

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

**Identificação de antocianinas em raízes de**

***Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms**

Ana Tereza de Souza Cruz

Araraquara

2017

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

## **Identificação de antocianinas em raízes de**

### ***Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms**

Ana Tereza de Souza Cruz

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,  
da Universidade Estadual Paulista, para  
obtenção do grau de Farmacêutica-  
Bioquímica.

Araraquara

2017

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a minha família, que sempre me incentivou a ir para a UNESP e me auxiliou nas horas difíceis.

Agradeço a Profa. Dra. Isabele Rodrigues Nascimento, pela oportunidade de desenvolver um projeto no Laboratório de Produtos Naturais e os ensinamentos passados durante todos estes anos de aprendizado.

Agradeço o Dr. Marcos Donizete Pereira, pelos ensinamentos de técnicas e principalmente pela paciência e otimismo quando nada parecia dar certo.

Agradeço o Dr. Nivaldo Boralle, Denise Selegato e Me. João Luiz Bronzel Júnior pela ajuda nos procedimentos experimentais.

Agradeço a República Askerozas por estes anos de amizade e companheirismo e ao meu namorado Bruno Ferreira pelos incentivos de continuar sempre em frente e ser sempre melhor.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	6
LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE TABELAS.....	10
LISTA DE ESQUEMAS.....	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	12
1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Antocianinas.....	13
1.1.1 Estrutura química das antocianinas.....	13
1.1.2 Estabilidade das antocianinas.....	15
1.1.3 Aplicações das antocianinas.....	18
1.2 <i>Eichhornia crassipes</i> (Mart.) Solms.....	19
1.3 Análise de antocianinas em plantas.....	22
2 OBJETIVOS.....	26
3 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....	27
4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	29
4.1 Preparação do extrato de <i>E. crassipes</i> .....	29
4.2 Análise por CLAE do extrato bruto.....	30
4.3 Fracionamento do extrato bruto.....	31
4.4 Fracionamento da fração Raiz-4FR.....	32
4.5 Análise das subfrações de Raiz-4FR.....	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5.1 Preparação do extrato de <i>E. crassipes</i> .....	35
5.2 Análise por CLAE do extrato bruto.....	35

5.3 Fracionamento do extrato bruto.....	37
5.4 Fracionamento da fração Raiz-4FR.....	40
5.5 Análise das subfrações de Raiz-4FR.....	43
5.5.1 Análise da subfração Raiz-4FR5.....	43
5.5.2 Análise da subfração Raiz-4FR8.....	49
5.5.3 Análise da subfração Raiz-4FR9.....	56
6 CONCLUSÕES.....	64
REFERÊNCIAS.....	65
APÊNDICE A.....	73

## RESUMO

Antocianinas são produtos naturais pertencentes ao grupo dos flavonoides, apresentando coloração que pode variar do vermelho ao azul, sendo utilizadas como corantes naturais. Essas substâncias são conhecidas também por possuírem propriedades antioxidantes e serem capazes de interagir com espécies metálicas. O aguapé (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms, Pontederiaceae) é uma macrófita utilizada na descontaminação de ambientes aquáticos, devido à sua capacidade de absorver metais e outros poluentes. Estudos fitoquímicos prévios relatam o isolamento e identificação de antocianinas esterificadas com ácido malônico das flores dessa planta. Este trabalho visou à identificação de antocianinas e antocianidinas nas raízes do aguapé, de modo que em estudos futuros possa avaliar se a absorção de metais está relacionada com a possível complexação destes com moléculas de antocianinas. As raízes da planta foram extraídas com metanol em meio ácido. As frações obtidas foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector de Arranjo de Diodos e Espectrometria de Massas (CLAE-DAD-EM). Após as análises foi possível identificar a presença de delphinidina-3-O-glicosídeo e 6-hidroxi-petunidina-3-O-glicosídeo, além de outras antocianinas.

## ABSTRACT

Anthocyanins are natural products that belong to the group of flavonoids, showing color that can vary from red to blue, being used as natural dyes. These substances are known, as well, because of their antioxidant properties and that they are able to interact with metal species. Water hyacinth (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms, Pontederiaceae) is a macrophyte used in the decontamination of aquatic environments, due to its ability to absorb metals and other pollutants. Preliminary phytochemical studies have reported the isolation and identification of anthocyanins esterified with malonic acid in the flowers of this plant. This work aimed the identification of anthocyanins and anthocyanidins in the roots of water hyacinth, so that in further studies it can be evaluated if the absorption of metals is related to a possible complexation of these with molecules of anthocyanins. The roots of the plant were extracted with methanol in acid medium. The fractions were analysed by High Performance Liquid Chromatography coupled to Diode Array Detector and Mass Spectrometry (HPLC-DAD-MS). After the analysis, it was possible to identify the presence of delphinidin-3-O-glycoside and 6-hydroxy-petunidin-3-O-glycoside, besides others anthocyanins.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Transformações estruturais das antocianinas em meio aquoso em função das alterações no pH, R <sup>1</sup> = H ou glicosídeo, R <sup>2</sup> e R <sup>3</sup> = H ou metil (adaptado de CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009).....	17
Figura 2 - <i>Eichhornia crassipes</i> (Foto: a autora).....	20
Figura 3 - Antocianinas esterificadas com ácido malônico isoladas de <i>E. crassipes</i> .....	22
Figura 4 - Destaque da coloração das raízes da macrófita <i>E. crassipes</i> ao lado da caixa de cultivo no Instituto de Química de Araraquara (Foto: a autora).....	29
Figura 5 - Subfrações de Raiz-4FR.....	33
Figura 6 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD do extrato bruto das raízes de <i>E. crassipes</i> . Detecção em 510 nm.....	36
Figura 7 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD da fração Raiz-3FR. Detecção em 510 nm.....	38
Figura 8 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD da fração Raiz-4FR. Detecção em 510 nm.....	39
Figura 9 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD da fração Raiz-5FR. Detecção em 310 nm.....	40
Figura 10 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD da fração Raiz-4FR em escala semipreparativa. Detecção em 254 nm.....	41
Figura 11 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD da fração Raiz-4FR em escala semipreparativa. Detecção em 510 nm.....	42
Figura 12 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD da fração Raiz-4FR5 em coluna analítica Kinetex. Detecção em 254 nm.....	43
Figura 13 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD-EM de Raiz-4FR5 em coluna analítica Kinetex. Detecção em 254 nm.....	44

Figura 14 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD da fração Raiz-4FR5 em coluna analítica Kinetex. Detecção em 510 nm.....	45
Figura 15 - Espectros de absorção das substâncias I e II (CLAE-DAD, IQ- Unesp).....	46
Figura 16 - Região ampliada do cromatograma dos íons totais da subfração Raiz-4FR5.....	47
Figura 17 - Espectros MS <sup>2</sup> das substâncias I e II.....	48
Figura 18 - Proposta estrutural para substância I (delfinidina-3-O-glicosídeo)....	48
Figura 19 - Proposta estrutural para substância II (6-hidroxi-petunidina-3-O- glicosídeo).....	49
Figura 20 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD da fração Raiz-4FR8 em coluna analítica Kinetex. Detecção em 254 nm.....	50
Figura 21 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD-EM da fração Raiz-4FR8 em coluna analítica Kinetex. Detecção em 254 nm.....	51
Figura 22 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD da fração Raiz-4FR8 em coluna analítica Kinetex. Detecção em 510 nm.....	52
Figura 23 - Espectros de absorção das substâncias III a VII.....	53
Figura 24 - Região ampliada do cromatograma dos íons totais da subfração Raiz-4FR8.....	54
Figura 25 - Espectro MS <sup>2</sup> das substâncias III, IV, V, VI e VII.....	56
Figura 26 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD da fração Raiz-4FR9 em coluna analítica Kinetex. Detecção em 254 nm.....	57
Figura 27 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD-EM em coluna analítica Kinetex da fração Raiz-4FR9. Detecção em 254 nm.....	58
Figura 28 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD da fração Raiz-4FR9 em coluna analítica Kinetex. Detecção em 510 nm.....	59

Figura 29 - Espectros de absorção das substâncias <b>III</b> , <b>V</b> e <b>VIII</b> .....	60
Figura 30 - Sobreposição amplificada dos cromatogramas das subfrações Raiz-4FR5, Raiz-4FR8 e Raiz-4FR9 obtidos por CLAE-DAD em coluna analítica Kinetex. Detecção em 510 nm.....	61
Figura 31 - Região ampliada do cromatograma dos íons totais da subfração Raiz-4FR9.....	62
Figura 32 - Espectros MS <sup>2</sup> das substâncias <b>III</b> , <b>V</b> e <b>VIII</b> respectivamente.....	63

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estruturas das antocianidinas (adaptado de CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009).....	14
Tabela 2 - Tabela das subfrações obtidas na separação por CLAE-semipreparativa.....	33
Tabela 3 - Antocianinas identificadas na subfração Raiz-4FR5.....	46
Tabela 4 - Antocianinas identificadas na subfração Raiz-4FR8.....	54
Tabela 5 - Antocianinas identificadas na subfração Raiz-4FR9.....	62

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Fluxograma de fracionamento do extrato bruto das raízes.....	31
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Abs	Absorbância
C-18	Octadecilsilano
CC	Cromatografia em Coluna
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 aos Detectores de Arranjo de Diodos e de Espectrometria de Massas
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
EFS	Extração em Fase Sólida
EM	Espectrometria de Massas
EtOH	Etanol
MeOH	Metanol
$t_R$	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 Antocianinas**

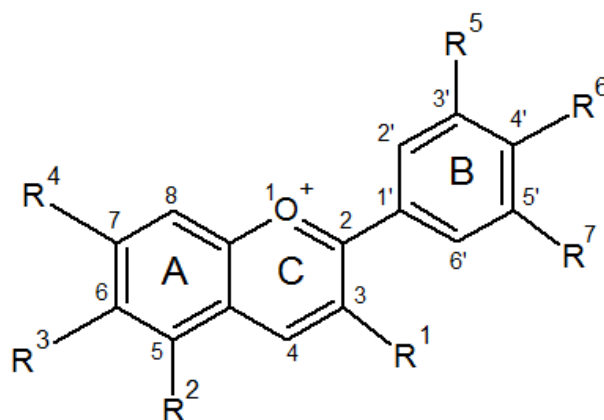
As antocianinas são pigmentos naturais, classificadas quimicamente como compostos fenólicos pertencentes ao grupo dos flavonoides, que variam do vermelho intenso até o violeta (YOSHIDA et al., 2009). São amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em frutos, flores, algumas folhas, caules e raízes de plantas. Elas são pigmentos muito instáveis, sendo facilmente degradadas com alterações de pH, temperatura e luz (ANDERSEN et al., 1998).

Estes pigmentos são solúveis em água e outros solventes polares, podendo ser incorporados em meios aquosos (PAZMIÑO-DURÁN et al., 2001).

#### **1.1.1 Estrutura química das antocianinas**

As antocianinas consistem em uma aglicona (antocianidina), que tem como estrutura fundamental um anel aromático [A] ligado a um anel heterocíclico [C] oxigenado (cátion flavílico), e este anel ainda é ligado a um outro anel aromático [B] por uma ligação carbono-carbono (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009), além de açúcar e muitas vezes grupos acilados (Tabela 1). A presença de grupos glicosilados, normalmente ligados ao carbono na posição 3 do anel C, caracteriza estas substâncias. A ausência dos mesmos caracteriza as antocianidinas, ou agliconas.

**Tabela 1:** Estruturas das antocianidinas (adaptado de CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009)



Antocianidina	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	R <sup>5</sup>	R <sup>6</sup>	R <sup>7</sup>
Apigeninidina	H	OH	H	OH	H	OH	H
Arrabidina	H	H	OH	OH	H	OH	OMe
Aurantidinina	OH	OH	OH	OH	H	OH	H
Capensinidina	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OMe
Carajurina	H	H	OH	OH	H	OMe	Ome
Cianidina	OH	OH	H	OH	OH	OH	H
Delfinidina	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH
Europinidina	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OH
Hirsutidina	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	OMe
3'-Hidroxi-Arrabidina	H	H	OH	OH	OH	OH	OMe
6-Hidroxi-Cianidina	OH	OH	OH	OH	OH	OH	H
6-Hidroxi-Delfinidina	OH	OH	OH	OH	OH	OH	OH
6-Hidroxi-Pelargonidina	OH	OH	OH	OH	H	OH	H
Luteolinidina	H	OH	H	OH	OH	OH	H
Malvidina	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OMe
5-Metil-Cianidina	OH	OMe	H	OH	OH	OH	H
Pelargonidina	OH	OH	H	OH	H	OH	H
Peonidina	OH	OH	H	OH	OMe	OH	H
Petunidina	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OH
Pulchelidina	OH	OMe	H	OH	OH	OH	OH
Ricionidina A	OH	H	OH	OH	H	OH	H
Rosinidina	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	H
Tricetinidina	H	OH	H	OH	OH	OH	OH

Apesar de centenas de antocianinas terem sido descobertas, apenas algumas foram estudadas. Em contrapartida, 23 antocianidinas já foram descritas (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009), sendo seis as mais encontradas nas plantas: pelargonidina, peonidina, cianidina, malvidina, petunidina e delphinidina (REIN, 2005), listadas na Tabela 1.

As diferenças entre as antocianinas estão basicamente no tipo de açúcar ligado aos anéis e os padrões de hidroxilação, metilação e acilação (RIAZ et al., 2016). Os tipos de açúcares mais encontrados são *D*-glucose, *L*-ramnose, *D*-galactose, *D*-xilose e arabinose, estando localizados normalmente nos carbonos das posições 3, 5, 7, 3' e 5' (DA COSTA et al., 2000; STRACK, 1993). Além disso, estes açúcares podem estar ligados a ácidos alifáticos ou aromáticos (MARÇO et al., 2008), sendo os aromáticos mais comuns os ácidos *p*-cumárico, caféico, ferúlico, *p*-hidroxibenzóico e gálico, e ácidos alifáticos malônico, acético, málico, succínico, oxálico e tartárico (ANDERSEN; JORDHEIM. 2006).

### **1.1.2 Estabilidade das antocianinas**

As antocianinas são substâncias extremamente instáveis e muito suscetíveis a degradação (GIUSTI, WROLSTAD, 2003). Elas podem ser degradadas por diversos fatores como alterações de temperatura, pH, luminosidade, concentração, contato com oxigênio, solventes, presença de enzimas, outros flavonoides ou íons metálicos (LOPES et al., 2007).

Na natureza, são encontradas normalmente as antocianinas, que possuem o grupamento glicosídico. Isso se deve pela instabilidade das agliconas, em que o cátion flavílico é extremamente reativo devido à sua deficiência em elétrons. (RIAZ et al., 2016).

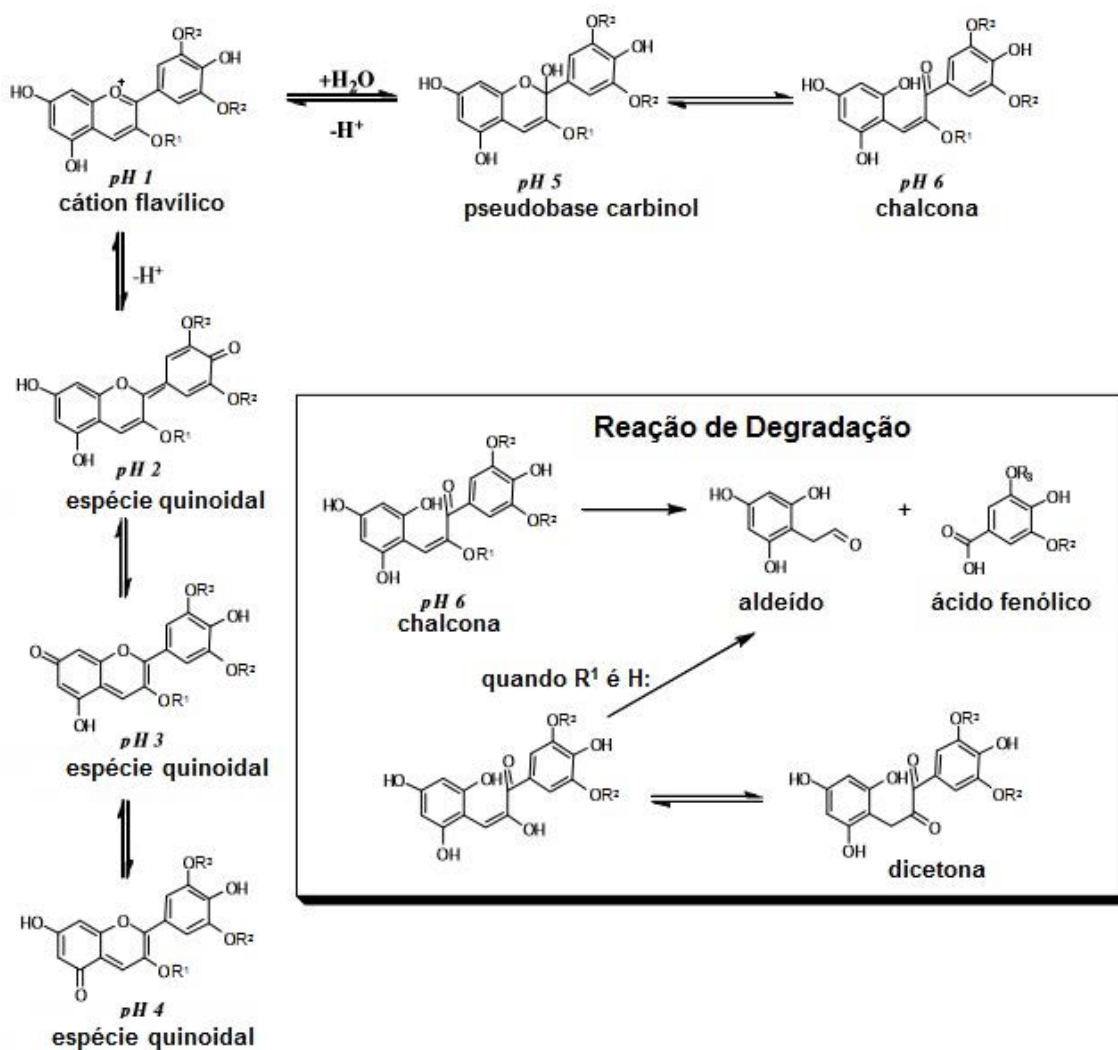
Com relação a alterações de temperatura, as antocianinas são instáveis em temperaturas acima de 25 °C. Portanto recomenda-se o armazenamento de frascos contendo estas substâncias em temperaturas baixas. Ao entrar em contato com íons metálicos, a estabilidade destas substâncias aumenta quando expostas ao calor, alterações de pH e presença de oxigênio por formarem compostos insolúveis. Além disso, a presença de oxigênio pode acarretar em reações de oxidação, mesmo em ausência de luminosidade, por mecanismos de oxidação direta e indireta (LOPES et al., 2007).

Dependendo do pH da solução, as antocianinas podem ser encontradas em diferentes formas, como mostra a Figura 1. Em pH 1, o cátion flavílico é predominante, contribuindo para colorações vermelhas e roxas. Em valores de pH entre 2 e 4, as formas quinoidais azuis são mais predominantes. Em pH 5 e 6, apenas duas espécies podem ser observadas sendo elas pseudobase carbinol (incolor) e chalcona (amarelo), respectivamente, sendo que as chalconas podem apresentar configurações *cis* e *trans*. Acima de pH 7, as antocianinas são degradadas dependendo dos seus grupos substituintes, sendo em alguns casos uma reação irreversível (CASTAÑEDA-OVANDO, et al., 2009).

A copigmentação em contrapartida é um mecanismo de estabilização da cor em espécies vegetais. Ela consiste na formação de associações ou complexos moleculares de pigmentos com outros compostos geralmente incolores que geram um incremento na intensidade da cor (BOULTON, 2001). Isso se dá pois os copigmentos são sistemas ricos em elétrons  $\pi$ , enquanto os íon flavílicos são pobres em elétrons. Os copigmentos podem ser outros flavonoides, alcaloides, aminoácidos, ácidos orgânicos, nucleotídeos, polissacarídeos, metais ou outras antocianinas. A associação promovida pela copigmentação protege a posição 2 do íon flavílico de

ataques nucleofílicos, como por exemplo, da água (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009).

**Figura 1:** Transformações estruturais das antocianinas em meio aquoso em função das alterações no pH,  $R^1 = H$  ou glicosídeo,  $R^2$  e  $R^3 = H$  ou metil (adaptado de CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009).



As interações das antocianinas com metais devem-se ao mecanismo de complexação, porém apenas para aquelas antocianinas que contenham grupos *orto*-dihidroxílicos no anel B, que é o caso da cianidina, delphinidina e petunidina. Alguns

estudos sugerem que a cor azul de algumas soluções seja devido a complexação de antocianinas com alguns metais como alumínio, ferro, cobre, estanho, magnésio e molibdênio (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009).

### **1.1.3 Aplicações das antocianinas**

As antocianinas possuem excelente atividade antioxidante tanto *in vivo* quanto *in vitro*, de forma a proteger o corpo humano contra o estresse oxidativo pela eliminação de radicais livres e supressão da peroxidação lipídica (moléculas que podem doar elétrons livres ou átomos de hidrogênio para reagir com os radicais livres) (RIAZ et al. 2016).

Sua atividade antioxidante depende de muitos fatores, como quantidade e posições dos grupos hidroxílicos, o grupamento catecol no anel B e os padrões de metilação, glicosilação e acilação (YANG et al., 2011).

Estas substâncias são encontradas em tecidos vegetais, frequentemente em vacúolos de células epidermais (RIAZ et al. 2016), dissolvidas em fluidos que apresentem pH levemente ácido (MARÇO et al., 2008). Desempenham papel fundamental na polinização, por causa de suas cores vivas que atraem os agentes polinizadores, sendo importantes na reprodução vegetal, além de servirem como transportadores de monossacarídeos nas plantas, protegerem contra radiações UVB e serem ajustadores osmóticos durante secas ou quedas de temperatura (RIAZ et al., 2016).

