

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Estudo de Metodologias para a Extração e Caracterização de
Compostos Fenólicos da Polpa de Açaí

Osman Feitosa da Silva

Rio de Janeiro
2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Estudo de Metodologias para a Extração e Caracterização de Compostos Fenólicos da Polpa de Açaí

Osman Feitosa da Silva

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química de Produtos Naturais do Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências (Fitoquímica).

**Orientador: Prof. Dr. Antonio Jorge Ribeiro da Silva
Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais (UFRJ)**

Rio de Janeiro
2007

Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais - NPPN

Bloco H, Centro de Ciências da Saúde, Cidade Universitária, CEP. 21941-590, Rio de Janeiro

Fax: 55-21-2562 6512

Estudo de Metodologias para a Extração e Caracterização de
Compostos Fenólicos da Polpa de Açaí

Osman Feitosa da Silva

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química de Produtos Naturais do Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências (Fitoquímica).

Rio de Janeiro, 19 de dezembro de 2007

Prof. Dr. Antonio Jorge Ribeiro da Silva (NPPN / UFRJ)

Profa. Dra. Ana Lúcia do Amaral Vendramini (EQ / UFRJ)

Dr. Humberto Ribeiro Bizzo (CTAA / Embrapa)

Profa. Dra. Gilda Guimarães Leitão (NPPN / UFRJ)

Este trabalho é dedicado ao meu padrinho e avô Osman Luís da Silva (1925-1998) e à minha madrinha Liberalina P. de Souza (1928-2001)

AGRADECIMENTOS

A Deus, o Pai, por se importar comigo.

Ao Prof. Dr. Antonio Jorge Ribeiro da Silva pela paciência, orientação e confiança.

Aos membros da banca examinadora por terem aceitado o convite.

A todo o corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Química de Produtos Naturais do NPPN, principalmente, àqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a minha formação.

Ao Prof. Dr. Armando Sabaa Srur pelo fornecimento das amostras de açaí do Pará.

À pesquisadora Daise Lopes pela contribuição inicial dada à este trabalho.

Aos meus amigos de laboratório e praticamente co-orientadores deste trabalho, os doutorandos Josiane Roberto Domingues, Regina Pereira dos Santos e Ricardo Moreira Borges.

Aos amigos, também doutorandos, Juan Francisco P. Sabino da Guatemala e Kátia P. Menezes do INCQS / FIOcruz pela companhia e pelo enriquecimento dos seminários internos.

À doutoranda Andréa Gomes da Silva do Instituto de Nutrição pela colaboração intelectual.

Ao doutorando Evanoel Crizanto de Lima pela colaboração prestada no planejamento de reações e elucidação de mecanismos.

A todo o corpo técnico do Programa de Pós-Graduação em Química de Produtos Naturais do NPPN, especialmente, à Maria Cristina Holanda, Maria do Carmo Freire e Gisele de Oliveira.

Aos amigos e colegas também pós-graduandos do Programa de Pós-Graduação em Química de Produtos Naturais do NPPN pelo incentivo e colaboração intelectual.

À amiga de graduação do curso de Farmácia Gleiser Tupinambá pelo incentivo e indicação.

Ao Prof. Dr. Mário Vasconcelos, ex-professor de Química Orgânica da Faculdade de Farmácia da UFRJ, por sua dedicação profissional e por ter sido um dos responsáveis pelo meu interesse pela área.

Ao Dr. Mario Jorge de Araújo Gatti do Instituto Oswaldo Cruz (FIOcruz) e à Luciana Nogaroli Cavalcante pelo que contribuíram para a minha formação acadêmica.

Ao Prof. Dr. Adalberto Vieyra do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho pelo incentivo e compreensão.

À Prof.^a Elaine Gomes Quintana do Programa de Fisiologia do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho e ao Dr. Marcelo Einicker Lamas pela amizade e pela prontidão em servir sempre que requisitados.

À coordenação de pós-graduação e à direção, da gestão atual e da gestão anterior, e à administração do NPPN por terem garantido as condições necessárias para a realização deste trabalho.

À minha mãe Maria Lúcia Feitosa da Silva Netto e à minha avó Edith Feitosa de Lima pelo carinho e apoio durante toda a minha trajetória acadêmica.

“Eu sou a verdadeira videira e meu Pai é o lavrador. Todo o ramo em mim que não dá fruto, ele tira, e todo o que dá fruto, ele limpa, para que dê mais fruto.”

Jesus, segundo João Cap. 15:1-2.¹

¹ Tradução do Novo Mundo das Escrituras Sagradas. 1992. Watchtower Bible and Tract Society of New York, Inc. & International Bible Students Association, Brooklyn, New York, U.S.A. Edição Brasileira, p. 1061.

RESUMO

SILVA, Osman Feitosa da. **Estudo de Metodologias para a Extração e Caracterização de Compostos Fenólicos da Polpa de Açaí**. Rio de Janeiro, 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

No presente estudo, foram desenvolvidas metodologias analíticas que viabilizaram a investigação de compostos fenólicos em amostras de açaí, referidas aqui como os extratos aquosos de polpa obtidos por maceração dos frutos de *E. oleracea* Mart. A partir de extratos hidroalcoólicos e aquosos de açaí liofilizado e desengordurado por hexano em aparelho de Soxhlet, obteve-se, por extração líquido-líquido, frações hidrossolúveis e frações em acetato de etila (AcOEt), a partir das quais fez-se a caracterização de ácidos fenólicos e flavonóides do fruto por uso de várias técnicas preparativas e analíticas, incluindo técnicas de extração em fase sólida, cromatográficas e espectroscópicas. As frações aquosas serviram de objeto de análise para antocianinas, enquanto as frações orgânicas (em AcOEt) foram exploradas, principalmente, quanto ao seu conteúdo em ácidos fenólicos e outros flavonóides. A fração antocianina foi caracterizada com o auxílio de um adsorvente polimérico não iônico (Amberlite XAD-16) e análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (EM-IES). A fração de ácidos fenólicos livres foi caracterizada mediante o uso de diferentes fases estacionárias (celulose, trocadoras de íons e poliamida) e análises por CLAE acoplada a um sistema de detecção por rede de diodos, cromatografia gasosa (CG) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). Para a análise por CG-EM, as frações ricas em ácidos fenólicos foram submetidas às derivatizações com diazometano ou metanol anidro acidificado. A fração de ácidos fenólicos ligada à parede celular foi caracterizada por uso de uma resina trocadora de ânions fortemente básica (SAX) após tratamento alcalino dos resíduos de mesocarpo e epicarpo obtidos após centrifugação dos extratos brutos primários. Os resultados obtidos permitiram uma avaliação das técnicas analíticas e preparativas empregadas e geraram novas informações em relação ao conteúdo fitoquímico dos frutos de *E. oleracea*. Foram detectados e identificados, neste trabalho, os ácidos gálico, benzóico, protocatecuico, *p*-hidroxi-benzóico, vanílico, siríngico, verátrico, 3-(4-hidroxi)-fenil-2 (Z)-propenóico, 3-(3-metoxi-4-hidroxi)-fenil-2 (Z)-propenóico, ferúlico, *p*-cumárico e cinâmico, além de cianidina 3,5-diglicosídeo, cianidina 3-glicosídeo, cianidina 3-rutinosídeo, homoorientina e orientina. Este é o primeiro relato a citar a detecção de cianidina 3,5-diglicosídeo e dos ácidos benzóico, siríngico, verátrico, 3-(4-hidroxi)-fenil-2 (Z)-propenóico, 3-(3-metoxi-4-hidroxi)-fenil-2 (Z)-propenóico e cinâmico em amostras de açaí.

ABSTRACT

SILVA, Osman Feitosa da. **Estudo de Metodologias para a Extração e Caracterização de Compostos Fenólicos da Polpa de Açaí**. Rio de Janeiro, 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

In the present study, the development of analytical methodologies allowed the investigation of phytochemicals in “açaí” samples, referred here as the pulp aqueous extracts obtained from *E. oleracea* Mart. fruits. Liquid-liquid extraction of the hydroalcoholic and aqueous extracts of freeze-dried hexane defatted “açaí” yielded hydrossoluble and organic fractions from which the characterization of fruit phenolic acids and flavonoids was made by the use of several preparative and analytical techniques, including solid phase extraction, chromatographic and spectroscopic techniques. Aqueous fractions were used as analytical subject for anthocyanins, while the organic fractions (in ethyl acetate) were explored, mainly, for its phenolic acids and flavonoid content. Anthocyanic fraction was characterized by the use of an adsorption resin (Amberlite XAD-16) and by high performance liquid chromatography (HPLC) and electron-spray ionization-mass spectrometry (ESI-MS) analysis. The free phenolic acid fraction was characterized by use of different stationary phases (cellulose, ion exchangers and polyamide) and by HPLC with a photodiode array detector, gas chromatography (GC) and gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) analysis. Phenolic acid rich fractions were submitted to previous derivatization with diazomethane or anhydrous/acidified methanol before GC-MS analysis. After alkaline treatment of the mesocarp and epicarp residues obtained by centrifugation of the primary crude extracts, the wall bound phenolic acid fraction was characterized by use of a strongly alkaline anion exchange resin (SAX). The results obtained allowed an evaluation of the analytical and preparative techniques employed and generated new information about the phytochemical content of the *E. oleracea* fruits. The following acid compounds were identified in this study: gallic, benzoic, protocatecuic, *p*-hydroxy-benzoic, vanilic, siringic, veratric, 3-(4-hydroxy)-phenyl-2 (*Z*)-propenoic, 3-(3-methoxy-4-hydroxy)-phenyl-2 (*Z*)-propenoic, ferulic, *p*-coumaric and cinamic. The flavonoids cyanidin 3,5-diglucoside, cyanidin 3-glucoside, cyanidin 3-rutinoside, homoorientin and orientin were characterized altogether. This is the first study to report the detection of cyanidin 3,5-diglucoside and benzoic, siringic, veratric, 3-(4-hydroxy)-phenyl-2 (*Z*)-propenoic, 3-(3-methoxy-4-hydroxy)-phenyl-2 (*Z*)-propenoic e cinamic acids in “açaí” samples.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 <i>Euterpe oleracea</i> M.: uma espécie nativa	14
<i>1.1.1 Ocorrência e sinônimas</i>	14
<i>1.1.2 Descrição botânica da espécie e sistemática</i>	15
<i>1.1.3 Descrição geral e importância econômica</i>	17
1.2 Açaí: um possível alimento funcional	20
<i>1.2.1 Polifenóis do açaí</i>	20
<i>1.2.2 Lipossolúveis do açaí</i>	24
<i>1.2.3 Outros constituintes de valor nutricional</i>	25
<i>1.2.4 Atividade antioxidante</i>	25
1.3 Metodologias analíticas empregadas no estudo dos polifenóis	27
<i>1.3.1 Técnicas de extração e isolamento</i>	27
<i>1.3.2 Extração e isolamento dos polifenóis do açaí</i>	30
<i>1.3.3 Técnicas de identificação e quantificação</i>	36
2. OBJETIVOS.....	40
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
3.1 Material	41
<i>3.1.1 Solventes</i>	41
<i>3.1.2 Reagentes</i>	41
<i>3.1.3 Fases estacionárias para cromatografia em camada delgada</i>	43
<i>3.1.4 Resinas para extração em fase sólida</i>	43

3.2 Equipamentos	44
3.2.1 <i>Cromatógrafos</i>	44
3.2.2 <i>Espectrômetros</i>	44
3.2.3 <i>Componentes cromatográficos</i>	45
3.2.4 <i>Outros equipamentos</i>	45
3.3 Metodologia	46
3.3.1 <i>Obtenção e tratamento das amostras</i>	46
3.3.2 <i>Condições cromatográficas</i>	46
3.3.3 <i>Análise de fenólicos totais</i>	48
3.3.4 <i>Análise de antocianinas totais</i>	48
3.3.5 <i>Ensaio preliminar das técnicas de extração e isolamento para a análise de antocianinas</i>	49
3.3.6 <i>Análise dos compostos fenólicos por CCD</i>	50
3.3.7 <i>Ensaio experimental de marcha analítica direta para antocianinas</i>	51
3.3.8 <i>Testes de capacidade da resina XAD-16</i>	52
3.3.9 <i>Ensaio preliminar para a preparação de amostras para extração em fase sólida em coluna de celulose</i>	54
3.3.10 <i>Marcha preparativa comum para a obtenção de amostras para extração em fase sólida</i>	55
3.3.11 <i>Marcha experimental I para a obtenção de flavonóides</i>	57
3.3.12 <i>Testes comparativos para extração em fase sólida por SAX e obtenção da fração ligada à parede celular</i>	58
3.3.13 <i>Marcha experimental II para a obtenção de flavonóides</i>	60
3.3.14 <i>Teste preliminar de aprimoramento da análise da fração ligada à parede celular</i>	62

3.3.15 Reações de derivatização com diazometano e com metanol anidro acidificado	62
3.3.16 Reações de derivatização com catalisador de transferência de fase	63
3.3.17 Reações de hidrólise ácida	64
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
4.1 Resultados quantitativos gerais	65
4.1.1 Teor de massa seca	65
4.1.2 Teor de lipídeos totais	65
4.1.3 Fenólicos Totais	66
4.1.4 Antocianinas Totais	67
4.2 Antocianinas	68
4.2.1 Extração, detecção e identificação	68
4.2.2 Marcha analítica direta	74
4.2.3 Análise por CCD	75
4.2.4 Testes de capacidade da resina XAD-16	76
4.3 Ácidos fenólicos	77
4.3.1 Análise por CCD	77
4.3.2 Extração em fase sólida com coluna de celulose	78
4.3.3 Extração em fase sólida com RTIFB	90
4.3.4 Extração em fase sólida com SAX	97
4.3.5 Fração ligada à parede celular	118
4.3.6 Reações de derivatização com catalisador de transferência de fase	136
4.4 Flavonóides	142
4.4.1 Análise por CCD	142

4.4.2 <i>Extração em fase sólida com celulose e fracionamento em coluna sob média pressão</i>	143
4.4.3 <i>Extração em fase sólida com SAX</i>	148
4.4.4 <i>Extração em fase sólida com poliamida</i>	151
5. CONCLUSÕES	158
REFERÊNCIAS	161

LISTA DE SIGLAS

AcOEt	Acetato de etila
AcOH	Ácido acético
AcONa	Acetato de sódio
ADBE	2-amino-difenil-borato de etila
ATFA	Ácido trifluoracético
BTBA	Brometo de tetrabutilamônio
BTCA	Brometo de tetracetilamônio
C ₁₈	Fase estacionária inversa constituída de sílica funcionalizada com octadecilsilano
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG	Cromatografia gasosa
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CIT	Contagem de íons totais
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector com arranjo rede de diodos
CLAE-EM	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas
DAD	Detetor com arranjo de diodos
EFS	Extração em fase sólida
EM-BAR	Espectrometria de massas por bombardeamento com átomos rápidos
EM-DILAM	Espectrometria de massas com desorção e ionização à <i>laser</i> assistida por matriz

EM-IES	Espectrometria de massas com ionização por <i>electrospray</i>
EM-EI	Espectrometria de massas com eletroionização
EM-IQPA	Espectrometria de massas com ionização química à pressão atmosférica
EM-TV-DILAM	Espectrometria de massas por tempo de voo com desorção e ionização à <i>laser</i> assistida por matriz
Et ₂ O	Éter etílico
EtOH	Etanol
IES	Ionização por <i>electrospray</i>
MeOH	Metanol
P.A.	Para análise
PEG	Polietilenoglicol
POL	Poliamida
RDCTF	Reação de derivatização com catalisador de transferência de fase
RTIFB	Resina trocadora de íons fortemente básica
SAX	Marca registrada de resina de troca iônica, derivada da expressão strong anion exchange
XAD	Marca registrada de adsorvente polimérico não iônico

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Euterpe oleracea* M.: uma espécie nativa

1.1.1 Ocorrência e sinônimas

Entre as palmeiras encontradas em regiões de clima tropical, *Euterpe oleracea* Martius é uma das espécies mais abundantes das várzeas² da região leste amazônica (STRUDWICK & SOBEL, 1988; LICHTENTHÄLER *et al.*, 2005). Embora sua distribuição natural se limite ao norte da América do Sul (INSFRAN *et al.*, 2004; LICHTENTHÄLER *et al.*, 2005; SCHAUSS *et al.*, 2006a), a espécie desenvolve-se bem em vários tipos de clima e solo, preferindo regiões tropicais com temperatura média anual de 26°C, índice pluviométrico superior a 2.300 mm anuais e períodos de estiagem bem definidos (SANTOS, 2001). Esta e outras espécies do gênero *Euterpe* encontram-se vastamente disseminadas na amazônia oriental, principalmente entre os estados do Pará, Amazonas, Mato Grosso, Maranhão e Tocantins, atingindo também parte do nordeste, Amapá, Guianas e Venezuela (GONSALVES, 1955; SANTOS, 2001; ROCHA *et al.*, 2007). Como sua maior ocorrência e importância econômica se dá no estado do Pará (INSFRAN *et al.*, 2004; GALLORI *et al.*, 2004), a espécie *E. oleracea* Mart. é conhecida na região norte do Brasil como açaí do Pará, sendo também denominada por açaí touceira, açaí estuário³, juçara, jiçara (do indígena *yiçára*, que significa “feito de cordas duras”, *yi* = duro e *ça* = corda), palmeira *pinot* nas Guianas, *manaca* pelos venezuelanos e *Euterpe palm* pelos ingleses (FONSECA, 1927; GONSALVES, 1955; SANTOS, 2001). O nome açaí, que deriva de antigas denominações grafadas como *assahy*, *uassahy*, *açahy* e *uaçáy*, também tem origem indígena e significa “líquido dos frutos

² Planícies alagáveis.

³ Desembocadura de um rio, ampla e funda.

de corda” (*ua* = fruto, *ça* = corda e *y* = líquido ou água) (FONSECA, 1927). A espécie é também citada na literatura internacional como *amazonian palm berry* e *cabbage palm*, por ter aparência e sabor semelhantes a outros *berries* e devido a semelhança morfológica de seus brotos terminais com o repolho, respectivamente (GALLORI *et al.*, 2004; SCHAUSS *et al.*, 2006a).

1.1.2 Descrição botânica da espécie e sistemática

Dentro do gênero *Euterpe*, o qual compreende espécies muito semelhantes, *E. oleracea* não é a única espécie conhecida como açaí. Entre outras denominações, o nome “açaí” também é popularmente utilizado para designar as espécies *E. edulis* Mart., *E. badiocarpa* Barbosa Rodrigues e *E. precatoria* Mart. (FONSECA, 1927; GONSALVES, 1955; HENDERSON & SCARIOT, 1993), enquanto *E. catinga* Wallace, *E. controversa* Barb. Rodr. e *E. longibracteata* Barb. Rodr. são conhecidas como “açaí-chumbinho”, “açaí-chumbo” e “açaí-da-mata”, respectivamente (GONSALVES, 1955; HENDERSON & SCARIOT, 1993). Portanto, considerando que algumas destas espécies já tenham sido classificadas como variedades de uma mesma espécie (GONSÁLVES, 1955), sua distinção correta, atualmente, depende de análise cuidadosa de suas características morfológicas gerais. *E. oleracea* distingue-se por crescer formando touceiras, apresentando estipes múltiplos de 2 a 30 m de altura, reunidos na base (Fig. 1), folhas primordiais divididas em folíolos com oito segmentos lineares, folhas adultas longas e segmentadas, flores em espiga, frutos drupáceos com cerca de 10-15 mm de diâmetro e gomo terminal longo e macio, o apreciado palmito (FONSECA, 1927; SANTOS, 2001; INSFRAN *et al.*, 2004; LICHTENTHÄLER *et al.*, 2005). Entre outras fontes de palmito, *E. edulis* (também conhecida como palmito doce ou juçara) destaca-se por apresentar apenas estipes solitários, assim como *E. precatoria*

(IADEROZA *et al.*, 1992; HENDERSON & SCARIOT, 1993), enquanto *E. badiocarpa* (antes conhecida como palmito do norte) seria a espécie mais semelhante à *E. oleracea* (FONSECA, 1927).

O gênero *Euterpe* é um dos mais de 200 gêneros pertencentes à família Palmae, também denominada Arecaceae (JOLY, 1998; SANTOS, 2001). Segundo Joly (1998), a família Palmae é a única família representante da ordem Principes, compreendendo um dos maiores grupos de plantas pertencentes à classe das monocotiledônias (Reino Plantae / Divisão Anthophyta / Classe Monocotyledonae). Seu número exato de espécies, assim como o de subfamílias, gêneros e tribos são um tanto variáveis, de acordo com a classificação botânica adotada (SANTOS, 2001). A falta de concordância na determinação de fronteiras entre gêneros e espécies tem motivado a busca por possíveis marcadores quimiotaxonômicos que viabilizem uma classificação sistemática mais aceitável entre os botânicos.



Figura 1: Exemplo de uma palmeira da espécie *E. oleracea*. Fotografia disponível em www.cpatu.embrapa.br (12/08/2007).

Entre as classes de metabólitos secundários já detectados em espécies da família, destacam-se alcalóides, proantocianidinas, flavonóides, saponinas e sapogeninas (SANTOS, 2001). Porém, a ocorrência universal do ácido 3-cafeil-chiquímico (Fig. 2) em flores das

espécies de Palmae fez com que Harborne *et al.* (1974) propusessem que este fosse um marcador quimiotaxonômico para a família, dada a sua aparente raridade em outras espécies até então. Contudo, relato recente tem proposto o mesmo papel para o ácido *p*-hidroxi-benzóico (Fig. 3), já detectado em extratos de mesocarpo dos frutos de duas subfamílias de Palmae (CHAKRABORTY *et al.*, 2006).

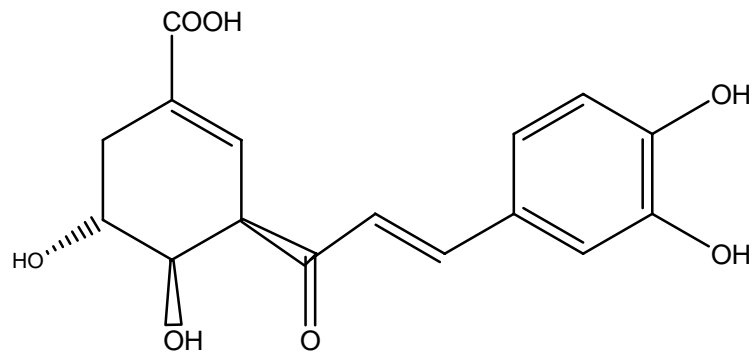


Figura 2: Estrutura do ácido 3'-cafeil chiquímico.

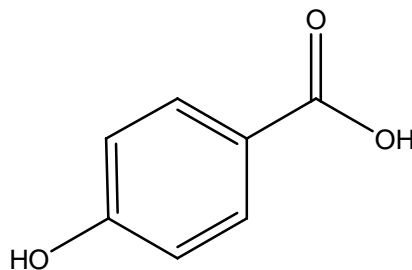


Figura 3: Estrutura do ácido *p*-hidroxi-benzóico.

1.1.3 Descrição geral e importância econômica

Os frutos da espécie *E. oleracea* devem ser colhidos durante a estação seca (agosto a dezembro na região do delta⁴ amazônico) para se obter maior produção e frutos com melhores características organolépticas (STRUDWICK & SOBEL, 1988; ROGEZ, 2000;

⁴ Terreno triangular em que dois lados são formados por dois braços de um rio e o outro pela costa do mar.

LICHTENTHÄLER, 2005). Cada palmeira, com até 30 metros de altura, produz três ou quatro cachos, e cada cacho (Fig. 4) fornece cerca de três a seis kilogramas de frutos (Fig. 5) (INSFRAN *et al.*, 2004). Os frutos possuem uma única semente, a qual constitui a maior parte de seu volume, e esta é revestida por fibras filamentosas que são recobertas por uma fina camada comestível (mesocarpo mais epicarpo), na qual se inclui a polpa e também a casca (FONSECA, 1927; CONSTANT, 2003; INSFRAN *et al.*, 2004; LICHTENTHÄLER *et al.*, 2005).



Figura 4: Cachos dos frutos de *E. oleracea*. Fotografia disponível em www.cpatu.embrapa.br (12/08/2007).

Desde 1992, a exploração dos frutos da juçara e de outros produtos florestais não madeireiros ganhou importância como alternativa para evitar desmatamentos e queimadas na Amazônia, sendo, hoje, de fundamental importância para as economias dos estados do Pará, Maranhão, Amapá, Acre e Rondônia (HOMMA, 2005). Em 2000, este mercado começou a ganhar o mundo e o extrato aquoso congelado da polpa passou a ser exportado para os Estados Unidos e para a Itália, atingindo também Holanda e Japão até 2004 (HOMMA, 2005; ROCHA *et al.*, 2007). Entretanto, mesmo com este crescimento (cerca de 20% ao ano), o volume de exportações em 2004 (cerca de 1.000 toneladas de extrato aquoso congelado) não

passava de 10 % do consumo nacional naquele mesmo ano (ROCHA *et al.*, 2007); cerca de 180 toneladas de polpa eram consumidas anualmente apenas no estado do Pará (GALLORI *et al.*, 2004).



Figura 5: Cestos recolhidos com os frutos de *E. oleracea*. Fotografia disponível em www.cpatu.embrapa.br (12/08/2007).

Embora o palmito de *E. oleracea*, extraído de seu tronco, seja consumido mundialmente em forma de conserva, incluído em saladas, a maior parte de seus frutos é consumida no Brasil, servindo inclusive como principal fonte alimentícia de populações pobres e indígenas no norte do Brasil, na Colômbia e no Suriname (GALLORI *et al.*, 2004; MATHEUS *et al.*, 2006; STRUDWICK & SOBEL, 1988; SCHAUSS *et al.*, 2006a). Nas regiões produtoras do norte brasileiro, os frutos são utilizados, primariamente, para o preparo do suco, denominado “vinho de açaí”, o qual pode ser obtido por despulpamento manual (em pilões) ou mecânico (Fig. 6), seguido por maceração e extração da polpa com quantidades variáveis de água (STRUDWICK & SOBEL, 1988; LICHTENTHÄLER *et al.*, 2005; SANTOS, 2001; INSFRAN *et al.*, 2004; SOUZA *et al.*, 2006). De acordo com as regulamentações vigentes no Brasil, estes extratos são comercializados com as seguintes designações: açaí grosso (> 14 % de massa seca), açaí médio (11-14 % de massa seca) e açaí fino (8-11 % de massa seca) (LICHTENTHÄLER *et al.*, 2005). No Pará, após despulpamento

dos frutos, é comum o preparo de emulsões aquosas da polpa oleosa com açúcar e farinha de mandioca (GALLORI *et al.*, 2004); enquanto nos centros urbanos de outras regiões, os produtos da polpa (sorvetes, geléias, licores e bebidas energéticas preparadas com ou sem adição de outras frutas e/ou xaropes) tornaram-se populares em todos os níveis sócio-econômicos (INSFRAN *et al.*, 2004; LICHTENTHÄLER *et al.*, 2005) devido seu alto valor nutritivo (MELO *et al. apud* SANTOS, 2001; ROGEZ, 2000) e ao consumo crescente de sucos de frutas naturais como bebidas energéticas (BOBBIO *et al.*, 2000).



Figura 6: Despolpadeira mecânica. Fotografia disponível em www.cpatu.embrapa.br (12/08/2007).

1.2 Açaí: um possível alimento funcional

1.2.1 Polifenóis do açaí

A procura por alimentos e bebidas que promovam efeitos benéficos para a saúde tem motivado a comunidade científica a buscar cada vez mais informações a respeito da constituição química dos alimentos que fazem parte da dieta humana. Entre os constituintes químicos hidrossolúveis detectados em alimentos de origem vegetal, os polifenóis constiuem

a maior classe de biomoléculas com atividade antioxidante (EVANS *et al.*, 1996; WANG *et al.*, 1996). Há evidências suficientes para se afirmar que os radicais livres desempenham um papel importante na maioria dos problemas de saúde da sociedade moderna, principalmente nos casos de doenças degenerativas causadas por estresse oxidativo, como os vários tipos de câncer, as doenças cardiovasculares e as doenças neurodegenerativas associadas com o envelhecimento (TSAO & YANG, 2003; SAKAKIBARA *et al.*, 2003). Os polifenóis, devido seu alto potencial redox, atuam como agentes redutores, doadores de hidrogênio ou “*singlet oxygen quenchers*”, prevenindo tais doenças degenerativas (KAHKONEN *et al.*, 1999; TSAO & YANG, 2003; SAKAKIBARA *et al.*, 2003).

Devido a grande variedade de glicosídeos existentes, estima-se que haja mais de um milhão de compostos fenólicos diferentes na natureza (HERRMANN, 1976; WOLLENWEBER & DIETZ, 1981; SAKAKIBARA *et al.*, 2003), subdivididos em duas classes principais de agliconas: os policíclicos e os fenólicos simples. Os primeiros incluem flavonóides, estilbenos, taninos condensados e hidrolizáveis, antraquinonas, cumarinas, lignanas e ligninas, entre outros não correlacionados estruturalmente, enquanto a segunda classe é representada, principalmente, por ácidos fenólicos, que incluem os derivados do ácido cinâmico e do ácido benzóico (SAKAKIBARA *et al.*, 2003; NACZK & SHAHIDI, 2004).

A composição química de extratos aquosos, hidroalcoólicos e cetônicos dos frutos de *E. oleracea* tem sido relatada por vários autores (IADEROZA *et al.*, 1992; ROGEZ, 2000; LICHTENTHÄLER *et al.*, 2005; BOBBIO *et al.*, 2000; CONSTANT, 2003; GALLORI *et al.*, 2004; INSFRAN *et al.*, 2004; LICHTENTHÄLER *et al.*, 2005; SCHAUSS *et al.*, 2006a; PACHECO *et al.*, 2007) e, embora não haja concordância absoluta entre estes relatos (Quadro 1), parecem já confirmadas as identidades de alguns constituintes principais.

Quadro 1: Polifenóis^a dos frutos de *E. oleracea* já descritos na literatura.

Antocianinas	Outros flavonóides	Ácidos fenólicos	Referências
Cianidina 3-glicosídeo e cianidina 3-rutinosídeo			IADEROZA <i>et al.</i> , 1992; ROGEZ, 2000; CONSTANT, 2003
Cianidina 3-arabinosídeo e cianidina 3-arabinosil-arabinosídeo			BOBBIO <i>et al.</i> , 2000
Cianidina 3-glicosídeo, cianidina 3-rutinosídeo e outros derivados de cianidina e peonidina	Homoorientina, orientina, isovitexina, taxifolina desoxi-hexose e um derivado de homoorientina		GALLORI <i>et al.</i> , 2004
Cianidina 3-glicosídeo e pelargonidina 3-glicosídeo	Catequina e epicatequina	Ácido ferúlico, <i>p</i> -hidroxi-benzóico, gálico, protocatecuico, elágico, vanílico, <i>p</i> -cumárico, cinco derivados de ácido gálico ^b e um derivado de ácido elágico ^b	INSFRAN <i>et al.</i> , 2004
Cianidina 3-glicosídeo, cianidina 3-rutinosídeo e peonidina rutinosídeo	Catequina e rutina	Ácido protocatecuico	LICHTENTHÄLER <i>et al.</i> , 2005
Cianidina 3-glicosídeo, cianidina 3-rutinosídeo, cianidina 3-sambubiosídeo, peonidina 3-glicosídeo e peonidina 3-rutinosídeo	Homoorientina, orientina, isovitexina, taxifolina desoxi-hexose, escoparina e outros não identificados		SCHAUSS <i>et al.</i> , 2006a
Cianidina 3-glicosídeo e cianidina 3-rutinosídeo	Catequina e epicatequina	Dois derivados de ácido gálico ^b , ácido ferúlico, ácido vanílico, <i>p</i> -cumárico, <i>p</i> -hidroxi-benzóico e protocatecuico	PACHECO <i>et al.</i> , 2007

^a exceto proantocianidinas (nenhuma estrutura de proantocianidina foi elucidada).

^b possíveis taninos hidrolizáveis.

Entre os polifenóis, duas antocianinas são predominantes: cianidina 3-glicosídeo e cianidina 3-rutinosídeo. Estes pigmentos, pertencentes à classe dos flavonóides, são identificados como os constituintes hidrossolúveis mais abundantes dos frutos pela maioria dos autores (IADEROZA *et al.*, 1992; ROGEZ, 2000; CONSTANT, 2003; GALLORI *et al.*, 2004; LICHTENTHÄLER *et al.*, 2005; SCHAUSS *et al.*, 2006a; PACHECO *et al.*, 2007). Um dos relatos mais recentes (SCHAUSS *et al.*, 2006a) descreve ainda a presença de

cianidina 3-sambubiosídeo, peonidina 3-glicosídeo e peonidina 3-rutinosídeo, de acordo com as propostas de Gallori *et al.* (2004). Entretanto, outros relatos identificam as duas antocianinas principais como cianidina 3-arabinosídeo e cianidina 3-arabinosil-arabinosídeo (BOBBIO *et al.*, 2000) e como cianidina 3-glicosídeo e pelargonidina 3-glicosídeo (INSFRAN *et al.*, 2004), o que levou Schauss *et al.* (2006a) a sugerirem que tais resultados fossem questionados, por se tratarem, provavelmente, de trabalhos com frutos de outras espécies ou variedades.

A presença de outros flavonóides em extratos de polpa ou extratos integrais dos frutos foi investigada em cinco relatos (INSFRAN *et al.*, 2004; GALLORI *et al.*, 2004; LICHTENTHÄLER *et al.*, 2005; SCHAUSS *et al.*, 2006a; PACHECO *et al.*, 2007), mas a detecção e a identificação de homoorientina, orientina, isovitexina e taxifolina desoxi-hexose por Gallori *et al.* (2004) é confirmada apenas por Schauss *et al.* (2006a) (Quadro 1), que descrevem ainda a detecção de vários outros flavonóides não identificados. A detecção de catequina e epicatequina é mencionada nos outros três relatos (INSFRAN *et al.*, 2004; LICHTENTHÄLER *et al.*, 2005; PACHECO *et al.*, 2007), mas a presença destes constituintes em extratos de polpa, assim como a presença de rutina e ácido procatecuico, tem sido referida como uma contaminação por constituintes da semente durante o processo de extração da polpa (LICHTENTHÄLER *et al.*, 2005). Proantocianidinas (ou taninos condensados), moléculas poliméricas responsáveis pela adstringência de frutos e bebidas, foram também detectadas em extratos integrais (SCHAUSS *et al.*, 2006a) e extratos de polpa (LICHTENTHÄLER *et al.*, 2005; PACHECO *et al.*, 2007). A detecção de cinco destas substâncias em extratos de semente é evidenciada por Rodrigues *et al.* (2006), assim como a detecção de epicatequina e ácido procatecuico, um ácido fenólico.

Poucos trabalhos relatam a existência de ácidos fenólicos nos frutos de *E. oleracea* e apenas dois exploram o seu conteúdo (INSFRAN *et al.*, 2004; PACHECO *et al.*, 2007). O

relato de Insfran *et al.* (2004) sugere que os ácidos fenólicos encontrados na polpa dos frutos sejam, do mais ao menos abundante: ácido ferúlico, *p*-hidroxi-benzóico, gálico, protocatecuico, elágico, vanílico e *p*-cumárico. Cinco derivados de ácido gálico e um derivado de ácido elágico também foram detectados. O segundo relato descreve a detecção de dois derivados de ácido gálico e ácido ferúlico como constituintes principais, enquanto ácido vanílico, *p*-cumárico, *p*-hidroxi-benzóico e protocatecuico constituiriam a fração menos expressiva. Considerando que vários fatores ambientais, além do estágio de maturação, podem ter influência sobre a composição química dos frutos, estes resultados parecem bastante concordantes. Entretanto, o questionamento levantado por Schauss *et al.* (2006a), em relação à espécie realmente utilizada por Insfran *et al.* (2004), torna necessária a obtenção de novos dados que confirmem tais resultados.

1.2.2 Lipossolúveis do açaí

A composição química de extratos apolares integrais ou da polpa tem sido pouco explorada atualmente (LUBRANO *et al.*, 1994; SANTOS, 2001; SCHAUSS *et al.*, 2006a), mas as primeiras investigações feitas com o óleo extraído dos frutos datam de muito tempo (FONSECA, 1927) e alguns resultados recentes são bastante concordantes. Segundo Schauss *et al.* (2006a), entre os ácidos graxos saturados, destacam-se os ácidos palmítico (24 %) e esteárico (1,6 %); entre os monoinsaturados, destacam-se os ácidos oléico (56,2 %) e palmitoléico (4,3 %), e, entre os poliinsaturados, os ácidos linoléico (12,5 %) e linolênico (0,8 %). Ainda segundo o mesmo relato, entre os constituintes químicos menos expressivos da fração lipossolúvel, colesterol, β -sitosterol, stigmasterol e campesterol foram também detectados. O conteúdo lipossolúvel total, 32,5 g por 100 g de massa seca de fruto íntegro (com a semente), mostrou-se reduzido quando comparado com o valor encontrado por Melo

et al. (apud SANTOS, 2001) para o extrato hexânico dos frutos obtido em aparelho de Soxhlet (44,47 %), mas pareceu condizente com o valor determinado por Rogez (2000), referente aos lipídeos totais extraídos da polpa (48 g / 100 g de massa seca).

1.2.3 Outros constituintes de valor nutricional

O perfil nutricional dos frutos de *E. oleracea* é de um alimento energético, com alto valor nutritivo e rico em sais minerais e fibras alimentares (ROGEZ, 2000; YUYAMA *et al.*, 2002; SCHAUSS *et al.*, 2006a). Embora tenha um alto teor calórico, devido principalmente ao seu alto conteúdo lipídico, seus constituintes glicídicos somam menos que 2 % da massa total dos frutos (SCHAUSS *et al.*, 2006a). Glicose, frutose e maltose constituem os glicídeos principais, enquanto lactose e sacarose são detectadas em quantidades ínfimas (SCHAUSS *et al.*, 2006a). Seu conteúdo protéico, quase 10 % da massa seca (MELO *et al.* apud SANTOS, 2001; SCHAUSS *et al.*, 2006a), responde pela outra “fatia calórica”, suprimindo cerca de 25-30 % das necessidades diárias após consumo de 1 L de suco do tipo médio (COHEN, 2005). Contudo, seus constituintes vitamínicos, nutrientes com reconhecida atividade antioxidante, parecem ainda não bem definidos, sendo a detecção das vitaminas A (retinol / β -caroteno), B1 (tiamina), B2 (riboflavina), C (ácido ascórbico) e E (α -tocoferol) reportada aleatoriamente entre três relatos (ROGEZ, 2000; AÇAÍ: GUIA RURAL - ABRIL ANUÁRIO apud SANTOS, 2001; SCHAUSS *et al.*, 2006a).

1.2.4 Atividade antioxidante

A capacidade antioxidante de diferentes extratos dos frutos de *E. oleracea* também tem sido avaliada por vários autores, seguindo metodologias diversas (SANTOS, 2001;

COÏSON *et al.*, 2005; LICHTENTHÄLER *et al.*, 2005; MATHEUS *et al.*, 2006; SCHAUSS *et al.*, 2006b; PACHECO *et al.*, 2007). Atividade anti-radical superóxido extremamente alta foi detectada em extratos totais (acetona / água) de frutos íntegros (SCHAUSS *et al.*, 2006b) e atividades moderadas a elevadas anti-radicais peroxila, peroxinitrito e hidroxila também foram detectadas em extratos aquosos e/ou orgânicos de frutos íntegros e de polpa (LICHTENTHÄLER *et al.*, 2005; SCHAUSS *et al.*, 2006b). Embora os constituintes químicos responsáveis por estas atividades ainda não tenham sido determinados na espécie, a procura por alimentos com atividades antioxidantes, característica típica de frutos ricos em antocianinas, incentivou a pesquisa por suas qualidades como alimento ou ingrediente funcional (COÏSON *et al.*, 2005; LICHTENTHÄLER *et al.*, 2005). Alimento funcional seria aquele que, comprovadamente, afetaria benéficamente um ou mais alvos funcionais do corpo humano, além de seus devidos efeitos nutricionais, proporcionando uma melhora no estado de saúde e bem estar e/ou reduzindo o risco de desenvolvimento de uma doença (ROBERFROID *et al.*, 2002). É dentro deste contexto funcional que o presente trabalho se propõe a explorar ainda mais a composição química do açaí⁵, especificamente os constituintes polifenólicos presentes em extratos hidrossolúveis do açaí liofilizado, já que seu conteúdo em nutrientes vitamínicos hidrossolúveis (SCHAUSS *et al.*, 2006a; ROGEZ, 2000) não parece ser suficiente para contribuir significativamente para a capacidade antioxidante total dos frutos.

⁵ Designado aqui como o extrato aquoso de polpa obtido por maceração dos frutos de *Euterpe oleracea*.

1.3 Metodologias analíticas empregadas no estudo dos polifenóis

1.3.1 Técnicas de extração e isolamento

A escolha da técnica mais apropriada e eficiente para a extração e o isolamento de um determinado grupo de polifenóis depende, principalmente, de uma análise prévia da natureza química do grupo a ser investigado. Embora sejam encontrados em diversas fontes vegetais, os compostos fenólicos não são uniformemente distribuídos nos tecidos e compartimentos celulares (BENGOECHEA *et al.*, 1997). Enquanto os fenólicos insolúveis (p. ex. ligninas) são encontrados constituindo as estruturas de parede celular, os fenólicos solúveis (como os glicosídeos de flavonóides) encontram-se compartimentalizados dentro de vacúolos das células vegetais (NACZK & SHAHIDI, 2004; BLOOR, 2001). Contudo, a extração de compostos fenólicos em geral pode ser feita por simples imersão da amostra numa solução extratora (por difusão) ou pelo uso conjunto de um homogeneizador, o qual promoverá a ruptura dos tecidos vegetais, facilitando a sorção dos solventes na amostra (BAILÓN & BUELGA, 2003).

A eficiência destes processos extrativos pode ser influenciada por diversos fatores, tais como tipo de solvente, pH, temperatura, número e período das etapas extrativas, volume da solução extratora e tamanho das partículas constituintes da amostra (BAILÓN & BUELGA, 2003). Normalmente, períodos de extração muito prolongados (mais de 24 h) são evitados com o intuito de se reduzir a possibilidade de ocorrência de reações de oxidação, exceto quando agentes redutores são adicionados ao sistema solvente (NACZK & SHAHIDI, 2004). Assistência por ultrassom torna a extração mais rápida e mais completa do que quando assistida por técnicas tradicionais (maceração ou agitação), devido à maior fragmentação das partículas da amostra, o que aumenta a superfície de contato entre as fases líquida e sólida

(BAILÓN & BUELGA, 2003). Metanol (MeOH), etanol (EtOH), acetona, água, acetato de etila (AcOEt) e suas combinações são os solventes mais utilizados para a extração de compostos fenólicos (NACZK & SHAHIDI, 2004). Entre estes, MeOH é o solvente mais empregado e a utilização de soluções metanólicas (70-80 % em H₂O) tem sido bem sucedida na extração de derivados hidroxicinâmicos, flavonas, flavonóis e catequinas (BAILÓN & BUELGA, 2003). Porém, a utilização de acetona para a extração de antocianinas em vez de MeOH acidificado tem proporcionado extrações mais eficientes e reprodutíveis, por evitar problemas com pectinas e permitir que a amostra seja concentrada em temperaturas mais baixas (VIGUERA *et al.*, 1998). Outra boa opção é a extração com AcOEt, que torna-se quantitativa para os principais compostos fenólicos quando se associa sulfato de amônio (20 %), ácido metafosfórico (2 %) e EtOH (20 %) ao solvente (BAILÓN & BUELGA, 2003).

Segundo Bloor (2001) a mistura MeOH / H₂O / ác. acético (AcOH) (70:23:7) seria um solvente de extração geral para a maioria dos tipos de flavonóides de tecidos vegetais e 2-5 mL desta solução seriam suficientes para se obter um extrato pronto para análises cromatográficas subsequentes a partir de 50 mg de material vegetal. Cinquenta mililitros de uma solução extratora semelhante (MeOH / H₂O / HCOOH; 70:28:2) foram utilizados por Gao & Mazza (1995) para a extração de antocianinas e outros polifenóis a partir de 30 g de *sweet cherries*. Entretanto, segundo Bailón & Buelga (2003), o uso de ácido fórmico para acidificar soluções extratoras de antocianinas não é indicado por promover acilações e gerar artefatos. A presença de um ácido orgânico teria por finalidade a manutenção do pH num valor baixo o suficiente para se evitar a degradação das estruturas catiônicas das antocianinas por hidratação e conseqüente geração de pseudobases, bases quinonoidais e chalconas (FIGUEIREDO *et al.*, 1996; LAPIDOT *et al.*, 1999; FLESCHHUT *et al.*, 2006), mas pode ser também conveniente para aumentar a recuperação de ácidos fenólicos em certos procedimentos extrativos (ŽIAKOVÁ *et al.*, 2003). Entretanto, Einbond *et al.* (2004)

utilizaram MeOH puro para extrair antocianinas de vários frutos comestíveis, embora a utilização deste solvente puro tenha sido relacionada à geração de turbidez em amostras de sucos após centrifugação (BAILÓN & BUELGA, 2003). Revilla *et al.* (1998) compararam várias técnicas de extração de antocianinas e concluíram que os solventes que contêm concentrações de HCl acima de 0,12 M podiam causar hidrólise parcial de antocianinas aciladas. Além disso, considerando que estes extratos hidroalcoólicos são sempre subsequentemente concentrados, o uso de ácidos não voláteis poderia causar não apenas hidrólise de grupos acila, mas também de glicosídeos, gerando agliconas instáveis (KONG *et al.*, 2003).

Quando o objetivo do trabalho é o isolamento de produtos naturais, um fator analítico importante é a presença de interferentes. Uma amostra vegetal pode conter uma grande variedade de compostos apolares, tais como ácidos graxos, esteróis, terpenos, clorofilas e carotenóides, que podem prejudicar os processos de separação e as análises subsequentes dos componentes fenólicos da amostra (ŽIAKOVÁ *et al.*, 2003; NACZK & SHAHIDI, 2004). Vários métodos extrativos, como a extração líquido-líquido, extração em fase sólida, extração por solvente acelerado (*accelerated solvent extraction*) e extração por fluido super crítico são recomendados para o tratamento de amostras vegetais antes das análises cromatográficas (ŽIAKOVÁ *et al.*, 2003). Amostras com alto teor de lipossolúveis geralmente requerem desengorduramento em aparelho de Soxhlet antes da extração dos fenólicos (BAILÓN & BUELGA, 2003). Clorofilas podem ser removidas por lavagem dos extratos hidroalcoólicos com hexano ou éter dietílico (Et₂O), enquanto açúcares e fenólicos indesejados podem ser removidos por extração em fase sólida (EFS) (BLOOR, 2001). Éter de petróleo, AcOEt e Et₂O também podem ser utilizados para remover lipídeos e fenólicos indesejados (NACZK & SHAHIDI, 2004).

Entre os procedimentos de EFS, o uso de resinas do tipo XAD tem sido aplicado quando se deseja remover açúcares e outros constituintes polares de amostras vegetais contendo fenólicos (BARBERÁN *et al.*, 1992; WANG *et al.*, 1997; LLORACH *et al.*, 2003; ADHIKARI *et al.*, 2005). O uso de resinas trocadoras de íons tem sido reduzido, devido o surgimento de técnicas mais modernas e eficientes. Assim, celulose impregnada com polietileneimina (PEI) e celulose ecteola não são mais utilizadas atualmente, enquanto DEAE-celulose e DEAE-Sephadex ainda são utilizadas, mas apenas para análises de polissacarídeos (WATT *et al.*, 2002; SUDHAMANI *et al.*, 2004). Entretanto, Einbond *et al.* (2004) utilizaram resina *Diaion HP20-SS* para remover açúcares e vitamina C de 12 extratos antociânicos de frutas e Mullen *et al.* (2002) empregaram uma combinação desta (*Diaion HP20-SS*) com uma coluna de sílica funcionalizada de fase inversa (C₁₈⁶) para fins semelhantes.

Cartuchos contendo C₁₈ são muito utilizados para EFS, inclusive para microextração em fase sólida. Seu uso permite a eliminação de compostos hidrossolúveis (açúcares e ácidos orgânicos) com H₂O e a separação de ácidos fenólicos, flavonóides e proantocianidinas oligoméricas (eluídos com AcOEt) de antocianinas e proantocianidinas poliméricas (eluídas com MeOH) numa mesma etapa (NACZK & SHAHIDI, 2004). Além disso, soluções hidroalcoólicas acidificadas também podem ser utilizadas (WANG & SPORNS, 1999), assim como na cromatografia em coluna (EINBOND *et al.*, 2004).

1.3.2 Extração e isolamento dos polifenóis do açaí

A maioria dos trabalhos iniciais desenvolvidos com extratos aquosos ou hidroalcoólicos da polpa ou do fruto íntegro de *E. oleracea* visavam a extração, a identificação e o isolamento apenas das antocianinas (IADEROZA *et al.*, 1992; BOBBIO *et*

⁶ Coluna também conhecida pela sigla RP18, do inglês: *Reversed phase*.

al., 2000; CONSTANT, 2003). Isto porque a notável abundância destes pigmentos nos frutos chamou a atenção dos pesquisadores, primariamente, para o seu possível aproveitamento como corantes naturais de alimentos (BOBBIO *et al.*, 2000; CONSTANT, 2003). Entretanto, embora já exista experiência do uso de antocianinas para esta finalidade (TIMBERLAKE & HENRY, 1988; SAONA *et al.*, 1999), a instabilidade destes pigmentos em valores usuais de pH (FIGUEIREDO *et al.*, 1996; LAPIDOT *et al.*, 1999; FLESCHHUT *et al.*, 2006) tornou-se um obstáculo para sua utilização na indústria. Contudo, o uso de copigmentos tem criado perspectivas promissoras de se conseguir aumentar a estabilidade destes polifenóis em condições diversas de pH, luz e temperatura (BAKOWSKA *et al.*, 2003).

As antocianinas constituem uma classe distinta de glicosídeos de flavonóides, cujas agliconas (ou antocianidinas) correspondem a derivados poli-hidroxilados e/ou metoxilados do cátion 2-fenilbenzopirílium (ou flavilium) (Fig. 7). Considerando a vulnerabilidade destas estruturas diante de variações de pH, tornou-se necessário o desenvolvimento de metodologias específicas para a análise destes pigmentos. Segundo Bloor (2001), para propósitos analíticos, os flavonóides podem ser classificados basicamente em três tipos: glicosídeos de flavonóides, flavonóides não polares (agliconas e flavonóides alquilados ou metilados) e antocianinas. As proantocianidinas constituiriam uma quarta classe não considerada pelo autor. Portanto, é provável que o direcionamento inicial das metodologias de extração, isolamento e detecção para as antocianinas tenha contribuído efetivamente para o retardo na detecção de outros flavonóides dos frutos de *E. oleracea*.

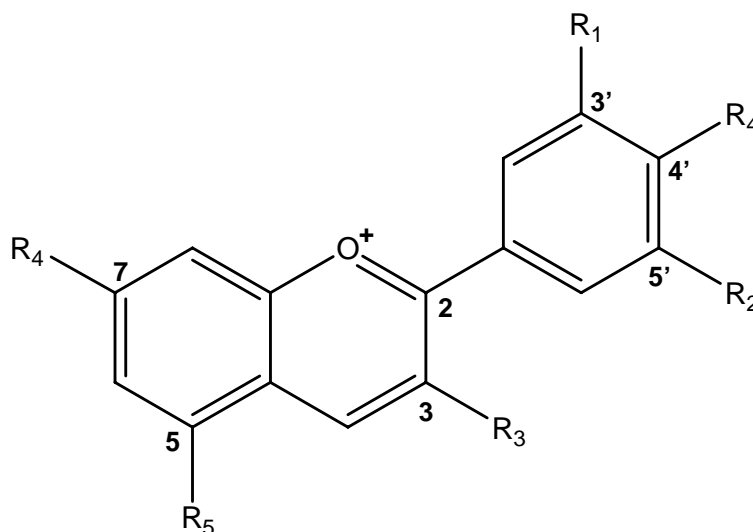


Figura 7: Estrutura do cátion flavilium substituído com os grupos R_1 - R_5 presentes em antocianidinas e/ou antocianinas (ver Quadro 2).

Quadro 2: Antocianidinas mais comuns e alguns glicosídeos de cianidina descritos na literatura.

Antocianidinas^a	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5
Pelargonidina	H	H	OH	OH	OH
Cianidina	OH	H	OH	OH	OH
Peonidina	OCH ₃	H	OH	OH	OH
Delfinidina	OH	OH	OH	OH	OH
Petunidina	OCH ₃	OH	OH	OH	OH
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃	OH	OH	OH
Antocianinas^a					
Cianidina 3-glicosídeo	OH	H	O- β -D-glicose	OH	OH
Cianidina 3-galactosídeo	OH	H	O- β -D-galactose	OH	OH
Cianidina 3-rutinosídeo	OH	H	O- β -D-(6- α -L-ramnosil)-glicose	OH	OH
Cianidina 3,5-diglicosídeo	OH	H	O- β -D-glicose	OH	O- β -D-glicose
Cianidina 3-sambubiosídeo	OH	H	O- β -D-(2- β -D-xilosil)-glicose	OH	OH

^a as posições dos grupos R_1 - R_5 estão indicadas na Figura 7.

Na metodologia adotada por Bobbio *et al.* (2000), 500 g de polpa liofilizada dos frutos da juçara foram submetidos a extração exaustiva com solução HCl 0,1 % em etanol. O extrato bruto, assim obtido, foi filtrado, concentrado e armazenado a -18°C para posterior análise por cromatografia em papel e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Constant (2003),

buscando a melhor técnica de extração das antocianinas dos frutos de *E. oleracea* para posterior aplicação em alimentos, avaliou o tempo de extração, o tipo de solvente e de ácido empregado e o pH das soluções extratoras, além dos efeitos da temperatura e das condições da matéria-prima. Segundo a autora, a extração das antocianinas deve ser feita a partir do fruto inteiro, já que o despulpamento promove a incorporação de mais lipídeos ao extrato e expõe os pigmentos à ação de enzimas presentes no fruto, que aceleram a sua degradação. Os melhores sistemas solventes foram H₂O / SO₂ (4000 ppm), EtOH 70 % / SO₂ (1000 ppm), EtOH 70 % / HCl (pH = 2) e H₂O / SO₂ (1000 ppm). Entre as preparações aquosas sem EtOH e sem SO₂, a melhor solução extratora foi H₂O / ácido cítrico (pH = 2). Constant (2003) concluiu ainda que uma única extração, à temperatura ambiente (31°C), já seria suficiente para se conseguir cerca de 95 % dos pigmentos extraíveis do fruto fresco e que o uso de temperaturas mais altas (até 60°C) permitiria uma maior extração dos pigmentos, sem perdas consideráveis por degradação.

No ano seguinte, Insfran *et al.* (2004) partiram da polpa pasteurizada e congelada, que, após ser descongelada, foi centrifugada, filtrada e particionada entre éter de petróleo e acetona. O extrato hidrofílico (em acetona) foi concentrado sob pressão reduzida (até 40°C) e redissolvido em água acidificada (HCl 0,01 %) para aplicação seguinte em coluna Sep-Pak Vac C₁₈. A coluna foi tratada com água acidificada (HCl 0,01 %) para a remoção de açúcares residuais e ácidos orgânicos, AcOEt para remover compostos polifenólicos não antocianínicos, e MeOH acidificado com HCl 0,01 % para remover a fração rica em antocianinas. As frações orgânicas foram concentradas e redissolvidas em tampão ácido cítrico (pH = 3,5) para posterior análise por CLAE. Gallori *et al.* (2004) partiram de 2,6 g de polpa liofilizada e triturada. Três extrações consecutivas, sob agitação, foram realizadas com 450 mL de solução EtOH / H₂O (7:3) com ácido fórmico (pH = 2). O extrato hidroalcoólico obtido foi filtrado, dividido em duas porções e concentrado sob vácuo a 25°C. Uma porção foi levada à secura,

retomada com água acidificada (HCOOH 5 %) e submetida à EFS (cartucho Extrelut). Nesta, eluiu-se n-hexano, AcOEt e MeOH acidificado com ácido fórmico (pH = 2), recuperando-se, respectivamente, compostos lipossolúveis, fenólicos não antociânicos e antocianinas, as quais foram eluídas juntas com açúcares e ácidos orgânicos. As frações obtidas em AcOEt e MeOH acidificado foram concentradas e analisadas por CLAE acoplada a um detector com arranjo de diodos (DAD) para ultravioleta / visível (UV/Vis) e por CLAE acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM⁷). A segunda porção do extrato hidroalcoólico foi particionada com n-hexano, concentrada até a secura e retomada com água acidificada (HCOOH 5 %) para análise posterior com as mesmas técnicas cromatográficas.

Na metodologia adotada por Lichtenthäler *et al.* (2005), 5 g de amostras não comerciais de polpa liofilizada foram suspensas com água desionizada até o volume final de 50 mL. As suspensões foram sonicadas por 10 min., centrifugadas a 2800 g também por 10 min. e os sobrenadantes obtidos foram analisados diretamente por CLAE-DAD⁸ e CLAE-EM. Schauss *et al.* (2006a) utilizaram a metodologia empregada por Wu *et al.* (2004), na qual 1 g de cada *berry* previamente congelado, liofilizado e triturado foi extraído com MeOH / H₂O / AcOH (85:15:0,5 v/v) em frasco vedado com tampa de rosca. O frasco foi agitado em vortex por 30 s e sonicado por 5 min. Depois, o frasco foi deixado à temperatura ambiente por 10 min., agitado por mais 30 s e centrifugado a 4550 g por 10 min. O sobrenadante foi removido para um balão volumétrico de 25 mL e o resíduo reextraído com 10 mL da mesma solução extratora. O novo sobrenadante foi adicionado ao anterior e o volume do balão (25 mL) completado com a sol. extratora. A solução obtida foi diluída e filtrada para as análises subsequentes.

Matheus *et al.* (2006) partiram de extratos etanólicos de frutos, flores e espigas, obtidos com 10 L de EtOH 70° para cada 300 g de material vegetal. O período de extração foi

⁷ Técnica mais conhecida pela sigla LC-MS, do inglês: *liquid chromatography-mass spectrometry*.

