

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Cecília Pinto Nogueira

Perfil de separação de antocianinas em capim-elefante (*Cenchrus purpureus Schum.*)

Cecília Pinto Nogueira

Perfil de separação de antocianinas em capim-elefante (*Cenchrus purpureus Schum.*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Ativos

Orientador: Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira

Coorientador: Dr. Juarez Campolina Machado

Juiz de Fora

2023

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da
Biblioteca Universitária da UFJF,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Pinto Nogueira, Cecília .

Perfil de separação de antocianinas em capim-elefante
(*Cenchrus purpureus* Schum.) / Cecília Pinto Nogueira. --
2023.

59 p.

Orientador: Marcone Augusto Leal de Oliveira

Coorientador: Juarez Campolina Machado

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz
de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2023.

1. capim-elefante roxo. 2. produtos naturais bioativos. 3.
antocianidina. 4. planejamento de misturas. 5. espectrometria. I.
Augusto Leal de Oliveira, Marcone , orient. II. Campolina Machado,
Juarez , coorient. III. Título.

Cecília Pinto Nogueira

Perfil de separação de antocianinas em capim-elefante (*Cenchrus purpureus Schum.*)

Dissertação
apresentada ao
Programa de Pós-
graduação em Ciências
Farmacêuticas
da Universidade
Federal de Juiz de Fora
como requisito parcial
à obtenção do título de
Mestra em Ciências
Farmacêuticas. Área de
concentração: Produtos
Naturais e Sintéticos
Ativos.

Aprovada em 29 de Junho de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira - Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr. Juarez Campolina Machado - Coorientador
Embrapa Gado de Leite

Dra. Ieda Spacino Scarminio
Universidade Estadual de Londrina

Dra. Luciana Moreira Chedier
Universidade Federal de Juiz de Fora

Juiz de Fora, 23/05/2023.



Documento assinado eletronicamente por **Marcone Augusto Leal de Oliveira, Professor(a)**, em 29/06/2023, às 17:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Juarez Campolina Machado, Usuário Externo**, em 30/06/2023, às 09:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ieda Spacino Scarminio, Usuário Externo**, em 30/06/2023, às 11:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciana Moreira Chedier, Professor(a)**, em 30/06/2023, às 13:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-UfF (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1297544** e o código CRC **BD1752AB**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que oportunizou todas as condições favoráveis para a conclusão desse trabalho da melhor forma possível. AO meu marido e companheiro de vida André, que sempre esteve ao meu lado e se tem revelado uma companhia incansável que não me deixa desanimar. Aos meus filhos Nicolas e Gustavo que dividiram a presença e dedicação costumeira da mamãe com as tarefas que o mestrado exigia. Aos meus pais, Adilon e Lídia que sempre me estimularam e apoiaram nas minhas decisões. A meus irmãos Marisa e Adriano que estão sempre presentes e acompanhando meu progresso.

Ao orientador prof. Dr. Marcone Augusto pela oportunidade incrível de ter esse tempo de contato direto com um professor tão dedicado e capaz. A troca de informações, as “puxadas de orelha” e os aprendizados foram motivo de crescimento e lições para a vida toda.

Ao pessoal do GQAQ, Maria Patrícia, Olivia, Nerilson e Luiz Henrique que estiveram presentes e foram companheiros de caminhada. Me auxiliaram nas análises no laboratório da UFJF e sempre vou lembrar de como foram peças-chave para a conclusão desse trabalho.

Ao meu coorientador Dr. Juarez Campolina que muito contribuiu com suas ideias para o texto e nas informações coletadas, sempre por perto me apoiando e estimulando, se revelou um verdadeiro amigo.

Aos colegas da Embrapa: Ernando, Dr. Marcelo, Mauricio, Michelle, Dr. Kirley e Paulo que participaram diretamente desse trabalho auxiliando nas análises. Vocês foram companhias muito importantes nesses tempos de aprendizado. Ao Dr. Humberto Brandão que muito me estimulou a iniciar esta jornada contribuindo na escolha do tema e com ideias para o bom desenvolvimento do mesmo. À Embrapa que permitiu a utilização dos recursos laboratoriais e amostrais e a conciliação do meu horário de trabalho com as atividades que o mestrado exigia.

Aos professores da Faculdade de Farmácia da UFJF: foi um prazer retornar aos bancos da graduação. Foi como uma viagem no tempo! Estou grata de ver que todos estão ali ainda dispostos a dividir seu conhecimento e fazer cada aluno alçar voos cada vez mais altos! Muito obrigada à Faculdade de Farmácia pela oportunidade de fazer esse mestrado que é um divisor de águas na minha carreira profissional.

RESUMO

Pennisetum purpureum Schumach, (capim-elefante roxo, syn (*Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone) tem a cor característica exibida pelos vegetais que possuem antocianinas, um corante natural que apresenta efeito contra doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, beneficia a microbiota intestinal e que pode prevenir o câncer. O presente trabalho teve como objetivo obter o perfil de separação de antocianinas em capim-elefante por técnicas cromatográficas e espectroscópicas de forma a otimizar o processo de extração e identificar diferentes antocianinas em capim-elefante roxo com foco às necessidades das rotinas industriais. As análises foram realizadas em amostras compostas de folhas de capim-elefante de coloração arroxeadada. Por meio da metodologia de planejamento de misturas foram realizados ensaios com diferentes proporções de água, etanol e metanol para extração de antocianinas. Os efeitos dos solventes foram determinados pelo modelo cúbico especial com significância estatística obtida pela análise de variância. Em seguida, foi realizada análise em Cromatografia Líquida acoplada ao Analisador de Massas (CLAE-MS) para identificação das antocianinas encontradas. Com os resultados de teor total de antocianinas em cada extrato, foi possível verificar que, em relação aos reagentes puros, o etanol extrai antocianinas mais eficientemente. Utilizando dois reagentes, observa-se o alto teor de antocianinas obtido pela mistura de água:etanol 3:7 (v/v) que é semelhante às misturas mais usadas para outros tipos de materiais. As misturas de três componentes são melhores para a extração de antocianinas em capim-elefante, uma vez que o maior valor encontrado pelo modelo foi na mistura de água:etanol:metanol 4:4:2 (v/v). Percebe-se pela análise no CLAE-EM que as misturas binárias e a mistura ternária são as mais promissoras em quantidade de antocianinas diferentes no mesmo extrato e os solventes puros mostraram menor poder de extrair substâncias diferentes. A partir da identificação das substâncias separadas, pode-se inferir que a pelargonidina 3-robinobiosídeo e a malvidina são mais comuns nos extratos de capim-elefante roxo.

Palavras-chave: capim-elefante roxo, produtos naturais bioativos, antocianidina, planejamento de misturas, espectrometria.

ABSTRACT

Pennisetum purpureum Schumach, (purple elephant grass, syn (*Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone) has the characteristic color displayed by plants that have anthocyanins, a natural dye that has an effect against cardiovascular and neurodegenerative diseases, benefits the intestinal microbiota and can prevent cancer. This study aimed to obtain the profile of anthocyanin separation in elephant grass by chromatographic and spectroscopic techniques in order to optimize the extraction process and identify different anthocyanins in purple elephant grass focusing on the needs of industrial routines. The samples composed of purple-colored elephant grass leaves were analysed. The mixture design methodology tested different proportions of water, ethanol and methanol for anthocyanin extraction. The special cubic model determined solvent effects with statistical significance by analysis of variance. Then, analysis was performed in Liquid Chromatography coupled to the Mass Analyzer (HPLC-MS) to identify the anthocyanins found. With the results of total anthocyanin content in each extract, it was possible to verify that, in relation to pure reagents, ethanol extracts anthocyanins more efficiently. Using two reagents, the high anthocyanin content was obtained by mixing water and ethanol (3:7), which is similar to the mixtures most used for other types of materials. The mixtures of three components are better for the extraction of anthocyanins in elephant grass, since the highest value found by the model was in the mixture of water:ethanol:methanol 4:4:2. It can be seen from the analysis in HPLC-MS that the binary mixtures and the ternary mixture are the most promising in terms of quantity of different anthocyanins in the same extract and the pure solvents demonstrate to have less power to extract different substances. From the identification of the separate substances, it can be inferred that pelargonidin 3-robinobioside and malvidin are more common in purple elephant grass extracts.

Keywords: purple elephant grass, bioactive compounds, anthocyanidin, mixture design, spectrometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Foto ilustrativa do hábito de um indivíduo de capim-elefante (<i>Cenchrus purpureus</i> (Schumach.) Morrone de coloração arroxeada cultivado na Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora-MG.....	13
Figura 2 – Cultivo de Capim elefante.....	14
Figura 3 - Estrutura química do cátion flavilium.....	17
Figura 4 - Rota de biossíntese das antocianinas.....	18
Figura 5 – Estrutura química das antocianidinas mais conhecidas.....	19
Figura 6 - Características espectrais de antocianinas em pH 1,0 e 4,5.....	22
Figura 7 - Representação dos componentes de um espectrofotômetro UV/Visível...23	
Figura 8 - Diagrama ilustrativo das principais partes de um cromatógrafo líquido de alta eficiência.....	25
Figura 9 - Esquema das principais partes de um espectrômetro de Massas.....	27
Figura 10 - Representação geométrica para o planejamento de mistura centroide simplex.....	31
Figura 11- Foto dos extratos de capim-elefante realizados com mistura de água:etanol:metanol (1:1:1) em pH 2 em duplicata.....	39
Figura 12 - Foto dos extratos de capim-elefante realizados com metanol (100%), etanol (100%) e mistura de etanol:metanol (1:1) em pH 2.....	40
Figura 13 - Curva de nível de antocianinas totais (mg/100g) para diferentes proporções etanol, metanol e água em extratos de capim-elefante roxo.....	41
Figura 14 - Espectros de absorção na região do UV-Visível para diferentes proporções dos solventes etanol, metanol e água em extratos de capim-elefante roxo.....	43
Figura 15 - Relação das antocianinas predominantes obtidas por meio da cromatografia líquida acoplado a espectrometria de massas nas diferentes proporções dos solventes etanol, metanol e água para os extratos de capim-elefante roxo.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Planejamento de misturas para a extração de antocianinas.....	35
Tabela 2 - Resultados do modelo cúbico especial para a extração de antocianinas em capim-elefante roxo.....	38
Tabela 3. Relação das antocianinas predominantes obtidas por meio da cromatografia líquida acoplado à espectrometria de massas nas diferentes proporções dos solventes etanol, metanol e água para os extratos de capim-elefante roxo.....	45

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS.....	12
2.1	OBJETIVO GERAL.....	12
2.2	OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	12
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
3.1	CAPIM-ELEFANTE.....	13
3.2	ANTOCIANINAS.....	15
3.3	MÉTODOS DE ANÁLISE DE ANTOCIANINAS.....	21
3.3.1	Espectrofotometria UV/Visível.....	21
3.3.2	Cromatografia líquida.....	24
3.3.3	Espectrometria de massas.....	27
3.4	PLANEJAMENTO DE MISTURAS.....	30
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
4.1	PREPARO DE AMOSTRA VEGETAL	33
4.2	PREPARO DO EXTRATO VEGETAL.....	33
4.3	EQUIPAMENTOS E REAGENTES.....	33
4.4	PLANEJAMENTO DE MISTURAS.....	34
4.5	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ANTOCIANINAS TOTAIS.....	35
4.6	ESPECTROFOTOMETRIA DE MASSAS.....	35
4.7	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	36
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
6	CONCLUSÕES.....	50
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

1 INTRODUÇÃO

Existe uma preocupação crescente com a alimentação humana e de que forma essa pode ser mais saudável. Sabe-se que algumas substâncias que o ser humano ingere diariamente, principalmente de produtos industrializados causam efeitos prejudiciais ao organismo. Por outro lado, existem fontes naturais que possuem substâncias naturais bioativas benéficas à saúde como as derivadas das antocianinas. Elas estão presentes em diversos produtos de origem vegetal e podem ser utilizadas como corantes naturais na alimentação. Ademais, são antioxidantes e podem combater os efeitos deletérios dos radicais livres no nosso organismo. Vale destacar também que estas substâncias têm apresentado diversos efeitos benéficos aos sistemas cardiovascular e digestivo, atuando na microbiota local, e na prevenção de doenças neurodegenerativas e câncer (MATTIOLI et al.; 2020, OIANO NETO, 2010).