Na indústria alimentícia, são utilizadas como alternativa aos corantes artificiais. Porém seu uso ainda é muito restrito devido à dificuldade de isolamento, estabilidade frente a temperaturas altas, uma vez que o processamento de alimentos envolve temperaturas acima de 150 °C, luminosidade, alterações de pH, temperatura

de armazenamento, oxigênio, presença de enzimas, dentre outros fatores (PATRAS et al., 2010).

O interesse em antocianinas vem crescendo após o reconhecimento de seus benefícios à saúde (SCALBERT; WILLIAMSON, 2000). Seus efeitos incluem além de sua atividade antioxidante (KONG et al., 2003), atividades anti-inflamatória (LIETTI et al., 1976), antitumoral (KAMEI et al., 1995), antidiabética (TAKIKAWA et al., 2010), melhoria da visão (TIMBERLAKE, 1988) e efeito protetor contra várias doenças metabólicas, degenerativas e cardiovasculares (VALLS et al., 2009). Estudos em animais mostraram que estas substâncias podem ser úteis na prevenção da obesidade (TSUDA, 2008) e até na prevenção da osteoporose (KAUME et al., 2015).

## **1.2 *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms**

A espécie *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms é uma macrófita aquática, pertencente a família Pontederiaceae e ao gênero *Eichhornia* Kunth (Figura 2). É nativa do Brasil e possivelmente de outros países da América do Sul, capaz de crescer em uma ampla variedade de zonas úmidas, preferindo águas enriquecidas com nutrientes (WILSON et al., 2005). Apresenta suas raízes compridas, folhas pecioladas, sendo seus pecíolos inflados quando estão flutuando ou delgados quando está enraizada, flores sésseis em inflorescências do tipo espiga e com perigônio variável (PEREIRA, 2010). É também conhecida popularmente como aguapé, baronesa ou jacinto d'água e tem como habitat rios, lagos e pântanos.

**Figura 2:** *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms (Foto: a autora)



A capacidade de reprodução desta macrófita é particularmente grande, utilizando tanto reprodução sexuada por sementes e por propagação vegetativa por brotamento (MALIK, 2007). Consegue crescer em diferentes variações de temperatura e nutrientes e sob ótimas condições pode ter sua biomassa duplicada a cada seis dias (DHIR, 2013).

Por causa de sua alta capacidade de crescimento, é considerada uma das dez maiores pragas do mundo (*Global Invasive Species Database*). Sua ocorrência em esteira densa obstrui a passagem de luz, impossibilitando a fotossíntese de plantas aquáticas, que acarreta em diminuição do oxigênio dissolvido na água levando até a extinção de animais aquáticos e criando um ambiente favorável para a procriação de mosquitos vetores da malária e filariose (MALIK, 2007).

Além disso, estas plantas prejudicam a pesca local, pela dificuldade de acesso ao local e diminuição da população de peixes. Também tem causado sérios perigos

aos ecossistemas aquáticos, incluindo o bloqueio de canais, danificação de turbinas em hidroelétricas e outros equipamentos (MALIK, 2007; GUNNARSSON; PETERSEN, 2007).

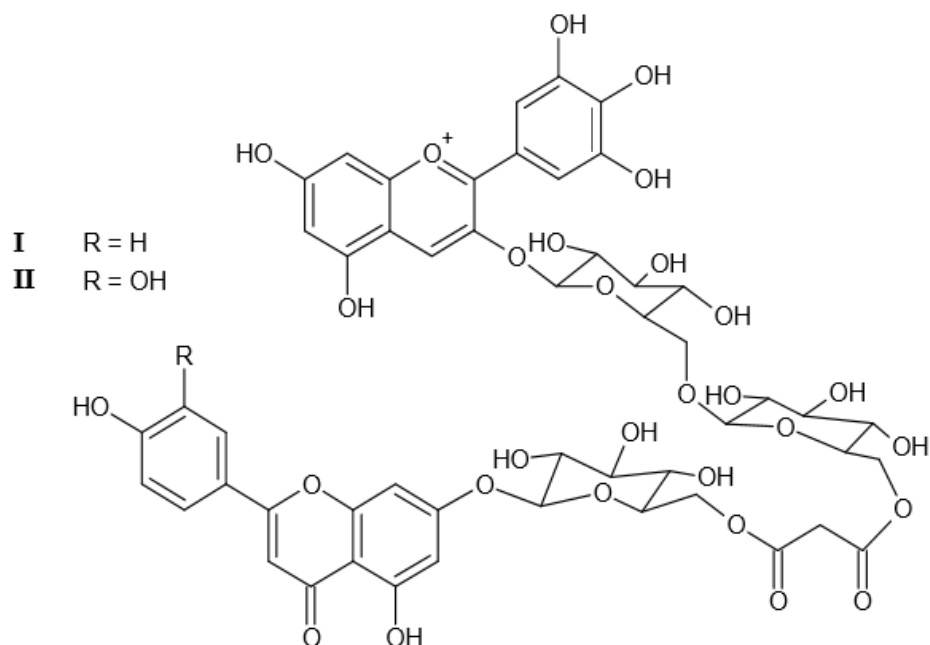
Muitos esforços vem sendo feitos nos últimos anos para contornar a situação e controlar o crescimento do aguapé por métodos de remoção físicos (remoção manual com redes, drenagem permanente da área e remoção mecanizada) (HARLEY et al., 1997), químicos (utilização de reagentes como sal do ácido 2,4-diclorofenoxilacético) (RAM; MOOLANI, 2000) ou biológicos (controle clássico por insetos, plantas alelopáticas ou fungos patogênicos) (MBATI; NEUENSCHWANDER, 2005; ZHANG et al., 2005; SHABANA; MOHAMED. 2005).

Apesar dos problemas que o aguapé pode causar, muitas pesquisas vem sendo feitas para aplicação da planta em outras áreas, como utilização da biomassa para produção de bioenergia, biogás e etanol, ração para o gado e substrato para fertilizantes naturais para plantas (OKEWALE et al., 2016; GUNJA et al., 2016; KHAKET et al., 2012; PÉREZ et al., 2015).

O aguapé é capaz de crescer em águas poluídas e absorver e tolerar grandes quantidades de íons metálicos (LIAO; CHANG, 2004). Desta forma, ele vem sendo muito utilizado na fitorremediação de rios e lagos poluídos. A fitorremediação é a utilização de plantas para a absorção ou captação de poluentes através das raízes e translocá-los para as outras partes da planta (SHARMA et al., 2015).

Várias substâncias já foram isoladas do aguapé, como metabólitos derivados do fenaleno (LALITHA et al., 2012), nas raízes e partes aéreas, e também antocianinas. Duas antocianinas esterificadas com ácido malônico foram isoladas das flores de *E. crassipes* (TOKI et al., 2004) durante um estudo fitoquímico da planta (Figura 3).

**Figura 3:** Antocianinas isoladas de flores de *E. crassipes* (TOKI et al., 2004).



### 1.3 Análise de antocianinas em plantas

As antocianinas são moléculas polares, portanto os solventes mais adequados para sua extração são etanol, metanol ou acetona (KAHKONEN et al., 2001). São normalmente extraídas a frio, utilizando metanol ou etanol acidificados, sendo a extração com metanol mais eficiente (AMR; AL-TAMIMI, 2007). Em relação aos ácidos, os mais utilizados são ácidos clorídrico, fórmico e trifluoracético (ANDERSEN; JORDHEIM, 2006). Ácidos fracos são mais recomendados para evitar a hidrólise dos glicosídeos e são utilizados para diminuir o pH, prevenindo a degradação de antocianinas não aciladas (DA COSTA et al., 2000). Assim, ácidos fortes como ácido clorídrico podem extrair até agliconas e, se não houver controle do pH (entre 2 e 3), não é possível saber se as agliconas vieram da amostra ou como produto da reação de hidrólise (CASTAÑEDA-OVANDO, 2009).

Estas substâncias possuem máximos de absorção característicos no espectro na região do UV na faixa de 285 e 510 nm, que garantem colorações que variam do vermelho ao azul (BORDIGNON et al., 2009). Os valores dos máximos de absorção podem variar de acordo com o pH, que influencia nas formas estruturais que as antocianinas podem assumir.

Para a confirmação da presença das mesmas, pode ser feita análise em Cromatografia em Papel, Cromatografia em Camada Delgada ou Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em modo analítico com coluna de fase reversa C-18, além da observação da coloração característica destas substâncias. É interessante a utilização do método de CLAE com Detector de Arranjo de Diodos (DAD) para observação dos espectros UV das substâncias de interesse (MARÇO et al., 2008; CASTAÑEDA-OVANDO et al.; 2009), uma vez que este detector permite a gravação simultânea de cromatogramas em comprimentos de onda diferentes (GEORGE; MAUTE, 1982).

A cromatografia em coluna aberta (CC) é uma técnica utilizada para purificação de grandes quantidades de amostra, porém não oferece a mesma resolução obtida nas cromatografias em papel e CLAE. Normalmente são utilizadas como fase estacionária C-18 ou Sephadex para fracionamento de extratos antociânicos (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009).

Também é utilizada a extração em fase sólida (EFS) utilizando cartuchos de fase reversa (C-18) e Sephadex para purificação de extratos brutos. A técnica tem o mesmo princípio da cromatografia em coluna, porém seu objetivo principal é dividir a amostra em grupos quimicamente distintos, enquanto a CC promove o isolamento de substâncias em geral. No cartucho com fase estacionária compactada, as antocianinas ficam retidas pela interação com a fase estacionária através de suas

hidroxilas não-substituídas, e os açúcares e outras impurezas são eluídos primeiramente com a água. Logo após, metanol acidificado é utilizado para eluir as substâncias retidas no cartucho, obtendo-se uma fração rica em antocianinas (MARÇO et al., 2008).

As maiores dificuldades encontradas para a purificação e separação de antocianinas são: baixa solubilidade nos solventes utilizados nas técnicas de CLAE, como metanol e água, o fato de apresentarem estruturas complexas e de ocorrerem em misturas, que dificultam o processo de isolamento. Isso pode ocasionar precipitação no começo da coluna, que gera cromatogramas com resolução prejudicada, diminuição da vazão da fase móvel ou bloqueio da coluna. Além do risco de comprometer a coluna, uma vez que a utilização de ácidos fortes na fase móvel favorece este fato. As antocianinas, assim como outros flavonoides, tornam-se menos solúveis como produtos de sua purificação, o que dificulta as etapas seguintes na análise desses compostos (ANDERSEN; JORDHEIM, 2006).

Outras técnicas também são utilizadas para elucidação das formas estruturais das antocianinas, mesmo com pequenas quantidades de material, como por exemplo a Espectrometria de Massas (EM) e a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (ANDERSEN; JORDHEIM, 2006).

A Espectrometria de Massas acoplada a um cromatógrafo (CLAE-EM) foi uma das mais importantes técnicas da última década do século 20. A combinação permite um método de separação e identificação simultâneo de substâncias. Com os dados de EM, é possível conhecer a fórmula molecular exata de uma antocianina. A técnica consiste na geração de íons pela fragmentação das moléculas, sendo a detecção dos fragmentos feita de acordo com a sua massa. Para a análise de antocianinas, geralmente emprega-se ionização por electrospray (*Electrospray Ionization*, ESI), em

que as amostras devem ser introduzidas na forma de solução e também fontes de bombardeamento de átomos rápidos (*Fast Atom Bombardment*, FAB) que também podem ser utilizadas para gerar os fragmentos moleculares (MARÇO et al., 2008).

Pelo fato do isolamento das antocianinas ser um processo muito complicado e assim estarem normalmente em mistura, a utilização da técnica de Ressonância Magnética Nuclear é limitada. Os espectros de RMN podem fornecer informações sobre estrutura molecular, com dados da localização dos átomos de carbono e hidrogênio presentes na molécula. Os solventes mais utilizados para análise de antocianinas são hexadeuterodimetilsulfóxido (DMSO- $d_6$ ) ou tetradeuterometanol (CD<sub>3</sub>OD), acidificados com ácido deuterotrifluoroacético (CF<sub>3</sub>COOD) em várias proporções (2 a 20%) para que ocorra a conversão para o cátion flavílico. Por serem substâncias muito reativas e de fácil degradação, os espectros de RMN apresentam baixa resolução, dificultando a elucidação das formas estruturais destas moléculas (MARÇO et al., 2008; ANDERSEN; JORDHEIM, 2006).

A combinação dos dados obtidos utilizando as técnicas de CLAE-UV, RMN e EM pode ser suficiente para a identificação de antocianinas.

## 2 OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo o isolamento e identificação de antocianinas presentes nas raízes da macrófita *E. crassipes* por meio de técnicas como Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Espectrometria de Massas.

### 3 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Os materiais e equipamentos utilizados durante o estudo 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;
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Jasco equipado com duas bombas PU-2086Plus, forno termostatizado CO-2060Plus, injetor automático AS-2055Plus, desaerador DG-280-53, misturador MX-2080-31, detector de arranjo de fotodiodos UV-Vis MD-2018Plus. As colunas cromatográficas utilizadas no modo analítico foram de fase reversa C-18 Kinetex (Allcrom®, 4,6 × 150 mm, 5 µm) e ChromSep SS (Varian®, 4,6 × 250 mm, 5 µm). As análises em escala semipreparativa foram realizadas em coluna Agilent Zorbax (RX-C18, 9,4 x 250 mm, 5 µm).
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Shimadzu CBM-20 com detector de arranjo de diodo SPD-M20A, bombas de alta pressão LC-20AD, degaseificador DGU-20A-5 e bomba de infusão Cole Parmer, equipado com coluna Kinetex C18 (Allcrom® 150 x 4.6 mm, 5 µm), acoplado ao Espectrômetro de Massas ultrOToF (Bruker Daltonic), com ionização por electrospray (ESI), analisador tipo QqToF (analisador do tipo quádruplo, tempo de voo em sequência), fluxo de 300 µL h<sup>-1</sup> e modo de ionização positivo. Como gás nebulizador foi utilizado nitrogênio, 4 bar e fluxo de 8 L min<sup>-1</sup>;
- Coluna de vidro preenchida com sílica gel de fase reversa C18 de 230-400 mesh (Merck®).

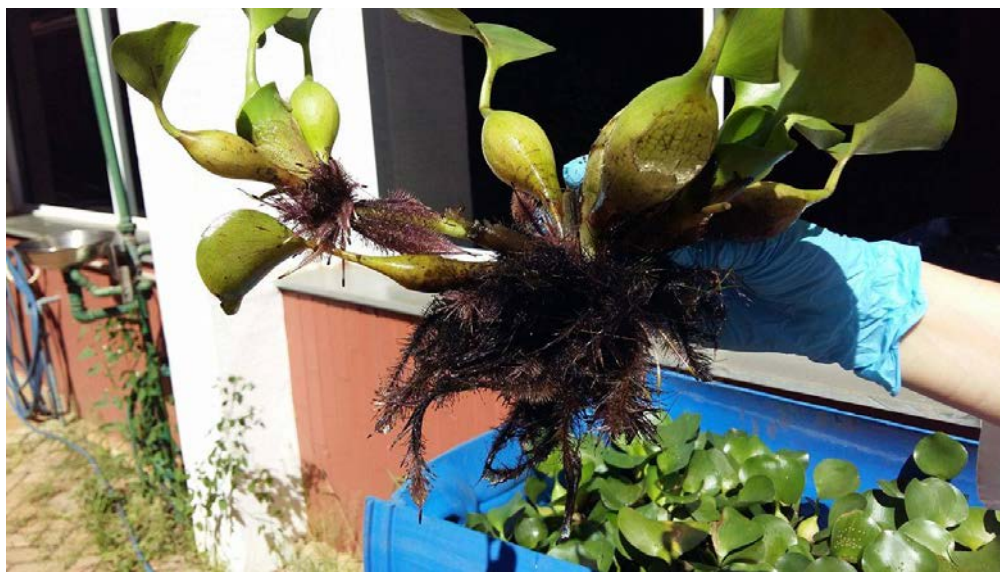
- Cartuchos SPE C-18 (Strata, 500 mg/3 mL);
- Filtro de membrana hidrofóbica para seringa de porosidade 0,22 $\mu$ m (Exacta®).
- Os solventes utilizados foram Metanol da marca Merck® e Sigma-Aldrich® em grau CLAE, água ultrapura deionizada em aparelho da marca Milli-Q (resistividade mínima 18,2 M $\Omega$ .cm a 25 °C), Ácido Fórmico, grau de pureza analítico e Ácido Clorídrico, grau de pureza analítico.

## 4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

### 4.1 Preparação do extrato de *E. crassipes*

As macrófitas *E. crassipes* foram coletadas no Clube Náutico de Araraquara em Janeiro de 2016. Depois, foram lavadas em água corrente para remoção de terra e caramujos. No momento da coleta, priorizou-se aquelas cujas raízes eram mais jovens, preferencialmente apresentando coloração arroxeada (Figura 4).

**Figura 4:** Destaque da coloração das raízes da macrófita *E. crassipes* ao lado da caixa de cultivo no Instituto de Química de Araraquara (Foto: a autora).



As partes aéreas foram descartadas e as raízes cortadas em partes menores e trituradas com auxílio de nitrogênio líquido. Após secagem, pesou-se o material vegetal e obteve-se 206,52 g, que foram submetidos ao processo de maceração com 1500 mL de MeOH acidificado com 0,1% de HCl (pH 2-3). O erlenmeyer contendo o material vegetal e o solvente foi colocado em ultrassom por 30 minutos e, após 24 horas, a solução extrativa foi filtrada sob pressão reduzida.

Em seguida, as soluções foram concentradas em rota evaporador acoplado a bomba de vácuo e em banho a temperatura controlada de 30 °C. Após 3 extrações sucessivas do mesmo material, obteve-se 6,294 g de extrato bruto.

Todos os procedimentos foram realizados evitando ao máximo a exposição das soluções extrativas e extratos à luz, utilizando papel-alumínio para envolver os frascos.

#### **4.2 Análise por CLAE do extrato bruto**

Uma alíquota do extrato (27,3 mg) foi submetida a *clean up* utilizando cartucho C18, ativado com 6 mL MeOH com 0,1% de HCl (pH 2-3) e depois em 6 mL H<sub>2</sub>O com 0,1% HCl (pH 2-3). A amostra, solubilizada em MeOH com 0,1% HCl, foi então aplicada no cartucho e eluída com 16 mL de H<sub>2</sub>O com 0,1% HCl, obtendo-se a fração aquosa, rica em açúcares. Em seguida, a amostra foi eluída com 10 mL de MeOH com 0,1% HCl, obtendo-se a fração rica em antocianinas, que apresentava coloração roxa.

As duas frações obtidas foram secas em capela, obtendo-se 20,7 mg da fração aquosa e 4,7 mg da fração metanólica.

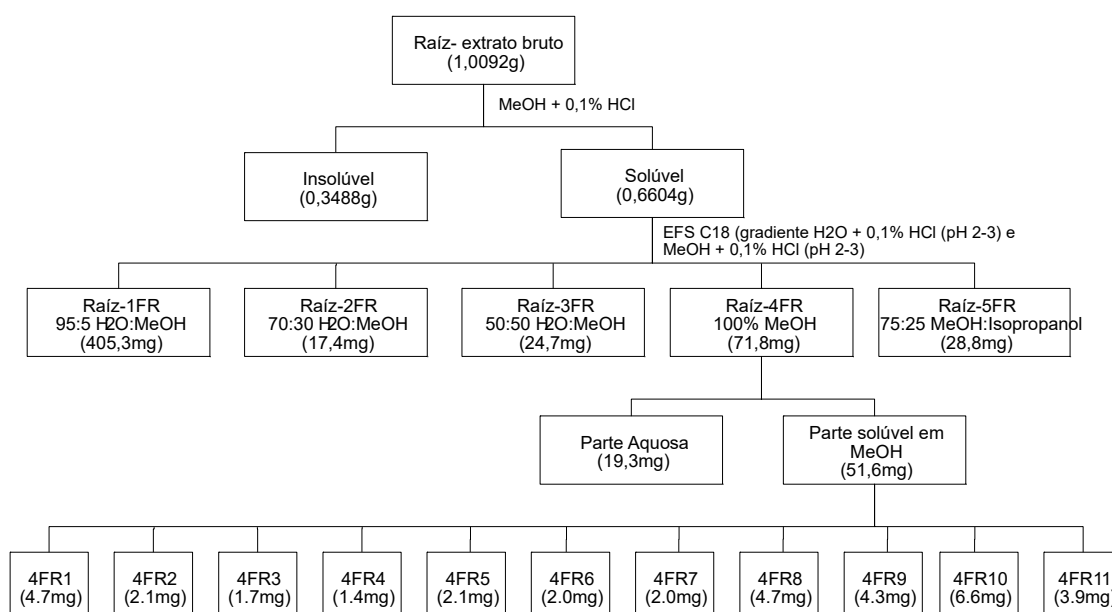
A fração metanólica foi solubilizada novamente em MeOH com 0,1% HCl, filtrada em filtro de membrana (0,22 µm) e coletada em vial. Logo após, foi analisada por CLAE-DAD no cromatógrafo Jasco com a coluna analítica ChromSep SS utilizando a vazão de 1 mL/min, observando os espectros de UV na região de 254-650 nm. Os solventes utilizados como fase móvel foram H<sub>2</sub>O com 0,25% Ácido Fórmico (A) e MeOH com 0,5% Ácido Fórmico (B). Primeiramente foi feito um gradiente exploratório (0,01-5 min: 5% B; 5-20 min: 5→100% B; 20-30 min: 100% B; 30-32 min: 100 → 5% B; 32-42 min: 5% B) sendo o volume de injeção de 20 µL.

Após otimização do gradiente, foi desenvolvido método com melhor resolução (0,01-10 min: 60% B; 10-20 min: 60 →100% B; 20-30 min: 100% B; 30-35 min: 100→60% B; 35-40 min: 60% B).