⁸ Técnica mais conhecida pela sigla HPLC-DAD, do inglês: *high performance liquid chromatography- diode array detector*.

de 72 h para cada 2,5 L de solução extratora e os extratos obtidos foram concentrados até a secura e retomados com água. Em seguida, cada solução aquosa foi particionada sequencialmente com AcOEt e n-butanol (ButOH) antes das etapas analíticas. Contudo, as frações obtidas em AcOEt e ButOH a partir do extrato etanólico bruto dos frutos não se mostraram seletivas para os pigmentos antociânicos, cujas concentrações em ambas as frações ficaram muito semelhantes. Na etapa preparativa da metodologia adotada por Rocha *et al.* (2007), os frutos foram descascados (ou despulpados) manualmente e tiveram suas cascas (e polpas) separadas das sementes. Cerca de 100 g de cascas ou 200 g de sementes foram fervidas em 400 mL de água por 5 min., trituradas por 2 min. e novamente fervidas por mais 5 min. Os decoctos obtidos foram resfriados à temperatura ambiente, extraídos com 400 mL de EtOH, agitados por 2 h e mantidos em garrafas escuras sob refrigeração por 10 dias. Após o período de maceração, os extratos hidroalcoólicos foram filtrados, concentrados a 55°C sob pressão reduzida e liofilizados.

Pacheco *et al.* (2007) partiram da polpa pasteurizada e congelada, a qual foi centrifugada a 2000 g por 15 min. a 4°C e passada por um leito de terra diatomácea, obtendo-se um suco clarificado. O suco clarificado foi acidificado com ácido cítrico (pH = 3,5) e submetido a dois procedimentos separativos, utilizando-se mini-colunas Sep-Pak Vac C₁₈ para remover açúcares, ácidos orgânicos e íons metálicos. No primeiro isolamento, todos os compostos fenólicos (fração ligada) foram recuperados com MeOH acidificado (por HCl 0,01 %) e o solvente foi removido sob pressão reduzida (até 40°C). Em seguida, o resíduo foi redissolvido em tampão ácido cítrico 0,1 M (pH = 3,5) ou na fração não ligada (contendo açúcares, ácidos orgânicos e íons metálicos) com pH corrigido para 3,5. No segundo isolamento, os compostos fenólicos não antociânicos foram removidos com AcOEt e as antocianinas com MeOH acidificado (por HCl 0,01 %). Ambas as frações foram concentradas e redissolvidas em tampão ácido cítrico ou na fração não ligada (todas com pH = 3,5).

1.3.3 Técnicas de identificação e quantificação

A cromatografia gasosa (CG) acoplada a um detector de ionização em chama (DIC) e a CLAE acoplada a um detector de UV/Vis são as técnicas analíticas mais utilizadas quando o objetivo do trabalho é a identificação e a quantificação de compostos fenólicos. Muitas vezes, a elucidação estrutural de tais moléculas requer o uso combinado destas técnicas cromatográficas com a espectrometria de massas (CG-EM⁹ e CLAE-EM) ou o auxílio de outras técnicas espectrométricas, como a espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN) e a espectrometria de infra vermelho (IV). Análises mais sofisticadas, baseadas em espectrometria de massas, têm sido empregadas de acordo com a natureza química dos compostos fenólicos analisados.

Entre as técnicas acopladas à cromatografia líquida, a espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (EM-IES¹⁰) e com interface de ionização química à pressão atmosférica (EM-IQPA¹¹) constituem as técnicas mais empregadas para as análises de fenólicos policíclicos (KONG *et al.*, 2003; NACZK & SHAHIDI, 2004). Técnicas de desorção e ionização à *laser* assistida por matriz (EM-DILAM¹²) e sua variante conectada a um espectrômetro por tempo de voo (EM-TV-DILAM¹³) têm sido empregadas em análises de antocianinas e outros polifenóis pré isolados (WANG & SPORNS, 1999; KONG *et al.*, 2003; NACZK & SHAHIDI, 2004). A análise de fenólicos mais simples geralmente é realizada por CG-EM após derivatização dos analitos (GAO & MAZZA, 1994; FIAMEGOS *et al.*, 2004). Porém, o uso direto da espectrometria de massas por bombardeamento com átomos rápidos

⁹ Técnica mais conhecida pela sigla GC-MS, do inglês: *Gas chromatography-mass spectrometry*.

¹⁰ Técnica mais conhecida pela sigla ESI-MS, do inglês: *electrospray ionization-mass spectrometry*.

¹¹ Técnica mais conhecida pela sigla APCI-MS, do inglês: *atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry*.

¹² Técnica mais conhecida pela sigla MALDI-MS, do inglês: *matrix- assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry*.

¹³ Técnica mais conhecida pela sigla MALDI-TOF-MS, sendo TOF correspondente à expressão: *time of flight*.

(EM-BAR¹⁴) ou mesmo por eletroionização (EM-EI¹⁵) dispensa a etapa de derivatização, mas requer isolamento prévio por CLAE preparativa (NACZK & SHAHIDI, 2004).

Por outro lado, vários métodos espectrofotométricos simples, baseados em diferentes princípios, têm sido desenvolvidos para se obter uma quantificação rápida e estimada destes compostos, servindo inclusive como ferramentas para a determinação de certos grupos estruturais (NACZK & SHAHIDI, 2004). Entre tais métodos, podemos citar os ensaios de Folin-Ciocalteu (SINGLETON & ROSSI, 1965; BONOLI *et al.*, 2004; KLOPOTEK *et al.*, 2005) e Folin-Denis (BRESSANI *et al.*, 1991), empregados para a determinação do teor de fenólicos totais em alimentos e outras amostras vegetais, respectivamente; os testes da vanilina (GUPTA & HASLAM, 1980) e do 4-(dimetilamino)-cinamaldeído (MCMURROUGH & MCDOWELL, 1978), indicados para a quantificação de proantocianidinas; os ensaios com iodeto de potássio (SMITH, 1977) e rodamina (FUJIHARA *et al.*, 2007) para a determinação de taninos hidrolizáveis; os ensaios com Al (III) (ZAPOROZHETS *et al.*, 2004), indicado para a determinação de ácido caféico, flavonóides e taninos totais; e o ensaio para a determinação de antocianinas totais pelo método diferencial de pH (BONILLA *et al.*, 2003; KLOPOTEK *et al.*, 2005).

A maioria dos protocolos analíticos elaborados para a investigação de ácidos fenólicos e flavonóides é baseada nas técnicas de CLAE acopladas com um sistema de detecção espectrofotométrico, eletroquímico ou colorimétrico (FIAMEGOS *et al.*, 2004). A introdução das colunas de fase estacionária inversa e o desenvolvimento de novos sistemas de detecção têm aumentado consideravelmente o uso da CLAE para diferentes classes de compostos fenólicos e permitido a execução de análises mais completas e conclusivas (NACZK & SHAHIDI, 2004). Acompanhando esta evolução, vários trabalhos realizados com CLAE

¹⁴ Técnica mais conhecida pela sigla FAB-MS, do inglês: *fast atom bombardment-mass spectrometry*.

¹⁵ Técnica mais conhecida pela sigla EI-MS, do inglês: *electron impact ionization-mass spectrometry*.

tornaram-se referências relevantes na escolha das alternativas metodológicas para a análise de compostos fenólicos.

No relato de Sumere *et al.* (1993), um protocolo de eluição para CLAE com fase inversa permitiu a detecção de quase 50 flavonóides num mesmo cromatograma de 50 min. O sistema binário de solventes era composto de HCOOH 5 % em H₂O (fase A) e acetonitrila (CH₃CN) 5 % em MeOH (fase B). Entretanto, embora bastante eficiente para a maioria dos glicosídeos de flavonóides e ácidos fenólicos, a metodologia não cobria proantocianidinas e glicosídeos de chalconas (TSAO & YANG, 2003).

Gao & Mazza (1994) utilizaram um sistema CLAE-DAD com fase inversa para analisar ácidos fenólicos e antocianinas. O sistema de solventes utilizado era composto por HCOOH 1 % (v/v) em H₂O (fase A) e MeOH (fase B). Com o mesmo sistema de detecção, Mattila & Kumpulainen (2002) desenvolveram uma metodologia para a determinação de ácidos fenólicos totais e livres em alimentos de origem vegetal, utilizando H₃PO₄ 50 mM (pH = 2,5) como fase móvel A e CH₃CN como fase móvel B. Sakakibara *et al.* (2003) desenvolveram uma metodologia para a determinação simultânea de todos os compostos fenólicos de fontes vegetais. Os cromatogramas eram obtidos em 95 min. e o método teria a vantagem de permitir a análise de todos os glicosídeos e agliconas, sem a necessidade de hidrólise prévia das formas glicosiladas, embora não se tenha mencionado o comportamento de proantocianidinas, cumarinas, lignanas e secoiridóides neste sistema. O par de eluentes consistia de fosfato de sódio 50 mM (pH = 3,3) / MeOH 10 % (sol. A) e MeOH 70 % (sol. B). Em paralelo, Tsao & Yang (2003), também utilizando CLAE-DAD com fase inversa, desenvolveram uma metodologia que permitiu a determinação simultânea dos polifenóis pertencentes aos cinco principais grupos de compostos fenólicos (ácidos fenólicos, procianidinas, antocianinas, flavonóis e diidrochalconas) em vários frutos e produtos relacionados. Os cromatogramas foram adquiridos em apenas 70 min e o sistema de fases

móveis consistia de AcOH 6 % (v/v) em AcONa 2 mM (pH = 2,55; fase A) e CH₃CN (fase B). Outras metodologias desenvolvidas para CLAE na análise destas e de todas as outras classes de compostos fenólicos podem ser acessadas em detalhe numa boa revisão publicada por Naczk & Shahidi (2004).

2. OBJETIVOS

O presente estudo tem como objetivos o desenvolvimento de técnicas analíticas e preparativas que possibilitem o isolamento e a caracterização de ácidos fenólicos, flavonóides e outros compostos fenólicos presentes no extrato aquoso da polpa dos frutos de *Euterpe oleracea* Mart. (açai), bem como investigar a presença de possíveis marcadores quimiotaxonômicos já descritos em outras espécies da família.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Solventes

Acetato de etila, etanol, clorofórmio, diclorometano, hexano e metanol destilados no próprio laboratório ou de grau analítico para análise (P.A.) foram utilizados nas etapas de extração e pré-isolamento. Acetato de etila, clorofórmio, etanol, metanol e metil-etil-cetona P.A. e água grau CLAE foram utilizados no desenvolvimento das placas de cromatografia em camada delgada (CCD). Acetonitrila e metanol de grau espectroscópico e água purificada grau CLAE foram utilizados nas análises por CLAE. Metanol, clorofórmio e diclorometano de grau espectroscópico foram utilizados nas análises por CG e CG-EM. Acetonitrila e éter etílico P.A. e água purificada grau CLAE foram também empregados nas etapas de extração e pré-isolamento. Etanol, éter etílico e metanol P.A. foram utilizados no preparo de reagentes e meios reacionais para derivatizações. Água destilada foi utilizada em etapas de lavagem de extratos e nos ensaios para fenólicos totais por Folin-Ciocalteu.

3.1.2 Reagentes

Acetato de sódio, ácido acético glacial, ácido clorídrico, ácido fórmico, ácido fosfórico, ácido *o*-fosfórico, ácido sulfúrico, ácido trifluoroacético, bicarbonato de sódio, carbonato de sódio, cloreto de acetila, fosfato de sódio dibásico heptaidratado, fosfato de sódio monobásico monoidratado, hidróxido de sódio e iodeto de metila P.A. foram utilizados no preparo de soluções extratoras, eluentes para extração em fase sólida, fases móveis para

cromatografia, soluções tampões ou meios reacionais. Brometo de tetrabutilamônio (BTBA) e brometo de tetracetilamônio (BTCA) P.A. foram empregados como catalisadores de transferência de fase em reações de derivatização. Ácido sulfúrico, 2-amino-difenil-borato de etila (ADBE¹⁶), orcinol, e polietilenoglicol (PEG) P.A. foram utilizados no preparo de soluções reveladoras de placas cromatográficas. Sulfato de sódio anidro P.A. foi utilizado como agente dessecante e cloreto de sódio P.A. foi utilizado para aumentar a força iônica de fases aquosas.

Diazometano foi preparado a partir de *p*-tolilsulfonilmetilnitrosamida, segundo a metodologia descrita por Vogel (1971) para pequenas quantidades do reagente. A solução etérea do reagente, obtida por destilação, foi armazenada em *freezer* até o momento do uso.

Orcinol sulfúrico foi preparado por diluição de 2 g de orcinol em 100 mL de solução H₂SO₄ 20 % em EtOH. ADBE, outro reagente de revelação, foi preparado por diluição de 1 g de 2-amino-difenil-borato de etila em 100 mL de MeOH.

Metanol anidro, utilizado nas reações de esterificação, foi preparado por destilação com magnésio, em sistema fechado, após tratamento com Na₂SO₄ anidro (VOGEL, 1971).

Padrões de ácido caféico, cinâmico, clorogênico, protocatecuico, vanílico e verátrico, e isoorientina foram adquiridos da Sigma Chemical Company. Padrões de ácido elágico, *p*-cumárico, catequina e epicatequina foram adquiridos da Fluka Biochemica / Chemika. Padrões de ácido ferúlico e sinápico foram adquiridos da Acrós Organics. Padrão de ácido siríngico foi adquirido da Aldrich Chemical Company. Padrão de rutina e ácido benzóico sublimado foram adquiridos da Merck. Padrão de ácido gálico foi adquirido da Riedel-de Haën. Padrão de *p*-hidroxi-benzoato de metila foi obtido da U.S.P. / Fisher Scientific Company. Padrões de cianidina 3-glicosídeo, cianidina 3-galactosídeo, cianidina 3-

¹⁶ Reagente mais conhecido pela sigla NP, do inglês: *Natural products reagent*.

rutinosídeo e cianidina 3,5-diglicosídeo foram adquiridos da Indofine Chemical Company, Inc. O reagente de Folin-Ciocalteu foi adquirido da Sigma Chemical Company.

Ácido *p*-hidroxi-benzóico foi obtido por hidrólise básica do metil-éster correspondente, utilizando NaOH 2 M. Cerca de 3 mg de *p*-hidroxi-benzoato de metila foram submetidos à hidrólise básica por 12 h à temperatura ambiente. HCl P.A. foi utilizado para acidificar o produto de reação e AcOEt foi utilizado para extrair o ácido orgânico gerado. NaCl foi utilizado para aumentar a força iônica da fase aquosa e aumentar a eficiência da extração do ácido orgânico por AcOEt. A fase orgânica foi concentrada e o produto foi redissolvido em MeOH para as análises cromatográficas.

3.1.3 Fases estacionárias para cromatografia em camada delgada

Placas de gel de sílica (em alumínio) AL 60 F₂₅₄ 20 x 20 cm Merck, placas de poliamida (em alumínio) DC-Alufolien 11 F₂₅₄ 20 x 20 cm Merck, e placas de celulose (em plástico) Baker-flex Cellulose F 20 x 20 cm J.T. Baker foram utilizadas análises por CCD.

3.1.4 Resinas para extração em fase sólida

Adsorvente polimérico não iônico Amberlite XAD-16 (diâmetro do poro: 100 Å; área superficial: 800 m² / g; tamanho da malha úmida: 20-60) Sigma foi utilizado para a remoção de açúcares e outros compostos polares das frações aquosas ricas em antocianinas.

Gel de sílica funcionalizada com octadecilsilano (C₁₈) Aldrich em coluna aberta e em coluna sob média pressão foi utilizado para purificação dos polifenóis a partir de extratos alcoólicos e hidroalcoólicos totais.

Celulose microcristalina $[C_6H_{10}O_5]_n$ Avicel Merck (Art. 2330); resina trocadora de íons fortemente básica (RTIFB) III Merck (5 mL; 0,9 mmol/mL; cat. 104767); resina trocadora de íons aniônica forte (SAX) cartucho SPE (1 g / 6 mL; diâm. x comp.: 1,2 x 1,4 cm) Chromatography Research Supplies, Inc.; e adsorvente MP Poliamida Ecochrom™ 09602-MP Biomedicals Germany GmbH foram utilizadas no semi-isolamento de compostos fenólicos em etapas preparativas pré-analíticas para CLAE.

3.2 Equipamentos

3.2.1 Cromatógrafos

Para CLAE analítica, foi utilizado um cromatógrafo Shimadzu com sistema de injeção manual (*loop* de 20 μ L), bomba Shimadzu modelo LC-10AD, detector com rede de diodos Shimadzu modelo SPD-M10A VP, e sistema de controle Shimadzu modelo SCL-10A VP.

Para CG, foi utilizado um cromatógrafo a gás Varian Star 3400 CX.

Para CG-EM, foi utilizado um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas Shimadzu modelo GCMS-QP5000.

Nas análises por inserção direta em espectrômetro de massas com IDE, foi utilizado um espectrômetro Agilent 1100 *Ion Trap*.

3.2.2 Espectrômetros

Para as determinações de absorvância dos ensaios para fenólicos totais e antocianinas totais foi utilizado um espectrofotômetro Shimadzu modelo U.V.-1601 equipado com cubetas de quartzo (caminho óptico: 1 cm) QS Hellma.

3.2.3 Componentes cromatográficos

Coluna *Symmetry ShieldTM* RP18 com 5 µm de poro, 4,6 x 250 mm, Waters foi utilizada nas análises por CLAE.

Coluna Phenomenex *ZebtronTM* ZB-5 ms (30 m, 0,25 mm DI, com filme de 0,25 µm de espessura; fenilmetilsilicone 5%) foi utilizada nas análises por CG-EM.

Coluna DB-5MS (122-5532) J & W Scientific / Agilent (30 m, 0,25 mm DI, com filme de 0,25 µm de espessura; temp. de -60°C até 350°C) foi utilizada nas análises por CG.

Hidrogênio, ar sintético e nitrogênio “ultra puros” foram utilizados na alimentação do cromatógrafo a gás.

Gás hélio comprimido *Air Products* foi utilizado para a desgaseificação das fases móveis utilizadas para CLAE e gás nitrogênio comprimido Aga foi utilizado na concentração de extratos orgânicos de pequeno volume.

Amostras submetidas à CLAE foram filtradas com filtro Millipore 2A (poros de 0,25 µm) quando necessário.

3.2.4 Outros equipamentos

Aparelho gerador de ultra-som de baixa frequência Thornton (T-14); balança analítica Mettler Toledo, AB 204-S; bomba peristáltica de média pressão Bio-Rad modelo *EP-1 Econo pump*; centrífuga Excelsa Baby II, modelo 206-R, Fanem (diâmetro relativo aos eixos paralelos principais dos tubos pares em rotação: 12,5 cm); coletor de fracionamento Bio-Rad modelo nº 2110; compressor Inalamax (frequência: 50/80 Hz); evaporador rotatório Pemem adaptado com bomba de vácuo Cole Parmer Instrument Company, modelo 7049-50, e banho

Fisatom, modelo 550 (1200 W 230 V); destilador de água Fstream™ II, mod. A74410, Barnstead; lâmpada ultravioleta UVSL-58 Mineralight multibanda (254/366 nm; 60 Hz; 0,16 Amps) *Ultra-violet Products, Inc.*; liofilizador Labconco com bomba de alto vácuo de dois estágios, modelo E2M8, Edwards; pistola de ar quente Comala 1400 W (temperaturas: 300/500°C, vol. de ar: 400 L / min.) Steinel; placa de aquecimento Thermolyne 2555 Kerper Boulevard, mod. SP18425, 50/80 Hz, Barnstead; purificador de água Nanopure Barnstead; vortex Ika tipo *lab dancer*, IP42.

3.3 Metodologia

3.3.1 Obtenção e tratamento das amostras

Todos os extratos congelados de polpa utilizados neste trabalho foram do tipo “açai médio”, adquiridos de um supermercado local da cidade do Rio de Janeiro (polpa de açai médio, tipo B, pasteurizada Brasfrut) ou diretamente de uma exportadora (Top Açai Ltda) do município de Santa Bárbara do estado do Pará e denominados aqui como açai comercial e açai Top, respectivamente. Os extratos congelados foram transportados sob refrigeração e armazenados em *freezer* até serem liofilizados. Cerca de 200 g de açai comercial ou 250 g de açai Top foram pesados antes e após liofilização por 10 dias, para o cálculo do teor de massa seca, e novamente armazenados em *freezer*, em recipiente fechado, até o dia das análises.

3.3.2 Condições cromatográficas

Nas análises de identificação das antocianinas por CLAE-DAD, utilizou-se solução ácido fórmico 4,5 % (v/v) (fase móvel A) e sol. acetonitrila 80 % aq. acidificada com ácido

fórmico 4,5 % (fase móvel B). O programa foi iniciado com 100 % de fase móvel A. De 0 a 7 min., a composição da fase B foi alterada de 0 a 15 %; de 7 a 15 min., variou de 15 a 20 %; de 15 a 16 min., variou de 20 a 100 %; e, de 16 a 26 min., foi mantida a 100 %. Para as análises de frações obtidas por extração em fase sólida e monitoramento das reações de hidrólise, utilizou-se também as condições descritas por Sumere *et al.* (1993), com vazão de 1 mL/min. O programa foi iniciado com 85 % de sol. ácido fórmico 5 % (v/v) em H₂O (fase móvel A) e 15 % de sol. CH₃CN / MeOH (5:95; v/v) (fase móvel B); foi mantido com 15 % de B até 3 min. e alterado de 15 para 24 % de B até 8 min.; de 8 a 11 min., foi mantido a 24 % de B; de 11 a 18 min., alterado de 24 para 34 % de B; de 18 a 28 min., de 34 para 44 % de B; de 28 a 39 min., de 44 para 95 % de B; de 39 a 42 min., mantido a 95 % de B; de 42 a 47 min., alterado de 95 para 15 % de B; e de 47 a 50 min., mantido a 15 % de B. As condições descritas por Wen *et al.* (2005) e Insfran *et al.* (2004) foram testadas com padrões de ácidos fenólicos e flavonóides, sempre com vazão de 1 mL/min. A condição descrita por Wen *et al.* (2005) e uma condição modificada a partir desta foram utilizadas nas análises realizadas com as frações contendo ácidos fenólicos e flavonóides. A condição modificada foi iniciada com 75 % de sol. ácido trifluoracético (ATFA) 0,02 % em H₂O (fase móvel A) e 25 % de sol. ATFA 0,02 % em MeOH (fase móvel B) até 5 min. De 5 a 10 min., o percentual da fase B foi variado de 25 a 30 %; de 10 a 16 min., foi variado de 30 a 45 %; de 16 a 18 min., manteve-se a 45 %; de 18 a 40 min., foi variado de 45 a 80 %; e, de 40 a 50 min., foi reduzido de 80 para 25%, mantendo-se nesta condição por mais um minuto.

Nas análises por CG, utilizou-se gás Hidrogênio como fase móvel (1 mL/min). Nas análises por CG-EM utilizou-se gás Hélio (1 mL/min). A temperatura do injetor foi mantida a 270°C, com interface a 230°C, e a temperatura da coluna foi variada de 60 a 290°C a 10°C / min ou a 20°C / min.

3.3.3 Análise de fenólicos totais

Nestes ensaios, utilizou-se uma adaptação do método de Folin-Ciocalteu (SINGLETON & ROSSI, 1965), nos quais amostras de 500 mg de açaí liofilizado foram diluídas em 1000 mL de H₂O destilada. Alíquotas de 25 mL das soluções obtidas foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 min. e 3 mL de cada sobrenadante foram utilizados nos ensaios com 5 mL de sol. 1:10 (v/v) do reagente de Folin-Ciocalteu. Cinco minutos após a adição do reagente, foram adicionados 4 mL de sol. Na₂CO₃ 7,5 % (p/v) em H₂O e os tubos foram homogeneizados em vortex. Após duas horas, fez-se a leitura das soluções em espectrofotômetro a 740 nm. Alíquotas de 3 mL de soluções padrões de ácido gálico a 100, 50, 25 e 10 ppm foram submetidas ao mesmo ensaio para a construção de uma curva padrão e os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico / g de açaí liofilizado.

3.3.4 Análise de antocianinas totais

Nestes ensaios, utilizou-se uma adaptação do método descrito por Bonilla *et al.* (2003); amostras de 200 mg de açaí recém liofilizado foram submetidas à extração com 20 mL de sol. ATFA 0,5 % em H₂O e centrifugadas a 3000 rpm por 10 min. Duas alíquotas de 1 mL foram transferidas para tubos de ensaio e 9 mL das soluções tampão HCl / KCl 0,1 M (pH = 1) ou AcONa / AcOH 0,1 M (pH = 4,5) foram adicionados para diluir as alíquotas. Os tubos foram homogeneizados em vortex e, após 15 min. de repouso, todas as soluções foram analisadas em espectrofotômetro a 510 nm e a 700 nm. O cálculo do teor de antocianinas totais nas amostras foi feito como descrito por Klopotek *et al.* (2005), utilizando como base de cálculo a massa molar (M.M.) e o coeficiente de extinção molar (ϵ) de cianidina

3-rutinosídeo a 510 nm (7000 L / mol.cm, segundo Figueiredo *et al.*, 1996). As equações descritas por Klopotek *et al.* (2005) são:

$$E1. A \text{ (absorbância)} = (A_{510} - A_{700})_{\text{pH} = 1,0} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH} = 4,5}$$

$$E2. C \text{ (mg/L)} = A \times \text{M.M. (g / mol)} \times \text{fator dil.} \times 1000 / \epsilon_{510} \text{ (L / mol} \times \text{cm)} \times l \text{ (cm)}$$

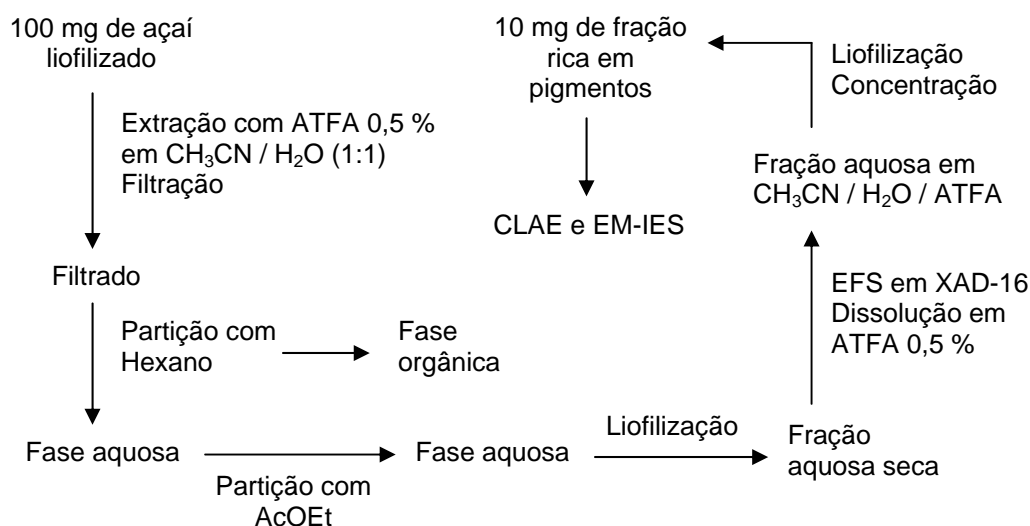
3.3.5 Ensaio preliminar das técnicas de extração e isolamento para a análise de antocianinas

Inicialmente foram utilizados 100 mg de açaí comercial liofilizado em cada partida. A obtenção do extrato bruto foi feita por adição de 20 mL de solução ATFA 0,5 % em CH₃CN / H₂O (1:1) sobre a amostra e sonicação por 10 min. O extrato obtido foi filtrado em funil de Buchner com papel filtro e o material retido no filtro foi lavado com mais 20 mL da solução extratora. Os 40 mL de extrato aquoso bruto foram particionados duas vezes com 40 mL de hexano e, em seguida, com 40 mL de AcOEt. A CH₃CN migrou para a fase AcOEt e o volume da fase aquosa se reduziu a 20 mL. A fração aquosa foi liofilizada e retomada em 30 mL de solução ATFA 0,5 % em H₂O para aplicação seguinte em resina XAD-16 (coluna com 2 cm de diâmetro x 12,5 cm de comprimento; aprox. 40 mL). Um resumo de todo o procedimento é apresentado no esquema 1.

Os 30 mL de extrato foram aplicados na resina e deixados adsorver por 20 min. Após a eluição de 70-80 mL de H₂O, alíquotas de 30 mL foram recolhidas para a realização do teste para açúcares livres com orcinol sulfúrico em placa de gel de sílica para CCD. Solução de glicose 1 % (p/v) foi utilizada como controle positivo para a reação. Uma gota de cada fração foi aplicada em placa de gel de sílica pré-tratada com orcinol sulfúrico. Os solventes foram evaporados por corrente de ar quente e as manchas amarelo-amarronzadas foram identificadas como *spots* positivos. Assim, a coluna de XAD-16 continuou sendo lavada com H₂O até que a

reação com orcinol desse negativa. Em seguida, 125 mL de solução ATFA 0,5 % em CH_3CN / H_2O (1:1) foram aplicados para remover todos os pigmentos do XAD-16 e volumes semelhantes de MeOH e água foram utilizados para limpar a coluna.

Todas as frações removidas com solução ATFA 0,5 % em CH_3CN / H_2O (1:1) foram concentradas em rota-evaporador (até 40°C) para remover a CH_3CN e reunidas. O extrato aquoso reunido foi congelado, liofilizado e pesado. Uma pequena alíquota dos pigmentos semi-purificados obtidos foi diluída em MeOH / H_2O e analisada por CLAE e EM-IES.



Esquema 1: Marcha 2305¹⁷.

3.3.6 Análise dos compostos fenólicos por CCD

A partir de 100 mg de açaí comercial liofilizado, obteve-se um extrato bruto com 20 mL de solução ATFA 0,5 % em H_2O . A amostra com a solução extratora foi sonicada por 10 min. e o extrato aquoso obtido foi centrifugado a 3500 rpm por 30 min. O sobrenadante foi separado e o *pellet* foi ressuspensão em 10 mL de solução extratora. O extrato foi novamente

¹⁷ Os quatro dígitos que designam as marchas referem-se à sua data (dia e mês) de partida e são utilizados aqui como código de identificação.

centrifugado a 3500 rpm por 30 min. e o sobrenadante foi reunido com o obtido anteriormente. Os 30 mL de extrato aquoso (*pool* sobrenadante) foram particionados duas vezes com 30 mL de hexano e, em seguida, duas vezes com o mesmo volume de AcOEt. A fração aquosa resultante foi concentrada em rota-evaporador (até 40°C), congelada, liofilizada e retomada em MeOH para análise seguinte por CCD em placa de gel de sílica. A fração em AcOEt foi também concentrada em rota-evaporador (até 40°C) e retomada em MeOH. Solução AcOEt / AcOH glacial / HCOOH / H₂O (100:11:11:26) (WAGNER & BLADT, 1996) foi utilizada como fase móvel e as frações obtidas foram cromatografadas em placas separadas, em duplicata. A placa desenvolvida com o extrato rico em pigmentos foi analisada sem tratamento e após tratamento com orcinol sulfúrico. A placa com a fração advinda da fase AcOEt foi revelada com solução ADBE e visualizada com luz ultravioleta (a 254 nm e 366 nm).

3.3.7 Ensaio experimental de marcha analítica direta para antocianinas

Duas amostras de aproximadamente 500 mg de açaí comercial foram descongeladas à temperatura ambiente e submetidas à extração direta com 5 mL de solução ATFA 0,5 % em H₂O. Cada extrato foi sonificado por 12 min. e centrifugado por 30 min. a 3500 rpm. Os sobrenadantes foram separados e denominados Am1a e Am2a. Os *pellets* foram submetidos a uma nova extração com mais 5 mL de solução extratora. O novo extrato foi também sonificado por 12 min. e centrifugado por 30 min. a 3500 rpm. Os novos sobrenadantes foram denominados Am1b e Am2b. Em seguida, cada sobrenadante foi particionado com 5 mL de hexano e as fases aquosas correspondentes foram filtradas e analisadas por CLAE.

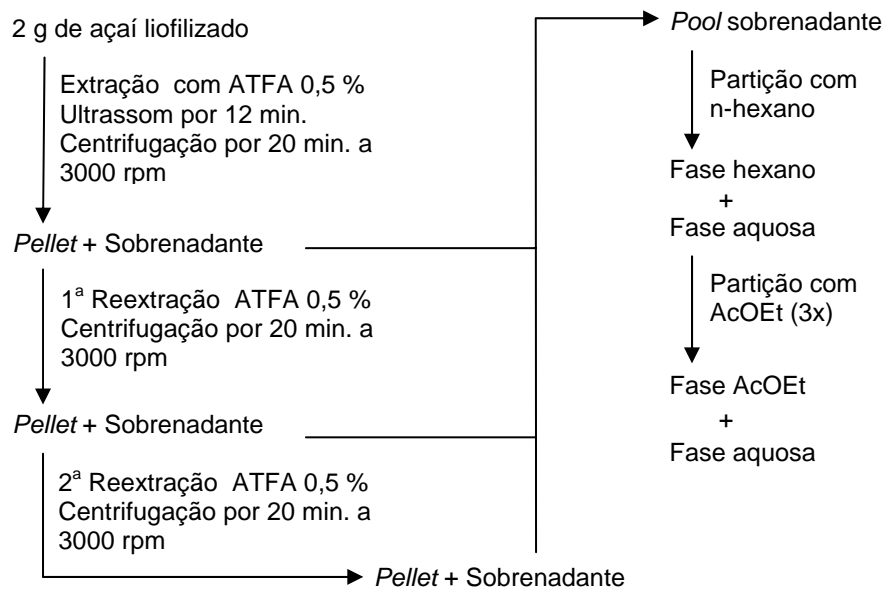
3.3.8 Testes de capacidade da resina XAD-16

Uma amostra de 1 g de açaí comercial liofilizado foi suspensa em 30 mL de hexano e sonicada por 3 min. Em seguida, o material foi filtrado em funil de Büchner e lavado com mais 100 mL de hexano. Após evaporação dos resíduos de hexano, o material foi submetido à extração com 30 mL de sol. ATFA 0,5 % em H₂O, sonicado por 12 min. e centrifugado a 3500 rpm por 20 min. O *pellet* foi reextraído com mais 20 mL de solução extratora e novamente centrifugado. Os sobrenadantes reunidos foram particionados duas vezes com volumes iguais de AcOEt e os resíduos deste solvente na fração aquosa foram removidos rapidamente em evaporador rotatório (até 40°C) e dividida em duas partes de 25 mL cada.

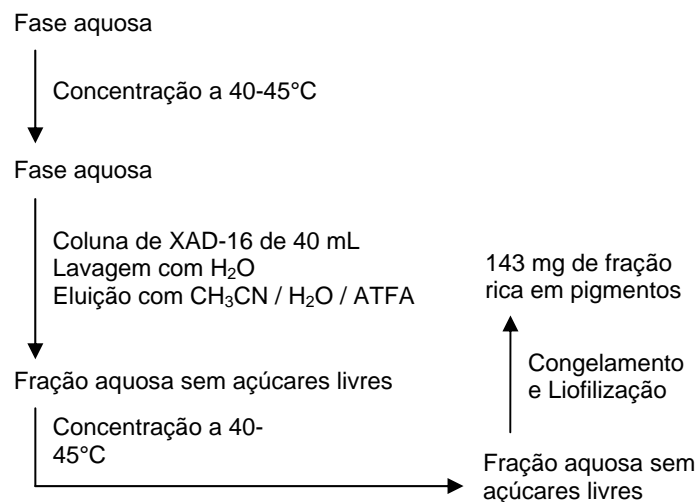
Neste teste, utilizou-se uma coluna de vidro com 40 mL de XAD-16, à qual foram aplicados os 25 mL da primeira metade da fração aquosa. Após a adsorção dos pigmentos, a coluna foi lavada com 120 mL de H₂O para remover os contaminantes polares e, depois, desenvolvida com 80 mL de solução ATFA 0,5 % em CH₃CN / H₂O (1:1). Como parte dos pigmentos foi perdida por ter passado direto pela resina, a segunda metade da fração aquosa foi concentrada em evaporador rotatório (a exatamente 40°C) até que o volume fosse reduzido a 15 mL. Adicionou-se 15 mL de H₂O a esta fração e aplicou-se os 30 mL totais no XAD-16, seguindo-se o mesmo procedimento adotado para a outra metade analisada anteriormente.

Em outra partida, 2 g de açaí comercial liofilizado foram submetidos à extração com 50 mL de sol. ATFA 0,5 % em H₂O. O extrato foi sonicado por 12 min. e centrifugado a 3000 rpm por 20 min. O *pellet* foi reextraído com mais 30 mL da solução extratora e centrifugado novamente. A reextração foi repetida e o sobrenadante total (~ 110 mL) foi particionado três vezes com volumes iguais de hexano. Em seguida, a fase aquosa foi particionada três vezes com volumes iguais de AcOEt e concentrada em evaporador rotatório (a 40-45°C). Após ter seu volume reduzido a 75 mL, a fração aquosa foi aplicada na mesma coluna de XAD-16 (de

40 mL). Então, a coluna foi lavada com volume suficiente de H₂O e os pigmentos foram eluídos com 110 mL de solução ATFA 0,5 % em CH₃CN / H₂O (1:1). Esta solução foi concentrada em evaporador rotatório (a 40-45°C), congelada e liofilizada. A fração liofilizada teve sua massa determinada em balança analítica. Um resumo de todo o procedimento é apresentado nos esquemas 2 e 3.



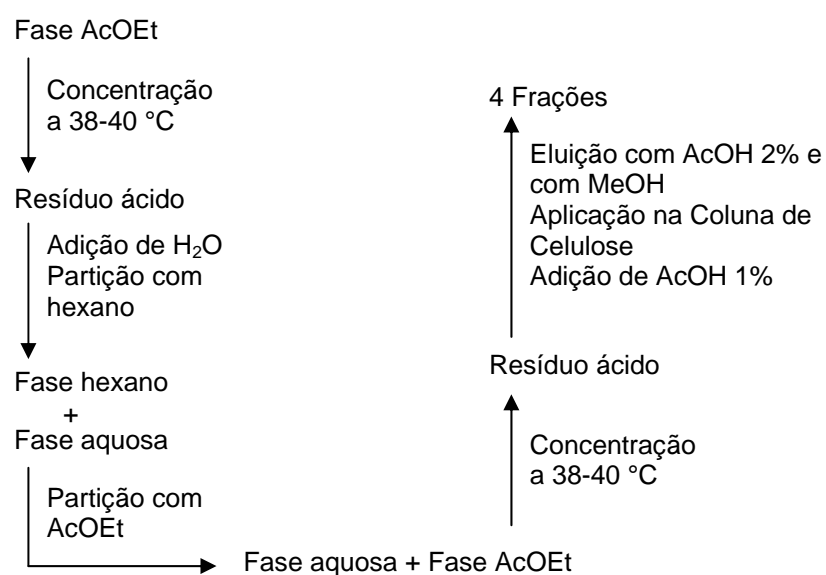
Esquema 2: Marcha 0712 (primeira etapa).



Esquema 3: Marcha 0712 (fração hidrossolúvel).

3.3.9 Ensaio preliminar para a preparação de amostras para EFS em coluna de celulose

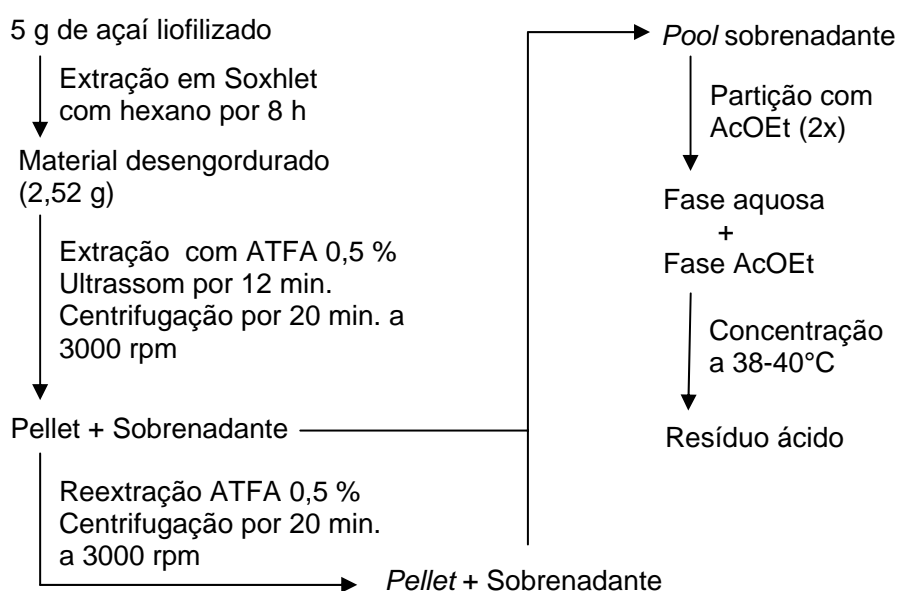
As duas primeiras fases AcOEt obtidas por partição do extrato aquoso da marcha anterior (partida de 2 g) foram lavadas duas vezes com 100 mL de H₂O, reunidas e concentradas em evaporador rotatório (até 40°C). Como a fração concentrada normalmente apresentava resíduos de clorofilas e antocianinas, adicionou-se 50 mL de H₂O e fez-se novas partições com volumes iguais de hexano e AcOEt (duas vezes cada). A fração obtida em AcOEt foi novamente concentrada em evaporador rotatório e redissolvida em 2 mL de AcOH 1 % com o auxílio do ultrassom (5 min.). Em seguida, a nova solução em AcOH 1 % foi aplicada na coluna de celulose e submetida à EFS, conforme descrito por Bloor (2001). Assim, após eluição do volume de injeção, a coluna foi desenvolvida com AcOH 2 % e depois com MeOH. Cada fração foi analisada posteriormente por CLAE-DAD e a fração eluída com AcOH 2 % foi submetida à derivatização com diazometano para análise subsequente por CG-EM. Um resumo deste procedimento é apresentado no esquema 4.



Esquema 4: Marcha 0712 (fração orgânica).

3.3.10 Marcha preparativa comum para a obtenção de amostras para EFS

Nestes ensaios, 5 g de açaí Top liofilizado foram submetidos a extração em aparelho de Soxhlet com 400 mL de hexano, a 60°C, durante 8 horas. Após evaporação dos resíduos de hexano, o material desengordurado foi pesado e submetido à extração com 100 mL de solução ATFA 0,5 % em H₂O. A suspensão foi sonicada por 12 min. e centrifugada por 20 min. a 3000 rpm. Os *pellets* foram submetidos a uma reextração com 80 mL da sol. extratora e, após a segunda centrifugação, os sobrenadantes reunidos foram particionados duas vezes com volumes iguais de AcOEt. As fases AcOEt foram lavadas 3 vezes com H₂O e, após serem reunidas, a fração total foi concentrada em evaporador rotatório (até 40°C) até restar um pequeno resíduo aquoso (~0,5 mL). Um resumo deste procedimento é apresentado no esquema 5.



Esquema 5: Marchas 0612, 1104 e 1707 (primeira etapa).

Nos ensaios com a coluna de celulose, adicionou-se cerca de 2 mL de sol. AcOH 1 % ao resíduo ácido e seguiu-se o mesmo procedimento descrito para a marcha anterior.

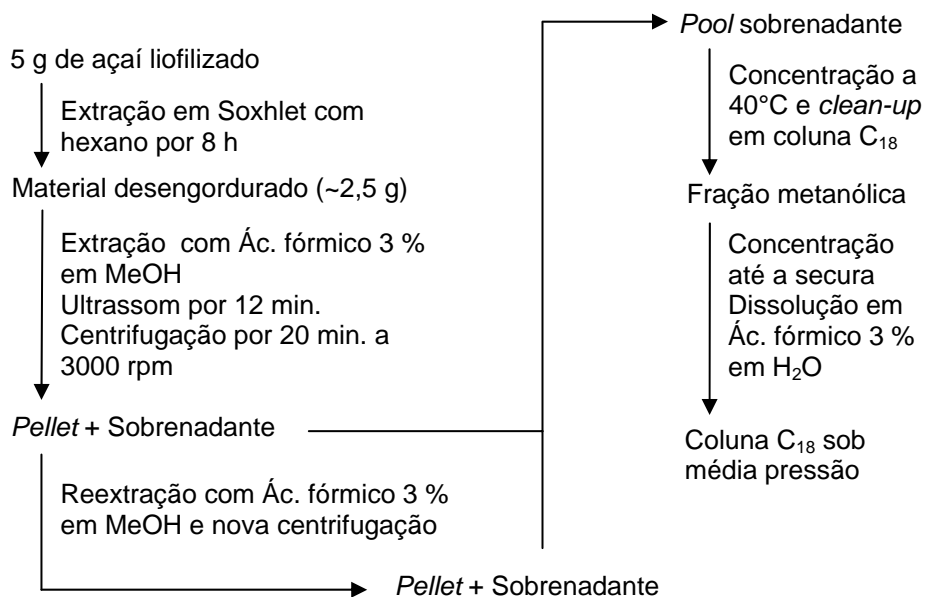
No ensaio com a RTIFB, após concentração da fase AcOEt em evaporador rotatório, o resíduo ácido resultante foi submetido a uma breve concentração por corrente de gás N₂. A este resíduo, foram adicionados 0,5 mL de sol. AcONa 500 mM (pH = 8) e 0,5 mL de MeOH para se conseguir a solubilização total dos constituintes da fração. Antes da aplicação, a resina foi tratada com 10 mL de sol. NaOH 3 % (p/v; 7,5 mmols) e com 70 mL de sol. MeOH / H₂O (1:1) (até atingir pH = 6). A solução amostra foi aplicada e, 5 min. após a eluição de seu volume, passou-se 40 mL de sol. MeOH / H₂O (1:1), 25 mL de sol. HCl P.A. (1:20; v/v) em MeOH / H₂O (1:1), 30 mL de água e 10 mL de sol. NaOH 3 % (p/v). As frações de interesse foram analisadas por CLAE-DAD e, posteriormente, a fração rica em ácidos fenólicos foi concentrada em evaporador rotatório (até 40°C), liofilizada e submetida às derivatizações com diazometano ou metanol anidro acidificado; em seguida, os produtos de reação foram analisados por CG e/ou por CG-EM. As reações com diazometano foram realizadas com e sem adição de 10 mg de BTBA e 0,5 mL de tampão Na₂HPO₄ / HCl 1 M (pH = 7).

Num ensaio preliminar com o cartucho SAX, partiu-se de 5 g de açaí comercial liofilizado. Após concentração da fração solúvel em AcOEt em evaporador rotatório, o resíduo ácido foi submetido à concentração por corrente de gás N₂ até a secura. Então, adicionou-se 1 mL de AcONa 50 mM (pH = 7) e submeteu-se a solução ao ultrassom por 2 min. Como a maior parte do resíduo ainda não havia solubilizado, adicionou-se 0,2 mL de MeOH e mais 0,8 mL da solução anterior. Após agitação, formou-se uma suspensão que pôde ser aplicada integralmente na SAX. A resina, anteriormente tratada com 3 mL de MeOH e 4 mL de H₂O, foi desenvolvida com a suspensão e, em seguida, lavada com 3-4 mL de H₂O. Depois, foi desenvolvida com 4 mL de solução H₂SO₄ 500 mM, com a qual obteve-se uma fração fortemente colorida. Todas as frações recolhidas foram analisadas por CLAE-DAD e, posteriormente, a fração rica em ácidos fenólicos foi submetida à derivatização com metanol anidro acidificado; em seguida, os produtos de reação foram analisados por CG e CG-EM.

3.3.11 Marcha experimental I para a obtenção de flavonóides

Partindo de 5 g de açaí Top liofilizado, fez-se o desengorduramento como descrito no item 3.3.10. Em seguida, fez-se a extração do material desengordurado com 50 mL de ácido fórmico 3 % em MeOH (v/v; pH = 2-3). A suspensão foi sonicada por 12 min. e centrifugada por 20 min. a 3000 rpm. O *pellet* obtido foi reextraído com mais 50 mL da mesma solução extratora e novamente centrifugado. Os sobrenadantes foram reunidos e concentrados em evaporador rotatório a 40°C até que seu volume fosse reduzido a 10 mL. O concentrado obtido foi aplicado numa coluna de C₁₈ aberta (150 x 10 mm) e eluído com MeOH. Em seguida, os lipossolúveis mais polares, presos na coluna, foram removidos com MeOH / AcOEt / CH₂Cl₂ (5:1:2) e a fração eluída com metanol foi novamente concentrada em evaporador rotatório (até 40°C), por corrente de gás N₂ e no liofilizador até a *secura*.

Então, o concentrado foi dissolvido em 7 mL de solução HCOOH 3 % em H₂O (v/v) e injetado numa coluna de C₁₈ sob média pressão (250 x 25 mm) previamente equilibrada com 125 mL da mesma solução. Eluiu-se mais 120 mL de sol. HCOOH 3 % em H₂O (fase móvel A) a 5 mL / min. e, em seguida, iniciou-se a eluição de sol. HCOOH 3 % em MeOH (v/v; fase móvel B) a 0,2 mL / min. por outra bomba, em paralelo, até o volume eluído ter atingido 150 mL. A partir daí, a vazão da fase móvel A foi alterada para 4,5 mL / min. e a vazão da fase móvel B alterada para 0,5 mL por min. até o volume eluído atingir 175 mL. Em seguida, percebeu-se que as fases não estavam se misturando adequadamente antes de passarem na coluna e os componentes ainda não eluídos foram removidos somente com a fase móvel B a 0,5 mL / min. Ainda assim, sete frações foram recolhidas e analisadas posteriormente por CLAE-DAD. Todo o procedimento está resumido no esquema 6.



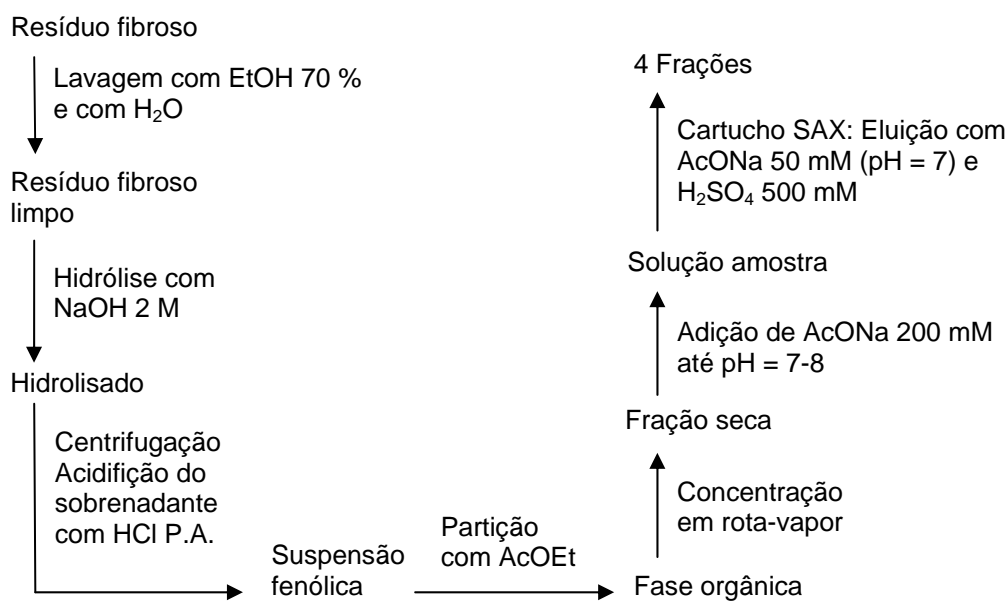
Esquema 6: Marcha 1106.

3.3.12 Testes comparativos para EFS por SAX e obtenção da fração ligada à parede celular

Partindo de 5 g de açai Top liofilizado, fez-se o desengorduramento como descrito no item 3.3.10. O primeiro extrato, obtido com 100 mL de sol. ATFA 0,5 %, foi homogeneizado manualmente e igualmente centrifugado, mas não foi sonicado. Fez-se apenas uma reextração com 100 mL da solução extratora e os extratos combinados foram particionados duas ou três vezes com 200 mL de AcOEt. Cada fase AcOEt foi lavada 3 vezes com sol. aquosa ácida, HCl P.A. (1:100; v/v) ou ATFA 0,1 %. Depois, foram reunidas e concentradas em evaporador rotatório (até 40°C) e por corrente de gás N₂ até a *secura*. O resíduo seco foi retomado com sol. NaOH 3 % (p/v) ou sol. AcONa 200 mM e teve o pH corrigido para um valor entre 7 e 8 (medido por fita indicadora Merck) com o auxílio das soluções aquosas de HCl P.A. (1:100; v/v) e NaOH 3 % (p/v). O cartucho SAX, previamente tratado com 2 mL de MeOH, 3 mL de H₂O e 3 mL de sol. aquosa de NaOH diluído (pH = 8) ou de AcONa 50 mM (pH = 7), foi desenvolvido com a solução (ou suspensão) do extrato e lavado com 6 mL da sol. aquosa correspondente (pH = 7 ou 8). Em seguida, o cartucho foi desenvolvido com sol. H₂SO₄

500 mM, com a qual obteve-se a fração rica em ácidos fenólicos. Todas as frações recolhidas foram analisadas por CLAE-DAD.

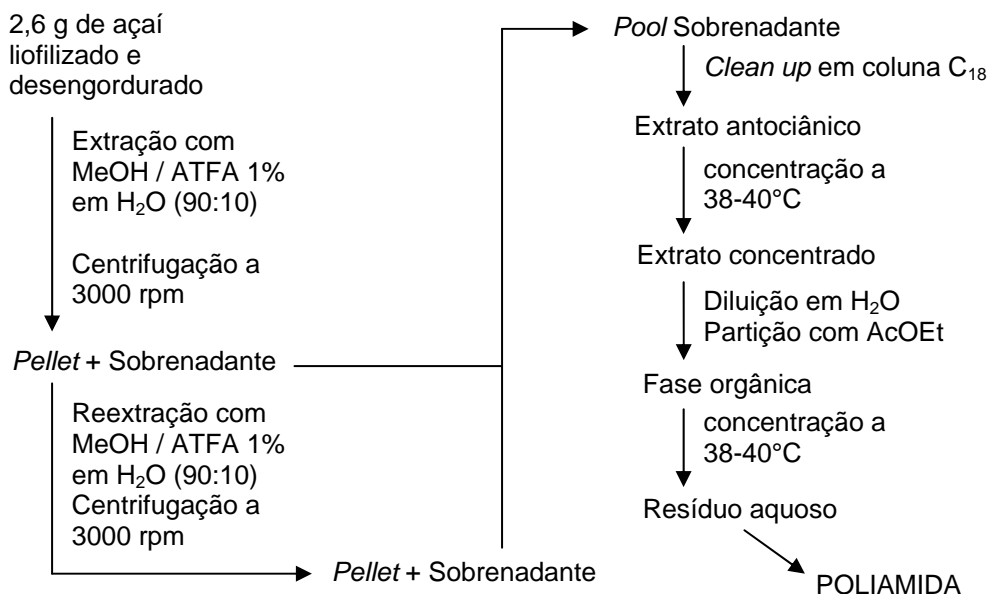
O *pellet* obtido após a segunda extração com a sol. ATFA 0,5 % foi submetido à hidrólise básica com 50 mL de sol. NaOH 2 M ou à uma reextração com 80 mL de EtOH 70 % em H₂O seguida por lavagem com 80 mL de H₂O e hidrólise básica nas mesmas condições. Imediatamente após o início da reação de hidrólise ou duas horas após, a suspensão foi novamente centrifugada a 3000 rpm por 20 min. e o sobrenadante foi separado e acidificado com 6-7 mL de HCl P.A. Este foi particionado duas vezes com 50 mL de AcOEt e as fases orgânicas foram reunidas e concentradas em evaporador rotatório (até 40°C). O concentrado foi dissolvido em 4 mL de solução AcONa 200 mM e eluído num cartucho SAX como descrito anteriormente, utilizando sol. AcONa 50 mM para as lavagens. Todas as frações recolhidas e o extrato etanólico bruto foram também analisados por CLAE-DAD. Um resumo do melhor procedimento é apresentado no esquema 7.



Esquema 7: Marcha 2008 (fração ligada à parede celular).

3.3.13 Marcha experimental II para a obtenção de flavonóides

Partindo-se de 2,6 g de açaí Top liofilizado e desengordurado como descrito anteriormente (item 3.3.10), obteve-se um extrato metanólico total submetendo-se o material à extração com 100 mL de solução MeOH / ATFA 1 % (v/v) aq. (90:10; v/v) por 20 min. A suspensão obtida foi centrifugada a 3000 rpm por 20 min. e os *pellets* foram submetidos a uma reextração com mais 100 mL da sol. extratora. Após nova centrifugação, os sobrenadantes antociânicos foram aplicados numa coluna C₁₈ (150 x 10 mm) aberta, submetida à pressão. A coluna C₁₈, previamente tratada com 20 mL da sol. extratora, foi desenvolvida com a solução amostra e lavada com mais 50 mL da mesma solução. Os 25 mL finais eluíram como uma fração amarela que foi separada e analisada em espectrofotômetro. Após uma caracterização preliminar, a fração foi também analisada por CG e CG-EM. Restou na coluna ainda uma fração verde que foi removida com sol. MeOH / CHCl₃ (1:1) e caracterizada por fluorescência em placa de sílica sob luz ultravioleta. Os extratos antociânicos recuperados foram concentrados em evaporador rotatório a 40°C até que seu volume fosse reduzido a 20 mL. Em seguida, o volume foi ajustado para 50 mL por adição de H₂O e o extrato diluído foi particionado duas vezes com 50 mL de AcOEt. A fração em AcOEt, rica em polifenóis, foi concentrada em evaporador rotatório a 40°C até que todo o solvente orgânico fosse evaporado, restando um resíduo aquoso de aproximadamente 0,5 mL. Este foi diluído com 5 mL de sol. MeOH / H₂O (1:1) e aplicado numa coluna de vidro com poliamida (55 x 10 mm). Um resumo deste procedimento é apresentado no esquema 8.



Esquema 8: Marcha 2509b.

Após a aplicação, a coluna de poliamida, previamente tratada com 5 mL da sol. MeOH / H₂O (1:1), foi desenvolvida com mais 10 mL da mesma solução. Em seguida, foram aplicados 26 mL de sol. AcOEt / MeOH / H₂O (3:5:5), 15 mL de AcOEt e 10 mL de sol. MeOH / H₂O (1:1) para remover os resíduos de AcOEt da coluna. Depois, aplicou-se, também, 10 mL de sol. CH₃CN / H₂O (60:40) acidificada com ATFA 0,1 % (v/v), 20 mL de sol. CH₃CN / MeOH (1:1) e 10 mL de sol. acetona / MeOH (1:1). Todas as frações recolhidas foram analisadas por CLAE-DAD. As frações aquosas ou hidroalcoólicas foram analisadas diretamente e as frações contendo AcOEt ou acetona foram concentradas até volume mínimo e rediluídas com MeOH / H₂O. Após análise por CLAE-DAD, as frações de interesse foram selecionadas para serem analisadas por CLAE-EM.

