CLAE-DAD: Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Varian (bomba Projetar, amostrador automático, modelo 410, detector de arranjo de diodo modelo Prostar), equipado com coluna Gemini C18 (5  $\mu$ m, 250 x 4, 60 mm);
  - Equipamento 3 – CLAE-DAD-EM: Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Shimadzu CBM-20 com detector de arranjo de diodo (Shimadzu SPD-M20A), bombas de alta pressão (Shimadzu LC-20AD) desgaseificador (Shimadzu DGU-20A-5) e bomba de infusão Cole Parmer, equipado com coluna Varian C18 (5  $\mu$ m, 250  $\times$  4.6 mm), acoplado ao Espectrômetro de Massas de Alta Resolução ultrOToF (Bruker Daltonic), com ionização por spray de elétrons (ESI), analisador tipo QqToF (analisados do tipo quádruplo, tempo de voo em

sequência), fluxo de  $300 \mu\text{L h}^{-1}$  e modo de ionização positivo. Como gás nebulizador foi utilizado nitrogênio, 4 bar e fluxo de  $8 \text{ L min}^{-1}$ ;

- Equipamento 4 – CLAE-DAD: Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Jasco (controlador LC-Net II/ADC, bomba PU-2086 Plus, detector MD-2018 Plus), equipado com coluna Gemini C18 ( $5 \mu\text{m}$ ,  $250 \times 4$ ,  $60 \text{ mm}$ );
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência para uso em escala semipreparativa:
  - Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Shimadzu (controlador SCL-10, bomba LC-6 AD, detector SPD-10 Avp), equipado com coluna Zorbax C-18 ( $5 \mu\text{m}$ ,  $19,4 \times 250\text{mm}$ );
- Cartuchos SPE C-18 (Strata,  $500 \text{ mg}/3 \text{ mL}$ );
- Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC): Fase estacionária: sílica gel 60 G; fase móvel: *n*-BuOH:HOAc:H<sub>2</sub>O 4:1:5 (BAW). As revelações foram efetuadas com radiações UV em 254 nm e 365 nm e/ou em cubas com vapores de iodo;
- Cromatografia em Coluna (CC): C18 230-400 mesh (Merck) e Sephadex LH-20, partículas 25-100  $\mu\text{m}$  (Sigma).
- Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear: Varian INOVA-500 (11,7 T), operando a 500 MHz para o núcleo de hidrogênio;
- Solventes utilizados foram MeOH marca J. J. Baker grau de pureza HPLC; HCl marca Qhemis; ácido trifluoracético (TFA) marca Tedia grau de pureza HPLC; a água foi deionizada em aparelho Milli-Q. Solventes deuterados: CDCl<sub>3</sub> da Sigma-Aldrick™ com pureza  $\geq 99,8\%$  para D e CF<sub>3</sub>COOD da Sigma-Aldrick™.

## 4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

### 4.1. Preparação dos extratos de *E. crassipes*

A espécie *E. crassipes* foi coletada no Clube Náutico de Araraquara em novembro de 2008. O material vegetal foi lavado em água corrente e mantido em caixas d'água no Instituto de Química de Araraquara – Unesp (Figura 6).



Figura 6. Cultivo da espécie *E. crassipes* no Instituto de Química de Araraquara.

Seis espécimes foram mantidos em cilindros contendo solução nutritiva ( $\text{NaNO}_2$ , 1,7 mM;  $\text{CaCl}_2$ , 170  $\mu\text{M}$ ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 180  $\mu\text{M}$ ;  $\text{MgSO}_4$ , 200  $\mu\text{M}$ ;  $\text{KCl}$ , 340  $\mu\text{M}$ ;  $\text{FeSO}_4$ , 5  $\mu\text{M}$ ;  $\text{MnSO}_4$ , 10  $\mu\text{M}$ ). Em três desses cilindros foram adicionados 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$ . Após um período de 46 horas, as plantas foram retiradas da solução e a parte aérea foi separada das raízes. Nitrogênio líquido foi utilizado para secagem das raízes, que depois foram submetidas ao processo de maceração com MeOH acidificado com 0,1% de HCl (pH 2-3) durante 24 horas. Em seguida, realizou-se filtração sob pressão reduzida, obtendo-se a solução extrativa.

As soluções foram concentradas a uma temperatura de 30 °C em evaporador rotativo acoplado a bomba de vácuo e em banho termostaticado. Foram realizadas 7 extrações sucessivas do material vegetal, obtendo-se no final 6,177 g de extrato bruto do experimento sem cádmio (Raiz s-Cd) e 8,1851 g do experimento com cádmio (Raiz c-Cd).

#### **4.2. Análise por CLAE dos extratos Raiz s-Cd e Raiz c-Cd**

Alíquotas de aproximadamente 15 mg dos extratos Raiz s-Cd e Raiz c-Cd foram submetidas a *clean up* utilizando cartuchos C18 ativados em MeOH com 0,1% HCl (pH 2-3) e depois em H<sub>2</sub>O com 0,1% de HCl (pH 2-3). Após ser aplicada no cartucho, a amostra foi eluída em H<sub>2</sub>O com 0,1% de HCl (pH 2-3), obtendo-se uma fração rica em açúcares e ácidos orgânicos fenólicos e, em seguida, eluída em MeOH com 0,1% HCl (pH 2-3) obtendo-se a fração rica em antocianinas.

As frações enriquecidas de antocianinas obtidas dos extratos Raiz s-Cd e Raiz c-Cd foram analisadas por CLAE-UV (Equipamento 1) utilizando vazão de 1,0 mL/ min e observando-se a 254, 310, 520 e 546 nm. Empregou-se método gradiente (0,01-10 min: 100% A; 10-25 min: 100 → 0% A; 25-35 min: 0% A; 35-40 min: 0 → 100% A; 40-45 min: 100% A), utilizando solvente A: MeOH:H<sub>2</sub>O 1:1 com 0,1% HCl (pH 2-3) e solvente B: MeOH com 0,1% HCl (pH 2-3) como fase móvel e coluna de fase reversa C18 como fase estacionária. As amostras analisadas foram previamente filtradas em filtros de membrana de 0,45 µm e o volume de injeção foi de 10 µL.

### 4.3. Fracionamento do extrato Raiz s-Cd

O extrato bruto obtido do experimento sem Cd(II) foi submetido à cromatografia em coluna (CC) para separação das antocianinas. Uma alíquota do extrato (0,9892 g) foi parcialmente solubilizada em H<sub>2</sub>O:MeOH 4:1 com 0,1% HCl (pH 2-3) e submetida a CC de fase reversa C18 (17,0 x 2,8 cm) utilizando gradiente de H<sub>2</sub>O com 0,1% HCl (pH 2-3) e MeOH com 0,1% HCl (pH 2-3) como fase móvel. Foram obtidas 5 frações que foram concentradas em rotaevaporador (Esquema 1).

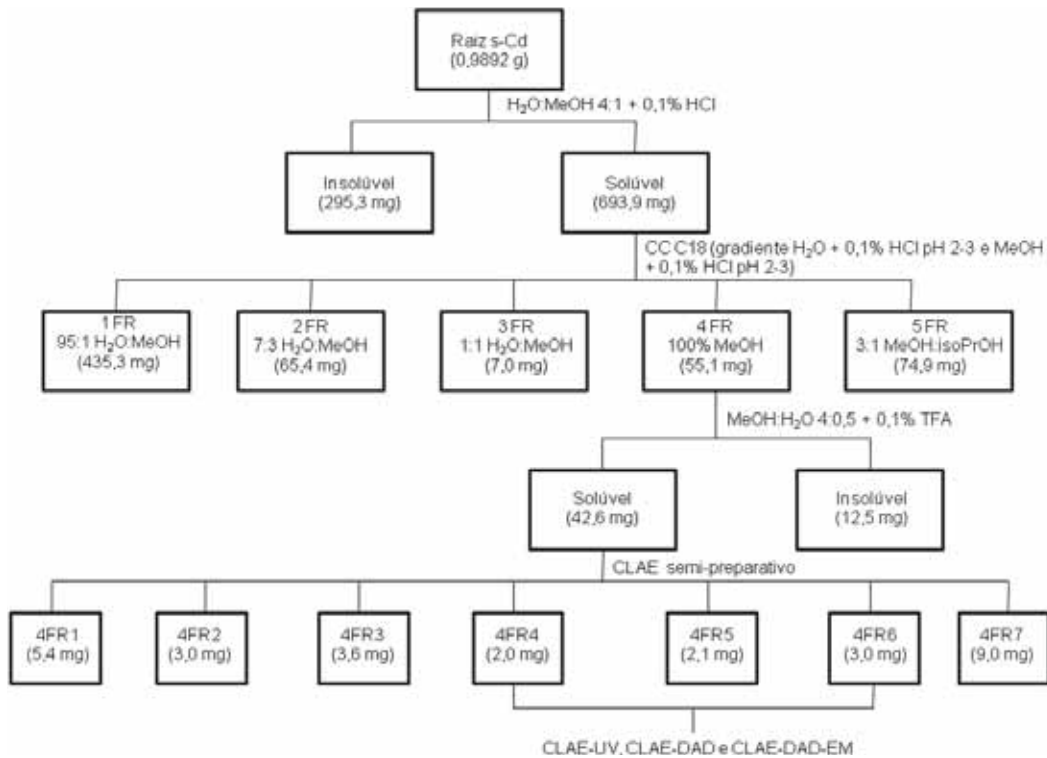
A fração Raiz s-Cd-4FR, por apresentar cor roxa característica de antocianinas, foi analisada em CLAE-UV nas mesmas condições apresentadas anteriormente no item 4.2. Esta mesma fração foi submetida à separação em CLAE em escala semipreparativa (MeOH:H<sub>2</sub>O 3:2 com 0,1% TFA, pH 2-3), obtendo-se 7 frações (Esquema 1).

As sub-frações de interesse Raiz s-Cd-4FR4 e Raiz s-Cd-4FR6 foram solubilizadas em MeOH com 0,1% TFA pH 3, filtradas em filtros de membrana de 0,45 mm e analisadas em CLAE-UV (Equipamento 1: MeOH:H<sub>2</sub>O 55:45 com 0,1% TFA pH 2-3; vazão de 1,0 mL/ min), em CLAE-DAD (Equipamento 2: método gradiente 0-40 min: 5 → 100% B, 40-50 min: 100% B; 51-60 min: 100 → 5% B; solvente A: H<sub>2</sub>O com 0,1% TFA pH 2-3 e solvente B: MeOH com 0,1% TFA pH 2-3; vazão de 1 mL/min) e em CLAE-DAD-EM (Equipamento 3: método gradiente 0-40 min: 5 a 100% B; 40-50 min: 100% B; 50-55 min: 100 a 5% B; solvente A: H<sub>2</sub>O com 0,1% TFA pH 2-3 e solvente B: MeOH com 0,1% TFA pH 2-3; vazão de 1 mL/min).

As análises em CLAE-UV, CLAE-DAD e CLAE em escala semipreparativa ocorreram no Instituto de Química de Araraquara – Unesp e em CLAE-DAD-EM

ocorreram na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP (FCFRP-USP).

Esquema1. Fracionamento do extrato obtido do experimento Raiz s-Cd.