As antocianinas são encontradas comumente em frutas e flores, e sua extração para uso na alimentação humana a partir dessas fontes é bastante comum. O açaí e o repolho roxo são as principais fontes comerciais de antocianinas, porém, o uso de vegetais comestíveis para a extração das antocianinas concorre com o uso para alimentação humana (TEIXEIRA et al., 2008). Dentro deste contexto, é importante a busca por fontes de antocianinas que não tenham esse tipo de uso pois será mais interessante do ponto de vista econômico e ambiental (PAI et al., 2022; ZHOU et al., 2019)

O capim-elefante roxo tem essa cor característica devido a presença das antocianinas. Ele é muito usado na alimentação animal e vem demonstrando funções importantes em estudos para uso como ação bioativa, com propriedades antioxidantes, antimicrobianas, anticitotóxicas, anti-hipertensivas e anti-inflamatórias (OJO et al., 2022). O Brasil possui condições favoráveis ao cultivo do capim-elefante, além do mais reuniu um conjunto de conhecimentos técnicos científicos, tornando o país referência mundial no conhecimento sobre a espécie. Nesse sentido, a Embrapa mantém a variabilidade da espécie por meio do Banco Ativo de Germoplasma de Capim-elefante da Embrapa (BAGCE) (MACHADO et al., 2013). Por ser um capim com alta produtividade ($50 \text{ Mg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$) pode se tornar uma boa fonte de substâncias naturais bioativas. Além do mais, não tem uso na alimentação humana como outras fontes comuns de antocianinas (TEIXEIRA et al., 2008).

Para avaliar se o capim-elefante é uma boa fonte de antocianina é preciso conhecer o perfil químico dessas substâncias, quais delas ocorrem em maior quantidade e como podem ser úteis para os diversos usos, como por exemplo, nutracêutico, farmacêutico, cosméticos, dentre outros. Para responder a essa hipótese investigativa, o presente trabalho obteve o perfil de separação de antocianinas em capim-elefante, por técnicas cromatográficas e espectroscópicas, de forma a otimizar o processo de extração e identificação de diferentes antocianinas em capim-elefante roxo com foco às necessidades das rotinas industriais.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar o perfil de separação de antocianinas em capim-elefante por técnicas cromatográficas e espectroscópicas visando o uso na alimentação e como fitomedicamento.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver e otimizar métodos de extração para antocianinas por meio da aplicação do planejamento de misturas.
- Obter as proporções de solventes mais favoráveis à extração das antocianinas do capim elefante.
- Estudar o perfil da espectrometria eletrônica de varredura das antocianinas de capim-elefante na região do ultravioleta e visível.
- Desenvolver e otimizar método por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa para o estudo do perfil de separação de antocianinas de capim-elefante.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CAPIM-ELEFANTE

O capim-elefante (*Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone syn. *Pennisetum purpureum* Schumach.) é uma espécie vegetal muito valorizada devido à alta taxa de produção de forragem para consumo animal e de biomassa para produção de bioenergia (PEREIRA et al., 2017; ROCHA et al., 2017) (Figura 1). Pode ser utilizado na alimentação de rebanhos sob as formas de capineira, pastejo, feno e silagem. Além do uso forrageiro, o capim-elefante tem sido considerado como uma alternativa sustentável para utilização da biomassa como insumo energético e como matéria prima para a produção de substâncias de alto valor agregado, no conceito de biorrefinaria, sobretudo em função do alto potencial produtivo ($50 \text{ Mg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$) e da sua composição química (ROCHA, 2017).

Figura 1 - Foto ilustrativa do hábito de um indivíduo de capim-elefante (*Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone de coloração arroxeadada cultivado na Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora-MG



Fonte: própria autora (2023).

A origem geográfica e ecológica do capim-elefante é o continente Africano, mais especificamente a África Tropical, entre 10°N e 20°S de latitude, tendo sido

descoberto como planta forrageira no início do século XX (RODRIGUES et al., 2001). Espalhou-se por toda África e foi introduzido no Brasil em 1920, com material propagativo proveniente de Cuba. Hoje, encontra-se difundido nas cinco regiões brasileiras (MACHADO et al., 2013).

O capim elefante apresenta diversas vantagens em relação a outras forrageiras utilizadas no país. Entre as principais vantagens estão a alta produtividade, a resistência a pragas e doenças, a capacidade de rebrotar após o corte e a tolerância a condições de seca e solos de baixa fertilidade. (NEIVA, 2019).

Figura 2: Cultivo de Capim elefante



Fonte: Adaptado de <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/46543710/cultivar-de-capim-elefante-rende-30-a-mais-e-e-adotada-em-todas-as-regioes-do-pais>

A Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) tem desempenhado um papel fundamental no desenvolvimento de pesquisas relacionadas ao capim elefante no Brasil. Desde a década de 1970, a Embrapa tem investido em pesquisas e desenvolvimento de tecnologias para melhorar a produtividade e a qualidade nutricional do capim elefante, contribuindo significativamente para o avanço

da pecuária em regiões tropicais e subtropicais do país como a utilização de adubação, a seleção de variedades mais nutritivas e o pastejo rotativo. Essas estratégias têm contribuído para aumentar a digestibilidade e o teor de nutrientes da forragem, tornando o capim elefante uma opção mais nutritiva para a alimentação do gado (DERESZ et al, 2006).

Uma das principais contribuições da Embrapa no desenvolvimento do capim elefante foi a criação de variedades mais produtivas e adaptadas às condições de clima e solo do Brasil. Entre as variedades desenvolvidas pela Embrapa estão a BRS Capiacu e a BRS Kurumi, que apresentam maior produtividade, qualidade nutricional e resistência a pragas e doenças, em comparação com outras variedades de capim elefante cultivadas no país (PEREIRA et al, 2017).

A ampliação da variabilidade genética do capim-elefante pode ser obtida por meio de coletas, introdução e intercâmbio com instituições nacionais e internacionais. Ao longo dos anos foram realizadas caracterizações e avaliações morfológica, agrônômica e molecular dos acessos, de forma a permitir a compreensão da variabilidade existente na coleção (AZEVEDO et al., 2012; MACHADO et al., 2012). Entre a variabilidade disponível existem mais de uma centena de acessos, dos quais alguns deles de coloração arroxeadada. Atualmente, o foco da pesquisa é no aproveitamento da variabilidade via melhoramento genético, selecionando novos genótipos e cultivares de acordo com o interesse dos produtores e consumidores.

O capim-elefante possui, além dos componentes primários nutricionais, os metabólitos especiais que variam de composição e quantidade conforme o local, clima e o tipo de tratamento que a planta recebe. Por isso é interessante avaliar cada uma dessas substâncias, pois irão fornecer informações importantes sobre os métodos de sobrevivência a estresses bióticos e abióticos (MACHADO, 2013). Em contrapartida, podemos encontrar substâncias de alto valor agregado como as antocianinas que tem larga escala de possibilidades de uso em alimentação humana e nutracêutica (MATTIOLI et al., 2020).

O conhecimento existente sobre a espécie de capim-elefante tem sido ampliado em relação a genética e genômica (MACHADO, 2013; AZEVEDO, 2011), porém estes estudos contemplam poucos marcadores relacionados aos metabólitos secundários, mais precisamente relacionados a metabolômica. As análises utilizadas neste processo podem fornecer informações importantes, tais como similaridades ou diferenças entre os acessos e cultivares, forma de resistência a pragas ou toxidez do

solo, estresse hídrico (ARAÚJO et al., 2010), por exemplo. Além do mais, podem contribuir para a identificação de substâncias que prospectam essa planta para usos além do agrônomo.

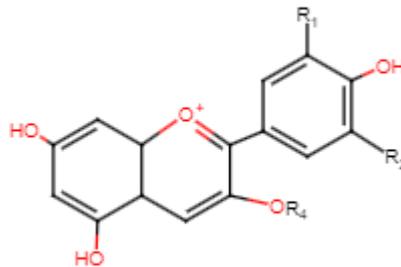
3.2 ANTOCIANINAS

Plantas têm sido usadas no tratamento de doenças desde tempos antigos. Muitas drogas sintéticas estão disponíveis para tratamento de diversas doenças, mas que possuem diversos efeitos colaterais. Pesquisadores procuram por fitoquímicos que possuem poucos efeitos adversos e vários estudos demonstram que diversas plantas, fungos e animais marinhos possuem princípios ativos contra doenças (KOUR et al., 2022; AMEEN et al., 2020).

O capim-elefante roxo recebe esse nome devido a cor característica das folhas causado pela presença de corantes naturais como antocianinas. Elas podem ser de cor roxa e vermelha, alaranjadas ou marrom, dependendo do pH. As antocianinas são metabólitos especiais produzidos pelos vegetais para sua sobrevivência e agem como proteção contra as formas radicalares de Oxigênio, pragas, intempéries como sol e chuva excessivos e até como chamariz para agentes polinizadores. Ademais, esses metabólitos especiais podem ter valor para a saúde humana em usos como farmacêutico e nutracêutico (MARTÍN et al., 2017; FREITAS, 2019, FANG, 2015).

O termo antocianina quer dizer “flor azul” em grego. As antocianinas são substâncias que fazem parte do grupo dos flavonóides encontradas em plantas, especialmente em seus frutos e flores. Possui uma estrutura característica composta do cátion flavilium, formado por um esqueleto de 15 carbonos na forma da estrutura C6-C3-C6 e absorve energia luminosa na região do visível. Por isso são facilmente detectáveis por métodos espectrofotométricos na faixa de comprimento de onda entre 500 e 600 nm, nas quais apresentam maior capacidade de detecção, mas outros também podem ser usados dependendo da técnica utilizada. Na figura 3 está apresentado a estrutura química do cátion flavilium.

Figura 3 - Estrutura química do cátion flavilium

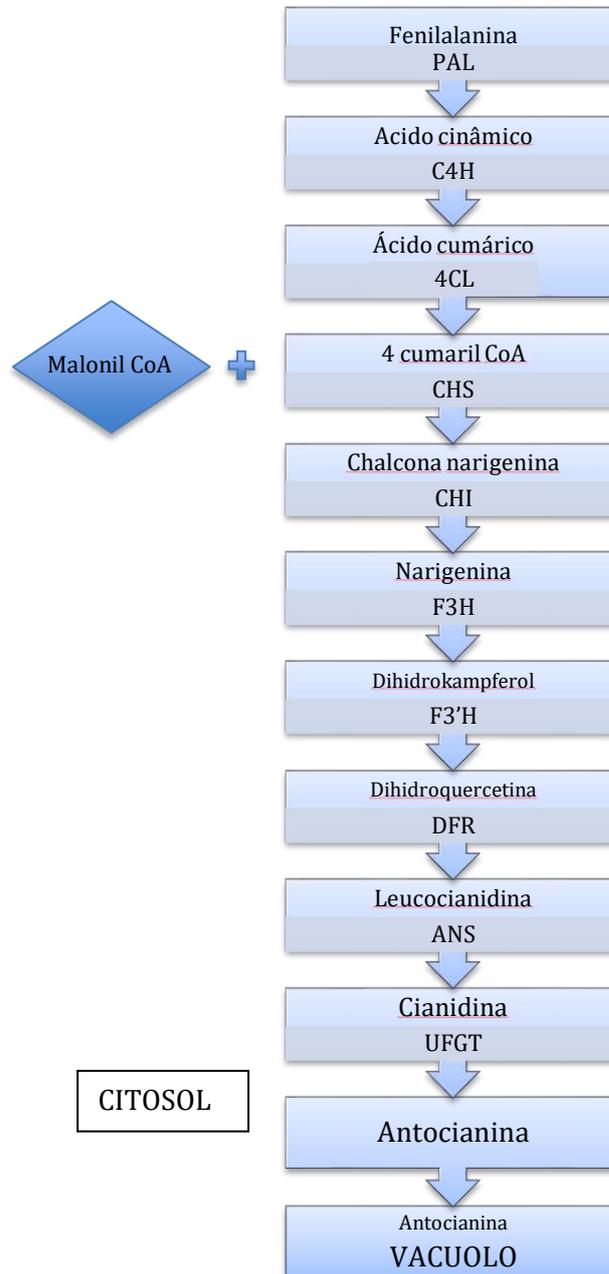


Fonte: ACD/ChemSketch (Freeware) (2021)

As antocianinas são derivadas de duas rotas sintéticas, a do ácido chiquímico e a do acetato, cujo composto intermediário são as chalconas. Essas rotas passam por várias etapas de hidroxilação, metilação e glicosilação que originam substâncias com estruturas semelhantes como flavona, flavonóis, antocianinas e catequinas (DEWICK, 2009).