3.3.14 *Teste preliminar de aprimoramento da análise da fração ligada à parede celular*

Após a obtenção dos extratos aquosos ou hidroalcoólicos do açaí liofilizado e desengordurado, os *pellets* foram submetidos a mais duas extrações consecutivas com 60 mL de EtOH 70 % e lavados, em seguida, com o mesmo volume de H₂O. Então, os *pellets* foram submetidos à hidrólise básica com 50 mL de NaOH 2 M por uma hora e novamente centrifugados a 3000 rpm por 20 min. Os sobrenadantes foram reunidos e acidificados com 6,5 mL de HCl P.A. e depois particionados três vezes com 50 mL de AcOEt. As fases AcOEt foram reunidas e concentradas em evaporador rotatório (a 40°C) até a secura. O concentrado foi dissolvido em 2 mL de solução Na₂HPO₄ 100 mM e o pH da solução foi aferido.

O cartucho SAX a ser utilizado foi lavado com 2 mL de MeOH, 3-4 mL de H₂O e 2-3 mL de tampão Na₂HPO₄ / HCl 50 mM (pH = 7). A solução contendo o extrato foi aplicada no cartucho e este foi lavado com 4 mL do mesmo tampão e com sol. H₂SO₄ 500 mM. Todas as frações recolhidas foram analisadas por CLAE-DAD.

3.3.15 *Reações de derivatização com diazometano e com metanol anidro acidificado*

As frações neutras a serem derivatizadas por estes reagentes foram acidificadas com HCl P.A. (até pH = 2) e particionadas duas vezes com volumes iguais de AcOEt. Exceto no procedimento descrito no item 3.3.10, as frações ácidas foram diretamente particionadas com o solvente. As fases orgânicas foram reunidas e concentradas em evaporador rotatório (a 40°C) até a secura e retomadas com a solução reagente (diazometano em EtOH / Et₂O ou cloreto de acetila / MeOH anidro).

Na reação com diazometano, os solventes foram evaporados à temperatura ambiente em capela de exaustão e os produtos foram pesados em balança analítica. Estes foram redissolvidos com volumes apropriados de clorofórmio / metanol e analisados por CG-EM.

Para a reação com metanol anidro acidificado, adicionou-se cuidadosamente, em sistema fechado, 2 mL de cloreto de acetila sobre 20 mL de metanol anidro. Um mililitro do reagente recém preparado foi adicionado sobre 2 mg de substância padrão ou fração concentrada em frasco de vidro com tampa de rosca vedada com teflon. Os frascos foram tampados e colocados em banho de grafite sobre placa de aquecimento a 50°C por 16 h. Após a reação, os produtos foram concentrados em evaporador rotatório (a 40°C) e redissolvidos em volume apropriado de CH₂Cl₂ ou clorofórmio / metanol e analisados por CG ou CG-EM, respectivamente.

3.3.16 Reações de derivatização com catalisador de transferência de fase

Esta reação foi testada de acordo com o método proposto por Fiamegos *et al.* (2004) e com modificações para se adequar aos substratos testados. Primeiramente, utilizou-se 2 mg de ácido gálico mais 2 mg de ácido caféico como substratos para a reação. Estes foram solubilizados com 0,5 mL de tampão H₂PO₄⁻ / HPO₄²⁻ 1 M (pH = 8) mais H₂O até 10 mL. A solução foi transferida para um frasco Erlenmeyer com tampa de rosca vedado com teflon, ao qual adicionou-se também 1 mL de sol. BTBA 0,1 M em CH₂Cl₂, 0,1 mL de CH₃I e 1 mL de CH₂Cl₂. A mistura foi, então, aquecida a 70°C por 30 min. sob agitação constante (com barra magnética) e a fase orgânica foi recuperada com CH₂Cl₂ para análise subsequente por CG-EM. Posteriormente, testou-se uma quantidade maior de substrato (20 mg de ácido gálico) com um tempo de reação também maior (1 hora). Em um segundo teste, a reação foi realizada com 20 mg de ácido cinâmico, 0,1 mL de CH₃I e 20 mg de BTBA recém dissolvidos em 2 mL

de CH_2Cl_2 , sem aquecimento. O frasco vedado contendo todos os reagentes foi submetido a um banho com ultrassom por 60 min. com intervalos de agitação manual vigorosa a cada 12 min. Após todas as reações, os produtos foram extraídos por partição com CH_2Cl_2 , usando NaCl para aumentar a força iônica da fase aquosa. Em seguida, as fases orgânicas foram concentradas por corrente de gás N_2 e os produtos foram diluídos em volumes apropriados de clorofórmio / metanol para serem analisados por CG-EM.

Outro teste com padrões, utilizando 20 mg de uma mistura de substratos (ácido gálico, cinâmico, *p*-cumárico e siríngico; 5 mg de cada), foi realizado com apenas 10 mg de BTBA nas mesmas condições citadas anteriormente. O mesmo teste foi repetido outras vezes com 20 mg de BTBA ou BTCA e apenas 2 mg de cada substrato ou resíduo da fração obtida em AcOEt (segundo o procedimento inicial descrito no item 3.3.10).

3.3.17 Reações de hidrólise ácida

Estes ensaios seguiram metodologia baseada na técnica utilizada por Gao & Mazza (1994). Alíquotas de 0,5 mL de frações da coluna C_{18} aberta ou da SAX foram transferidas para um frasco Erlenmeyer com tampa de rosca vedado com teflon e submetidas à hidrólise ácida por adição de 1 mL de HCl 2 M e 0,5 mL de MeOH, seguindo-se com aquecimento à 100°C por 1 h. Os produtos de reação foram analisados diretamente por CLAE-DAD.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Resultados quantitativos gerais

4.1.1 Teor de massa seca

De acordo com o item 3.3.1, os extratos congelados de açaí médio foram pesados antes e depois de serem liofilizados. Os teores de massa seca das amostras de açaí Top e açaí comercial foram calculados em 11,6 % (p/p) e 14,8 % (p/p), respectivamente, como média de três determinações semelhantes. Ao contrário do primeiro valor, o teor de massa seca determinado para as amostras de açaí comercial encontra-se um pouco fora da faixa estipulada para a designação “açaí médio” (11-14 %) (LICHTENTHÄLER *et al.*, 2005), o que mudaria a classificação destas amostras para “açaí grosso”.

4.1.2 Teor de lipídeos totais

De acordo com o item 3.3.10, após extração dos lipossolúveis com hexano e evaporação dos resíduos do solvente, o material desengordurado obtido foi pesado e o teor de lipossolúveis extraído com hexano foi calculado por diferença. Três determinações feitas com amostras de açaí Top revelaram uma média de 49 % (p/p) de lipídeos totais. Para a determinação deste teor nas amostras de açaí comercial, pesou-se a fração recuperada em hexano após concentração em rota-evaporador (a 40-45°C). A média de duas determinações semelhantes revelaram um teor de 44 % (p/p) de lipídeos totais. Passando a fazer a determinação do teor de lipídeos totais nas amostras de açaí Top também por pesagem da fração obtida em hexano, revelaram-se valores maiores que os anteriores (obtidos por marchas

distintas): 52 % (p/p), como média de três determinações semelhantes. Embora, em cada caso, o número de determinações tenha sido pequeno, os valores considerados nos cálculos de cada média foram todos muito semelhantes. Contudo, dois fatores importantes devem ser considerados na avaliação destes resultados: a possível evaporação incompleta dos resíduos de hexano do material desengordurado¹⁸, o que causaria uma subestimação do teor de lipídeos totais calculado por diferença, e a provável perda de substâncias voláteis durante a concentração da fração recuperada em hexano, o que também causaria uma subestimação do teor calculado diretamente. Portanto, embora os resultados citados aqui estejam concordantes com o valor relatado por Rogez (2000), é possível que estes teores sejam ainda maiores.

4.1.3 Fenólicos Totais

O ensaio para determinação de fenólicos totais está descrito no item 3.3.3. Com o auxílio de uma curva padrão (Fig. 8) foi possível expressar o teor de fenólicos totais nas amostras de açaí analisadas em equivalentes de ácido gálico por unidade de massa seca. A média de duas determinações semelhantes, feitas em triplicata, para três amostras homogêneas de açaí comercial foi $33,2 \pm 0,92$ mg equivalentes de ácido gálico / g de açaí liofilizado. Uma determinação isolada com outra amostra de açaí comercial revelou um teor mais elevado de fenólicos totais, 41,8 mg equivalentes de ácido gálico / g de açaí liofilizado, assim como outra determinação isolada, também feita em triplicata, com uma amostra de açaí Top, a qual revelou um teor de 36,3 mg equivalentes de ácido gálico / g de açaí liofilizado. Diferenças significativas entre estes valores, quando existentes, podem ser atribuídas a diversos fatores, como condições climáticas de cultivo, tipo de solo, época da colheita e estágio de maturação dos frutos.

¹⁸ O material desengordurado não foi aquecido, para evitar degradação de pigmentos e de outros polifenóis.

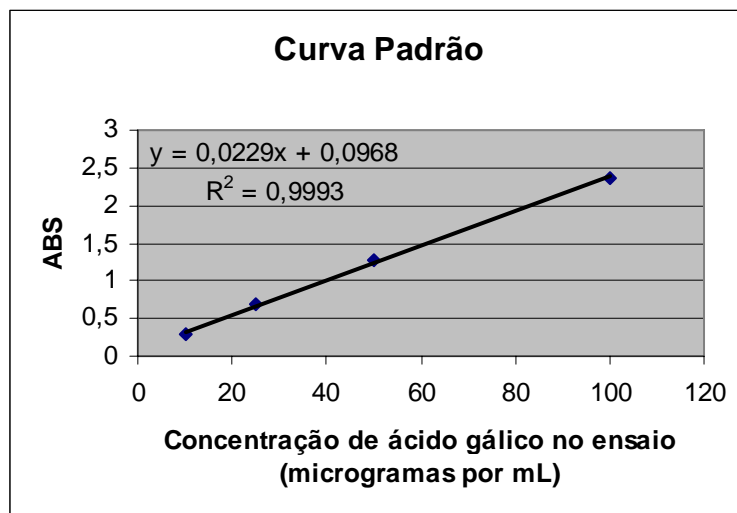


Figura 8: Curva padrão obtida após os ensaios com alíquotas de 3 mL das soluções de ácido gálico a 10, 25, 50 e 100 ppm.

4.1.4 Antocianinas Totais

Conforme descrito no item 3.3.4, o teor de antocianinas totais nas amostras de açaí foi calculado em equivalentes de cianidina 3-rutinosídeo (M.M. = 595,1 g / mol), já que esta é a antocianina mais abundante em *E. oleracea*. Embora sua absorvidade molar a 510 nm (ϵ_{510}) seja quase quatro vezes menor que o valor correspondente para cianidina 3-glicosídeo (FIGUEIREDO *et al.*, 1996; KIM *et al.*, 2005), segunda antocianina mais abundante nos frutos, a relação entre concentração do rutinosídeo e concentração do glicosídeo supera a relação observada entre suas absorvidades. Considerando as razões entre os respectivos valores de absorvidade molar a 510 nm (ϵ_{510}) e entre os valores recuperados de absorbância para ambos os pigmentos nos cromatogramas visualizados no mesmo comprimento de onda (dado não mostrado), a concentração do rutinosídeo, calculada em função da concentração do glicosídeo, atinge 26 vezes a concentração deste na amostra de açaí comercial e 7 vezes na amostra de açaí Top analisada. Os respectivos teores de antocianinas totais foram calculados

em 22,0 mg (açai comercial) e 27,1 mg (açai Top) de cianidina 3-rutinosídeo equivalentes / g de açai liofilizado, valores significativamente maiores que os que seriam obtidos em equivalentes de cianidina 3-glicosídeo (4,3 e 5,3 mg / g, respectivamente). Após verificação de que estes valores decrescem com o passar do tempo, indicando degradação contínua dos pigmentos após a liofilização, os resultados apresentados aqui correspondem aos teores obtidos a partir de amostras recém liofilizadas, conforme descrito no item 3.3.4.

4.2 Antocianinas

4.2.1 Extração, detecção e identificação

No primeiro ensaio descrito neste trabalho para a análise de antocianinas (item 3.3.5), utilizou-se ATFA 0,5 % em CH₃CN / H₂O (1:1) como solução extratora. O uso desta solução gerou problemas durante a etapa de extração da fração dos compostos fenólicos não antociânicos com AcOEt, já que a acetonitrila migrou para a fase AcOEt, carreando pigmentos da fração aquosa. Embora a maior parte da CH₃CN tenha sido perdida durante esta etapa, a fração aquosa foi ainda liofilizada e redissolvida em sol. ATFA 0,5 % aq. antes de ser aplicada na coluna de XAD-16, pela qual seriam removidos açúcares livres e ácidos orgânicos. Após passagem por esta resina, apenas 10 mg de fração semi-purificada de pigmentos puderam ser recuperados, o que equivale a 10 % do material de partida (em massa seca). Embora se tenha detectado várias substâncias não identificadas na análise por CLAE a 280 nm (dado não mostrado), o cromatograma obtido a 520 nm (Fig. 9) mostra a detecção de, pelo menos, seis picos bem definidos com absorção neste comprimento de onda. De acordo com os respectivos valores de tempo de retenção de cada pico e comparando-os com os valores obtidos para alguns padrões de glicosídeos (antocianinas), pode-se sugerir que alguns

dos picos assinalados correspondam a cianidina 3,5-diglicosídeo (pico 1), cianidina 3-galactosídeo (pico 2), cianidina 3-glicosídeo (pico 3) e cianidina 3-rutinosídeo (pico 4).

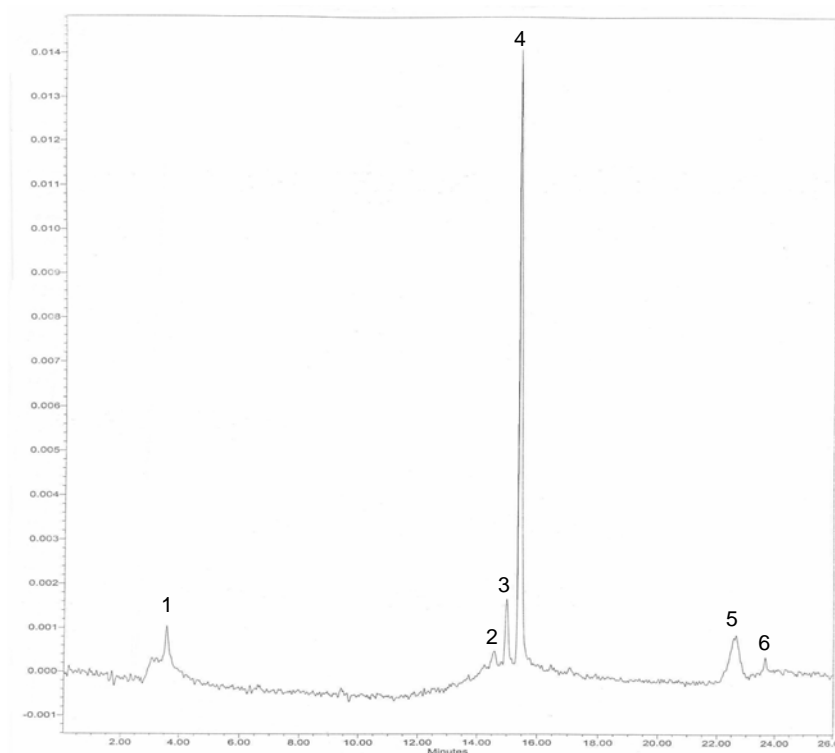


Figura 9: Cromatograma obtido por CLAE da fração de pigmentos semi-purificada a 520 nm. Condições cromatográficas: item 3.3.2.

Os resultados obtidos da análise em espectrômetro de massas com IDE (modo positivo), por inserção direta da mesma fração (Fig. 10), confirmaram claramente a identidade do glicosídeo mais abundante, cianidina 3-rutinosídeo (P.M. = 595 u.m.a.). O espectro de massas obtido do sinal com $m/z = 595$ como íon precursor (Fig. 11) mostra os fragmentos correspondentes ao monoglicosídeo ($m/z = 449$) e à aglicona ($m/z = 287$), gerados pelas respectivas perdas de ramnose e ramnoglicose.

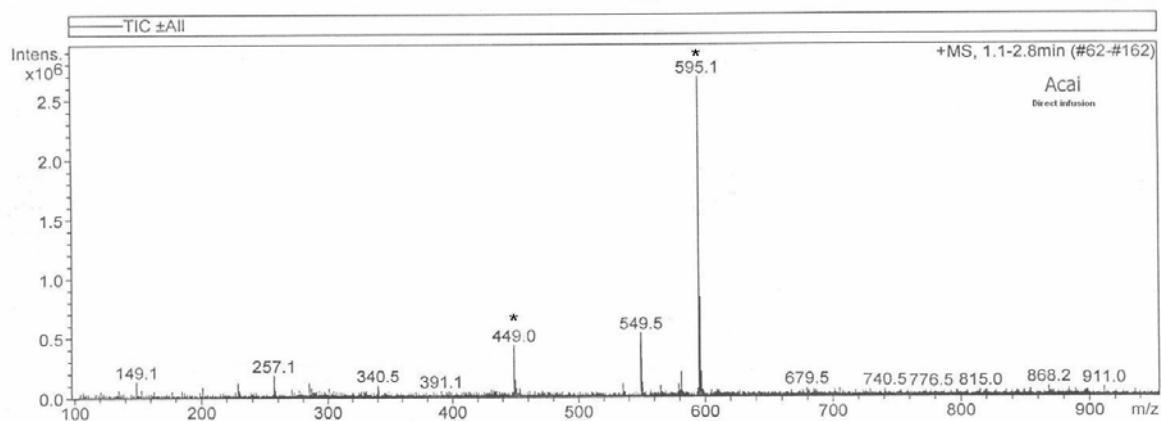


Figura 10: Espectro de massas obtido por inserção direta da fração de pigmentos semi-purificada.

O pico de $m/z = 449$ obtido por inserção direta (Fig. 10) corresponderia aos picos 2 e 3 do cromatograma obtido por CLAE (Fig. 9), ou seja, aos isômeros cianidina 3-glicosídeo e cianidina 3-galactosídeo. A análise por fragmentação daquele pico ($m/z = 449$) selecionado (Fig. 12) mostra o fragmento correspondente à aglicona, cianidina ($m/z = 287$).

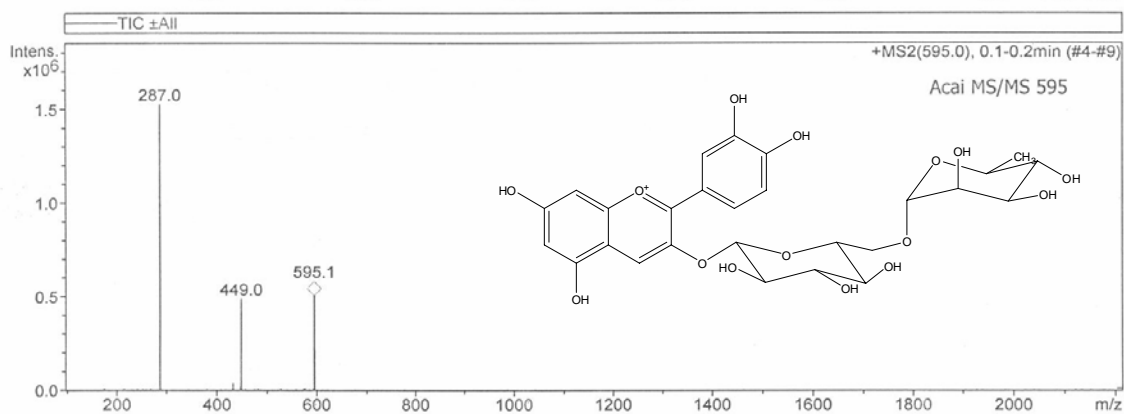


Figura 11: Espectro de massas obtido por análise de fragmentação do pico de $m/z = 595$ selecionado e estrutura do diglicosídeo correspondente, cianidina 3-rutinosídeo¹⁹.

Como nenhum pico de massa correspondente ao diglicosídeo cianidina 3,5-diglicosídeo (P.M. = 611 u.m.a.) foi detectado na primeira análise por inserção direta (Fig. 10), fez-se uma nova análise com a amostra mais concentrada (Fig. 13). O novo espectro

¹⁹ Detalhes da nomenclatura, referentes às configurações dos carboidratos, podem ser conferidos no Quadro 2 (item 1.3.2).

obtido revelou não somente o pico de $m/z = 611$, mas também o de $m/z = 581$. A análise da fragmentação deste último (Fig. 14) mostra o aparecimento do pico de $m/z = 443$, que sugere uma perda de 138 unidades de massa ($581 - 443$), seguida por outra perda de 156 unidades ($443 - 287$) para gerar a aglicona, também cianidina.

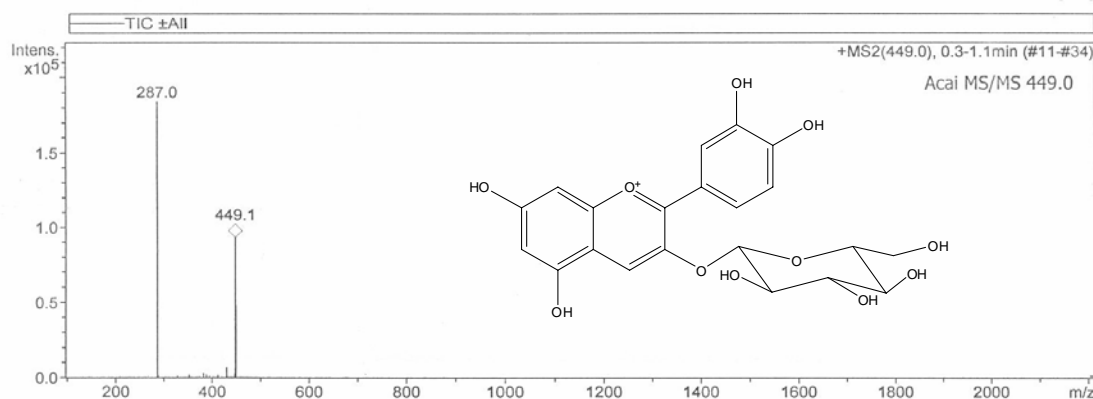


Figura 12: Espectro de massas obtido por análise de fragmentação do pico de $m/z = 449$ selecionado e estrutura do glicosídeo predominante responsável pelo respectivo sinal, cianidina 3-glicosídeo.

As perdas de 138 e 156 unidades de massa não correspondem a qualquer açúcar conhecido (com P.M. = 156 ou 174 u.m.a.). Porém, um glicosídeo com íon molecular de $m/z = 581$ tem sido detectado em frutos de *E. oleracea* por Gallori *et al.* (2004) e Schauss *et al.* (2006a). Os últimos autores o identificaram como cianidina 3-sambubiosídeo (Fig. 15), a qual deveria gerar fragmentos de $m/z = 449$ ($581 - 132$), por perda do açúcar mais externo (xilose), e de $m/z = 287$ ($449 - 162$ ou $581 - 294$), por perda de glicose ou de xilosil-glicose, como demonstrado por Cao *et al.* (2001). Entretanto, Schauss *et al.* (2006a) relatam que o sambubiosídeo gera apenas um fragmento, correspondente à aglicona ($m/z = 287$), assim como outros autores (WU *et al.*, 2002; STONER *et al.*, 2005). Além disso, as condições cromatográficas utilizadas por Cao *et al.* (2001) não permitiram uma boa separação dos glicosídeos cianidina 3-sambubiosídeo ($m/z = 287$) e cianidina 3-glicosídeo ($m/z = 449$) por

CL-EM, o que dá possibilidade do pico 449 do espectro do sambubiosídeo ter sido gerado devido à presença deste último (cianidina 3-glicosídeo).

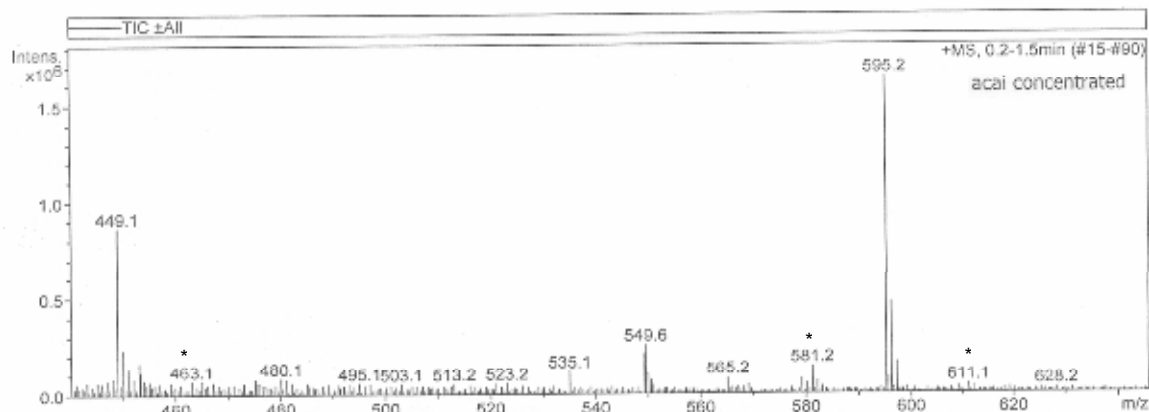


Figura 13: Espectro de massas obtido por inserção direta da fração de pigmentos concentrada.

Analisando a ordem de eluição do sambubiosídeo em relação às outras antocianinas de *E. oleracea* na literatura (GALLORI *et al.*, 2004; SCHAUSS *et al.*, 2006a), pôde-se notar que é possível que este diglicosídeo corresponda ao pico 2 da figura 9. Assim, o sambubiosídeo poderia estar co-eluindo com cianidina 3-galactosídeo, a qual poderia ainda nem estar presente, já que seu pico de massas, obtido por EM-IES ($m/z = 449$), também é atribuído à cianidina 3-glicosídeo. Além disso, cianidina 3-galactosídeo não tem sido detectada por outros autores (Quadro 1).

Embora seja possível identificar um pequeno pico correspondente ao fragmento de $m/z = 449$ no espectro de fragmentação do pico 581 (fig 14; primeiro pico à direita do pico 443), a presença pronunciada do fragmento de $m/z = 443$ poderia sugerir perda de algum grupo acila (com 138 u.m.a.) por rearranjo.

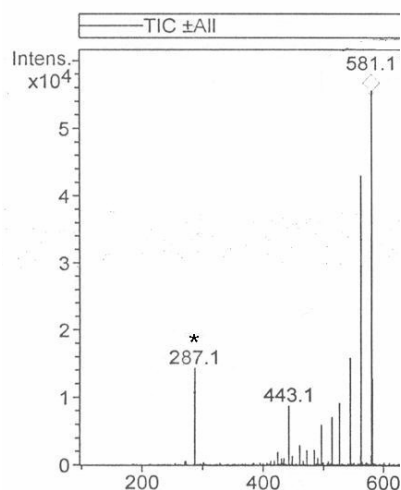


Figura 14: Espectro de massas obtido por análise de fragmentação do pico de $m/z = 581$ selecionado.

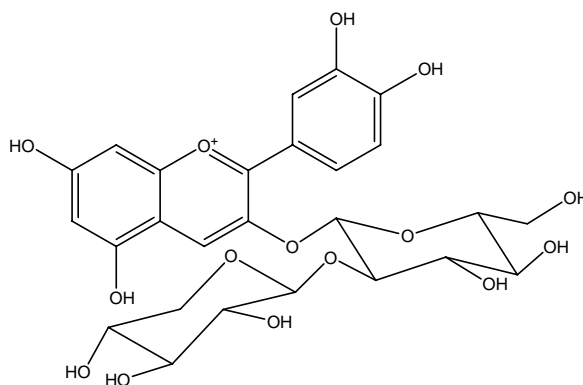


Figura 15: Estrutura de cianidina 3-sambubiosídeo²⁰.

O presente trabalho é o único a relatar a detecção de cianidina 3,5-diglicosídeo nos frutos de *E. oleracea*, mas também descreve a detecção de todas as antocianinas já detectadas pelos relatos concordantes que citam cianidina 3-glicosídeo e cianidina 3-rutinosídeo como os principais componentes hidrossolúveis dos frutos da espécie (IADEROZA *et al.*, 1992; ROGEZ, 2000; CONSTANT, 2003; GALLORI *et al.*, 2004; LICHTENTHÄLER *et al.*, 2005; SCHAUSS *et al.*, 2006a; PACHECO *et al.*, 2007). A detecção do pico de $m/z = 463$ no espectro de massas obtido por inserção direta da fração de pigmentos concentrada (Fig. 13) e a detecção do pico de $m/z = 609$ por ampliação dos sinais de m/z entre 500 e 650 (dado não

²⁰ Detalhes da nomenclatura, referentes às configurações dos carboidratos, podem ser conferidos no Quadro 2 (item 1.3.2).

mostrado) podem ser, respectivamente, atribuídas a peonidina 3-glicosídeo e peonidina 3-rutinosídeo, também detectadas por Schauss *et al.* (2006a).

Especulativamente, o sinal de $m/z = 535$ (Fig. 13) poderia ser atribuído à malvidina 3-glicosídeo-acetato, de acordo com o relato de Wang & Sporns (1999). A falta de padrões de antocianinas e o fato de não se ter feito análises por CL-EM ou por EM de alta resolução com esta fração não permitiu a identificação inequívoca deste e de outros sinais.

4.2.2 *Marcha analítica direta*

A técnica descrita no item 3.3.7 tinha como objetivo o desenvolvimento de uma metodologia mais simples e mais rápida, e que ainda permitisse a detecção das principais antocianinas do fruto.

Em virtude do ocorrido durante a extração com AcOEt (item anterior), duas modificações poderiam ter sido tomadas: retirar a CH_3CN da solução extratora ou concentrar o extrato antes de fazer as partições. Com o intuito de se evitar etapas de aquecimento e, conseqüentemente, a degradação dos pigmentos, optou-se inicialmente por fazer extratos totalmente aquosos com ATFA 0,5 %. Portanto, neste ensaio, aproveitou-se também para verificar a capacidade extratora da sol. ATFA 0,5 % em H_2O , comparando-se a recuperação dos pigmentos no primeiro extrato de cada amostra (Am1a e Am2a) com a recuperação no segundo extrato (Am1b e Am2b).

Os resultados obtidos para as amostras Am1 e Am2 foram idênticos e a quantidade de pigmentos recuperada em Am1b ou Am2b correspondeu a aproximadamente 10 % da quantidade recuperada em Am1a ou Am2a, indicando que cerca de 90 % dos pigmentos são extraídos na primeira etapa. Os cromatogramas obtidos nas análises por CLAE do primeiro

extrato de uma das amostras (figuras 16 e 17) mostram que poucas substâncias, além das duas antocianinas principais, puderam ser detectadas por esta metodologia.

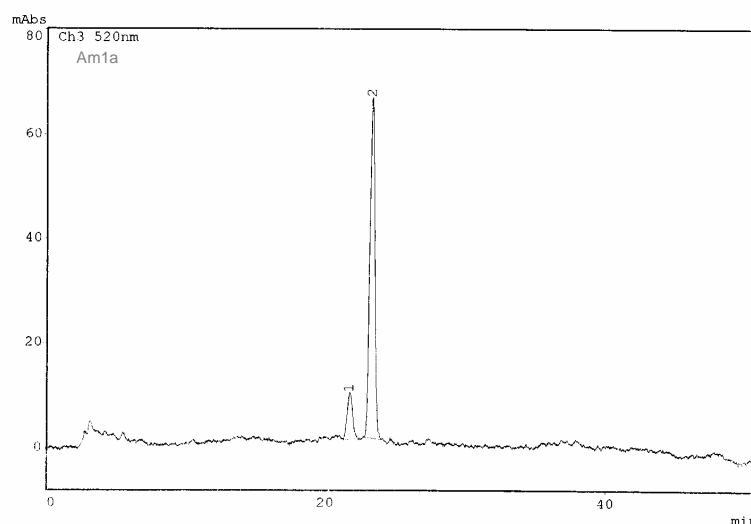


Figura 16: Cromatograma da fração aquosa do extrato Am1a obtido por CLAE com detecção a 520 nm. Condições cromatográficas: segundo Sumere *et al.* (1993). Sinais: cianidina 3-glicosídeo (1) e cianidina 3-rutinosídeo (2).

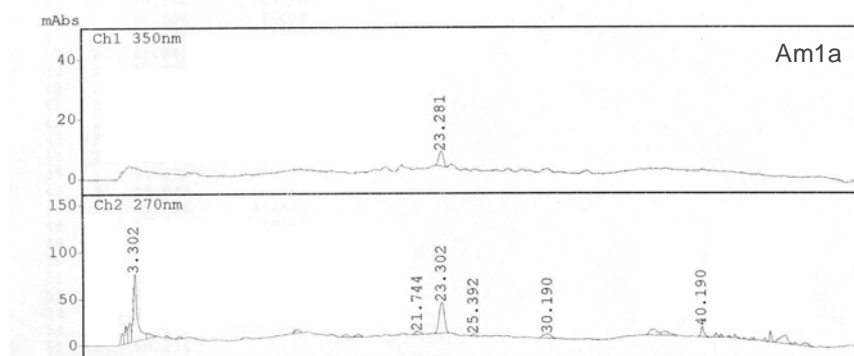


Figura 17: Cromatogramas da fração aquosa do extrato Am1a obtido por CLAE com detecção a 350 e 270 nm. Condições cromatográficas: segundo Sumere *et al.* (1993). Os principais sinais estão indicados com seus respectivos valores de tempo de retenção (min.).

4.2.3 Análise por CCD

A análise por CCD em placas de gel de sílica, descrita no item 3.3.6, revelou duas manchas de antocianinas com valores de R_f bem distintos (0 e 0,42), evidenciando a presença

de um pigmento mais polar ($R_f = 0$), provavelmente cianidina 3,5-diglicosídeo. A mancha superior ($R_f = 0,42$) corresponderia à soma dos glicosídeos principais, cianidina 3-glicosídeo e cianidina 3-rutinosídeo. A detecção de duas manchas intermediárias ($R_f = 0,13$ e $0,24$) após a revelação com orcinol sulfúrico evidenciou a presença de açúcares livres na fração aquosa, a qual não havia sido submetida à extração em fase sólida com XAD-16.

4.2.4 Testes de capacidade da resina XAD-16

As duas técnicas descritas no item 3.3.8 para a obtenção da fração aquosa a ser tratada na coluna de XAD-16 (40 mL) diferem, principalmente, quanto a forma de desengorduramento com hexano e na quantidade de material de partida. Na primeira marcha (partida de 1 g), mesmo dividindo a fração aquosa em duas metades, ocorreu perda significativa de pigmentos durante a eluição da primeira metade pela resina, devido a persistência de resíduos de AcOEt na fração aquosa após passagem pelo evaporador rotatório. Concentrando a segunda metade da fração aquosa até que todos os resíduos de AcOEt fossem removidos, a recuperação dos pigmentos eluídos foi quase total.

Com o objetivo de verificar a capacidade máxima da coluna, executou-se marcha semelhante a partir de 2 g de açaí liofilizado. Desta vez, sabendo-se que a etapa de concentração era crítica para a avaliação subsequente, a fração aquosa foi concentrada a uma temperatura ligeiramente mais elevada (40-45°C). Após concentração, a fração aquosa foi aplicada integralmente na resina, atingindo-se uma condição de saturação da fase estacionária. Portanto, os pigmentos excedentes foram eliminados até a etapa de lavagem com H₂O. A massa da fração contendo os pigmentos retidos foi determinada (143 mg) e fez-se uma correlação entre o volume de XAD-16 utilizado e a massa de partida do material liofilizado. Considerando que por marcha semelhante (não descrita), a partir de 1 g de material

liofilizado, foram obtidos 88 mg da fração de pigmentos semi-purificada, a massa de material liofilizado de partida necessária para se obter 143 mg desta fração seria: $143 \text{ mg} \times 1 \text{ g} / 88 \text{ mg} = 1,62 \text{ g}$.

Portanto, por esta técnica, pode-se partir, com segurança, de 1,5 g de material liofilizado para se obter uma quantidade de fração aquosa que seja tratável pela coluna de 40 mL de XAD-16, recuperando-se quase a totalidade dos pigmentos contidos no material de partida. Com base nesta relação, uma coluna maior (2,5 cm de diâmetro x 30 cm de comprimento; aprox. 150 mL) foi construída para o tratamento de frações aquosas obtidas a partir de 5 g de material liofilizado. Na técnica aprimorada, utilizando-se a coluna de 150 mL e partindo-se de 5 g de açaí liofilizado, os pigmentos foram lavados com 200 mL de sol. ATFA 0,1 % e removidos da resina com 150-180 mL de sol. ATFA 0,1 % em $\text{CH}_3\text{CN} / \text{H}_2\text{O}$ (60:40; v/v).

4.3 Ácidos fenólicos

4.3.1 Análise por CCD

A análise por CCD em placas de gel de sílica, descrita no item 3.3.6, permitiu a detecção de duas manchas fluorescentes azuis reveladas com ADPBE a 366 nm ($R_f = 0,79$ e $0,88$). A detecção de manchas azuis neste comprimento de onda indicou a presença de ácidos fenólicos na fração obtida em AcOEt (WAGNER & BLADT, 1996) e sugeriu que uma partida de 100 mg de açaí liofilizado seria suficiente para fornecer quantidades detectáveis destes polifenóis em outras etapas analíticas.

4.3.2 Extração em fase sólida com coluna de celulose

As frações extraídas com AcOEt, obtidas de marchas como a descrita nos itens 3.3.8 e 3.3.9, foram submetidas a EFS numa pequena coluna de celulose microcristalina para a obtenção de frações enriquecidas com ácidos fenólicos e flavonóides. A análise por CLAE da primeira fração (F1-celulose-0712²¹), eluída com sol. AcOH 2 %, mostra a detecção de várias substâncias com absorção na faixa característica de ácidos fenólicos (Fig. 18).

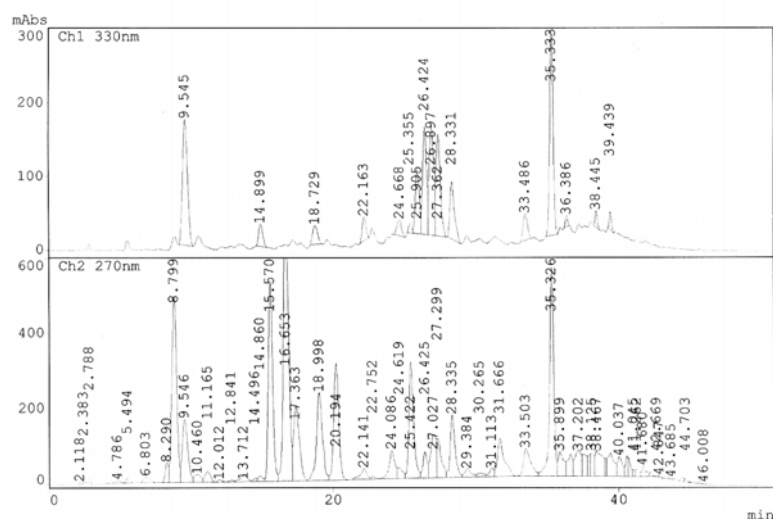


Figura 18: Cromatogramas de F1-celulose-0712 obtidos a 270 e 330 nm. Condições cromatográficas: segundo Sumere *et al.* (1993). Os principais sinais estão indicados com seus respectivos valores de tempo de retenção.

Embora, nesta etapa preliminar, não se tenha feito análises com padrões de ácidos fenólicos, a presença de vários picos com absorção em 270 nm e 330 nm foi indicativa de que a fração eluída com sol. AcOH 2 % estava enriquecida com tais fenólicos, o que estaria em concordância com a técnica descrita por Bloor (2001). Segundo o autor, os flavonóides de uma amostra também contendo ácidos fenólicos ficariam presos na celulose após eluição com AcOH 2 % e poderiam ser removidos posteriormente com um álcool. Então, após tratamento

²¹ Os quatro dígitos que acompanham as designações das frações se referem à data (dia e mês) de partida da marcha correspondente e são utilizados aqui como código de identificação.

da fração ácida (~ 4,5 mg) com diazometano, fez-se a análise dos produtos de reação por CG-EM (Fig. 19).

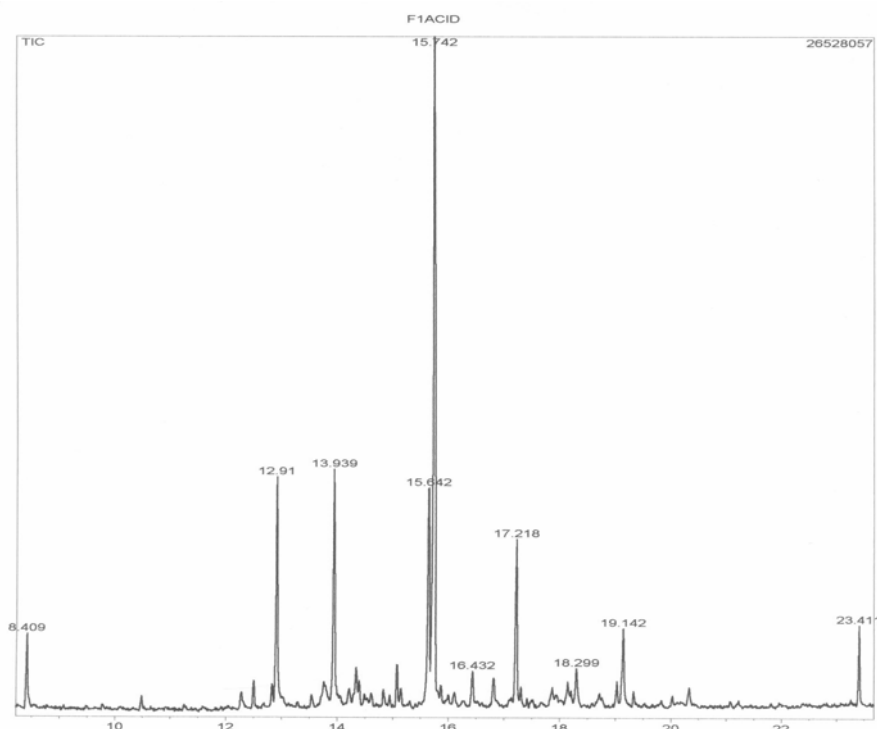


Figura 19: Cromatograma reconstruído da F1-celulose-0712 por CG-EM (CIT²²). Condições cromatográficas: item 3.3.2. Os principais sinais estão indicados com seus respectivos valores de tempo de retenção (min.).

Os espectros de massa gerados a partir dos picos detectados, correspondentes aos derivados de ácidos fenólicos (em sua maioria, ésteres metílicos fenol-metilados), revelaram a presença dos ácidos benzóico e *p*-hidroxi-benzóico por detecção de benzoato de metila e *p*-metoxi-benzoato de metila (figuras 20 e 21), respectivamente. A detecção de 3,4-dimetoxi-benzoato de metila (Fig. 22) sugeriu a presença dos ácidos protocatecuico²³, vanílico²⁴ e/ou verátrico²⁵; a detecção de 3,4,5-trimetoxi-benzoato de metila (Fig. 23) sugeriu a presença dos

²² Contagem de íons totais; também conhecido pela sigla TIC, do inglês: *Total Ion Count*.

²³ Ácido 3,4-diidroxi-benzóico.

²⁴ Ácido 3-metoxi-4-hidroxi-benzóico.

²⁵ Ácido 3,4-dimetoxi-benzóico.

ácidos gálico²⁶ e/ou siríngico²⁷; e a detecção de 3,4-dimetoxi-cinamato de metila²⁸ (Fig. 24) sugeriu a presença dos ácidos caféico²⁹, ferúlico³⁰ e/ou isoferúlico³¹.

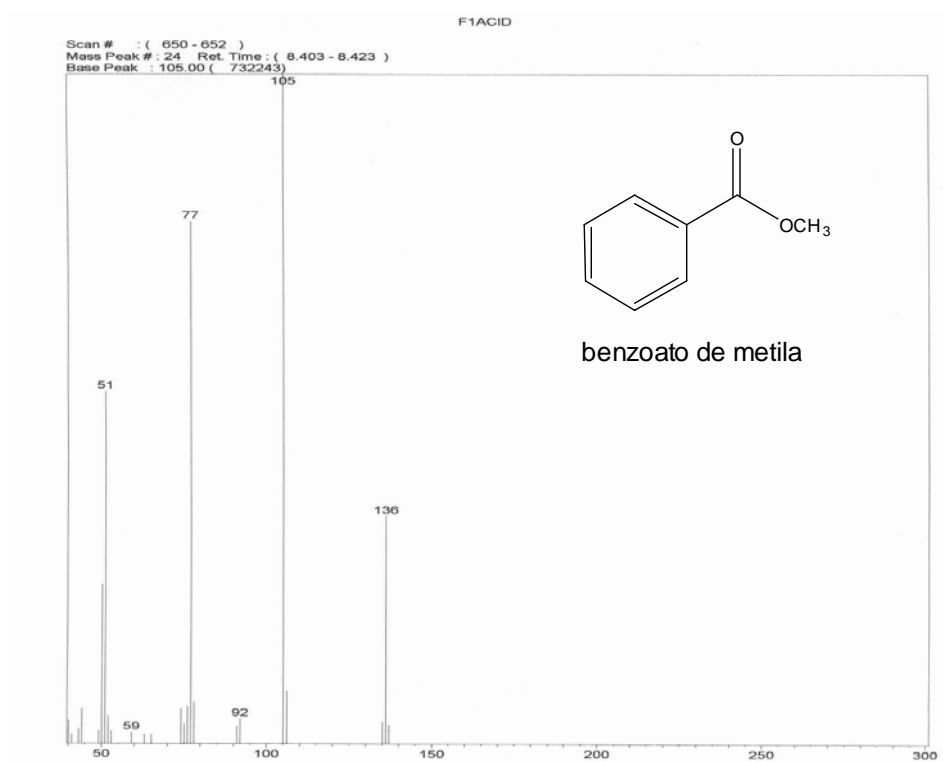


Figura 20: Espectro de massas do pico eluído em 8,4 min. (Fig. 19) obtido por CG-EM e estrutura proposta para o derivado correspondente.

²⁶ Ácido 3,4,5-triidroxi-benzóico.

²⁷ Ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxi-benzóico.

²⁸ Nome mais comum para o 3-(3,4-dimetoxi)-fenil-2(E)-propenoato de metila.

²⁹ Ácido 3,4-diidroxi-cinâmico.

³⁰ Ácido 3-metoxi-4-hidroxi-cinâmico.

³¹ Ácido 3-(3-metoxi-4-hidroxi)-fenil-2(Z)-propenóico.

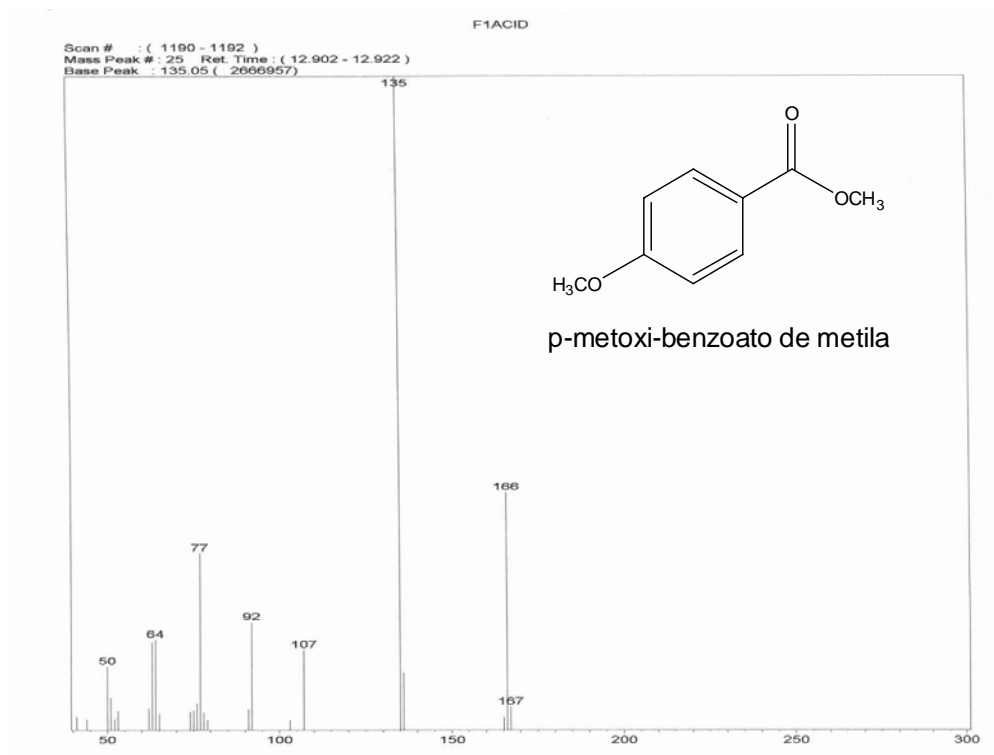


Figura 21: Espectro de massas do pico eluído em 12,9 min. (Fig. 19) obtido por CG-EM e estrutura proposta para o derivado correspondente.

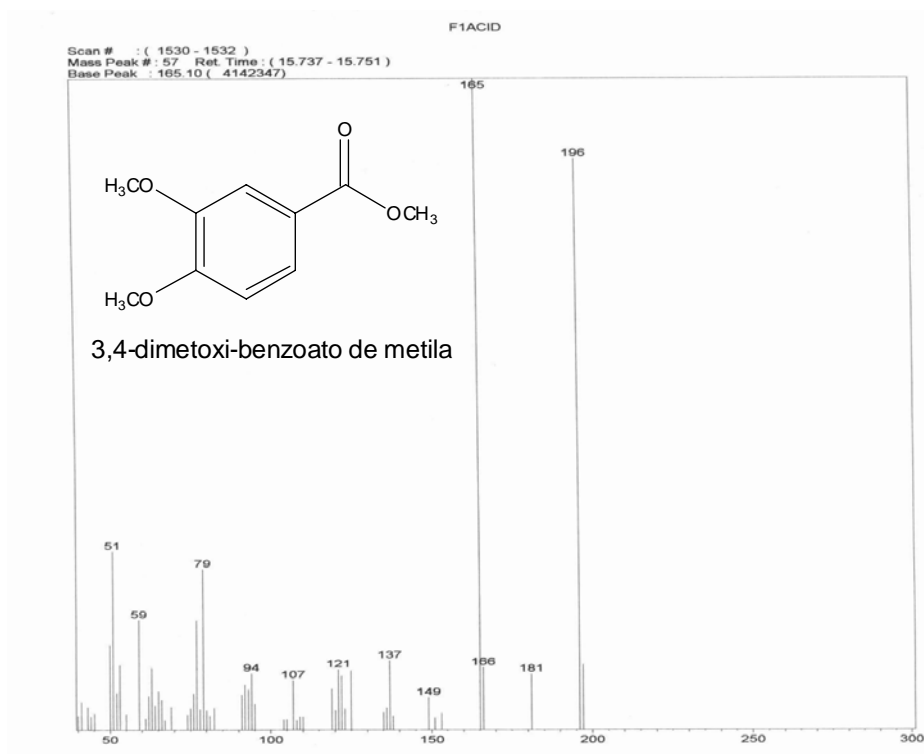


Figura 22: Espectro de massas do pico eluído em 15,7 min. (Fig. 19) obtido por CG-EM e estrutura proposta para o derivado correspondente.

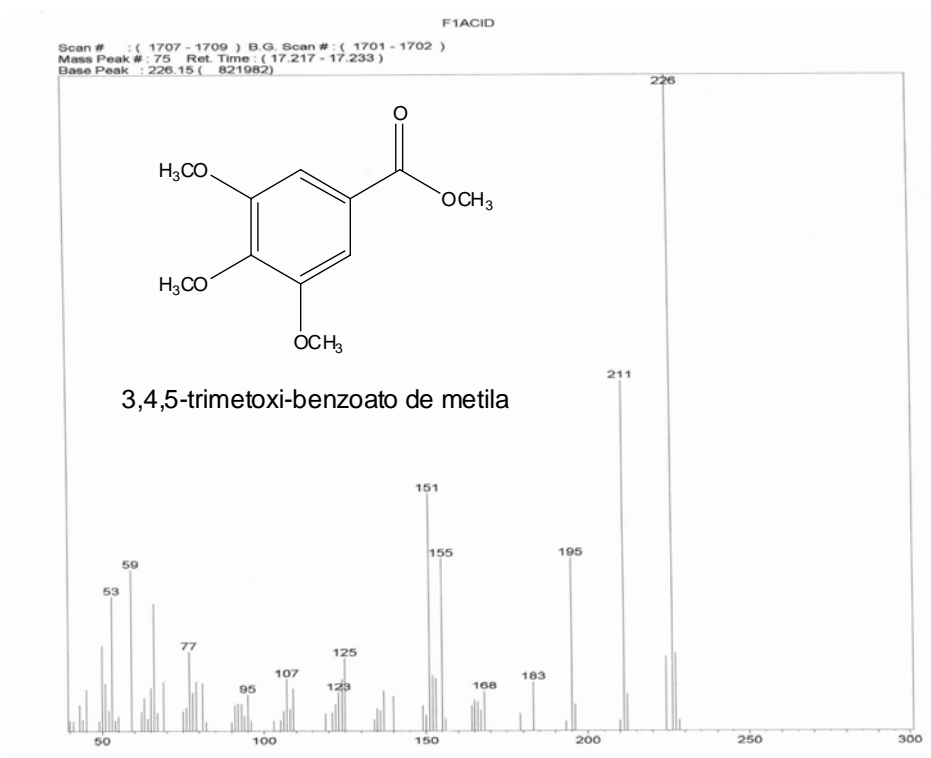


Figura 23: Espectro de massas do pico eluído em 17,2 min. (Fig. 19) obtido por CG-EM e estrutura proposta para o derivado correspondente.

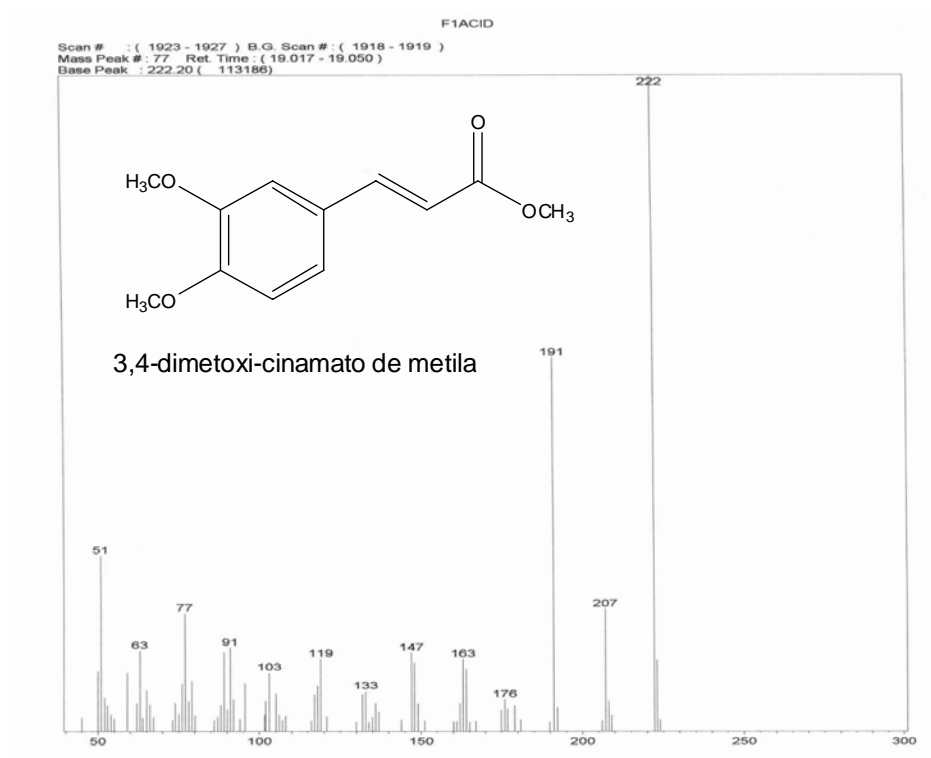


Figura 24: Espectro de massas do pequeno pico eluído em 19,0 min. (Fig. 19) obtido por CG-EM e estrutura proposta para o derivado correspondente.

Todos os espectros obtidos até então (figuras 20 a 24) mostraram índice de similaridade igual ou superior a 90 % quando comparados com os respectivos espectros gravados no banco de dados do próprio aparelho (item 3.2.1) para cada estrutura proposta. Contudo, a elucidação estrutural de um derivado de ácido fenólico atípico, provavelmente o éster metílico do ácido 5-(3,4-dimetoxi)-fenil-pentanóico, exigiu análise minuciosa dos fragmentos detectados em seu respectivo espectro (Fig. 25). Tal derivado pode ter sido gerado a partir do ácido 5-(3-metoxi, 4-hidroxi)-fenil-pentanóico, já detectado em *Eucalyptus globulus* (PASCOAL NETO *et al.*, 1999), o que evidencia a existência de ácidos fenólicos em *E. oleracea* ainda não propostos para a espécie na literatura (Quadro 1). Entre outros ácidos ainda não propostos, inclui-se também o ácido benzóico, demonstrado aqui por detecção de seu respectivo éster metílico (Fig. 20), embora a detecção de seu derivado *p*-hidroxilado já tenha sido citada por outros autores (INSFRAN *et al.*, 2004; PACHECO *et al.*, 2007).