### 4.3 Fracionamento do extrato bruto

Uma alíquota do extrato bruto das raízes de *E. crassipes* (1,0092 g) foi submetida a extração em fase sólida (EFS) para separação das antocianinas. A alíquota solúvel em MeOH com 0,1% HCl (0,6604 g) foi aplicada em coluna de C18 (17 x 2,5 cm). Foi feito então um gradiente de H<sub>2</sub>O com 0,1% HCl e MeOH com 0,1% de HCl como fase móvel e obtiveram-se 5 frações (Esquema 1). Para cada fração, foram utilizados 130 mL de fase móvel e posteriormente concentradas em rota evaporador.

**Esquema 1:** Fluxograma de fracionamento do extrato bruto das raízes.



As frações Raiz-3FR, Raiz-4FR e Raiz-5FR apresentaram coloração laranja, roxa e rosa, respectivamente, e foram analisadas em CLAE-DAD no cromatógrafo Jasco, primeiramente em escala analítica com a coluna ChromSep SS, nas condições da última análise do extrato bruto e logo depois em uma condição otimizada para estas frações (0,01 – 10 min: 57% B; 10 – 15 min: 57 → 100% B; 15 – 20 min: 100% B; 20 – 25 min: 100 → 57% B; 25 – 30 min: 57% B), sendo a concentração das amostras injetadas de 1 mg/mL, volume de injeção de 20 µL; fluxo de 1 mL/min; tempo de análise de 30 minutos e cromatograma monitorado em 510 nm. A fração Raiz-4FR por apresentar a coloração característica de antocianinas e em seu espectro UV haver regiões de absorção acima de 500 nm, foi submetida à separação em CLAE em escala semipreparativa.

#### **4.4 Fracionamento da fração Raiz-4FR**

Para o preparo da amostra para injeção, foi realizado novamente um processo de *clean up* utilizando cartucho C18 ativado com MeOH com 0,1% HCl. A fração Raiz-4FR, eluída em MeOH, foi filtrada e coletada em diversos vials, sendo a concentração da amostra em cada um dos vials de aproximadamente 6 mg/mL.

A separação da amostra Raiz-4FR por CLAE semipreparativa foi feita utilizando o método otimizado, descrito anteriormente na escala analítica com algumas alterações (0,01 – 10 min: 57% B; 10 – 12 min: 57 → 100% B; 12 – 17 min: 100% B; 17 – 19 min: 100 → 57% B; 19 – 25 min: 57% B), utilizando a coluna Agilent Zorbax (RX-C18, 9,4 x 250 mm, 5 µm) no cromatógrafo Jasco, com fluxo de 2,5 mL/min e volumes de injeção variando de 20 a 60 µL, observando sempre a resolução dos cromatogramas, O comprimento de onda escolhido para a separação

foi de 254 nm e o tempo total de análise foi de 25 minutos. Ao final foram obtidas onze subfrações (Figura 5, Tabela 2).

**Figura 5:** Subfrações de Raiz-4FR.



**Tabela 2:** Tabela das subfrações obtidas na separação por CLAE-semipreparativa.

Fração	Massa (mg)	t <sub>R</sub> (min)
Raiz-4FR1	4,7	3,46
Raiz-4FR2	2,1	3,92
Raiz-4FR3	1,7	4,04
Raiz-4FR4	1,4	4,39
Raiz-4FR5	3,1	4,62
Raiz-4FR6	2,0	5,20
Raiz-4FR7	2,0	7,32
Raiz-4FR8	4,7	8,73
Raiz-4FR9	4,3	12,00
Raiz-4FR10	6,6	16,88
Raiz-4FR11	3,9	17,47

#### 4.5 Análise das subfrações de Raiz-4FR

Todas as onze subfrações foram submetidas a análise em CLAE-DAD em gradiente analítico utilizando-se a coluna analítica ChromSep SS. Os solventes utilizados foram MeOH com 0,5% de Ácido Fórmico (Solvente B) e H<sub>2</sub>O com 0,25% de Ácido Fórmico (Solvente A). As amostras analisadas estavam em concentração de

1 mg/mL, o tempo das análises foi de 30 minutos com fluxo de 1,0 mL/minuto, volume de injeção de 20 µL e o  $\lambda$  observado de 510 nm (0,01min – 30 min: 20% → 100% B).

As subfrações Raiz-4FR5, Raiz-4FR8 e Raiz-4FR9 apresentaram relativamente boa resolução, grau de pureza e espectros de UV com absorção acima de 510 nm. Portanto, estas três frações foram submetidas a análise em CLAE acoplado a CLAE-EM, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP em Ribeirão Preto. Para as análises, as amostras foram solubilizadas na concentração de 1 mg/mL e foi utilizada uma condição experimental otimizada, em que os solventes eram MeOH com 0,1% de Ácido Fórmico (Solvente B) e H<sub>2</sub>O com 0,1% de Ácido Fórmico (Solvente A). O tempo da análise foi de 75 minutos, com fluxo de 1,0 mL/minuto, volume de injeção de 20 µL e coluna analítica Kinetex C18 (150 x 4.6 mm, 5 µm) no cromatógrafo Shimadzu(0,01 – 50 min: 10 → 90% B; 50 – 60 min: 90 → 100% B; 60 – 65 min: 100% B; 65 – 67 min: 100% → 10% B; 67 – 75 min: 10% B).

A fim de comparação com os cromatogramas obtidos no cromatógrafo Shimadzu acoplado a Espectrômetro de Massas, utilizou-se o mesmo método de análise e a mesma coluna analítica no cromatógrafo Jasco.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Preparação do extrato de *E. crassipes*

As raízes de *E. crassipes* selecionadas para a preparação do extrato metanólico apresentavam coloração roxa. As raízes foram trituradas com nitrogênio líquido por ser um processo rápido, uma vez que se elas ficassem expostas ao ar e luminosidade para secagem, os compostos de interesse poderiam ser degradados. Apesar da rapidez, a técnica não foi muito eficiente, tendo como produto raízes levemente úmidas. Desta forma não pode-se obter exatamente o peso do material vegetal seco.

A técnica de maceração com metanol acidificado foi escolhida por apresentar bons resultados na extração de compostos fenólicos, sendo a adição do ácido fundamental para a estabilização e extração de antocianinas. A solução extrativa apresentou coloração roxa, indicando que antocianinas poderiam estar presentes, uma vez que foi utilizada metodologia própria para extração destes compostos.

Após a extração, os extratos foram concentrados em rota evaporador com temperatura controlada de 30 °C, evitando assim a degradação das substâncias de interesse, bem como a utilização de papel-alumínio nos frascos que teve o mesmo objetivo.

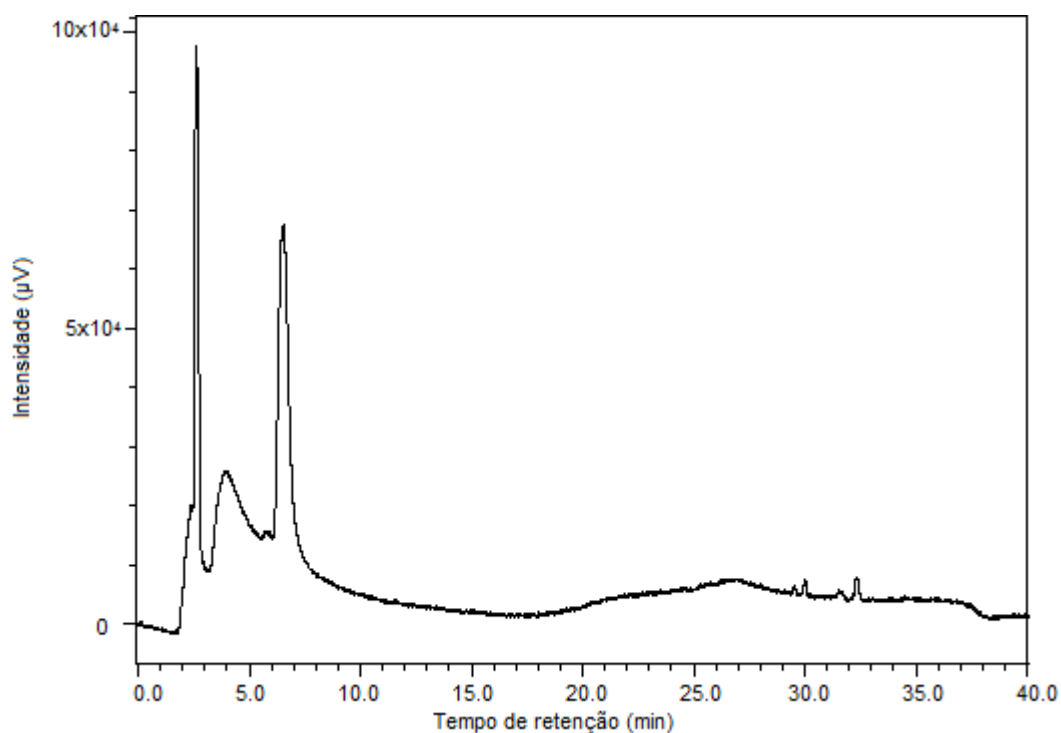
### 5.2 Análise por CLAE do extrato bruto

O processo de *clean up* realizado antes da injeção em CLAE-DAD foi utilizado para limpeza da amostra, de forma a não passarem partículas insolúveis para o equipamento e, mais do que isso, como uma técnica de separação, uma vez que a

fração contendo antocianinas foi separada dos açúcares, ácidos orgânicos fenólicos e outros compostos do extrato.

Pela análise em CLAE-DAD pode ser confirmada a presença de antocianinas no extrato bruto, por meio da observação de sinais na região de 510 nm, como mostra a Figura 6. Não foi possível inferir quantos derivados de antocianinas estavam presentes na amostra, pelo fato dos picos estarem muito largos, indicando que as substâncias não foram devidamente separadas.

**Figura 6:** Cromatograma obtido por CLAE-DAD do extrato bruto das raízes de *E. crassipes*. Detecção em 510 nm.



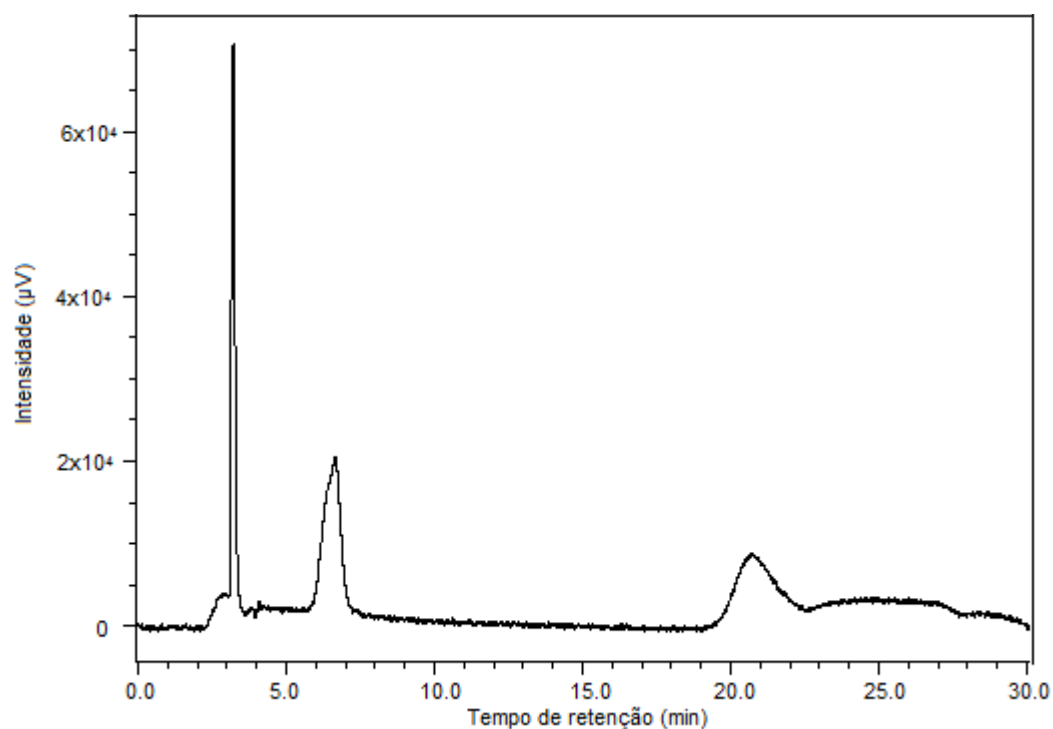
Condições de análise: cromatógrafo Jasco; coluna analítica ChromSep SS; volume de injeção: 20 µL; concentração da amostra: 1 mg/mL; fluxo: 1 mL/min; tempo de análise: 40 minutos; solventes utilizados: (A) H<sub>2</sub>O + 0.25% Ácido Fórmico, (B) MeOH + 0,5% Ácido Fórmico (0,01-10 min: 60% B; 10-20 min: 60 →100% B; 20-30 min: 100% B; 30-35 min: 100→60% B; 35-40 min: 60% B)

### 5.3 Fracionamento do extrato bruto

A técnica de EFS foi escolhida com o intuito de se poder utilizar uma grande quantidade de massa de extrato bruto, para assim ter massa suficiente de material para as análises que viriam a seguir em escala semipreparativa. A amostra foi solubilizada em MeOH acidificado, pois houve dificuldade na solubilização com a primeira fase móvel do gradiente que seria feito, no caso 95:5 H<sub>2</sub>O + 0,25% Ácido Fórmico: MeOH + 0,5% Ácido Fórmico. Desta forma, após o procedimento, as frações Raiz-3FR, Raiz-4FR e Raiz-5FR, que apresentaram coloração característica, foram analisadas em CLAE-DAD. As frações Raiz-3FR e Raiz-4FR foram analisadas em  $\lambda$  de 510 nm, como mostram as Figuras 7 e 8. O comprimento de onda escolhido para análise da fração Raiz-5FR foi 310 nm, mostrado na Figura 9, devido a baixa resolução do cromatograma de comprimento de onda 510 nm.

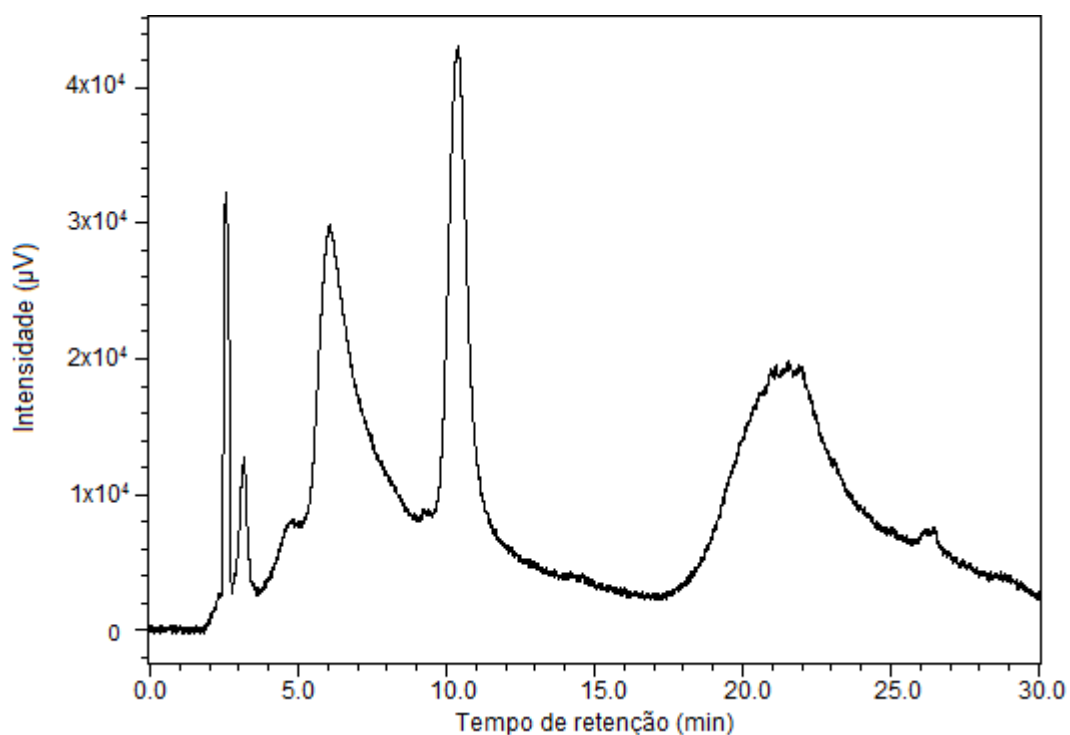
A fração Raiz-4FR foi submetida a CLAE em escala semipreparativa, pois apresentou maior número de sinais e com maior intensidade acima de 500 nm, além de sua coloração ser roxa e ter quantidade suficiente de massa.

**Figura 7:** Cromatograma obtido por CLAE-DAD da fração Raiz-3FR. Detecção em 510 nm.



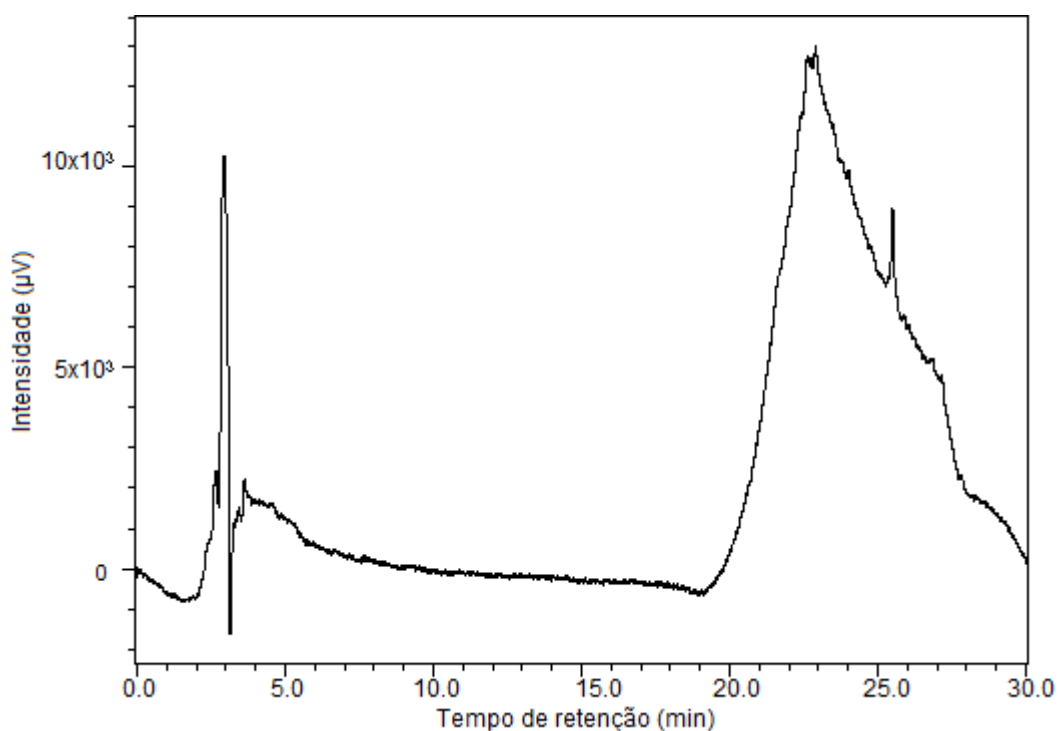
Condições de análise: cromatógrafo Jasco; coluna analítica ChromSep SS; volume de injeção: 20 µL; concentração da amostra: 1 mg/mL; fluxo: 1 mL/min; tempo de análise: 30 minutos; solventes utilizados: (A) H<sub>2</sub>O + 0,25% Ácido Fórmico, (B) MeOH + 0,5% Ácido Fórmico (0,01 – 10 min: 57% B; 10 – 15 min: 57 → 100% B; 15 – 20 min: 100% B; 20 – 25 min: 100 → 57%B; 25 – 30 min: 57% B)

**Figura 8:** Cromatograma obtido por CLAE-DAD da fração Raiz-4FR. Detecção em 510 nm.



Condições de análise: cromatógrafo Jasco; coluna analítica ChromSep SS; volume de injeção: 20 µL; concentração da amostra: 1 mg/mL; fluxo 1 mL/min; tempo de análise: 30 minutos; solventes utilizados: (A) H<sub>2</sub>O + 0,25% Ácido Fórmico, (B) MeOH + 0,5% Ácido Fórmico (0,01 – 10 min: 57% B; 10 – 15 min: 57 → 100% B; 15 – 20 min: 100% B; 20 – 25 min: 100 → 57%B; 25 – 30 min: 57% B).