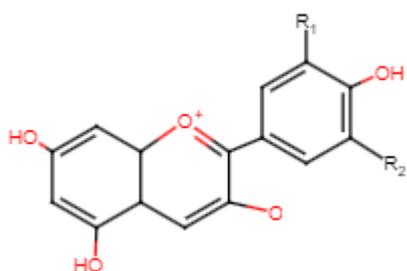
A rota biossintética de forma resumida (Figura 4) das antocianinas nos vegetais se inicia na fenilalanina que é convertida em ácido cinâmico pela fenilalanina amônia-liase que é convertido em ácido cumárico pela ação da cinamato-4-hidroxilase e convertido em 4-cumarilCoA pela 4-cumaril CoA ligase. A 4-cumaril CoA se une à malonil CoA originando a chalcona narigenina que pela ação da chalcona isomerase produz narigenina e dihidroflavonois como a dihidrokampferol e a dihidroquercetina. Na fase final da rota de biossíntese são produzidas leucocianidinas que originam cianidinas e finalmente as antocianinas (MATTIOLI, 2020).

Figura 4: Rota de biossíntese das antocianinas



Fonte: Adaptado de Mattioli (2020)

A estrutura das antocianinas muda conforme o número, tipo e posição do açúcar ligado a ela e da posição e do número de radicais hidroxila e metila ligados ao anel B. A antocianina “pura” sem ligação com açúcares é chamada de antocianidina (Figura 5).

Figura 5 - Estrutura das **antocianidinas** mais conhecidas

Antocianidina	Grupo em R1	Grupo em R2
Cianidina	OH	H
Delfinidina	OH	OH
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃
Pelargonidina	H	H
Peonidina	OCH ₃	H
Petunidina	OCH ₃	OH

Fonte: própria autora (2023)

As antocianinas podem ser do tipo acilada e não acilada. As aciladas tem um açúcar ligado a um ácido aromático ou alifático e as não aciladas não tem o ácido ligado. A maior ocorrência é de antocianinas aciladas que são mais estáveis que as suas contrapartes não aciladas (SAHA et al., 2020).

Radicais livres são conhecidos por agredirem as células do corpo humano causando degradação molecular e levando, entre outros problemas, ao envelhecimento precoce e ao câncer. O acúmulo de radicais livres tem diversos efeitos no organismo como peroxidação lipídica e danos ao DNA e as proteínas. O sistema nervoso é o órgão mais ativo do corpo humano e o grande consumo de Oxigênio leva ao aumento na geração dos radicais livres. Estresse oxidativo é o maior fator envolvido na neurodegeneração e a perda de neurônios é tanto relacionada com o decréscimo do suprimento de antioxidantes quanto ao aumento da produção de radicais livres. Algumas doenças causadas pela neurodegeneração pelo estresse oxidativo são as Doenças de Parkinson, Alzheimer, esclerose lateral amiotrófica (ELA), esclerose múltipla, e outras (KAMAL et al., 2019).

O corpo humano possui algumas formas de se prevenir dos danos causados pelos radicais livres. Esses modos podem ser naturais ou sintéticos e enzimáticos ou não enzimáticos. No caso de serem enzimáticos atuam as catalases, a superóxido dismutase e a glutathiona peroxidase. No caso dos sistemas antioxidantes não enzimáticos atuam as vitaminas e os produtos naturais originários de plantas, os chamados fitoquímicos. As vitaminas não são produzidas pelo organismo humanos e

devem ser consumidas na dieta. Os fitoquímicos como antocianinas, isoflavonas, catequinas e rutina têm efeito antioxidante já relatado na literatura. As antocianinas apresentam cargas positivas e são reativas aos radicais livres presentes no organismo, neutralizando os mesmos e contribuindo para sua eliminação do organismo. (KAMAL et al., 2019).

As antocianinas estão sendo estudadas nas diversas áreas da medicina humana e suas potencialidades nesses estudos são cada vez mais promissoras. As frutas são grandes fontes de antocianinas e podem ser classificadas conforme os tipos que mais aparecem e que atuam em diversas doenças no organismo (FANG, 2015). Yildiz et al (2021) relataram como as antocianinas podem ser usadas na obesidade e chegaram à conclusão de que elas agem de cinco formas diferentes: através da inibição da absorção de lipídeos, do aumento do gasto energético, da regulação do mecanismo lipídico, do controle do consumo de alimentos e da regulação da microbiota intestinal.

Os cálculos teóricos têm sido muito usados para entender e prever as características químicas e físicas das antocianinas e seus derivados. Sinopoli et al (2019) concluíram que os cálculos realizados pelos novos métodos de Teoria Funcional da Densidade (DFT) são úteis para identificar os sítios ativos das moléculas, as mudanças estruturais em diferentes pHs e descrever suas propriedades antioxidantes.

As antocianinas também podem ser utilizadas como indicadores de pH naturais, tendo sido inclusive aplicadas no desenvolvimento de tecnologias para detecção de deterioração de produtos lácteos (WESTON et al., 2020). Existem pesquisas envolvendo as potencialidades de uso em sistemas estruturados para a geração de energia solar devido sua capacidade de absorção luminosa e transformação química (AYALEW et al., 2016; SINOPOLI et al., 2019).

Frutas são fonte de antocianinas na dieta e fornecem até 70% do consumo diário dessas substâncias. As antocianinas não são consideradas nutrientes essenciais e por isso não há ingestão diária recomendada, mas um trabalho desenvolvido na China sugeriu a ingestão diária de 50 mg. A avaliação da ingestão diária de antocianinas ainda é imprecisa devido as dificuldades de quantificação delas nos alimentos mas estima-se entre 12 a 65 mg/dia a ingestão nos Estado Unidos e Europa. Ou seja, conclui-se que há espaço e demanda para aumento do consumo dessas substâncias na dieta (MATTIOLI et al, 2020).

Produtos alimentares como refrigerantes, geleias, compotas, laticínios e sucos podem ser beneficiar da adição dessas substâncias pois além de atuar como antioxidantes e proteger os alimentos de degradação também adiciona a vantagem de aumentar o potencial nutricional exercendo efeitos de promoção da saúde. No entanto o uso de corantes de antocianinas tem o desafio da estabilidade pois tendem a degradar rapidamente em presença de luz, oxigênio, enzimas e temperatura extrema. Alguns métodos têm sido usados para reverter esse processo como microencapsulação, exclusão de oxigênio, adição de co-pigmento e derivatização química. Microencapsulação ou complexação com biopolímeros como maltodextrinas e beta-glucanos parecem fornecer uma proteção eficiente. Os micro transportadores podem ser produzidos por secagem por pulverização ou liofilização e uma abordagem alternativa para microencapsulação é representada por nano formulações como nano lipossomas ou nano emulsões (CHEN; INBARAJ, 2019).

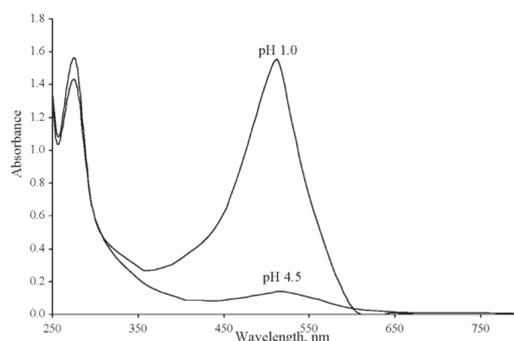
3.3 MÉTODOS DE ANÁLISE DE ANTOCIANINAS

As antocianinas são solúveis em solventes polares e são instáveis em pH neutro ou básico (LOPES et al., 2007; CORTEZ et al., 2016; STAVENGA et al., 2021), o que favorece a mediação da extração em solução hidro alcoólica em meio acidificado, através do uso de uma mistura de etanol 70% e ácido clorídrico 5% até pH 2. Para a quantificação das antocianinas de forma rápida, podem ser usadas técnicas de espectrofotometria na região da radiação Ultravioleta e Visível. Para a identificação é feita a separação dos componentes do extrato em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), sendo os componentes eluídos por solventes apropriados, seguida da espectrometria de massas onde são separados conforme a relação massa/carga (m/z) de cada um (MARÇO et al., 2008).

3.3.1 – Espectrofotometria UV/Visível

A quantificação pode ser realizada pelo método do pH diferencial, que consiste na diferença de absorção luminosa conforme a variação do pH (Figura 6). Em pH 1, o valor da absorção é maior que em pH 4,5, pois a estrutura das moléculas muda, então a diferença entre os sinais é usada para quantificar as amostras conforme recomenda o método oficial da Official Methods of Analysis de 2005 (AOAC, 2005).

Figura 6 - Características espectrais de antocianinas em pH 1,0 e 4,5



Fonte: Adaptado de LEE et al. (2005).

O método do pH único é mais simples e econômico e utiliza as leituras em espectrofotometria de um valor de pH 2, e a partir das medidas de absorvância é possível calcular o teor total das antocianinas conforme a fórmula:

$$AntTmg \frac{Ant}{100g} Amostra = \frac{DO_{535nm} \times Ve1 \times Ve2 \times 1000}{Valq \cdot m \times E_{1cm}} \quad \text{Equação 1}$$

Em que:

DO_{535nm} : valor da absorvância no comprimento de onda de 535nm

V_{e1} : extrato concentrado

V_{e2} : extrato diluído

V_{alq} : alíquota do extrato 1

m = peso da amostra

E_{1cm} = coeficiente de extinção

Fonte: TEIXEIRA et al., 2008

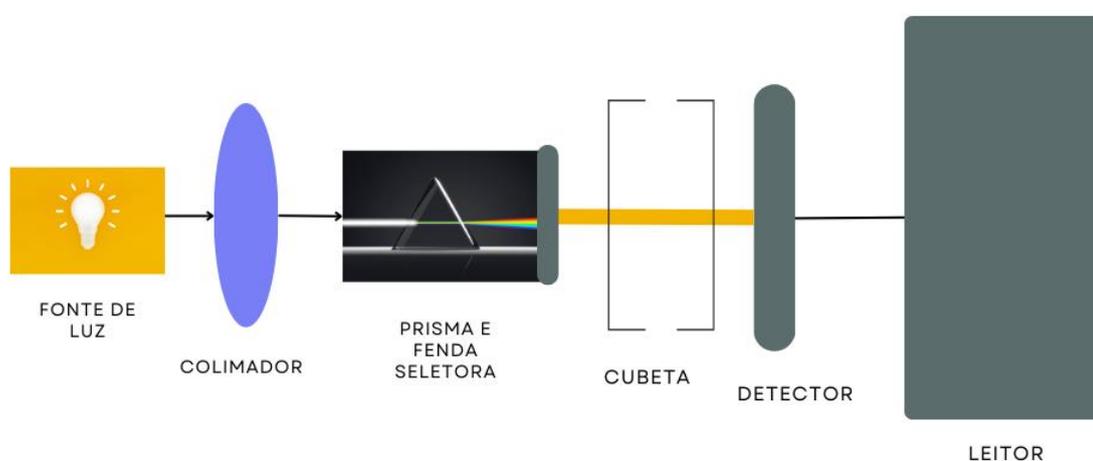
No trabalho de Teixeira et al (2008) é feita comparação entre os métodos pH único e pH diferencial e não foi encontrado diferença significativa entre os resultados considerando amostras de matrizes diferentes de plantas como frutos e folhas.