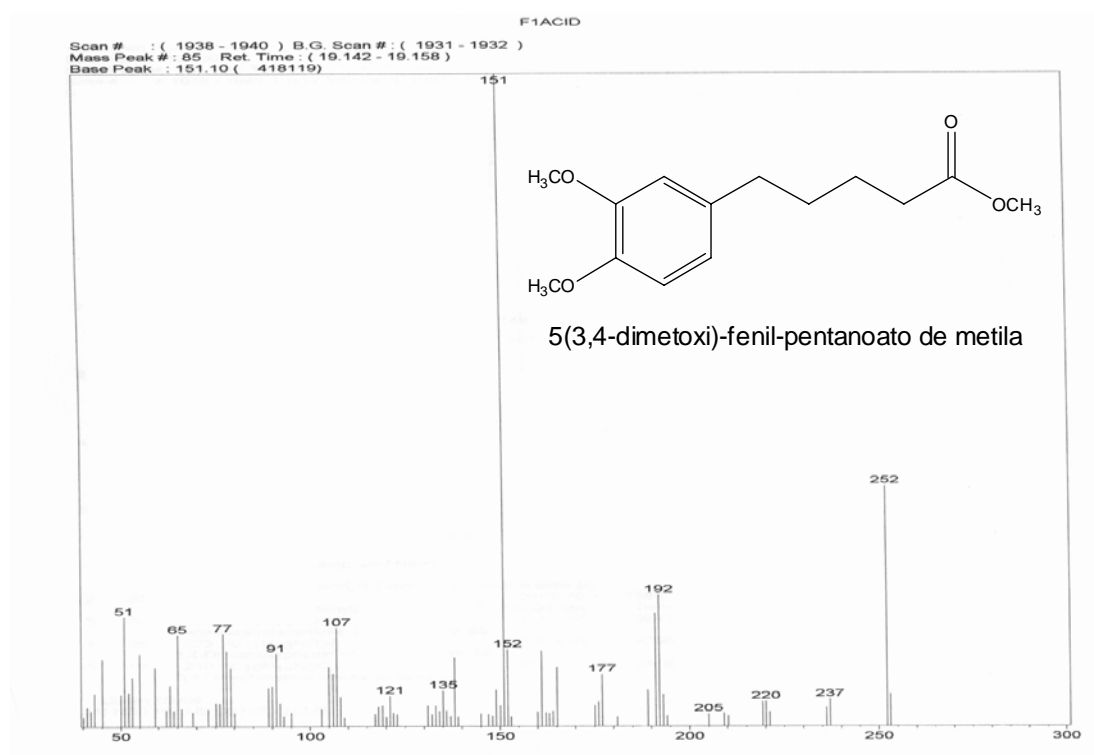


Figura 25: Espectro de massas do pico eluído em 19,1 min. (Fig. 19) obtido por CG-EM e estrutura proposta para o derivado correspondente.

Analisando o espectro de massas da figura 25, é possível notar as perdas de 32 (252-220) e 28 (220-192) unidades de massa, típicas de ésteres metílicos (PRETSCH *et al.*, 1980), gerando um pico relativamente abundante de $m/z = 192$. Embora o fragmento gerado por rearranjo de McLarferty (de $m/z = 74$) não tenha sido detectado, a detecção do fragmento mais estável ($m/z = 151$; pico base), por quebra da ligação C4-C5, e a detecção do pico de $m/z = 152$, com abundância relativa superior a 10 %, sustentam a proposta de um derivado de cadeia saturada e di-substituído no anel aromático (figuras 26 e 27).

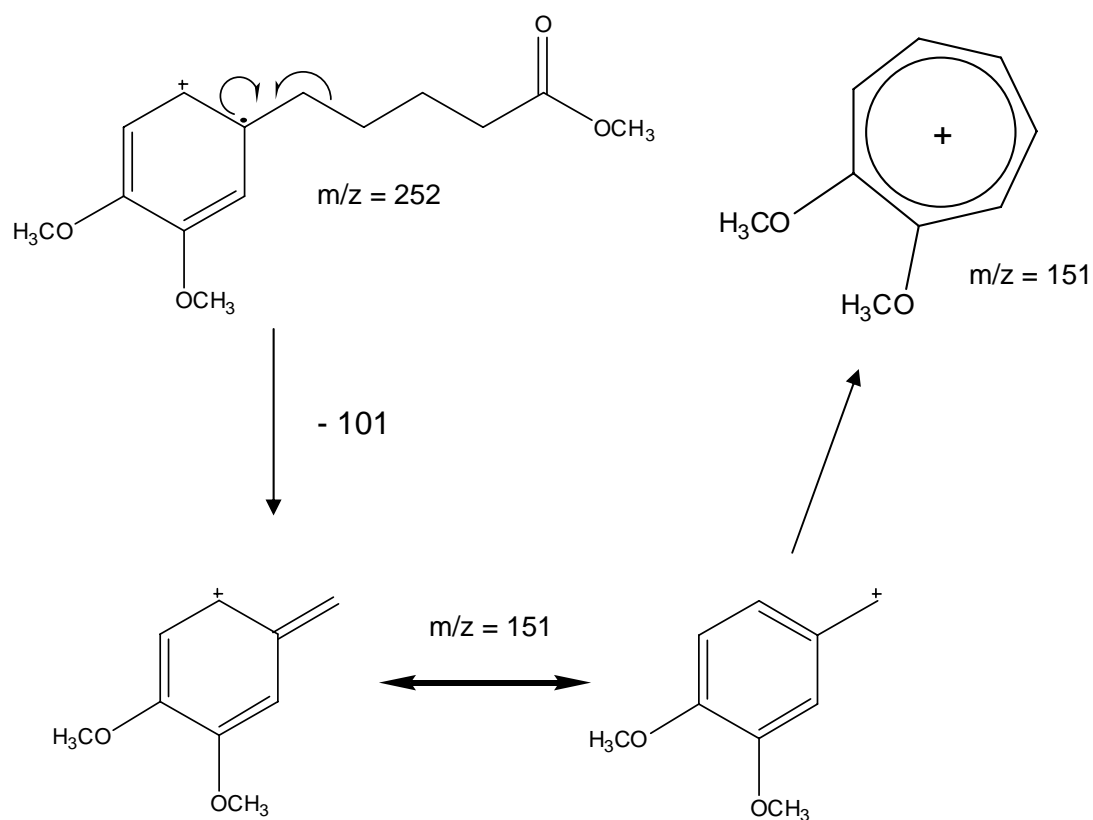


Figura 26: Rota de fragmentação do íon molecular proposto ($m/z = 252$) para gerar o fragmento de $m/z = 151$.

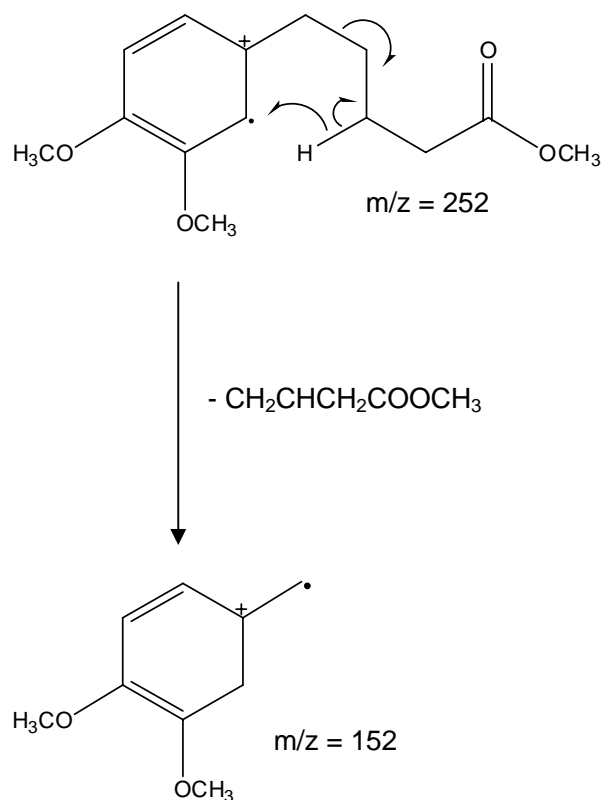


Figura 27: Rota de fragmentação do íon molecular proposto ($m/z = 252$) para gerar o fragmento de $m/z = 152$.

Com o objetivo de se aumentar a detectabilidade da fração metanólica (rica em flavonóides), uma marcha semelhante à descrita no item 3.3.9, com partida de 5 g de material liofilizado, foi realizada e sua primeira fração da coluna de celulose foi denominada F1-celulose-1001. Para esta fração, as análises por CLAE foram realizadas nas condições descritas por Wen *et al.* (2005), utilizando-se alguns padrões de ácidos fenólicos e substâncias correlatas (item 3.1.2) para a devida comparação de seus valores de tempo de retenção e dados espectrais obtidos com o DAD (tab. 1).

Tabela 1: Padrões de fenólicos analisados por CLAE-DAD^a.

Fenólico	Tempo de retenção (min.)	Bandas de absorção máxima no U.V. (nm)
Ácido gálico	6,3-6,7	211, 270
Ácido protocatecuico	12,4-12,7	217, 259, 292
Ácido <i>p</i> -hidroxi-benzóico	19,1	254
Ácido clorogênico	20,3-20,7	217, 241, 294 <i>sh</i> , 327
Ácido siríngico	20,9	211, 274
Ácido vanílico	20,9-21,0	217, 259, 291
Epicatequina	21,5	227 <i>sh</i> , 278
Catequina	21,7	230 <i>sh</i> , 278
Ácido caféico	22,4-23,0	217, 235, 292 <i>sh</i> , 324
Ácido verátrico	25,1-25,5	217, 259, 290
Ácido ferúlico	27,0	217, 234, 293 <i>sh</i> , 322
Ácido <i>p</i> -cumárico	27,6-27,8	226, 308
Ácido elágico	30,1	253, 368
Ácido cinâmico ^b	30,4	275

^a segundo as condições descritas por Wen *et al.* (2005).

^b ácido cinâmico não possui hidroxila fenólica e, portanto, não é classificado como um composto fenólico.
sh: *shoulder* (ombro ou banda semi-sobreposta à outra maior).

Ao contrário do que se esperava, o cromatograma obtido da F1-celulose-1001 (Fig. 28) continha um número de picos menor que o obtido para as frações equivalentes das marchas anteriores (como F1-celulose-0712), o que facilitou a identificação de alguns picos. Ácido gálico, ácido vanílico e ácido verátrico (Fig. 29) foram identificados facilmente por comparação dos respectivos valores de tempo de retenção e espectros obtidos no UV, sendo este o primeiro relato a citar a detecção de ácido verátrico em *E. oleracea* (Quadro 1). Entretanto, vários outros picos não foram identificados. Entre os principais, os picos 2 e 3, aparentemente pertencentes a uma mesma classe de moléculas, e o pico 7, com bandas no UV (217, 260 e 290 nm) muito semelhantes às dos espectros dos derivados de ácido benzóico 3,4-di-substituídos (Fig. 28 e tab. 1).

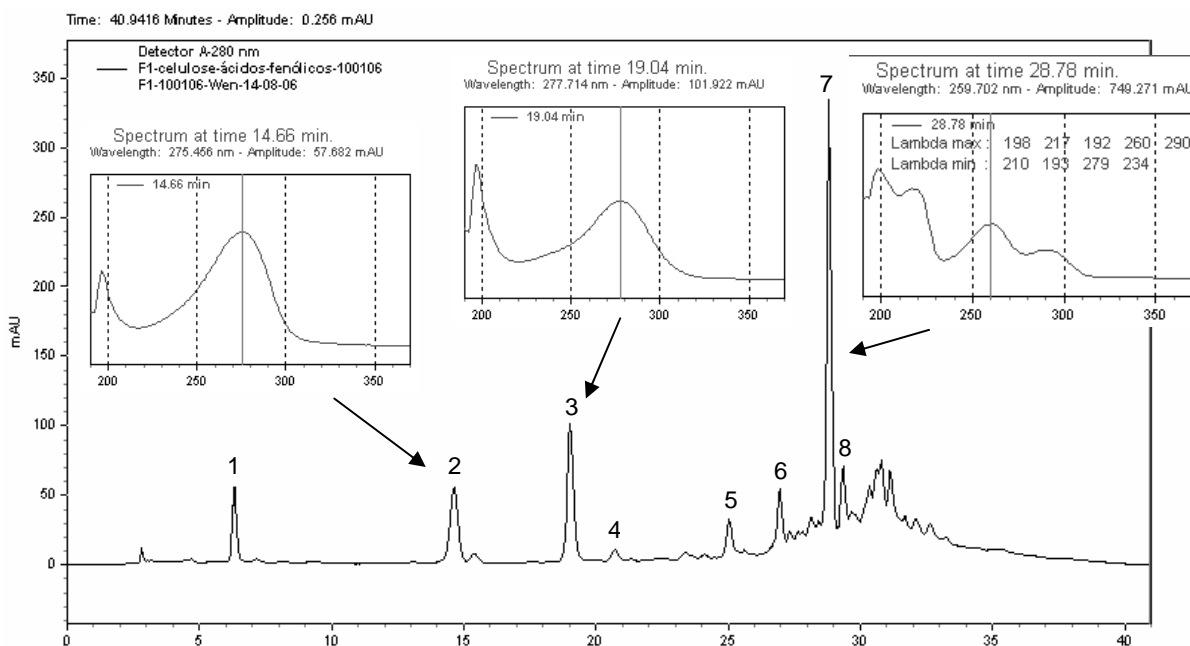


Figura 28: Cromatograma da F1-celulose-1001 obtido por CLAE-DAD a 280 nm. Condições cromatográficas: segundo Wen *et al.* (2005). Sinais identificados: Ácido gálico (1), ácido vanílico (4) e ácido verátrico (5). Os principais sinais não identificados estão indicados com seus respectivos espectros obtidos no UV.

Já que os ácidos benzóicos 3,4-di-substituídos (protocatecuico, vanílico e verátrico), nestas condições, eluem em ordem decrescente de polaridade (tab. 1), poderia-se especular que o pico 7 seria um alquil éster de um destes ácidos ou, então, o precursor do éster detectado por CG-EM da F1-celulose-0712 (Fig. 25). Entretanto, o ácido precursor do derivado 5-(3,4-dimetoxi)-fenil-pentanoato de metila não apresentaria uma banda primária em 260 nm, correspondente à transição $\pi \rightarrow \pi^*$ na carbonila do grupo ácido, típica de derivados do ácido benzóico.

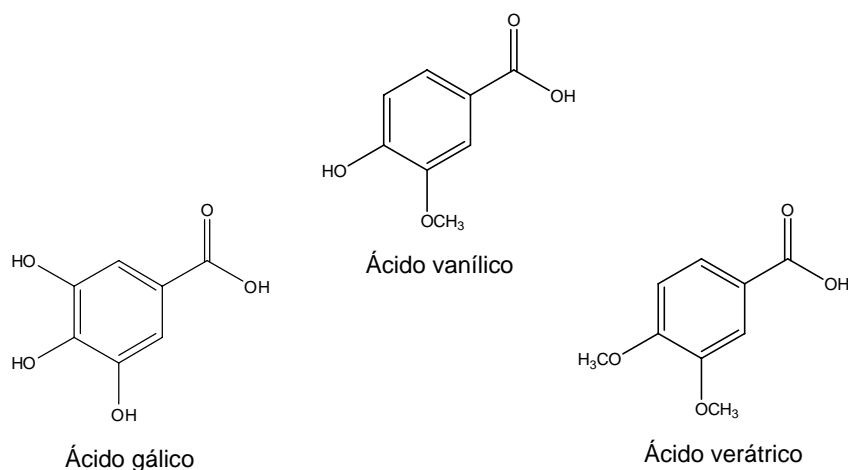


Figura 29: Estruturas dos ácidos gálico, vanílico e verátrico.

Assim como o resultado obtido por CLAE-DAD, a análise da F1-celulose-1001 por CG-EM revelou um número também menor de substâncias detectadas (Fig. 30). Benzoato de metila, 3,4-dimetoxi-cinamato de metila e outras substâncias não identificadas não foram detectados, confirmando a não detecção de seus respectivos ácidos no cromatograma obtido por CLAE-DAD (Fig. 28). Segundo a biblioteca de espectros do aparelho, o pico em 3,8 min. tem um índice de similaridade de 94 % para dimetil-sulfóxido e o pico em 6,3 min. seria, provavelmente, um alcalóide de estrutura não elucidada, também detectado em F1-celulose-0712 (pico não mostrado). Outro sinal novamente detectado foi o pico eluído em 19,1 min. (PM = 252 u.m.a.), reforçando a idéia contraditória de que este possa ser o derivado correspondente ao pico 7 do cromatograma obtido por CLAE-DAD (Fig. 28).

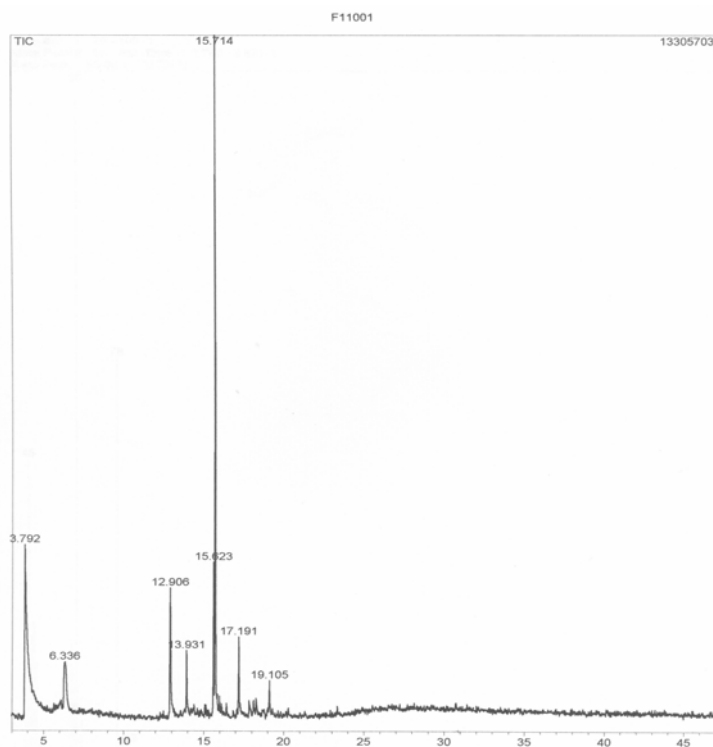


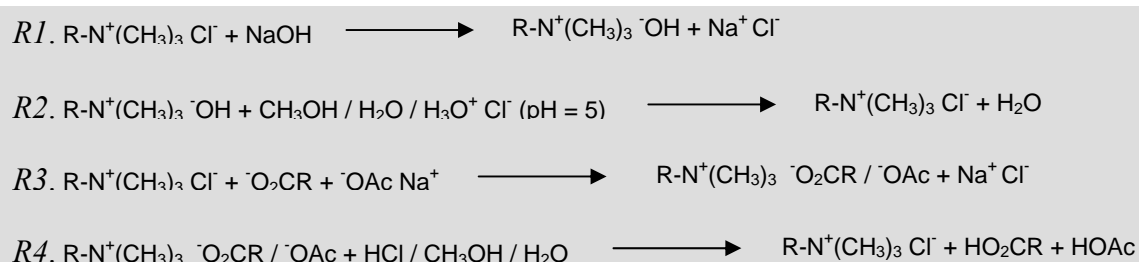
Figura 30: Cromatograma reconstruído da F1-celulose-1001 por CG-EM (CIT). Condições cromatográficas: item 3.3.2. Os principais sinais estão indicados com seus respectivos valores de tempo de retenção (min.).

As diferenças observadas entre os resultados obtidos com F1-celulose-0712 e F1-celulose-1001 podem ser atribuídas à falta de padronização dos procedimentos realizados durante a marcha 1001, não descrita na seção 3 (Material e Métodos) pelo mesmo motivo, ou ainda a algum problema com a coluna de celulose, a qual já havia sido reutilizada em três análises consecutivas. Por outro lado, embora o estado de conservação da coluna durante a marcha 0712 fosse melhor, a detecção de substâncias contaminantes em F1-celulose-0712 foi maior. Substâncias de carácter lipossolúvel considerável, entre elas um carotenóide (16,4 min.) e até mesmo uma cera (23,4 min), puderam ser detectadas nesta fração ácida (Fig. 19). Além disso, a carga de material lipossolúvel eluído nas frações da celulose era, muitas vezes, visivelmente expressiva, indicando que a etapa de desengorduramento por partição do extrato aquoso com hexano não havia sido eficiente. Portanto, após algumas tentativas frustradas de

se repetir os resultados obtidos pela marcha 0712³² com partidas de 5 g de material liofilizado, utilizando a mesma coluna de celulose, todos os ensaios passaram a ser iniciados com extração dos lipossolúveis em aparelho de Soxhlet, ainda com hexano. Entretanto, no primeiro ensaio realizado com aparelho de Soxhlet, ainda se utilizou a mesma coluna de celulose e não obteve-se resultados satisfatórios.

4.3.3 Extração em fase sólida com RTIFB

A técnica utilizada para a obtenção da fração submetida à EFS com a RTIFB foi descrita no item 3.3.10. Antes de seu uso, a resina foi tratada com 7,5 mmols de NaOH, suficientes para preencher todos os sítios positivos da resina com hidroxilas (esq. 9; R1). Em seguida, foi necessário um volume bastante elevado (70 mL) de sol. MeOH / H₂O (1:1) para neutralizar a resina, ou seja, remover a base forte (OH⁻) e recolocar uma base fraca (provavelmente Cl⁻, já que a água purificada utilizada tem pH = 5 e este deve ser o contra-íon presente) (esq. 9; R2).



Esquema 9: Reações com a resina trocadora de íons fortemente básica. R-N⁺(CH₃)₃: sítio de ligação da RTIFB; HO₂CR / ⁻O₂CR: ácido fenólico e base conjugada; HOAc / ⁻OAc: ácido acético e base conjugada.

Como a fração ácida foi diluída em sol. AcONa 500 mM (pH = 8), todos os seus constituintes ácidos foram ionizados, inclusive os ácidos fenólicos, cujo pK_a³³ da função

³² Três marchas semelhantes, com resultados equivalentes, foram representadas aqui com a designação 0712.

³³ Logaritmo do inverso da constante de ionização ácida.

ácida varia em torno de 4,5 (FIAMEGOS *et al.*, 2004; DOVBII *et al.*, 2006). Nestas condições, durante a eluição desta fração amostra, os ácidos fenólicos ionizados (bases conjugadas relativamente fortes) substituíram os íons Cl⁻ (bases fracas) nos sítios positivos da resina (esq. 9; R3). Esta interação seria forte o suficiente para resistir a lavagem com a sol. MeOH / H₂O (1:1), a qual carrearia todos os interferentes não ionizáveis (como os flavonóides) e as bases conjugadas fracas (de ácidos fortes, como o ATFA) solúveis em tal solução. A análise por CLAE-DAD da fração eluída com a sol. HCl P.A. (1:20; v/v) em MeOH / H₂O (1:1) (F2-RTIFB-1104) revelou a detecção de quatro substâncias em altíssimas proporções (Fig. 31). Como os valores de tempo de retenção obtidos nas condições descritas por Wen *et al.* (2004) apresentaram-se significativamente deslocados para a esquerda (em 0,5-2 min.) (Fig. 31 e tab. 1), a identificação inequívoca dos ácidos siríngico, *p*-cumárico e cinâmico requereu nova análise da F2-RTIFB-1104 por CLAE-DAD, utilizando as condições descritas por Sumere *et al.* (1993) (Fig. 31, *insert a*).

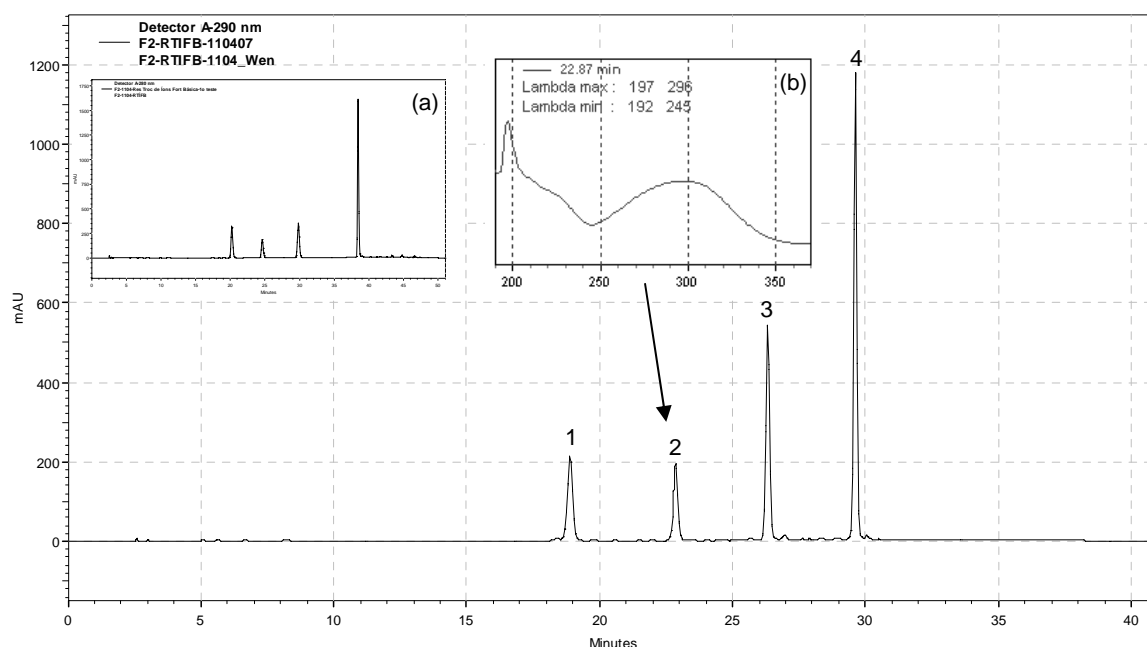


Figura 31: Cromatograma de F2-RTIFB-1104 obtido por CLAE-DAD com detecção a 280 nm. Condições cromatográficas: segundo Wen *et al.* (2004). Sinais: ácido siríngico (1), ácido 3-(4-hidroxi)-fenil-2(Z)-propenóico (2), ácido *p*-cumárico (3) e ácido cinâmico (4). *Insert a*: cromatograma de F2-RTIFB-1104 obtido nas condições descritas por Sumere *et al.* (1993). *Insert b*: espectro do pico 2 obtido no UV.

Os desvios nos valores de tempo de retenção ocorridos na primeira análise foram gerados por problemas técnicos com o cromatógrafo. Portanto, puderam ser verificados novamente na segunda condição, o que exigiu a injeção subsequente de uma mistura de padrões dos respectivos ácidos fenólicos propostos. Após a confirmação das identidades dos picos 1, 3 e 4, restava identificar o pico 2, cujo espectro no UV mostra uma banda relativamente larga, com máximo de absorção próximo aos 300 nm (Fig. 31, *insert b*). Considerando que uma banda larga neste comprimento de onda possa corresponder à sobreposição de duas bandas secundárias, geradas por transições do tipo $n \rightarrow \pi^*$, como ocorre no espectro do ácido *p*-cumárico (Fig. 32), o pico 2 poderia ser identificado como o isômero “*cis*” deste, o ácido 3-(4-hidroxi)-fenil-2(*Z*)-propenóico (Fig. 33), o qual já havia sido detectado, com o mesmo tempo de retenção, como um contaminante em cromatogramas obtidos com o padrão de ácido *p*-cumárico.

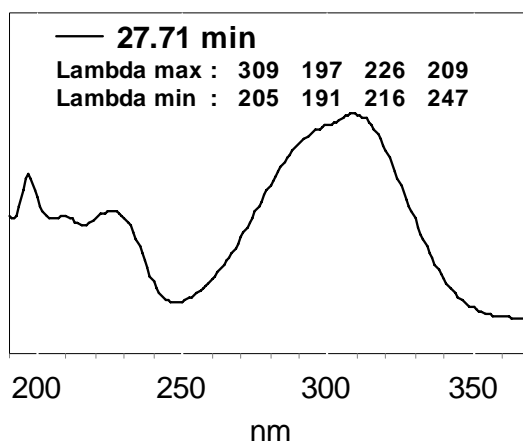


Figura 32: espectro do ácido *p*-cumárico obtido no UV.

O espectro de UV do ácido *p*-cumárico mostra intensidade máxima de absorção em 309 nm, correspondente à transição $n \rightarrow \pi^*$ na hidroxila fenólica, cuja banda se sobrepõe à banda secundária (de mesmo tipo de transição) referente à carboxila (entre 290 e 300 nm), a qual é vista como um “ombro” da banda maior (KURKIN, 2003). Provavelmente, a

disposição “*cis*” do isômero *Z* deve apresentar um desvio de planaridade que dificultaria a conjugação completa do sistema π da molécula, a qual, portanto, geraria uma banda secundária ligeiramente menos deslocada para a direita do espectro de UV. Este efeito seria consequência de uma interação estérica intramolecular entre os átomos mais extremos da carboxila e os hidrogênios aromáticos em posição *orto*.

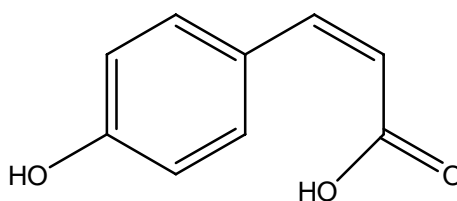


Figura 33: Estrutura do ácido 3-(4-hidroxi)-fenil-2(*Z*)-propenóico.

Após análise por CLAE-DAD, a F2-RTIFB-1104 foi concentrada e liofilizada. O procedimento mais indicado para uma amostra a ser metilada com diazometano seria a extração direta com um solvente orgânico (no caso, AcOEt) e concentração subsequente, como descrito no item 3.3.15. Entretanto, a massa da fração liofilizada excedeu 50 mg e os 2 mg de material destinados à reação com diazometano não se mostraram solúveis em qualquer solvente orgânico (somente em água) nem geraram produtos detectáveis por CG-EM após a reação, provavelmente devido à alta concentração de resíduos de ácido forte (HCl) na fração liofilizada. Diante disso, adicionou-se BTBA, um catalizador de transferência de fase, e tampão Na_2HPO_4 / HCl 50 mM (pH = 7) ao meio reacional, obtendo-se apenas os ésteres metílicos e butílicos do ácido *p*-hidroxi-benzóico e de seu derivado *p*-metoxilado (figuras 34-37), o que indicou somente a presença do ácido *p*-hidroxi-benzóico, um produto de decomposição de ácidos cinâmicos em meio fortemente ácido, segundo Gao e Mazza (1994). Entretanto, o baixo rendimento em ésteres metílicos e a alta proporção de derivados *p*-hidroxilados (cromatograma não mostrado) evidenciaram ainda a baixa eficiência da reação com diazometano nestas condições.

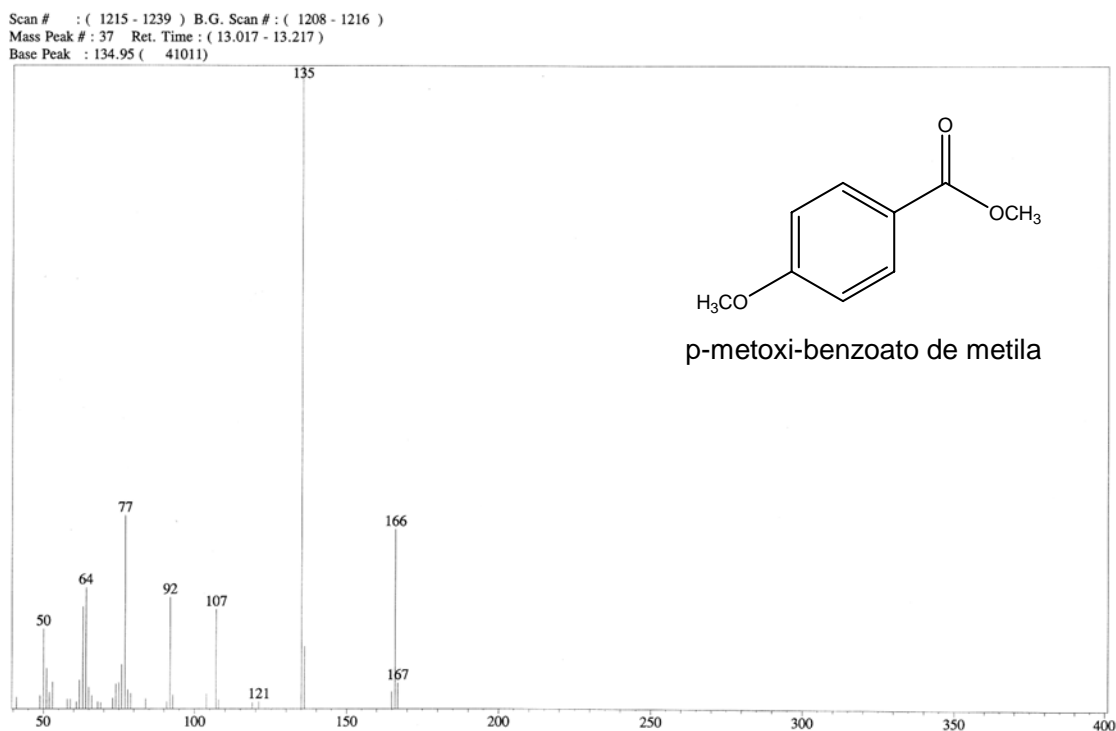


Figura 34: Espectro de massas do éster metílico do ácido *p*-metoxi-benzóico obtido por CG-EM dos produtos de reação da F2-RTIFB-1104 com diazometano e BTBA.

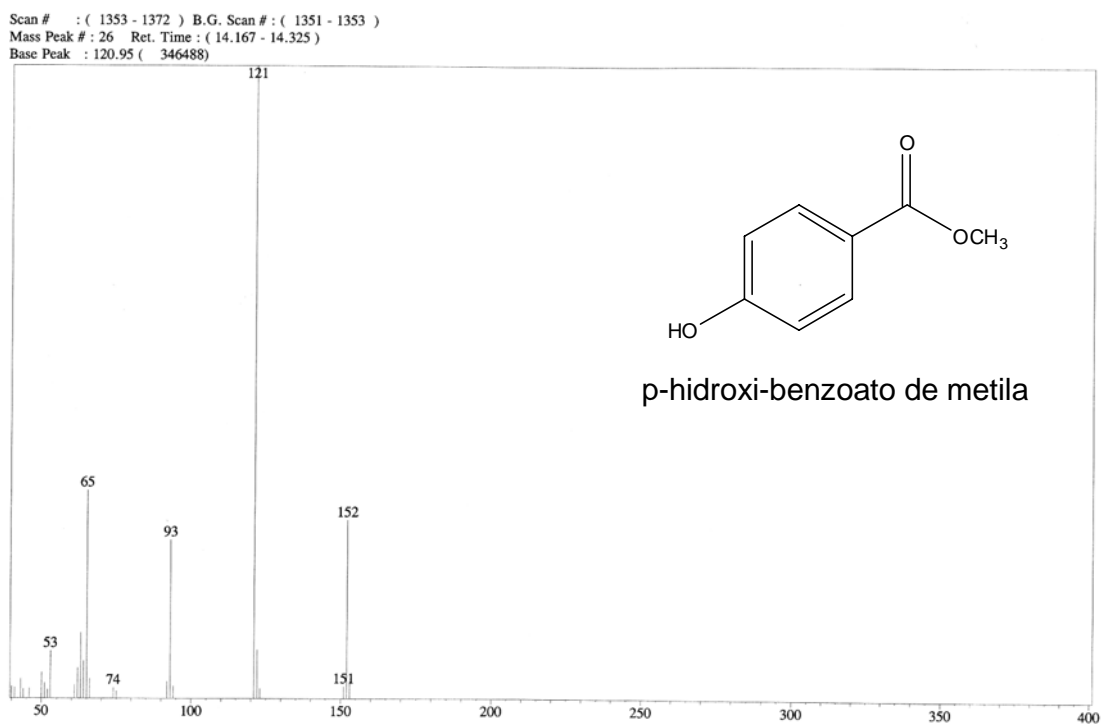


Figura 35: Espectro de massas do éster metílico do ácido *p*-hidroxi-benzóico obtido por CG-EM dos produtos de reação da F2-RTIFB-1104 com diazometano e BTBA.

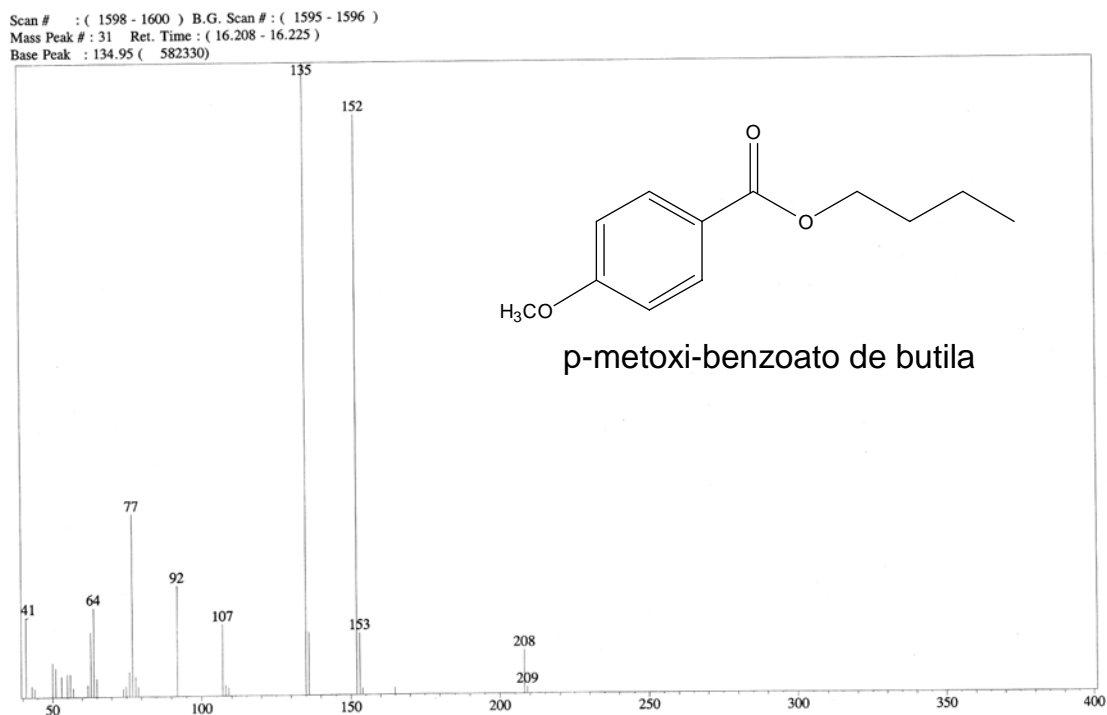


Figura 36: Espectro de massas do éster butílico do ácido *p*-metoxi-benzóico obtido por CG-EM dos produtos de reação da F2-RTIFB-1104 com diazometano e BTBA.

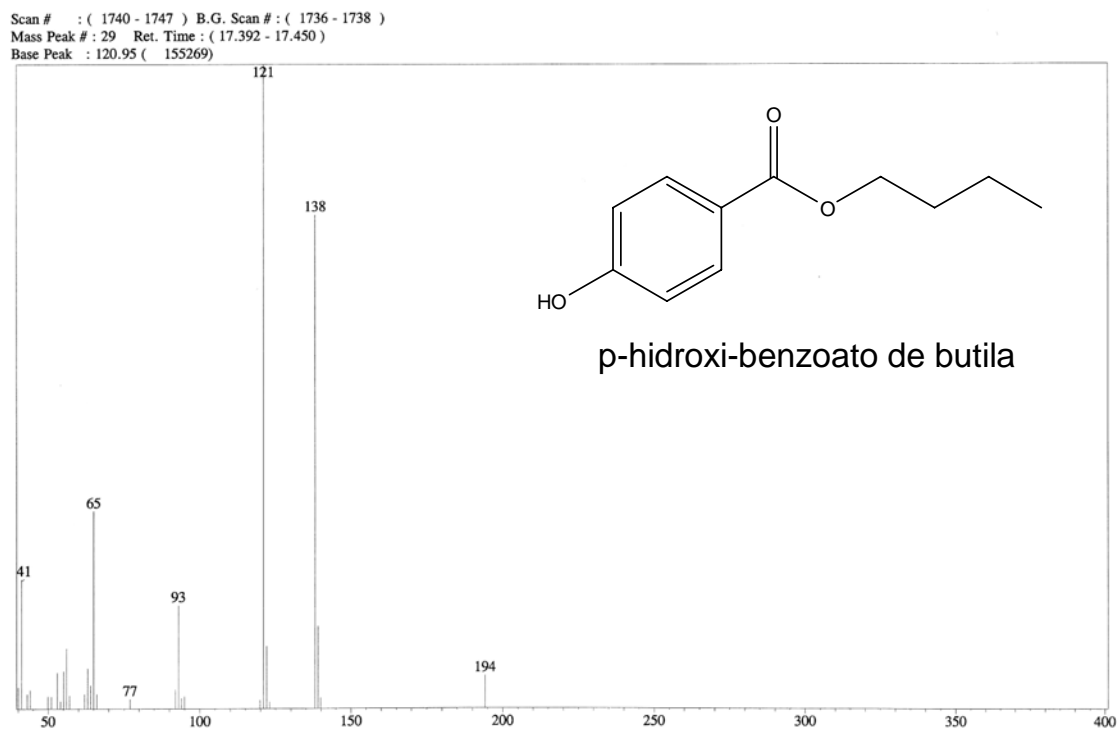


Figura 37: Espectro de massas do éster butílico do ácido *p*-hidroxi-benzóico obtido por CG-EM dos produtos de reação da F2-RTIFB-1104 com diazometano e BTBA.

Embora pareça evidente que a grande massa de material recuperado da RTIFB se deva a contaminantes polares advindos da própria resina, devido provavelmente ao tratamento com NaOH ou MeOH, uma pequena alíquota de 2 mg da F2-RTIFB-1104 liofilizada foi submetida ainda à esterificação com metanol anidro acidificado. Os produtos da reação foram analisados por CG, detectando-se vários picos de muito baixa intensidade (Fig. 38), entre eles dois picos com o mesmo tempo de retenção que os ésteres metílicos obtidos por reação com padrões de ácido cinâmico e ácido siríngico, também detectados pela primeira vez em *E. oleracea*. A não detecção de derivados do ácido *p*-cumárico sugere que este (assim como o seu isômero *Z*) tenha sido degradado prontamente a ácido *p*-hidroxi-benzóico durante as etapas de concentração da fração ácida, embora o éster metílico deste último quase não tenha sido detectado (Fig. 38; seta em 10,8 min.). Este resultado confirma a baixa proporção de substratos para a reação de esterificação nos 2 mg da F2-RTIFB-1104 liofilizada.

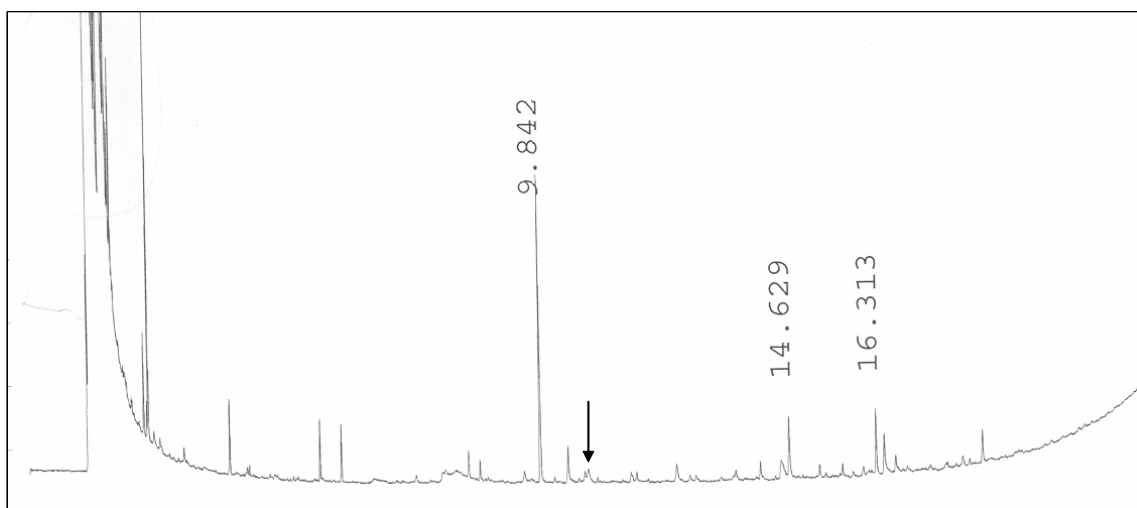


Figura 38: Cromatograma de F2-RTIFB-1104 obtido por CG. Condições cromatográficas: item 3.3.2. Sinais identificados: cinamato de metila (9,8 min.), *p*-hidroxi-benzoato de metila (seta) e 3,5-dimetoxi-4-hidroxi-benzoato de metila (14,6 min.).

4.3.4 Extração em fase sólida com SAX

Um ensaio preliminar com o cartucho SAX foi descrito no item 3.3.10. Nele, a fração obtida em AcOEt, após ser concentrada até a secura, foi suspensa em um total de 1,8 mL de sol. AcONa 50 mM mais 0,2 mL de MeOH. A adição de MeOH tinha como objetivo a dissolução total dos constituintes da fração, embora o solvente pudesse causar uma perda da capacidade de troca da resina, segundo o manual do fabricante. Ainda segundo o mesmo manual, o condicionamento da resina e as etapas de lavagem poderiam ser feitos com água desionizada ou com um tampão de baixa força iônica. Então, após o condicionamento da resina com H₂O, a suspensão amostra³⁴ foi aplicada e a fração coletada durante a eluição desta foi denominada F0-SAX-1707, a qual conteria as substâncias sem qualquer afinidade pela resina. A fração coletada durante a etapa de lavagem com H₂O foi denominada F1-SAX-1707; a parte final desta fração, próxima à interface com a solução seguinte, foi recolhida em frasco separado e denominada F2-SAX-1707; e a fração recolhida com a sol. H₂SO₄ 500 mM foi denominada F3-SAX-1707. Os cromatogramas obtidos das análises destas frações por CLAE-DAD (Fig. 39) revelaram que a maior parte das substâncias detectadas foi recuperada em F1, eluída com H₂O, e em F3, onde se esperava recuperar todos os ácidos fenólicos.

³⁴ Mesmo após a adição dos 0,2 mL de metanol, a fração obtida em AcOEt não foi solubilizada completamente.

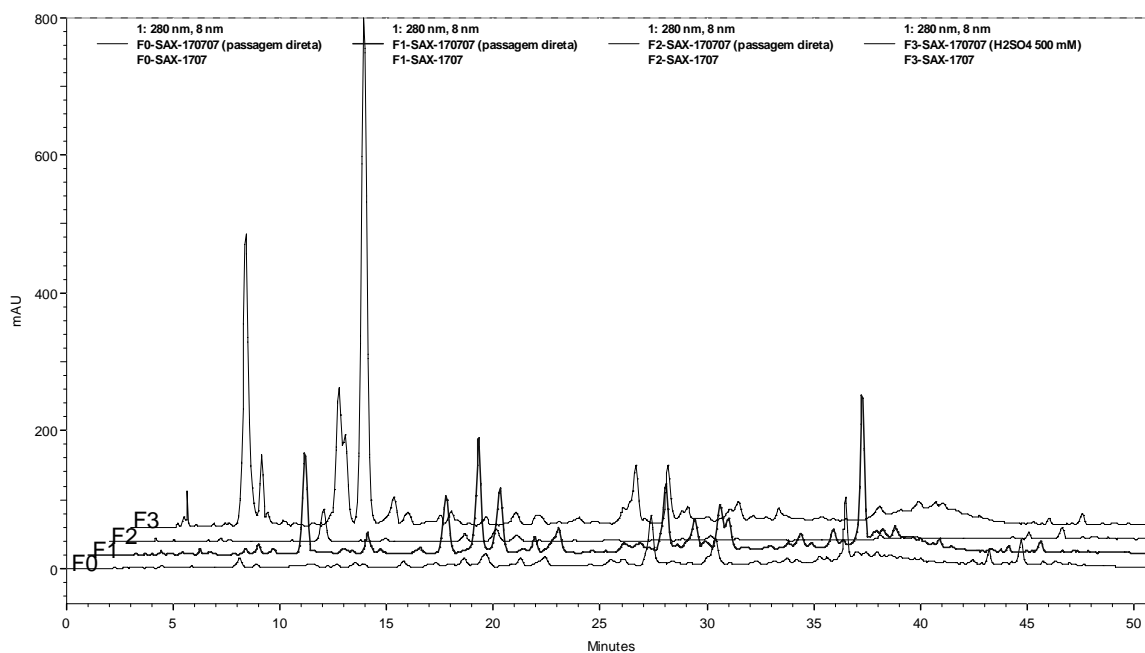


Figura 39: Cromatogramas sobrepostos das frações F0 a F3-SAX-1707 a 280 nm. Condições cromatográficas: conforme descrito por Sumere *et al.* (1993).

A detecção de vários picos intensos com características espectrais compatíveis com ácidos fenólicos em F1-SAX-1707 sugeriu duas possibilidades. Na primeira hipótese, as substâncias recuperadas em F1 poderiam ser ácidos fenólicos glicosilados do tipo éster, os quais, por não serem ionizáveis, seriam removidos durante a etapa de lavagem do cartucho SAX com H₂O. Glicosídeos de ácidos fenólicos do tipo éter, embora relativamente polares, não seriam removidos com água, porque seriam também ionizáveis nas condições descritas para este ensaio. Na segunda hipótese, as condições propostas para a EFS não estariam ainda adequadas para a SAX. Então, com o objetivo de se verificar a primeira hipótese, fez-se a hidrólise ácida da F1-SAX-1707, segundo o procedimento descrito no item 3.3.17. Entretanto, após comparação dos cromatogramas obtidos antes (Fig.40) e após (Fig. 41) a hidrólise ácida da F1-SAX-1707, verificou-se que a maioria dos sinais permaneceu inalterada.

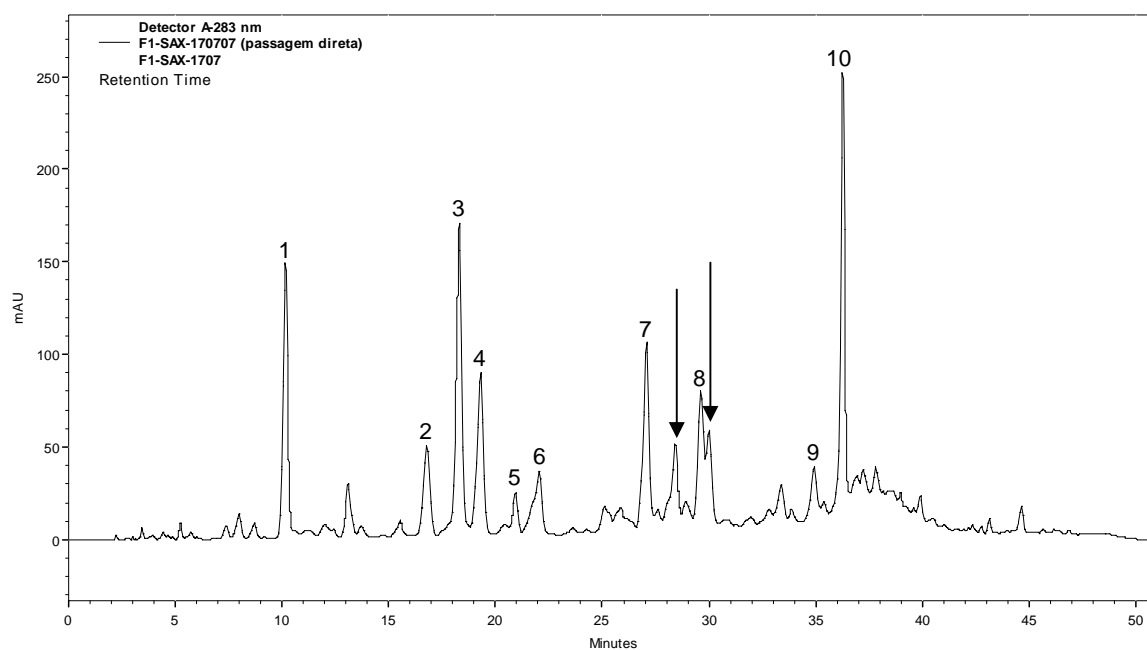


Figura 40: Cromatograma da F1-SAX-1707 a 280 nm. Condições cromatográficas: conforme descrito por Sumere *et al.* (1993). Sinais identificados: ácido protocatecuico (1), ácido *p*-hidroxi-benzóico (2), ácido vanílico (3) e ácido siríngico (4).

Quatro ácidos fenólicos puderam ser identificados antes e após a reação de hidrólise e vários picos, incluindo o de maior intensidade ($\lambda_{\text{máx.}} = 290 \text{ nm}$), não puderam ser identificados, entre os quais também o único produto evidente gerado pela reação (Fig. 41; pico 11). Este corresponderia a uma aglicona gerada, provavelmente, a partir de um dos dois prováveis substratos (ou de ambos) consumidos pela reação, os picos eluídos em 28,3 e 29,9 min. (Fig. 40; setas).

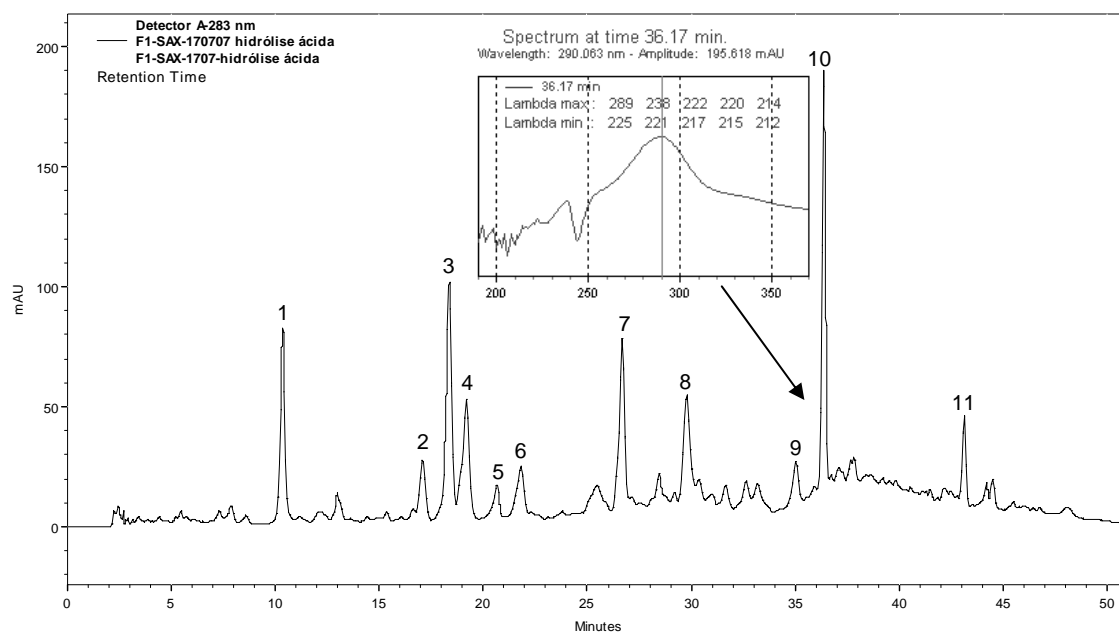


Figura 41: Cromatograma da F1-SAX-1707 a 280 nm após hidrólise ácida. Condições cromatográficas: conforme descrito por Sumere *et al.* (1993). Sinais identificados: ácido protocatecuico (1), ácido *p*-hidroxi-benzóico (2), ácido vanílico (3) e ácido siríngico (4).

Diante deste resultado, tornou-se evidente que a primeira hipótese poderia ser descartada, já que a maior parte das substâncias presentes em F1-SAX-1707 não correspondia a ácidos fenólicos glicosilados. Além disso, como a maioria das substâncias com tempo de retenção maior que 15 min. eluíram nesta fração, a não detecção de ácido gálico após hidrólise sugeriu a inexistência de derivados hidrolisáveis deste ácido em toda a fração obtida em AcOEt, contrariando os resultados obtidos por outros autores (INSFRAN *et al.*, 2004; PACHECO *et al.*, 2007). Por outro lado, a maior parte das substâncias eluídas em F3-SAX-1707 (Fig. 39) tiveram tempo de retenção inferior a 15 min., mostrando que as bases conjugadas dos ácidos mais polares foram retidas preferencialmente na resina durante o tratamento com H₂O nas condições descritas para este ensaio. Isto poderia sugerir que apenas os ácidos mais fortes (de pKa mais baixo) não estariam sendo removidos pelo tratamento com água purificada, cujo pH varia entre 5 e 6. Entre os picos detectados no cromatograma obtido por CLAE-DAD da F3-SAX-1707, apenas dois ácidos fenólicos puderam ser identificados por comparação de seus respectivos valores de tempo de retenção e espectros obtidos no UV

(Fig. 42). O pico de maior intensidade no cromatograma mostrou um espectro no UV com um perfil de bandas (284 e 309 nm) muito semelhante aos dos picos 2 (283 e 311 nm) e 7 (293 e 317 nm), sugerindo que estes três picos correspondam a um grupo de substâncias correlatas. Entre outros sinais não identificados, detectou-se também o pico 3 (9,7 min. e $\lambda_{\text{máx.}} = 287$ nm) e um pico eluído em 9,4 min. ($\lambda_{\text{máx.}} = 252$ nm) sem bandas em comprimentos de onda acima do $\lambda_{\text{máx}}$ e, por isso, não aparente no cromatograma obtido a 280 nm.

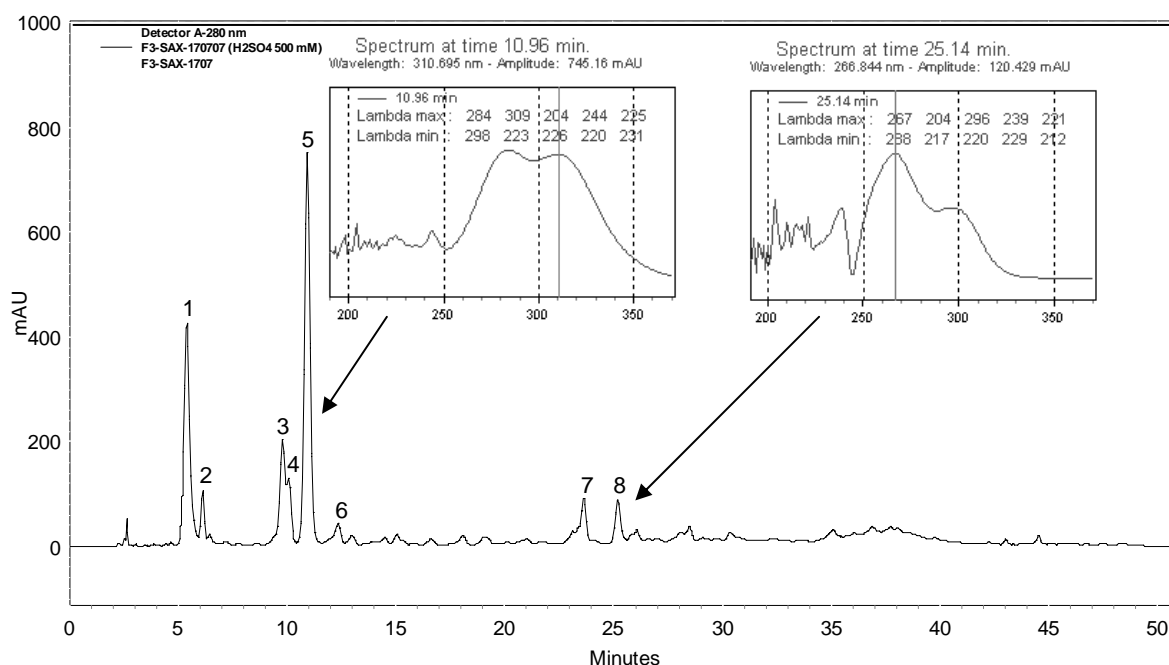


Figura 42: Cromatograma obtido por CLAE-DAD da F3-SAX-1707 a 280 nm. Condições cromatográficas: conforme descrito por Sumere *et al.* (1993). Sinais identificados: ácido gálico (1) e ácido protocatecuico (4).