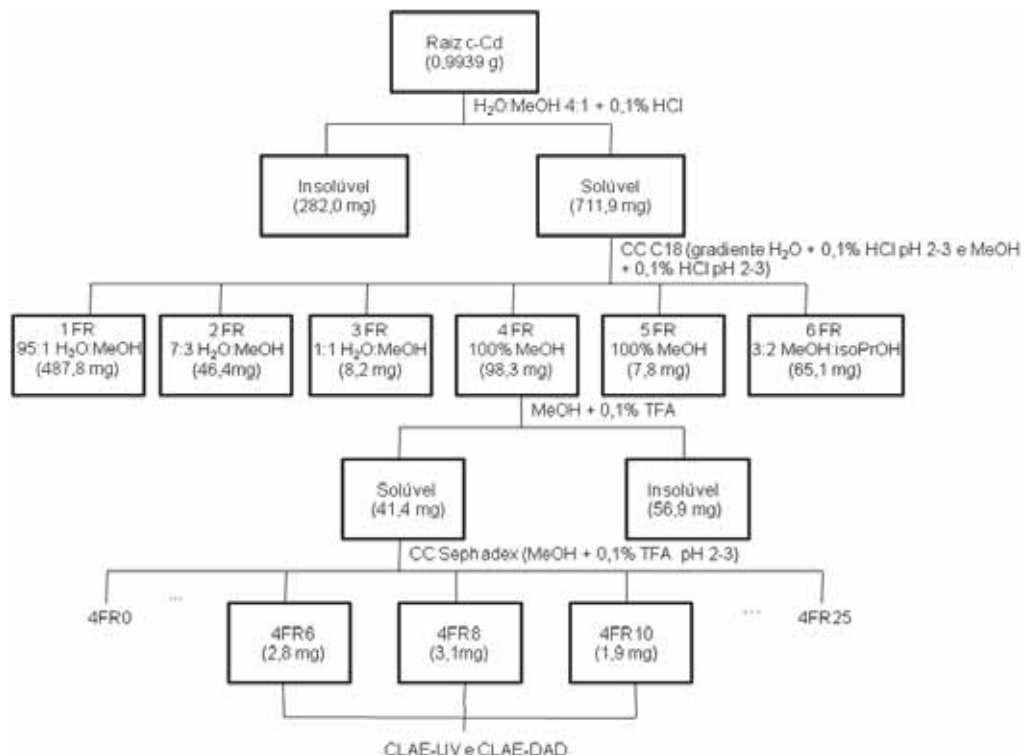


#### 4.4. Fracionamento do extrato Raiz c-Cd

O extrato bruto obtido do experimento com Cd(II) foi submetido à cromatografia em coluna (CC) para separação das antocianinas. Uma alíquota do extrato (0,9939 g) foi parcialmente solubilizada em 4:1 H<sub>2</sub>O:MeOH com 0,1% HCl (pH 2-3) e submetida a CC de fase reversa C18 (16,4 x 2,8 cm) utilizando gradiente de H<sub>2</sub>O com 0,1% HCl (pH 2-3) e MeOH com 0,1% HCl (pH 2-3) como fase móvel. Foram obtidas 6 frações que foram concentradas em rotaevaporador (Esquema 2).

A fração Raiz c-Cd-4FR, por apresentar cor roxa característica de antocianinas, foi analisada em CLAE-UV nas mesmas condições apresentadas anteriormente no item 4.2. A fração Raiz c-Cd-4FR foi submetida à CC utilizando com fase estacionária Sephadex LH-20 (29 x 1,5 cm) utilizando MeOH com 0,1% TFA (pH 2-3) como fase móvel, obtendo-se 25 sub-frações de aproximadamente 5 mL. Essas sub-frações foram analisadas em CCDC (sílica gel) em nBuOH:HOAc:H<sub>2</sub>O (BAW) 4:1:5 e reveladas por irradiação de luz UV e vapores de iodo. As sub-frações de interesse Raiz c-Cd-4FR6, Raiz c-Cd-4FR8 e Raiz c-Cd-4FR10 foram analisadas em CLAE-UV e em CLAE-DAD nas mesmas condições descritas no item 4.3.

Esquema 2. Fracionamento do extrato obtido do experimento Raiz c-Cd.



#### **4.5. Estudo sobre degradação de antocianinas**

Os extratos Raiz s-Cd e Raiz c-Cd foram armazenados em geladeira por aproximadamente um ano. Para verificar se ocorreu degradação de antocianinas nos extratos brutos, realizou-se novamente o processo de *clean up* utilizando cartuchos C18. Foram utilizadas alíquotas de aproximadamente 25 mg de cada extrato e seguiu-se procedimento descrito no item 4.2. As frações enriquecidas em antocianinas Raiz (2) s-Cd e Raiz (2) c-Cd foram analisadas em CLAE-UV (Equipamento 1) nas mesmas condições descritas no item 4.2.

#### **4.6. Estudo sobre provável complexação de antocianinas e íons Cd(II)**

Considerando a proporção 6:6:2 de antocianinas:flavonas:íons metálicos em metaloantocianinas (YOSHIDA; MORI; KONDO, 2009), adicionou-se 0,1 mg/mL de solução de  $\text{CdCl}_2$  à fração enriquecida de antocianinas Raiz (2) s-Cd obtida no item 4.5 e analisou essa fração em CLAE-DAD (Equipamento 4) seguindo as condições do item 4.3.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1. Preparação dos extratos de *E. crassipes*

A solução extrativa de MeOH com 0,1% HCl apresentou cor roxa quando em contato com as raízes de *E. crassipes*, cultivadas em solução nutritiva com e sem íons Cd(II). Essa coloração indicou que antocianinas poderiam estar presentes, já que foi utilizada uma metodologia própria para extração desses metabólitos.

### 5.2. Análise por CLAE-UV dos extratos Raiz s-Cd e Raiz c-Cd

Após o processo de *clean up* realizado nos extratos Raiz s-Cd e Raiz c-Cd, obtiveram-se duas frações para cada extrato. As primeiras contendo açúcares e ácidos orgânicos fenólicos e as segundas, as antocianinas.

A presença de antocianinas nas frações enriquecidas foi confirmada por meio da análise em CLAE-UV, onde foram observados sinais em 520 nm, uma região característica de absorção dessa classe de substâncias (Figuras 7 e 8). Nesse comprimento de onda, observa-se a presença de principalmente três derivados de antocianinas. O derivado com  $t_R \sim 21$  min parece ser comum aos dois experimentos, enquanto que os derivados em  $t_R$  17,5 min e 6,1 min foram observados nos extratos dos experimentos sem e com Cd(II), respectivamente. Os diferentes tempos de retenção desses dois últimos derivados podem ser devido a antocianinas de natureza diferente ou complexadas com o metal.

A análise desses cromatogramas sugere que há alteração na produção de derivados de antocianinas por *E. crassipes* quando a espécie se desenvolve na presença de íons Cd(II).

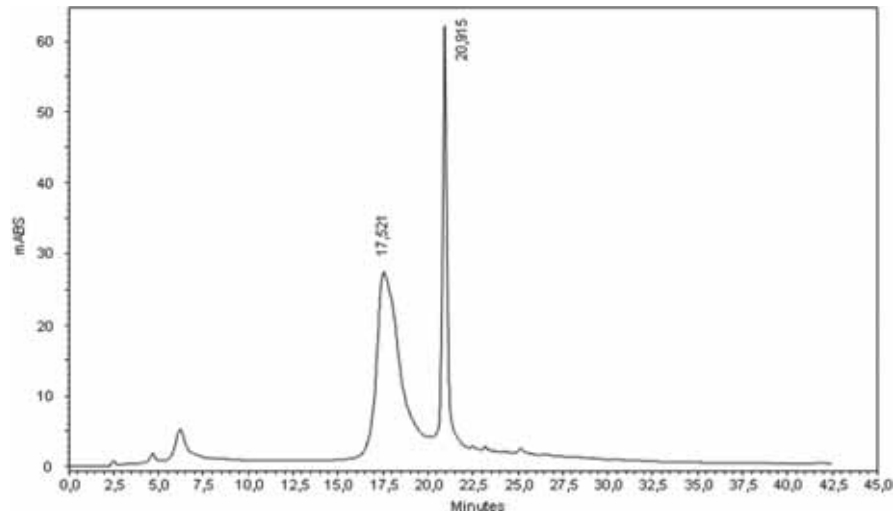


Figura 7. Cromatograma obtido por CLAE-UV da fração enriquecida de antocianinas do extrato Raiz s-Cd. Detecção em 520 nm.

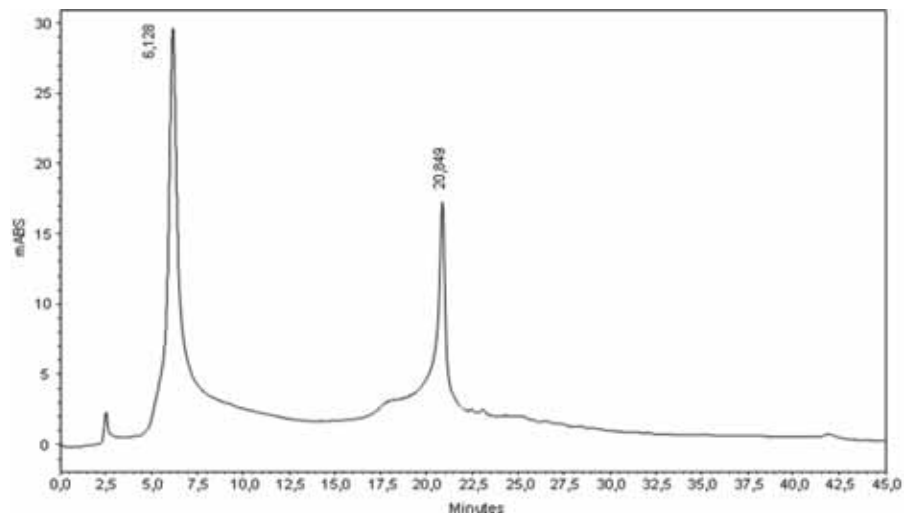


Figura 8. Cromatograma obtido por CLAE-UV da fração enriquecida de antocianinas do extrato Raiz c-Cd. Detecção em 520 nm.

### 5.3. Fracionamento do extrato Raiz s-Cd

A fração Raiz s-Cd-4FR, rica em antocianinas, foi analisada em CLAE-UV (Equipamento 1) em 254, 310, 520 e 546 nm. É possível observar no cromatograma

duas substâncias principais em  $t_R \sim 17$  min e  $t_R \sim 21$  min (Figura 9), confirmando a reprodutibilidade da CC de fase reversa C18 para o isolamento das antocianinas, em comparação com o processo de *clean up* realizado em cartuchos C18 do extrato Raiz s-Cd (Figura 7).

Com o objetivo de se isolar essas duas substâncias principais, a fração Raiz s-Cd-4FR foi submetida à CLAE semipreparativa, sendo coletadas as bandas cromatográficas de interesse referentes às sub-frações Raiz s-Cd-4FR4 e Raiz s-Cd-4FR6 (Figura 9). Essas sub-frações foram analisadas em CLAE-UV e CLAE-DAD (condições descritas nos itens 4.2 e 4.3, respectivamente).