No presente trabalho utilizou-se uma metodologia para medir o teor total de antocianinas que fosse prática e simples de ser executada. Procurou-se um método que não demandasse muito tempo de preparo e exposição a altas temperaturas, evitando a perda das substâncias extraídas. Também procurou-se utilizar um método que pudesse ser facilmente adaptado as condições de infraestrutura dos laboratórios pois a aquisição de equipamentos específicos para essa análise não seria possível.

Nessa metodologia do pH único utilizamos os extratos brutos para leitura da absorbância e cálculo do teor total de antocianinas. Com isso não foi necessário realizar o processo de secagem dos solventes. Devido à complexidade das soluções extratoras há dificuldade de adaptar o processo de secagem aos diferentes extratos. Além disso esse processo poderia causar degradação das substâncias gerando resultados subestimados.

A espectrofotometria uv/visível tem sido cada vez mais usada em diversas aplicações nas áreas de pesquisa. Ela é muito útil em diversos campos desde pesquisas em moléculas biológicas, vapores de óleo de cozinha até estudos em aço e meio ambiente. Na área farmacológica pode ser usada na avaliação de teor de princípios ativos de medicamentos por ser um método rápido e relativamente barato. Pode ser usada também em diversas aplicações como no mercado de materiais para análise de papel, filmes, tecidos, óculos; no mercado de química para identificação de substâncias, controle de qualidade e medidas de cores e na área de biotecnologia em estudos de reações enzimáticas, análises de drogas, de amostras biológicas, íons, proteínas entre outras (TERRA, 2020).

Figura 7: Representação dos componentes de um espectrofotômetro UV/Visível



Fonte: própria autora (2023)

O princípio básico da espectrofotometria é que cada composto absorve ou transmite luz em uma certa amplitude de comprimento de onda. Assim, a avaliação também pode ser usada para medir a quantidade de uma substância química

conhecida. É realizada a medição da intensidade da luz em comprimentos de onda, sendo que os componentes de uma solução podem ser identificados por seus espectros característicos ao ultravioleta, visível ou infravermelho (Figura 7). Como uma impressão digital, saber exatamente a cor absorvida, nos permite identificar e quantificar materiais diferentes. Quanto mais concentrada for a solução, maior será a absorção de luz. Por outro lado, a cor da solução é determinada pela cor da luz transmitida (TERRA, 2020).

A luz é uma forma de radiação eletromagnética que possui características de onda e de partícula (fóton). Os diferentes elementos absorvem energia em comprimentos de onda específicos. A cor de uma solução está relacionada ao comprimento de onda complementar ao apresentado. Portanto, uma solução aparece como branca porque transmite luzes de todas as cores. Quando absorve luzes de todas as cores, a solução é preta. Finalmente, a solução é verde quando absorve luz vermelha e transmite luz verde (amarelo mais azul), denominada de cor complementar. As radiações eletromagnéticas com comprimento de onda entre 380 e 780 nm são visíveis ao olho humano. Abaixo de 380 nm é denominada ultravioleta (UV) e acima de 780 nm correspondem à zona infravermelha (TERRA, 2020).

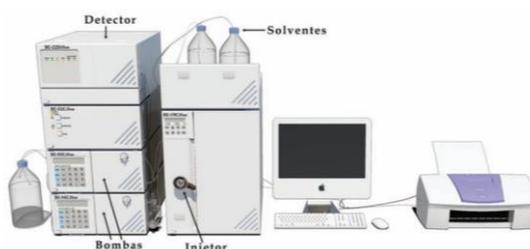
3.3.2 Cromatografia Líquida

Cromatografia líquida é uma técnica amplamente utilizada na separação de substâncias. Ela consiste na separação delas em uma coluna onde está a fase sólida e um solvente que está na fase líquida carregando os analitos pela coluna. As substâncias são separadas conforme a afinidade deles com a fase móvel ou com os sítios ativos da fase estacionária, ou coluna. Na cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), esse processo é acelerado pelo aumento da taxa de fluxo de fase móvel, o que faz com que os líquidos se separem em velocidade e eficiência melhoradas (LANÇAS, 2009).

Na Figura 8 é ilustrado um esquema de um cromatógrafo líquido com suas partes correspondentes. Nessa técnica o solvente denominado eluente ou fase móvel é impulsionado por uma bomba de alta pressão. No caminho a amostra é introduzida pela válvula de injeção e arrastada para a coluna onde ocorre a separação. O efluente da coluna passa por um detector que acusa a presença dos analitos e o sinal gerado por ele é captado por um software apropriado e tratado no computador. Um

cromatograma é gerado mostrando a variação do sinal em função do tempo de análise (LANÇAS, 2009).

Figura 8: Diagrama ilustrativo das principais partes de um cromatógrafo líquido de alta eficiência.



Fonte: Adaptado de F. M. Lanças (2009).

Essa técnica é utilizada para permitir a separação de misturas de substâncias. Ela age muito bem em meios complexos como um extrato de planta permitindo a eficiente separação de todos os componentes que compõem essa mistura de forma que possam ser identificados nas diversas formas de detecção. A cromatografia líquida foi definida na primeira década do século passado, pelos trabalhos do botânico russo, Mikhail Tswett. Seus estudos eram focalizados na separação de pigmentos em uma coluna empacotada com partículas, pigmentos estes extraídos de plantas usando solventes (LANÇAS, 2009).

Existem várias possibilidades de sistemas de detecção. No presente documento, será destacado os dois tipos de detectores utilizado, a saber: detector por arranjo de diodos, do inglês *Diode Array Detector - DAD*, o qual utiliza radiação ultravioleta e visível para leitura e identificação das partes cromóforas da molécula. Os espectros de absorção UV/Visível podem fornecer informações importantes sobre a natureza das agliconas, o padrão de glicosilação e as possibilidades de acilação. Detectores de comprimento de onda único podem monitorar seletivamente as antocianinas entre 520 e 546 nm onde outros compostos fenólicos não são detectáveis (COSTA et al., 2000).

Conforme Costa et al. (2000) a cromatografia líquida de fase reversa é a mais utilizada para separação de antocianinas e existem diversos métodos desenvolvidos para essas substâncias. Algumas condições são normalmente seguidas como detecção por DAD. Colunas cromatográficas do tipo C18 são as mais usadas, mas

colunas de poliestireno também são úteis nesses casos, e dependendo do fabricante as características de separação variam. Para separar substâncias semelhantes como os fenólicos é mais eficiente usar eluição gradiente usando metanol ou acetronitrila. O pH do sistema de eluição é mantido abaixo de dois pela adição de ácidos fórmico, acético ou tricloroacético (MATTIOLI et al, 2020).

Mesmo que algumas antocianinas puras estejam disponíveis como padrões analíticos para a quantificação de substâncias conhecidas, ainda existem muitas moléculas não disponíveis ou recentemente descobertas com diferentes modificações, principalmente na região das moléculas que envolvem porções de açúcar. Por isso existem trabalhos que identificam a estrutura das substâncias através de outros métodos como comparação de tempo de retenção (MATTIOLI et al, 2020).

A polaridade das antocianidinas é o fator que mais afeta o tempo de retenção da cromatografia líquida, sob condições normais a ordem de eluição começa pelos derivados de delphinidina, seguido por cianidina, petunidina, pelargonidina, peonidina e por último malvidina pois a retenção aumenta conforme aumenta o número de grupos hidroxila ligados ao núcleo flavilium. A presença de açúcares aumenta o tempo de retenção e diglucosídeos eluem antes de monoglicosídeos. A acilação também aumenta o tempo de retenção (COSTA et al, 2000).

Goiffon et al. (1998) utilizaram a técnica de cromatografia líquida usando a detecção em comprimento de onda único (525 nm) com sistema de eluição isocrático com água, acetonitrila e ácido fórmico e conseguiram obter a separação de nove antocianinas diferentes em oito amostras de sucos de frutas e xaropes. E Tsao e Yang (2003) otimizaram uma fase móvel que pudesse explorar a composição fenólica com a intenção de determinar um índice fenólico total usando a cromatografia líquida de alta eficiência. Madrera e Valles (2020) conseguiram analisar 17 amostras de feijão quanto ao teor de fenólicos utilizando cromatografia líquida de fase reversa com detecção pelo sistema DAD e as condições de extração assistida por ultrassom foram avaliadas e otimizadas pela metodologia de resposta de superfície.

O uso de detectores modernos e softwares dedicados permitem a quantificação de componentes das misturas em concentrações extremamente baixas, mas a parte de identificação é bastante limitada. Ela está sujeita aos erros devidos ao uso dos tempos de retenção para a identificação dos analitos. Apesar de ser característico de cada substância o tempo de retenção não é único e várias substâncias podem ter o mesmo valor (LANÇAS, 2009). Outro sistema de detecção muito utilizado é a detecção

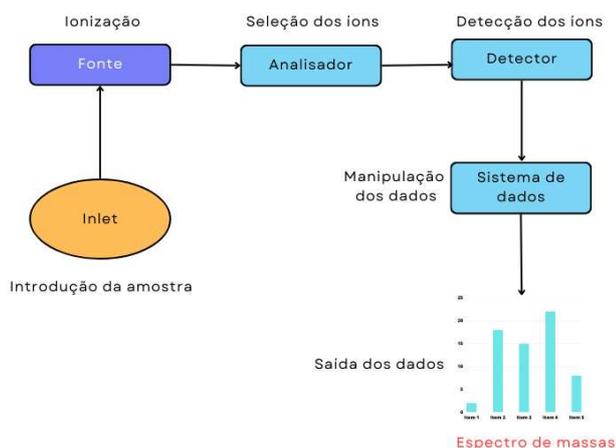
por espectrometria de massas, do inglês, *Mass Spectrometer detector* – MS, o qual ioniza a amostra e utiliza a equivalente massa/carga do composto para identificar cada um (COSTA et al., 2000).

3.3.3 Espectrometria de massas

A extração de substâncias naturais de plantas origina soluções de composição complexa. Além disso, o fato de as antocianinas serem um grupo de substâncias tão diversas dificulta obtenção de padrões analíticos. Nesse caso é interessante usar uma técnica analítica que possa identificar as substâncias de forma simples e eficiente, como a espectrometria de massas. Nela, as substâncias são separadas conforme sua massa e podemos utilizar bancos de dados ou comparar com outros trabalhos similares do mesmo material para encontrar as moléculas correspondentes (COSTA et al., 2000).

A Figura 9 ilustra um esquema genérico e simplificado de um espectrômetro de massas. A amostra é introduzida por um “inlet” e direcionada para a fonte de ionização. No caso de um espectrômetro de massas acoplado a um cromatógrafo líquido os sinais cromatográficos gerados pela separação dos componentes são introduzidos individualmente na fonte de ionização para gerar os íons a serem posteriormente separados no analisador e encaminhados para detecção e quantificação. Um *software* dedicado efetua os cálculos e gera os espectros de massas e também comanda as funções do espectrômetro. (LANÇAS, 2009)

Figura 9: Esquema das principais partes de um espectrômetro de massas.