A análise por CG dos produtos de esterificação dos constituintes da F3-SAX-1707 com metanol anidro acidificado confirmou a presença de um número relativamente pequeno de substâncias (Fig. 43). Ao contrário do que se esperava, não foi possível detectar o éster metílico do ácido gálico. A princípio, apenas o éster metílico do ácido protocatecuico (eluído em 13,5 min.) pôde ser detectado e identificado. A detecção de mais oito picos importantes parece se correlacionar muito bem com a quantidade de picos detectados no cromatograma obtido por CLAE-DAD (Fig. 42).

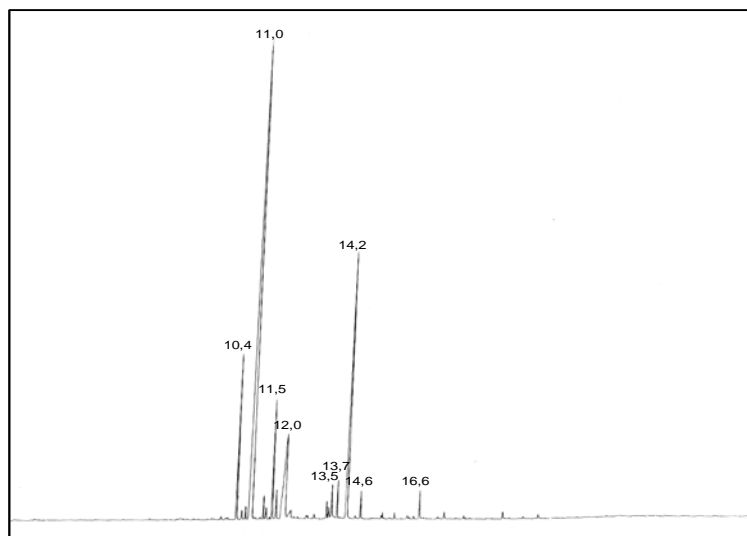


Figura 43: Cromatograma da F3-SAX-1707 obtido por CG. Condições cromatográficas: item 3.3.2. Os principais sinais estão indicados com seus respectivos valores de tempo de retenção (min.).

Interessantemente, após análise da mesma fração por CG-EM, verificou-se que a maioria dos picos presentes no cromatograma (Fig. 44) era correlacionada com substâncias semelhantes ao ácido cítrico, um aditivo normalmente empregado na indústria de alimentos e nunca antes detectado em *E. oleracea*. Além do trimetil-éster do ácido cítrico (13,7 min.) e outros dois picos de estrutura elucidada (13,2 e 14,3 min.) (figuras 45-47), os picos eluídos em 12,5 min. e 15,3 min. também geraram espectros compatíveis com derivados análogos do mesmo ácido, provavelmente dois isômeros (dado não mostrado). Estes teriam sido eluídos na F3-SAX-1707 por apresentarem valores de pKa ainda mais baixos³⁵ que os valores correspondentes para ácidos fenólicos (~ 4,5), o que os faria resistir ao tratamento com água purificada (pH = 5-6).

³⁵ Ácido cítrico tem pKa = 3,1.

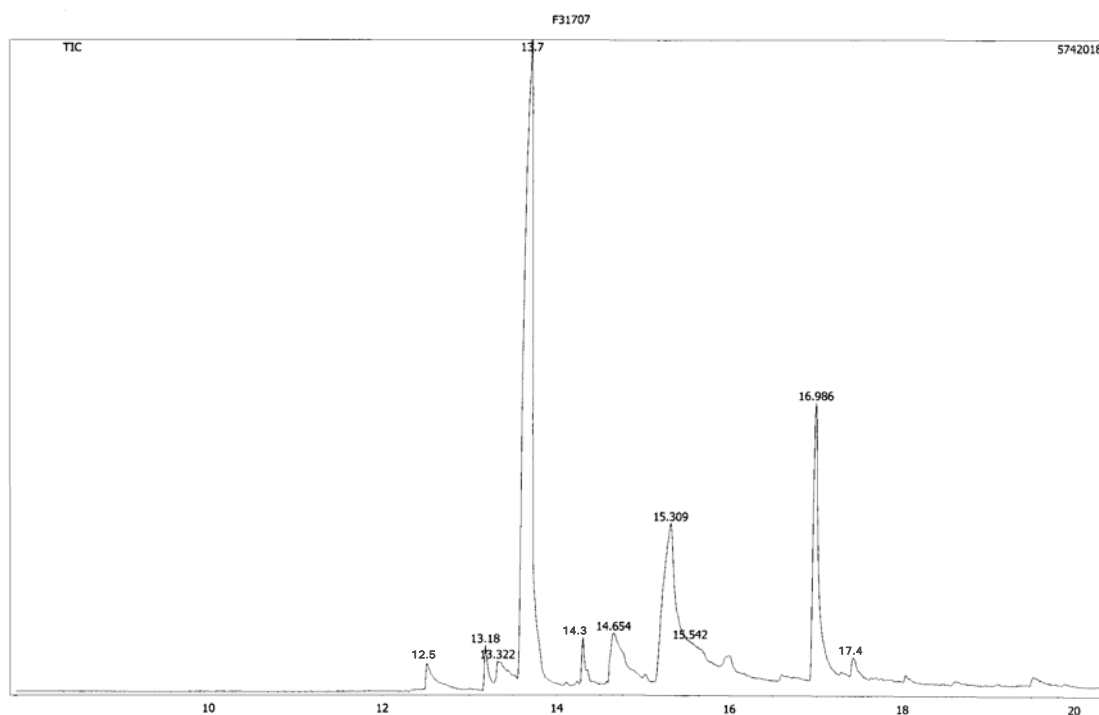


Figura 44: Cromatograma reconstruído da F3-SAX-1707 por CG-EM (CIT). Condições cromatográficas: conforme descrito no item 3.3.2. Os principais sinais estão indicados com seus respectivos valores de tempo de retenção.

Vale mencionar que a embalagem da amostra de açaí utilizada nesta análise (açaí comercial) não mencionava a adição de ácido cítrico no produto. No entanto, o uso de soluções aquosas de ácido cítrico durante a extração da polpa é uma prática constante na obtenção do açaí Top, para exportação (SRUR, 2007³⁶).

³⁶ Informação passada diretamente pelo Prof. Dr. Armando U. O. Sabaá Srur do Instituto de Nutrição da UFRJ, um dos sócios da empresa Top Açaí Ltda.

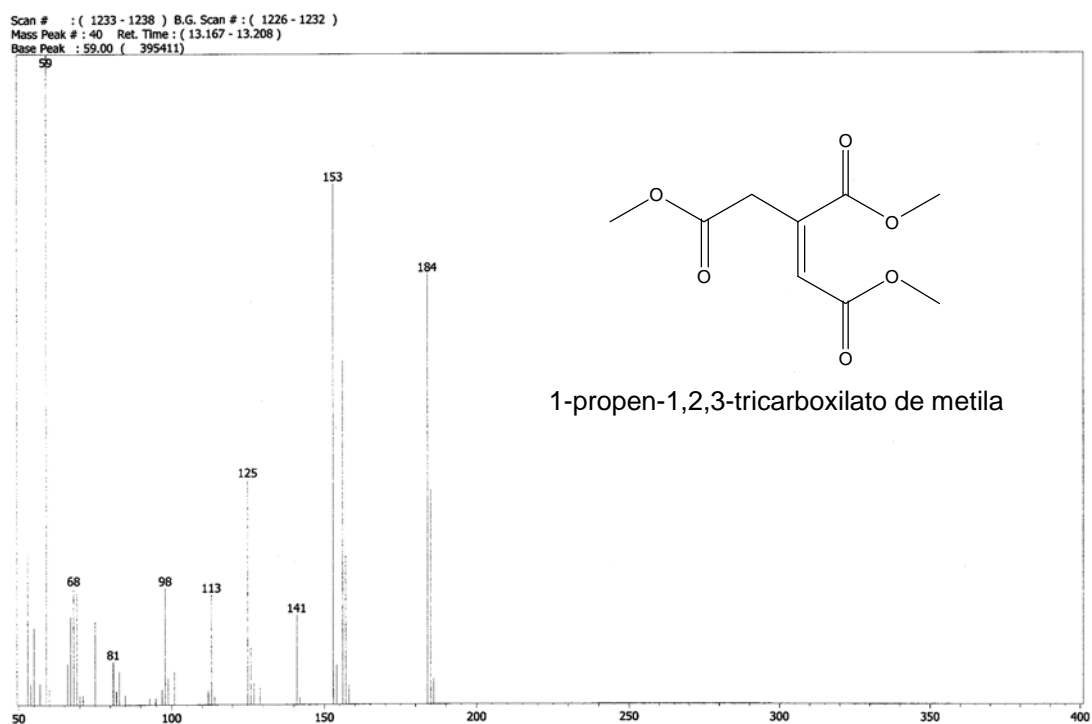


Figura 45: Espectro de massas do pico eluído em 13,2 min. (Fig. 44) obtido por CG-EM e estrutura proposta para o derivado correspondente.

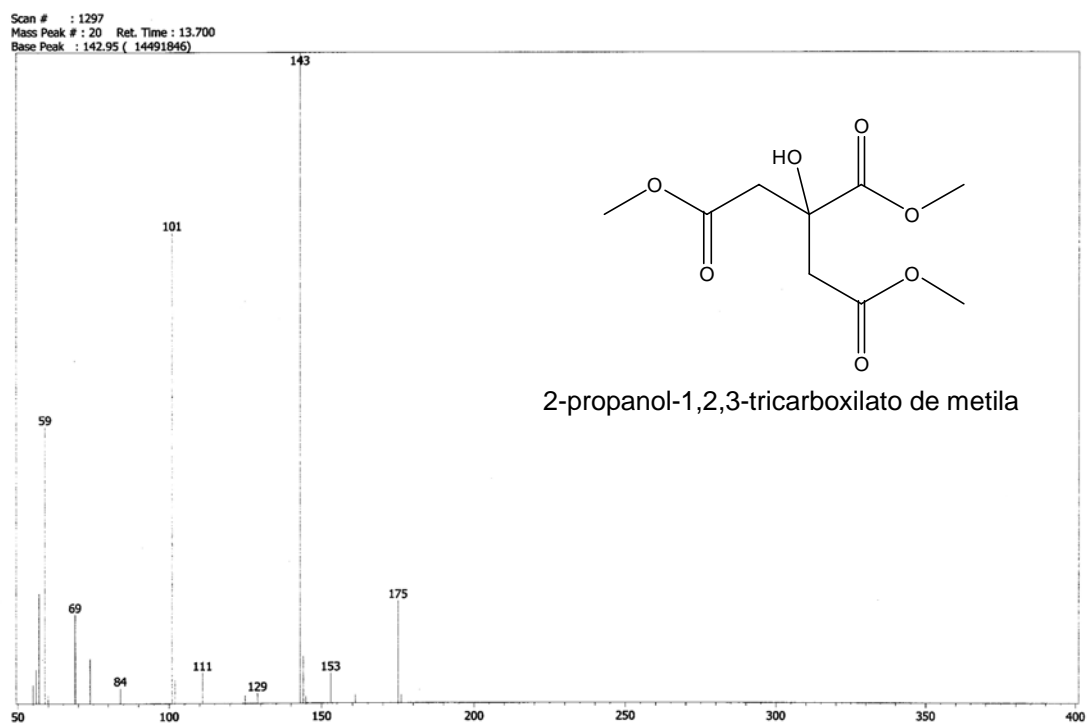


Figura 46: Espectro de massas do pico eluído em 13,7 min. (Fig. 44) obtido por CG-EM e estrutura proposta para o derivado correspondente.

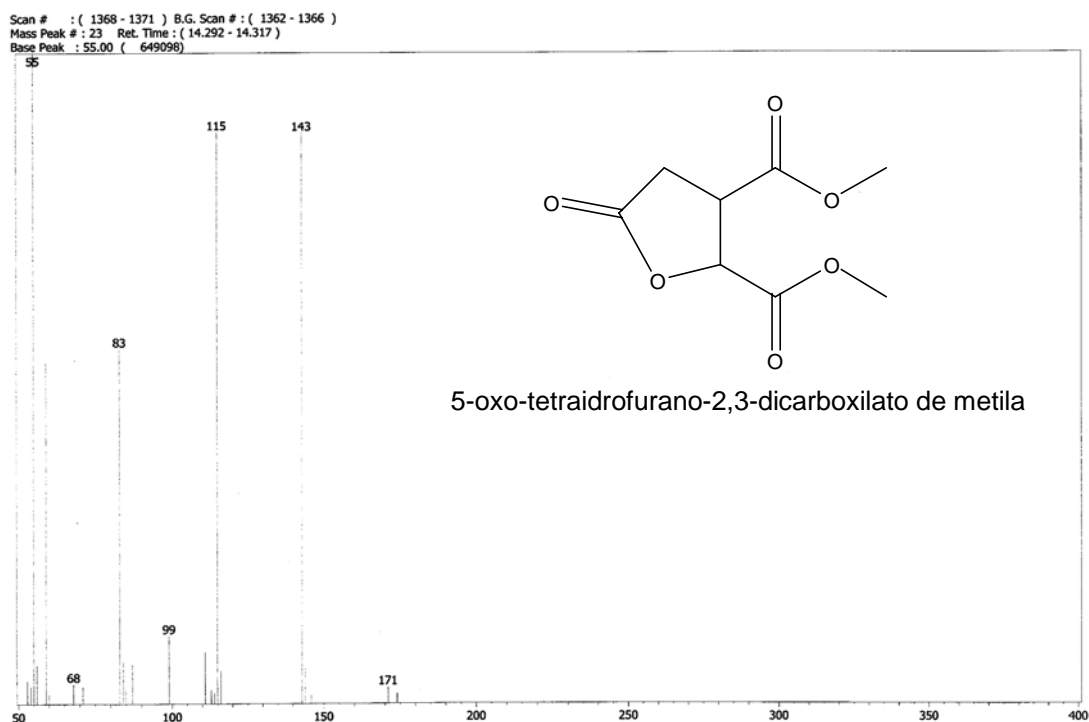


Figura 47: Espectro de massas do pico eluído em 14,3 min. (Fig. 44) obtido por CG-EM e estrutura proposta para o derivado correspondente.

A detecção de três derivados de ácidos fenólicos, eluídos em 14,6 min., 17,0 min. e 17,4 min. (Fig. 44), permitiu uma avaliação da reação de esterificação. A elucidação das estruturas correspondentes (figuras 48-50) revelou que a esterificação com metanol anidro acidificado também pode gerar produtos fenol-metilados, como a reação com diazometano, já que F3-SAX-1707 não continha ácido vanílico nem ácido sirínico, mas sim os respectivos precursores: ácido protocatecuico e ácido gálico (Fig. 42). Embora as análises realizadas por CG com os produtos de esterificação dos padrões destes ácidos fenólicos não tenham evidenciado a existência deste tipo de derivatização, a análise por CG com os produtos de reação da F3-SAX-1707 (Fig. 43) confirma a detecção de derivados dos ácidos vanílico e sirínico (eluídos em 11,5 e 14,6 min., respectivamente). A ocorrência deste tipo de reação talvez seja o motivo pelo qual quase não se detectou o éster metílico do ácido *p*-hidroxi-benzóico nos produtos de esterificação da F2-RTIFB-1104 (Fig. 38).

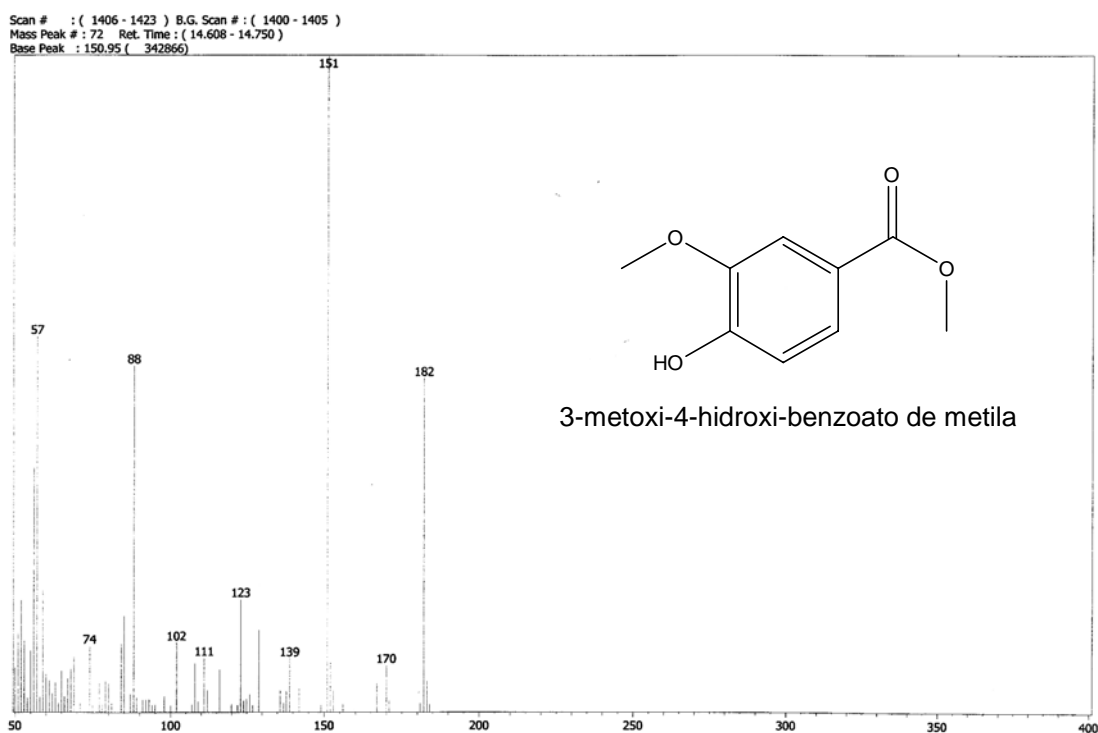


Figura 48: Espectro de massas do pico eluído em 14,7 min. (Fig. 44) obtido por CG-EM e estrutura proposta para o derivado correspondente.

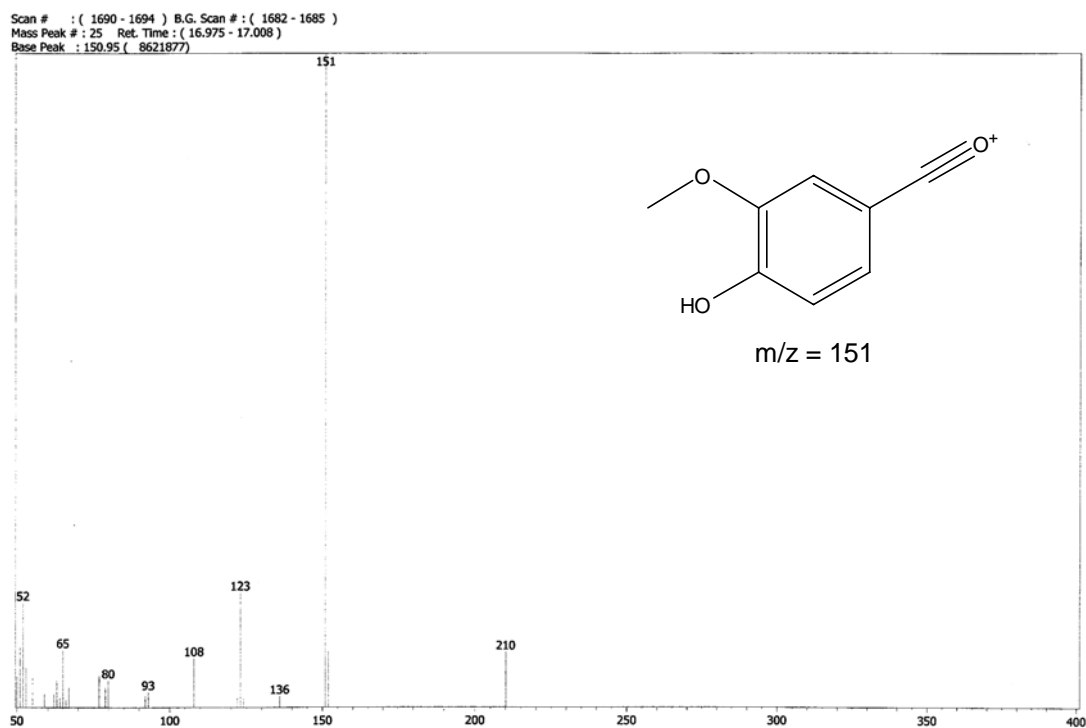


Figura 49: Espectro de massas do pico eluído em 17,0 min. (Fig. 44) obtido por CG-EM e estrutura proposta para o íon de m/z = 151 (pico base).

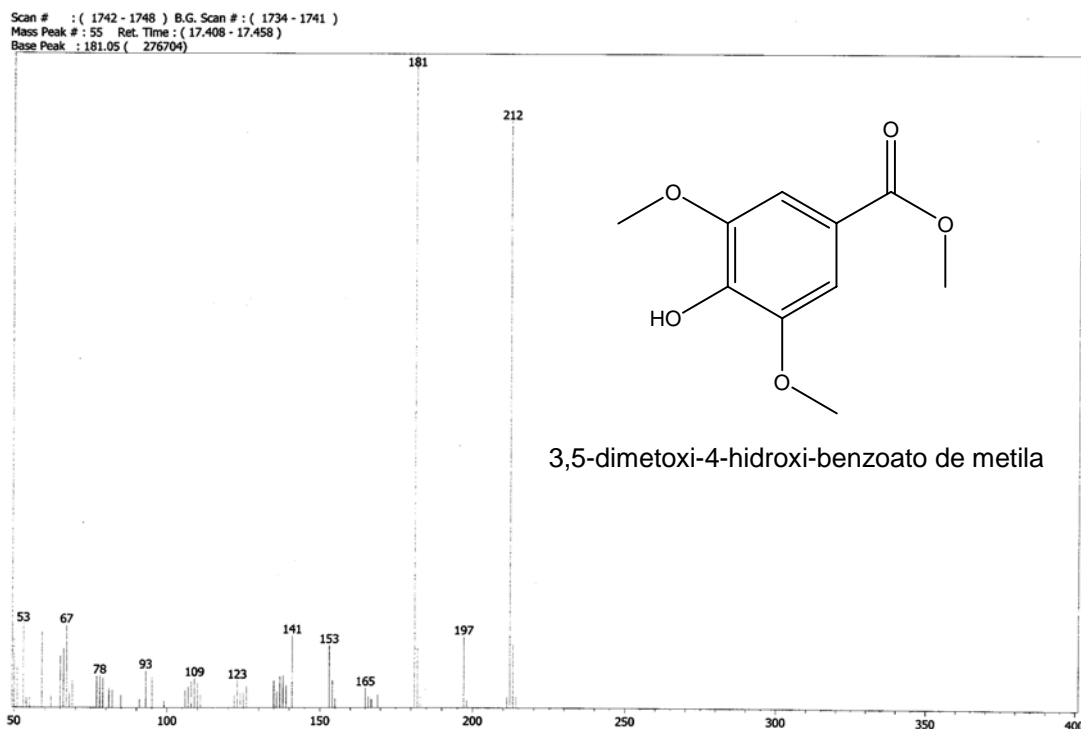


Figura 50: Espectro de massas do pico eluído em 17,4 min. (Fig. 44) obtido por CG-EM e estrutura proposta para o derivado correspondente.

É provável que o espectro mostrado na figura 49 corresponda a um derivado do ácido vanílico, gerado por alguma reação inespecífica durante a esterificação com metanol anidro acidificado. As metilações nas hidroxilas fenólicas ocorreriam por mecanismo semelhante ao da esterificação. Considerando um meio reacional fortemente ácido e com metanol anidro, certamente devem ter ocorrido reações de substituição, do tipo $sn2^{37}$, por ataque nucleofílico de hidroxilas fenólicas em moléculas de metanol protonadas, gerando H_2O como grupo abandonador.

Considerando que a hipótese de haver muitos ácidos fenólicos glicosilados do tipo éster tenha sido descartada, concluiu-se, então, que as condições propostas para a EFS com a SAX realmente não estavam ainda adequadas. Diante da necessidade de se controlar o pH das soluções eluídas pela resina, várias marchas semelhantes (como as descritas no item 3.3.12),

³⁷ Substituição nucleofílica de segunda ordem.

utilizando soluções ou tampões com pH entre 7 e 8, foram testadas para se determinar as melhores condições de trabalho com a SAX e com as frações ácidas obtidas em AcOEt.

Inicialmente, o maior desafio parecia ser a escolha de uma solução tampão de baixa força iônica (50-100 mM) que fosse resistente ao meio fortemente ácido da fração obtida em AcOEt, na qual sempre restavam resíduos de ATFA, mesmo após concentração até a secura. Diante de uma tentativa mal sucedida com o uso de tampão $\text{HCO}_3^- / \text{HCl}$ 50 mM (pH = 7) (marcha não descrita), testou-se o uso da sol. NaOH 3 % (p/v) para dissolver a fração amostra e o uso de uma solução aquosa diluída desta mesma base (pH = 8) nas etapas de lavagem. Entretanto, a dificuldade em se acertar o pH da solução obtida com a amostra tornou necessária a busca por outra metodologia. Portanto, diante da experiência positiva com a RTIFB, utilizando sol. AcONa 500 mM, decidiu-se dissolver a fração amostra numa sol. AcONa 200 mM (mais concentrada que a utilizada na marcha 1707), já que o uso de uma sol. NaHCO_3 200 mM também não havia sido bem sucedido (marcha não descrita). O uso desta última solução gerou queda considerável na detectabilidade dos constituintes das frações da SAX (dado não mostrado), sugerindo que esta técnica proporcionava grandes perdas de fenólicos, provavelmente durante a efervescência gerada pela produção de H_2CO_3 após a adição da sol. NaHCO_3 200 mM à fração amostra.

Analisando primeiro os cromatogramas obtidos por CLAE-DAD com as frações da SAX por uso das soluções de NaOH (marcha 0908) (Fig. 51), pôde-se confirmar que o controle do pH das soluções eluídas era mesmo um fator crítico para o bom desempenho da EFS no cartucho SAX. Desta vez, a maioria das substâncias presentes na fração obtida em AcOEt foi eluída em F3, obtendo-se o melhor rendimento entre todas as frações equivalentes obtidas neste trabalho (7 mg). Porém, vale lembrar que o procedimento com a SAX tem como objetivo a extração seletiva de substâncias ionizáveis nas condições descritas para este ensaio. A detecção de vários picos de muito baixa intensidade em F0 e a ausência de picos

significativos em F1 podem sugerir a ocorrência de ionização de substâncias indesejáveis, as quais também seriam eluídas em F3, juntas com os ácidos fenólicos.

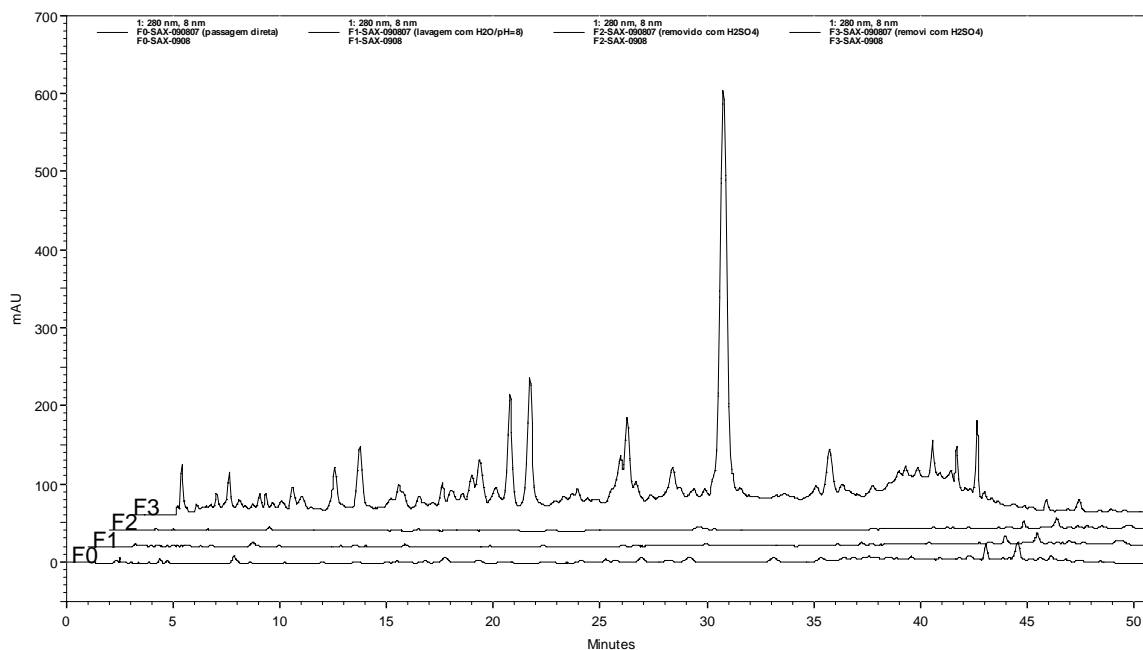


Figura 51: Cromatogramas sobrepostos das frações F0 a F3-SAX-0908 a 280 nm. Condições cromatográficas: conforme descrito por Sumere *et al.* (1993).

A análise dos dados espectrais e dos respectivos valores de tempo de retenção dos picos eluídos em F3-SAX-0908 mostra que as condições cromatográficas descritas por Sumere *et al.* (1993) não eram adequadas para resolver os picos referentes aos ácidos *p*-cumárico e ferúlico, co-eluídos em 27,6 min. (Fig. 52). O espectro obtido no UV para a mistura (*insert b*) está indicado para o pico correspondente. Além disso, os picos 1, 2 e 6 do cromatograma apresentam, respectivamente, as mesmas características espectrais que os picos 3, 5 e 7 do cromatograma obtido com a F3-SAX-1707 (Fig. 42) e, portanto, poderiam ser relacionados com o ácido cítrico e seus análogos. A análise do mesmo cromatograma a 260 nm (Fig. 52; *insert a*) mostra a alta proporção dos ácidos *p*-hidroxi-benzóico, vanílico e siríngico na F3-SAX-0908.

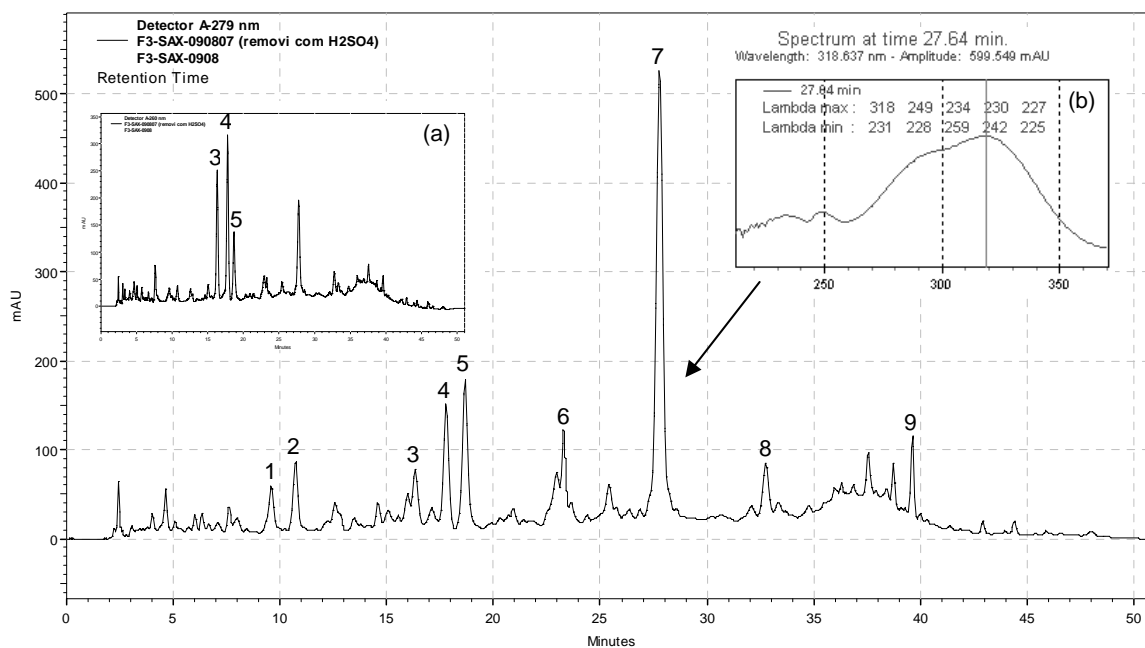


Figura 52: Cromatograma obtido por CLAE-DAD da F3-SAX-0908 a 280 nm. Condições cromatográficas: conforme descrito por Sumere *et al.* (1993). Sinais identificados: ácido *p*-hidroxi-benzóico (3), ácido vanílico (4), ácido siríngico (5) e ácidos ferúlico e *p*-cumárico (7). *Insert a*: mesmo cromatograma monitorado a 260 nm. *Insert b*: espectro do pico 7 obtido no UV.

Com o objetivo de se confirmar a identidade dos ácidos co-eluídos anteriormente, fez-se nova análise por CLAE-DAD com a mesma fração nas condições descritas por Wen *et al.* (2005). O cromatograma obtido mostra a boa separação dos picos referentes aos ácidos *p*-cumárico e ferúlico (Fig. 53), embora os ácidos *p*-hidroxi-benzóico, vanílico e siríngico passem a co-eluir nestas condições (pico 1).

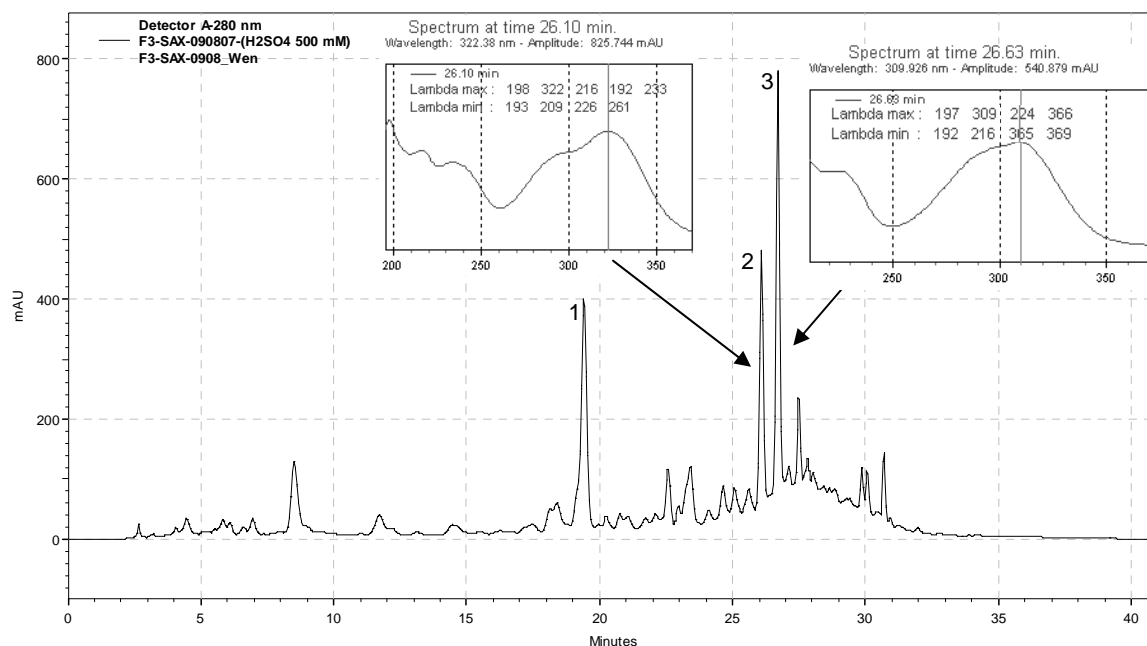


Figura 53: Cromatograma obtido por CLAE-DAD da F3-SAX-0908 a 280 nm. Condições cromatográficas: conforme descrito por Wen *et al.* (2005). Sinais identificados: ácidos *p*-hidroxi-benzóico, vanílico e síringico (1), ácido ferúlico (2) e ácido *p*-cumárico (3).

Interessantemente, os ácidos gálico e protocatecuico, detectados em F3-SAX-1707 (Fig. 42), não foram detectados nos cromatogramas da F3-SAX-0908 (figuras 52 e 53), cuja marcha (item 3.3.12) não teve assistência por ultrassom durante a obtenção do extrato aquoso, sugerindo que este tratamento pudesse estar proporcionando a degradação de precursores mais complexos. Entretanto, ao contrário das marchas descritas anteriormente, a marcha 0908 foi desenvolvida a partir de uma amostra de açaí Top e, portanto, deveria ser comparada com outra marcha desenvolvida a partir desta mesma amostra. A detecção de ácido gálico em frações da SAX obtidas por marchas não descritas, também desenvolvidas a partir de amostras de açaí Top e submetidas a extração assistida por ultrassom (Fig. 54), reforça a idéia de que este tratamento estaria proporcionando a degradação de precursores deste ácido. Considerando a possibilidade destes precursores serem hidrolisáveis em meio ácido, a proposta de não haver derivados hidrolisáveis de ácido gálico em *E. oleracea* poderia ser revista, já que a fração submetida à hidrólise ácida (F1-SAX-1707) poderia já não conter mais tais moléculas, as quais já teriam sido hidrolisadas pelo ultrassom. A presença de ácido gálico

em amostras de açaí comercial, submetidas à extração assistida por ultrassom, foi confirmada em outras três marchas (além da 1707), entre elas a marcha 1001 (Fig. 28), mas a detecção de ácido protocatecuico nestas mesmas amostras parece depender de algum fator ainda não determinado (figuras 28 e 42 e resultados não mostrados). Uma possibilidade seria a degradação dos glicosídeos de cianidina, a qual geraria, entre outros produtos, ácido floroglucinóico³⁸ e ácido protocatecuico por exposição a variações de pH e temperatura (SEERAM *et al.*, 2001). A relação estrutural entre antocianidinas e os respectivos ácidos fenólicos gerados por degradação (Fig. 55) foi estabelecida por Fleschhut *et al.* (2006).

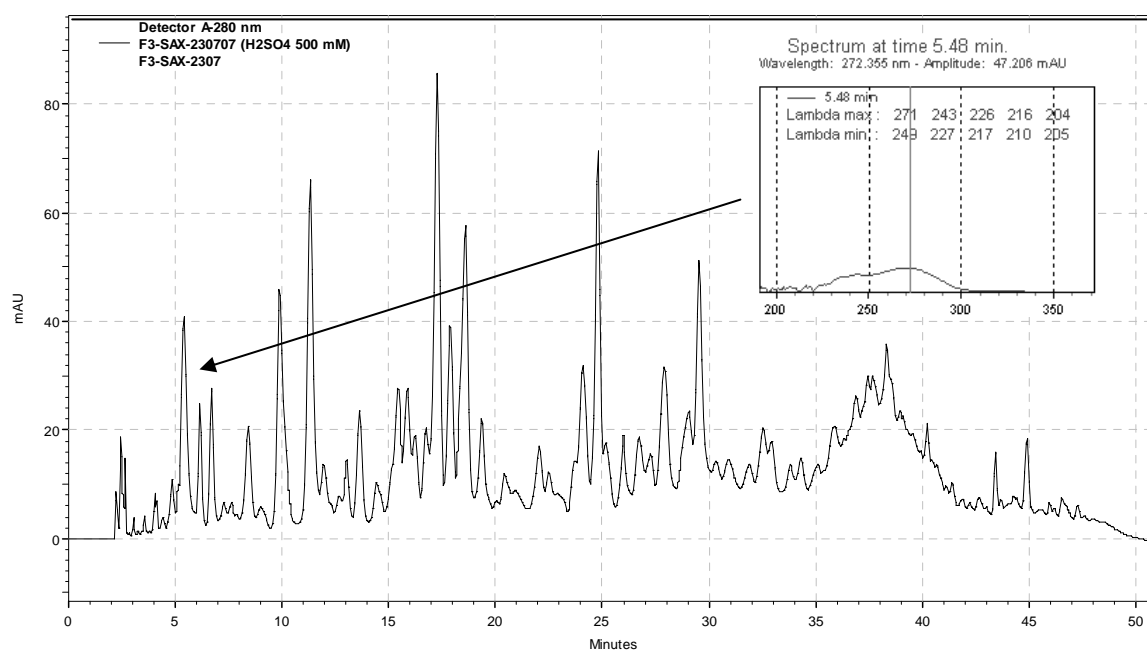
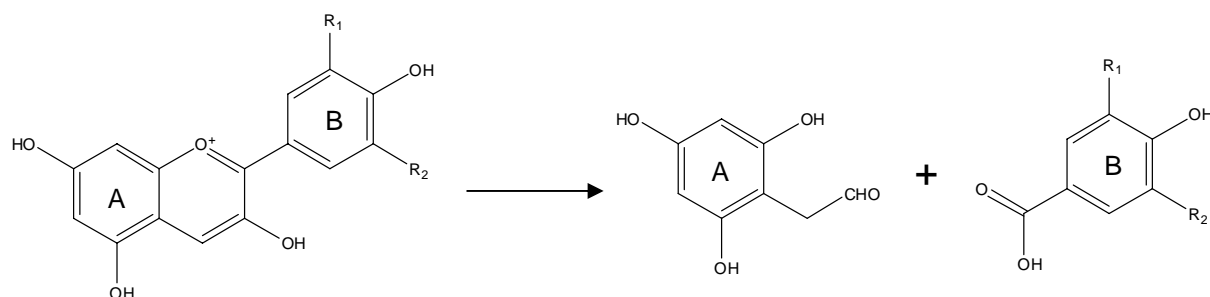


Figura 54: Cromatograma obtido por CLAE-DAD da F3-SAX-2307 (fração obtida por marcha não descrita) a 280 nm. Condições cromatográficas: conforme descrito por Sumere *et al.* (1993). Sinal indicado por seu respectivo espectro no UV: ácido gálico.

³⁸ Ácido 2,4,6-triidroxi-benzóico.



Antocianidina	Ácido fenólico correspondente	R₁	R₂
Pelargonidina	<i>p</i> -hidroxi-benzóico	H	H
Cianidina	protocatecuico	OH	H
Peonidina	vanílico	OCH ₃	H
Delfinidina	gálico	OH	OH
Petunidina	3-metoxi-4,5-dihidroxi-benzóico	OCH ₃	OH
Malvidina	siríntrico	OCH ₃	OCH ₃

Figura 55: Degradação de antocianidinas a ácidos fenólicos³⁹.

Passando, então, a analisar os resultados obtidos por CLAE-DAD com as frações da SAX por uso das soluções de AcONa a 200 mM e 50 mM (marcha 2008; item 3.3.12), verificou-se uma quantidade maior de substâncias não ionizáveis na faixa de pH utilizada, as quais foram eluídas entre F0 e F2 (Fig. 56). No entanto, apenas as substâncias eluídas entre 20 e 30 min. exibiram picos significativos nestas frações.

³⁹ O aldeído que herda o anel A seria o precursor do ácido floroglucínico.

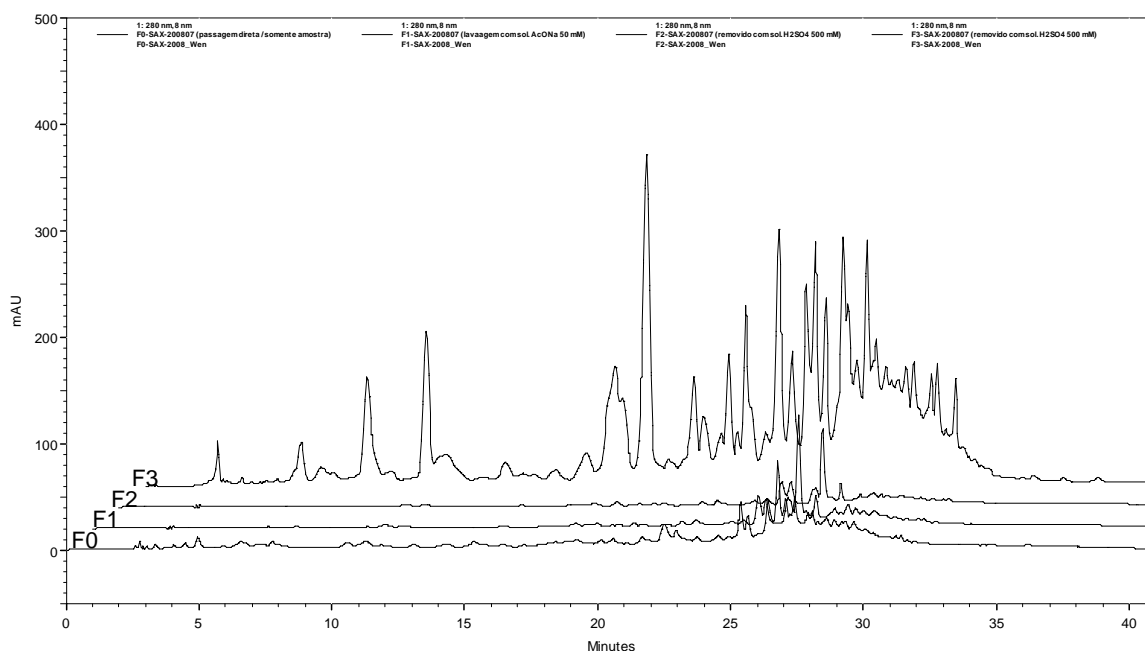


Figura 56: Cromatogramas sobrepostos das frações F0 a F3-SAX-2008 a 280 nm. Condições cromatográficas: conforme descrito por Wen *et al.* (2005).

A análise dos dados espectrais obtidos no UV revelou que dois picos, eluídos entre 25 e 26 min., estavam presentes em todos os cromatogramas das frações SAX-2008 (Fig. 56). Estes picos, com bandas fortes entre 345 e 350 nm (Fig. 57), corresponderiam a dois C-glicosídeos de flavonas, provavelmente homoorientina⁴⁰ e orientina⁴¹, segundo dados da literatura (GALLORI *et al.*, 2004; SCHAUSS *et al.*, 2006a), indicando que as condições descritas para este ensaio ainda não eram satisfatórias para se obter uma fração rica em ácidos fenólicos e livre de flavonóides. Além disso, a detecção de glicosídeos de flavonóides nesta marcha, mas não na anterior, sugere que estas moléculas tenham sido degradadas durante o tratamento da fração ácida da marcha 0908 com a sol. NaOH 3 % (p/v). Por outro lado, a detecção destes flavonóides na F3-SAX-2008 evidenciou a ocorrência de ionização parcial destas moléculas na solução de pH corrigido, obtida após dissolução da fração amostra em sol. AcONa 200 mM. Entretanto, embora o valor de pKa de hidroxilas fenólicas varie normalmente em torno de 10, o valor correspondente destes grupos em flavonóides é bastante

⁴⁰ Luteolina 6-C-glicosídeo.

⁴¹ Luteolina 8-C-glicosídeo.

variável (entre 7,3 e 12,5) ou ainda desconhecido para a maioria deles (FIAMEGOS *et al.*, 2004). Portanto, como a faixa de pK_{a1} (referente à carboxila) dos ácidos fenólicos (~ 4,5) exige que se trabalhe com a SAX em valores de pH acima de 7 para mantê-los todos ionizados, tornou-se evidente que esta resina não era adequada para o isolamento de ácidos fenólicos em presença de certos flavonóides, com valores de pK_a muito baixos. O comportamento variável de flavonóides de mesma classe extraídos de *E. oleracea* pôde ser verificado aqui após a detecção de outros dois glicosídeos de flavonas apenas em F0, F1 (Fig. 58) e F2. Estes, provavelmente, corresponderiam a isovitexina (27,2 min.) e seu isômero (26,2 min.) ainda não identificado, conforme proposta feita por Schauss *et al.* (2006a).

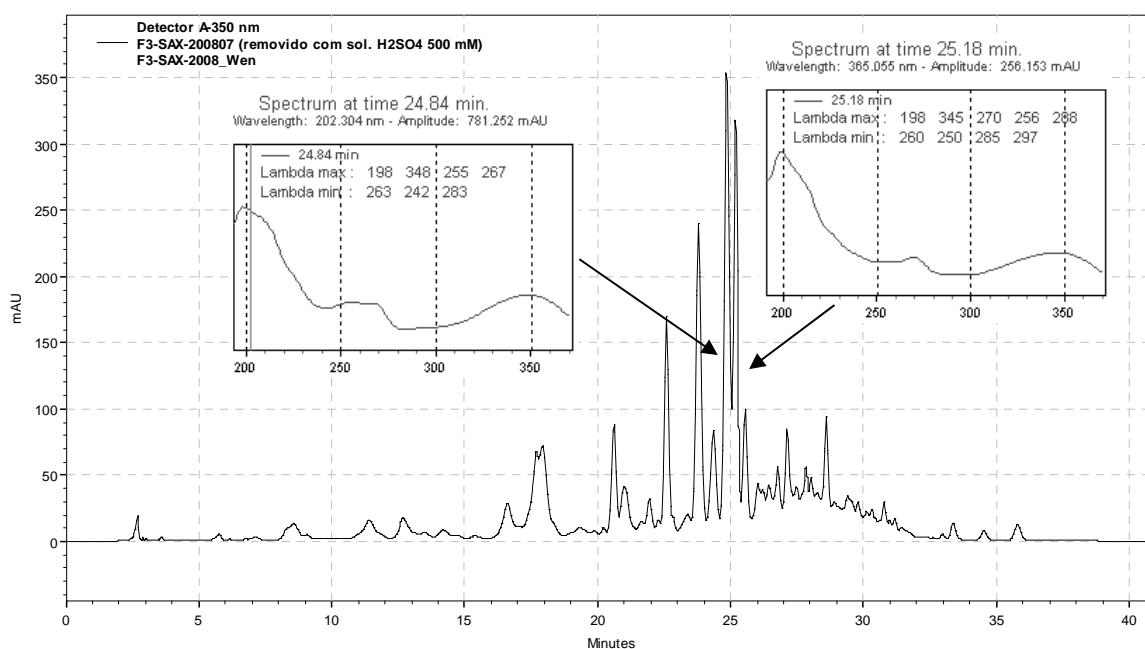


Figura 57: Cromatograma obtido por CLAE-DAD da F3-SAX-2008 a 350 nm. Condições cromatográficas: conforme descrito por Wen *et al.* (2005). Sinais indicados: homoorientina (24,8 min.) e orientina (25,2 min.).

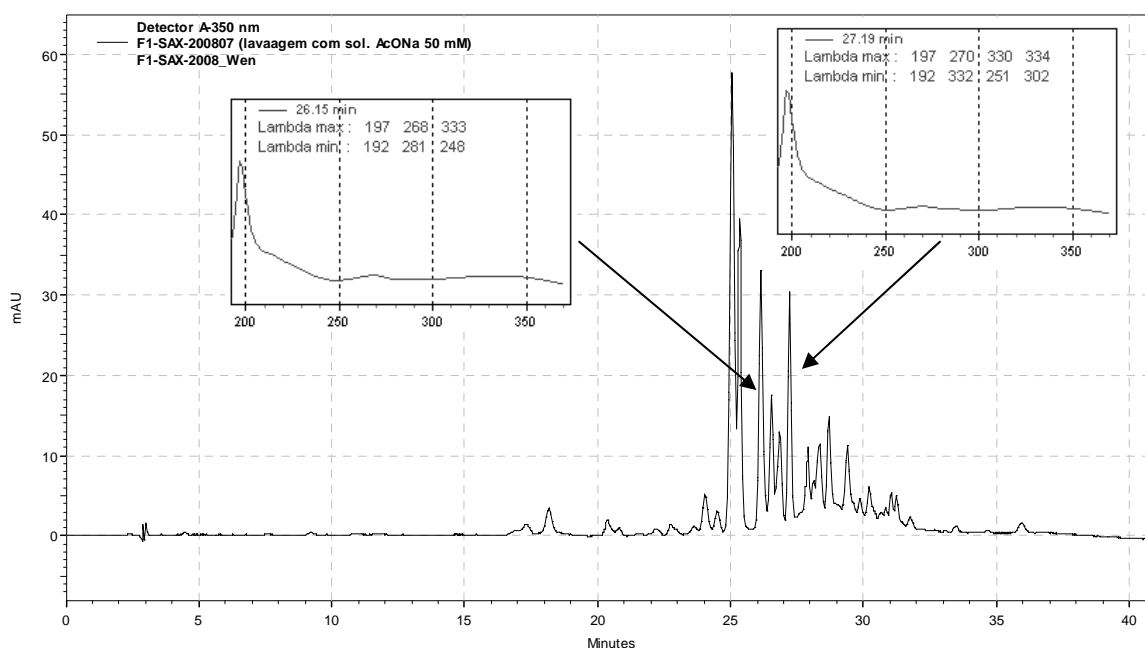


Figura 58: Cromatograma obtido por CLAE-DAD da F1-SAX-2008 a 350 nm. Condições cromatográficas: conforme descrito por Wen *et al.* (2005). Sinais indicados: isovitexina (27,2 min.) e seu isômero (26,2 min.).

Embora a etapa de extração da fração aquosa da marcha 2008 também não tenha sido assistida por ultrassom (item 3.3.12), o cromatograma obtido por CLAE-DAD da F3-SAX-2008 a 280 nm (Fig. 59) mostra claramente a detecção de ácido protocatecuico (pico 4). Portanto, assim como nas amostras de açaí comercial, a detecção deste ácido em amostras de açaí Top poderia estar relacionada com uma contaminação da fração orgânica (AcOEt) com quantidades significativas de pigmentos da fração aquosa (como citado no item 3.3.9), fato ocorrido durante a marcha 2008, mas não durante a marcha anterior (0908). Além de ácido protocatecuico, uma pequena quantidade de ácido gálico também foi detectada, mas sua concentração foi, de longe, muito inferior à observada em F3-SAX-1707 (Fig. 42).

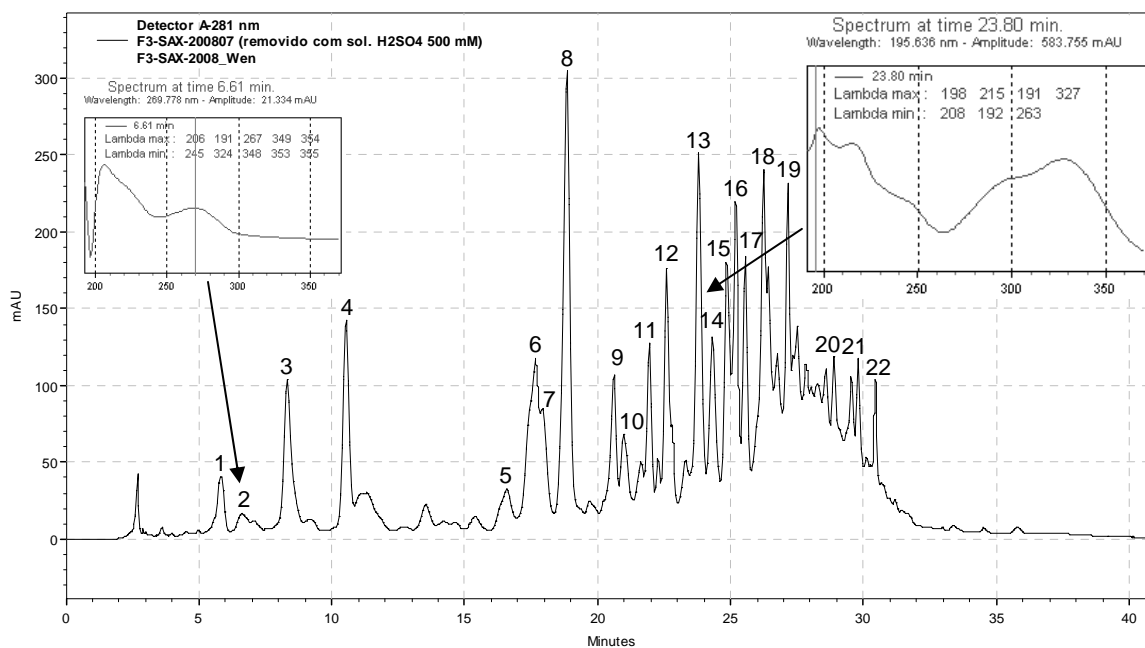


Figura 59: Cromatograma obtido por CLAE-DAD da F3-SAX-2008 a 280 nm. Condições cromatográficas: conforme descrito por Wen *et al.* (2005). Sinais identificados: ácido gálico (2), ácido protocatecuico (4), ácido clorogênico (7), ácidos *p*-hidroxi-benzóico, vanílico e siringico (8), ácido caféico (10), homoorientina (15), orientina (16), ácido ferúlico (17) e ácido *p*-cumárico (18).

Diante das oscilações ocorridas com os valores de tempo de retenção, a identificação segura de alguns compostos da F3-SAX-2008 tornou-se difícil, principalmente com o aparecimento de várias substâncias com espectros típicos de ácidos cinâmicos. Entre as propostas de identificação, sugeriu-se a presença de ácido clorogênico⁴² (pico 7) e ácido caféico (pico 10), não detectados anteriormente por CLAE-DAD em frações da SAX nem em outros relatos com *E. oleracea*; entre os desconhecidos, destacaram-se os picos 5, 9, 12 e 13 por apresentarem espectros no UV bem semelhantes aos obtidos para ácidos cinâmicos. Estes, provavelmente, corresponderiam a derivados de ácidos cinâmicos com moléculas de outras classes químicas, como o ácido quínico, constituinte estrutural do ácido clorogênico (Fig. 60). Portanto, entre tais derivados não identificados, poderia-se sugerir um possível marcador quimiotaxonômico das espécies de Palmae, o ácido 3'-cafeil chiquímico (Fig. 2), já detectado em flores e frutos de outras espécies da família (HARBORNE *et al.*, 1974). A identificação de

⁴² Ácido 5'-cafeoil quínico.

algum destes picos como o isômero 3' do ácido clorogênico (ácido neoclorogênico) não seria compatível com os valores de tempo de retenção citados para tal molécula na literatura (GAO & MAZZA, 1995; BENGOCHEA *et al.*, 1997), mas o isômero 4' deste ácido poderia estar presente. Contudo, existiria ainda a possibilidade destes compostos serem derivados de ácidos cinâmicos com ácido gálico. Isto explicaria a baixa concentração de ácido gálico livre nesta fração, mas não na fração equivalente da marcha anterior (F3-SAX-0908), na qual não se detectou ácido gálico nem tais derivados (figuras 52 e 53). Além disso, vale mencionar também que os derivados de ácido gálico citados na literatura para *E. oleracea* (INSFRAN *et al.*, 2004; PACHECO *et al.*, 2007) têm características espectrais semelhantes à do ácido gálico ($\lambda_{\text{máx.}} = 270 \text{ nm}$), indicando que estes seriam derivados esterificados na função carboxila (tipo galatos).