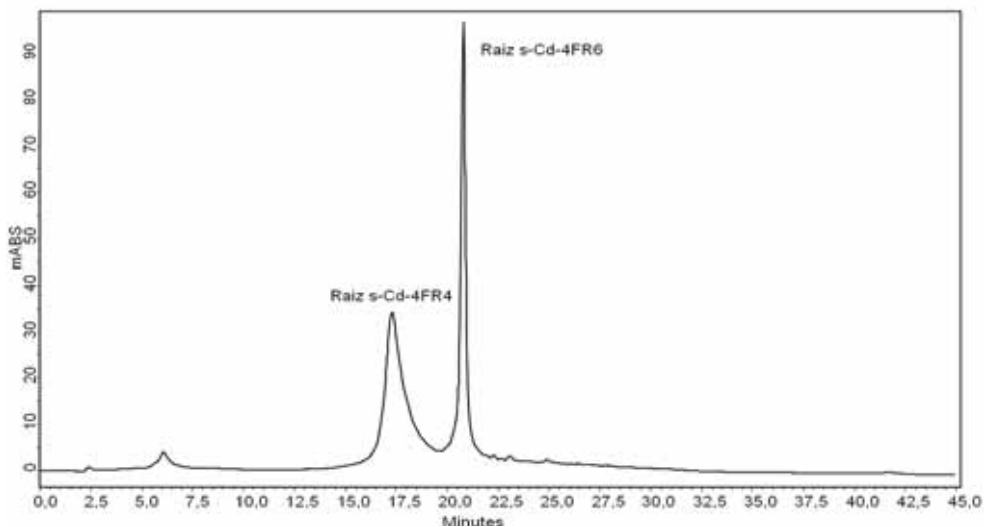


Figura 9. Cromatograma obtido por CLAE-UV da fração Raiz s-Cd-4FR, indicando as sub-frações coletadas em CLAE semipreparativo. Detecção em 520 nm.

Comparando o cromatograma da sub-fração Raiz s-Cd-4FR4 (Figura 10) com o da fração de partida (Figura 9) esperava-se obter somente a substância com  $t_R \sim 9$  min (**A**). No entanto observa-se que, além da substância **A**, há a presença de **B**

(obtida na sub-fração Raiz s-Cd-4FR6) e de **C**. A substância **C**, não observada antes do fracionamento, pode ser produto de degradação da substância **A** ou de **B**.

Analisando o cromatograma obtido de CLAE-UV da sub-fração Raiz s-Cd-4FR6 (Figura 10), é possível afirmar que a amostra está praticamente pura, pois apresenta uma única banca com intensa absorção em  $t_R \sim 11$  min.

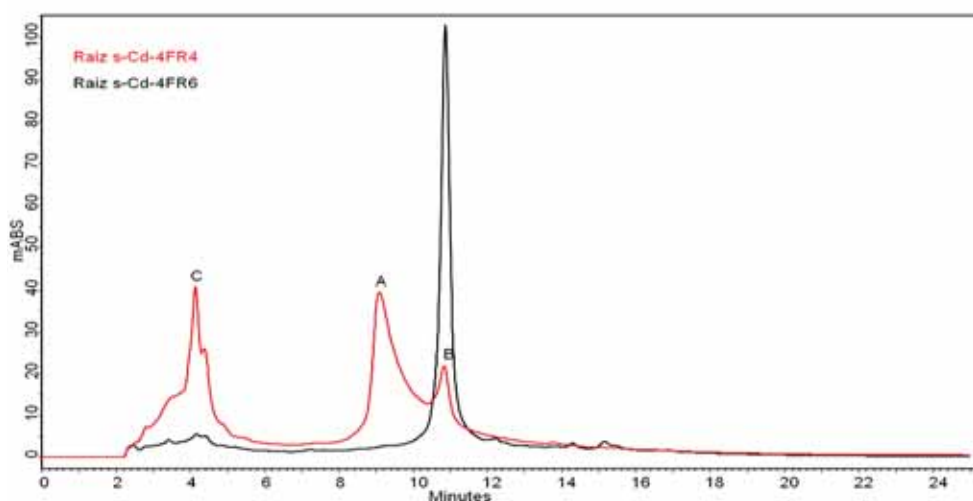


Figura 10. Cromatogramas obtidos por CLAE-UV das sub-frações Raiz s-Cd-4FR4 e Raiz s-Cd-4FR6. Detecção em 520 nm.

### 5.3.1. Análises por CLAE-DAD de Raiz s-Cd-4FR4

O cromatograma obtido por CLAE-DAD de Raiz s-Cd-4FR4 (Figura 11) indica uma mistura de substâncias com a presença de uma antocianina majoritária (**I**:  $t_R$  27,1 min) e duas minoritárias (**II**:  $t_R$  22,4 min e **III**: 29,1 min).

Os espectros de absorção dessas substâncias estão presentes na Figura 12. A substância **II** tem  $\lambda_{m\acute{a}x}$  em 560,3 nm, **I** apresenta  $\lambda_{m\acute{a}x}$  em 520,71 nm e **III** tem  $\lambda_{m\acute{a}x}$  em 543,56 nm, confirmando que essas substâncias são derivados antociânicos, pois apresentam valores característicos de absorção na faixa de 520 a 560 nm, atribuído

aos anéis B e C, e na faixa de 250 a 270 nm, atribuído ao anel A (LOPES et al., 2007).

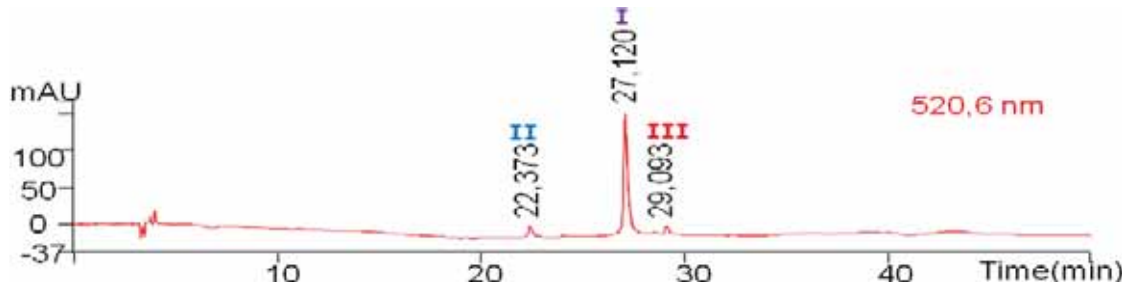


Figura 11. Cromatograma obtido por CLAE-DAD da subfração Raiz s-Cd-4FR4.

Detecção em 520,6 nm.

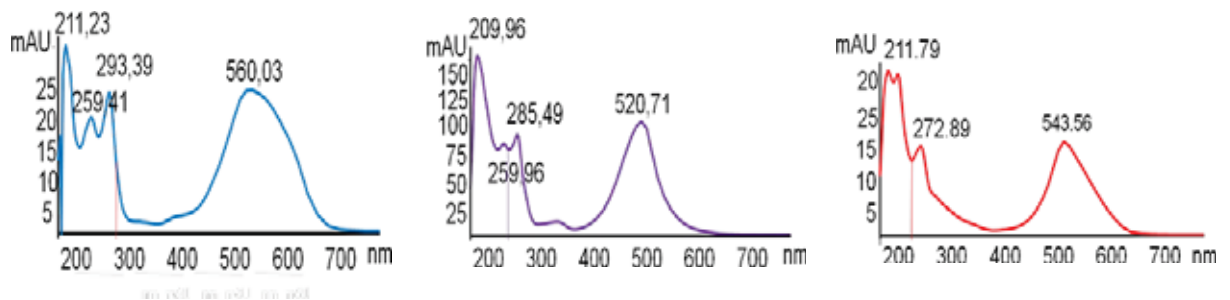


Figura 12. Espectros de absorção das substâncias II, I e III, respectivamente.

### 5.3.2. Análises por CLAE-DAD-EM de Raiz s-Cd-4FR4

A amostra Raiz s-Cd-4FR4 foi obtida em pequena quantidade (2,0 mg) e se apresentou com uma mistura de antocianinas. Isso indica que o processo de separação e isolamento utilizando CLAE semipreparativa não foi eficaz. Devido a esses fatores, a análise por CLAE-DAD-EM foi a opção encontrada para identificar as antocianinas presentes na amostra.

O cromatograma obtido na análise CLAE-DAD-EM (Figura 13), realizado na FCFRP-USP, apresentou perfil parecido com o cromatograma da análise CLAE-

DAD, realizado no IQ-Unesp (Figura 11), indicando que não houve degradação da amostra.

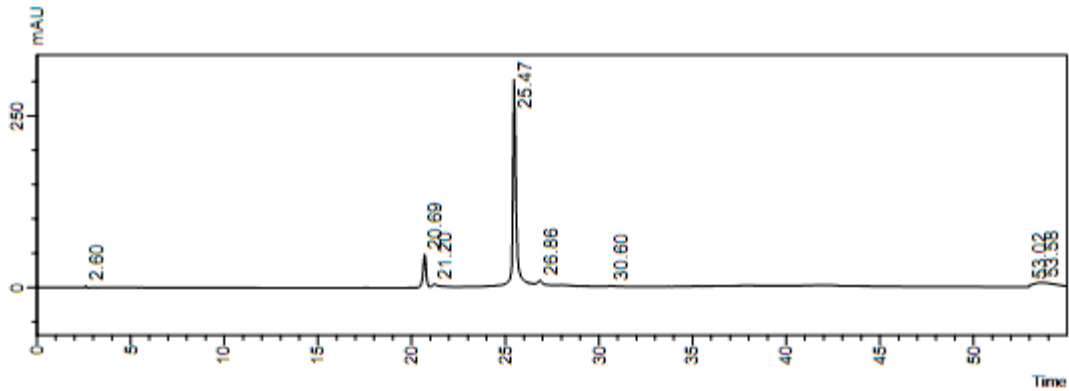


Figura 13. Cromatograma obtido por CLAE-DAD-EM de Raiz s-Cd-4FR4.

Por meio do cromatograma de íons totais da fração Raiz s-Cd-4FR4 (Figura 14), pode-se atribuir a massa dos íons pseudomoleculares das substâncias observadas, como apresentado na Tabela 1.