**Figura 9:** Cromatograma obtido por CLAE-DAD da fração Raiz-5FR. Detecção em 310 nm.

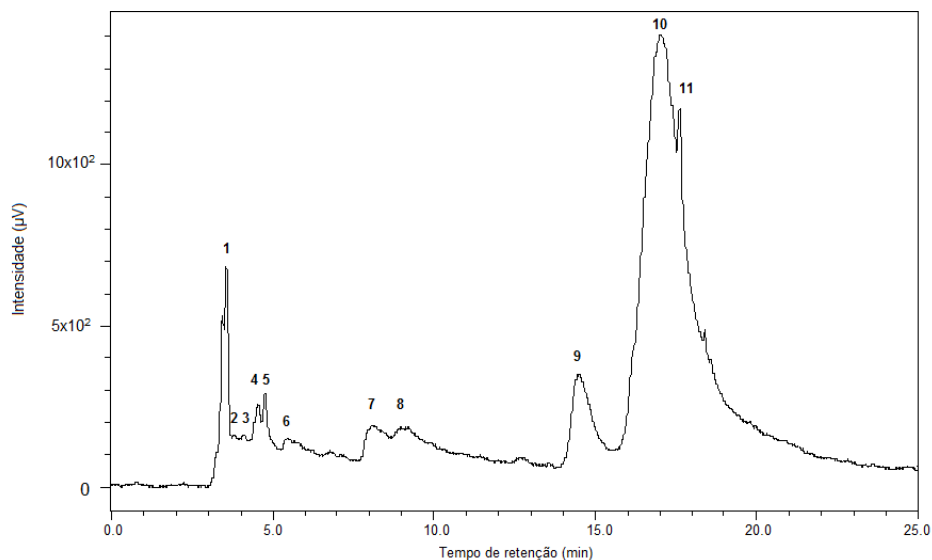


Condições de análise: cromatógrafo Jasco; coluna analítica ChromSep SS; volume de injeção: 20  $\mu$ L; concentração da amostra: 1 mg/mL; fluxo 1 mL/min; tempo de análise: 30 minutos; solventes utilizados: (A) H<sub>2</sub>O + 0,25% Ácido Fórmico, (B) MeOH + 0,5% Ácido Fórmico (0,01 – 10 min: 57% B; 10 – 15 min: 57 → 100% B; 15 – 20 min: 100% B; 20 – 25 min: 100 → 57%B; 25 – 30 min: 57% B)

#### 5.4 Fracionamento da fração Raiz-4FR

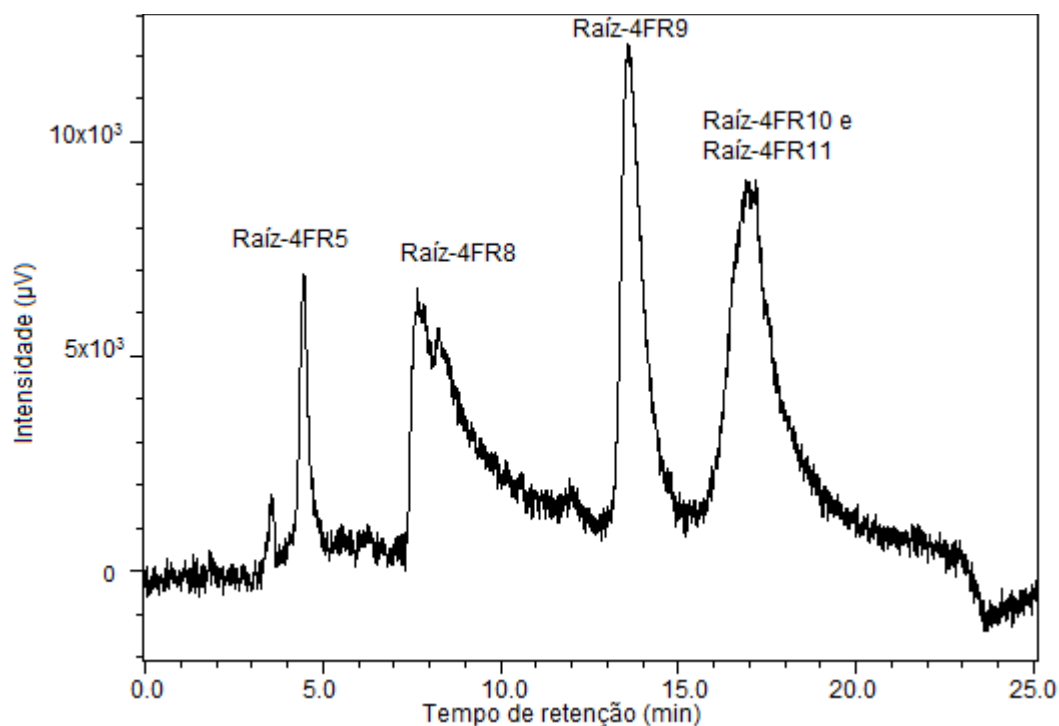
A fração Raiz-4FR após passar pelo processo de *clean up* como forma de purificação da amostra e eliminação de interferentes, como descrito anteriormente, foi submetida a CLAE semipreparativa em que obtiveram-se 11 frações. O comprimento de onda escolhido para acompanhar a separação foi de 254 nm, a fim de coletar-se o maior número de substâncias possíveis (Figuras 10 e 11). Todas as frações obtidas foram analisadas individualmente por CLAE-DAD (Apêndice A).

**Figura 10:** Cromatograma obtido por CLAE-DAD da fração Raiz-4FR em escala semipreparativa. Detecção em 254 nm.



Condições de análise: coluna analítica ChromSep SS; cromatógrafo Jasco; volume de injeção: 20 µL; concentração da amostra: 6 mg/mL; fluxo 2,5mL/min; tempo de análise: 25 minutos; solventes utilizados: (A) H<sub>2</sub>O + 0,25% Ácido Fórmico, (B) MeOH + 0,5% Ácido Fórmico (0,01 – 10 min: 57% B; 10 – 15 min: 57 → 100% B; 15 – 20 min: 100% B; 20 – 25 min: 100 → 57%B; 25 – 30 min: 57% B). Número correspondente as subfrações: (1) Raiz-4FR1, (2) Raiz-4FR2, (3) Raiz-4FR3; (4) Raiz-4FR4, (5) Raiz-4FR5, (6) Raiz-4FR6, (7) Raiz-4FR7, (8) Raiz-4FR8, (9) Raiz-4FR9, (10) Raiz-4FR10, (11) Raiz-4FR11.

**Figura 11:** Cromatograma obtido por CLAE-DAD da fração Raiz-4FR em escala semipreparativa. Detecção em 510 nm.



Condições de análise: coluna analítica ChromSep SS; cromatógrafo Jasco; volume de injeção: 20 µL; concentração da amostra: 6 mg/mL; fluxo 2,5 mL/min; tempo de análise: 25 minutos; solventes utilizados: (A) H<sub>2</sub>O + 0,25% Ácido Fórmico, (B) MeOH + 0,5% Ácido Fórmico (0,01 – 10 min: 57% B; 10 – 15 min: 57 → 100% B; 15 – 20 min: 100% B; 20 – 25 min: 100 → 57%B; 25 – 30 min: 57% B).

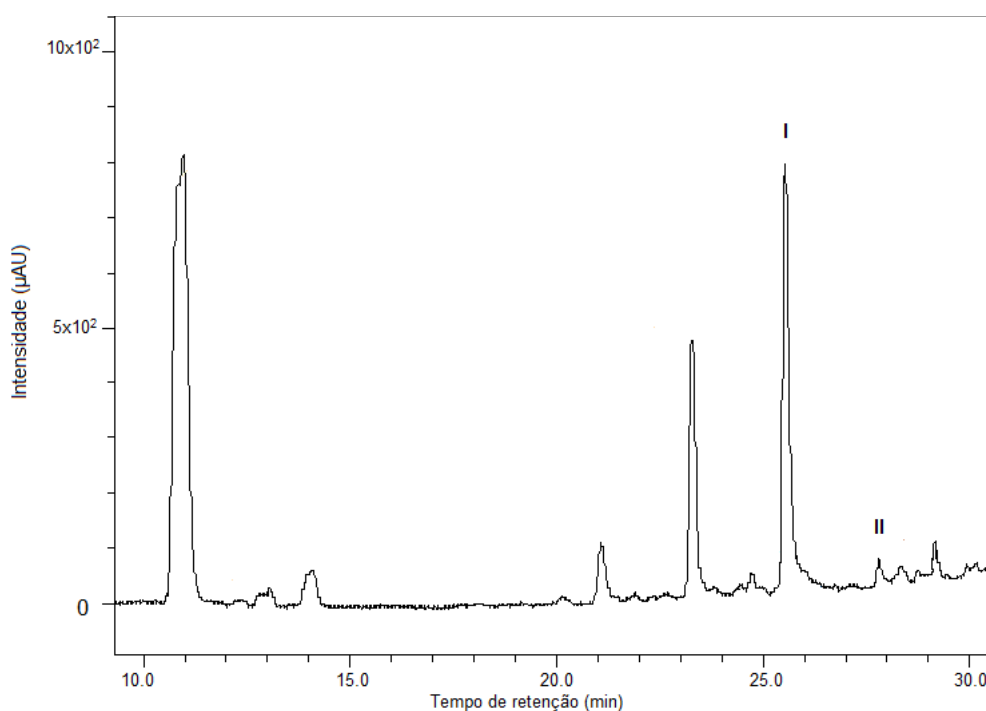
As subfrações Raiz-4FR10 e Raiz-4FR11, apesar de apresentarem substâncias com absorção em ~510 nm, não foram escolhidas para análise por CLAE-DAD-EM por não apresentarem bom grau de purificação. As subfrações Raiz-4FR5, Raiz-4FR8 e Raiz-4FR9 foram escolhidas então para posteriores análises por estarem menos complexas e possuírem maior massa para manipulação, em comparação com o restante das frações.

## 5.5 Análise das subfrações de Raiz-4FR

### 5.5.1 Análise da subfração Raiz-4FR5

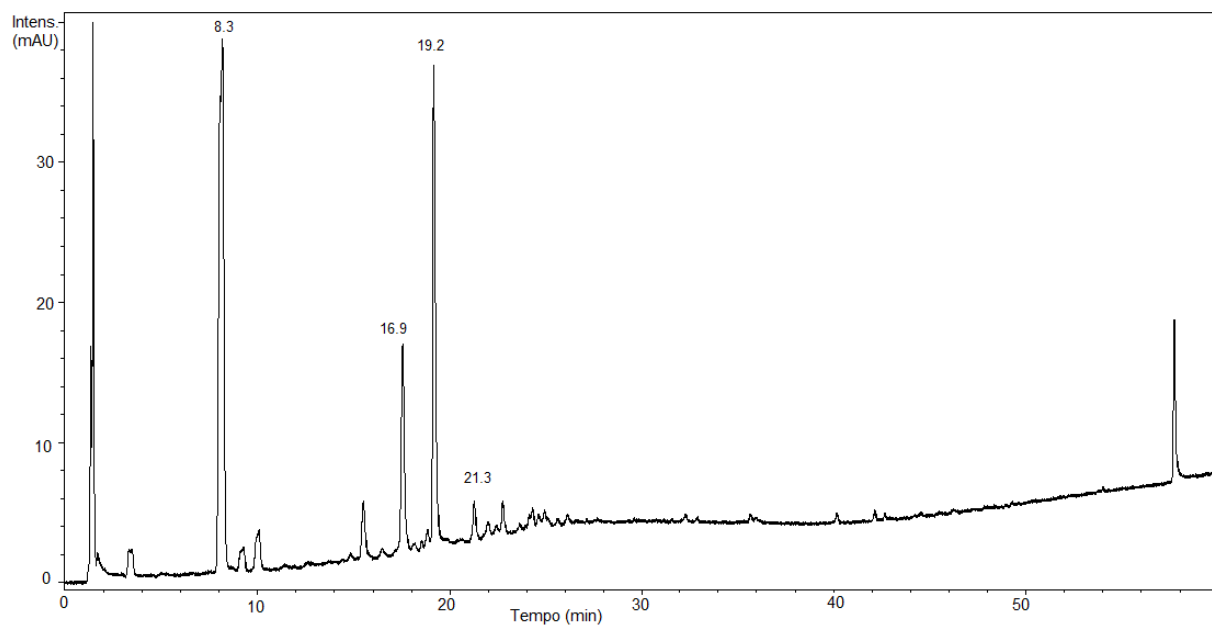
A subfração Raiz-4FR5 foi analisada por CLAE-DAD (IQ-Unesp) e por CLAE-DAD-EM (FCFRP-USP) em cromatógrafos Jasco e Shimadzu, respectivamente. Os cromatogramas obtidos nos dois equipamentos mostram perfis parecidos e estão apresentados nas Figuras 12 a 14. Os picos correspondentes nas duas análises apresentam tempos de retenção com diferença de aproximadamente 6,3 minutos.

**Figura 12:** Cromatograma obtido por CLAE-DAD da fração Raiz-4FR5 em coluna analítica Kinetex. Detecção em 254 nm.



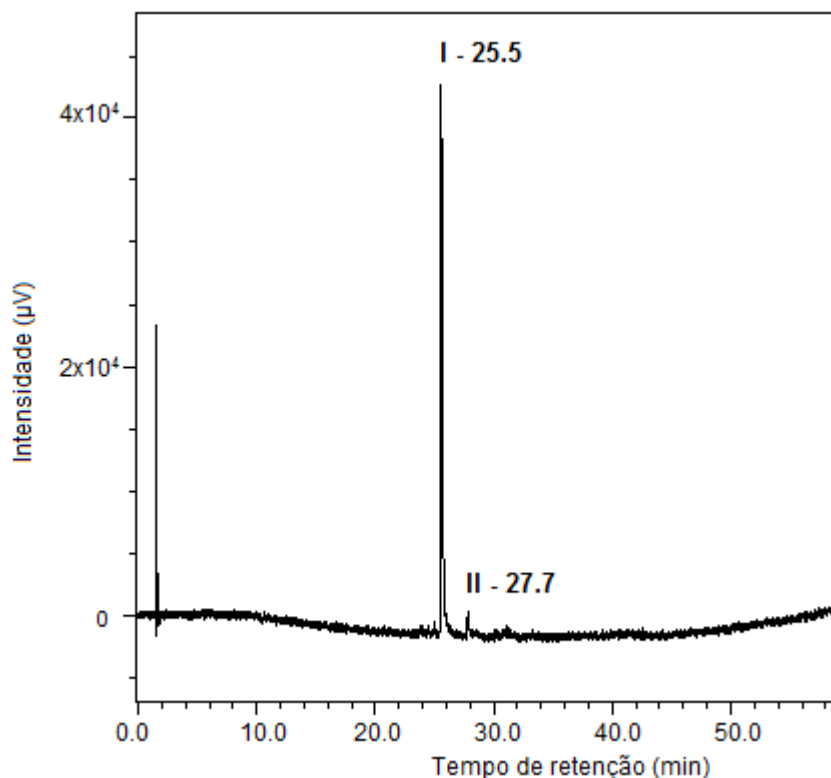
Condições de análise: coluna analítica Kinetex; cromatógrafo Jasco; volume de injeção: 20 µL; concentração da amostra: 1 mg/mL; fluxo 1 mL/min; tempo de análise: 75 minutos; solventes utilizados: (A) H<sub>2</sub>O + 0,1% Ácido Fórmico, (B) MeOH + 0,1% Ácido Fórmico (0,01 – 50 min: 10 → 90% B; 50 – 60 min: 90 → 100% B; 60 – 65 min: 100% B; 65 – 67 min: 100% → 10% B; 67 – 75 min: 10% B)

**Figura 13:** Cromatograma obtido por CLAE-DAD-EM de Raiz-4FR5 em coluna analítica Kinetex. Detecção em 254 nm.



Condições de análise: coluna analítica Kinetex; cromatógrafo Shimadzu; volume de injeção: 20  $\mu$ L; concentração da amostra: 1 mg/mL; fluxo 1 mL/min; tempo de análise: 75 minutos; solventes utilizados: (A) H<sub>2</sub>O + 0,1% Ácido Fórmico, (B) MeOH + 0,1% Ácido Fórmico (0,01 – 50 min: 10  $\rightarrow$  90% B; 50 – 60 min: 90  $\rightarrow$  100% B; 60 – 65 min: 100% B; 65 – 67 min: 100%  $\rightarrow$  10% B; 67 – 75 min: 10% B)

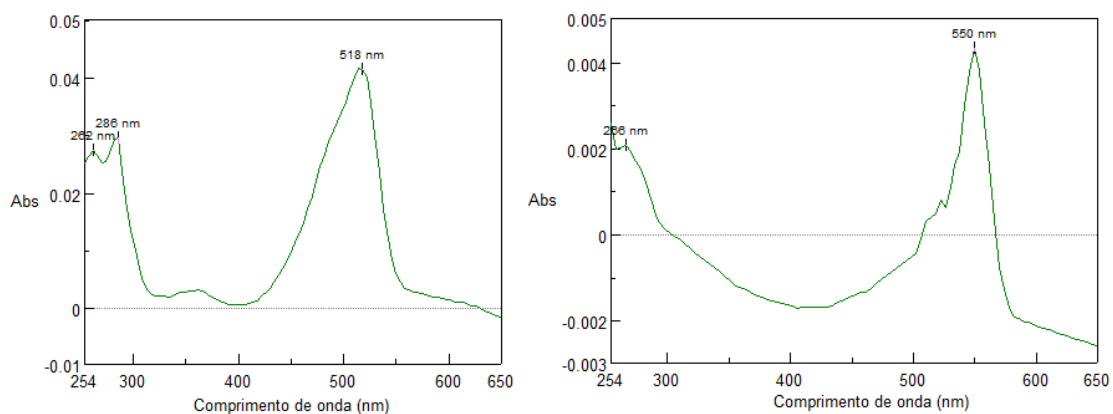
**Figura 14:** Cromatograma obtido por CLAE-DAD da fração Raiz-4FR5 em coluna analítica Kinetex. Detecção em 510 nm.



Condições de análise: coluna analítica Kinetex; cromatógrafo Jasco; volume de injeção: 20 µL; concentração da amostra: 1 mg/mL; fluxo 1 mL/min; tempo de análise: 75 minutos; solventes utilizados: (A) H<sub>2</sub>O + 0,1% Ácido Fórmico, (B) MeOH + 0,1% Ácido Fórmico (0,01 – 50 min: 10 → 90% B; 50 – 60 min: 90 → 100% B; 60 – 65 min: 100% B; 65 – 67 min: 100% → 10% B; 67 – 75 min: 10% B).

Os espectros de absorção das substâncias I e II obtidos no detector DAD (IQ-Unesp) estão apresentados na Figura 15. Os máximos de absorção ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) em 518 e 550 nm para I e II, respectivamente, sugerem que essas substâncias são derivados antocianicos, pois apresentam valores característicos de absorção na faixa de 510 a 560 nm, atribuídos aos anéis B e C, e na faixa de 250 a 270 nm, atribuído ao anel A (LOPES et al., 2007).

**Figura 15:** Espectros de absorção das substâncias I e II (CLAE-DAD).

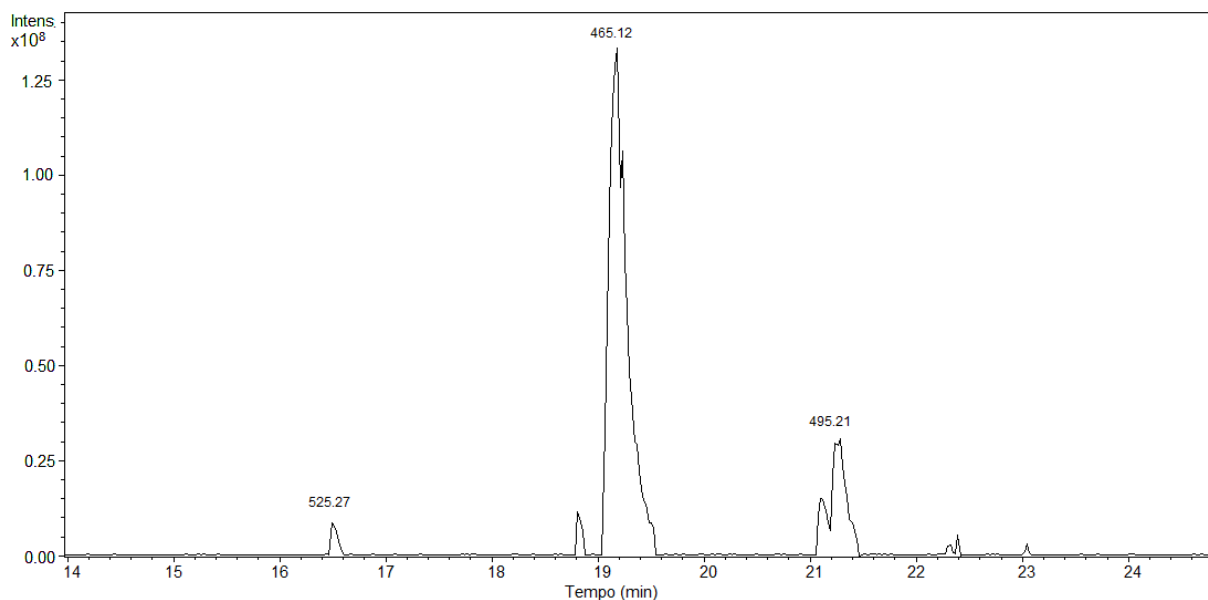


Por meio do cromatograma de íons totais da fração Raiz-4FR5 (Figura 16), pôde-se atribuir a massa dos íons das substâncias I e II (Tabela 3). Os espectros de massas dos íons precursores ( $MS^2$ )  $m/z$  465,12 e 494,21 foram obtidos e estão apresentados na Figura 17.