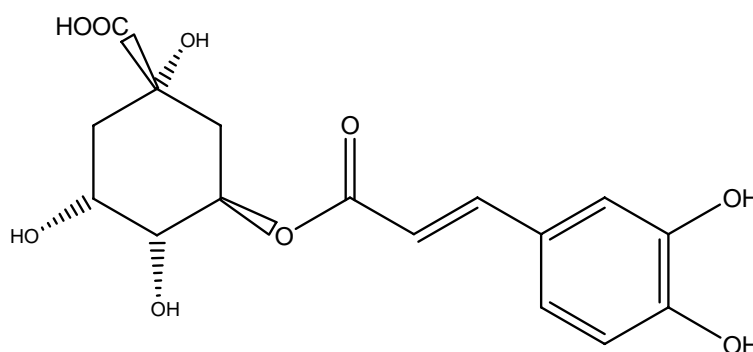


Figura 60: Estrutura do ácido clorogênico.

4.3.5 Fração ligada à parede celular

Diante da possibilidade de haver um marcador quimiotaxonômico ligado às estruturas de parede celular em mesocarpos de frutos da família Palmae (CHAKRABORTY *et al.*, 2006), decidiu-se investigar se os *pellets* recuperados após a obtenção do extrato aquoso conteriam ácidos fenólicos ligados a estas estruturas. A hidrólise alcalina com sol. NaOH

2 M, à temperatura ambiente, seria a técnica mais indicada para a obtenção quantitativa de ácidos fenólicos ligados à parede celular (BONOLI *et al.*, 2004; CHAKRABORTY *et al.*, 2006). Então, retornando à marcha 0908 (item 3.3.12), fez-se diretamente a hidrólise básica do resíduo obtido após a centrifugação do segundo extrato aquoso. Após recuperação dos produtos de hidrólise em AcOEt e concentração desta fração em evaporador rotatório, fez-se a EFS com o mesmo cartucho SAX utilizado anteriormente para a mesma marcha. O tratamento do cartucho SAX com MeOH / sol. H₂SO₄ 500 mM (1:1) após o uso proporcionou a remoção total de substâncias visíveis aderidas, sugerindo que este pudesse ser reutilizado. Então, analisando os cromatogramas obtidos por CLAE-DAD das frações obtidas da SAX (Fig. 61), revelou-se que quase todos os produtos de hidrólise básica foram eluídos na fração eluída com a sol. H₂SO₄ 500 mM (F3-SAX-*pellet*-0908).

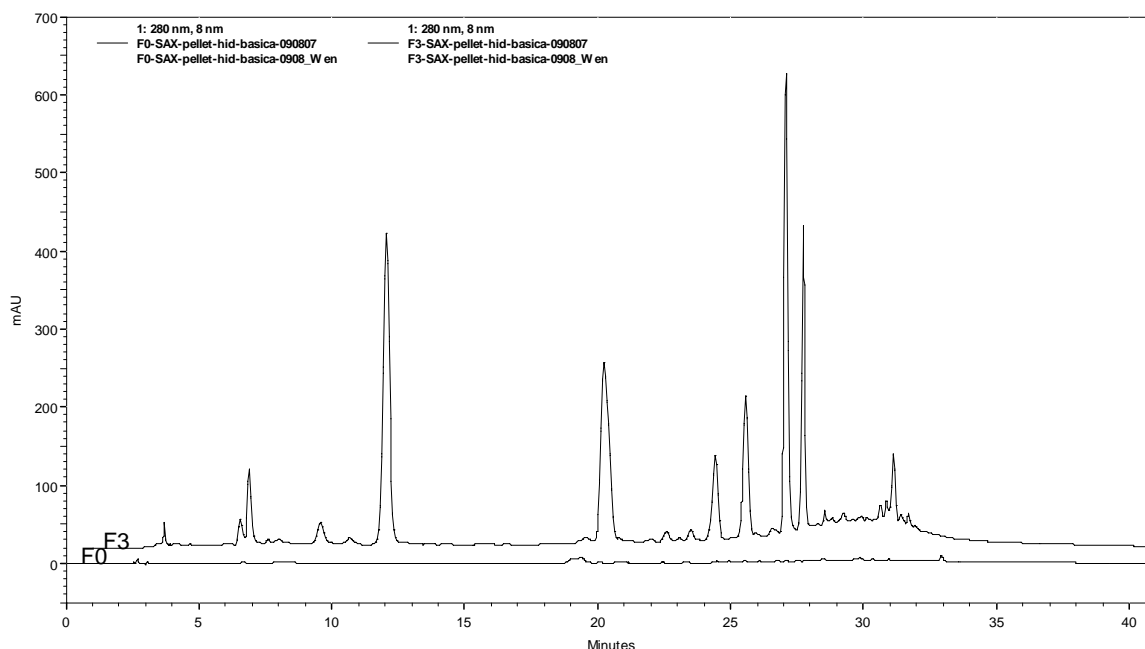


Figura 61: Cromatogramas sobrepostos das frações F0 e F3-SAX-*pellet*-0908 a 280 nm. Condições cromatográficas: conforme descrito por Wen *et al.* (2005).

A detecção dos ácidos protocatecuico, *p*-hidroxi-benzóico, vanílico, ferúlico e *p*-cumárico em altas proporções na F3-SAX-*pellet*-0908 (Fig. 62) sugeriu que todos estes

ácidos, entre outros, fossem os constituintes principais da fração ligada à parede celular. O pico 5, também detectado na F2-RTIFB-1104 (Fig. 31), corresponderia ao ácido 3-(4-hidroxi)-fenil-2(Z)-propenóico (o isômero “*cis*” do ácido *p*-cumárico), enquanto o pico 6, com espectro no UV também semelhante ao do ácido *p*-cumárico, seria o pico mais intenso ainda não identificado. Entre outros picos não identificados, os picos 1 e 2 seriam dois dos análogos do ácido cítrico já detectados anteriormente (Fig. 42) e o pico 9 seria mais um derivado cinâmico, com absorção máxima em 285-290 *sh* e 323 nm.

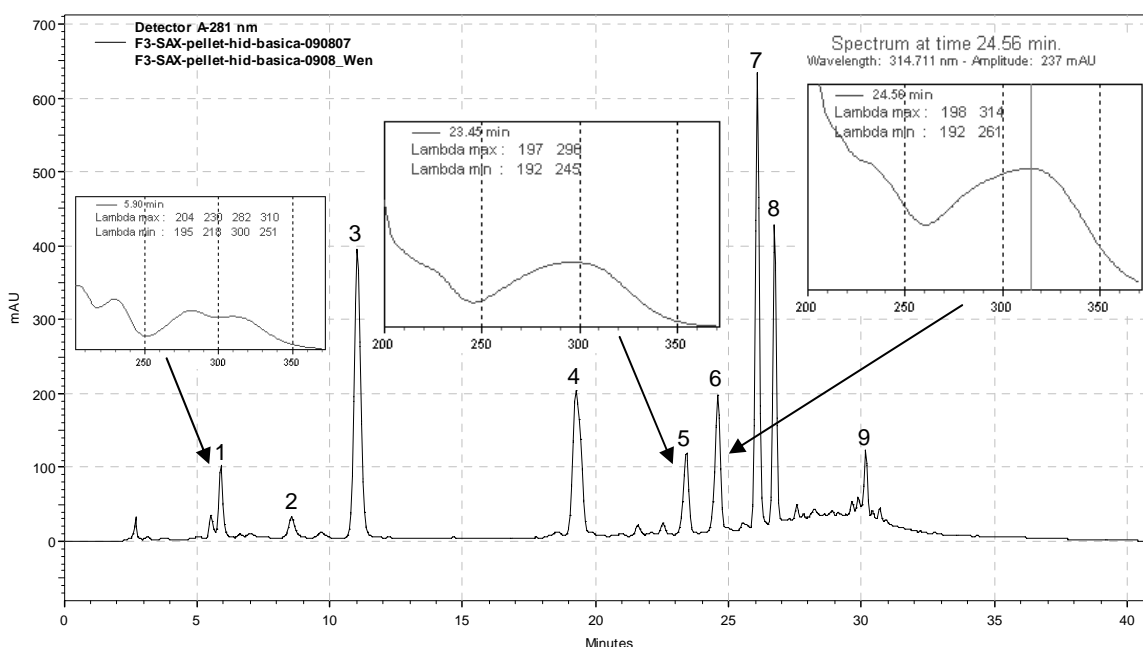


Figura 62: Cromatograma obtido por CLAE-DAD da F3-SAX-*pellet*-0908 a 280 nm. Condições cromatográficas: conforme descrito por Wen *et al.* (2005). Sinais identificados: ácido protocatecuico (3), ácidos *p*-hidroxi-benzóico e vanílico (4), ácido 3-(4-hidroxi)-fenil-2(Z)-propenóico (5), ácido ferúlico (7) e ácido *p*-cumárico (8).

A análise da F3-SAX-*pellet*-0908 por CG-EM após derivatização com diazometano permitiu a detecção de mais de dez picos relevantes (Fig. 63). Entre os picos mais intensos do cromatograma, pôde-se identificar o trimetil-éster do ácido cítrico (Fig. 64), eluído em 14,5 min., como o único derivado presente entre os análogos deste ácido citados anteriormente.

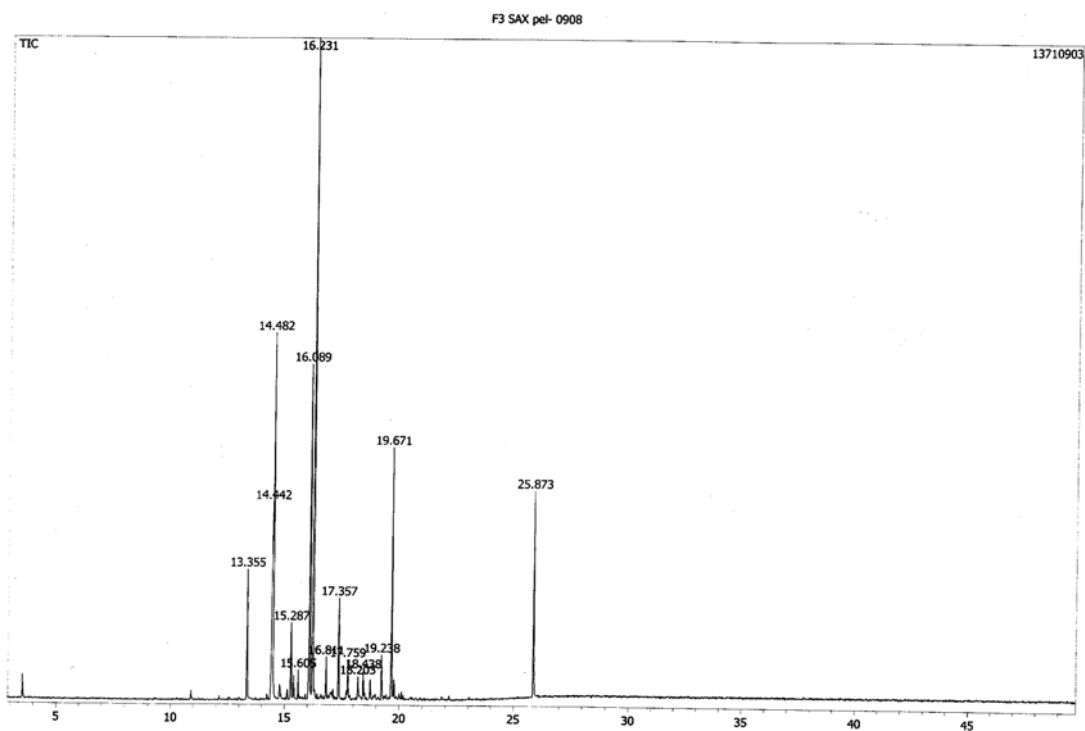


Figura 63: Cromatograma reconstruído da F3-SAX-*pellet*-0908 por CG-EM (CIT). Condições cromatográficas: conforme descrito no item 3.3.2. Os principais sinais estão indicados com seus respectivos valores de tempo de retenção.

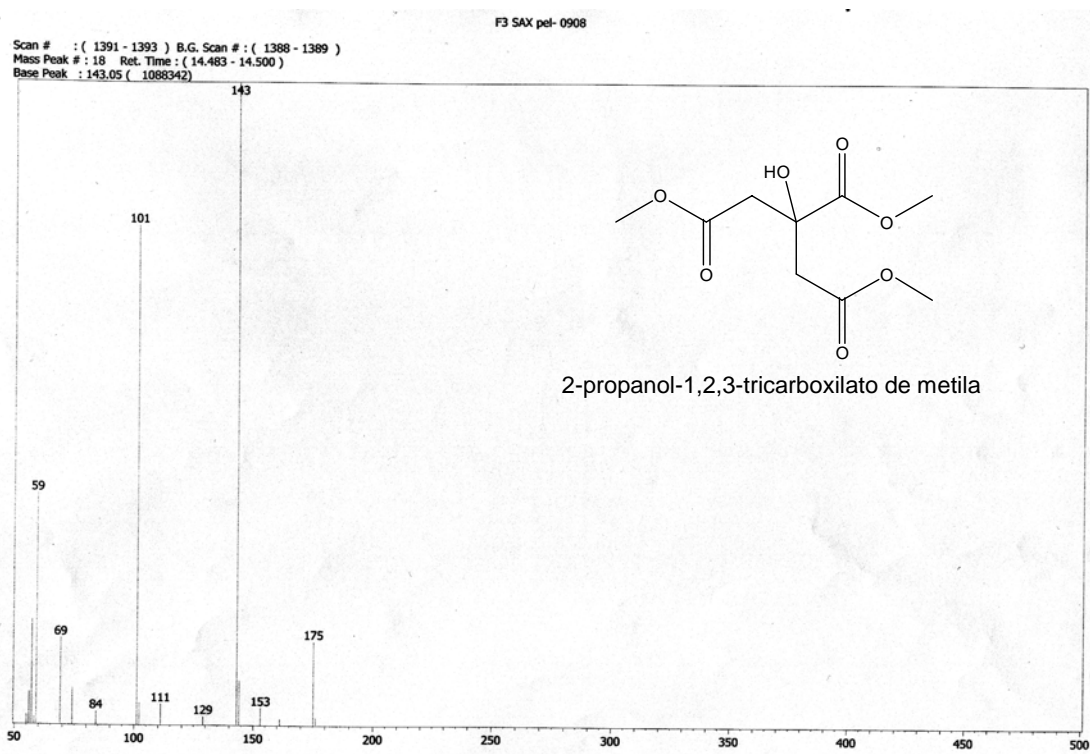


Figura 64: Espectro de massas do pico eluído em 14,5 min. (Fig. 63) obtido por CG-EM e estrutura proposta para o derivado correspondente.

A análise de todos os espectros de massas obtidos permitiu ainda a identificação de dois derivados do ácido *p*-hidroxi-benzóico, quatro derivados dos ácidos protocatecuico e vanílico, um derivado de ácido siríngico ou gálico, dois derivados do ácido *p*-cumárico e três derivados de ácido ferúlico ou caféico. A detecção de dois ésteres metílicos derivados do ácido *p*-hidroxi-benzóico, um *p*-metoxilado (Fig. 65) e outro *p*-hidroxilado (Fig. 66), evidenciou a ocorrência de metilação parcial das hidroxilas fenólicas pela reação com diazometano, fato não ocorrido na reação da F1-celulose-0712 com o mesmo reagente (figuras 19-24).

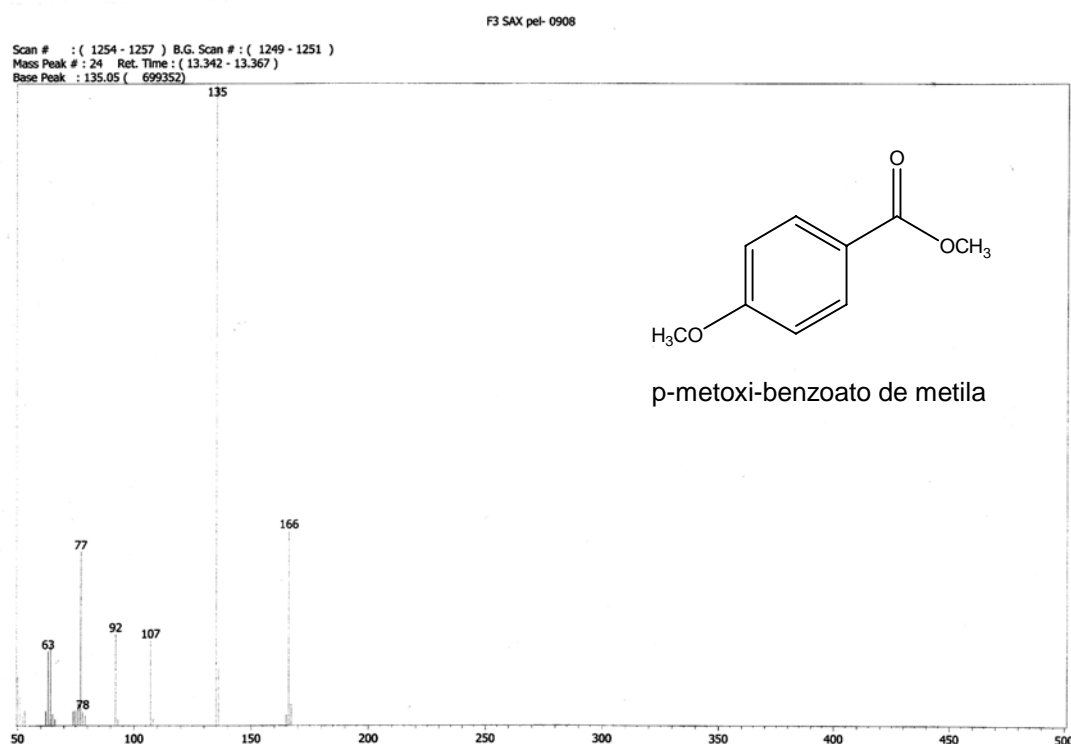


Figura 65: Espectro de massas do pico eluído em 13,4 min. (Fig. 63) obtido por CG-EM e estrutura proposta para o derivado correspondente.

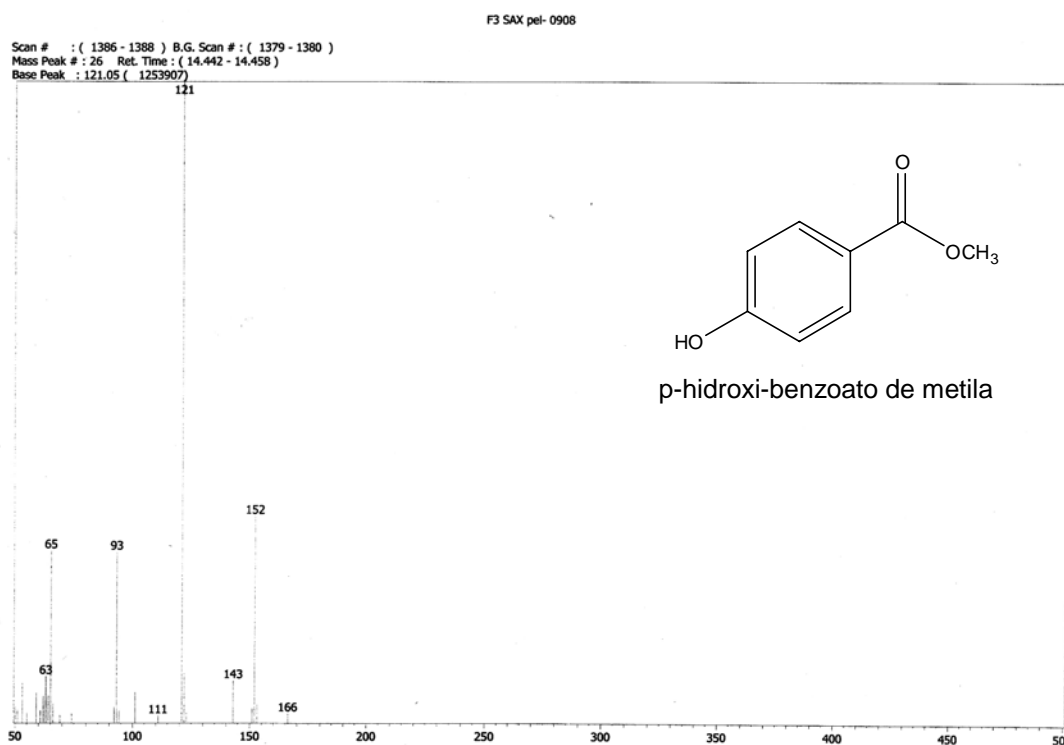


Figura 66: Espectro de massas do pico eluído em 14,4 min. (Fig. 63) obtido por CG-EM e estrutura proposta para o derivado correspondente.

Os dois ésteres metílicos detectados em 15,3 min. (Fig. 67) e 16,1 min. (Fig. 68) confirmaram a detecção dos ácidos protocatecuico e vanílico por CLAE-DAD (Fig. 62); um seria o éster metílico 3-metoxi 4-hidroxilado e o outro seria o 3-hidroxi 4-metoxilado. Além destes dois, um éster metílico dimetoxilado (Fig. 69) e um derivado de estrutura desconhecida (Fig. 70) também foram detectados.

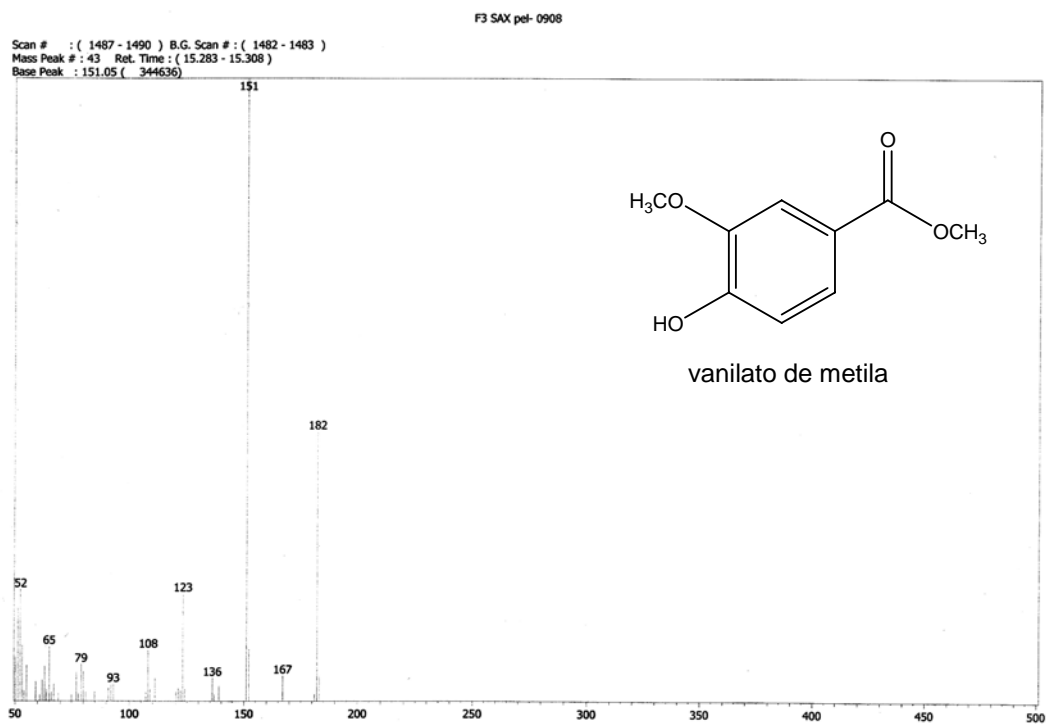


Figura 67: Espectro de massas do pico eluído em 15,3 min. (Fig. 63) obtido por CG-EM e estrutura proposta para o derivado correspondente.

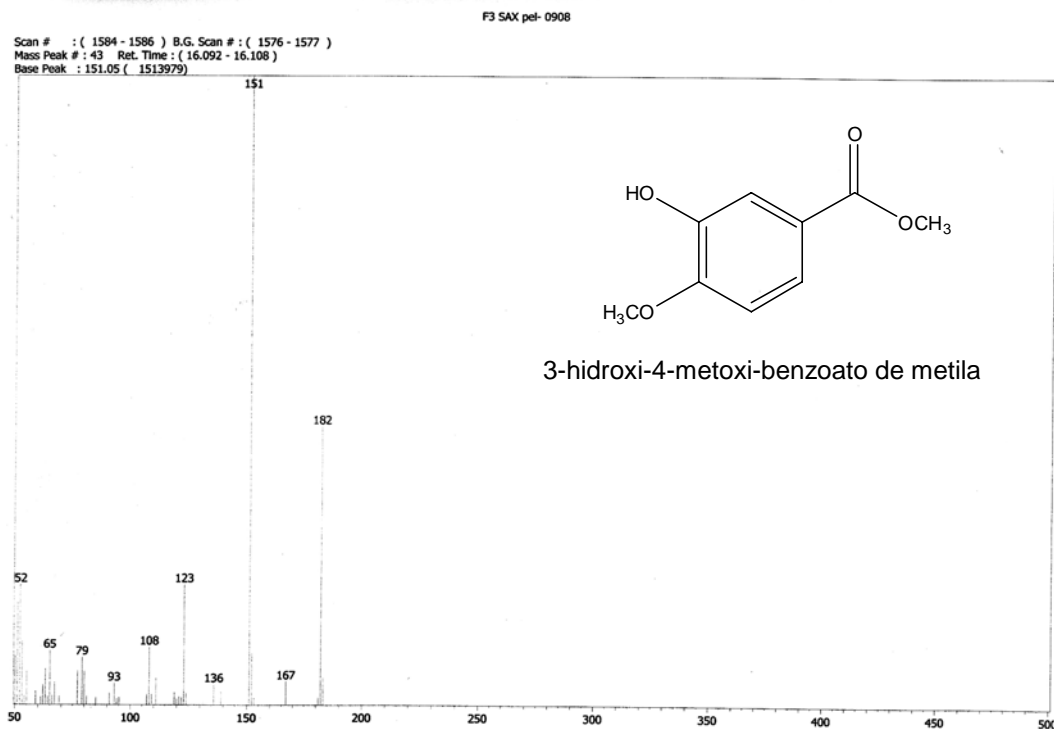


Figura 68: Espectro de massas do pico eluído em 16,1 min. (Fig. 63) obtido por CG-EM e estrutura proposta para o derivado correspondente.

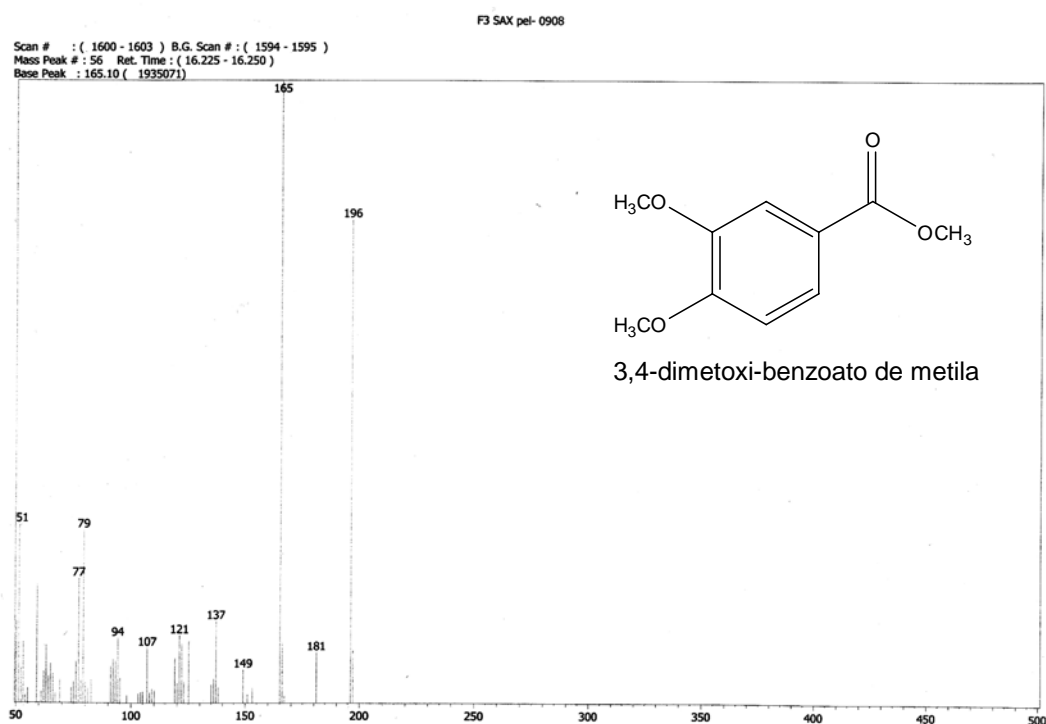


Figura 69: Espectro de massas do pico eluído em 16,2 min. (Fig. 63) obtido por CG-EM e estrutura proposta para o derivado correspondente.

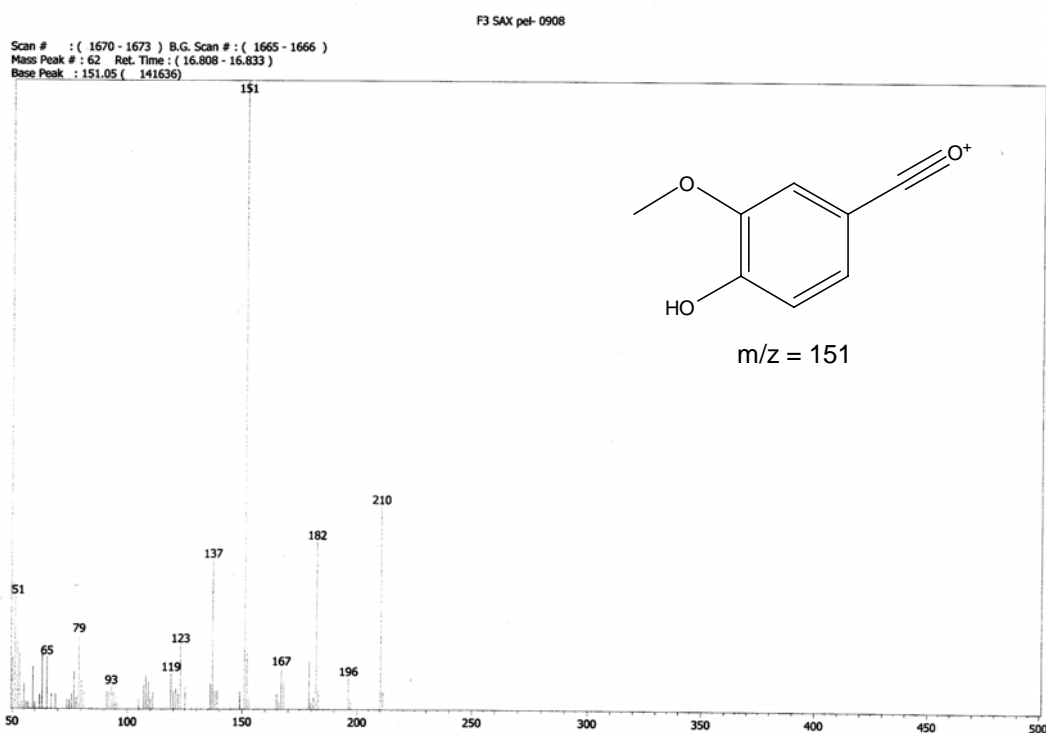


Figura 70: Espectro de massas do pico eluído em 16,8 min. (Fig. 63) obtido por CG-EM e estrutura proposta para o íon de m/z = 151 (pico base).

Como o ácido gálico não foi detectado no cromatograma obtido por CLAE-DAD (Fig. 62), o derivado trimetoxilado (Fig. 71), detectado em 17,6 min., foi relacionado com o ácido siríngico, que embora também não tenha sido aparentemente detectado no mesmo cromatograma, co-eluiria com os ácidos *p*-hidroxi-benzóico e vanílico nas condições utilizadas e poderia ter seu espectro no UV encoberto pelos espectros de ambos.

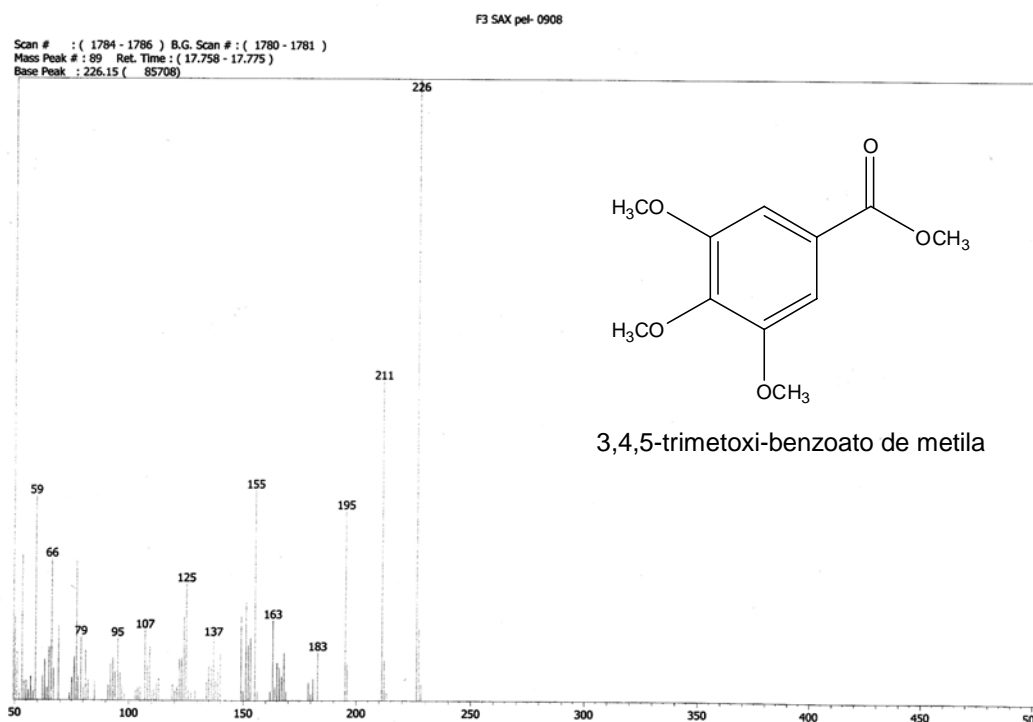


Figura 71: Espectro de massas do pico eluído em 17,6 min. (Fig. 63) obtido por CG-EM e estrutura proposta para o derivado correspondente.

Novamente, como o ácido caféico também não foi detectado no cromatograma obtido por CLAE-DAD (Fig. 62), os três derivados cinâmicos eluídos em 18,4 min., 19,3 min. e 19,7 min. foram relacionados com o ácido ferúlico. Enquanto o segundo derivado (19,2 min.) foi identificado como o éster metílico do ácido ferúlico (Fig. 72), os outros dois seriam dois isômeros dimetoxilados, o 3-(3,4-dimetoxi)-fenil-2(E)-propenoato de metila (Fig. 73) e o seu isômero “*cis*”, 3-(3,4-dimetoxi)-fenil-2(Z)-propenoato de metila (Fig. 74). O primeiro seria

um derivado do ácido ferúlico (Fig. 62; pico 7) e o segundo seria um derivado de seu isômero “*cis*”, provavelmente eluído em 24,6 min. (Fig. 62; pico 6).

Embora o cromatograma obtido por CLAE-DAD (Fig. 62) tenha revelado a presença do ácido *p*-cumárico e de seu isômero “*cis*”, apenas dois derivados deste ácido foram detectados por CG-EM, um *p*-metoxilado (Fig. 75) e o outro *p*-hidroxilado (Fig. 76), o que sugere a presença de apenas um dos dois precursores.

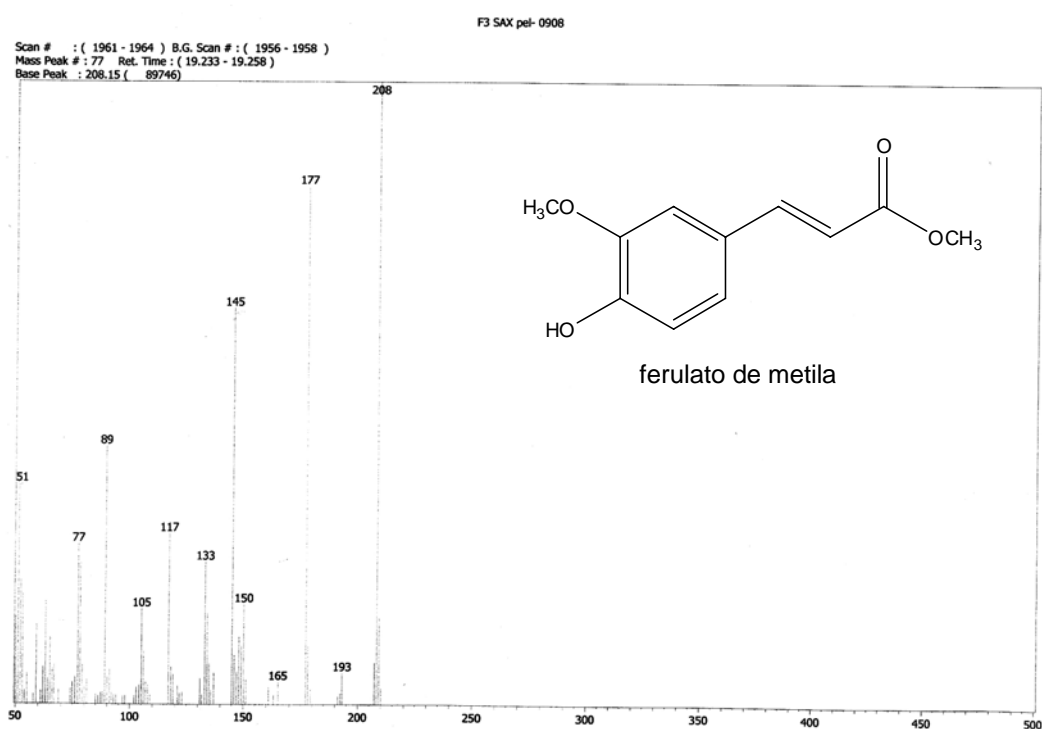


Figura 72: Espectro de massas do pico eluído em 19,2 min. (Fig. 63) obtido por CG-EM e estrutura proposta para o derivado correspondente.

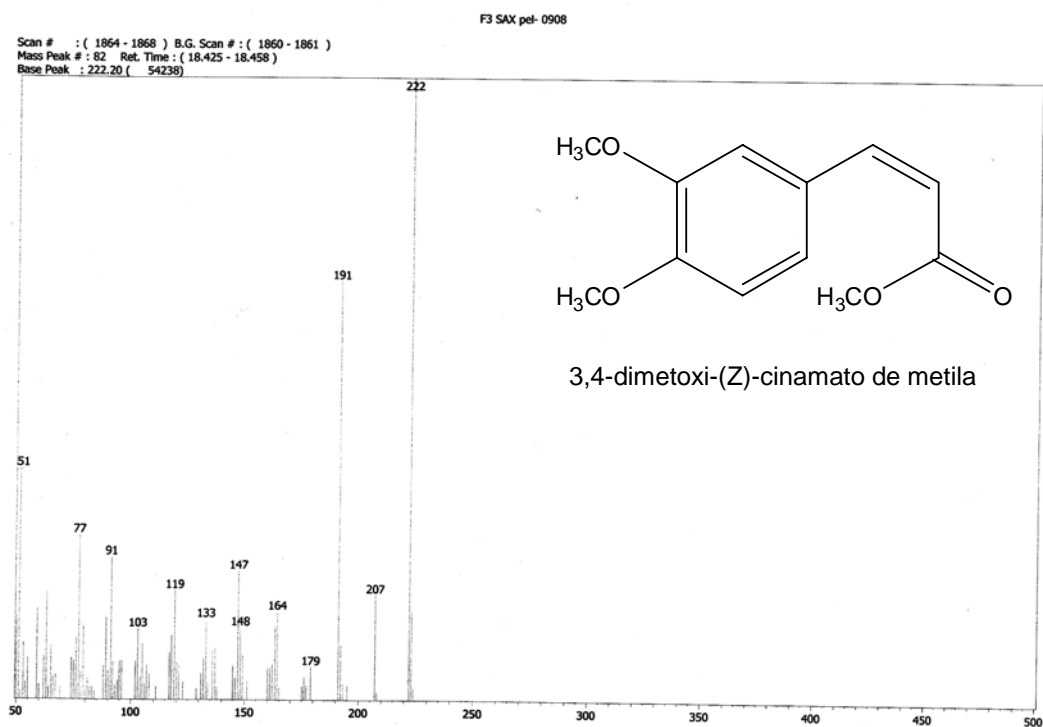


Figura 73: Espectro de massas do pico eluído em 18,4 min. (Fig. 63) obtido por CG-EM e estrutura proposta para o derivado correspondente.

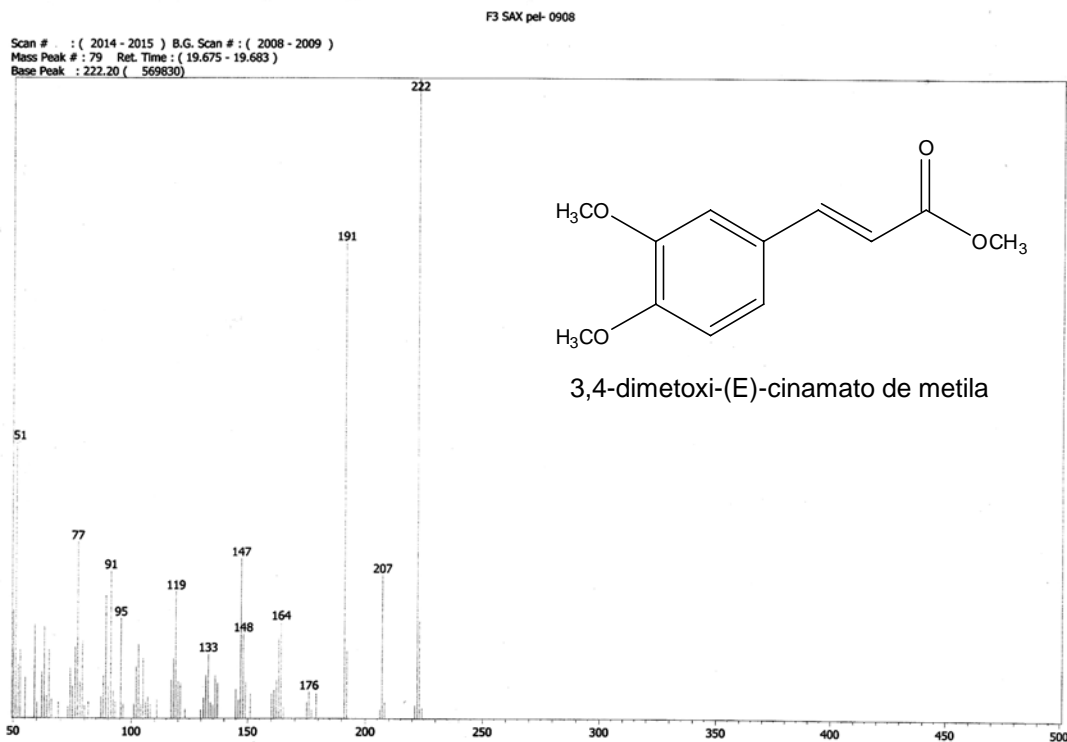


Figura 74: Espectro de massas do pico eluído em 19,7 min. (Fig. 63) obtido por CG-EM e estrutura proposta para o derivado correspondente.

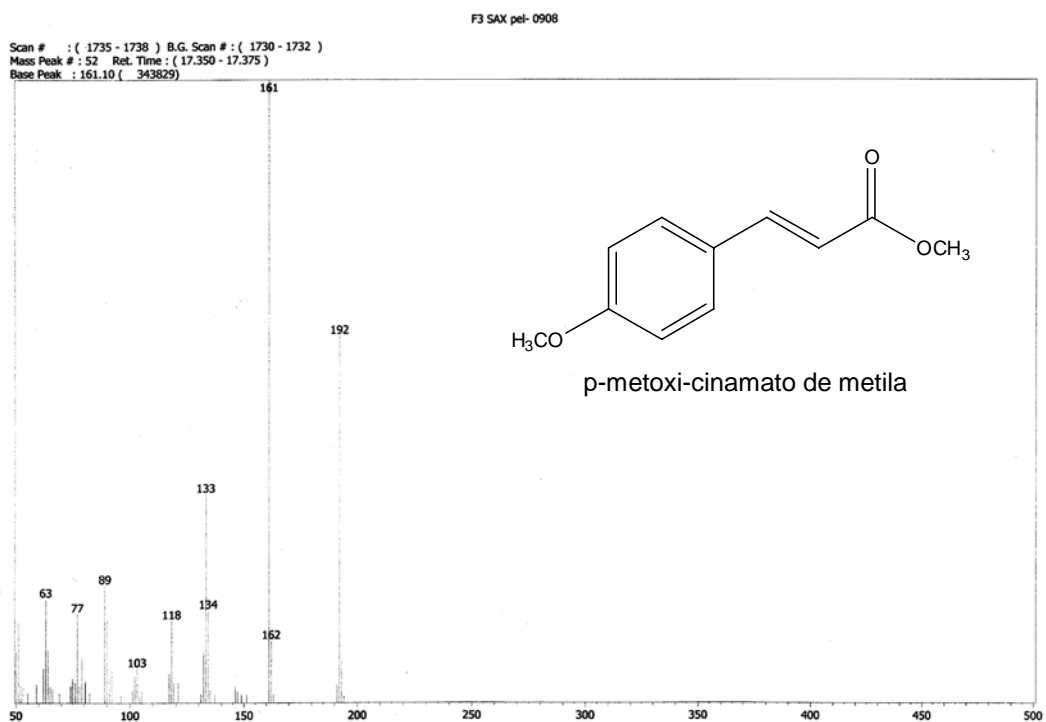


Figura 75: Espectro de massas do pico eluído em 17,4 min. (Fig. 63) obtido por CG-EM e estrutura proposta para o derivado correspondente.

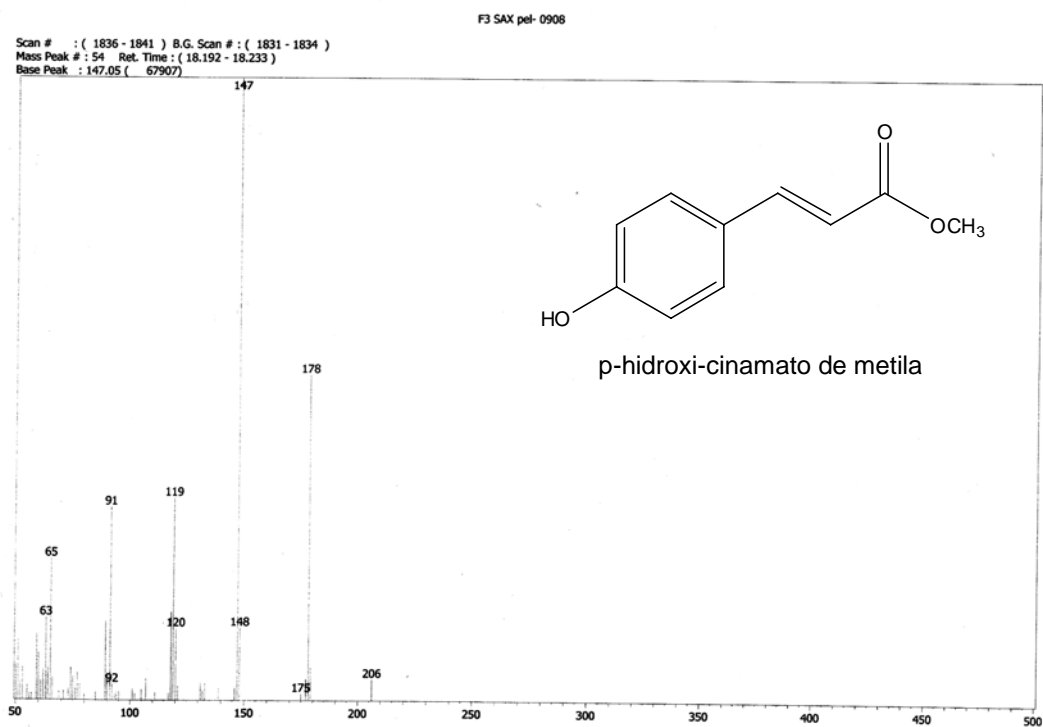


Figura 76: Espectro de massas do pico eluído em 18,2 min. (Fig. 63) obtido por CG-EM e estrutura proposta para o derivado correspondente.

Quando o *pellet* recuperado após a obtenção do extrato aquoso foi previamente tratado com EtOH 70 % e água purificada (*pellet* 2008), a concentração de ácido protocatecuico entre os produtos de hidrólise básica caiu consideravelmente (Fig. 77), sugerindo que este seja apenas um contaminante gerado por degradação de antocianinas residuais. Por outro lado, embora o cromatograma da F3-SAX-*pellet*-2008 mostre apenas cinco picos principais (todos mais intensos que os picos correspondentes da marcha anterior), outros picos menores também poderiam corresponder a substâncias exclusivas desta fração. Os picos eluídos em 24,5 min., 25,2 min. e 29,9 min., com espectros no UV típicos de derivados cinâmicos (Fig. 77; *insert* b), não foram detectados na fração rica em ácidos fenólicos livres da marcha 2008 (Fig. 58) e, portanto, seriam constituintes exclusivos da fração ligada. A alta proporção de ácido *p*-hidroxi-benzóico pode ser verificada no cromatograma obtido a 260 nm (Fig. 77; *insert* a), o que sustenta a proposta feita por Chakraborty *et al.* (2006), a qual sugere que este ácido seja um marcador quimiotaxonômico para a família Palmae.

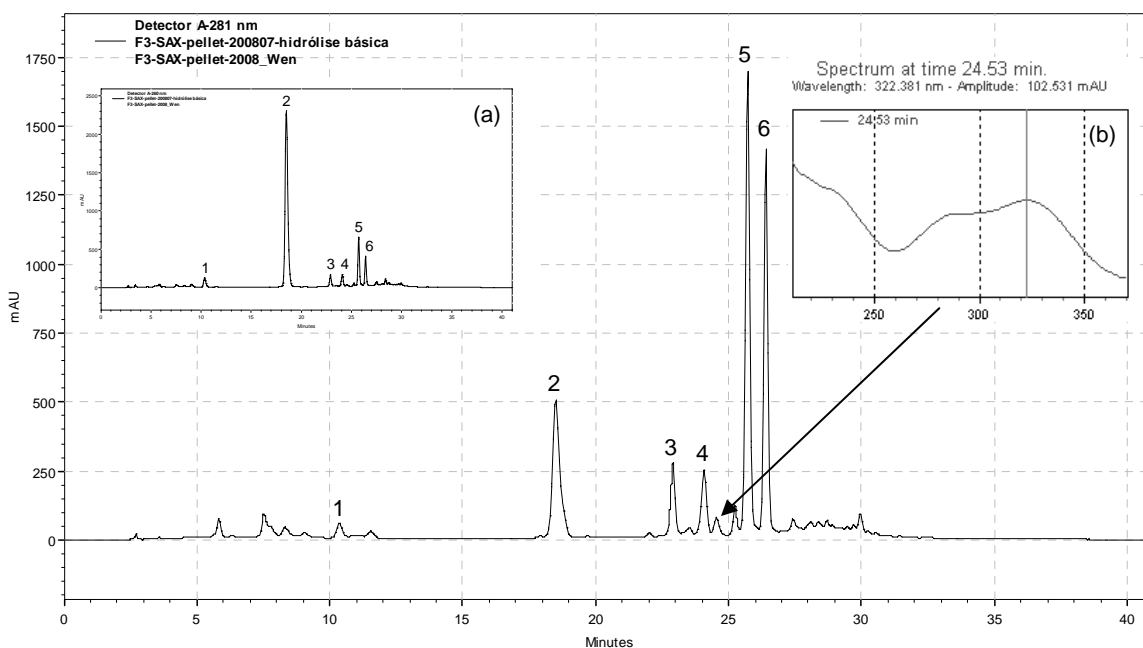


Figura 77: Cromatograma obtido por CLAE-DAD da F3-SAX-*pellet*-2008 a 280 nm. Condições cromatográficas: conforme descrito por Wen *et al.* (2005). Sinais identificados: ácido protocatecuico (1), ácidos *p*-hidroxi-benzóico e vanílico (2), ácido 3-(4-hidroxi)-fenil-2(Z)-propenóico (3), ácido 3-(3-metoxi-4-hidroxi)-fenil-2(Z)-propenóico (4), ácido ferúlico (5) e ácido *p*-cumárico (6). *Insert* a: mesmo cromatograma recuperado a 260 nm. *Insert* b: espectro obtido no UV para o pico eluído em 24,5 min.

A diferença de intensidade entre os principais picos obtidos em F3-SAX-*pellet*-0908 e F3-SAX-*pellet*-2008 poderia ser atribuída à diferença de tempo destinado à reação de hidrólise em cada marcha, o qual variou de alguns minutos (marcha 0908) para mais de duas horas (marcha 2008), conforme descrito no item 3.3.12. A influência do tempo na eficiência das reações de hidrólise básica para recuperação de fenólicos ligados à parede celular pode ser verificada em publicação relativamente recente (BONOLI *et al.*, 2004).

A análise por CG-EM da F3-SAX-*pellet*-2008 (Fig. 78) confirmou as propostas de identificação feitas para o cromatograma obtido por CLAE-DAD (Fig. 77), revelando, entre os picos mais intensos do cromatograma, os dois derivados do ácido *p*-hidroxi-benzóico (13,4 e 14,4 min.), um derivado do ácido *p*-cumárico (17,4 min.) e um derivado do ácido ferúlico (19,7 min.).

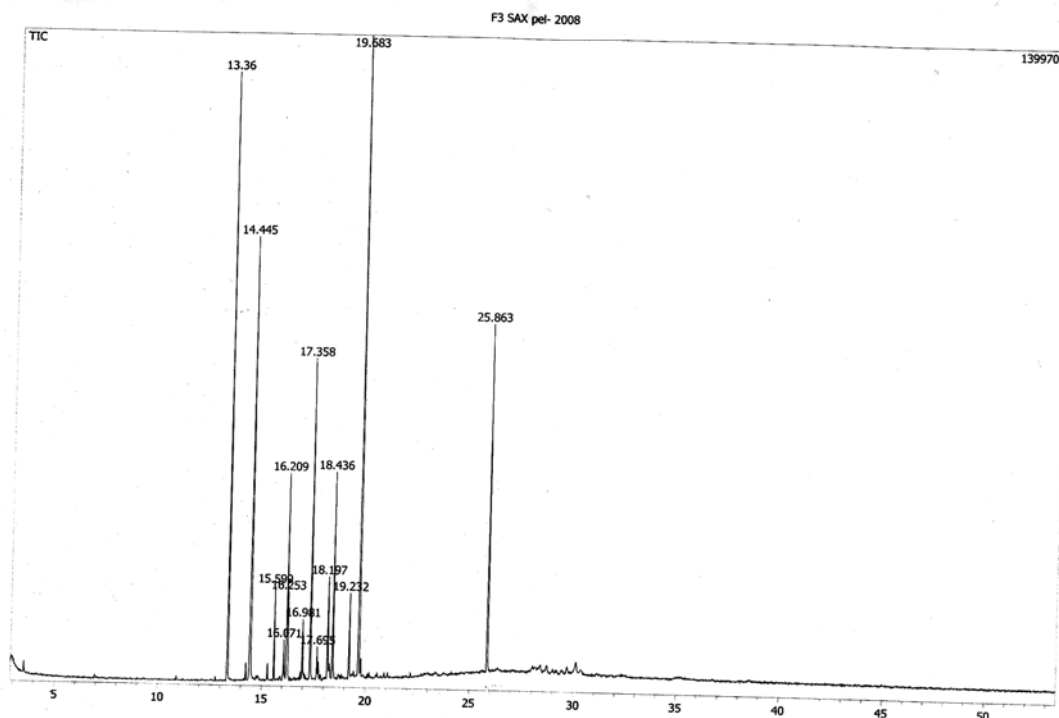


Figura 78: Cromatograma reconstruído da F3-SAX-*pellet*-2008 por CG-EM (CIT). Condições cromatográficas: conforme descrito no item 3.3.2. Os principais sinais estão indicados com seus respectivos valores de tempo de retenção.

Interessantemente, desta vez, nenhum derivado de ácido cítrico foi detectado, assim como nenhum derivado de ácido gálico ou siríngico, evidenciando que estes ácidos não são constituintes da fração ligada. A detecção de apenas dois derivados de ácido protocatecuico ou vanílico (16,1 e 16,2 min.) refletiu a baixa concentração de ácido protocatecuico nesta fração (Fig. 77; pico 1), o qual também não deve ser um constituinte real da fração ligada.

Ao contrário do que havia sido sugerido pelos resultados da marcha anterior, a presença do isômero “*cis*” do ácido *p*-cumárico foi confirmada aqui após a detecção de quatro derivados deste ácido, dois ésteres *p*-metoxilados e dois *p*-hidroxilados (figuras 79-82). A detecção do mesmo número de derivados do ácido ferúlico, eluídos em 17,7 min., 18,4 min., 19,2 min. e 19,7 min. (Fig. 78), confirmou a presença dos dois isômeros (*E* e *Z*) propostos anteriormente. Este é o primeiro relato que mostra a detecção destes isômeros *Z* em frutos de *E. oleracea* na literatura.