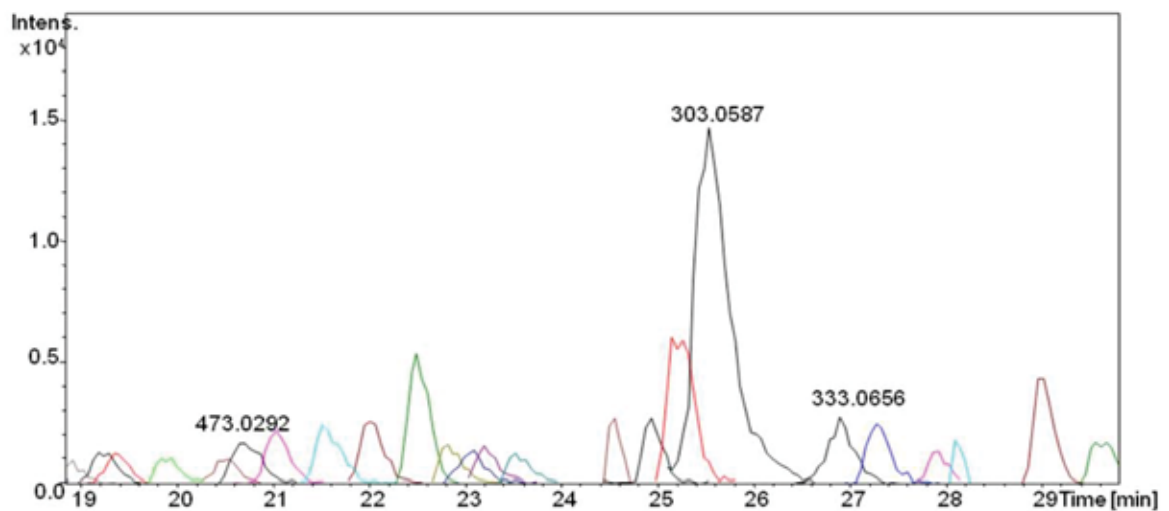
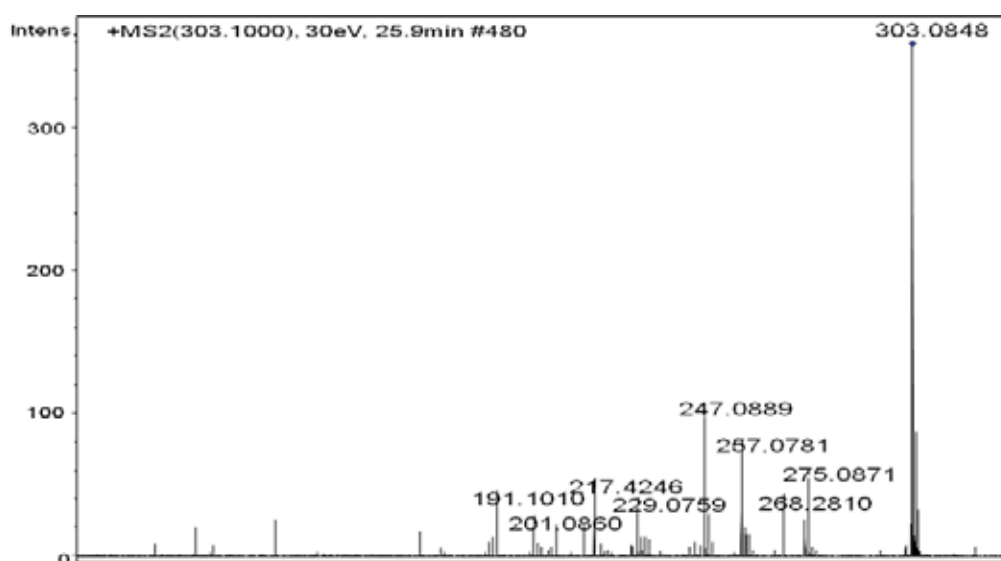


Figura 14. Cromatograma de íons totais de Raiz s-Cd-4FR4.

Tabela 1. Íons pseudomoleculares atribuídos às substâncias **I-III** (Raiz s-Cd-4FR4).

Antocianina	$t_R$ (min)	$m/z$ [M-Cl] <sup>+</sup>
<b>I</b>	25,47	303,0587
<b>II</b>	20,69	473,0292
<b>III</b>	26,86	333,0656

A massa do íon pseudomolecular de **I**,  $m/z$  303,0587, é equivalente à antocianidina delphinidina ( $C_{15}H_{11}O_7$ , 303,0504). Os principais fragmentos obtidos na análise ES/EM/EM em  $m/z$  275 e 247 (Figura 15) corroboram a estrutura proposta. Uma sugestão para as fragmentações dessa molécula está representada na Figura 16.

Figura 15. Espectro de ES/EM/EM da substância **I** (delphinidina).

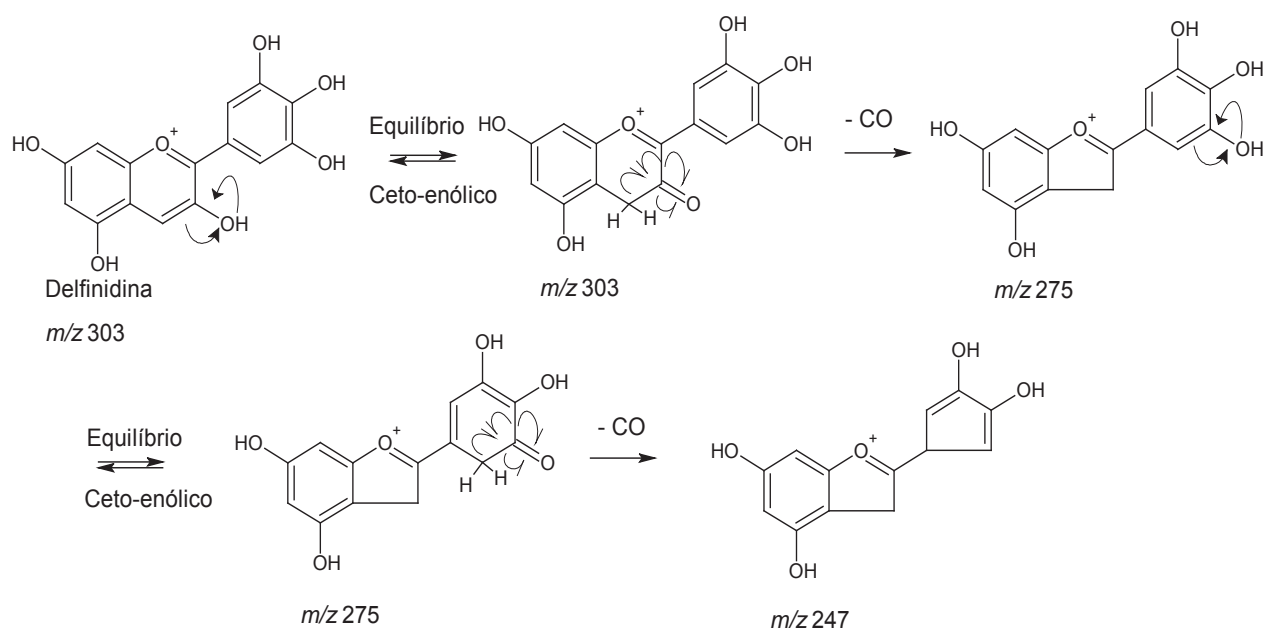


Figura 16. Proposta de fragmentação da substância I (delphinidina).

Montoro e colaboradores (2006) descrevem que o cátion flavílico é muito estável e não possui uma posição de fácil ruptura, apresentando um íon pseudomolecular intenso devido à dissociação do sal, além de pouca fragmentação, independente do equipamento utilizado na análise. Essas informações estão de acordo com o observado para a antocianidina I (Figura 15).

O espectro de ES/EM/EM da substância III (Figura 17) apresentou íon pseudo-molecular  $[M-Cl]^+$   $m/z$  333,0656. Comparando com a substância I, identificada como delphinidina ( $m/z$  303,0587), nota-se uma diferença de 30 unidades de massas entre I e III. Esse valor sugere a substituição de um dos hidrogênios aromáticos da antocianidina I por um grupo metoxílico ( $OCH_3$ ), resultando na fórmula molecular  $C_{16}H_{13}O_8$  (333,0609).

O espectro ES/EM/EM de  $m/z$  333 (Figura 17) apresentou pico-base em  $m/z$  318,0741. Essa diferença de 15 unidades de massa sugere a perda um grupo metílico ( $-\text{CH}_3$ ) e corrobora a presença da metoxila na substância **III**.

De acordo com levantamento bibliográfico realizado em bases de dados, como SciFinder, antocianidinas têm padrões de oxigenação nas posições 3, 4, 5, 6, 7, 8, 3', 4' e 5'. Devido às várias possibilidades de antocianidinas metoxiladas de fórmula molecular  $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{O}_8$  e aos poucos fragmentos obtidos no experimento ES/EM/EM, não foi possível propor a estrutura da substância **III**.

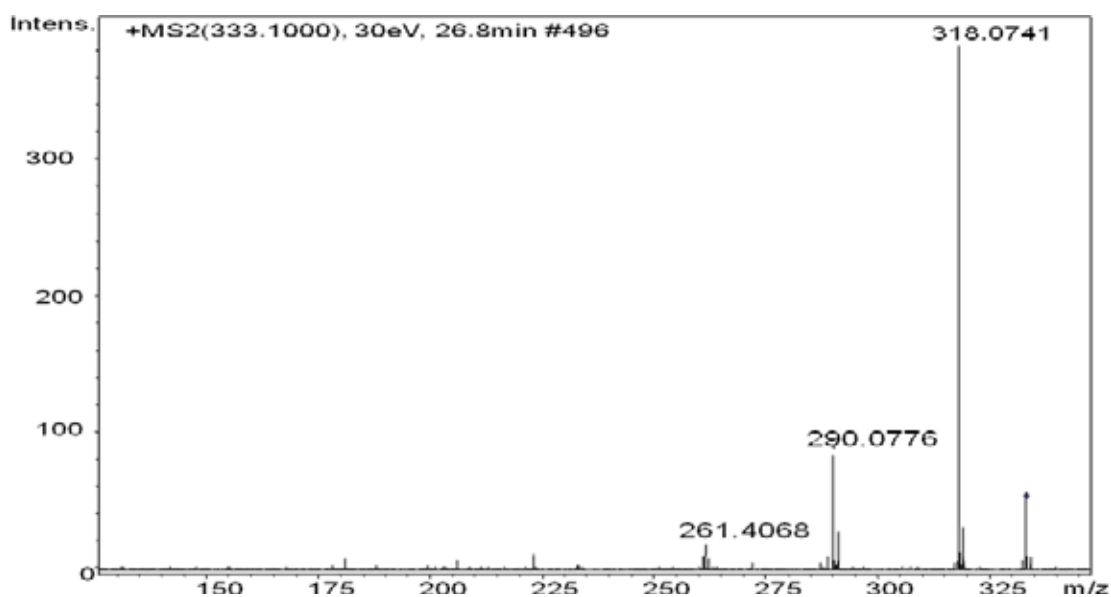


Figura 17. Espectro de ES/EM/EM da substância **III**.

O espectro de absorção da substância **II**, observado em CLAE-DAD, apresentou  $\lambda_{\text{max}}$  em 560,1 nm (Figura 12). Esse valor sugere que **II** tenha um padrão de substituição diferente de **I** e **III** e de outras antocianinas descritas na literatura,

uma vez que o intervalo de máxima absorção característico dessa classe de substâncias é entre 520-560 nm (LOPES et al., 2007).

O espectro de massas da substância **II**, de íon pseudo-molecular  $[M-Cl]^+$   $m/z$  473,0292, obtido utilizando várias energias de colisão é apresentado na Figura 18.