O desenvolvimento de novos métodos com alta sensibilidade e seletividade para o estudo de antocianinas é altamente buscado. A robustez dos instrumentos de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, aliada à redução do preço desses instrumentos tem contribuído. Métodos de ionização, como ionização por *Electrospray* (ESI) e dessorção/ionização a laser assistida por matriz (MALDI), hifenizados com vários detectores, como Orbitrap, armadilha de íons (IT), quadrupolo triplo (QqQ), tempo de voo (TOF), e tempo de voo quadrupolo (QTOF) são frequentemente usados no estudo de antocianinas (ONGKOWIJOYO; LUNA-VITAL; MEJIA, 2018).

A ionização pelo modo *Electrospray* ocorre em ambiente de pressão atmosférica onde a amostra é dissolvida em um solvente e pressurizada em um tubo capilar ao qual é aplicada uma voltagem entre 3000 e 5000V. O líquido emerge do capilar na forma de aerossol e as gotículas formadas perdem sucessivamente o solvente e os íons fluem para o espectrômetro de massas induzidos pelos efeitos da atração eletrostática e pelo vácuo do analisador. Ele pode ser operado em modo positivo ou negativo. No modo positivo as gotículas saem do spray com carga positiva e o eletrodo recebe os elétrons ocorrendo um processo de oxidação. No modo negativo ocorre o oposto (LANÇAS, 2009).

O quadrupolo é o analisador de massas mais popular atualmente devido a sua simplicidade e baixo custo relativo, além de possuir boa linearidade e ser de fácil operação. Ele é composto de quatro barras cilíndricas feitas de metal separadas em dois pares sendo que um tem potencial elétrico positivo e outro negativo. Uma combinação de corrente contínua e radiofrequência é aplicada nas barras. Considerando-se a amplitude entre eles, os íons, que apresentarem certa razão massa/carga que esteja em ressonância com o campo aplicado, irão passar pelas barras e serão detectados. Os demais terão suas trajetórias instáveis e serão eliminados pela bomba de vácuo (LANÇAS, 2009).

Até o momento, ESI/TOF são os instrumentos mais populares usados na identificação de antocianidinas e seus glicosídeos, devido à sua alta sensibilidade e capacidade de pico. MALDI-TOF, no entanto, não é tão amplamente utilizado uma vez que o peso molecular de 500 unidades de massa é uma faixa de massa difícil para análise de MALDI-TOF. Apesar das dificuldades, MALDI-TOF é ideal para análise de antocianinas oligoméricas e misturas complexas, pois produz um único íon molecular carregado para cada molécula parental. O detector mais popular usado no estudo de

antocianinas é o TOF devido à sua alta velocidade de varredura. O Orbitrap, embora forneça uma alta resolução, é altamente dependente do tempo e do modo de varredura, que, em comparação com o TOF, fica aquém do poder de resolução (ONGKOWIJOYO; LUNA-VITAL; MEJIA, 2018).

Existe o analisador do tipo Q-TOF (quadrupolo-tempo de voo) que possui elevada resolução, boa sensibilidade e velocidade de varredura. Porém, exigem eletrônica muito elaborada, controle do tempo e da energia inicial precisos e distribuição espacial dos íons. Sua aplicação é bastante ampla, especialmente quando alta resolução é necessária. A faixa de massas que analisa é ampla exceto para valores superiores a 500.000 Da pois são difíceis de serem determinadas com boa precisão e exatidão. (LANÇAS, 2009)

As antocianidinas que existem predominantemente como cátions flavílium, permitem que o modo de ionização positiva seja o mais usado em sua identificação. Pesquisas posteriores, no entanto, mostram que a ionização ESI de modo negativo pode ser útil no estudo devido à sua alta sensibilidade. No modo de ionização negativa, o espectro MS obtido é geralmente mais complexo em comparação com o modo de ionização positiva com o íon M^+ observado como o íon mais intenso. No entanto, em comparação com o modo de ionização positiva, o modo de ionização negativa permite a diferenciação das antocianinas dos outros fenóis, como glicosídeos de flavonol (ONGKOWIJOYO; LUNA-VITAL; MEJIA, 2018).

A espectrometria de massas, além da identificação das substâncias também contribui com a identificação dos diversos modos de ionização e fragmentação das substâncias contribuindo para o conhecimento aprofundado das estruturas (POLISELI et al., 2018). Hong et al. (2020) utilizaram a espectrometria de massas para caracterização e quantificação de antocianinas em matrizes complexas de grãos de milho pigmentados. Yang et al. (2017) desenvolveram uma abordagem alternativa para avaliação de frutas contendo antocianina de modo que foram usados os dados espectrais de massas das substâncias em vez dos cromatogramas. As misturas de antocianinas foram separadas dos outros componentes em tempo de gradiente curto (5 min) e o espectro de massas representativo foi obtido a partir do cromatograma. Os dados quimiométricos dos espectros continham informações de identificação e quantificação relativa de antocianinas com precisão e exatidão.

3.4 PLANEJAMENTO DE MISTURAS

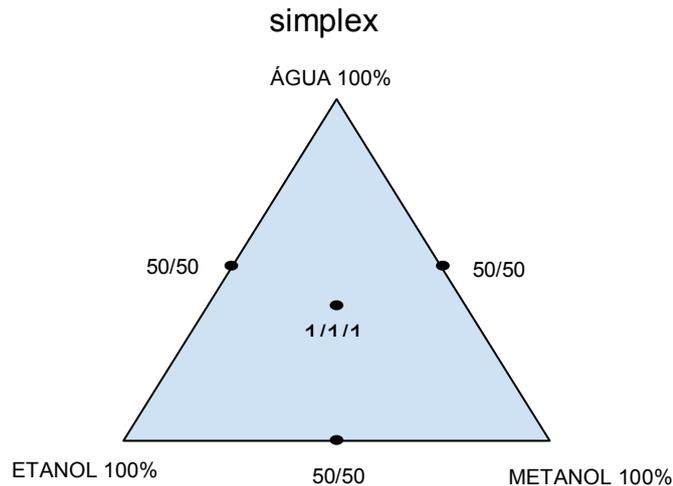
As interações que ocorrem entre um solvente e o material a ser extraído são inúmeras, e é difícil prever para cada material qual o solvente ideal sem fazer experimentos que demonstrem qual tem maior eficácia. Ocorrem situações em que a mistura de dois ou mais solventes altera a capacidade de cada um deles gerando efeitos sinérgicos ou antagônicos, e o resultado final pode ser diferente do esperado. Para isso existem experimentos de planejamento de misturas que podem demonstrar esses resultados de forma mais simples (NOVAES et al., 2018).

No planejamento de misturas podemos usar solventes em combinações pré-determinadas e depois com os resultados obtidos gerar um modelo de regressão que forneça valores de predição para outras composições de misturas. Assim, misturas de dois e três solventes podem ser testadas simultaneamente e a partir dos resultados coletados pode-se gerar uma equação usada para prever o efeito de outras misturas sem necessariamente realizar a extração (NOVAES et al., 2018).

De forma gráfica os planejamentos de mistura podem ser representados por uma linha para dois componentes, um triângulo equilátero para três variáveis e para quatro variáveis um tetraedro. Acima de quatro esses planejamentos tem representações abstratas e a sua visualização e interpretação ficam comprometidos. A escolha do planejamento adequado deve levar em consideração o número de variáveis e as interações entre elas, a complexidade do planejamento, a validade estatística, a efetividade da modelagem e a viabilidade e os custos envolvidos na sua execução (NOVAES et al., 2018).

Nesse trabalho foi executado o planejamento de mistura centroide simplex e na Figura 10 tem-se a representação geométrica dele. Nos vértices do triângulo estão representados os solventes puros, nas laterais as proporções para a combinação de mistura para dois componentes e na região do interior do triângulo a composição de mistura para três componentes. A soma das proporções de todos os componentes de uma mistura deve ser sempre igual a 100%. Dessa forma, além dos componentes puros pode-se testar as interações entre dois e entre três solventes e a amostra (NOVAES et al., 2018).

Figura 10- Representação geométrica para o planejamento de mistura centroide



Fonte: própria autora (2023).

Este planejamento foi proposto por Scheffé (1963) de forma a simplificar os modelos usados na época que demandavam muitos pontos de análise, se tornando trabalhosos e caros.

Após a obtenção das respostas correspondentes a cada ponto definido pelo modelo experimental os coeficientes b podem ser estimados usando o método dos mínimos quadrados na forma matricial de acordo com a equação 2:

$$B = (X^T X)^{-1} (X^T Y) \quad \text{Equação 2}$$

Fonte: Novaes et al (2018)

Onde Y é o vetor que contém as respostas para cada ponto. Cada linha da matriz X corresponde a uma mistura e contém a mesma ordem vertical no vetor Y .

Para avaliar o nível de significância as estimativas dos seus erros devem ser determinadas pela equação 3:

$$\text{Var}(B) = (X^T X)^{-1} s^2 \quad \text{Equação 3}$$

Fonte: Novaes et al (2018)

Onde s^2 é a variância global associada as medidas realizadas em relação aos experimentos.

Para experiências de misturas contendo dois ou mais componentes pode-se desenvolver um modelo linear, quadrático, cúbico completo e cúbico especial. Geralmente a presença de um termo cúbico é suficiente para descrever a região estudada desta forma o modelo cúbico especial é preferido.

Para o modelo experimental centroide simplex foi proposta a função polinomial cúbico especial (Equação 4), que contém apenas os pontos experimentais relacionados a presença de componentes em proporções iguais dentro do espaço experimental. Podem ser inseridos outros pontos experimentais no interior do domínio, conforme a necessidade até mesmo para ajustar a um modelo cúbico completo (NOVAES et al., 2018).

$$y = b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{123}x_1x_2x_3$$

Equação 4

Fonte: Barros Neto et al. (2001)

Para expressão dos resultados globais obtidos com a equação gerada pelo modelo, podem-se usar figuras como a superfície de resposta e o gráfico de curva de níveis. Essa metodologia é utilizada em diversos processos industriais. (BARROS NETO et al., 2001).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PREPARO DA AMOSTRA VEGETAL

Folhas e caules de *Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone foram coletadas em amostras implantadas na Sede da Embrapa Gado de Leite, em Juiz de Fora - MG (21°46'57''S; 43°23'13''W; 1041 m acima do nível do mar). Essa coleção foi implantada a campo em 04/03/2020 e realizado corte de uniformização no dia 19/05/2020, seguindo as recomendações técnicas para o cultivo do capim-elefante (ITALIANO, 2004). Foram realizadas coletas em fevereiro e março de 2021 e 2022, a folha e o colmo foram separados, reduzidos a pequenos fragmentos, acondicionados em sacos plásticos e armazenados em *freezer* a -20°C. A avaliação foi realizada em amostras compostas de folhas das duas coletas. O material vegetal foi constituído por um genótipo elite do programa de melhoramento de capim-elefante da Embrapa, denominado "T_44.1", o qual foi selecionado em função da alta produção de biomassa e alta intensidade de coloração arroxeadada nas flores, folhas e colmos.

4.2 PREPARO DO EXTRATO

Para realizar a extração foi utilizado 5g (+/-0,05) de amostra de folhas descongeladas em temperatura ambiente. A amostra foi reduzida a pequenos fragmentos e colocada em béquer com a solução extratora, conforme os 7 ensaios do planejamento de misturas, posteriormente foi armazenada em geladeira por 24h. Depois, o extrato obtido foi filtrado com gaze e o líquido recolhido em balão volumétrico de 100mL, completando-se o volume com a mesma solução usada na extração. Foram realizadas medidas de pH no extrato final. Foi realizado o processo de purificação partição líquido-líquido para retirada de substâncias interferentes tais como a clorofila, utilizando mistura de éter etílico:éter de petróleo 1:1 (v/v), em funil de separação. Foi descartada a fase do éter que apresentava cor esverdeada, indicando a presença de clorofila em maior quantidade (TEIXEIRA et al., 2008).