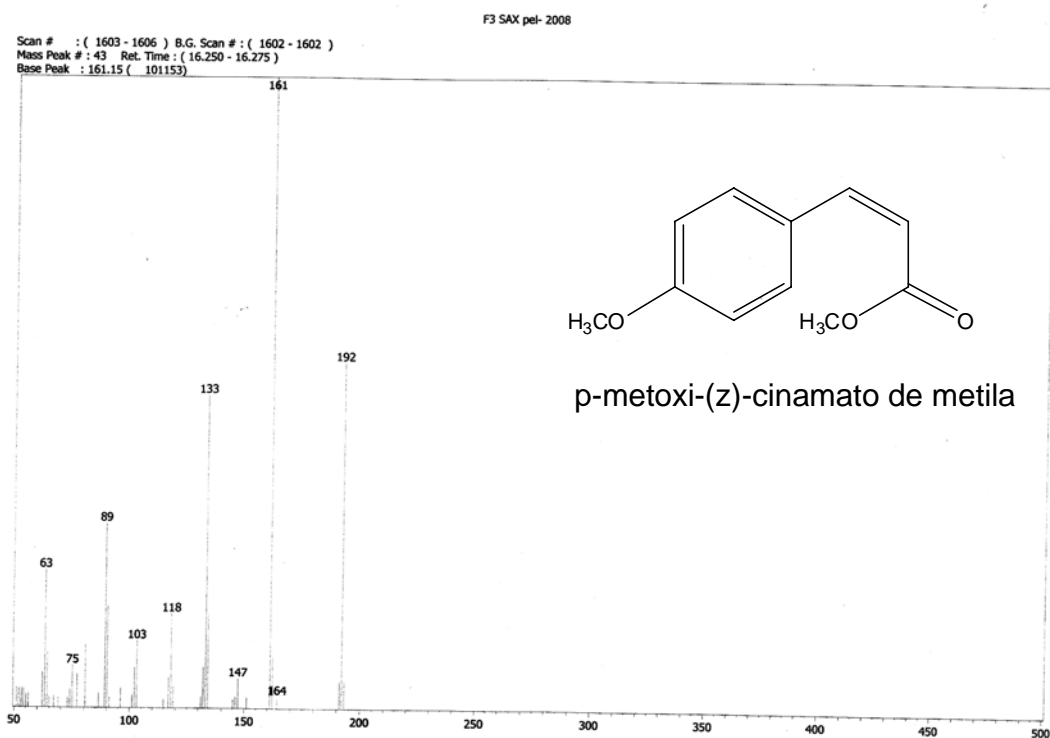


Figura 79: Espectro de massas do pico eluído em 16,3 min. (Fig. 78) obtido por CG-EM e estrutura proposta para o derivado correspondente.

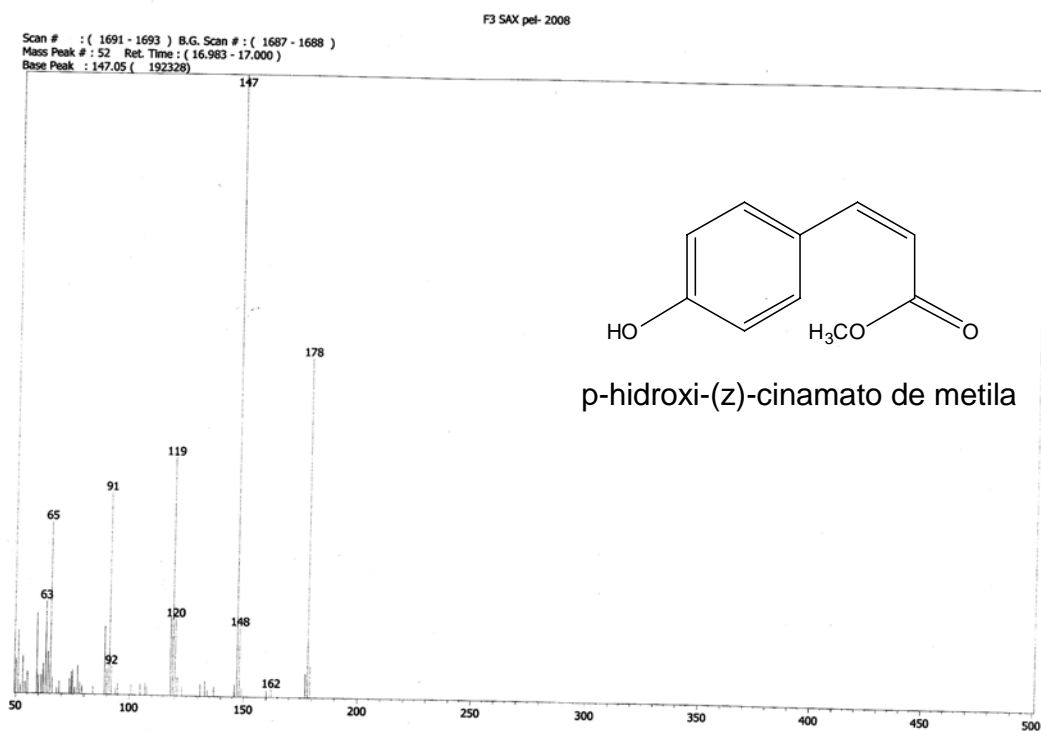


Figura 80: Espectro de massas do pico eluído em 17,0 min. (Fig. 78) obtido por CG-EM e estrutura proposta para o derivado correspondente.

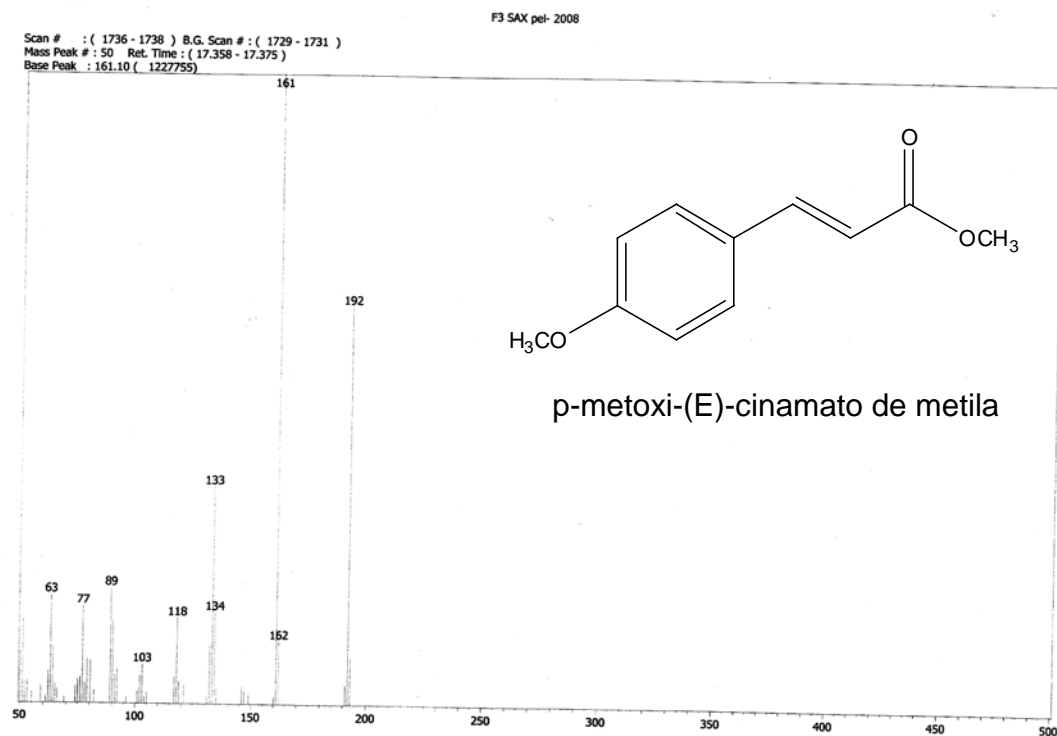


Figura 81: Espectro de massas do pico eluído em 17,4 min. (Fig. 78) obtido por CG-EM e estrutura proposta para o derivado correspondente.

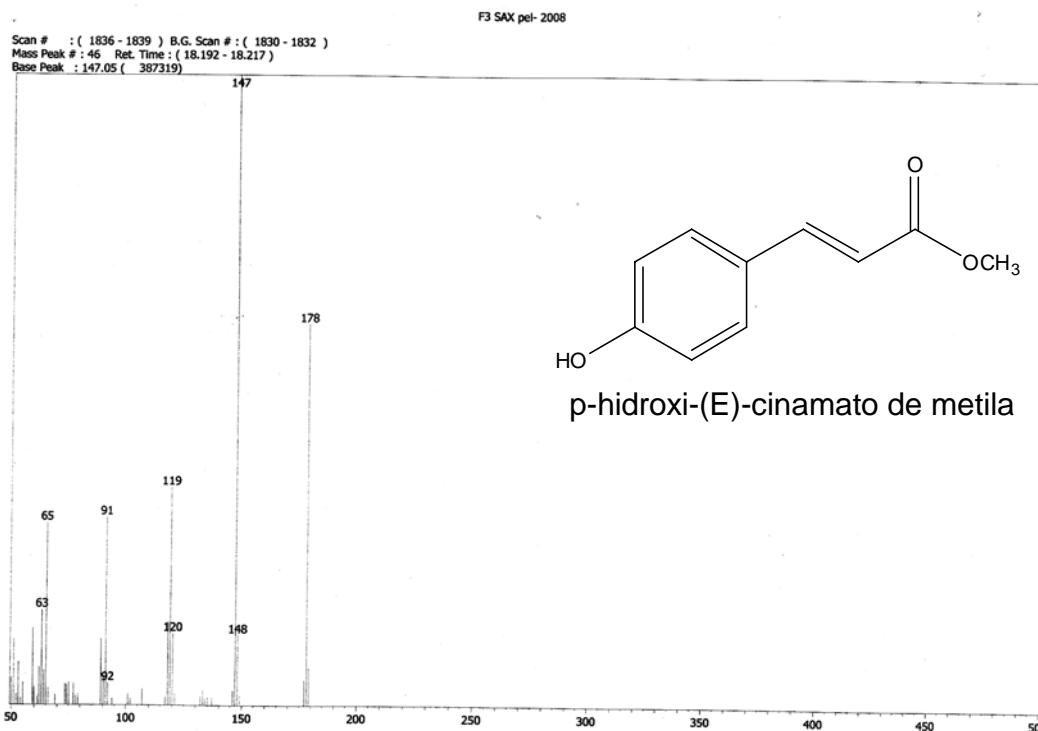


Figura 82: Espectro de massas do pico eluído em 18,2 min. (Fig. 78) obtido por CG-EM e estrutura proposta para o derivado correspondente.

Embora os resultados com a SAX tenham se tornado relativamente satisfatórios com o uso das soluções de AcONa 200 mM e 50 mM (item 3.3.12), o ajuste do pH da fração a ser submetida à EFS continuou sendo uma dificuldade a ser superada; em parte, devido ao fato de se formar um tampão AcOH / AcO⁻ quando o pH da fração ácida atingia o valor do pKa do ácido acético (~ 4,8). Assim, para se alcançar o valor de pH desejado (entre 7 e 8), foi sempre necessário um volume considerável (mais de 4 mL) de sol. AcONa 200 mM, suficiente para consumir todas as formas ácidas do tampão que se formava. Na maioria das vezes, após adição de 4 mL de sol. AcONa 200 mM, passava-se a utilizar a sol. de NaOH 3 % (p/v) para se conseguir uma redução do volume final de aplicação. Além disso, quando o tampão era “vencido”, a variação do valor de pH tornava-se grande para pequenos volumes de sol. AcONa 200 mM ou NaOH 3 % (p/v) adicionada, o que algumas vezes proporcionava erros (os valores de pH chegavam a 10 ou 11) e, para se corrigir novamente o pH, a adição de ácido tinha que ser bem controlada para não se atingir novamente a região do tampão AcOH / AcO⁻.

Portanto, com o intuito de se propor uma metodologia mais prática e reprodutível, decidiu-se testar o uso da solução Na_2HPO_4 100 mM para dissolver a fração amostra e o uso de um tampão Na_2HPO_4 / HCl 50 mM (pH = 7) para as etapas de condicionamento e lavagem (item 3.3.14). O uso da solução Na_2HPO_4 100 mM para neutralizar a fração ácida teria a vantagem de tender a gerar um tampão na faixa de pH desejado, já que o pKa do ácido conjugado correspondente (H_2PO_4^-) é igual a 7,2. Entretanto, nesta concentração, a solução de Na_2HPO_4 prestou-se muito bem apenas para amostras não muito ácidas, como a fração ligada, obtida a partir do *pellet* previamente tratado com EtOH 70 % e H_2O (Fig. 83).

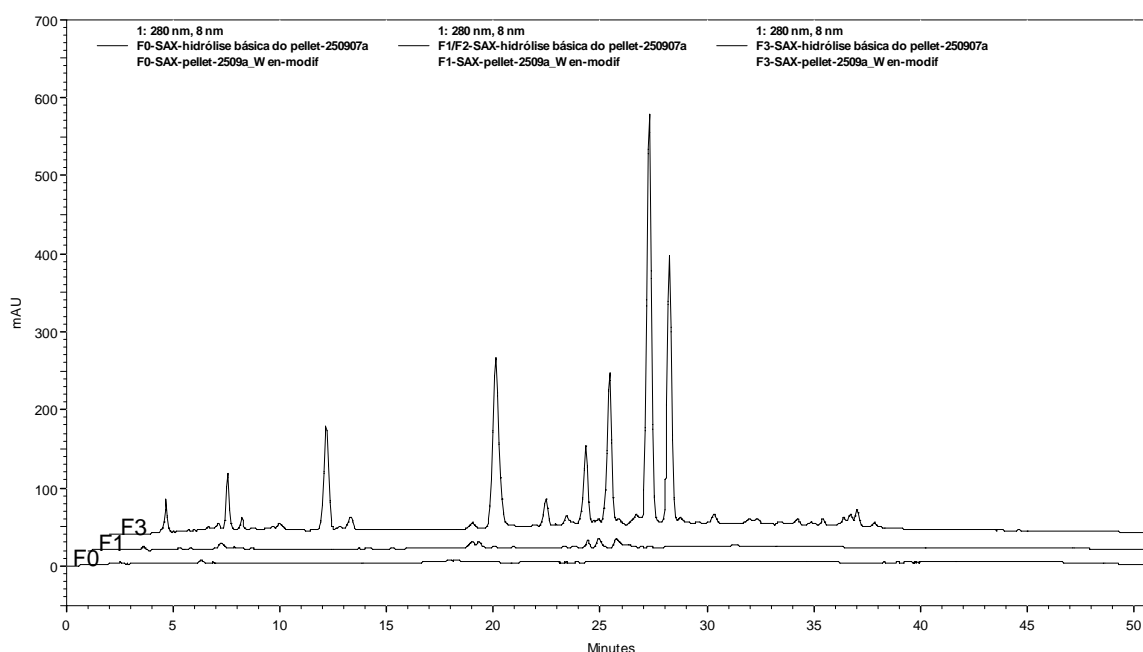


Figura 83: Cromatogramas sobrepostos das frações F0, F1 e F3-SAX-*pellet*-2509a (frações obtidas por marcha não descrita) a 280 nm. Condições cromatográficas: conforme método descrito por Wen *et al.* (2005) com as modificações propostas no item 3.3.2.

Embora o *pellet* 2509a tenha sido submetido a um tratamento prévio com EtOH 70 % e H_2O (item 3.3.14), um pico intenso de ácido protocatecuico pôde ser detectado na F3-SAX-*pellet*-2509a (Fig. 84), contrariando a proposta de haver degradação de antocianinas residuais. Entretanto, como o extrato aquoso desta marcha foi obtido com sol. ATFA 0,1 % (marcha não descrita), é possível que a alta proporção de ácido protocatecuico em F3-SAX-*pellet*-2509a se deva à extração ineficiente das antocianinas pela sol. ATFA 0,1 % (fato visivelmente

perceptível), o que teria aumentado a quantidade de antocianinas residuais no *pellet*. A detecção de ácido gálico e ácido caféico nesta fração (Fig. 84) confirma a proposta de extração ineficiente pela sol ATFA 0,1 %.

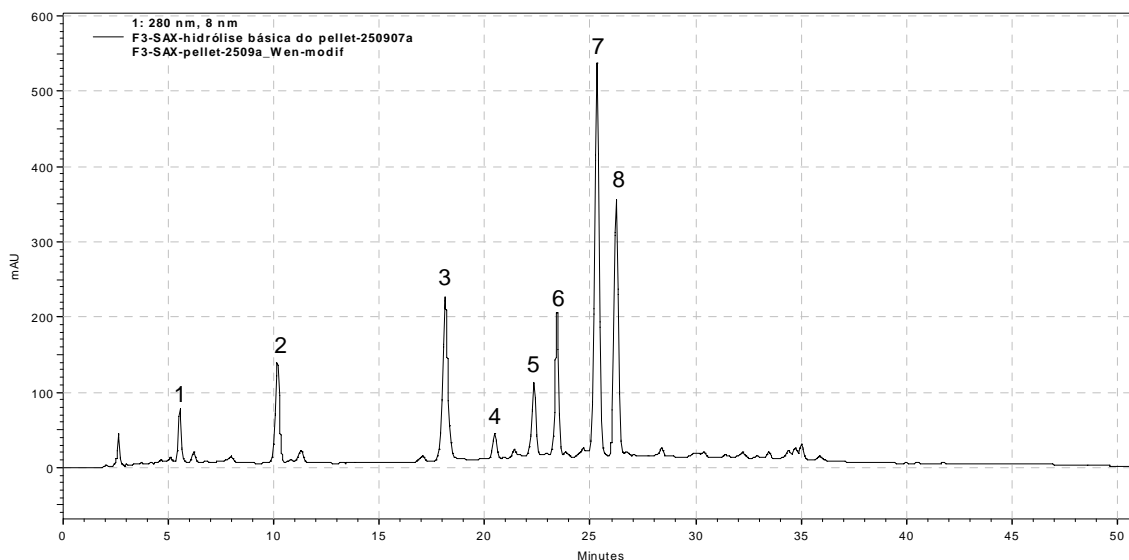


Figura 84: Cromatograma obtido por CLAE-DAD da F3-SAX-*pellet*-2509a a 280 nm. Condições cromatográficas: conforme método descrito por Wen *et al.* (2005) com as modificações propostas no item 3.3.2. Sinais identificados: ácido gálico (1), ácido protocatecuico (2), ácidos *p*-hidroxi-benzóico e vanílico (3), ácido caféico (4), ácido 3-(4-hidroxi)-fenil-2(Z)-propenóico (5), ácido 3-(3-metoxi-4-hidroxi)-fenil-2(Z)-propenóico (6), ácido ferúlico (7) e ácido *p*-cumárico (8).

4.3.6 Reações de derivatização com catalisador de transferência de fase

Com o objetivo de se obter apenas ésteres metílicos dos ácidos fenólicos, testou-se as técnicas de alquilação descritas no item 3.3.13, baseadas no método originalmente proposto por Fiamegos *et al.* (2004). Esta técnica, quando executada no pH adequado, deveria gerar apenas um derivado para cada ácido fenólico analisado e, conseqüentemente, cada derivado seria correlacionado com apenas um ácido fenólico precursor, o que evitaria dúvidas quanto a identificação deste último. Além disso, os ácidos presentes na fração obtida em AcOEt poderiam ser derivatizados e extraídos em uma só etapa, estando prontos para análise por CG-EM, sem a necessidade de um tratamento prévio por EFS.

O primeiro teste com a reação de derivatização com catalisador de transferência de fase (RDCTF) foi realizado com 2 mg de ácido gálico e 2 mg de ácido caféico como substratos, nas condições descritas no item 3.3.16. Como este primeiro teste não gerou resultados, modificou-se a quantidade de substratos e o tempo de reação, mas havia ainda uma grande preocupação com a adequada homogeneização do sistema, já que a reação tinha que ocorrer num sistema bifásico. Então, como a mudança dos parâmetros anteriores não gerou resultados satisfatórios, decidiu-se fazer uso do ultrassom por 60 min. com o objetivo de se substituir tanto o aquecimento como a agitação com barra magnética. Inesperadamente, nestas condições e utilizando-se ácido cinâmico como substrato, obteve-se não somente o seu éster metílico, mas também o respectivo éster butílico, evidenciando a existência de reações paralelas não previstas. A análise dos produtos da reação por CG-EM permitiu a detecção de quatro picos importantes e um sinal largo em aproximadamente 15 min. (Fig. 85).

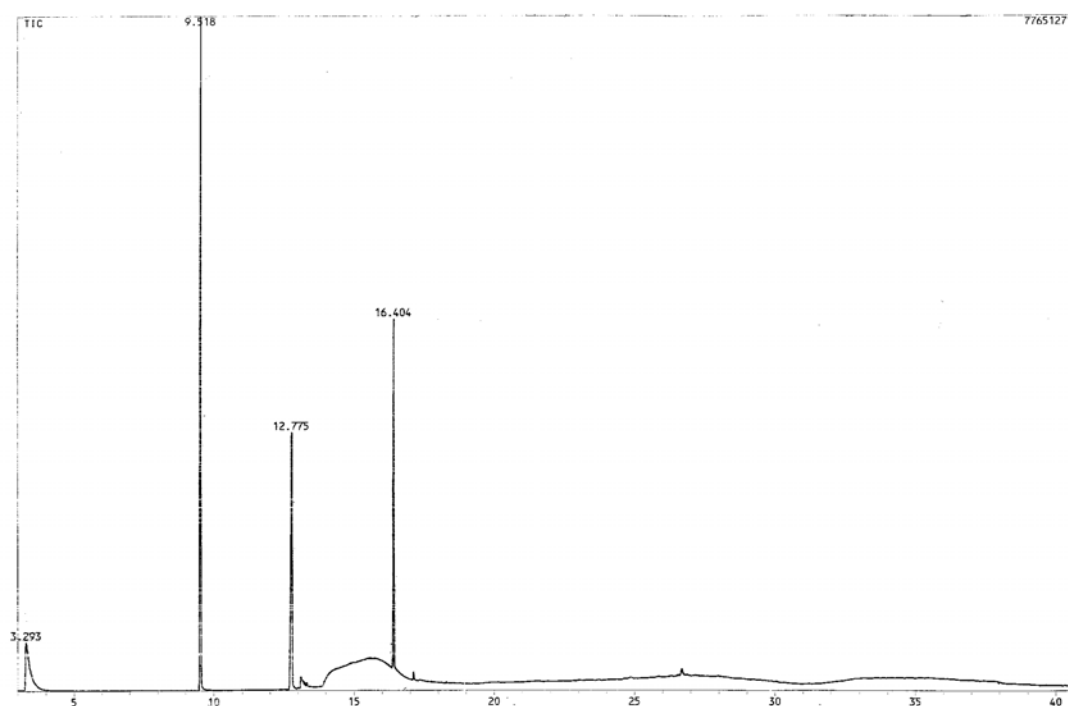


Figura 85: Cromatograma reconstruído da RDCTF-3 por CG-EM (CIT). Condições cromatográficas: item 3.3.2. Os principais sinais estão indicados com seus respectivos valores de tempo de retenção (min.).

A análise dos respectivos espectros de massas permitiu a identificação do pico eluído em 3,3 min. como iodeto de butila, um subproduto da reação. O pico eluído em 9,5 min. foi identificado como o catalisador de transferência de fase, brometo de tetrabutilamônio (BTBA), e o sinal largo foi identificado como tributilamina, um produto de degradação do BTBA. Os derivados do ácido cinâmico foram detectados em 12,8 min. e 16,4 min., o éster metílico (Fig. 86) e o éster butílico, outro subproduto da reação (Fig. 87).

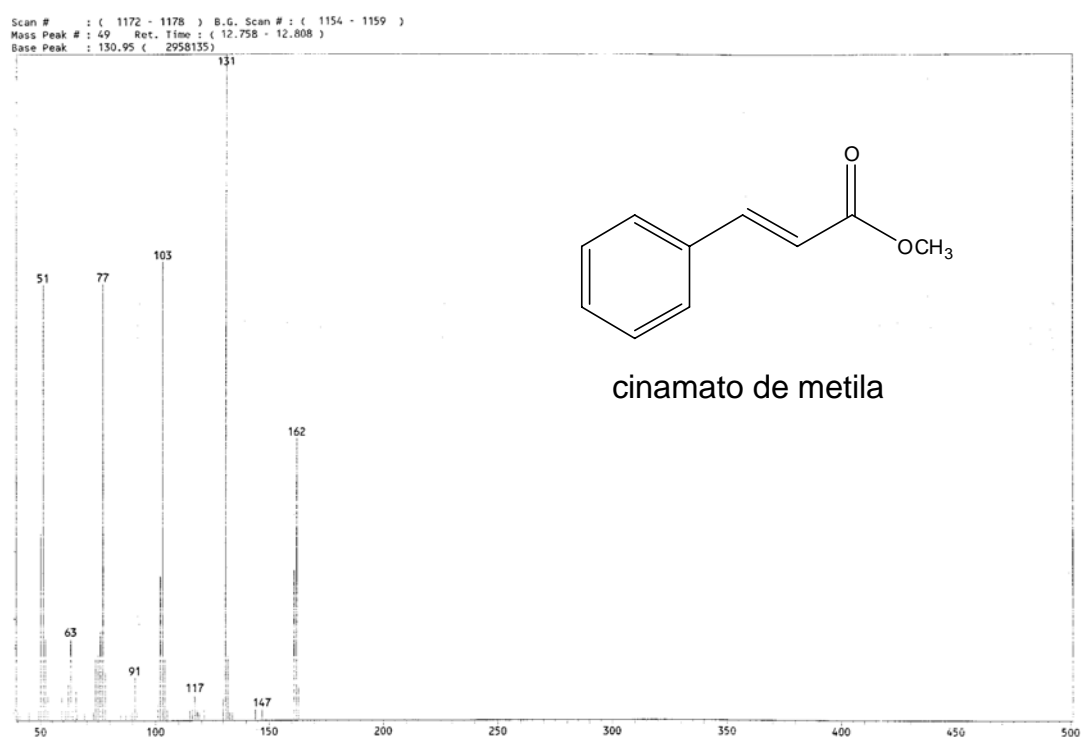


Figura 86: Espectro de massas do pico eluído em 12,8 min. (Fig. 85) obtido por CG-EM e estrutura proposta para o derivado correspondente.

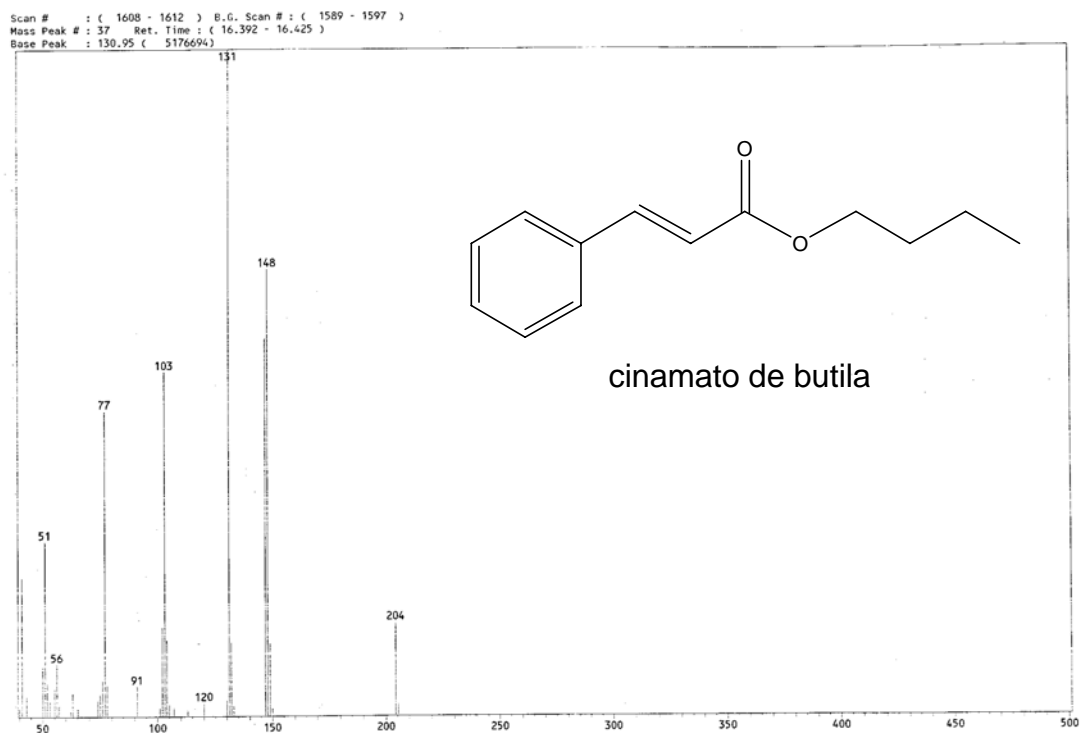


Figura 87: Espectro de massas do pico eluído em 16,4 min. (Fig. 85) obtido por CG-EM e estrutura proposta para o derivado correspondente.

Embora a reação não tivesse ocorrido da maneira desejada, decidiu-se testar novamente o uso do ultrassom com uma mistura de 20 mg de substratos, a qual continha os ácidos gálico, cinâmico, *p*-cumárico e siríngico, como descrito no item 3.3.16. Porém, a análise dos produtos de reação por CG-EM permitiu a detecção de apenas seis picos relevantes (Fig. 88), incluindo subprodutos, como o iodeto de metila (3,3 min.), e reagentes como o BTBA (9,6 min.). Portanto, entre os derivados de interesse, foram identificados o éster metílico (12,7 min.) e o éster butílico (16,4 min.) do ácido cinâmico, também detectados anteriormente. O pico detectado em 14,1 min. foi identificado como o próprio ácido cinâmico (Fig. 89), um dos substratos da reação.

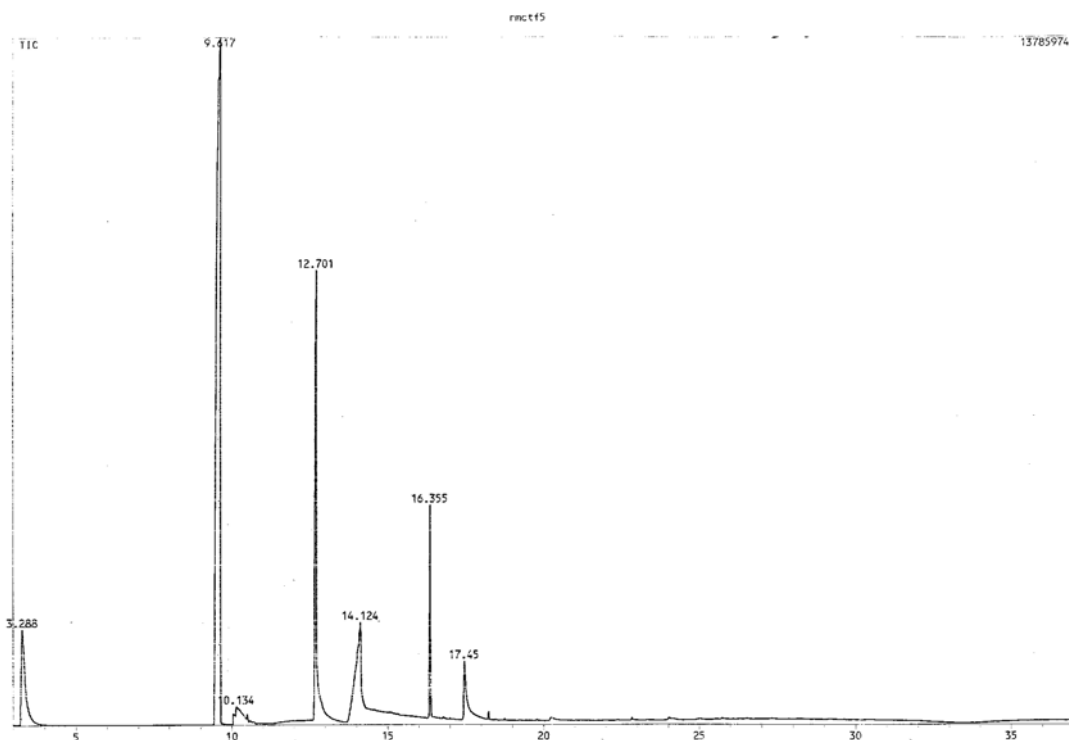


Figura 88: Cromatograma reconstruído da RDCTF-5 por CG-EM (CIT). Condições cromatográficas: item 3.3.2. Os principais sinais estão indicados com seus respectivos valores de tempo de retenção (min.).

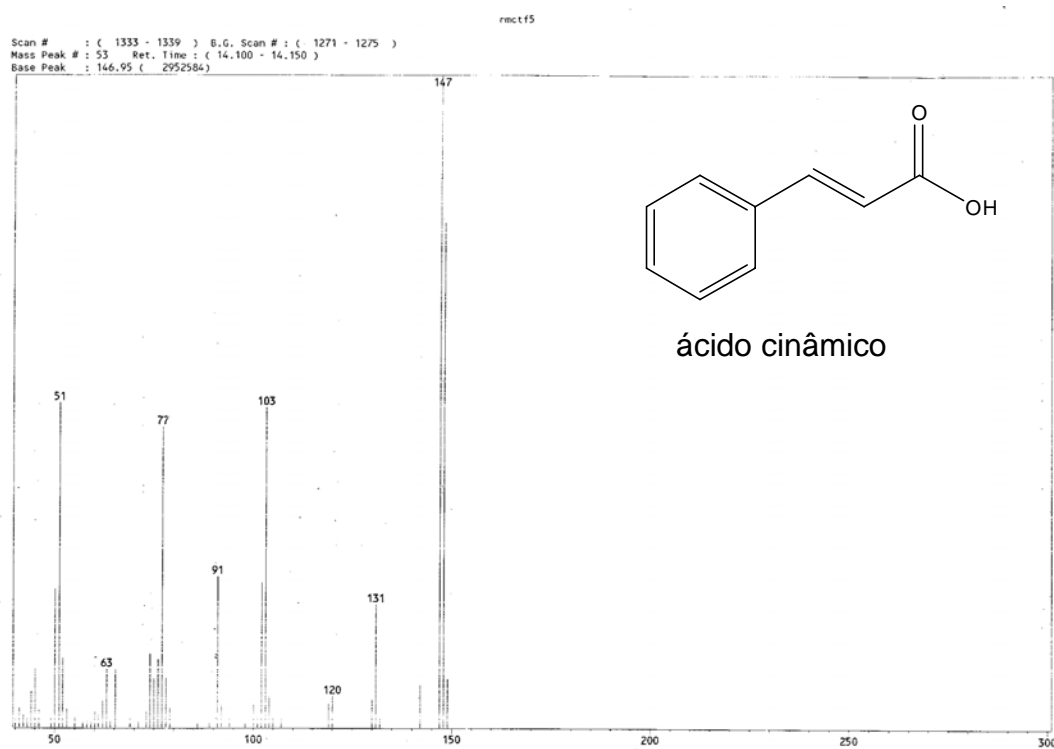


Figura 89: Espectro de massas do pico eluído em 14,1 min. (Fig. 88) obtido por CG-EM e estrutura proposta para o derivado correspondente.

Além do ácido cinâmico, apenas o ácido siríngico gerou derivados detectáveis por esta reação, o éster metílico em 17,5 min. (Fig. 90) e o éster butílico em 20,2 min. (Fig. 91), quase não detectado. A ausência de derivados de ácido gálico e de ácido *p*-cumárico sugeriu que apenas os derivados mais voláteis estivessem sendo detectados nas condições de análise destes ensaios.

Admitindo a possibilidade de ainda haver erros relacionados com a metodologia, testou-se a reação com quantidades menores de ácidos fenólicos e quantidades maiores de catalisador, inclusive com brometo de tetracetilamônio (BTCA), mas nenhuma das reações geraram derivados detectáveis. Um teste feito com uma fração obtida em AcOEt revelou que apenas ácidos graxos podiam ser derivatizados por esta técnica (dado não mostrado).

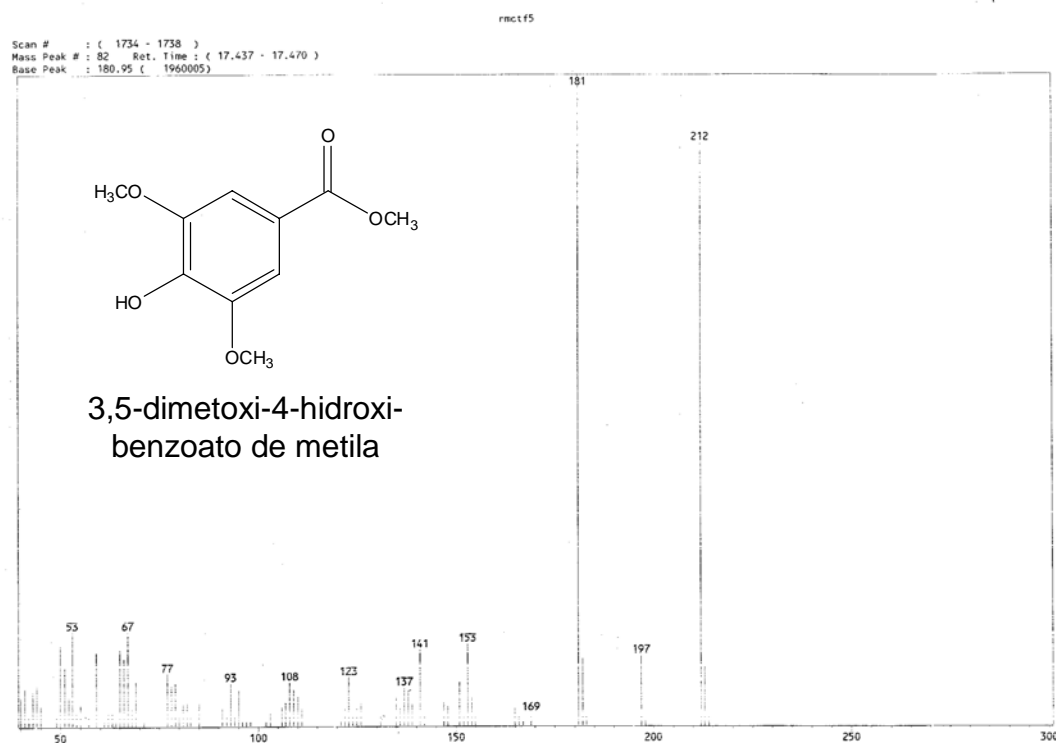


Figura 90: Espectro de massas do pico eluído em 17,5 min. (Fig. 88) obtido por CG-EM e estrutura proposta para o derivado correspondente.

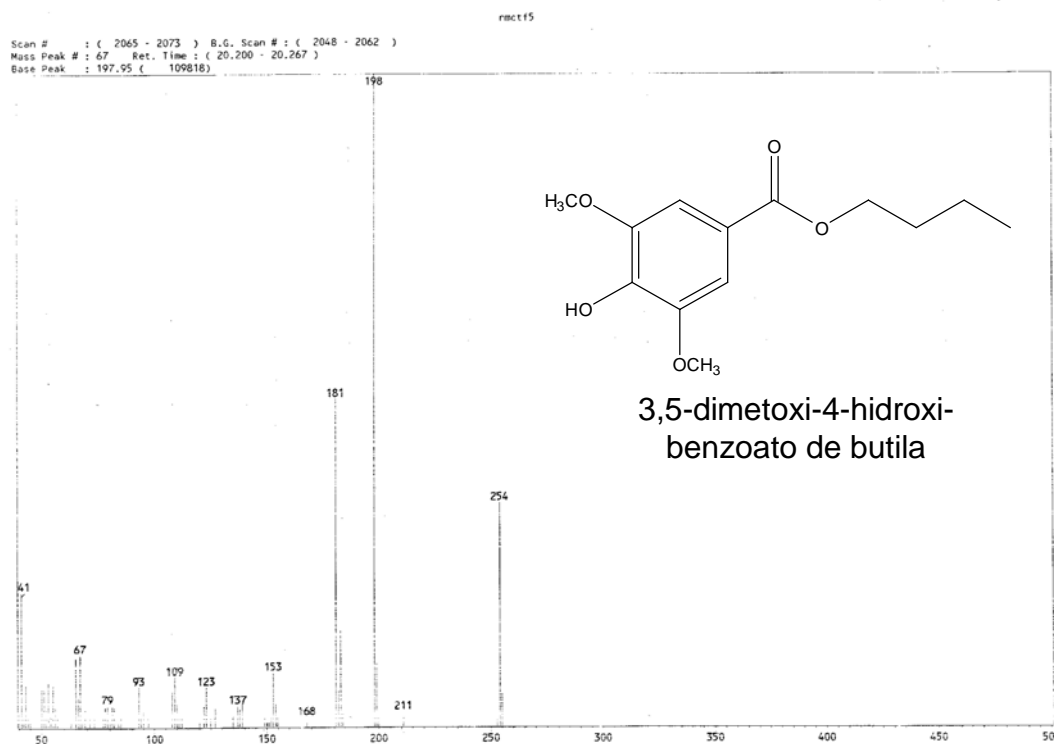


Figura 91: Espectro de massas do pico eluído em 20,2 min. (Fig. 88) obtido por CG-EM e estrutura proposta para o derivado correspondente.

4.4 Flavonóides

4.4.1 Análise por CCD

Nenhuma mancha típica de flavonóides foi detectada após a análise por CCD em placas de gel de sílica nas condições descritas no item 3.3.6. Como a detecção de flavonóides já havia sido relatada por outros autores (GALLORI *et al.*, 2004; INSFRAN *et al.*, 2004; LICHTENTHÄLER *et al.*, 2005; SCHAUSS *et al.*, 2006a; PACHECO *et al.*, 2007), este resultado poderia sugerir que a sol. ATFA 0,5 % seria ineficiente em extrair flavonóides, ou ainda, que a partida de 100 mg de açaí liofilizado seria insuficiente para fornecer quantidades detectáveis destes polifenóis. Daí, decidiu-se primeiro testar partidas com quantidades maiores de material liofilizado, utilizando-se a mesma solução extratora.

4.4.2 Extração em fase sólida com celulose e fracionamento em coluna sob média pressão

Exceto para antocianinas, a obtenção de extratos totalmente aquosos em protocolos destinados à detecção de glicosídeos de flavonóides não é uma prática comum na literatura (BLOOR, 2001). Embora Lichtenthäler *et al.* (2005) tenham relatado recentemente a detecção de rutina⁴³ em extratos aquosos de amostras de açaí liofilizado, todos os outros glicosídeos de flavonóides já detectados em *E. oleracea* foram extraídos por soluções hidroalcoólicas acidificadas (GALLORI *et al.*, 2004; SCHAUSS *et al.*, 2006a). Interessantemente, entre os flavonóides não glicosilados, apenas catequina e epicatequina foram citados, justamente naqueles relatos onde não se descreve a utilização de soluções hidroalcoólicas (INSFRAN *et al.*, 2004; LICHTENTHÄLER *et al.*, 2005; PACHECO *et al.*, 2007). Portanto, baseando-se nestes e em outros argumentos, não era de se esperar que a extração de glicosídeos de flavonóides fosse muito eficiente com o uso da solução ATFA 0,5 % em H₂O. Mesmo assim, a análise por CLAE da F4-celulose-0712 (removida com MeOH; item 3.3.9) já evidenciava a presença de polifenóis com absorção no UV típica de flavonóides (Fig. 92).

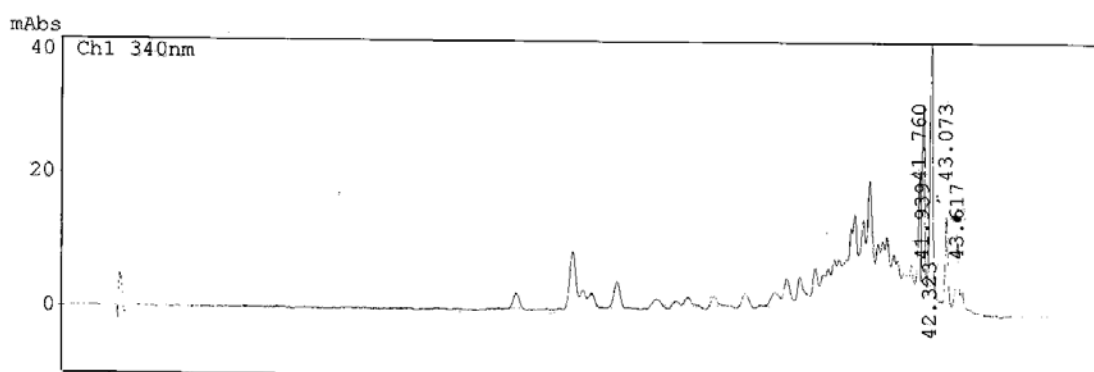


Figura 92: Cromatograma obtido por CLAE da F4-celulose-0712 a 340 nm. Condições cromatográficas: conforme descrito por Sumere *et al.* (1993). Alguns sinais estão indicados com seus respectivos valores de tempo de retenção.

⁴³ Quercetina 3-O-rutinosídeo.

Como mencionado anteriormente, pretendendo-se melhorar a detectabilidade dos flavonóides, decidiu-se aumentar a massa de material de partida para 5 g de açaí liofilizado. Entretanto, mesmo com esta modificação, a detecção de flavonóides por extração com ATFA 0,5 % só se tornou satisfatória com o uso da técnica de EFS com o cartucho SAX. Antes do uso da SAX, fez-se alguns testes com soluções metanólicas acidificadas para a obtenção de extratos totais ricos em flavonóides, como o descrito no item 3.3.11. No primeiro teste (marcha não descrita), utilizou-se MeOH / AcOH (90:10; v/v) como solução extratora, mas os procedimentos subsequentes serviram apenas de experiência para a elaboração de uma marcha mais adequada. Portanto, como o extrato total obtido era muito rico em antocianinas e estas são melhor separadas por condições cromatográficas que usam soluções de ácido fórmico, decidiu-se optar por uma solução metanólica deste ácido (item 3.3.11) para se ter um maior controle do tipo de resíduo ácido que apareceria em todas as frações obtidas nas análises subsequentes. O objetivo era fracionar o extrato total diretamente numa coluna de fase estacionária inversa (C_{18}) sob média pressão. Diante da existência de uma quantidade ainda apreciável de moléculas relativamente apolares, não removidas pelo tratamento com hexano em aparelho de Soxhlet, foi necessário um pré-tratamento do extrato total por EFS em uma coluna aberta, também com C_{18} . Após este segundo desgorduramento, o extrato total foi fracionado na coluna C_{18} sob média pressão. Os resultados obtidos após a análise por CLAE-DAD das sete frações recolhidas refletiu, em parte, o insucesso da tentativa de se fazer um gradiente crescente com a fase metanólica (item 3.3.11), utilizando-se de duas bombas peristálticas.

Porém, interessante, a primeira fração recolhida (F1-RP18-1106) permitiu a detecção de, pelo menos, nove picos com absorção típica de antocianinas, a 520 nm (Fig. 93). Entre os pigmentos mais abundantes, além de cianidina 3-glicosídeo e cianidina 3-rutinosídeo (picos 4 e 5), foram detectadas duas antocianinas com tempo de retenção bastante curto (3,0 e

3,7 min.; picos 1 e 2), o que sugeriu a presença de mais de um diglicosídeo 3,5, ambos ainda não citados na literatura. Por outro lado, de acordo com os relatos de Gallori *et al.* (2004) e Schauss *et al.* (2006a), dois dos picos 6, 7 e 8 corresponderiam a peonidina 3-glicosídeo e peonidina 3-rutinosídeo, os quais também foram detectados por EM-IES (item 4.2.1). A detecção de antocianinas não detectadas anteriormente em extratos aquosos totais, obtidos pelo uso de ATFA 0,5 % em H₂O e por marchas com partidas de 5 g de açaí liofilizado (dado não mostrado), sugere que o uso de soluções aquosas com ATFA não é adequado para a extração completa das antocianinas presentes nos frutos de *E. oleracea*. Outros dois glicosídeos de flavonóides, provavelmente homoorientina e orientina, também puderam ser detectados quando o cromatograma foi visualizado a 350 nm (Fig. 94). A banda a 521 nm, presente no espectro obtido para orientina, é devida a um rastro de antocianinas presente em quase todo o cromatograma.

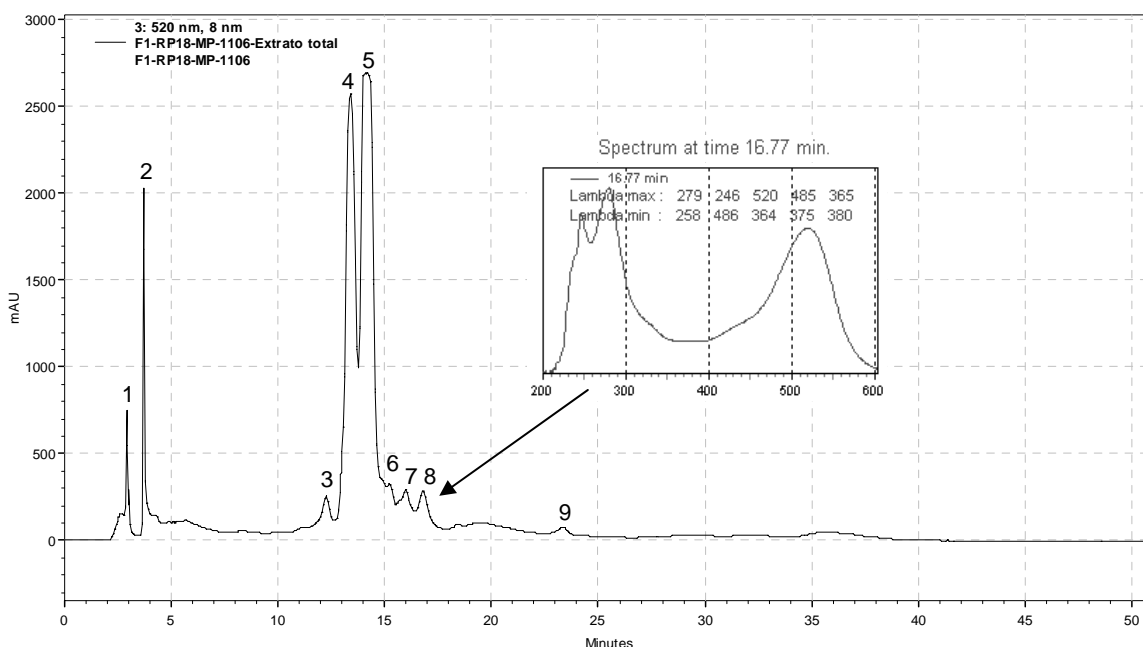


Figura 93: Cromatograma obtido por CLAE-DAD da F1-RP18-1106 a 520 nm. Condições cromatográficas: conforme descrito por Sumere *et al.* (1993). Sinais identificados: cianidina 3,5-diglicosídeo (2), cianidina 3-sambubiosídeo (3), cianidina 3-glicosídeo (4) e cianidina 3-rutinosídeo (5).

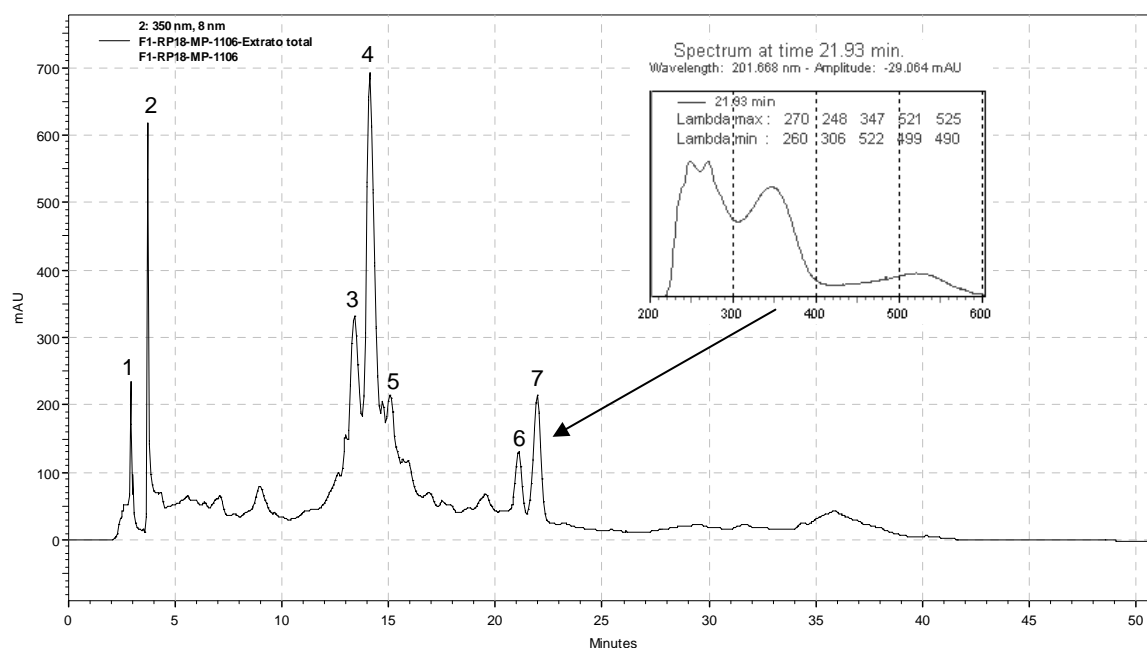


Figura 94: Cromatograma obtido por CLAE-DAD da F1-RP18-1106 a 350 nm. Condições cromatográficas: conforme descrito por Sumere *et al.* (1993). Sinais identificados: cianidina 3-glicosídeo (3), cianidina 3-rutinosídeo (4), homoorientina (6) e orientina (7).

Entre F2 e F6-RP18-1106, foram detectados os mesmos picos eluídos entre 15 e 30 min., os quais mostraram-se mais concentrados em F2 (Fig. 95). Mesmo analisando o cromatograma a 350 nm, seis picos bem resolvidos de antocianinas puderam ser detectados nesta fração, entre eles um ainda não citado para *E. oleracea* na literatura. Este seria um dos três sinais (picos 4, 5 e 6) que antecedem os C-glicosídeos de flavonas, entre os quais também se encontram os dois glicosídeos de peonidina.

A análise do cromatograma obtido por CLAE-DAD da F3-RP18-1106 a 520 nm (Fig. 96) permitiu ainda a detecção de mais dois picos de antocianinas, co-eluídos com os picos de cianidina 3-glicosídeo e cianidina 3-rutinosídeo. Estes, provavelmente, corresponderiam a outras duas antocianinas ainda não citadas na literatura para *E. oleracea*.

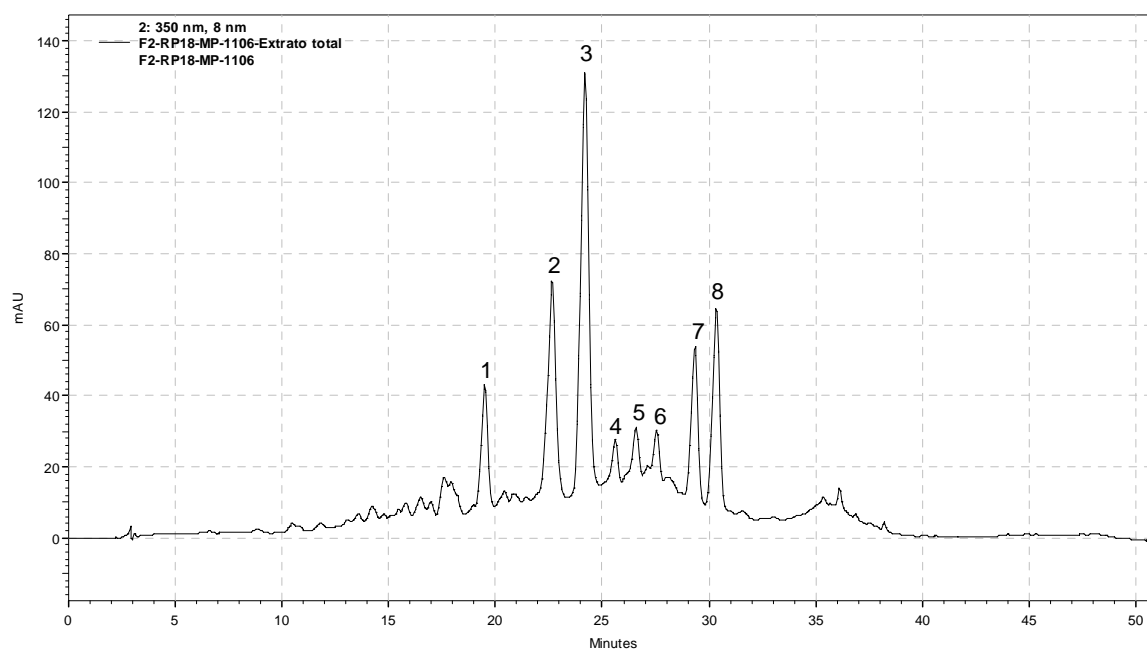


Figura 95: Cromatograma obtido por CLAE-DAD da F2-RP18-1106 a 350 nm. Condições cromatográficas: conforme descrito por Sumere *et al.* (1993). Sinais identificados: cianidina 3-sambubiosídeo (1), cianidina 3-glicosídeo (2), cianidina 3-rutinosídeo (3), homoorientina (7) e orientina (8).

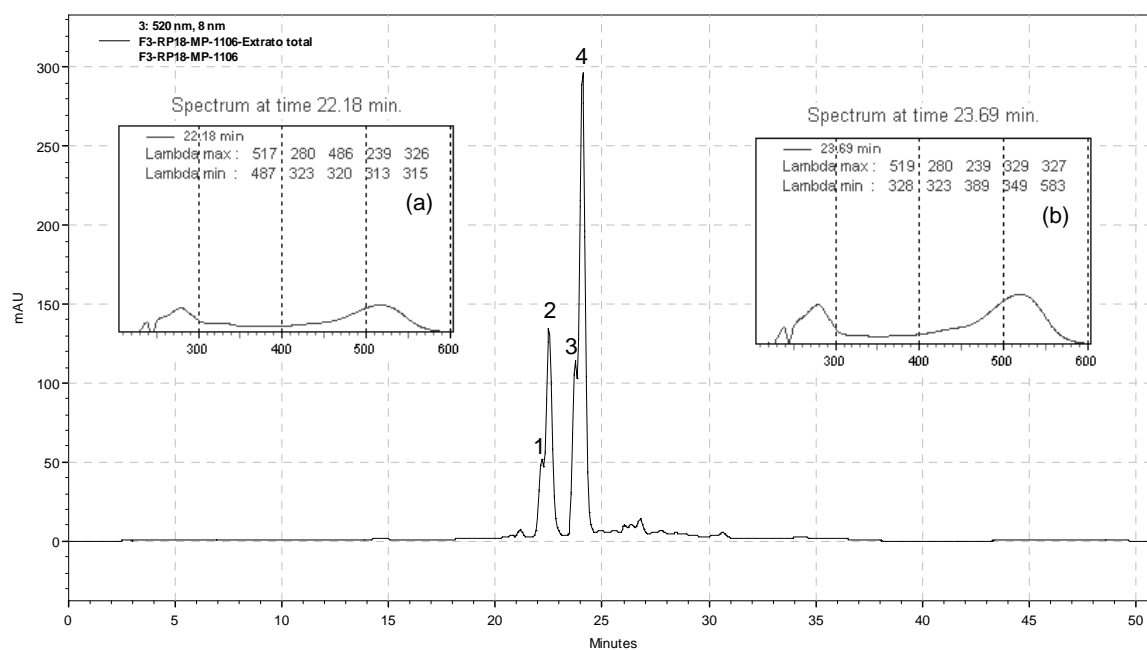


Figura 96: Cromatograma obtido por CLAE-DAD da F3-RP18-1106 a 520 nm. Condições cromatográficas: conforme descrito por Sumere *et al.* (1993). Sinais identificados: cianidina 3-glicosídeo (2), cianidina 3-rutinosídeo (4). *Insert a*: espectro obtido no UV para o pico 1. *Insert b*: espectro obtido no UV para o pico 3.