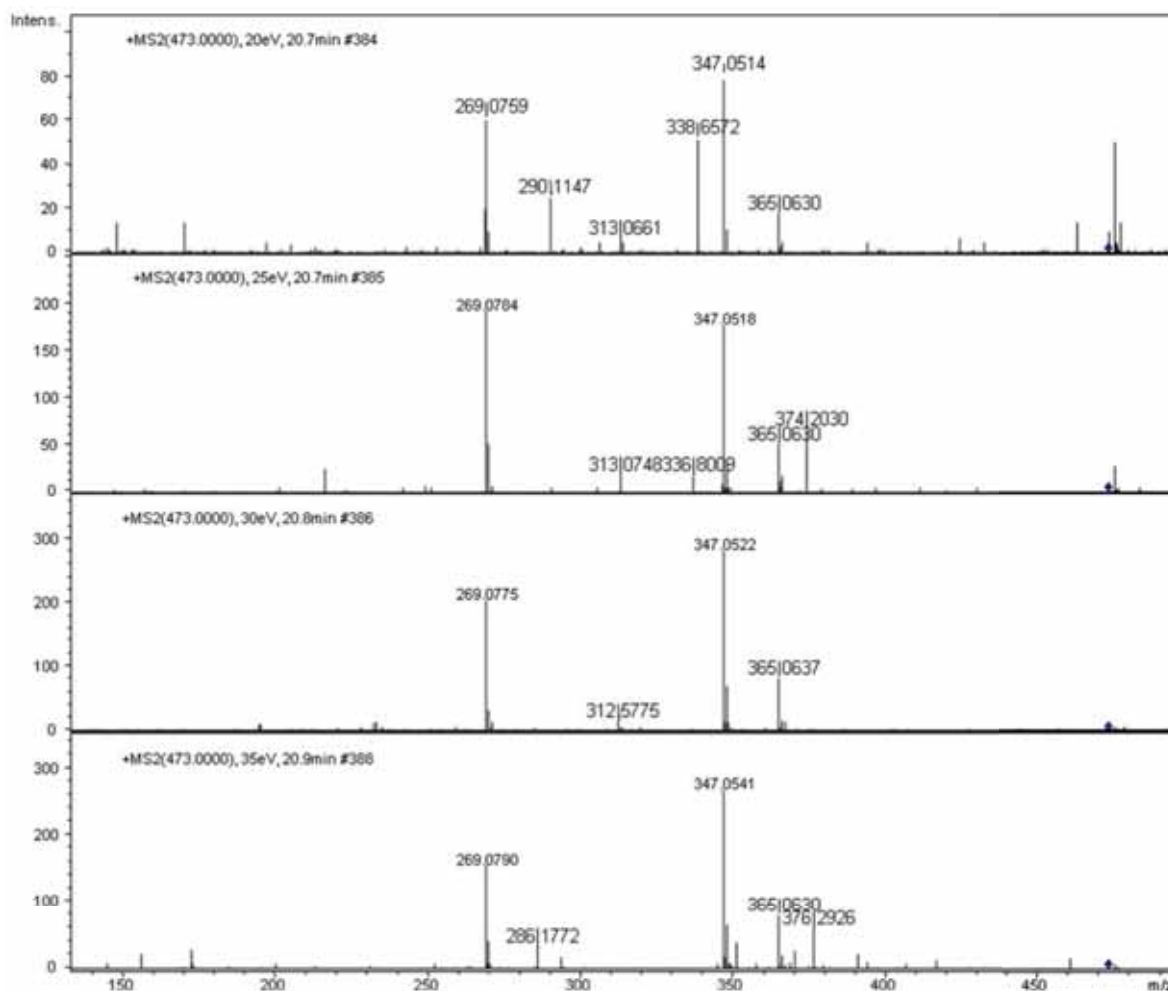


Figura 18. Fragmentograma da antocianidina **II**.

### 5.3.3. Análises por CLAE-DAD de Raiz s-Cd-4FR6

A análise do cromatograma obtido por CLAE-DAD de Raiz s-Cd-4FR6 (Figura 19) revela que esta subfração está em mistura, contendo uma antocianina majoritária (**III**:  $t_R$  28,8 min) e duas minoritárias (**I**:  $t_R$  26,9 min e **IV**:  $t_R$  28,2 min),

além de um derivado aromático ( $t_R$  29,7 min). Os espectros de absorção dessas substâncias estão presentes na Figura 20. A antocianina I apresenta  $\lambda_{m\acute{a}x}$  em 521,73 nm, a IV tem  $\lambda_{m\acute{a}x}$  em 546,98 nm e a III tem  $\lambda_{m\acute{a}x}$  em 543,11 nm.

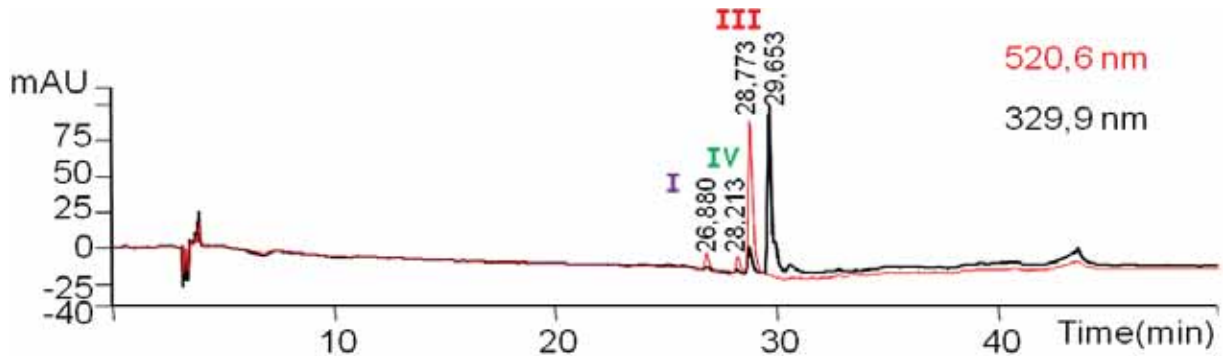


Figura 19. Cromatograma obtido por CLAE-DAD da subfração Raiz s-Cd-4FR6.

Deteccção em 329,9 e 520,6 nm.

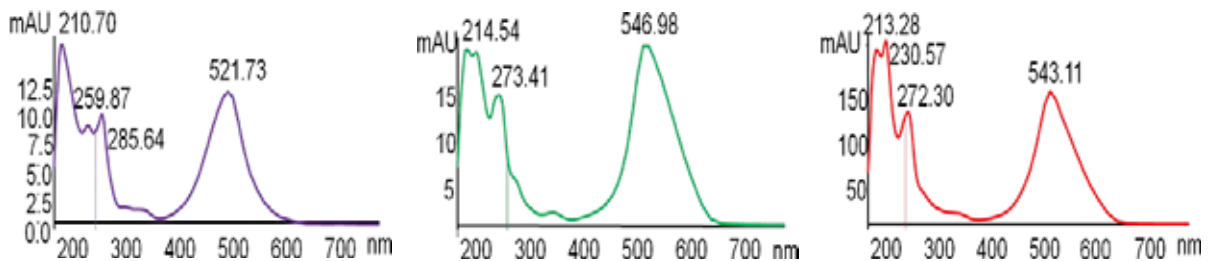


Figura 20. Espectros de absorção das substâncias I, IV e III.

#### 5.3.4. Análises por CLAE-DAD-EM de Raiz s-Cd-4FR6

A amostra s-Cd-4FR6 foi analisada em CLAE-DAD-EM na FCFRP-USP e o cromatograma obtido (Figura 21) não apresentou o mesmo perfil que o cromatograma da análise CLAE-DAD realizado anteriormente no IQ-Unesp (Figura

19). Observa-se um aumento na intensidade da banda cromatográfica referente à substância I.

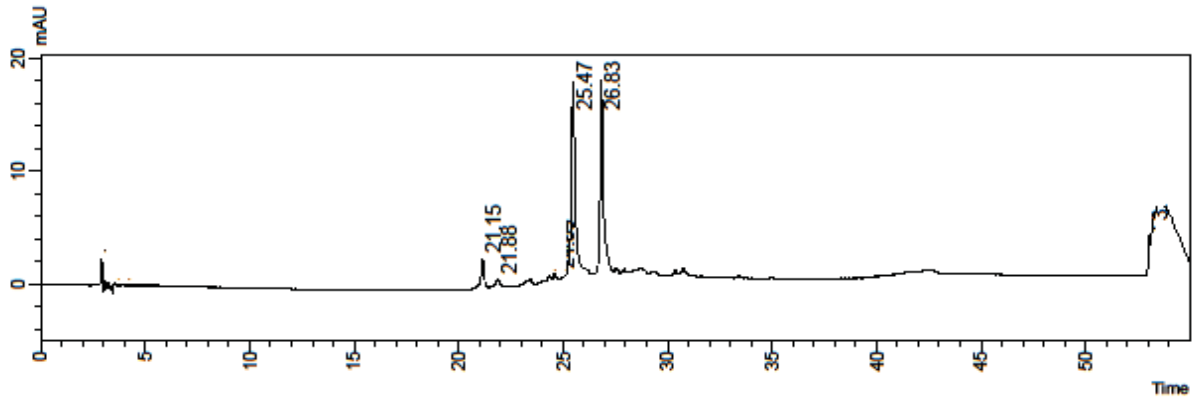


Figura 21. Cromatograma obtido por CLAE-DAD-EM de Raiz s-Cd-4FR6.

Por meio do cromatograma de íons totais da fração Raiz s-Cd-4FR6 (Figura 22), pode-se atribuir a massa dos íons pseudomoleculares das antocianinas observadas como mostrado na Tabela 2.

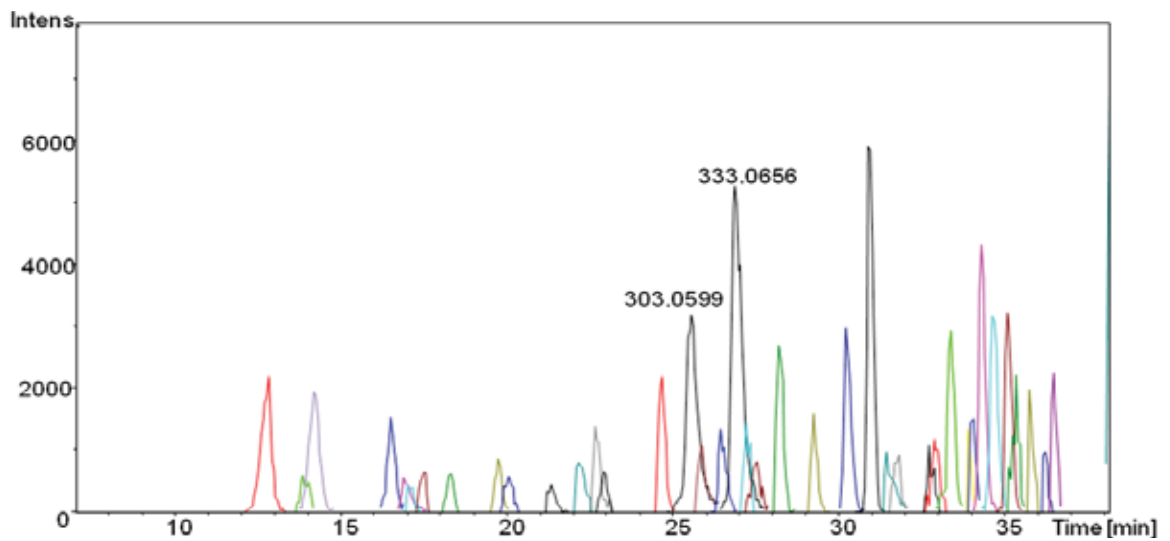


Figura 22. Cromatograma de íons totais de Raiz s-Cd-4FR6.

Tabela 2. Íons pseudomoleculares atribuídos às antocianinas **I** e **III** (Raiz s-Cd-4FR6).

Antocianina	$t_R$ (min)	$m/z$ [M-Cl] <sup>+</sup>
<b>I</b>	25,47	303,0599
<b>III</b>	26,83	333,0656

Com base nos dados apresentados nas Tabela 1 e 2, pode-se firmar que as substâncias **I** e **III** estão presentes nas amostras Raiz s-Cd-4FR4 e Raiz s-Cd-4FR6. O espectro de massas dessas antocianidinas são presentes nas Figuras 23 e 24.