**Tabela 3:** Antocianinas identificadas na subfração Raiz-4FR5.

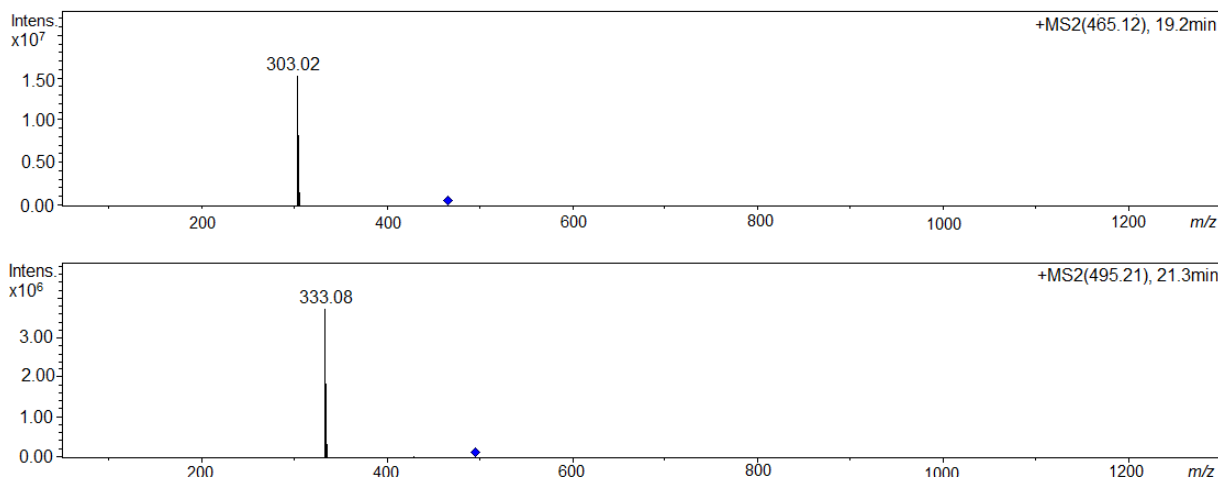
Substância	$t_R$ (min)	$t_R$ (min)	$[M-CI]^+$	Íon produto
	(CLAE-DAD)	(CLAE-DAD-EM)	( $m/z$ )	( $m/z$ )
I	25,5	19,2	465,12	303,02
II	27,7	21,3	495,21	333,08

**Figura 16:** Região ampliada do cromatograma dos íons totais da subfração Raiz-4FR5.

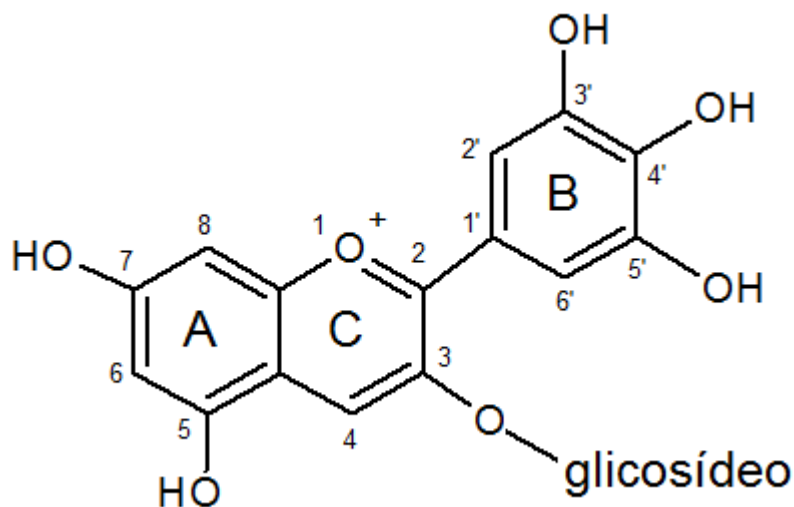


A substância **I** foi sugerida como sendo delphinidina-3-O-glicosídeo ( $C_{21}H_{21}O_{12}$ , 465,38, Figura 18), com base na massa do íon ( $m/z$  465,12,  $[M-Cl]^+$ ) e do principal fragmento obtido no espectro  $MS^2$  ( $m/z$  303,02), referente à aglicona delphinidina. Sugere-se que o glicosídeo esteja ligado ao oxigênio do carbono na posição 3, pois é a forma mais usual desta substância (JOAQUÍN-CRUZ et al., 2015). Não é possível saber a identidade do glicosídeo ligado à aglicona, pois tanto glicose quanto galactose tem a mesma massa molecular, e nem se trata-se de um piranosídeo ou furanosídeo. Seriam necessários estudos mais aprofundados neste aspecto.

**Figura 17:** Espectros MS<sup>2</sup> das substâncias I e II.



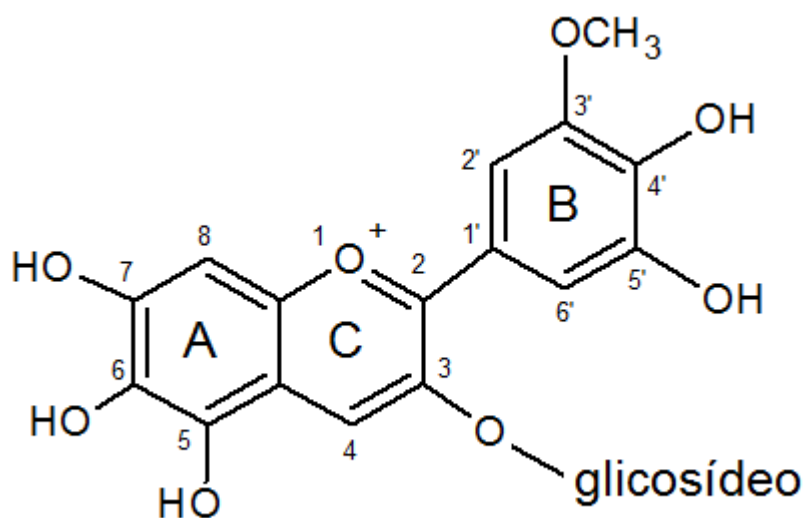
**Figura 18:** Proposta estrutural para substância I (delfinidina-3-O-glicosídeo).



O espectro de massas da substância II (Figura 17) apresentou íon  $[M-Cl]^+$   $m/z$  495,21, que possui 30 unidades de massa a mais que a substância I. Pode-se atribuir esse valor à presença de um grupo metoxílico ( $OCH_3$ ), resultando na fórmula molecular  $C_{22}H_{23}O_{13}$  ( $m/z$  495,40). Com base na análise dos espectros de massas (Figuras 16 e 17, Tabela 3), sugere-se que a estrutura corresponda à antocianina 6-

hidroxi-petunidina-3-O-glicosídeo (Figura 19). Do mesmo modo que para a substância I, é sugerido que o glicosídeo esteja ligado à aglicona na posição 3.

**Figura 19:** Proposta estrutural para substância II (6-hidroxi-petunidina-3-O-glicosídeo).



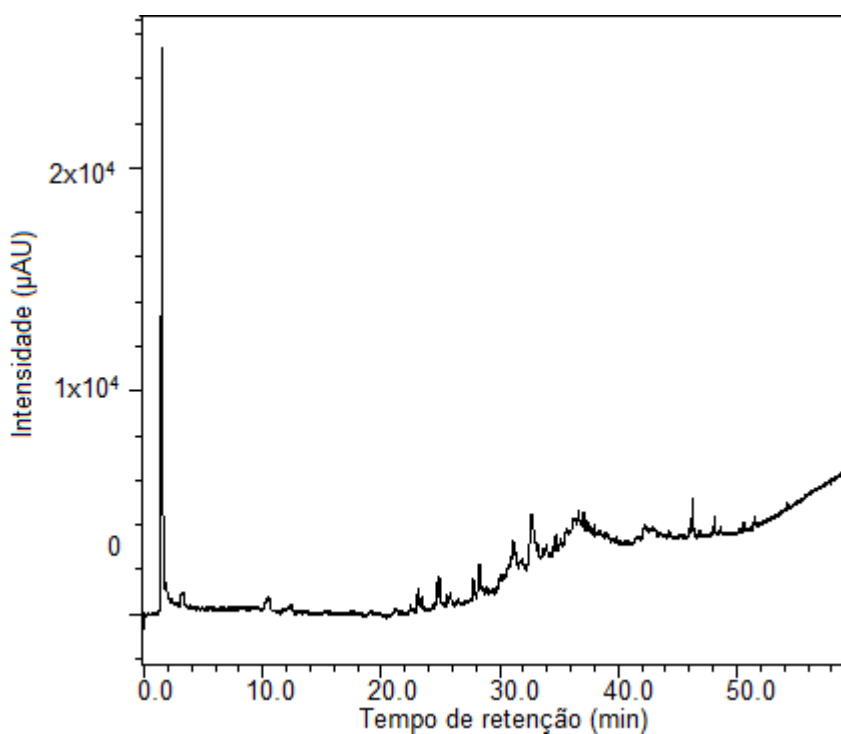
### 5.5.2 Análise da subfração Raiz-4FR8

Da mesma maneira que a subfração Raiz-4FR5, a subfração Raiz-4FR8 foi analisada por CLAE-DAD (IQ-Unesp) e por CLAE-DAD-EM (FCFRP-USP) em cromatógrafos Jasco e Shimadzu, respectivamente. Os cromatogramas obtidos nos dois equipamentos mostraram perfis parecidos e estão apresentados nas Figuras 20 e 21. Os tempos de retenção dos picos correspondentes nas duas análises apresentam a mesma diferença de aproximadamente 6,3 minutos.

Analisando o perfil cromatográfico em 510 nm (Figura 22), tem-se então cinco substâncias de interesse (III - VII). Os espectros de absorção dessas substâncias

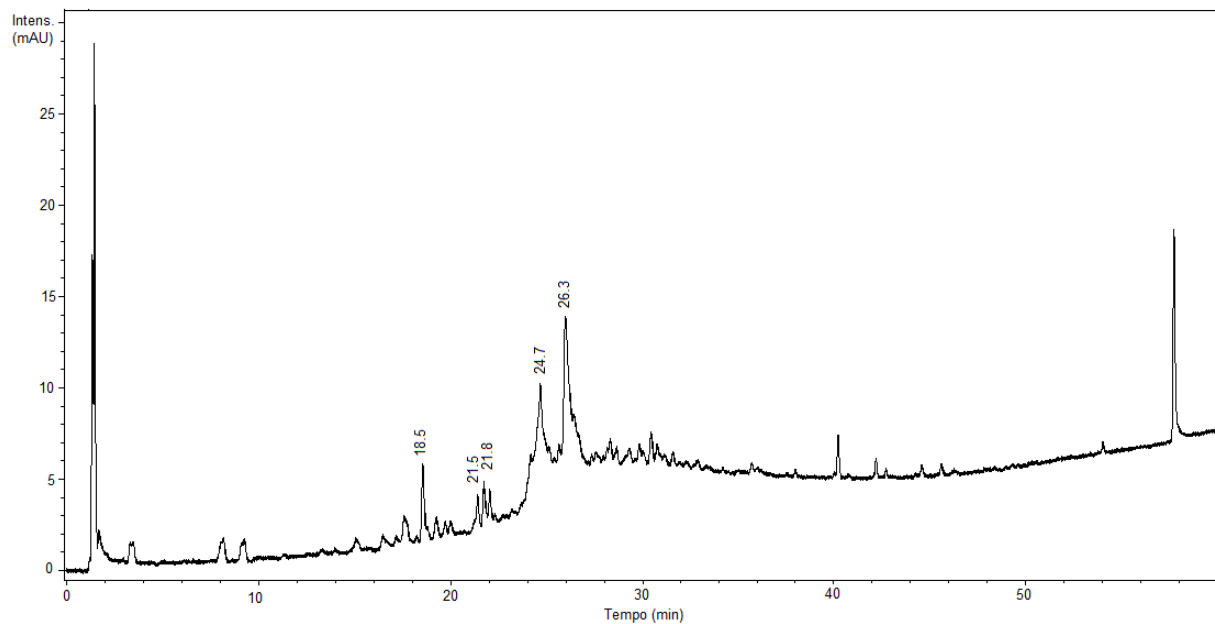
foram analisados (Figura 23) e todas possuem absorção máxima em comprimento de onda acima de 500 nm, evidenciando, assim, que tratam-se de pigmentos antociânicos. Chama-se a atenção aos valores para as substâncias **V** a **VII**, por serem acima de 540 nm.

**Figura 20:** Cromatograma obtido por CLAE-DAD da fração Raiz-4FR8 em coluna analítica Kinetex. Detecção em 254 nm



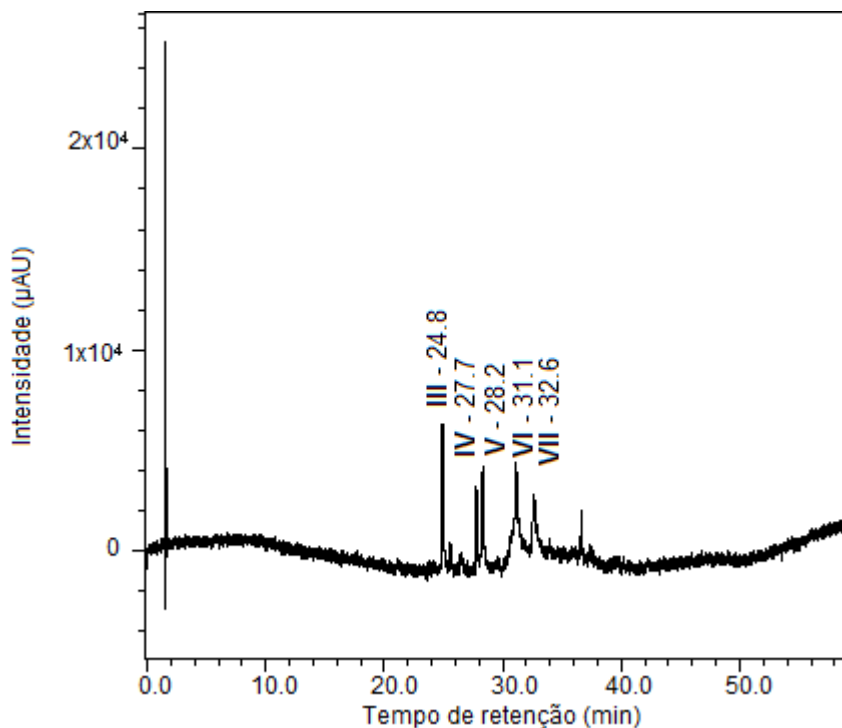
Condições de análise: coluna analítica Kinetex; cromatógrafo Jasco; volume de injeção: 20 μL; concentração da amostra: 1 mg/mL; fluxo 1 mL/min; tempo de análise: 75 minutos; solventes utilizados: (A) H<sub>2</sub>O + 0,1% Ácido Fórmico, (B) MeOH + 0,1% Ácido Fórmico (0,01 – 50 min: 10 → 90% B; 50 – 60 min: 90 → 100% B; 60 – 65 min: 100% B; 65 – 67 min: 100% → 10% B; 67 – 75 min: 10% B).

**Figura 21:** Cromatograma obtido por CLAE-DAD-EM da fração Raiz-4FR8 em coluna analítica Kinetex. Detecção em 254 nm.

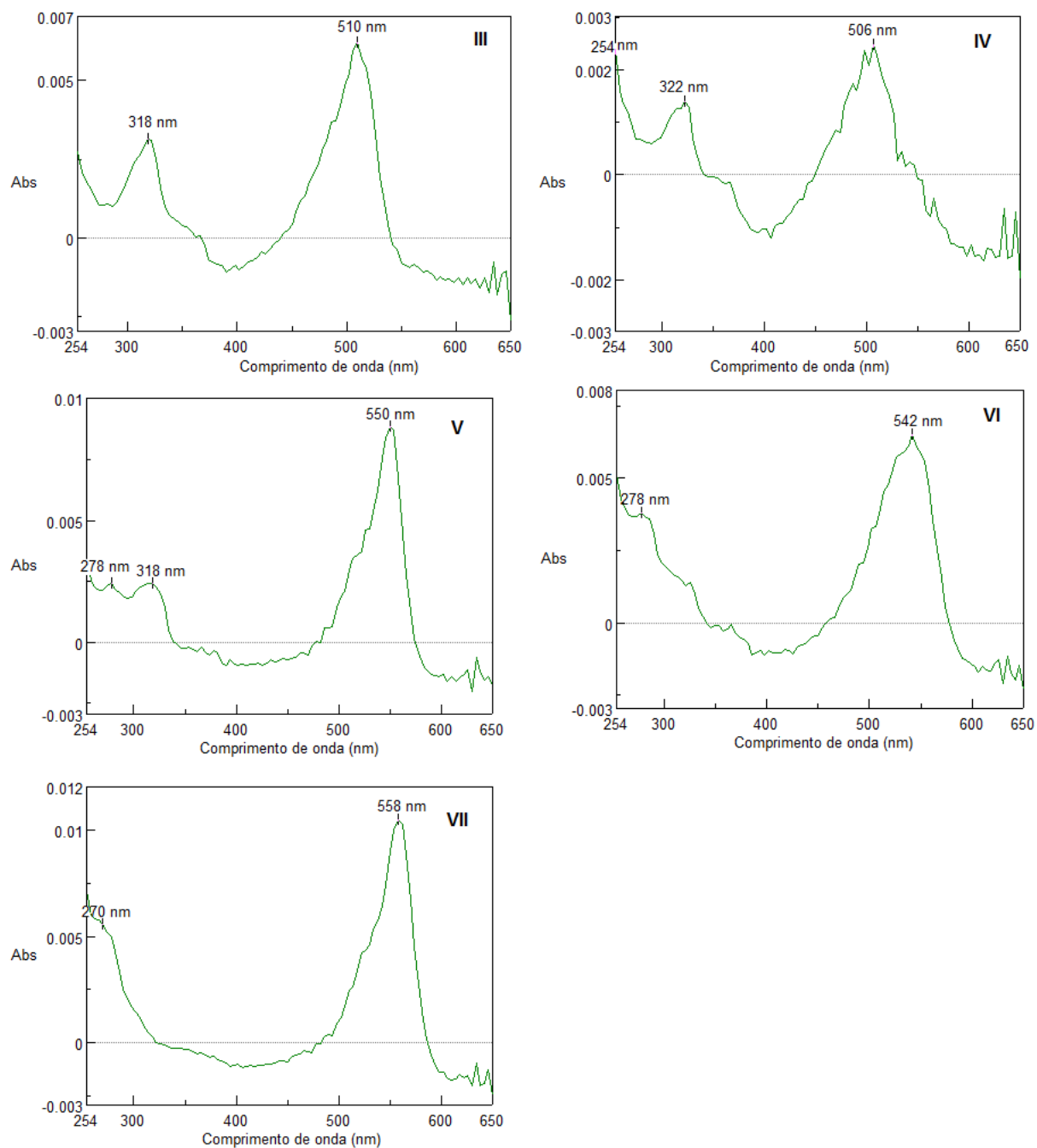


Condições de análise: coluna analítica Kinetex; cromatógrafo Shimadzu; volume de injeção: 20  $\mu$ L; concentração da amostra: 1 mg/mL; fluxo 1 mL/min; tempo de análise: 75 minutos; solventes utilizados: (A) H<sub>2</sub>O + 0,1% Ácido Fórmico, (B) MeOH + 0,1% Ácido Fórmico (0,01 – 50 min: 10  $\rightarrow$  90% B; 50 – 60 min: 90  $\rightarrow$  100% B; 60 – 65 min: 100% B; 65 – 67 min: 100%  $\rightarrow$  10% B; 67 – 75 min: 10% B)

**Figura 22:** Cromatograma obtido por CLAE-DAD da fração Raiz-4FR8 em coluna analítica Kinetex. Detecção em 510 nm.

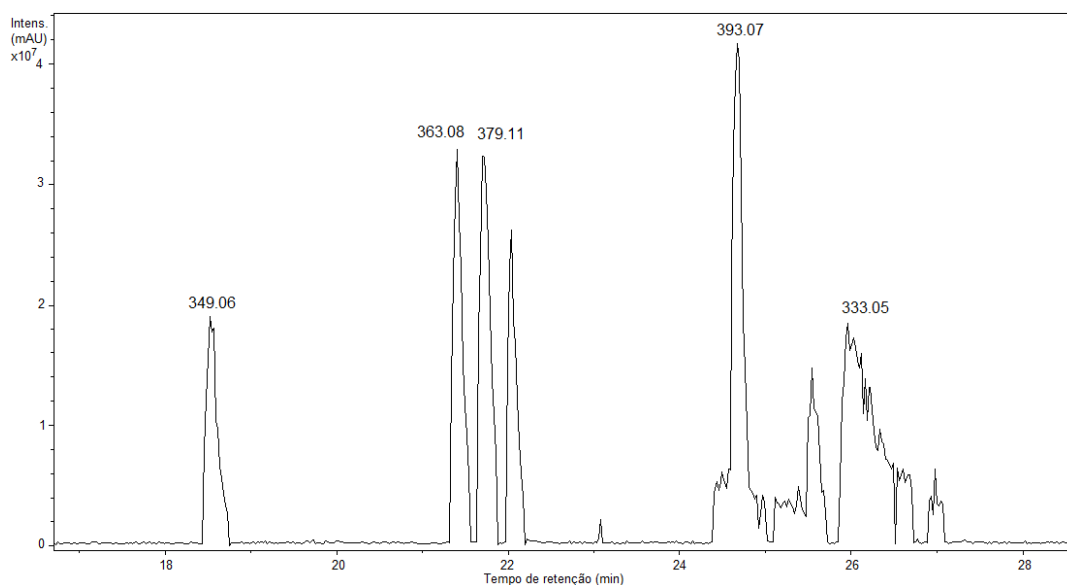


Condições de análise: coluna analítica Kinetex; cromatógrafo Jasco; volume de injeção: 20 µL; concentração da amostra: 1 mg/mL; fluxo 1 mL/min; tempo de análise: 75 minutos; solventes utilizados: (A) H<sub>2</sub>O + 0,1% Ácido Fórmico, (B) MeOH + 0,1% Ácido Fórmico (0,01 – 50 min: 10 → 90% B; 50 – 60 min: 90 → 100% B; 60 – 65 min: 100% B; 65 – 67 min: 100% → 10% B; 67 – 75 min: 10% B).

**Figura 23:** Espectros de absorção das substâncias **III** a **VII**.

Por meio do cromatograma de íons totais da fração Raiz-4FR8 (Figura 24) foi possível atribuir a massa dos íons das substâncias analisadas, como apresentado na Tabela 4.