As substâncias mais apolares do extrato aplicado na coluna C_{18} foram recuperadas com MeOH acidificado numa sétima fração, a qual ainda continha quantidades consideráveis

de antocianinas e outros flavonóides, co-eluídos com diversas outras substâncias (dado não mostrado). Então, diante dos resultados pouco expressivos obtidos para flavonóides não antociânicos, decidiu-se investir tempo no recém adquirido cartucho SAX, com o qual se esperava obter frações isoladas de ácidos fenólicos e flavonóides, como citado anteriormente.

4.4.3 *Extração em fase sólida com SAX*

O primeiro resultado relevante para flavonóides com o uso da SAX foi obtido quando as condições da EFS ainda não estavam ajustadas para o isolamento da fração rica em ácidos fenólicos. O uso de tampão $\text{HCO}_3^- / \text{HCl}$ 50 mM (pH = 7) para suspender a fração amostra (obtida em AcOEt) e de H_2O para as etapas de condicionamento e lavagem (marcha 2307, não descrita) proporcionou um fracionamento inadequado dos ácidos fenólicos da fração de partida, mas concentrou os dois principais flavonóides (homoorientina e orientina) nas frações iniciais (F0 e F1-SAX-2307; figuras 97 e 98). Isto porque, além do tampão não ter sido adequado para neutralizar a fração amostra, as etapas de condicionamento e lavagem com água purificada (pH = 5-6) proporcionaram a redução ou a manutenção do pH em valores suficientemente baixos para remover, com eficiência, as espécies ionizáveis de pKa mais alto, como os dois flavonóides detectados, e também boa parte dos ácidos fenólicos. A baixa recuperação de ácidos fenólicos na F3-SAX-2307 pode ser verificada na figura 54 (cromatograma a 280 nm), na qual não foi possível visualizar o pico eluído em 14,5 min. ($\lambda_{\text{máx.}} = 340 \text{ nm}$), outro possível glicosídeo de flavonóide (Fig. 99).

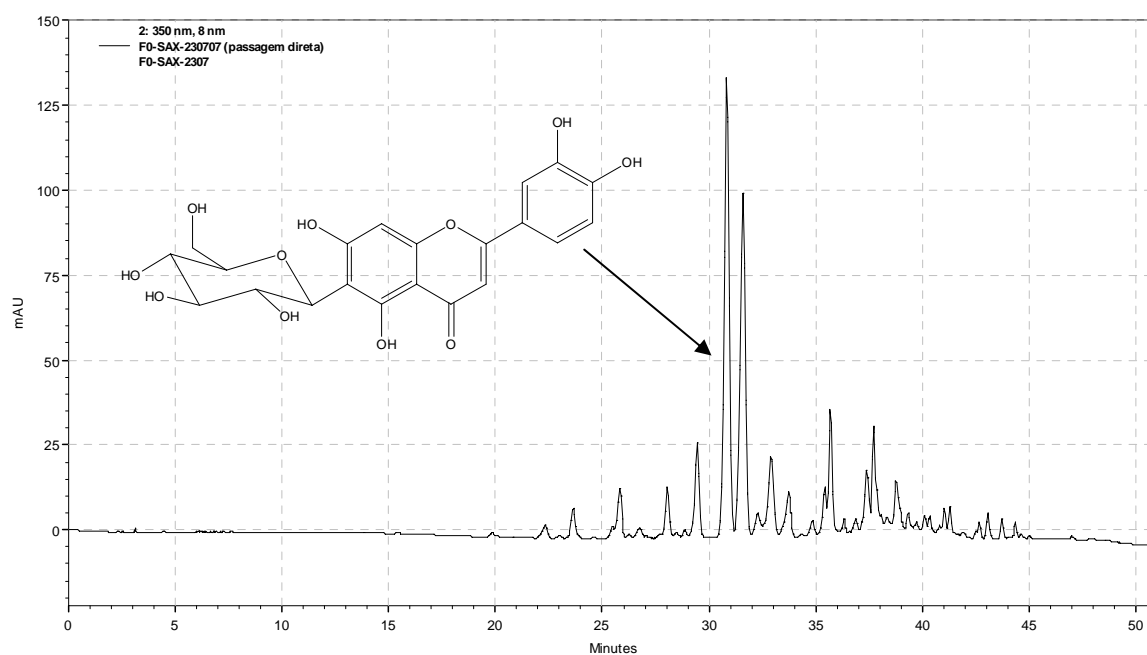


Figura 97: Cromatograma obtido por CLAE-DAD da F0-SAX-2307 a 350 nm. Condições cromatográficas: conforme descrito por Sumere *et al.* (1993). Sinal indicado por sua estrutura molecular: homoorientina.

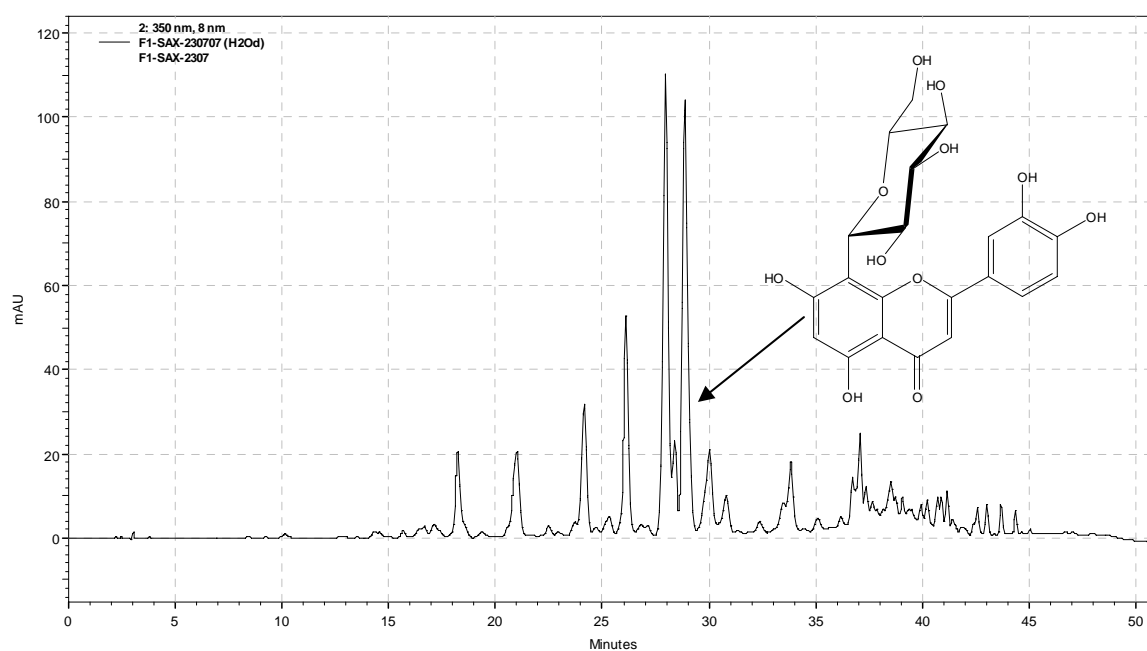


Figura 98: Cromatograma obtido por CLAE-DAD da F1-SAX-2307 a 350 nm. Condições cromatográficas: conforme descrito por Sumere *et al.* (1993). Sinal indicado por sua estrutura molecular: orientina.

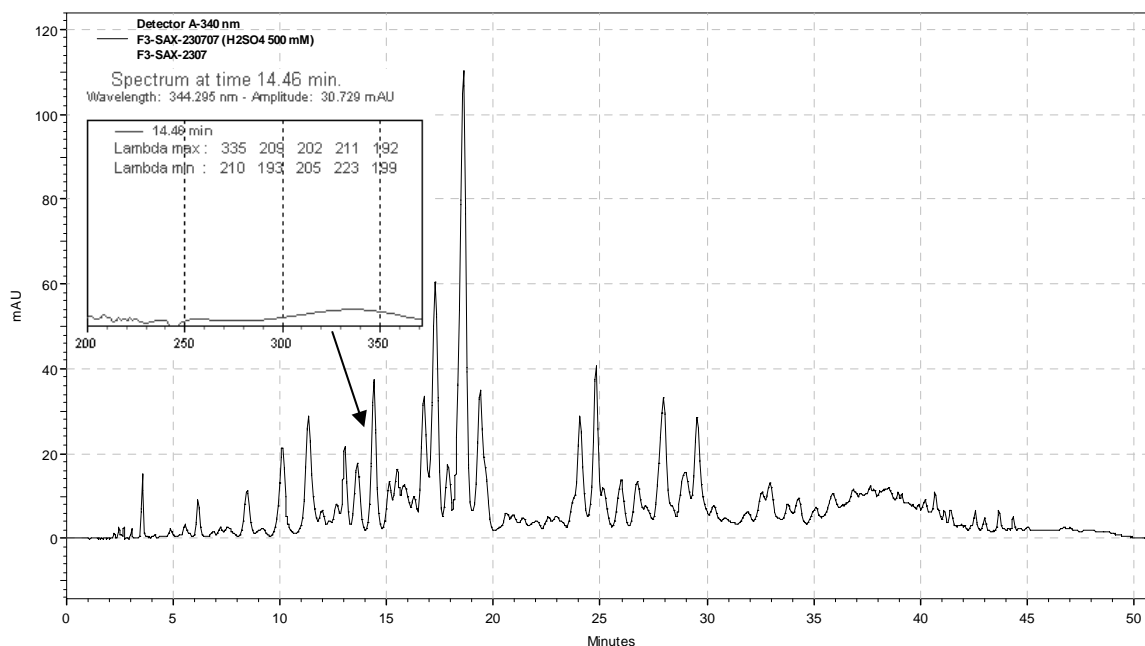


Figura 99: Cromatograma obtido por CLAE-DAD da F3-SAX-2307 a 340 nm. Condições cromatográficas: conforme descrito por Sumere *et al.* (1993).

Contudo, o melhor rendimento em glicosídeos de flavonóides com o uso do cartucho SAX foi obtido pela marcha 2008 (figuras 57-59), a qual permitiu a detecção de mais dois C-glicosídeos de flavonas, relatados anteriormente como isovitexina e seu isômero não identificado (GALLORI *et al.*, 2004; SCHAUSS *et al.*, 2006a). Entretanto, considerando a ordem de eluição citada para homoorientina e orientina (figuras 57, 97 e 98), conforme relatado por Gallori *et al.* (2004), poderia-se sugerir que a molécula identificada como isovitexina seria, na verdade, vitexina (Fig. 100) e o isômero não identificado isovitexina (Fig. 101). Assim, os valores de tempo de retenção citados para ambas anteriormente (Fig. 58) deveriam ser trocados.

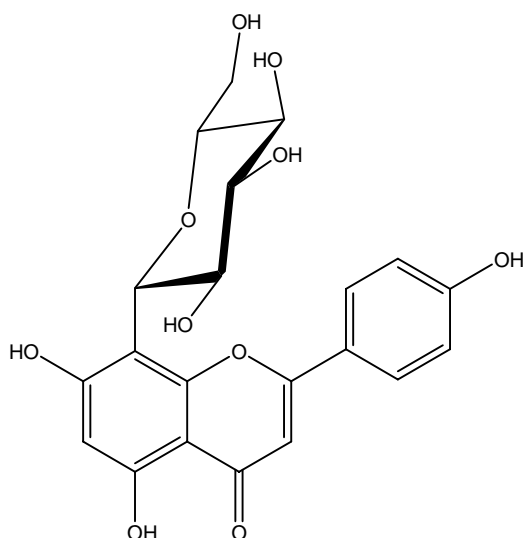


Figura 100: Estrutura da vitexina.

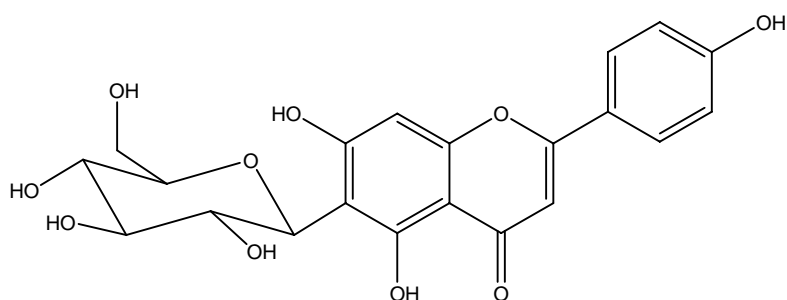


Figura 101: Estrutura da isovitexina.

4.4.4 Extração em fase sólida com poliamida

Embora os procedimentos com a SAX tenham permitido a detecção de cinco glicosídeos de flavonóides, dos quais quatro foram identificados, o número total destes polifenóis proposto na literatura para *E. oleracea* é ainda maior (GALLORI *et al.*, 2004; INSFRAN *et al.*, 2004; LICHTENTHÄLER *et al.*, 2005; SCHAUSS *et al.*, 2006a; PACHECO *et al.*, 2007). Então, considerando que uma parcela destes flavonóides poderia não estar sendo extraída pela sol. ATFA 0,5 % aquosa, resolveu-se voltar a experimentar os procedimentos com soluções metanólicas acidificadas. Desta vez, tomando como objetivo a obtenção de uma fração final rica em flavonóides e livre de antocianinas, decidiu-se utilizar a

sol. MeOH / ATFA 1 % em H₂O (90:10; v/v) para a obtenção do extrato total (item 3.3.13), o qual seria submetido, em seguida, a um segundo desengorduramento em coluna de fase inversa, como citado anteriormente. Este procedimento permitiu o isolamento de uma fração amarela, removida da coluna C₁₈ com a própria solução extratora, e de uma fração verde, removida com MeOH / CHCl₃ (1:1) (item 3.3.13).

A análise da fração amarela em espectrofotômetro revelou a presença de carotenóides, com bandas típicas em 421, 443 e 471 nm, mas revelou também que a fração não estava pura, mostrando bandas fracas em outros comprimentos de onda. Além disso, após concentração desta fração em evaporador rotatório (até 40°C), a análise por CG-EM revelou apenas a presença de fragmentos de carotenóides, além de ácidos graxos e esteróides já relatados na literatura (dado não mostrado). Por outro lado, como era de se esperar, a análise da fração verde em placa de gel de sílica exposta à luz ultravioleta (a 366 nm) revelou a presença de clorofilas, após visualização de manchas vermelhas características.

A fração de interesse (vermelha), contendo os polifenóis, seria particionada com AcOEt para se obter uma fração orgânica livre de antocianinas, a qual seria, em seguida, fracionada numa coluna de poliamida para a obtenção de uma fração rica em flavonóides e livre de ácidos fenólicos (item 3.3.13).

Após alguns testes com a poliamida em coluna para EFS, fez-se a proposta de que a resina, quando tratada com AcOEt, apresentaria mais afinidade para flavonóides do que para ácidos fenólicos. Isto porque, geralmente, os primeiros possuem mais hidroxilas fenólicas que estes últimos, sendo estas hidroxilas um dos grupos funcionais que, de fato, interagem com a poliamida (por ligações de hidrogênio com as carbonilas de seus grupos amida). Entretanto, também podem ocorrer interações com carboxilas de ácidos, fenólicos ou não, o que não ocorreria com flavonóides.

Contudo, buscando-se uma separação efetiva destes dois grupos de compostos fenólicos, o fracionamento da fração fenólica (obtida em AcOEt) da marcha 2509b em coluna de poliamida foi realizado conforme descrito no item 3.3.10. Após sua aplicação, eluiu-se mais 10 mL da solução metanólica utilizada para dissolver a fração amostra. A fração recolhida nesta etapa foi denominada F1-POL-2509b; a fração seguinte, recolhida durante a eluição da sol. AcOEt / MeOH / H₂O (3:5:5), foi denominada F2-POL-2509b; a fração recuperada com AcOEt puro foi denominada F3-POL-2509b; a fração recolhida durante a eluição da sol. CH₃CN / H₂O (60:40) com ATFA 0,1 % foi denominada F4-POL-2509b; a fração seguinte, eluída com a sol. CH₃CN / MeOH (1:1), foi denominada F5-POL-2509b; e a fração recuperada com acetona / MeOH (1:1) foi denominada F6-POL-2509b.

A análise por CLAE-DAD da F1-POL-2509b (Fig. 102) revelou que a sol. MeOH / H₂O (1:1) havia removido ácidos fenólicos, duas antocianinas residuais (não aparentes) e outras substâncias desconhecidas. Entre os ácidos fenólicos, os picos 3, 6, 7 e 8 seriam derivados cinâmicos não identificados e o pico 10 seria um provável derivado de ácido gálico, com banda no UV em 273 nm. O pico 9, o mais intenso do cromatograma, também não foi identificado, assim como o pico 5. A ausência de flavonóides não antociânicos nesta fração confirmou as expectativas de que a poliamida teria mais afinidade por estes polifenóis. Porém, ao contrário do que se esperava, boa parte deles foi eluída em F2-POL-2509b, junto com uma pequena porção de ácidos fenólicos quase indetectáveis (Fig. 103). Entre os flavonóides, detectou-se o par homorientina e orientina (picos 1 e 2) e outros dois glicosídeos de flavonas (picos 3 e 4), provavelmente isovitexina e vitexina, embora estivessem bem diluídas e com espectros não muito elucidativos (dado não mostrado). O pico 5, com banda no UV em torno dos 350 nm, poderia ser identificado como outro glicosídeo, provavelmente rutina. Outros três picos com espectros no UV típicos de flavonóides foram detectados no final do cromatograma (picos 5, 6 e 7).

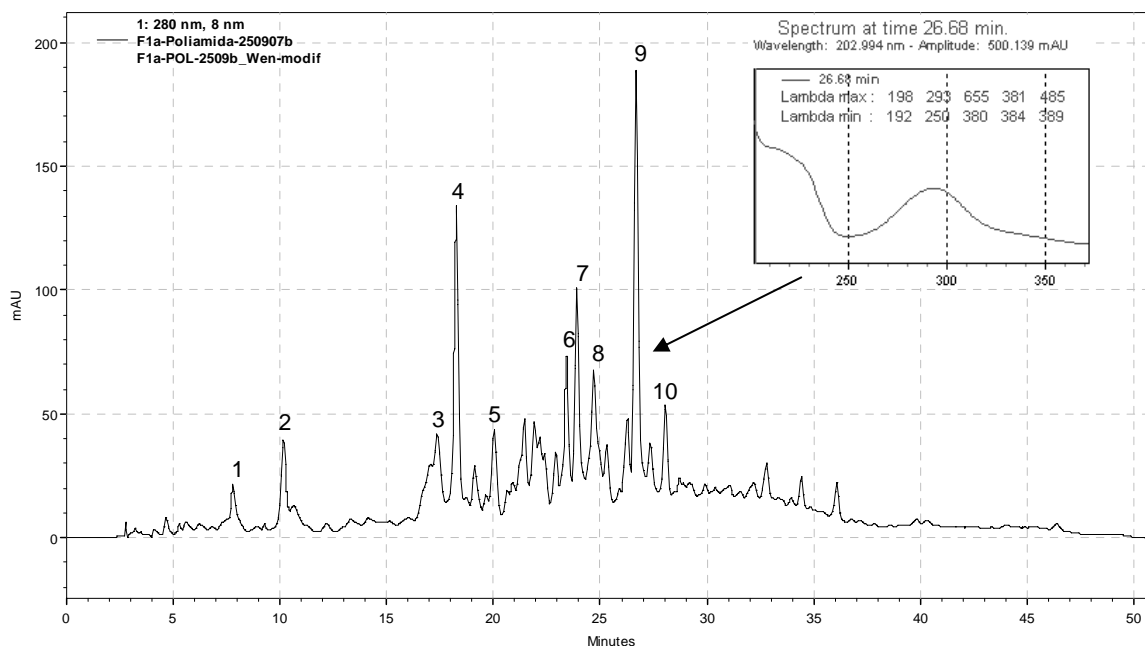


Figura 102: Cromatograma obtido por CLAE-DAD da F1-POL-2509b a 280 nm. Condições cromatográficas: conforme método descrito por Wen *et al.* (2005) com as modificações propostas no item 3.3.2. Sinais identificados: ácido protocatecuico (2) e ácido vanílico (4).

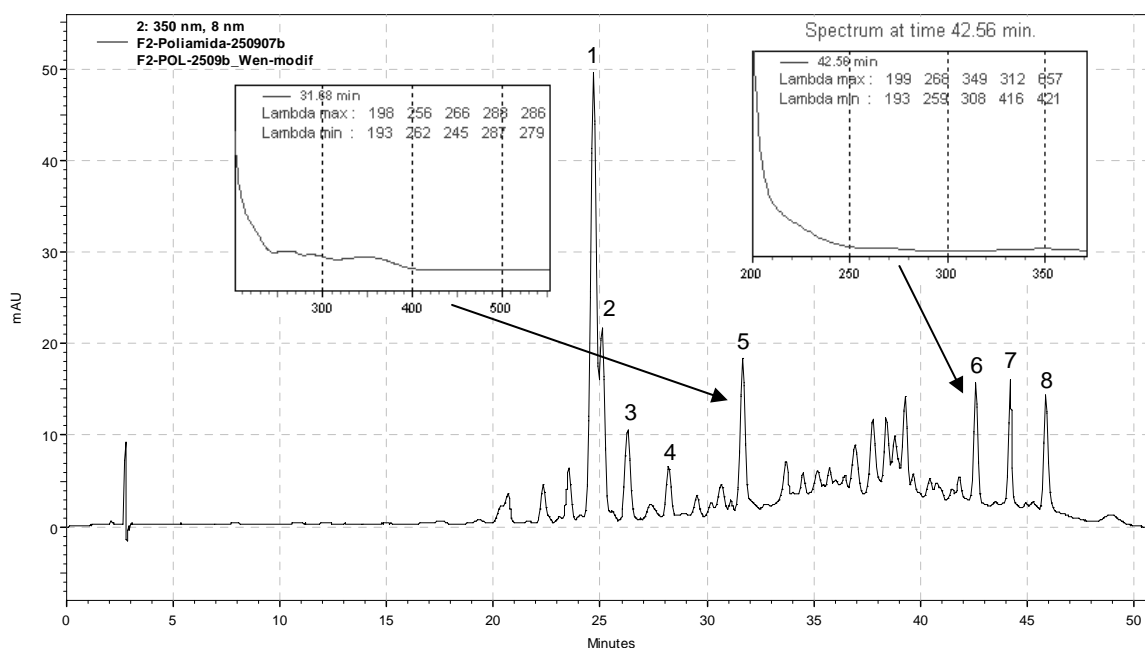


Figura 103: Cromatograma obtido por CLAE-DAD da F2-POL-2509b a 350 nm. Condições cromatográficas: conforme método descrito por Wen *et al.* (2005) com as modificações propostas no item 3.3.2. Sinais identificados: homoorientina (1), orientina (2), isovitexina (3), vitexina (4) e rutina (5).

A análise por CLAE-DAD da F3-POL-2509b mostra a detecção de mais quatro polifenóis ainda não detectados anteriormente, todos com espectros no UV típicos de flavonóides (Fig. 104); entre eles, uma provável aglicona com bandas no UV compatíveis com um flavonol (pico 1), possivelmente quercetina. O pico 2, com bandas no UV semelhantes às da rutina, seria provavelmente um glicosídeo de flavonol bastante apolar, enquanto o pico 3, com bandas em 267 e 346 nm, poderia corresponder a uma flavona. O pico 4, sem bandas evidentes no UV, não pôde ser correlacionado com qualquer classe específica.

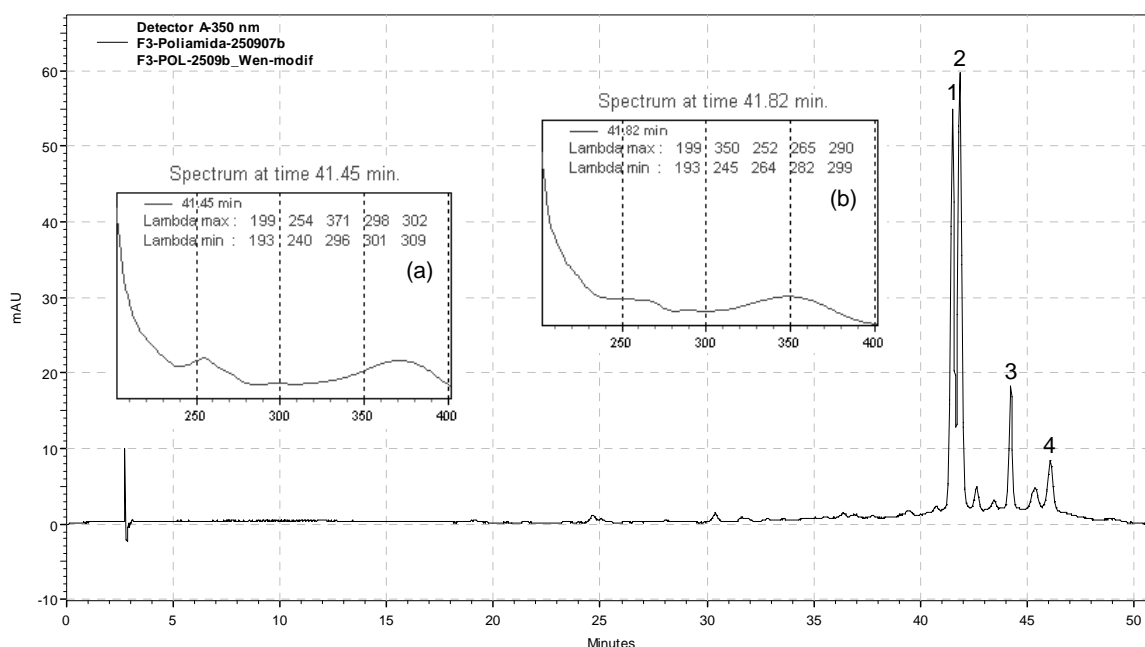


Figura 104: Cromatograma obtido por CLAE-DAD da F3-POL-2509b a 350 nm. Condições cromatográficas: conforme método descrito por Wen *et al.* (2005) com as modificações propostas no item 3.3.2. *Insert a*: espectro obtido no UV para o pico 1. *Insert b*: espectro obtido no UV para o pico 2.

Interessantemente, após a análise por CLAE-DAD da F4-POL-2509b (Fig. 105), recuperada com CH₃CN / H₂O (60:40) com ATFA 0,1 %, revelou-se que outras substâncias teriam maior afinidade pela poliamida que os flavonóides. Polifenóis, como o provável ácido floroglucínico (pico 2; $\lambda_{\text{máx.}} = 285$ nm), e até mesmo substâncias sem hidroxilas fenólicas, como os análogos do ácido cítrico (picos 1, 4 e 5), foram mais persistentes que a maioria dos flavonóides detectados nestas frações. Além destes picos, detectou-se ainda mais um provável

glicosídeo de flavonóide (pico 3), eluído em 11,7 min., o qual deveria ser o mais hidroxilado e/ou glicosilado dentre todos os flavonóides detectados até aqui.

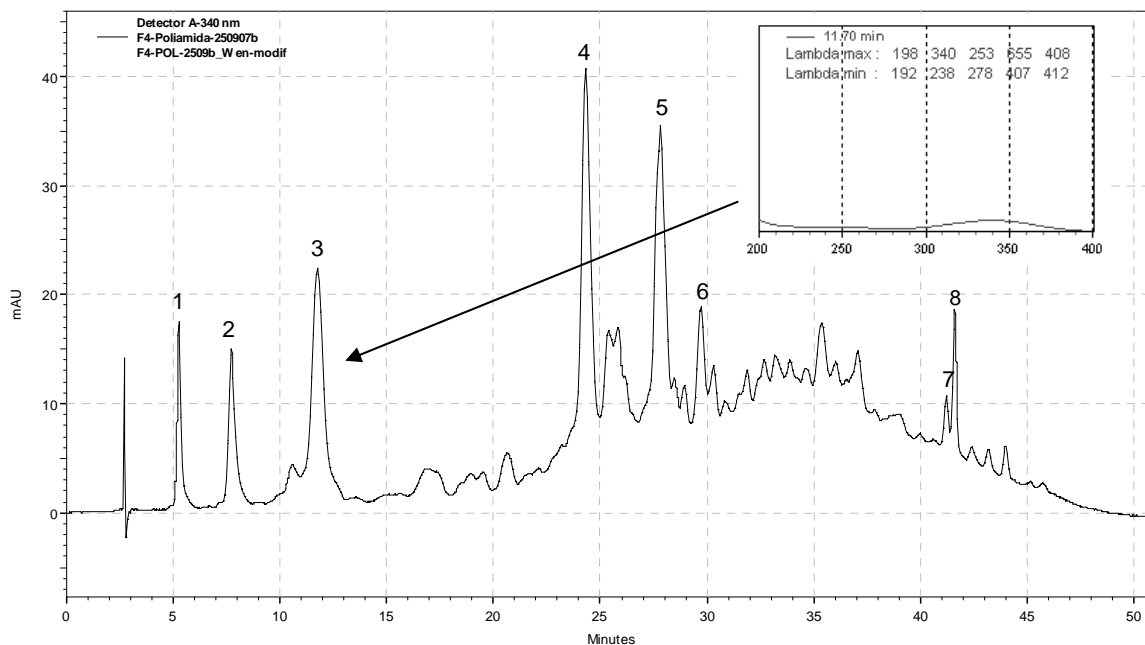


Figura 105: Cromatograma obtido por CLAE-DAD da F4-POL-2509b a 340 nm. Condições cromatográficas: conforme método descrito por Wen *et al.* (2005) com as modificações propostas no item 3.3.2.

A análise por CLAE-DAD da F5-POL-2509b (Fig. 106) permitiu a detecção de três substâncias atípicas (picos 1, 2 e 3), com bandas em 266, 397 e 500 nm. Além destas, outros dois flavonóides foram detectados (picos 4 e 5), provavelmente os mesmos detectados anteriormente em F3 (Fig. 104; picos 1 e 2) e em F4 (Fig. 105; picos 7 e 8). Este resultado sugeriu que o volume de AcOEt utilizado durante a eluição da F3-POL-2509b não foi suficiente para remover completamente os dois flavonóides principais daquela fração.

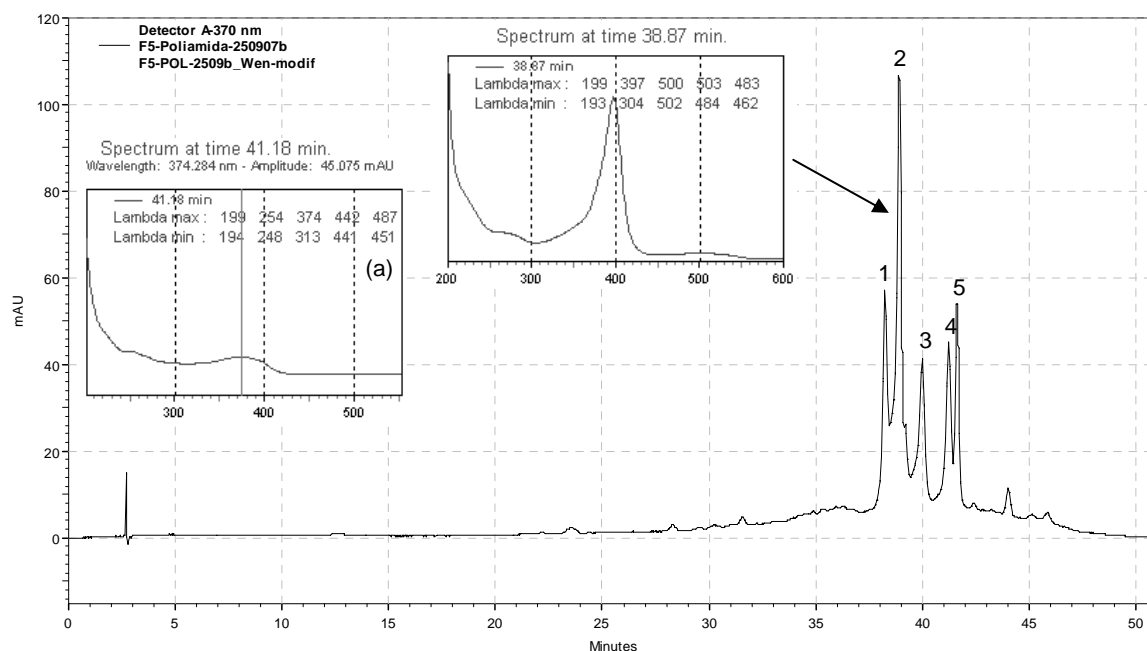


Figura 106: Cromatograma obtido por CLAE-DAD da F5-POL-2509b a 370 nm. Condições cromatográficas: conforme método descrito por Wen *et al.* (2005) com as modificações propostas no item 3.3.2. *Insert a*: espectro obtido no UV para o pico 4.

A ausência de picos no cromatograma obtido após a análise por CLAE-DAD da F6-POL-2509b (dado não mostrado) sugeriu que já não houvesse mais substâncias em quantidades detectáveis na poliamida após o tratamento com CH_3CN / MeOH (1:1). Entretanto, como não se testou acetonitrila pura, a possibilidade de haver ainda substâncias em quantidades detectáveis na resina não pôde ser descartada, já que este solvente mostrou-se ter a melhor capacidade de desorção de substâncias adsorvidas na poliamida entre os solventes orgânicos testados neste trabalho.

4. CONCLUSÕES

No presente estudo, foram desenvolvidas metodologias analíticas que permitiram a caracterização de ácidos fenólicos e flavonóides a partir de extratos hidroalcoólicos e aquosos de açaí liofilizado. Os resultados obtidos, além de permitirem uma avaliação das técnicas empregadas, geraram também novas informações em relação ao conteúdo fitoquímico dos frutos de *E. oleracea*.

No que se refere à obtenção dos extratos, o estudo revelou que a solução aquosa de ATFA 0,5 % não foi capaz de extrair completamente antocianinas e outros flavonóides, mas proporcionou a melhor recuperação de ácidos fenólicos entre todas as soluções extratoras testadas neste trabalho. A utilização de soluções metanólicas acidificadas gerou melhores resultados para antocianinas e flavonóides menos polares, mas a recuperação dos glicosídeos de flavonas foi aparentemente superior com o uso da sol. ATFA 0,5 % em H₂O. Entre as metodologias desenvolvidas neste trabalho, a extração direta para antocianinas permitiu um acesso simples e rápido às duas principais antocianinas do fruto, sem interferência significativa por outros constituintes hidrossolúveis.

Os testes realizados para a reação de derivatização com iodeto de metila e catalisador de transferência de fase produziram reações de alquilação paralelas, com formação de derivados butilados e subprodutos.

As técnicas de extração em fase sólida, aplicadas neste estudo, foram adequadas à obtenção de extratos enriquecidos com as classes de fenólicos investigadas.

A utilização da resina XAD-16 permitiu a remoção de ácidos orgânicos e açúcares livres da fração aquosa antociânica, mas não gerou um extrato contendo apenas antocianinas.

A técnica de EFS com coluna de celulose gerou resultados satisfatórios no isolamento da fração rica em ácidos fenólicos, mas não pôde ser devidamente avaliada nas condições em que foi testada neste trabalho.

O uso da resina trocadora de íons fortemente básica permitiu a concentração de quatro ácidos fenólicos, entre os quais três ainda não relatados na literatura para a espécie (siringico, 3-(4-hidroxi)-fenil-2 (Z)-propenóico e cinâmico). Entretanto, a técnica não permitiu a detecção de vários outros ácidos certamente presentes e também não pôde ser devidamente avaliada por falta de repetições do procedimento.

Os vários ensaios de EFS com os cartuchos SAX permitiram uma avaliação das várias soluções eluentes empregadas e também do comportamento físico-químico dos polifenóis presentes nas frações submetidas ao procedimento. Esta técnica permitiu ainda a caracterização da fração de ácidos fenólicos ligada às estruturas de parede celular em resíduos de mesocarpo e epicarpo dos frutos de *E. oleracea*.

O uso da técnica de EFS com coluna de poliamida mostrou-se ser uma alternativa valiosa para a obtenção de frações ricas em classes distintas de polifenóis. Esta técnica permitiu o isolamento de pequenos grupos de flavonóides e outras substâncias ainda não identificadas.

A técnica de EFS com coluna de sílica funcionalizada com octadecilsilano foi a técnica auxiliar mais simples e eficiente para a obtenção de um extrato totalmente desengordurado após a extração dos lipossolúveis com hexano em aparelho de Soxhlet. O tratamento primário com hexano mostrou-se insuficiente para extrair completamente os lipossolúveis do açaí.

Entre os ácidos fenólicos detectados neste trabalho, foram identificados os ácidos gálico, protocatecuico, *p*-hidroxi-benzóico, vanílico, siringico, verátrico, 3-(4-hidroxi)-fenil-2 (Z)-propenóico, 3-(3-metoxi-4-hidroxi)-fenil-2 (Z)-propenóico, ferúlico, e *p*-cumárico.

Entre os não fenólicos, foram também detectados os ácidos benzóico e cinâmico. O último foi detectado apenas com o uso da RTIFB; ácido benzóico e ácido verátrico apenas com a coluna de celulose; e ácido 3-(3-metoxi-4-hidroxi)-fenil-2(Z)-propenóico apenas na fração ligada à parede celular, com a SAX. Entre as propostas de identificação de ácidos fenólicos, foram sugeridos os ácidos 5-(3-metoxi, 4-hidroxi)-fenil-pentanóico, clorogênico, caféico e floroglucinóico. Os principais componentes da fração ligada foram os ácidos *p*-hidroxi-benzóico (possível marcador quimiotaxonômico para a família Palmae), vanílico, 3-(4-hidroxi)-fenil-2 (Z)-propenóico, 3-(3-metoxi-4-hidroxi)-fenil-2 (Z)-propenóico, ferúlico e *p*-cumárico.

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem ainda que os ácidos gálico e protocatecuico, assim como o ácido floroglucinóico, sejam produtos de degradação gerados durante os procedimentos preparativos e analíticos, não sendo constituintes naturais do fruto não processado.

Os glicosídeos de flavonóides identificados foram cianidina 3,5-diglicosídeo, cianidina 3-glicosídeo, cianidina 3-rutinosídeo, homoorientina e orientina. Cianidina 3-sambubiosídeo e cianidina 3-galactosídeo foram relacionadas a um único sinal obtido por CLAE e não puderam ter sua identificação confirmada inequivocamente por EM-IES. Entre as propostas de identificação de flavonóides, foram sugeridos vitexina, isovitexina, rutina e quercetina.

Este é o primeiro relato a citar a detecção dos ácidos benzóico, siríngico, verátrico, 3-(4-hidroxi)-fenil-2 (Z)-propenóico, 3-(3-metoxi-4-hidroxi)-fenil-2 (Z)-propenóico e cinâmico em amostras de açaí. É também o primeiro relato a sugerir a detecção dos ácidos 5-(3-metoxi, 4-hidroxi)-fenil-pentanóico, clorogênico, caféico e floroglucinóico neste alimento. Entre os flavonóides, cianidina 3,5-diglicosídeo, cianidina 3-galactosídeo, vitexina e quercetina foram também propostos pela primeira vez em açaí.

REFERÊNCIAS

AÇAÍ: GUIA RURAL - ABRIL ANUÁRIO., 1988 *apud* SANTOS, G. **Açaí (*Euterpe oleracea*): Aspectos químicos e farmacológicos.** 2001. f. 14. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.

ADHIKARI, D.; Francis, J.; Schutzki, R; Chandra, A.; Nair, M. **Quantification and characterization of cyclo-oxygenase and lipid peroxidation inhibitory anthocyanins in fruits of *Amelanchier*.** *Phytochemical Analysis* 2005, 16, 175-180.

BAILÓN, M. & BUELGA, C. **Polyphenol extraction from foods.** In Buelga, C. & Williamson, G. (Eds.) *Methods in polyphenol analysis.* Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, 2003, p. 1-16.

BAKOWSKA, A.; Kucharska, A.; Oszmianski, J. **The effects of heating, UV irradiation, and storage on stability of the Anthocyanin-polyphenol copigment complex.** *Food Chemistry* 2003, 81, 349-355.

BARBERÁN, F.; Blázquez, M.; Viguera, C.; Ferreres, F.; Lorente, F. **A comparative study of different Amberlite XAD resins in flavonoid analysis.** *Phytochemical Analysis* 1992, 3, 178-181.

BENGOECHEA, M.; Sancho, A.; Bartolomé, B.; Estrella, I.; Cordovés, C.; Hernández, T. **Phenolic composition of industrially manufactured purées and concentrates from peach and apple fruits.** *J. Agric. Food Chem.* 1997, 45, 4071-4075.

BLOOR, S. **Overview of methods for analysis and identification of flavonoids.** In: Packer, L. (Ed.) *Methods in Enzymology*, Vol. 335: Flavonoids and other polyphenols. University of California, Berkeley, Academic Press, 2001, p. 3-14.

BOBBIO, F.; Druzian, J. Abrao, P.; Bobbio, P.; Fadelli, S. **Identification and quantification of anthocyanins from the açai fruit (*Euterpe oleracea*) Mart.** *Cienc. Tecnol. Aliment.* 2000, 20, 388-390.

BONILLA, E.; Akoh, C.; Sellappan, S.; Krewer, G. **Phenolic content and antioxidant capacity of Muscadine grapes.** *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 5497-5503.

BONOLI, M.; Verardo, V.; Marconi, E.; Caboni, M. **Antioxidant phenols in Barley (*Hordeum vulgare* L.) Flour: Comparative Spectrophotometric study among extraction**

methods of free and bound phenolic compounds. J. Agric. Food Chem. 2004, 52, 5195-5200.

BRESSANI, R.; Mora, D.; Flores, R.; Brenes, R. **Evaluation of two methods to determine the polyphenol content in raw and cooked beans and its effect on protein digestibility.** Arch. Latinoam. Nutr. 1991, 41, 569-583.

CAO, G.; Muccitelli, H.; Sánchez-Moreno, C.; Prior, R. **Anthocyanins are absorbed in glycosylated forms in elderly women: a pharmacokinetic study.** Am. J. Clin. Nutr. 2001, 73, 920-926.

CHAKRABORTY, M.; Das, K.; Dey, G.; Mitra, A. **Unusually high quantity of 4-hydroxybenzoic acid accumulation in cell wall of palm mesocarps.** Biochemical Systematics and Ecology 2006, 34, 509-513.

COHEN, K. **Sistema de produção do açaí: composição química do açaí.** Embrapa Amazônia Oriental 2005, 04, versão eletrônica. Disponível em: <http://www.cpatu.embrapa.br>. Acesso em: 12/08/2007.

COÏSSON, J.; Travaglia, F.; Piana, G.; Capasso, M.; Arlorio, M. **Euterpe oleracea juice as a functional pigment for yogurt.** Food Research International 2005, 38, 893-897.

CONSTANT, P. **Antocianinas de açaí (*Euterpe oleracea* M): extração, caracterização, desenvolvimento de formulação e aplicação em alimentos.** 2003. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003.

DOVBII, O.; Kazakova, O.; Lipkovskaya, N. **The effect of the structure of cinamic acid derivatives on their interaction with highly dispersed silica in aqueous medium.** Colloid Journal 2006, 68, 777-783.

EINBOND, L.; Reynertson, K.; Luo, X.; Basile, M.; Kennely, E. **Anthocyanin antioxidants from edible fruits.** Food Chemistry 2004, 84, 23-28.

EVANS, C.; Miller, N.; and Paganga, G. **Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids.** Free Radicals Biol. Med 1996, 20, 933-956.

FIAMEGOS, Y.; Nanos, C.; Vervoort, J.; Stalikas, C. **Analytical procedure for the in-vial derivatization-extraction of phenolic acids and flavonoids in methanolic na aqueous plant extracts followed by gas chromatography with mass-selective detection.** Journal of Chromatography A 2004, 1041, 11-18.

FIGUEIREDO, P.; Elhabiri, M.; Saito, N.; Brouillard, R. Anthocyanin intramolecular interactions. **A new Mathematical approach to account for the remarkable colorant properties of the pigments extracted from *Matthiola incana***. J. Am. Chem. Soc. 1996, 118, 4788-4793.

FLESCHHUT, J.; Kratzer, F.; Rechkemmer, G.; Kulling, S. **Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins *in vitro***. Eur. J. Nutr. 2006, 45, 7-18.

FONSECA, E. **Óleos vegetais brasileiros (inclusive resinas, gommas, breus, ceras)**. 2. ed. Rio de Janeiro, 1927, p. 93-94.

FUJIHARA, T.; Izumi, A.; Ozawa, T.; Numata, O. **High-molecular-weight polyphenols from oolong tea and black tea: purification, some properties, and role in increasing mitochondrial membrane potential**. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2007, 71, 711-719.

GALLORI, S.; Bilia, A.; Bergonzi, M.; Barbosa, W.; Vincieri, F. **Polyphenolic constituents of fruit pulp of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí palm)**. Chromatographia 2004, 59, 739-743.

GAO, L. & MAZZA, G. **Rapid method for complete chemical characterization of simple and acylated anthocyanin by high-performance liquid chromatography and capillary gas-liquid chromatography**. J. Agric. Food Chem. 1994, 42, 118-125.

GAO, L. & MAZZA, G. **Characterization, quantitation, and distribution of anthocyanins and colorless phenolics in sweet cherries**. J. Agric. Food Chem. 1995, 43, 343-346.

GONSALVES, A. **O Babaçu: considerações científicas, técnicas e econômicas**. Ministério da Agricultura, Serviço de informação agrícola, Rio de Janeiro, 1955 (Série estudos e ensaios - n. 8), p. 21-65.

GUPTA, R. & HASLAM, E. **Vegetable tannins: structure and biosynthesis. Polyphenols in cereals and legumes**. International Development Research Center, Ottawa, Canada, 1980.

HARBORNE, J.; Williams, C.; Greenham, J.; Moyna, P. **Distribution of charged flavones and caffeoylshikimic acid in palmae**. Phytochemistry 1974, 13, 1557-1559.

HENDERSON, A. & SCARIOT, A. **A flórua da reserva Ducke, I: Palmae (Arecaceae)**. Acta Amazonica, 1993, 23, 349-369.

HERRMANN, K. **Flavonols and flavones in food plants: a review**. J. Food Technol.

1976, 11, 433-448.

HOMMA, A. **Sistema de produção do açaí: mercado e comercialização.** Embrapa Amazônia Oriental 2005, 04, versão eletrônica. Disponível em: <http://www.cpatu.embrapa.br>. Acesso em: 11/08/2007.

IADEROZA, M.; Baldini, V.; Draetta, I.; Bovi, M. **Anthocyanins from fruits of açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) and juçara (*Euterpe edulis* Mart.).** Trop. Sci. 1992, 32, 41-46.

INSFRAN, D.; Brenes, C.; Talcott, S. **Phytochemical composition and pigment stability of açaí (*Euterpe oleracea* Mart.).** J. Agric. Food Chem. 2004, 52, 1539-1545.

JOLY, A. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal.** 12^a ed. São Paulo, Companhia Editora Nacional, 1998, p. 704-708.

KAHKONEN, M.; Hopia, A.; Vuorela, H.; Rauha, J.; Pihlaja, K.; Heinonen, M. **Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds.** Journal of Agriculture and Food Chemistry 1999, 47, 3954-3962.

KIM, D.; Heo, H.; Kim, Y.; Yang, H.; Lee, C. **Sweet and sour cherry phenolics and their protective effects on neuronal cells.** J. Agric. Food Chem. 2005, 53, 9921-9927.

KLOPOTEK, Y.; Otto, K.; Böhm, V. **Processing strawberries to different products alters contents of vitamin C, total phenolics, total anthocyanins, and antioxidant capacity.** J. Agric. Food Chem. 2005, 53, 5640-5646.

KONG, J.; Chia, L.; Goh, N.; Chia, T; Brouillard, R. **Analysis and biological activities of Anthocyanins.** Phytochemistry 2003, 64, 923-933.

KURKIN, V. **Phenylpropanoids from medicinal plants: Distribution, classification, structural analysis, and biological activity.** Chemistry of Natural Compounds 2003, 39, 123-153.

LAPIDOT, T.; Harel, S.; Akiri, B.; Granit, R.; Kenner, J. **pH-Dependent forms of red wine antocyanins as antioxidants.** Journal of Agriculture and Food Chemistry 1999, 47, 67-70.

LICHTENTHÄLER, R.; Rodrigues, R.; Maia, J.; Papagiannopoulos, M.; Fabricius, H.; Marx, F. **Total oxidant scavenging capacities of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) fruits.** International Journal of Food Sciences and Nutrition 2005, 56(1), 53-64.

LLORACH, R.; Izquierdo, A.; Ferreres, F.; Barberán, F. **HPLC-DAD-MS/MS ESI characterization of unusual highly glycosylated acylated flavonoids from cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *Botrytis*) agroindustrial byproducts.** J. Agric. Food Chem. 2003, 51, 3895-3899.

LUBRANO, C.; Robin, J.; Khaiat, A. **Fatty acid, sterol and tocopherol composition of oil from the fruit mesocarp of six palm species in French Guiana.** Oleagineux 1994, 49, 59-65.

MATHEUS, M.; Fernandes, S.; Silveira C.; Rodrigues, V.; Menezes, F.; Fernandes, P. **Inhibitory effects of *Euterpe oleracea* Mart. on nitric oxide production and iNOS expression.** Journal of Ethnopharmacology 2006, 107, 291-296.

MATTILA, P. & KUMPULAINEN, J. **Determination of free and total phenolic acids in plant-derived foods by HPLC with diode-array detection.** J. Agric. Food Chem. 2002, 50, 3660-3667.

MAZZA, G. & BROUILLARD, R. **The mechanism of copigmentation of anthocyanins in aqueous solutions.** Phytochemistry 1990, 29, 1097-1102.

MCMURROUGH, I. & MCDOWELL, J. **Chromatographic separation and automated analysis of flavonols.** Analytical Biochemistry 1978, 91, 92-100.

MELO, C.; Barbosa, W.; Alves, S., 1988 *apud* SANTOS, G. **Açaí (*Euterpe oleracea*): Aspectos químicos e farmacológicos.** 2001. f. 14. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.

MULLEN, W.; McGinn, J.; Lean, M.; Maclean, M.; Gardner, P.; Duthie, G.; Yokota, T.; Crozier, A. **Ellagitannins, flavonoids, and other phenolics in red raspberries and their contribution to antioxidant capacity and vasorelaxation properties.** J. Agric. Food Chem. 2002, 50, 5191-5196.

NACZK, M. & SHAHIDI, F. **Extraction and analysis of phenolics in food.** Journal of Chromatography A 2004, 1054, 95-111.

PACHECO, L.; Hawken, P.; Talcott, S. **Juice matrix composition and ascorbic acid fortification effects on the phytochemical, antioxidant and pigment stability of açaí (*Euterpe oleracea* Mart.).** Food Chemistry 2007, 105, 28-35.

PASCOAL NETO, C.; Belino, E.; Evtuguin, D.; Silvestre, A. **Total fractionation and analysis of organic components of industrial *Eucalyptus globulus* kraft black liquor.** Appita Journal 1999, 52, 213-217.

PRETSCH, E.; Clerc, T.; Seibl, J.; Simon, W. **Tablas para la elucidacion estructural de compuestos organicos por metodos espectroscopicos.** Edición española, Madrid. Editorial Alhambra S. A., 1980, 307 p.

REVILLA, E.; Ryan, J.; Ortega, G.; **Comparison of several procedures used for extraction of anthocyanins from red grapes.** J. Agric. Food Chem. 1998, 46, 4592-4597.

ROBERFROID, M. **Functional food concept and its application to prebiotics.** Digest Liver Dis 2002, 34 (2), S105-110.

ROCHA, A.; Carvalho, L.; Sousa, M.; Madeira, S.; Sousa, P.; Tano, T.; Kerth, V.; Resende, A.; Moura, R. **Endothelium-dependent vasodilator effect of *Euterpe oleracea* Mart. (açai) extracts in mesenteric vascular bed of the rat.** Vascular Pharmacology 2007, 46, 97-104.

RODRIGUES, R.; Lichtenthäler, R.; Zimmermann, B.; Papagiannopoulos, M.; Fabricius, H.; Marx, F.; Almeida, O.; Maia, J. **Total oxidant scavenging capacities of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí seeds) and their polyphenolic compounds.** In 29^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química; Águas de Lindóia, 2006, PN-041.

ROGEZ, H. **Açaí: Preparo, composição e melhoramento da conservação.** Belém, Brasil: EDUFPA, 2000, 360 p.

SAKAKIBARA, H.; Honda, Y.; Nakagawa, S.; Ashida, H.; Kanazawa, K. **Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits and teas.** J. Agric. Food Chem. 2003, 51, 571-581.

SANTOS, G. **Açaí (*Euterpe oleracea*): Aspectos químicos e farmacológicos.** 2001. 151 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.

SAONA, L.; Giusti, M.; Wrolstad, R. **Color and pigment stability of red radish Anthocyanins and red-fleshed potato Anthocyanins in juice model system.** J. Food Sci. 1999, 61, 688-694.

SCHAUSS, A.; Wu, X.; Prior, R.; Ou, B.; Patel, D.; Huang, D.; Kababick, J. **Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* Mart. (Acai).** J. Agric. Food Chem. 2006a, 54, 8569-8603.

SCHAUSS, A.; Wu, X.; Prior, R.; Ou, B.; Huang, D.; Owens, J.; Agarwal, A.; Jensen, G.; Hart, A.; Shanbrom, E. **Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* Mart. (Acai).** J. Agric. Food Chem. 2006b, 54, 8604-8610.

SEERAM, N.; Bourquin, L.; and Nair, M. **Degradation products of cyanidin glycosides from tart cherries and their bioactivities.** J. Agric. Food Chem. 2001, 49, 4924-4929.

SINGLETON, V. & ROSSI, J. **Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents.** Am. J. Enol. Vitic. 1965, 16, 144-158.

SMITH, E. **Astringent tannins of Acer species.** Phytochemistry 1977, 16, 1421-1426.

SOUZA, M.; Yuyama, L.; Aguiar, J.; Pantoja, L. **Suco de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.): avaliação microbiológica, tratamento térmico e vida de prateleira.** Acta Amazônica 2006, 36, 483-496.

STONER, G.; Sardo, C.; Apsehoff, G.; Mullet, D.; Wargo, W.; Pound, V.; Singh, A.; Sanders, J.; Aziz, R.; Casto, B.; Sun, X. **Pharmacokinetics of anthocyanins and ellagic acid in healthy volunteers fed freeze-dried black raspberries daily for 7 days.** J. Clin. Pharmacol. 2005, 45, 1153-1164.

STRUDWICK, J. & SOBEL, G. **Uses of *Euterpe oleracea* Mart. in the amazon estuary, Brazil.** Adv. Econ. Bot. 1988, 6, 225-253.

SUDHAMANI, S.; Tharanathan, R.; Prasad, M. **Isolation and characterization of extracellular polysaccharide from *Pseudomonas caryophylli* CFR 1705.** Carbohydrate Polymers 2004, 56, 423-427.

SUMERE, C.; Faché, P.; Castele, K.; Cooman, L.; Everaert, E.; Loose, R.; Hutsebaut, W. **Improved extraction and reversed phase-high performance liquid chromatographic separation of flavonoids and the identification of *rosa* cultivars.** Phytochemical Analysis 1993, 4, 279-292.

TIMBERLAKE, C. & HENRY, B. **Anthocyanins as natural food colorants.** Prog. Clin. Biol. Res. 1988, 280, 107-121.

TSAO, R. & YANG, R. **Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: towards a total phenolic index using high performance liquid chromatography.** Journal of Chromatography A 2003, 1018, 29-40.

VIGUERA, C.; Zafrilla, P.; Barberán, F. **The use of acetone as extraction solvent for anthocyanins from strawberry fruit.** Phytochemical Analysis 1998, 9, 274-277.

VOGEL, A. **Química Orgânica: Análise Orgânica Qualitativa, vol. 3.** Tradução da 3ª edição. Ao Livro Técnico S.A. e Editora da Universidade de São Paulo, 1971, p. 1017-1023.

WAGNER, H. & BLADT, S. **Plant drug analysis: A thin layer chromatography atlas.** Second edition. Ed. Springer, 1996, 384 p.

WANG, H.; Cao, G.; Prior, R. **Total antioxidant capacity of fruits.** J. Agric. Food Chem. 1996, 44, 701-705.

WANG, H.; Cao, G.; and Prior, R. **Oxygen radical absorbing capacity of Anthocyanins.** J. Agric. Food Chem. 1997, 45, 304-309.

WANG, J. & SPORNS, P. **Analysis of anthocyanins in red wine and fruit juice using MALDI-MS.** J. Agric. Food Chem. 1999, 47, 2009-2015.

WATT, D.; O'Neill, S.; Percy, A.; Brasch, D. **Isolation and characterization of a partially methylated galacto-glucurono-xylo-glycan, a unique polysaccharide from the red seaweed *Apophloea lyallii*.** Carbohydrate Polymers 2002, 50, 283-294.

WEN, D.; Li, C.; Di, H.; Liao, Y.; Liu, H. **A universal HPLC method for the determination of phenolic acids in compound herbal medicines.** J. Agric. Food Chem. 2005, 53, 6624-6629.

WOLLENWEBER, E. & DIETZ, V. **Occurrence and distribution of free flavonoid aglycones in plants.** Phytochemistry 1981, 20, 869-932.

WU, X.; Cao, G.; Prior, R. Absorption and metabolism of **anthocyanins in elderly women after consumption of elderberry or blueberry.** The Journal of Nutrition 2002, 132, 1865-1871.

WU, X.; Gu, L.; Prior, R.; McKay, S. **Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of *Ribes*, *Aronia*, and *Sambucus* and their antioxidant capacity.** J. Agric. Food Chem. 2004, 52, 7846-7856.

YUYAMA, L.; Barros, S.; Aguiar, J.; Yuyama, K.; Filho, D. **Quantificação de fibra alimentar em algumas populações de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal), camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K) Mc Vaugh e açaí (*Euterpe oleracea* Mart.).** Acta Amazônica 2002, 32, 491-497.

ZAPOROZHETS, O.; Krushynska, O.; Lipkovska, N.; Barvinchenko, V. **A new test method for the evaluation of total antioxidant activity of herbal products.** J. Agric. Food Chem. J. Agric. Food Chem. 2004, 52, 21-25.

ŽIAKOVÁ, A.; Brandšteterová, E.; Blahová, E. **Matrix solid-phase dispersion for the liquid chromatographic determination of phenolic acids in *Melissa officinalis*.** Journal of Chromatography A 2003, 983, 271-275.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)