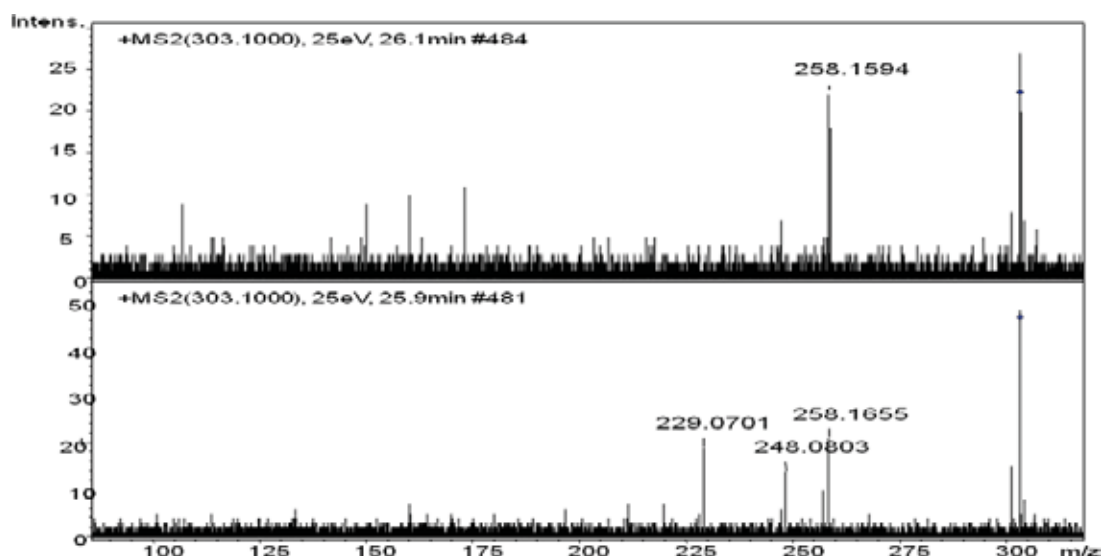


Figura 23. Fragmentograma da antocianidina **I** presente em Raiz s-Cd-4FR6.

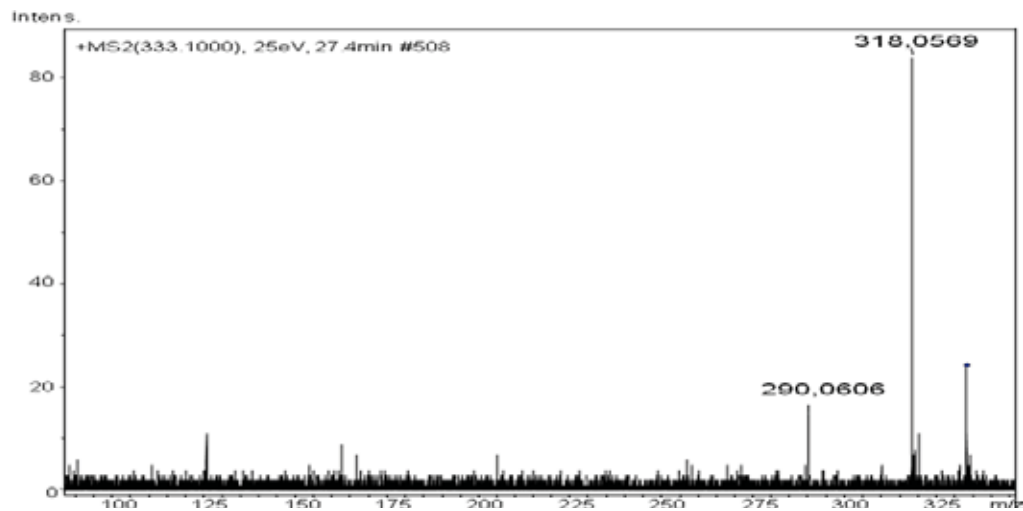


Figura 24. Fragmentograma da antocianidina **III** presente em Raiz s-Cd-4FR6.

#### 5.4. Fracionamento do extrato Raiz c-Cd

Analisando o cromatograma CLAE-UV em 520 nm da fração Raiz c-Cd-4FR (Figura 25), observa-se a presença de duas bandas cromatográficas referentes a antocianinas em  $t_R$  ~6 e ~21 min. No entanto, observa-se que outras substâncias co-eluem com as antocianinas, uma vez que absorvem em 310 nm e não absorvem em 520 nm (Figura 25). A presença dessas impurezas dificulta o processo de isolamento das antocianinas por CLAE semipreparativo utilizando fase reversa C18.

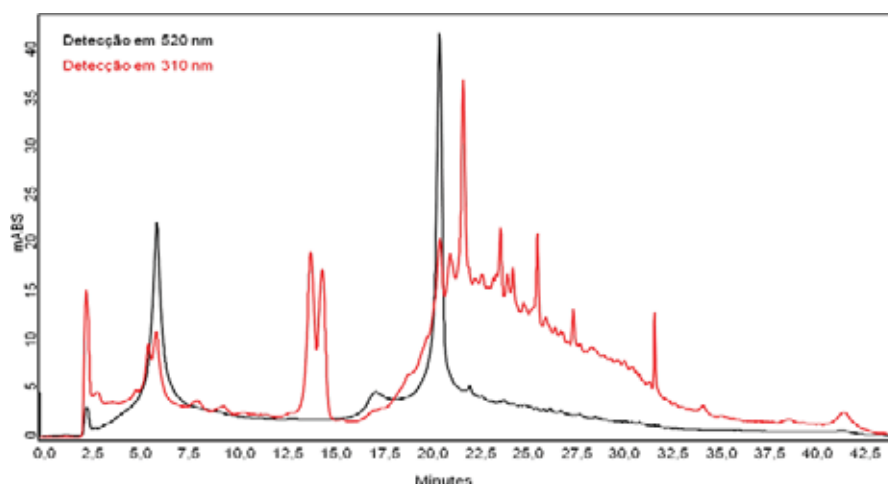


Figura 25. Cromatogramas obtidos por CLAE-UV da fração Raiz c-Cd-4FR em 520 e 310 nm.

Com o objetivo de isolar as antocianinas, realizou-se CC utilizando Sephadex LH-20 para melhorar a separação entre as substâncias. Obteve-se 25 frações, dentre as quais sete apresentavam cor de rosa a roxo, indicativo de antocianinas. As sub-frações Raiz c-Cd-4FR6, Raiz c-Cd-4FR8 e Raiz c-Cd-4FR10 foram escolhidas para análise em CLAE-UV porque, além de apresentarem essas colorações, possuem maior quantidade em massa.

As sub-frações Raiz c-Cd-4FR6 e Raiz c-Cd-4FR8 apresentam uma mistura de antocianinas, pois possuem mais de uma banda cromatográfica em 520 nm (Figura 26). Já a sub-fração Raiz c-Cd-4FR10 encontra-se praticamente pura, devido a presença de uma única banda cromatográfica ( $t_R \sim 11$ min) com absorção em 520 nm (Figura 26).

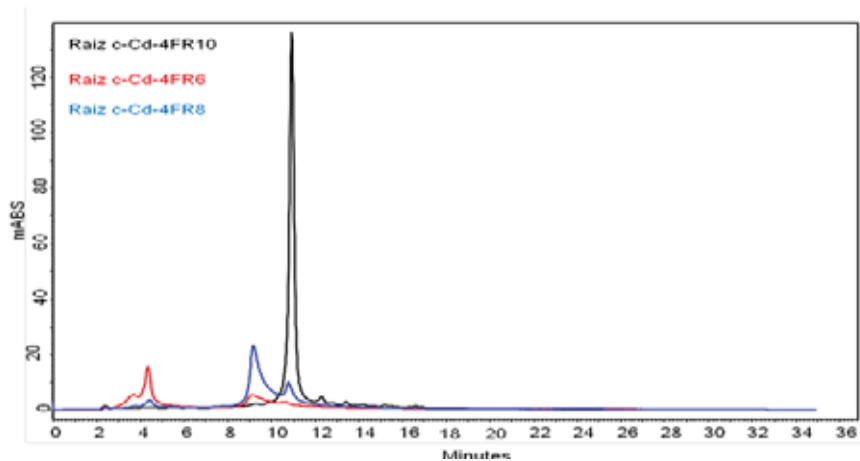


Figura 26. Cromatogramas obtidos por CLAE-UV das sub-frações Raiz c-Cd-4FR6, Raiz c-Cd-4FR8 e Raiz c-Cd-4FR10. Detecção em 520 nm.

#### 5.4.1. Análises por CLAE-DAD de Raiz c-Cd-4FR6

Observando o cromatograma da sub-fração Raiz c-Cd-4FR6 (Figura 27) é possível afirmar que ela se encontra em mistura, devido a presença da substância I com  $t_R$  28,2 min ( $\lambda_{m\acute{a}x}$  521 nm) e de um derivado aromático com  $t_R$  30,2 min ( $\lambda_{m\acute{a}x}$  327 nm). A substância I foi identificada como delphinidina no item 5.3.2.

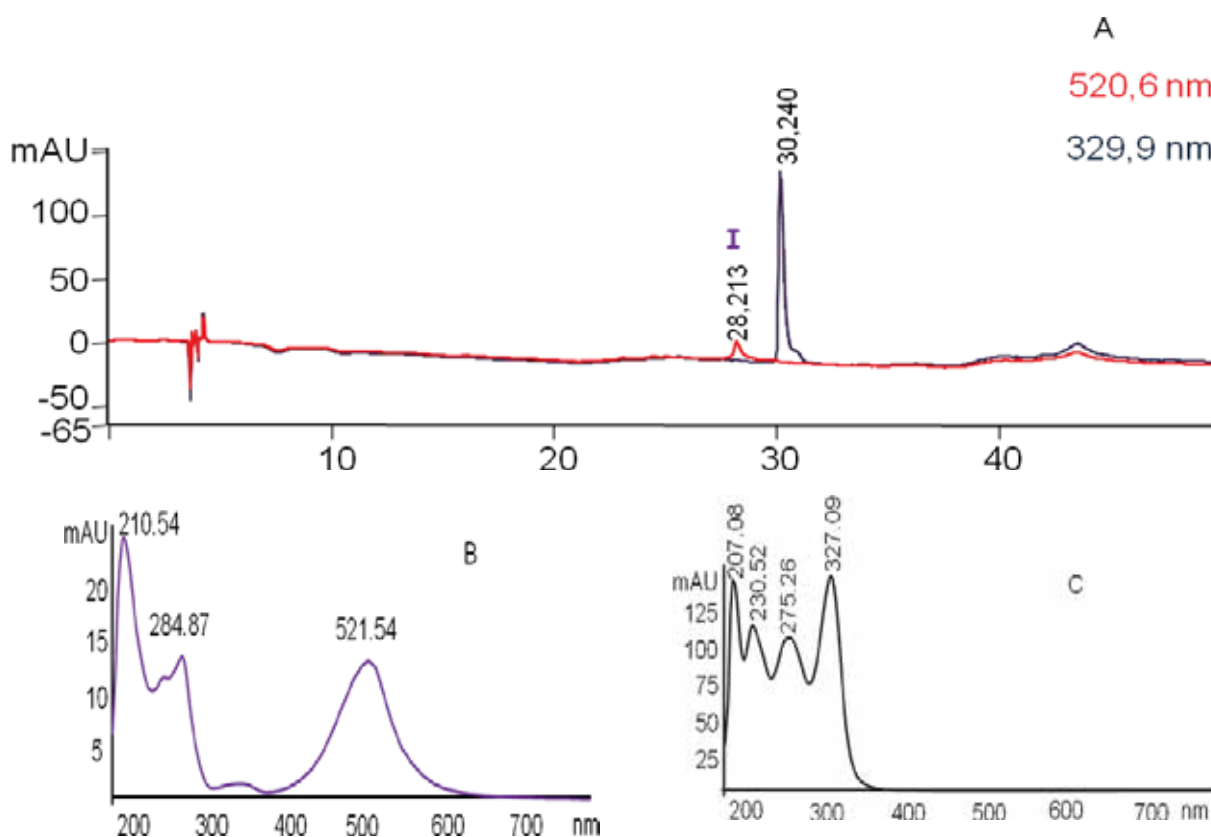


Figura 27. (A) Cromatograma obtido por CLAE-DAD da sub-fração Raiz c-Cd-4FR6. Detecção em 520,6 e 329,9 nm. (B e C) Espectros de absorção das substâncias em  $t_R$  28,2 e 30,2 minutos, respectivamente.