4.3 EQUIPAMENTOS E REAGENTES

As análises foram realizadas no Laboratório de Análise de Alimentos da Embrapa Gado de Leite e nos laboratórios Central Bio e de Química Analítica e

Quimiometria da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). Foram utilizados os equipamentos espectrofotômetro UV/Visível: marca Instrutherm modelo UV-1000 A em 535nm; Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE): marca Agilent Technologies modelo 1260 Infinity II; Espectrômetro de massas (MS): marca Agilent Technologies modelo 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS e Espectrofotômetro UV/Visível de varredura: marca Thermo Scientific modelo Genesys 150, em comprimentos de onda de 200 a 900 nm. Foi feita calibração do branco com água pura e do bloco escuro antes de todas as leituras.

Os reagentes utilizados foram adquiridos das empresas VETEC Química Fina Ltda., Dinâmica Química Contemporânea Ltda., Sigma Aldrich Corporation e Cromoline Química Fina. A água foi purificada por sistema de osmose reversa. Os reagentes de grau analítico utilizados no extrato de capim-elefante foram: etanol, metanol, éter etílico e éter de petróleo. Os reagentes de grau CLAE utilizados na análise em CLAE-MS foram: ácido fórmico e acetonitrila.

4.4 PLANEJAMENTO DE MISTURAS

Por meio da metodologia de planejamento de misturas (BARROS NETO et al., 2001) foram realizados os ensaios com diferentes proporções de água, etanol e metanol para extração de antocianinas das folhas de capim-elefante. Devido característica polar das antocianinas sua extração ocorre melhor com solventes também polares, conforme os utilizados. A água é o mais indicado para solubilização por ser o mais polar. O etanol e o metanol, além da polaridade, agem nas membranas celulares favorecendo a extração das substâncias que estão dentro das células (TEIXEIRA et al., 2008). A partir desse estudo, pode-se avaliar qual composição de mistura de solvente é mais apropriada para extrair as substâncias desejados para posterior análise do perfil. Neste sentido, foi realizada a mistura de três componentes conforme apresentado na tabela 1, onde 0 representa ausência total e 1 representa o solvente puro sendo cada ensaio realizado em triplicata.

Tabela 1 – Planejamento de misturas para a extração de antocianinas

Ensaio	Símbolo	Água	Etanol	Metanol
1	a	1	0	0
2	e	0	1	0
3	m	0	0	1
4	ae	0.5	0.5	0
5	am	0.5	0	0.5
6	em	0	0.5	0.5
7	aem	0.333	0.333	0.333

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

4.5 DETERMINAÇÃO TEOR DE ANTOCIANINAS TOTAIS

O método de análise de antocianinas pelo pH único foi utilizado de forma que uma alíquota de 30 mL (V_{alq}) do extrato concentrado obtido após a filtração (V_{e1}) foi vertida em balão de 50 mL (V_{e2}) e completado o volume com a mesma solução extratora inicial. Uma alíquota dessa diluição foi usada de forma a preencher a cubeta de 1 cm, analisada em espectrofotômetro uv-visível em comprimento de onda de 535 nm e anotado o valor de absorbância (DO_{535nm}). A Equação 5 foi utilizada para o cálculo do teor de antocianinas totais (TEIXEIRA et al., 2008). Foi utilizado o coeficiente de extinção médio ($E^{1\%_{1cm}}$) de diversas antocianinas, adotando-se o valor de 982 (FULEKI; FRANCIS, 1968).

$$AntTmg \frac{Ant}{100g} Amostra = \frac{DO_{535nm} \times V_{e1} \times V_{e2} \times 1000}{Valq \times m \times E^{1\%_{1cm}}} \quad \text{Equação 5}$$

Em que:

DO_{535nm} : valor da absorbância no comprimento de onda de 535nm

V_{e1} : extrato concentrado (100mL)

V_{e2} : extrato diluído (50mL)

V_{alq} : alíquota do extrato 1 (30mL)

m = peso da amostra (5g)

E_{1cm} = coeficiente de extinção (982)

Fonte: Teixeira et al. (2008)

4.6 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Foi utilizado o equipamento espectrômetro de massas Agilent Technologies 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS com as seguintes especificações experimentais:

fonte de íons ESI, faixa de 100 a 1200 m/z, energia de colisão 5.00, modos negativo e positivo, Fluxo de gás do revestimento: 7 Temperatura do gás de revestimento 175 °C Nebulizador: 35 psig, Fluxo de gás: 7l/min Temperatura do gás: 200 °C. Separação em cromatografia líquida no equipamento Agilent Technologies modelo 1260 Infinity II com fluxo de 0,5 ml/min, volume de injeção de 40µl, temperatura 35°C, tempo de corrida 50 min, composição de solvente modo gradiente – solução A: ácido fórmico 0,1% e solução B: acetonitrila + ácido fórmico 0,1%, aumentando a concentração da solução A de 0 a 95% e reduzindo a solução B de 100 a 5%.

4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os efeitos dos solventes foram determinados pelo modelo cúbico especial com análise de significância pela Análise de Variância (ANOVA). As superfícies de resposta da mistura e os cálculos de ANOVA foram realizados usando os softwares R e Excel. Os resultados de MS foram processados usando o MassHunter Qualitative Analysis v. 10.0 (Agilent Technologies).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da extração de antocianinas obtidos para as misturas dos solventes testadas em extratos das folhas do capim-elefante roxo pelo modelo cúbico especial estão apresentados na Tabela 2.

Os **teores** totais de antocianinas nas extrações variaram de 1,34 mg/100g a 5,70 mg/100g. Nas extrações com a mistura dos três componentes (etanol, metanol e água 1:1:1), o valor médio do teor de antocianinas foi expressivo (5,70 mg/100g). Esse valor corresponde àquele encontrado por Zhou et al. (2019) que também avaliou o teor de antocianinas em capim-elefante, usando extração com metanol e análises em LC-MS.

Em relação aos valores obtidos para as misturas binárias (1:1), aqueles encontrados para a mistura de etanol e água foram os que promoveram a maior extração (5,22 mg/100g), seguido pela mistura de água e metanol (3,02 mg/100g). Para a mistura de metanol e etanol, a eficiência em extrair as antocianinas foi a mais baixa (1,34 mg/100g).

Para os solventes puros, o de maior teor total de antocianinas foi o etanol (5,11 mg/100g), seguido pela água (2,43 mg/100g) e pelo metanol (2,39 mg/100g) que obteve o menor teor de antocianinas. Alara et al. (2021) relataram que o uso de misturas de solventes orgânicos se mostra mais eficiente na extração de substâncias fenólicas e que deve fazer um estudo da combinação de diversos solventes para encontrar a mistura ideal para a amostra em estudo.

Tabela 2 – Resultados do modelo cúbico especial para a extração de antocianinas em capim-elefante roxo pelo método do pH Único e leitura em Espectrometria UV/Visível

Ensaio	Água	Etanol	Metanol	Resultados (mg/100g)	Extração Média (mg/100g) ¹	
1.1	1	0	0	2,55	2,43	bc
1.2				2,31		
2.1	0	1	0	5,16	5,11	a
2.2				5,33		
2.3				4,85		
3.1	0	0	1	3,77	2,39	bc
3.2				1,97		
3.3				1,43		
4.1	0.5	0.5	0	6,38	5,22	a
4.2				5,26		
4.3				4,01		
5.1	0.5	0	0.5	3,05	3,02	b
5.2				2,24		
5.3				3,77		
6.1	0	0.5	0.5	1,46	1,34	c
6.2				1,26		
6.3				1,29		
7.1	0.333	0.333	0.333	5,47	5,70	a
7.2				5,94		
CV (%)					21,93	

¹ Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Least Significant Difference (LSD) a 5% de probabilidade.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Aos dados obtidos nessa experiência foram acrescentados os pontos experimentais intermediários entre água e etanol puro de 70% água e 70% etanol para poder ajustar um modelo de regressão cúbico especial (Equação 6). A falta de ajuste do modelo não foi significativa em nível de 95% de confiança pelo teste ANOVA. Isso indica que o modelo se enquadra satisfatoriamente nos dados experimentais, e pode ser usado para predição e otimização da extração de antocianinas em capim-elefante.

“Teor antocianinas (mg/100g)

$$\begin{aligned}
 &= 2,43 a (+/-0,5) + 5,11 e (+/-0,4) + 2,39 m (+/-0,4) \\
 &+ 5,78 ae (+/-2,3) + 2,45 am (+/-2,3) - 9,66 em (+/- 2,2) \\
 &+ 69,18 aem (+/- 17,8) “
 \end{aligned}$$

Equação 6

Em que:

a=água

e=etanol

m=metanol

Fonte: Elaborado pela autora (2023)

Cada coeficiente da equação representa quanto aquele elemento é favorável ao aumento do teor de antocianinas no extrato final. O coeficiente dos três solventes foi o maior da equação (69,18), demonstrando ser o que mais contribuiu para o aumento na quantidade de antocianinas extraídas. Entre os coeficientes das misturas de dois componentes, aquele composto por água e etanol foi o de maior valor (5,78), revelando sua importância no cálculo do teor de antocianinas e, como pode ser uma mistura favorável à extração. Sua contribuição é maior que a da água (2,43) ou do etanol puro (5,11), mostrando que a mistura dos dois solventes tem importante papel nesse processo de extração (MARÇO et al., 2008).

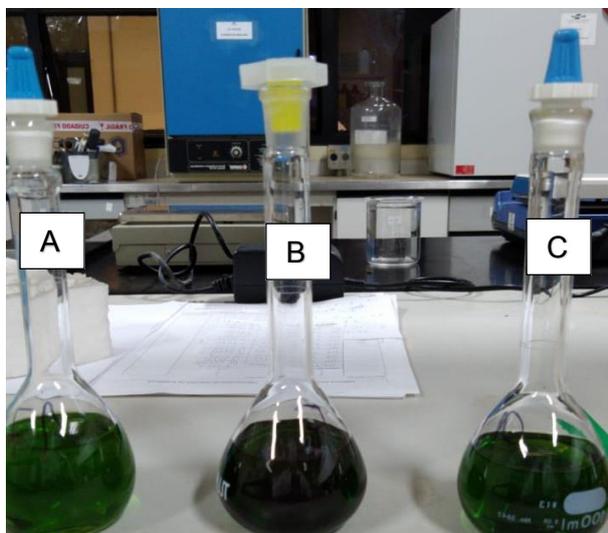
Dentre os coeficientes dos componentes puros, o metanol e a água tiveram os coeficientes mais baixos (2,39 e 2,43). O coeficiente resultante da interação do metanol e etanol mostrou um sinal negativo (-9,66) e pode ser considerado um componente que diminui a extração. Vale destacar que a cor das soluções que não continham água em sua composição era esverdeada (Figura 12), o que é diferente do avermelhado característico dos extratos que contêm antocianinas (Figura 11). Além disso foi medido o pH dos extratos no final da extração sendo que os de coloração vermelha apresentaram pH ácido e os de cor verde estavam básicos.