**Figura 24:** Região ampliada do cromatograma dos íons totais da subfração Raiz-4FR8.



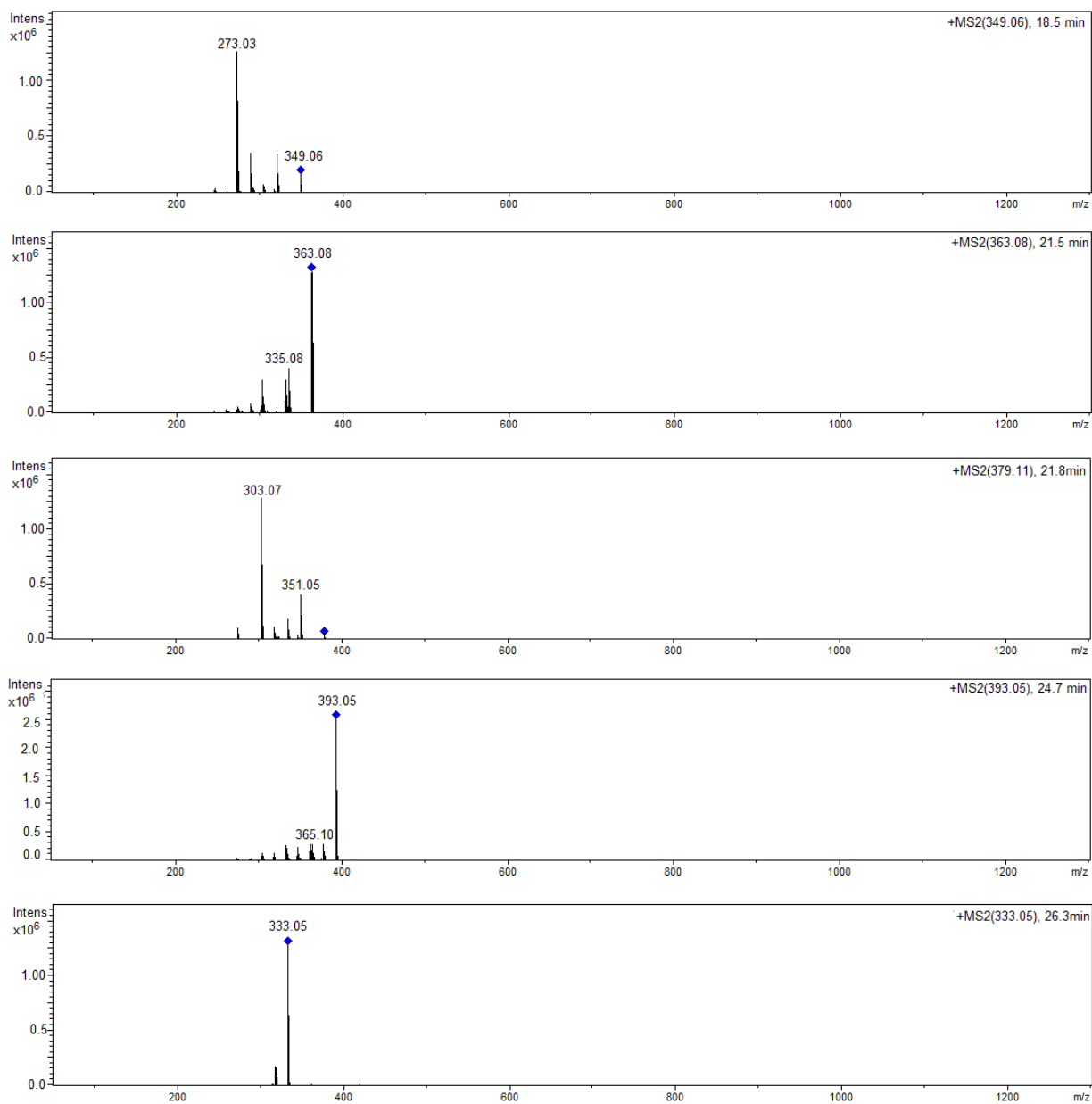
**Tabela 4:** Antocianinas identificadas na subfração Raiz-4FR8.

Substância	$t_R$ (min)	$t_R$ (min)	$[M-CI]^+$	Íon produto
	(CLAE-DAD)	(CLAE-DAD-EM)	( $m/z$ )	( $m/z$ )
III	24,8	18,5	349,06	273,03
IV	27,7	21,5	363,08	335,08
V	28,2	21,8	379,11	351,05; 303,07
VI	31,1	24,7	393,05	365,10
VII	32,6	26,3	333,05	318,02

Ao analisar as informações obtidas das substâncias referentes à fração Raiz-4FR8, não foi possível propor as estruturas das substâncias encontradas.

A substância **V** possui íon produto  $m/z$  303,08 (Figura 25), que poderia ser referente à aglicona delphinidina. Porém não se sabe o perfil de fragmentação da mesma, além do  $\lambda_{\text{máx}}$  ser 550 nm, não sendo o comprimento de onda máximo

característico desta substância, então não pode-se afirmar tal. O mesmo serve para a substância **VII**, com íon produto  $m/z$  333,05 (Figura 25), podendo ter a estrutura parecida com a substância **II**, porém o  $\lambda_{\text{máx}}$  é maior (558 nm), descartando esta hipótese. Porém, até então não foi reportada nenhuma antocianina com  $\lambda_{\text{máx}}$  acima de 560 nm, o que traz atenção para esta substância para estudos futuros. Nenhuma conclusão foi tirada a respeito das demais substâncias. Os espectros dos íons precursores ( $MS^2$ ) das substâncias **III**, **IV** e **VI** são mostrados na Figura 25.

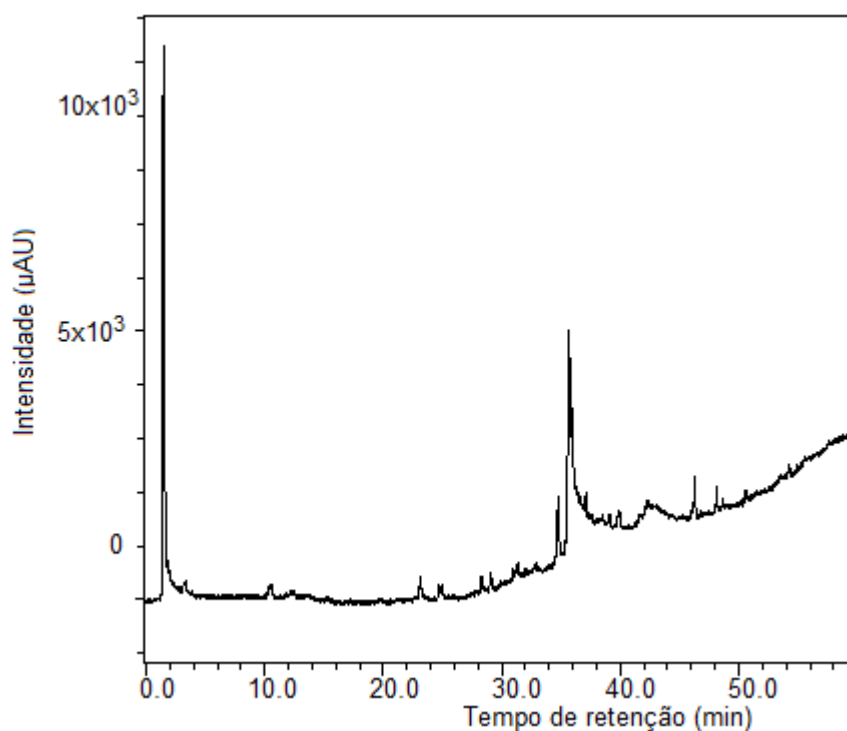
**Figura 25:** Espectro MS<sup>2</sup> das substâncias III, IV, V, VI e VII.

### 5.5.3 Análise da subfração Raiz-4FR9

As análises da subfração raiz-4FR9 por CLAE-DAD (IQ-Unesp) e por CLAE-DAD-EM (FCFRP-USP) apresentaram perfis cromatográficos parecidos (Figuras 26 e 27) e tempos de retenção dos picos correspondentes nas duas análises com

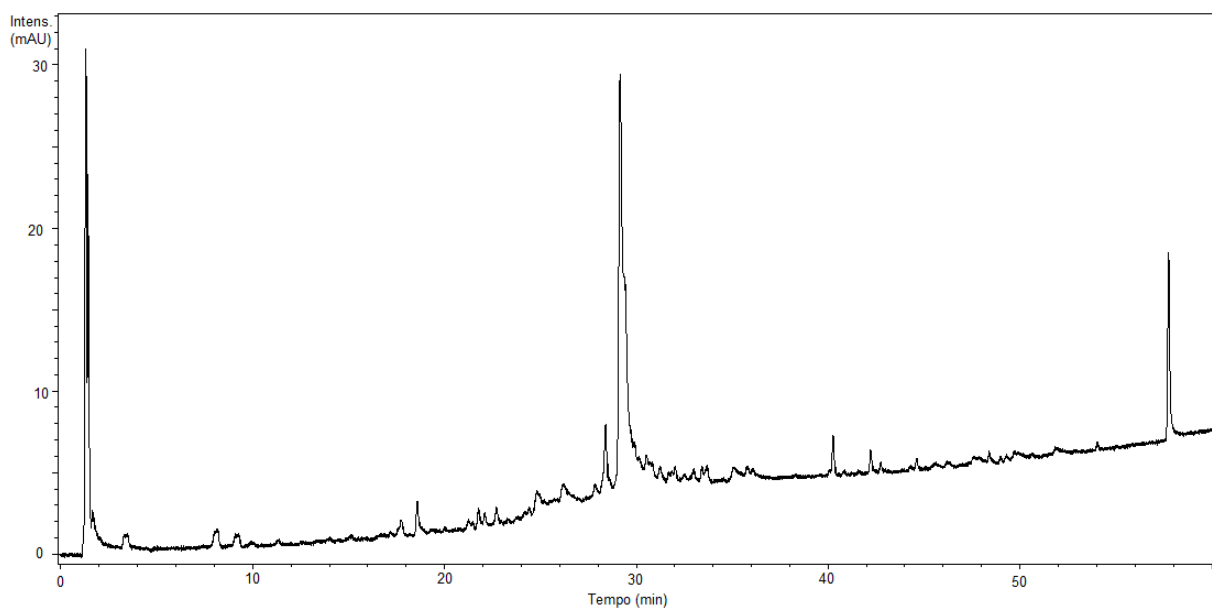
diferença de aproximadamente 6,3 minutos. A análise em 510 nm (Figura 28) destaca a presença de três substâncias de interesse.

**Figura 26:** Cromatograma obtido por CLAE-DAD da fração Raiz-4FR9 em coluna analítica Kinetex. Detecção em 254 nm.



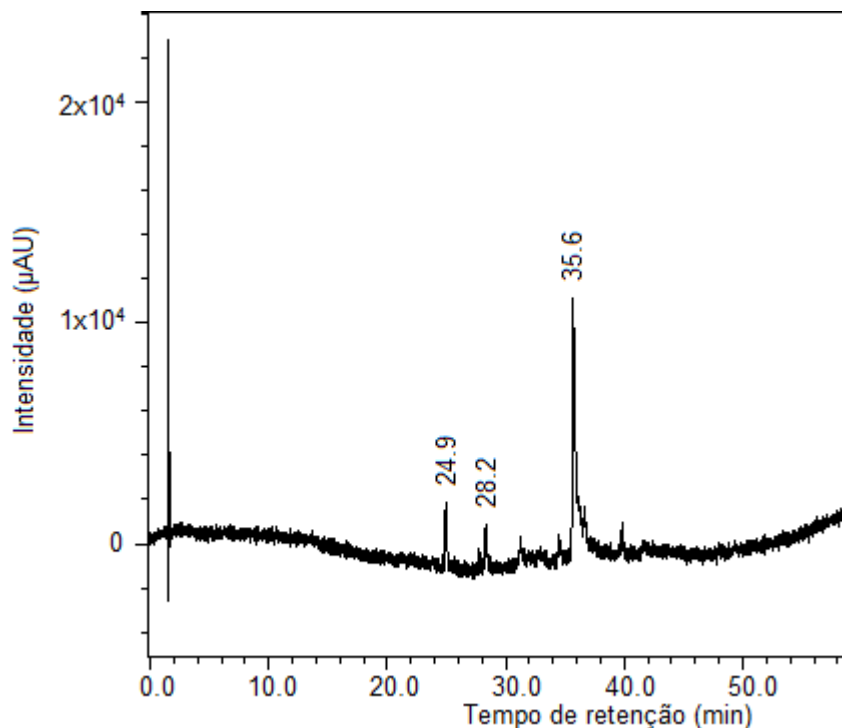
Condições de análise: coluna analítica Kinetex; cromatógrafo Jasco; volume de injeção: 20 µL; concentração da amostra: 1 mg/mL; fluxo 1 mL/min; tempo de análise: 75 minutos; solventes utilizados: (A) H<sub>2</sub>O + 0,1% Ácido Fórmico, (B) MeOH + 0,1% Ácido Fórmico (0,01 – 50 min: 10 → 90% B; 50 – 60 min: 90 → 100% B; 60 – 65 min: 100% B; 65 – 67 min: 100% → 10% B; 67 – 75 min: 10% B).

**Figura 27:** Cromatograma obtido por CLAE-DAD-EM em coluna analítica Kinetex da fração Raiz-4FR9. Detecção em 254 nm.



Condições de análise: coluna analítica Kinetex; cromatógrafo Shimadzu; volume de injeção: 20  $\mu$ L; concentração da amostra: 1 mg/mL; fluxo 1 mL/min; tempo de análise: 75 minutos; solventes utilizados: (A) H<sub>2</sub>O + 0,1% Ácido Fórmico, (B) MeOH + 0,1% Ácido Fórmico (0,01 – 50 min: 10  $\rightarrow$  90% B; 50 – 60 min: 90  $\rightarrow$  100% B; 60 – 65 min: 100% B; 65 – 67 min: 100%  $\rightarrow$  10% B; 67 – 75 min: 10% B).

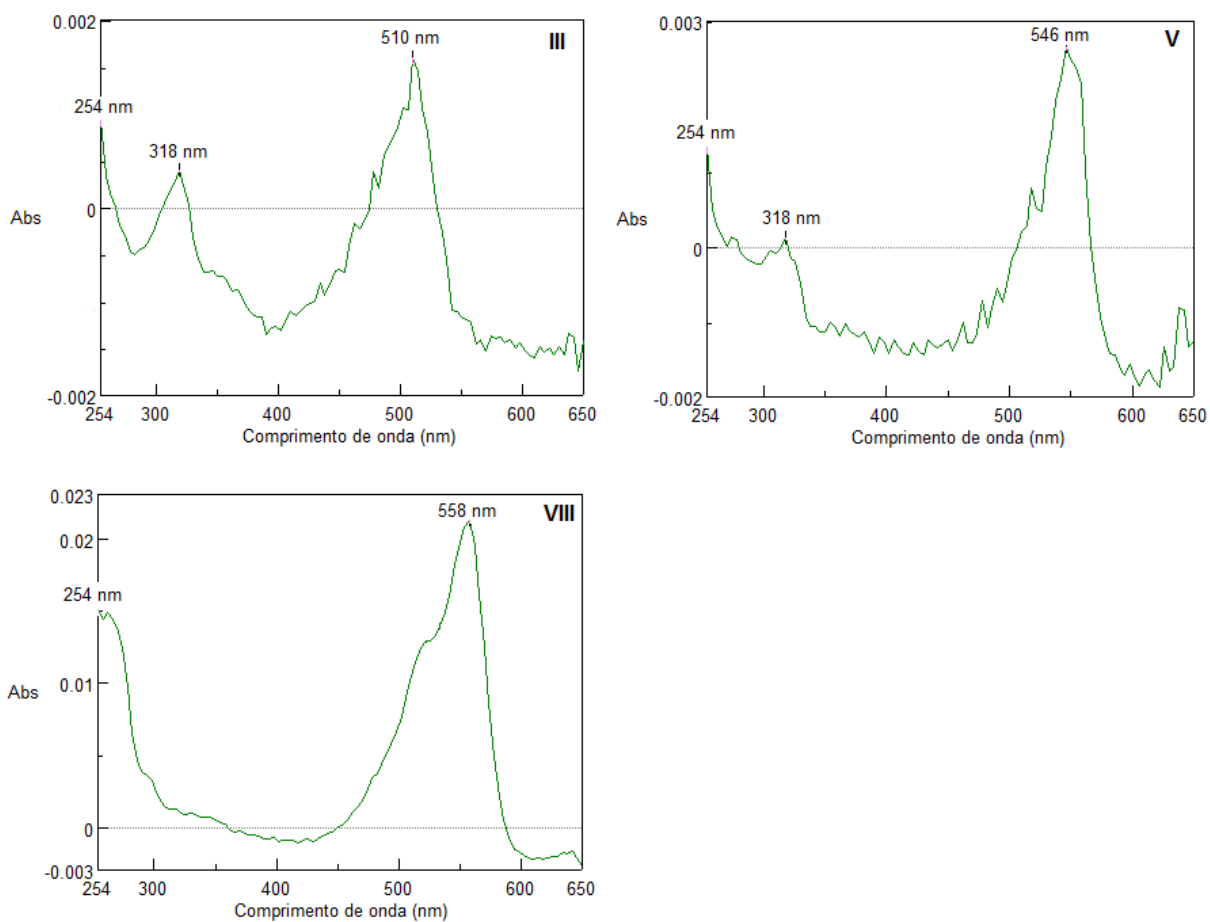
**Figura 28:** Cromatograma obtido por CLAE-DAD da fração Raiz-4FR9 em coluna analítica Kinetex. Detecção em 510 nm.



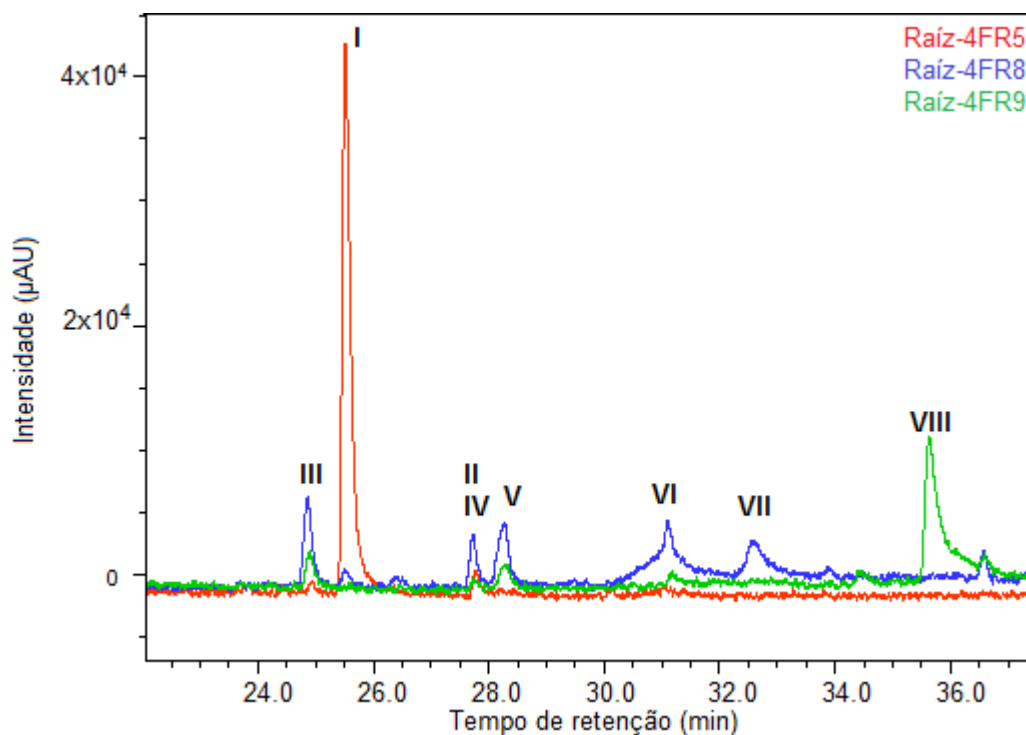
Condições de análise: coluna analítica Kinetex; cromatógrafo Jasco; volume de injeção: 20 µL; concentração da amostra: 1 mg/mL; fluxo 1 mL/min; tempo de análise: 75 minutos; solventes utilizados: (A) H<sub>2</sub>O + 0,1% Ácido Fórmico, (B) MeOH + 0,1% Ácido Fórmico (0,01 – 50 min: 10 → 90% B; 50 – 60 min: 90 → 100% B; 60 – 65 min: 100% B; 65 – 67 min: 100% → 10% B; 67 – 75 min: 10% B).

Os espectros de absorção das três substâncias em destaque (Figura 29) possuem  $\lambda_{\text{máx}}$  acima de 510 nm, pressupondo que tratam-se de antocianinas. Nota-se a presença de uma substância com tempo de retenção distinto das anteriores em 35,6 minutos (**VIII**), em comparação com as frações Raiz-4FR5 e Raiz-4FR8 (Figura 30). As outras duas substâncias possuem os mesmos tempos de retenção e  $\lambda_{\text{máx}}$  das substâncias **III** e **V**, previamente discutidas. Para confirmação de tal afirmação, análises em CLAE-DAD-EM foram realizadas.

**Figura 29:** Espectros de absorção das substâncias **III**, **V** e **VIII**.



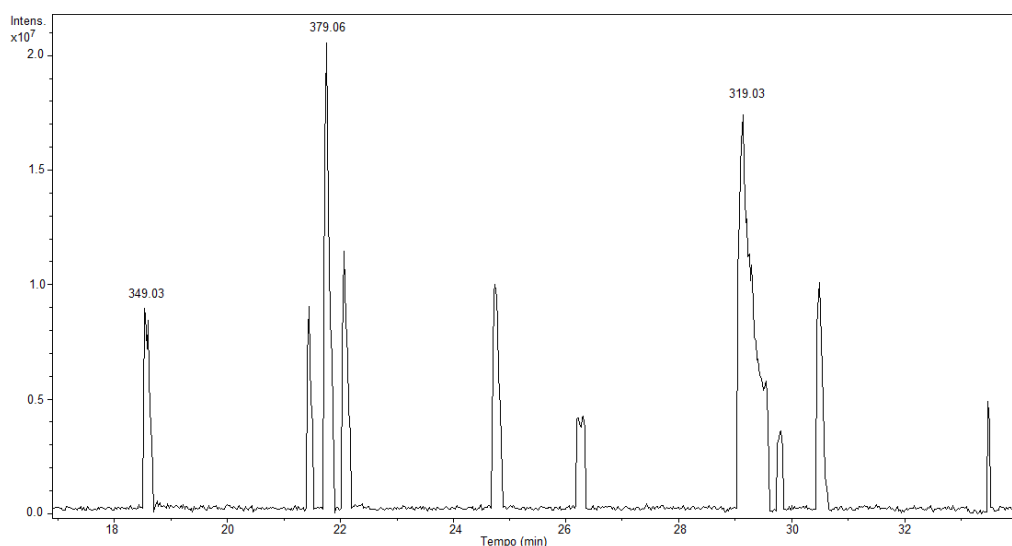
**Figura 30:** Sobreposição amplificada dos cromatogramas das subfrações Raiz-4FR5, Raiz-4FR8 e Raiz-4FR9 obtidos por CLAE-DAD em coluna analítica Kinetex. Detecção em 510 nm.



Condições de análise: coluna analítica Kinetex; cromatógrafo Jasco; volume de injeção: 20  $\mu\text{L}$ ; concentração da amostra: 1 mg/mL; fluxo 1 mL/min; tempo de análise: 75 minutos; solventes utilizados: (A)  $\text{H}_2\text{O}$  + 0,1% Ácido Fórmico, (B) MeOH + 0,1% Ácido Fórmico (0,01 – 50 min: 10  $\rightarrow$  90% B; 50 – 60 min: 90  $\rightarrow$  100% B; 60 – 65 min: 100% B; 65 – 67 min: 100%  $\rightarrow$  10% B; 67 – 75 min: 10% B).