#### 5.4.2. Análises por CLAE-DAD de Raiz c-Cd-4FR8

Com a análise em CLAE-DAD da sub-fração Raiz c-Cd-4FR8 (Figura 28) é possível afirmar que ela também se encontra em mistura. Observa-se a presença da

de um derivado aromático com  $t_R$  30,2 min, da substância **I** com  $t_R$  28,1 min, identificada com defenidina (item 5.3.2) e da substância **III** com  $t_R$  29,7 min, identificada com antocianidina substituída por grupo metoxílico (item 5.3.2). Os espectros de absorção dessas substâncias estão presentes na Figura 29. A antocianina **I** apresenta  $\lambda_{m\acute{a}x}$  em 521,0 nm e a **III** tem  $\lambda_{m\acute{a}x}$  em 547,0 nm

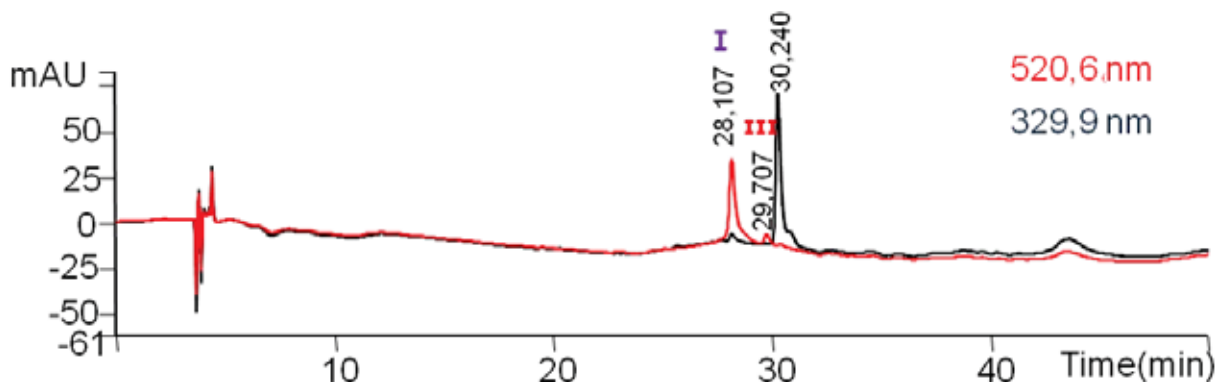


Figura 28. Cromatograma obtido por CLAE-DAD da sub-fração Raiz c-Cd-4FR8.

Deteccção em 520 e 329,9 nm.

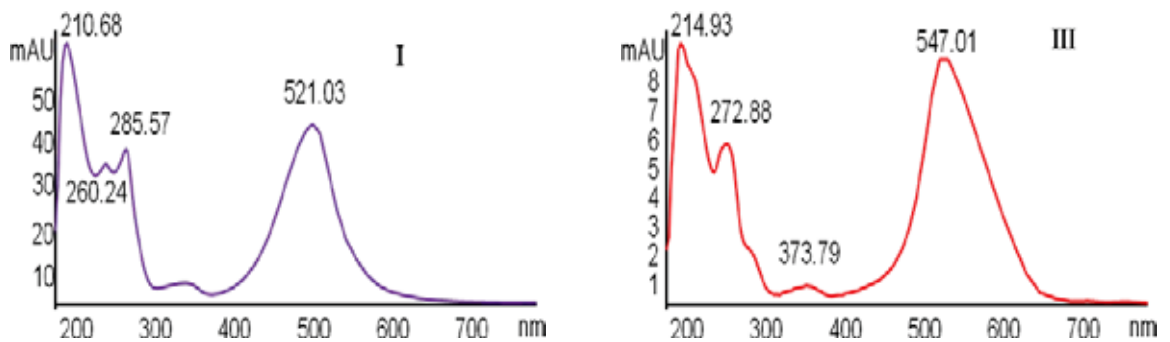


Figura 29. Espectros de absorção das substâncias **I** e **III**, respectivamente.

### 5.4.3. Análises por CLAE-DAD de Raiz c-Cd-4FR10

Analisando o cromatograma obtido por CLAE-DAD da sub-fração Raiz c-Cd-4RF10 (Figura 30) é possível afirmar que ela se encontra em mistura, devido a presença de um derivado aromático com  $t_R$  27,6 min ( $\lambda_{m\acute{a}x}$  314 nm) e da substância **III** com  $t_R$  29,8 min ( $\lambda_{m\acute{a}x}$  544 nm), identificada com antocianidina substituída por grupo metoxílico (item 5.3.2).

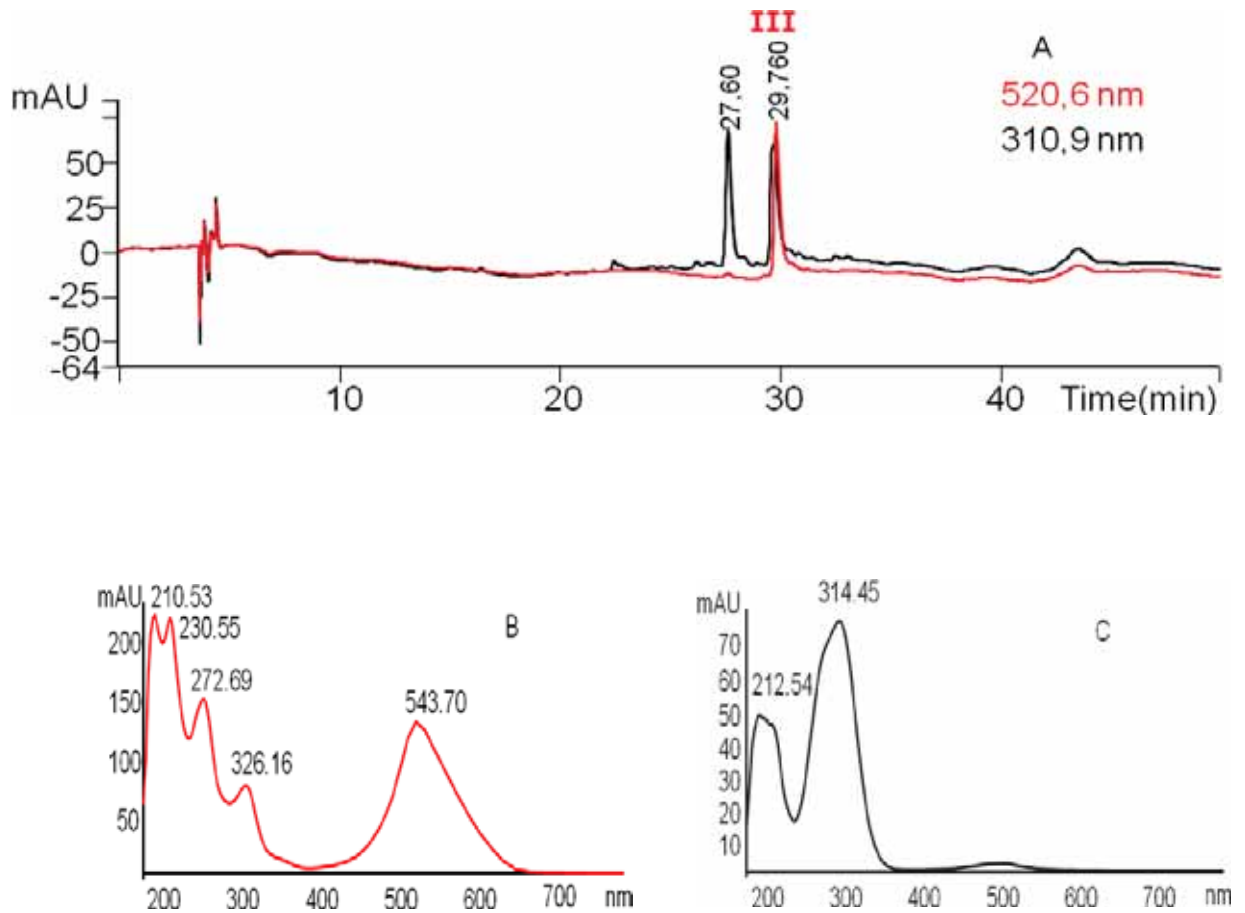


Figura 30. (A) Cromatograma obtido por CLAE-DAD da sub-fração Raiz c-Cd-4FR10. Detecção em 520,6 e 310,9 nm. (B e C) Espectros de absorção das substâncias em  $t_R$  29,8 e 27,6 minutos, respectivamente.

### 5.5. Estudo sobre degradação de antocianinas

Analisando o cromatograma obtido por CLAE-UV da fração rica em antocianinas Raiz (2) c-Cd (Figura 31) observa-se uma banda cromatográfica intensa no  $t_R \sim 6$  min. Comparando este cromatograma com o da Figura 8, obtido aproximadamente 1 ano antes, observa-se que a banda cromatográfica no  $t_R \sim 6$  min se manteve intensa, mas a banda cromatográfica  $t_R \sim 20$  min aparece com intensidade muito menor. Essa diminuição sugere degradação da substância com  $t_R \sim 20$  min.

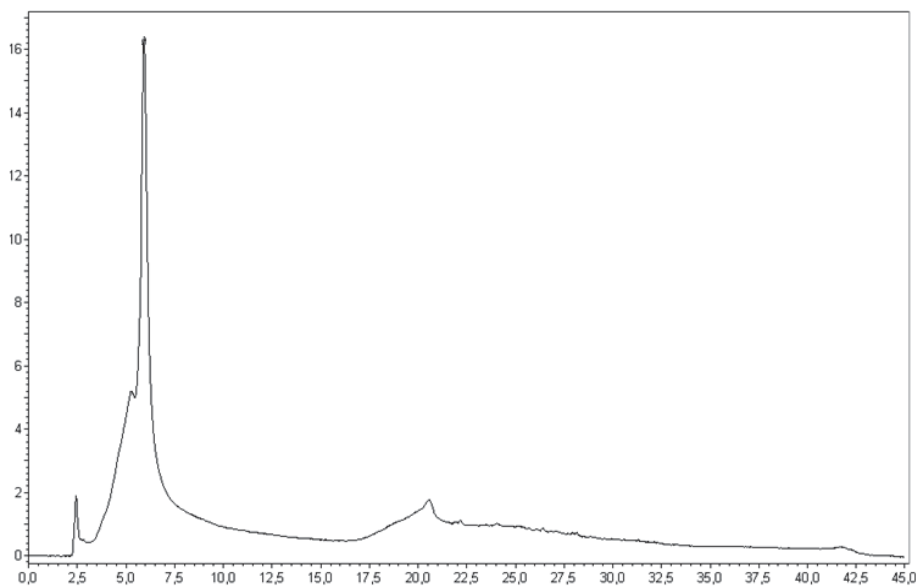


Figura 31. Cromatograma obtido por CLAE-UV da fração Raiz (2) c-Cd. Detecção em 520 nm.

O cromatograma da fração rica em antocianinas do extrato Raiz (2) s-Cd (Figura 32) apresenta o mesmo perfil que o cromatograma da Figura 7, obtido aproximadamente 1 ano antes, indicando que não houve degradação das substâncias presentes no extrato bruto.