Figura 11: Foto dos extratos de capim-elefante realizados com mistura de água:etanol:metanol (1:1:1) em pH 2 em duplicata



Fonte: Elaborado pela autora (2023)

Figura 12: Foto dos extratos de capim-elefante realizados com metanol (100%), etanol (100%) e mistura de etanol:metanol (1:1) em pH 2

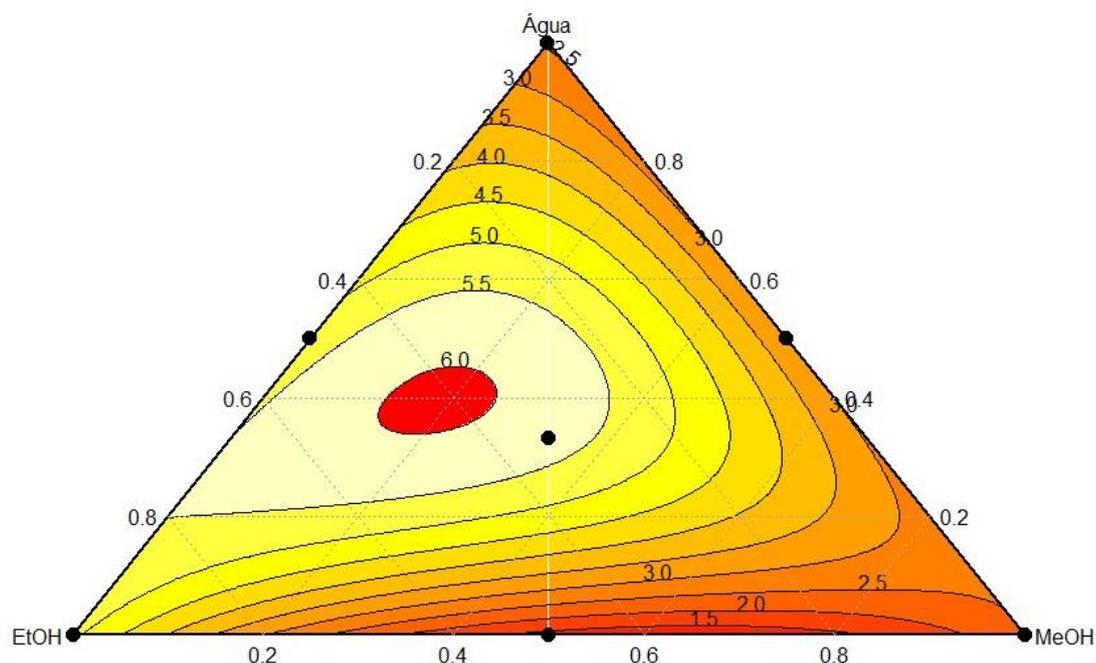


Legenda: A- Metanol (100%) B- Etanol (100%) C- Etanol:Metanol (1:1)

Fonte: Elaborado pela autora (2023)

A curva de nível para o teor de antocianinas totais em função das proporções de solvente está apresentada na Figura 13. O maior valor encontrado foi na mistura em de água:etanol:metanol 4:4:2 (v/v). Para as misturas binárias, etanol:água 7:3 (v/v) foi a que demonstrou a maior capacidade de extração de antocianinas. Isso concorda com os estudos de Março et al., 2008 que utilizaram essa mistura para extração de antocianinas em materiais vegetais. As antocianinas são substâncias muito polares e por isso muito solúveis em água. Porém, estão contidas no interior das células das plantas, no vacúolo de suco celular, e para serem extraídas desse local é necessário um solvente como álcool que tem a capacidade de penetrar as paredes celulares e expor seu conteúdo para o exterior da célula. Por isso, a combinação dos dois solventes é eficiente no mecanismo de extração dessas substâncias do tecido foliar.

Figura 13 – Curva de nível de antocianinas totais (mg/100g) para diferentes proporções etanol, metanol e água em extratos de capim-elefante roxo pelo método do pH Único e leitura em Espectrometria UV/Visível

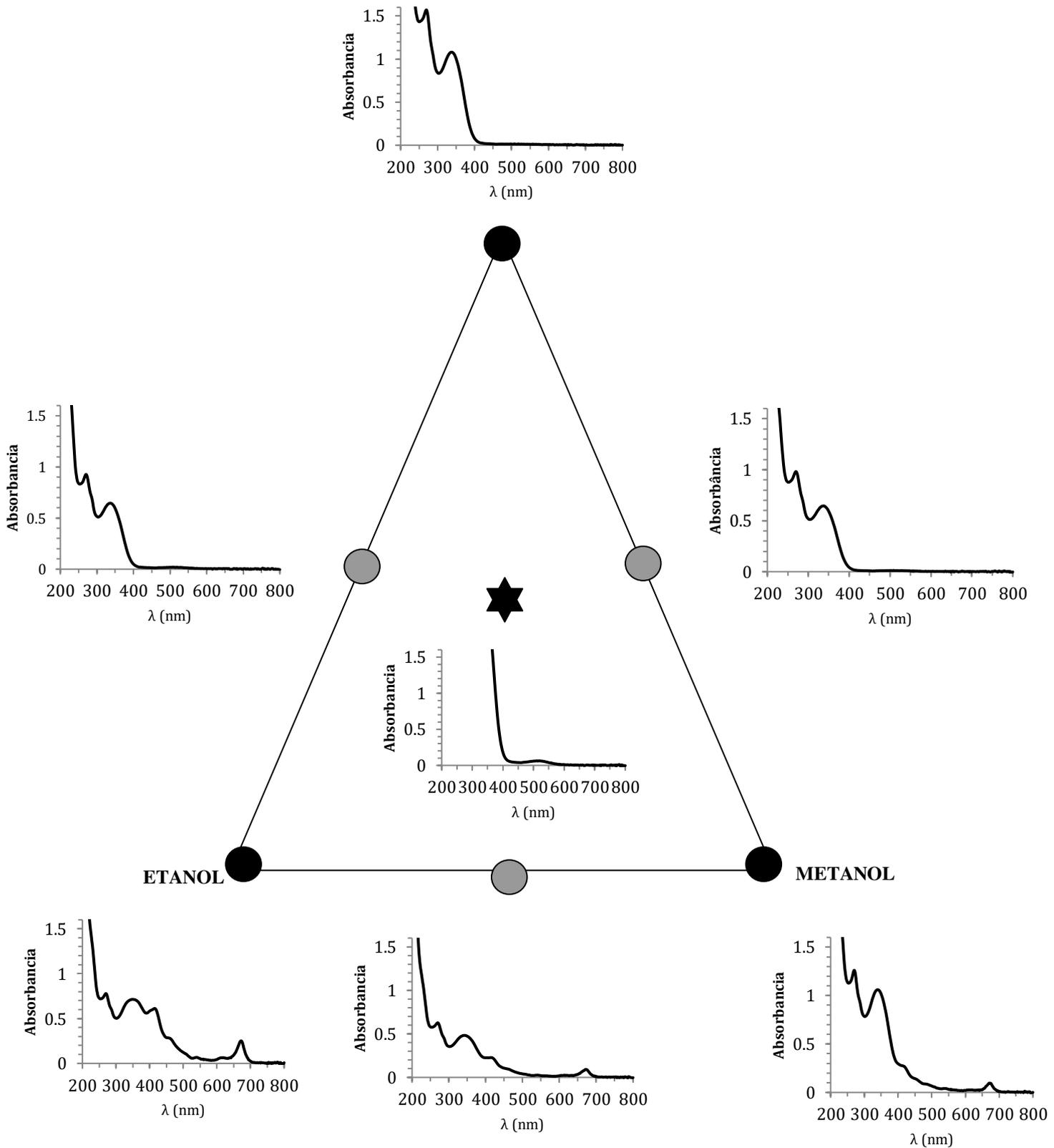


Fonte: Elaborado pela autora (2023).

A análise de extratos por meio da espectrometria no uv/visível de varredura está apresentada na Figura 14. Após a avaliação dos extratos que teriam em sua composição maior teor total de antocianinas, foi realizada uma análise por meio da leitura do espectro nesses comprimentos de onda, para confirmar a presença das antocianinas. Conforme reportado na literatura para substâncias isoladas, no comprimento de onda de 500 a 600 nm, as antocianinas são mais encontradas. Como neste trabalho isso não fica evidente devido à interferência de outras substâncias no extrato, também é possível observar a presença deles em outras regiões do espectro (SAHA et al., 2020). Pode-se verificar que os sinais na região 340 nm correspondem aos açúcares ligados às antocianinas. Segundo Saha et al. (2020), num espectro de uv-visível, as antocianinas apresentam um padrão em que a absorção máxima ocorre na faixa de 500 nm com um ombro na faixa de 400 a 450 nm que se refere aos açúcares ligados ao cátion flavilium. Algumas bandas aparecem na faixa de 310 a 340

nm, se os substituintes ligados ao cátion flavilium forem acilados e as antocianinas têm um grupo de absorção na faixa do visível de 260 a 280 nm.

Figura 14 – Espectros de absorção na região do UV-Visível para diferentes proporções dos solventes etanol, metanol e água em extratos de capim-elefante roxo



Fonte: própria autora (2023).

A relação das antocianinas predominantes obtidas por CLAE-MS está apresentada na Tabela 3, com os respectivos tempos de retenção (TR) e equivalentes massa/carga. O trabalho de Zhou et al (2019) revelou as estruturas de antocianinas identificadas através das massas obtidas por meio de análise em CLAE-MS em extratos de capim elefante. Esses dados foram conferidos com bancos de dados públicos MassBank e PubChem onde as massas e as estruturas das substâncias podem ser verificadas. Utilizando o programa do equipamento CLAE-MS foram obtidos, para os pontos analisados do planejamento centroide-simplex, as moléculas identificadas pelos seus respectivos tempos de retenção e equivalente massa/carga. Foi possível identificar algumas substâncias encontradas no trabalho de Zhou et al (2019) e aquelas com maior área de detecção (> 50.000) no espectrômetro de massas foram registradas nesse documento.

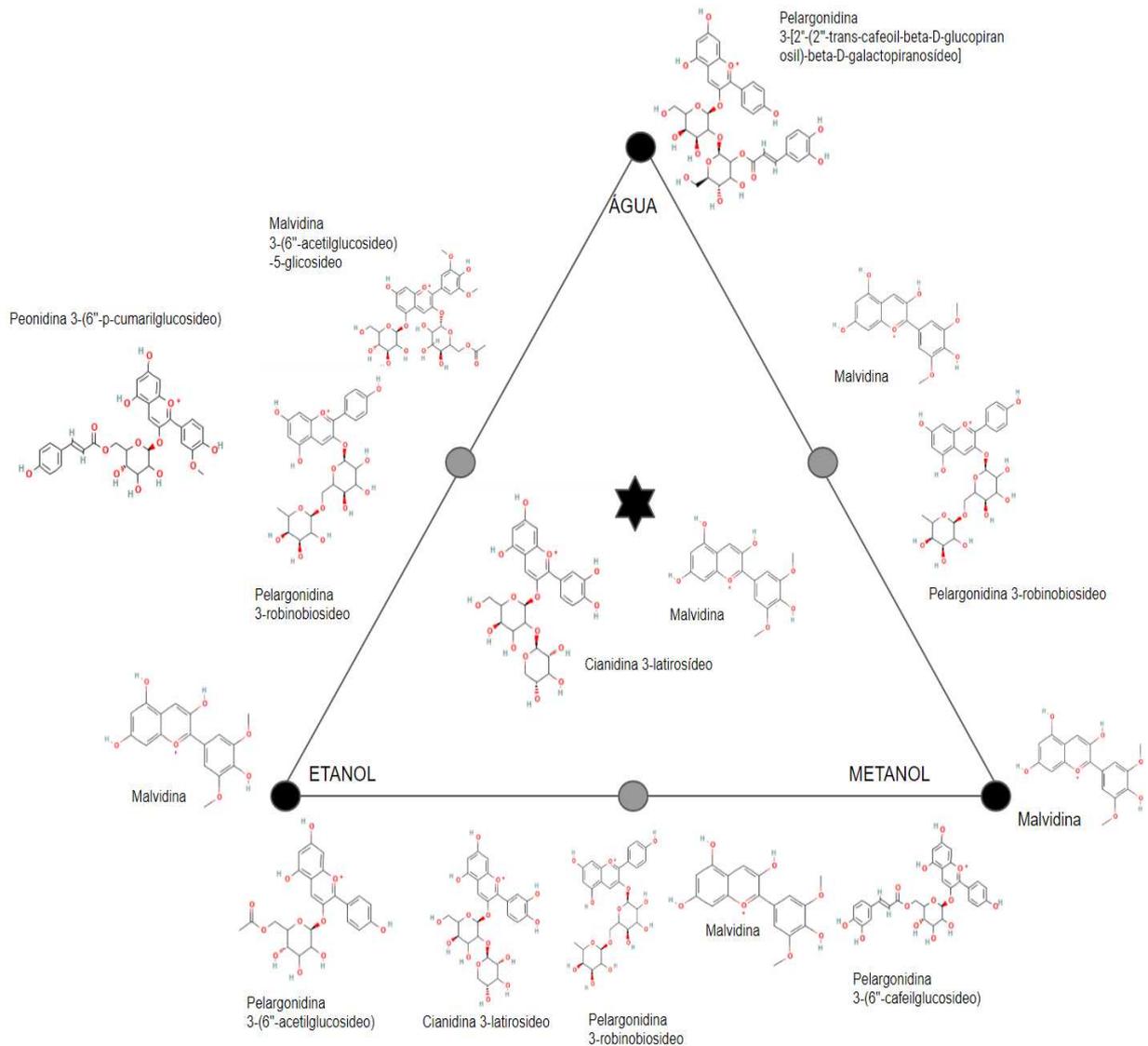
Estas análises revelaram a presença de várias estruturas nos extratos de capim-elefante roxo. Além do mais, pode-se perceber que algumas antocianinas são predominantes como pelargonidina 3-robinobiosídeo que aparece em todas as misturas binárias e a pelargonidina 3-[2''-(2'''-trans-cafeoil-beta-D-glucopiranosil)-beta-D-galactopiranosídeo] na água pura. A peonidina 3-(6''-p-cumarilglicosídeo) aparece somente na mistura de etanol e água e a cianidina 3-latirosídeo aparece na mistura ternária e de etanol e metanol. A malvidina, por sua vez aparece em quase todos os extratos e parece ser a antocianidina mais comum. Percebe-se também que as misturas binárias e a mistura ternária são as mais promissoras em diversidade de antocianinas diferentes no mesmo extrato, e os solventes puros demonstram ter menor poder de extrair substâncias diferentes.