A substância previamente chamada de **VIII** assemelha-se com o perfil da substância **VII** da fração Raiz-4FR8, tanto no perfil do pico no cromatograma quanto no  $\lambda_{\text{máx}}$ . Através do cromatograma de íons totais foi possível saber a massa das substâncias observadas (Figura 31), listadas na Tabela 5.

**Figura 31:** Região ampliada do cromatograma dos íons totais da subfração Raiz-4FR9.

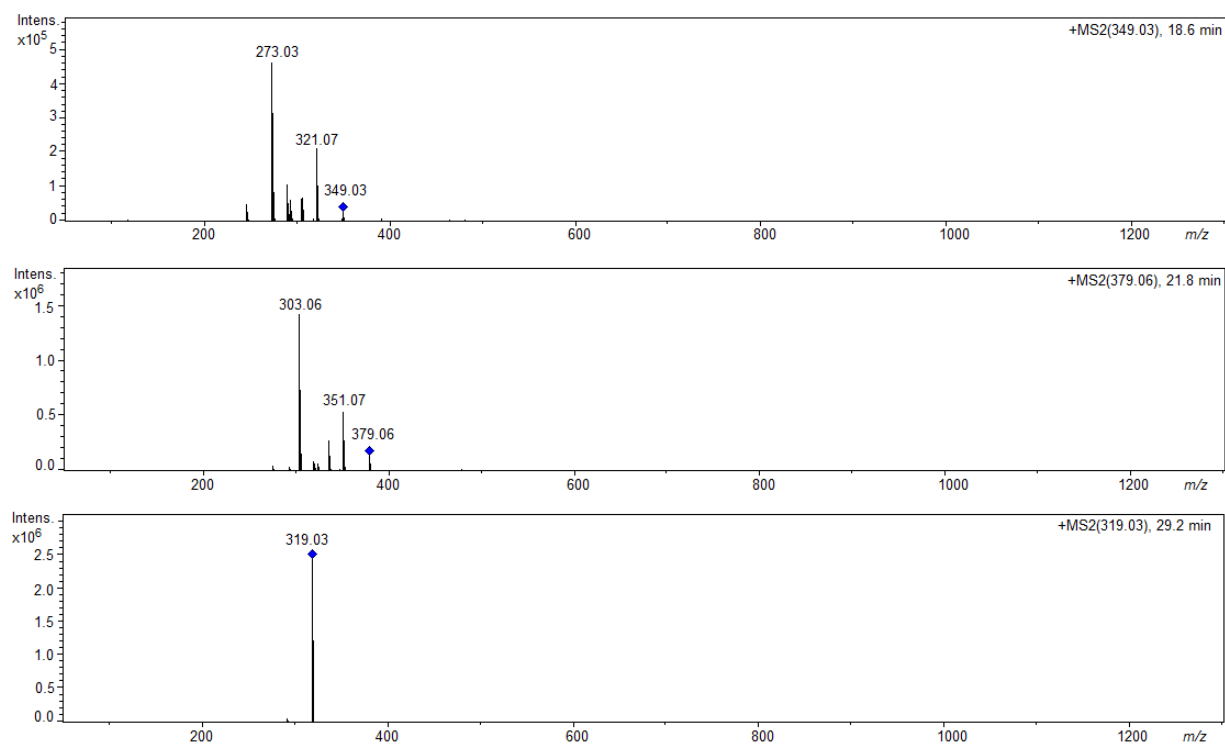


**Tabela 5:** Antocianinas identificadas na subfração Raiz-4FR9.

Substância	$t_R$ (min)	$t_R$ (min)	$[M-CI]^+$	Íon produto
	(CLAE-DAD)	(CLAE-DAD-EM)	( $m/z$ )	( $m/z$ )
<b>III</b>	24,9	18,6	349,03	273,03
<b>V</b>	28,2	21,8	379,06	351,07; 303,06
<b>VIII</b>	35,6	29,2	319,03	319,03

Conclui-se que as substâncias **III** e **V** parecem ser realmente as mesmas da fração Raiz-4FR8, observando a fragmentação das mesmas (Figura 32). Já a substância **VIII** aparece três minutos depois da substância **VII** da fração Raiz-4FR8. Ao comparar as massas destas duas substâncias, nota-se uma perda de  $m/z$  14,02 (Figura 32), que poderia ser referente a um grupo metílico, podendo ser decorrente de degradação da substância **VII**. Porém, como justificado anteriormente, não foi possível realizar a proposta de estrutura destas substâncias.

**Figura 32:** Espectros MS<sup>2</sup> das substâncias III, V e VIII respectivamente.



## 6 CONCLUSÕES

O extrato das raízes de *E. crassipes* foi obtido pelo processo de maceração, fracionado por técnicas de cromatografia em coluna, CLAE e EFS. As frações obtidas foram analisadas por CLAE-DAD-EM com o objetivo de identificar as antocianinas presentes no extrato. As metodologias utilizadas não foram suficientes para purificação de antocianinas e antocianidinas, pois as frações coletadas permaneceram em mistura.

Os fatores que impossibilitaram o isolamento das antocianinas foram principalmente a dificuldade de trabalho em ambiente escuro, uma vez que as frações secavam em capela de exaustão, sendo, mesmo que por pouco tempo, expostas à luminosidade e oxigênio; pequena quantidade de material obtido: as frações apresentavam coloração intensa, porém após pesagem, constatava-se que havia muito pouca massa da mistura; restrição de solvente para manipulação, que era o metanol acidificado, não obtendo total solubilização (parecia solúvel, porém partículas pequenas entupiam cartuchos, mostrando que a solubilização não foi total) e dessa forma não permitiu a obtenção de espectros de RMN de  $^1\text{H}$  com boa resolução.

Apesar das dificuldades encontradas durante o estudo, foi possível identificar duas antocianinas, sendo uma delas não descrita até o momento na literatura. Outras antocianinas não puderam ser identificadas pelo desconhecido perfil de fragmentação que estas substâncias demonstraram.

## REFERÊNCIAS

- AMR, A.; AL-TAMIMI, E. Stability of the crude extracts of *Ranunculus asiaticus* anthocyanins and their use ad food colourants. **International Journal of Food Science and Technology**. 42, 985-991, 2007.
- ANDERSEN, O.; JORDHEIM, M. The Anthocyanins. Em: Andersen, O. M.; Markham, K. R. **Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications**. Boca Raton: CRC Press, 2006.
- ANDERSEN, O.; CABRITA, L.; FOSSEN, T. Colour and stability of pure anthocyanins influenced by pH including the alkaline region. **Food Chemistry**. 63(4), 435-440, 1998.
- BORDIGNON, C.; FRANCESCATO, V.; NIENOW, A.; CALVETE, E.; REGINATTO, F. Influência do pH da solução extrativa no teor de antocianinas em frutos de morango. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas. 29(1), 183-188, 2009.
- BOULTON, R. The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. **American Journal of Enology and Viticulture**. 52, 67-87, 2001.
- CASTAÑEDA-OVANDO, A.; PACHECO-HERNÁNDEZ, M.; PÁEZ-HERNÁNDEZ, M.; RODRÍGUEZ, J.; GALÁN-VIDAL, C. Chemical studies of anthocyanins: A review. **Food Chemistry**. 113 (4), 859–871, 2009.

DA COSTA, C.; HORTON, D.; MARGOLIS, S. Analysis of anthocyanins in foods by liquid chromatography, liquid chromatography – mass spectrometry and capilar electrophoresis. **Journal of Chromatography A**. 881(1-2), 403-410, 2000.

DHIR, B. Aquatic plant species and removal of contaminants. In: **Phytoremediation: Role of Aquatic Plants in Environmental Clean-up**. Springer India, India. 21-50, 2013.

GEORGE, S.; MAUTE, A. A photodiode array detection system: design, concept and implementation. **Chromatographia**. 15, 419, 1982.

GIUSTI, M.; WROLSTAD, R. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. **Biochemical Engineering Journal**. 14(3), 217–225, 2003.

GLOBAL INVASIVE SPECIES DATABASE. **100 of the World's Worst Invasive Alien Species**. Disponível em <[http://www.iucngisd.org/gisd/100\\_worst.php](http://www.iucngisd.org/gisd/100_worst.php)>. Acesso em: 08 Mar. 2017.

GUNJA, G.; PRIYANKA, J.; KANT, S.; DIXIT, A.; JAIN, R.. Production of bioethanol from water hyacinth by isolated thermotolerant bacteria. **International Journey of Current Science & Technology**. 4, 219-223, 2016

GUNNARSSON, C.; PETERSEN, C. Water hyacinths as a resource in agriculture and energy production: A literature review. **Waste Management**. 27, 117-129, 2007.

HARLEY K., JULIEN M., WRIGHT A. Water hyacinth: a tropical world wide problem and methods for its control, proceedings of the first meeting of the international water hyacinth consortium. **World Bank**, 1997.

JOAQUÍN-CRUZ, E.; DUEÑAS, M.; GARCÍA-CRUZ, L.; SALINAS-MORENO, Y.; SANTOS-BUELGA, C.; GARCIA-SALINAS, C. Anthocyanin and phenolic characterization, chemical composition and antioxidant activity of chagalapoli (*Ardisia compressa* K.) fruit: A tropical source of natural pigments. **Food Research International**. 70, 151-157, 2015.

KAHKONEN, M.; HOPIA, A.; HEININEN, M. Berry phenolics and their antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 49(8), 4076-4082, 2001.

KAMEI, H.; KOKIMA, T.; HASEGAWA, M.; KOIDE, T.; UMEDA, T.; YUKAWA, T.; TERABE, K. Suppression of tumor cell growth by anthocyanins *in vitro*. **Cancer Investigation**. 13 (6), 590–594, 1995.

KAUME, L.; GILBERT, W.; SMITH, B.; DEVAREDDY, L. Cyanidin 3-*O*- $\beta$ -*D*-glucoside improves bone indices. **Journal of Medicinal Food**. 18 (6), 690–697, 2015.

KHAKET, T.; SINGH, M.; DHANDA, S.; SINGH, T.; SINGH, J. Biochemical characterization of consortium compost of toxic weeds *Parthenium hysterophorus* and *Eichhornia crassipes*. **Bioresource Technology**. 123, 360-365, 2012.

KONG, J.; CHIA, L.; GOH, N.; CHIA, T.; BROUILLARD, R. Analysis and biological activities of anthocyanins. **Phytochemistry**. 64, 923–933, 2003.

LALITHA, P., SRIPATHI, S., JAYANTHI, P. Secondary metabolites of *Eichhornia crassipes* (waterhyacinth): a review (1949 to 2011). **Natural Product Communications**. 7, 1249-1256, 2012.

LIAO, S.; CHANG, W. Heavy metal phytoremediation by water hyacinth at constructed wetlands in Taiwan. **Journal of Aquatic Plant Management**, 42, 60-68, 2004.

LIETTI, A.; CRISTONI, A.; PICCI, M. Studies on *Vaccinium myrtillus* anthocyanosides. I. Vasoprotective and anti-inflammatory activity. **Arzneimittel-Forschung**. 26 (5), 829–832, 1976.

LOPES, T.; XAVIER M.; QUADRI, M. B. Antocianinas: uma breve revisão das características estruturais e da estabilidade. **Revista Brasileira de Agrociência**. 13, 291-297, 2007.

MALIK, A. Environmental challenge vis a vis opportunity: the case of water hyacinth. **Environment International**, 33, 122-138, 2007.

MARÇO, P.; POPPI, R.; SCARMINIO, I. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Química Nova**. 31, 1218-1223, 2008.

- MBATI, G; NEUENSCHWANDER, P. Biological control of three floating water weeds, *Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes*, and *Salvinia molesta* in the Republic of Congo. **Biocontrol**. 50, 635-645, 2005.
- OKEWALE, A.; OMORUWOU, F.; OJAIGHO, R. Alternative energy production for environmental sustainability. **British Journal of Renewable Energy**. 1, 18-22, 2016.
- PATRAS, A.; NIGEL, P.; O'DONNELL, C.; TIWARI, B. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. **Trends in Food Science and Technology**. 21(1), 3–11, 2010.
- PAZMIÑO-DURÁN, A.; GIUSTI, M.; WROLSTAD, R.; GLÓRIA, B. Anthocyanins from *Oxalis triangularis* as potential food colorantes. **Food Chemistry**. 75(2), 211-216, 2001.
- PEREIRA, F. **Características anatômicas e fisiológicas de aguapé e índice de fitorremediação de alface d'água cultivados na presença de arsênio, cádmio e chumbo**. 116 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia vegetal, Universidade Federal de Lavras, 2010.
- PÉREZ, E.; TELLEZ, T.; MAQUEDA, S.; LINARES, P.; CORTES, J.; GUZMAN, J. Seed germination and risks of using the invasive plant *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms-Laub. (water hyacinth) for composting, ovine feeding and biogas production. **Acta Botanica Gallica**. 162, 203-214, 2015.

RAM, S.; MOOLANI, M. Herbicidal weed control of water hyacinth under semi-arid conditions. **Pestology**. 24, 69-71, 2000.

REIN, M. **Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins**. 87 f. Dissertação (Bacharelado) – Faculty of Agriculture and Forestry, University of Helsinki. 2005.

RIAZ, M.; ZIA-UL-HAQ, M.; SAAD; B. **Anthocyanins and Human Health: Biomolecular and Therapeutic aspects**. Paquistão: Springer Nature, 2016.

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **Journal of Nutrition**. 130(8), 2073-2085, 2000.

SHABANA, Y.; MOHAMED, Z. Integrated control of water hyacinth with a mycoherbicide and a phenylpropanoid pathway inhibitor. **Biocontrol Science & Technology**, 15, 659-669, 2005.

SHARMA, S.; SINGH, B.; MANCHANDA, V. Phytoremediation: role of terrestrial plants and aquatic macrophytes in the remediation of radionuclides and heavy metal contaminated soil and water. **Environmental Science and Pollution Research**, 22, 946-962, 2015.

STRACK, D.; STEGLICH, W.; WRAY, V. Betalains. Em: **Methods in Plant Biochemistry**. Orlando: Academic Press, 1993.

- TAKIKAWA, M.; INOUE, S.; HORIO, F.; TSUDA, T. Dietary anthocyanin-rich bilberry extract ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity via activation of AMP-activated protein kinase in diabetic mice. **Journal of Nutrition**. 140 (3), 527–533, 2010.
- TIMBERLAKE, C. The biological properties of anthocyanin compounds. **NATCOL Quarterly Bulletin**. 1, 4–15, 1988.
- 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**. 63, 899-902, 2004.
- TSUDA, T. Regulation of adipocyte function by anthocyanins; possibility of preventing the metabolic syndrome. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 56(3), 642–646, 2008.
- VALLS, J.; MILLÁN, S.; MARTÍ, M. P.; BORRÀS, E.; AROLA, L. Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols. **Journal of Chromatography A**. 1216 (43), 7143–7172, 2009.
- WILSON J.; HOLST, N.; REES, M. Determinants and patterns of population growth in water hyacinth. **Aquatic Botany**. 81, 51-67, 2005.
- YANG, M.; KOO, S.; SONG W.; CHUN, O. Food matrix affecting anthocyanin bioavailability: Review. **Current Medicinal Chemistry**, 18(2), 291–300, 2011.

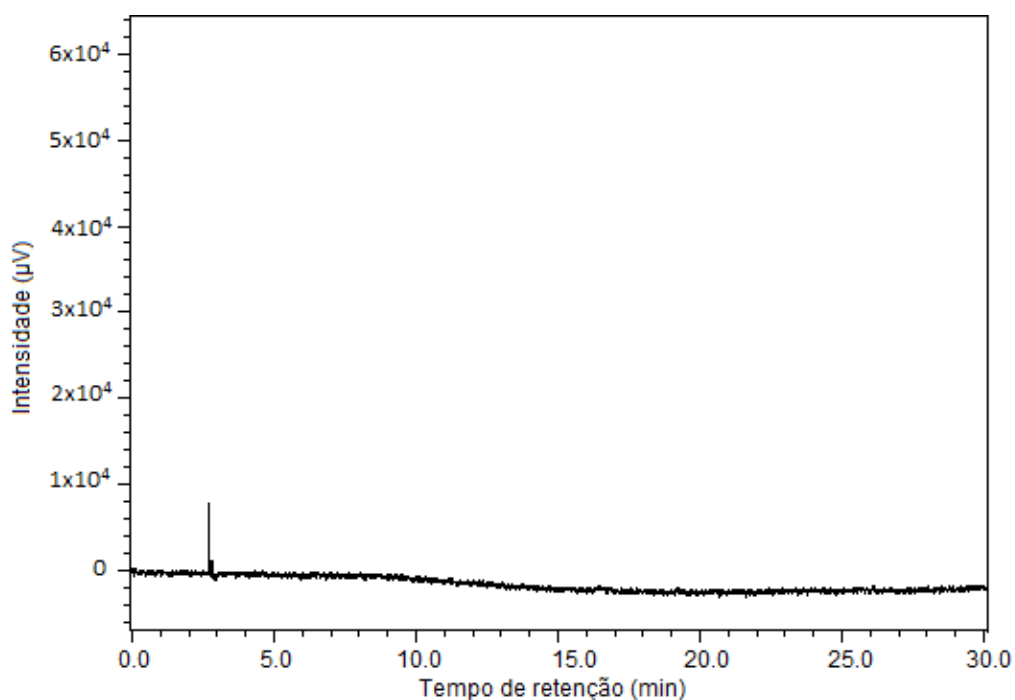
YOSHIDA, K.; MORI, M.; KONDO T. Blue flower color development by anthocyanins: from chemical structure to cell physiology. **Natural Product Reports**. 26, 857-964, 2009.

ZHANG, M.; LING, B.; KONG, C.; LIANG, G.; DONG, Y. Allelopathic effects of lantana (*Lantana camera* L.) on water hyacinth (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms. **Allelopathy J.** 15, 125-129, 2005.

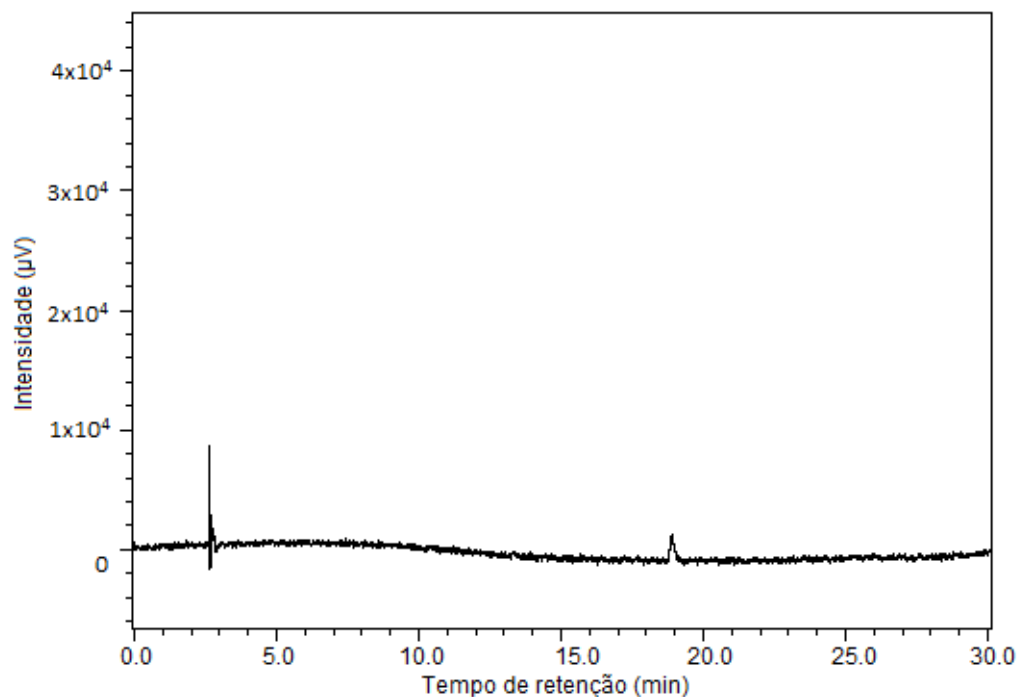
## APÊNDICE A

As condições de análise dos cromatogramas abaixo são: coluna analítica ChromSep SS; cromatógrafo Jasco; volume de injeção: 20  $\mu\text{L}$ ; concentração da amostra: 1 mg/mL; fluxo 1 mL/min; tempo de análise: 30 minutos; solventes utilizados: (A)  $\text{H}_2\text{O}$  + 0,25% Ácido Fórmico, (B) MeOH + 0,5% Ácido Fórmico (0,01 – 30 min: 20  $\rightarrow$  100% B).