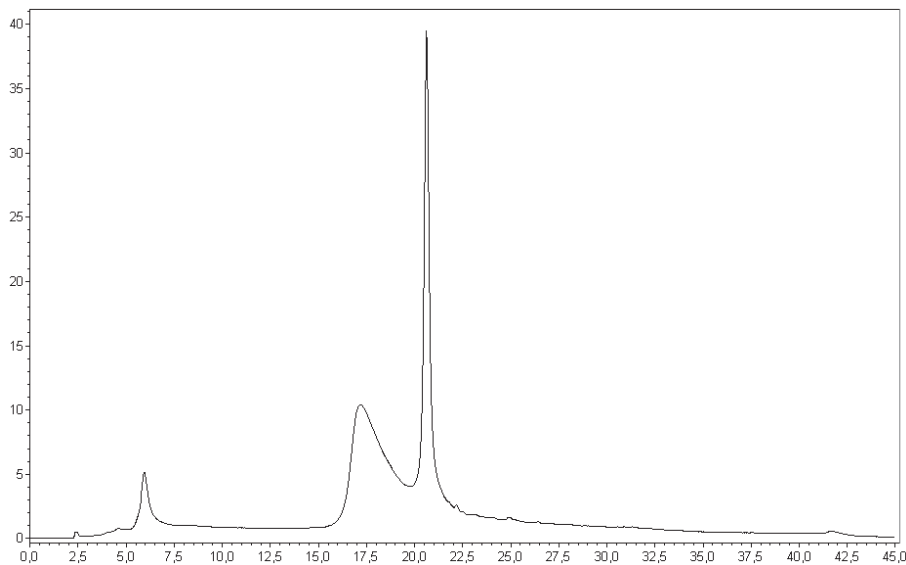


Figura 32. Cromatograma obtido por CLAE-UV da fração Raiz (2) s-Cd. Detecção em 520 nm.

### 5.6. Estudo sobre provável complexação de antocianinas e íons Cd(II)

As amostras Raiz (2) s-Cd e Raiz (2) s-Cd + solução CdCl<sub>2</sub> foram analisadas por CLAE-DAD e seus cromatogramas comparados com o de Raiz (2) c-Cd para avaliar sobre uma possível complexação das antocianinas com íons Cd(II). Os cromatogramas estão apresentados na Figura 33.

Não foram observadas mudanças nos perfis cromatográficos das amostras Raiz (2) s-Cd e Raiz (2) s-Cd + solução CdCl<sub>2</sub>, apenas uma diminuição na intensidade dos sinais provavelmente devido à diluição da amostra ao adicionar a solução de metal. A mudança no perfil cromatográfico das frações Raiz (2) c-Cd e Raiz (2) s-Cd podem ser atribuída a presença dos íons Cd(II) na solução nutritiva do cultivo das plantas.

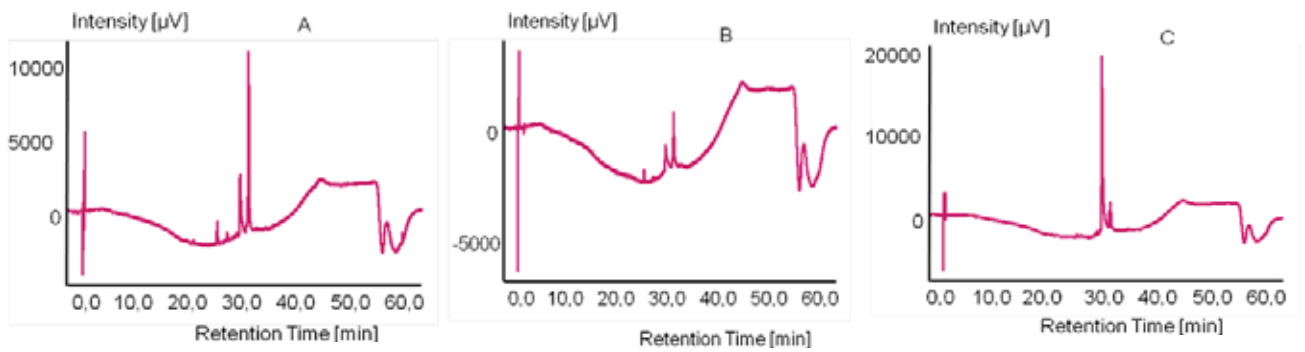


Figura 33. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD. Detecção em 520 nm. (A) Fração Raiz (2) s-Cd. (B) Fração Raiz (2) s-Cd + solução de  $\text{CdCl}_2$ . (C) Fração Raiz (2) c-Cd.

## 6. CONCLUSÕES

Os extratos das raízes de *E. crassipes*, obtidos dos experimentos sem e com Cd(II), foram submetidos a processos de separação. No entanto, a purificação de antocianinas e antocianidinas não foi alcançada com as metodologias utilizadas, pois estas substâncias se apresentaram na forma de mistura com outras de natureza aromática.

Alguns fatores dificultaram a elucidação estrutural dos pigmentos antociânicos, como a pequena quantidade de material obtido, frações não purificadas, baixa estabilidade das antocianinas e a falta de padrões. Além disso, a baixa solubilidade da amostra, restrita a metanol acidificado, por causa da técnica, não permitiu a obtenção de espectros de RMN de  $^1\text{H}$  com boa resolução. Isso impediu a utilização dessa técnica para auxiliar na identificação das substâncias de interesse.

Entretanto, foi possível diferenciar quatro antocianinas por meio de seus espectros de absorção e tempos de retenção a partir das análises cromatográficas por CLAE-DAD. Com as análises por CLAE-DAD-EM foi possível propor a estrutura de duas antocianidinas. A substância **I** foi identificada com delfinidina e **III** como antocianidina substituída por um grupo metoxílico, de fórmula molecular  $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{O}_8$  (333,0609).

O levantamento bibliográfico realizado na literatura sugere que este Trabalho de Conclusão de Curso é o primeiro em descrever a presença de antocianidinas e antocianinas nas raízes do aguapé.

Os resultados apresentados também sugerem que a produção de antocianinas possa ser influenciada pela presença de íons Cd(II). No entanto mais

experimentos devem ser realizados, levando em consideração a baixa estabilidade e dificuldade de isolamento e identificação estrutural desse tipo de substâncias.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARAL, M. C. E.; BITTICH, V.; FARIA, A. D.; ADERSON, L. O.; AONA, L. Y. S. Espécies com flores alvas, cremes ou esverdeadas. In:\_\_\_\_\_. **Guia de Campo para Plantas Aquáticas e Palustres do Estado de São Paulo**. Ribeirão Preto: Holos Editora, 2008. p. 110-111.
- ANDERSEN, Ø. M.; JORDHEIM, M. The Anthocyanins. In: ANDERSEN, Ø. M.; MARKHAM, K. R. **Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications**. Boca Raton: CRC Press, 2006. p. 474.
- ARAPITSAS, P., SJÖBERG, P. J. R., TURNER, C. Characterization of anthocyanins in red cabbage using high resolution liquid chromatography coupled with photodiode array detection and electrospray ionization-linear ion trap mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 109, p. 219–226. 2008.
- BOULTON, R. The Copigmentation of Anthocyanins and Its Role in the Color of Red Wine: A Critical Review. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 52, p. 67-87. 2001.
- DELLAGRECA, M.; PREVITERA, L.; ZARRELLI, A. Revised structures of phenylphenalene derivatives from *Eichhornia crassipes*. **Tetrahedron Letters**, v. 49, p. 3268-3272. 2008.
- DELLAGRECA, M.; PREVITERA, L.; ZARRELLI, A. Structures of new phenylphenalene-related compounds from *Eichhornia crassipes* (Water Hyacinth). **Tetrahedron**, v. 65, p. 8206-8208. 2009.
- GOSWAMI, P. C.; NAG, B.; SHARMA, A. K.; BORTHAKUR, A.; SINGH, H. D.; BARUAH, J. N. Water hyacinth as a prospective source of stigmasterol. **Current Science**, v. 52, p. 806-808. 1983.

- GRECA, M. D.; MONACO, P.; PREVITERA, L. New oxygenated sterols from the weed *Eichhornia crassipes* Solms. **Tetrahedron**, v. 47, p. 7129-7134. 1991.
- HAMANA, K.; MATSUZAKI, S.; NIITSU, M.; SAMEJIMA, K. Distribution of unusual polyamines in aquatic plants and gramineous seeds. **Canadian Journal of Botany**, v. 72, p. 1114-1120. 1994.
- HARBONE, J. B. Spectral Methods of Characterizing Anthocyanins. **John Innes Horticultural Institution**, v.19, p. 22-28. 1957.
- HÖLSCHER, D.; SCHNEIDER, B. The biosynthesis of 8-phenylphenalenones from *Eichhornia crassipes* involves a putative aryl migration step. **Phytochemistry**, v. 66, p. 59-64. 2005.
- KONG, J-M.; CHIA, L-S.; GOH, N-K.; CHIA, T-F.; BROUILLARD, R. Analysis and biological activities of anthocyanins. **Phytochemistry**, v. 64, p. 923–933. 2003.
- LOPES, T. J.; XAVIER, M. F.; QUADRI, M. G. N.; QUADRI, M. B. Antocianinas: uma breve revisão das características estruturais e da estabilidade. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 13, p. 291-297. 2007.
- MALIK, A. Environmental challenge *vis a vis* opportunity: The case of water hyacinth. **Environment International**, v. 33, p. 122-138. 2007.
- MARÇO, P. H.; POPPI, R. J.; SCARMINIO, I. S. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Química Nova**, v. 31, p. 1218-1223. 2008.
- MONTORO, P.; TUBEROSO, C. I. G; PERRONE, A.; PIACENTE, S.; CABRAS, P.; PIZZA, C. Characterisation by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry of anthocyanins in extracts of *Myrtus communis* L. berries used for the preparation of myrtle liqueur. **Journal of Chromatography A**, v. 1112, p. 232–240. 2006.

- POTT, V. J.; POTT, A. Pontederiaceae. In:\_\_\_\_\_. **Plantas Aquáticas do Pantanal**.  
Brasília: Embrapa, 2000. p. 276-277.
- TOKI, K.; SAITO, N.; IIMURA, K.; SUZUKI, T.; HONDA, T. (Delphinidin 3-gentiobiosyl) (apigenin 7-glucosyl) malonate from the flowers of *Eichhornia crassipes*. **Phytochemistry**, v. 36, p. 1181-1183. 1994.
- TOKI, K.; SAITO, N.; TSUTSUMI, S.; TAMURA, C.; SHIGIHARA, A.; HONDA, T. (Delphinidin 3-gentiobiosyl) (lueorin 7-glucosyl) malonate from the flowers of *Eichhornia crassipes*. **Heterocycles**, v. 63, p. 899-902. 2004.
- WANG, M-Z.; CAI, X-H.; LUO, X-D. New Phenylphenalene derivatives from water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). **Helvetica Chimica Acta**, v. 94, p. 61-66. 2011.
- YOSHIDA, K.; MORI, M.; KONDO T. Blue flower color development by anthocyanins: from chemical structure to cell physiology. **Natural Product Reports**, v. 26, p. 857-964. 2009.
- ZHU, Y. L.; ZAYED, A. M.; QIAN, J.-H.; DE SOUZA, M.; TERRY, N. Phytoaccumulation of trace elements by wetlands plants: II. Water hyacinth. **Journal of Environmental Quality**, v. 28, p. 339-344. 1999.