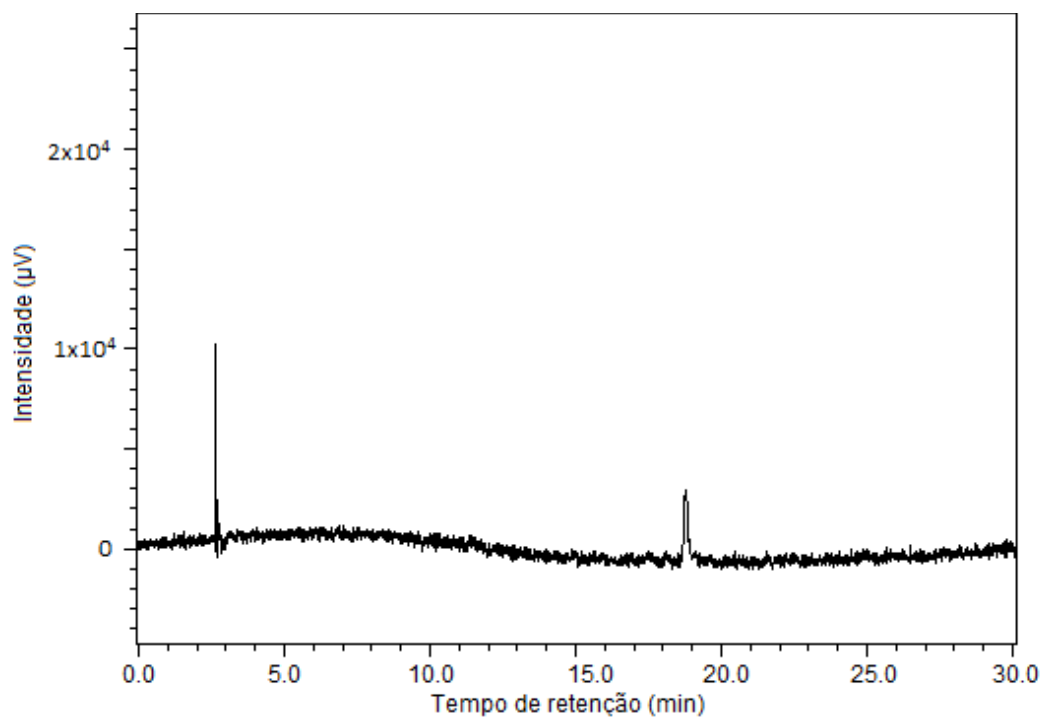
**Figura A:** Cromatograma obtido por CLAE-DAD da fração Raiz-4FR1. Detecção em 510 nm.



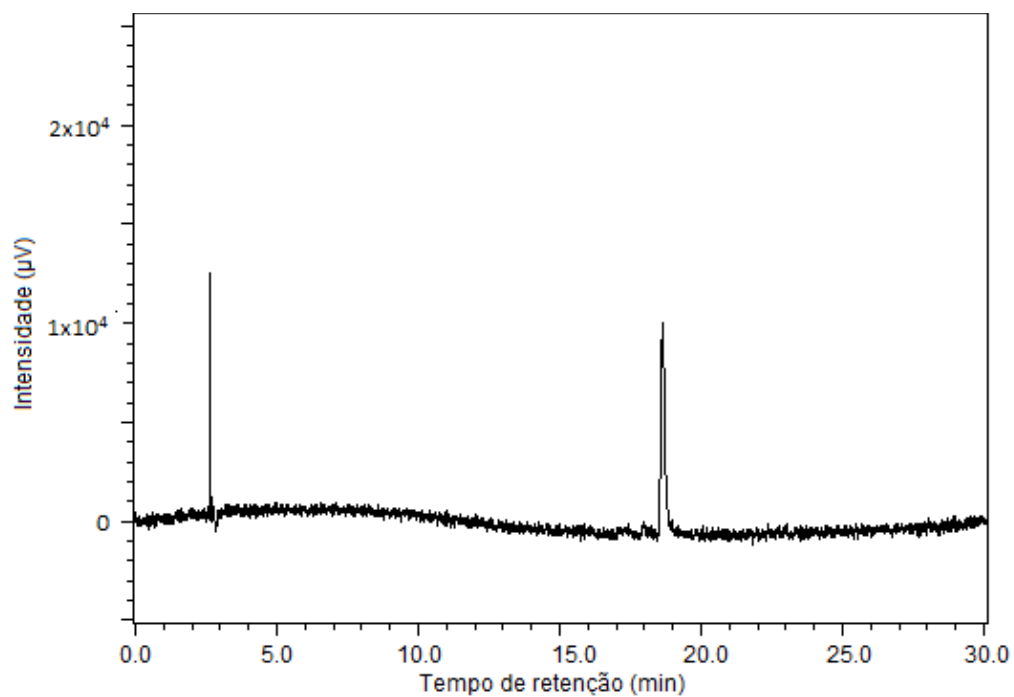
**Figura B:** Cromatograma obtido por CLAE-DAD da fração Raiz-4FR2. Detecção em 510 nm.



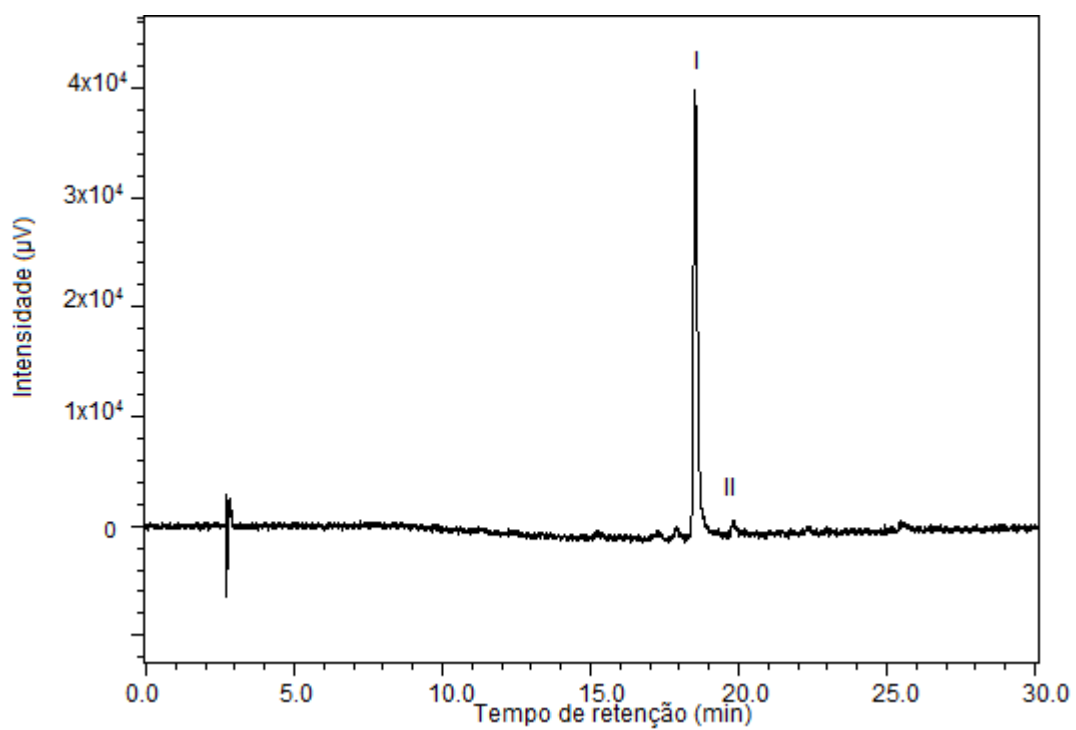
**Figura C:** Cromatograma obtido por CLAE-DAD da fração Raiz-4FR3. Detecção em 510 nm.



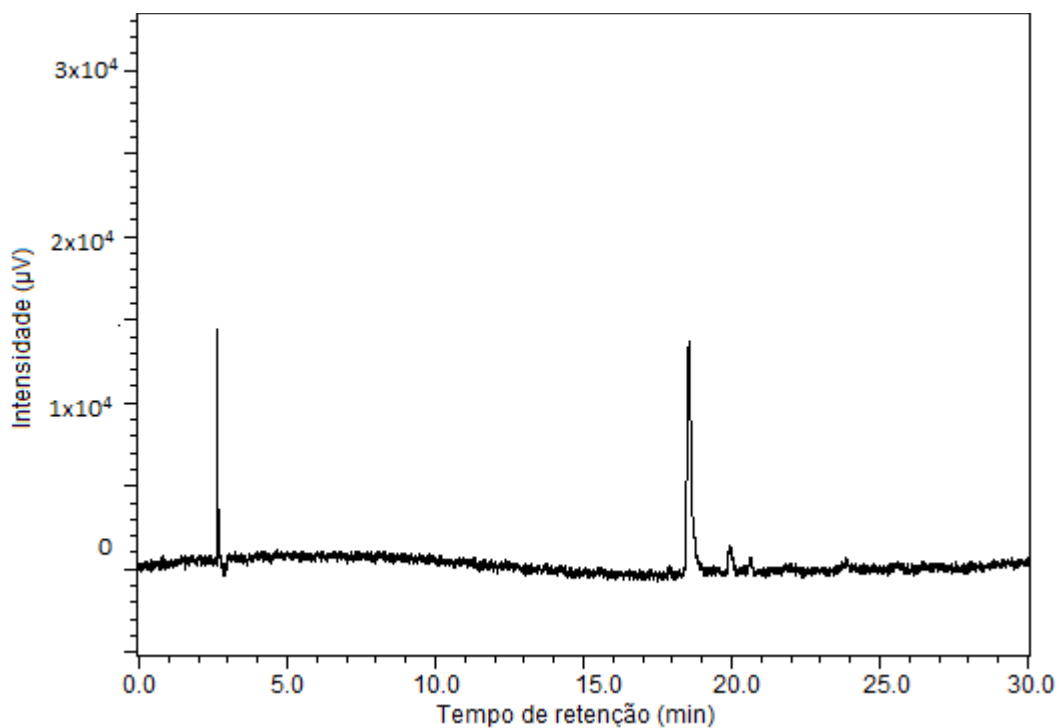
**Figura D:** Cromatograma obtido por CLAE-DAD da fração Raiz-4FR4. Detecção em 510 nm.



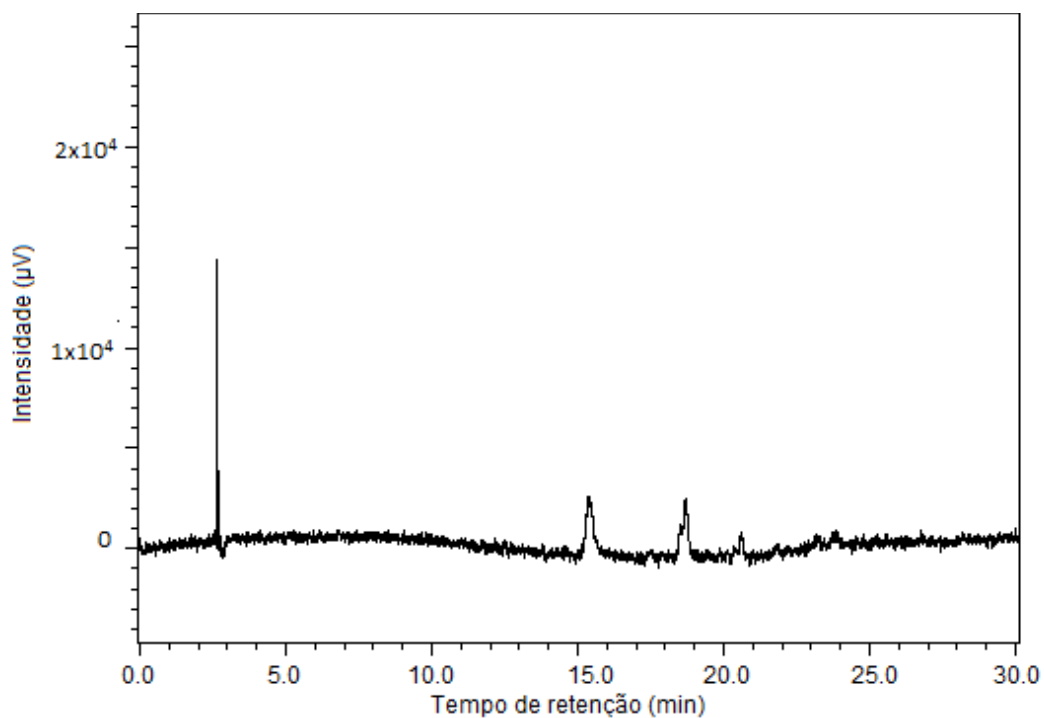
**Figura E:** Cromatograma obtido por CLAE-DAD da fração Raiz-4FR5. Detecção em 510 nm.



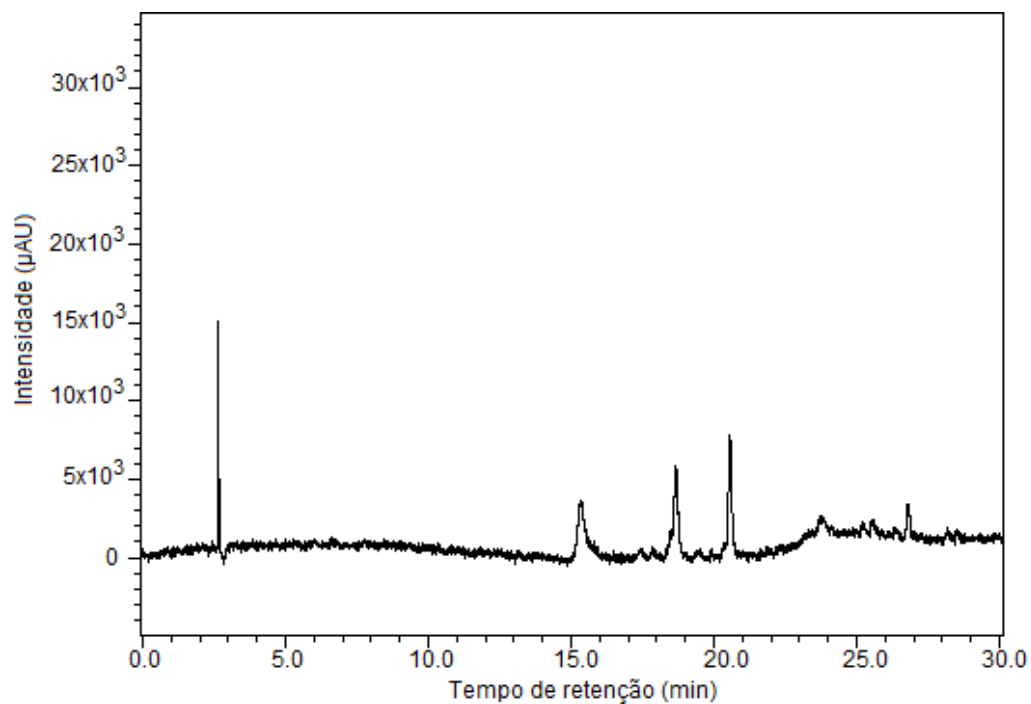
**Figura F:** Cromatograma obtido por CLAE-DAD da fração Raiz-4FR6. Detecção em 510 nm.



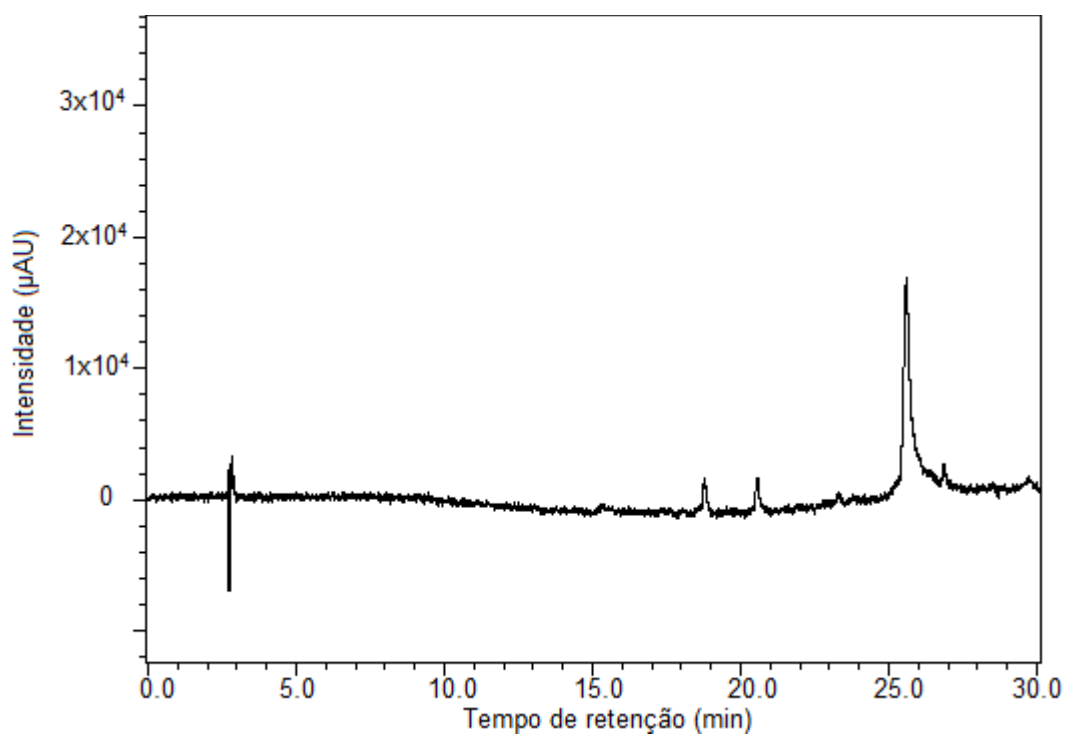
**Figura G:** Cromatograma obtido por CLAE-DAD da fração Raiz-4FR7. Detecção em 510 nm.



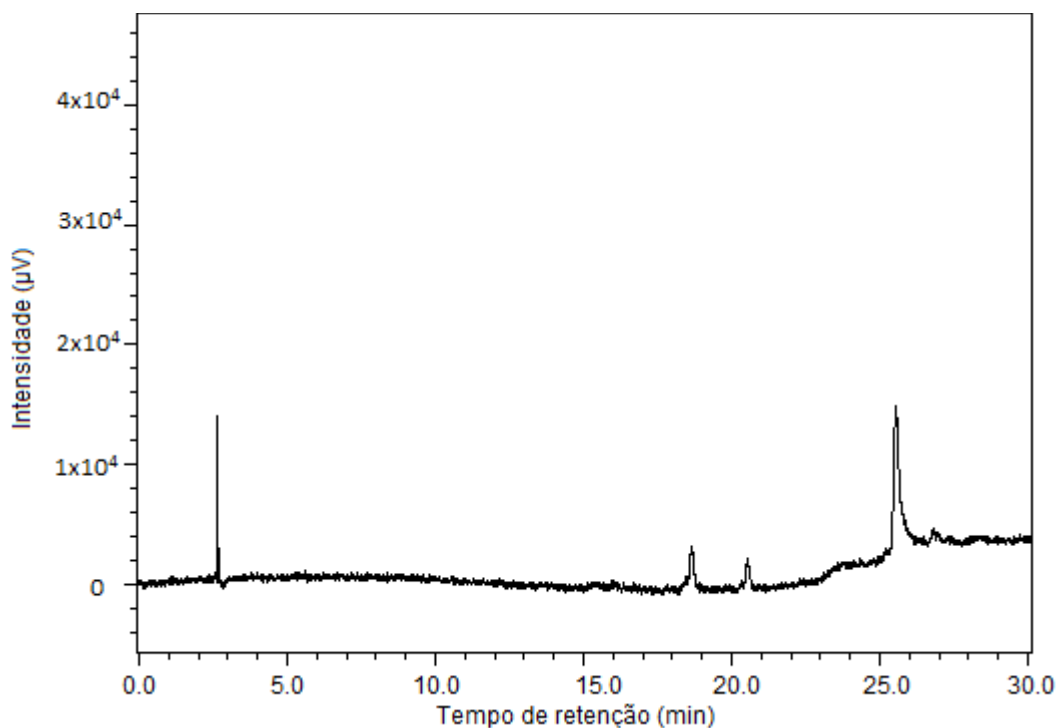
**Figura H:** Cromatograma obtido por CLAE-DAD da fração Raiz-4FR8. Detecção em 510nm.



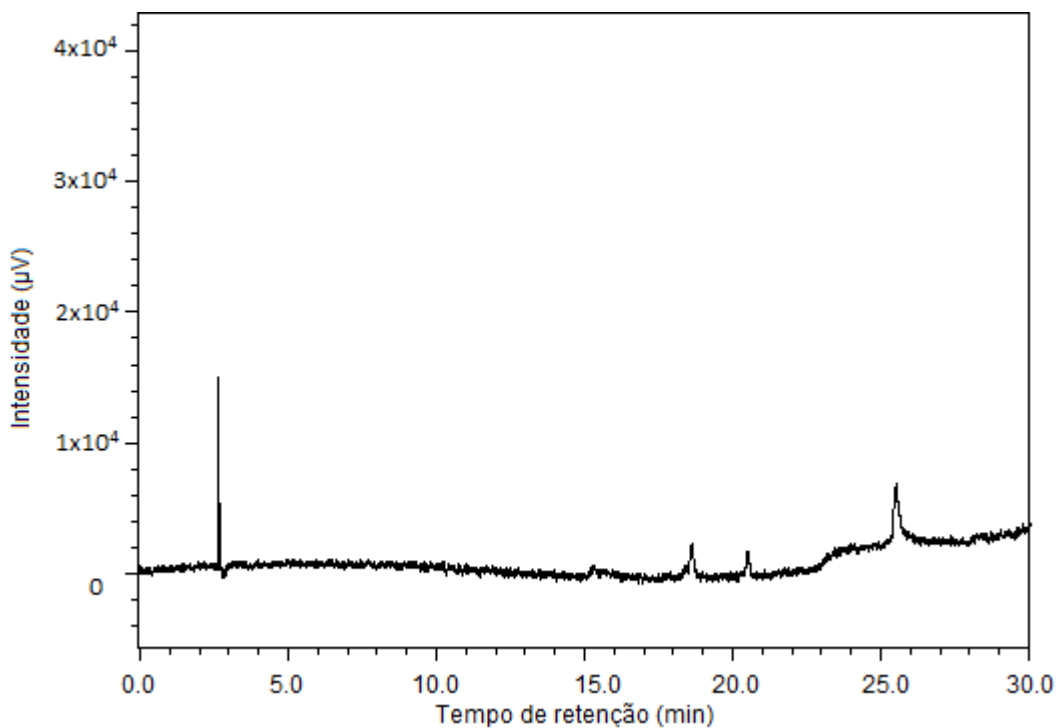
**Figura I:** Cromatograma obtido por CLAE-DAD da fração Raiz-4FR9. Detecção em 510 nm.



**Figura J:** Cromatograma obtido por CLAE-DAD da fração Raiz-4FR10. Detecção em 510 nm.



**Figura K:** Cromatograma obtido por CLAE-DAD da fração Raiz-4FR11. Detecção em 510 nm.



Araraquara, 05 de junho de 2017.

---

Ana Tereza de Souza Cruz

De acordo,

---

Profa. Dra. Isabele Rodrigues Nascimento