Tabela 3 – Relação das antocianinas predominantes obtidas por meio da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas nas diferentes proporções dos solventes etanol, metanol e água para os extratos de capim-elefante roxo; TR: Tempo de retenção em minutos e m/z: relação massa/carga

Ensaio	Antocianinas	TR (min)	m/z
a	Pelargonidina 3-[2''-(2'''-trans-cafeoil-beta-D-glucopyranosil)-beta-D-galactopiranosideo]	7,3	755,2200
e	Malvidina	25,0	329,0660
m	Malvidina	6,6	326,0735
ae	Malvidina 3-(6''-acetilglucosideo) -5-glucosideo	25,0	695,1742
	Pelargonidina 3-robinobiosideo	17,0	577,1556
	Peonidina 3- (6''-p-coumarilglucosideo)	17,2	607,1448
am	Malvidina	25,0	329,0652
	Pelargonidina 3-robinobiosideo	19,2	577,1536
em	Cianidina 3-latirosideo	5,3	579,1335
	Malvidina	24,9	329,0648
	Pelargonidina 3-(6''-acetilglucosideo)	22,9	473,1071
	Pelargonidina 3-(6''-cafeilglucosideo)	5,4	593,1290
	Pelargonidina 3-robinobiosideo	19,3	577,1551
aem	Cianidina 3-latirosideo	6,7	579,1382
	Malvidina	24,9	329,0664

Fonte: própria autora (2023)

Figura 15 – Relação das antocianinas predominantes obtidas por meio da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas nas diferentes proporções dos solventes etanol, metanol e água para os extratos de capim-elefante roxo



Fonte: própria autora (2023)

Pelos resultados obtidos pelo planejamento centroide-simplex, pode-se inferir que a presença de água, etanol e metanol na mistura favorece a extração de antocianinas em capim-elefante roxo quando observamos o alto teor de antocianinas obtido pela mistura dos três reagentes. Por outro lado, em relação aos reagentes puros, o etanol extrai mais substâncias e a mistura binária água:etanol (1:1) se mostra a mais eficiente deste tipo de mistura. Estudos que foram feitos usando esse modelo de experimentos revelaram que a mistura de dois ou mais solventes sempre é favorável ao resultado final (NOVAES et al., 2018).

O modelo de predição foi usado para obter o resultado do teor total de antocianinas obtidas do capim elefante roxo (NOVAES et al., 2018). Neste sentido, os testes de significância revelaram que o modelo pode ser usado para predição de conteúdo de antocianinas usando combinações dos solventes: etanol, metanol e água. O maior valor encontrado foi na mistura em que água e etanol estão em proporções iguais de 40% cada uma e o metanol completa o volume total com 20%.

Para o capim elefante se tornar uma boa fonte de substâncias bioativas é necessário avaliar, além do teor total dessas substâncias, o método de extração que favoreça o seu aproveitamento nos processos industriais tanto alimentício quanto farmacêutico. Em relação aos resultados encontrados vemos um favorecimento do uso da água e do etanol como melhores extratores de antocianinas. Esses solventes são bem acessíveis e podem ser retirados do extrato final através de processos de secagem. Além disso são menos tóxicos do que o metanol atuando como facilitadores para o uso alimentício das substâncias (Março et al., 2008).

A análise de extratos por meio da espectrometria no UV/Visível de varredura é utilizada há muito tempo pela sua simplicidade e custo para a avaliação inicial das substâncias que podem ser encontradas nas amostras (HARBORNE, 1959). No presente estudo foram detectadas duas composições distintas diferenciadas pela cor, sendo uma vermelha e outra verde. Os pigmentos antociânicos produzem coloração do roxo ao alaranjado e os pigmentos verdes podem ser substâncias relacionadas à clorofila. Porém as antocianinas se alteram estruturalmente em pH básico e geram compostos chamados chalconas que emitem radiação em faixas diferentes do vermelho. O pH dessas soluções estava alterado pois ao ser feita avaliação observou-se que ele estava mais básico do que os extratos de cor vermelha. As chalconas derivadas de antocianinas podem estar presentes nesses extratos mas sua alteração de cor provocou a mudança na cor do extrato.

Na metodologia usada nesse estudo a avaliação do teor de antocianinas totais está diretamente relacionada a absorvância observada no comprimento de onda de 535 nm (FULEKI; FRANCIS, 1968). Porém encontramos extratos com teor alto de antocianinas, mas com coloração verde, que é diferente do vermelho característico delas. Podemos verificar que elas estão presentes, mas que sua coloração foi modificada devido às condições diversas como composição de solventes, pH da solução final entre outras. Concluimos que a cor do extrato nem sempre é um indicativo real da presença delas pois, mesmo que a estrutura química tenha se alterado, podemos identificar essas antocianinas modificadas.

A análise dos extratos de capim-elefante na espectrofotometria em uv/visível revelou um espectro de diversos sinais o que demonstra que o extrato etanólico de capim-elefante é complexo e pode ser fonte de outros produtos naturais. Para isso são necessários estudos que utilizam metodologias de identificação como espectrometria de massas voltado para esses grupos de substâncias. Também necessita-se desenvolver processos de purificação dos mesmos (Ojo et al., 2022).

De forma complementar, o espectrômetro de massas acoplado a cromatografia líquida de alta eficiência é uma ferramenta importante na identificação de substâncias em misturas complexas (ZHANG et al., 2022). Os dados relativos às massas moleculares encontradas são comparados a outros trabalhos onde essas substâncias foram identificadas. Além disso, o banco de dados público também foi usado para essa identificação. A partir dessa avaliação foram identificadas várias estruturas de antocianinas nos extratos de capim-elefante, sendo que pelargonidina 3-robinobiosídeo e a antocianidina malvidina são mais encontradas (Figura 15).

Muitos estudos mostram os benefícios à saúde humana que as antocianinas promovem, pois elas são conhecidas por seu poder antioxidante, sendo potentes anti-inflamatórios naturais, protetores de doenças degenerativas e câncer. Em estudos específicos sobre cada antocianidina e seus glicosídeos verifica-se que a pelargonidina e cianidina tem efeito promissor contra a obesidade (GUO et al., 2020; WANG et al., 2023), que a combinação de peonidina e malvidina atenua a expressão de genes inflamatórios (MACKERT et al., 2016), que a cianidina e a malvidina juntas podem proteger do envelhecimento da pele causado por radiação solar (PETRUK et al., 2017), a cianidina atua na restauração da mucosa em doenças do intestino (IGLESIAS et al., 2022) e na prevenção à danos do órgão causado por poluição ambiental (CHEN et al., 2022).

Estudos que tentam elucidar o mecanismo de ação das antocianinas revelam que elas agem no rearranjo das membranas celulares (STRUGAŁA-DANAK et al., 2022), no trato gastrintestinal produzindo enzimas e protegendo a microbiota (OTEIZA et al., 2022), através da indução de enzimas e da expressão de genes antioxidantes (GARCIA; BLESSO, 2021). Além disso protegem do câncer de mama através da inibição de alguns fatores pró-inflamatórios e do acréscimo da atividade de enzimas detoxificação (LI et al., 2022) e através de diversos mecanismos como diminuição da disfunção colinérgica, da apoptose, e da sinapto toxidez ela pode atuar no tratamento do Alzheimer (SURESH et al., 2022). Elas também podem ter poder antibiótico como as antocianinas extraídas de trigo colorido (SHARMA et al., 2020).

As análises no espectrômetro de massas revelaram diversas relações massa/carga de antocininas e antocianidinas relatadas na literatura científica. Através da análise desses e de outros íons e de seus fragmentos gerados no CLAE-EM poderemos chegar à conclusão de que outras substâncias estão presentes inclusive antocianidinas com outros grupos de ligação que ainda não foram identificados. Além disso uma análise desses fragmentos poderá revelar seus ligantes principais, ou seja, quais ácidos, açúcares e outras substâncias estão se ligando a elas e auxiliando na sua estabilização. A elucidação estrutural também pode auxiliar no estudo de como ocorre a síntese química deles (POLISELI et al., 2018).

6 CONCLUSÕES

Com este trabalho foi possível determinar a quantidade total de antocianinas encontradas nas folhas do capim-elefante roxo e determinar quais tipos são mais encontradas nessa biomassa. Ademais, o método de extração, a análise espectroscópica e o método de separação desenvolvidos e otimizados no presente trabalho foram eficientes para prospectar o capim-elefante como uma espécie promissora para extração de antocianinas. Esse resultado é importante e mostra como essa espécie pode ser uma boa fonte dessas substâncias. O capim-elefante tem sido muito estudado devido seus grandes potenciais nutricionais, produtivos e como gerador de energia da biomassa. Mas seu potencial biológico ainda é pouco conhecido e esse trabalho acrescenta importantes informações nesse sentido.

Como trabalhos futuros devem-se ampliar os estudos que determinem o teor de antocianinas em outras estruturas do capim-elefante, como o colmo. Este apresenta coloração arroxeada e provavelmente possui alto teor de antocianinas. Também é necessário proceder avaliações quanto a variação do teor das substâncias ao longo das estações do ano, do local e do modo de cultivo, visto serem substâncias relacionados ao metabolismo especial das plantas e que sofrem grande influência desses fatores. Também é necessário realizar estudos biológicos com os extratos da planta que demonstrem os efeitos benéficos a saúde, além do seu poder antioxidante, antimicrobiano e citotóxico.

A Embrapa se dedica a estudos em pesquisa agropecuária e tem como missão entregar novas soluções tecnológicas aos produtores rurais e empresas do setor. No melhoramento vegetal, a Embrapa tem foco desenvolver cultivares que atendam o interesse dos produtores e consumidores para cada finalidade de uso. Nesse caso as técnicas utilizadas no presente trabalho são úteis na seleção e desenvolvimento de genótipos que contenham maior teor de antocianinas. Isso afetará a pesquisa em nutrição e saúde animal agregando valor à espécie e às novas cultivares a serem desenvolvidas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALARA, Oluwaseun Ruth; ABDURAHMAN, Nour Hamid; UKAEGBU, Chinonso Ishamel. Extraction of phenolic compounds: a review. **Current Research in Food Science**, [S.L.], v. 4, p. 200-214, 2021.

AMEEN, Fuad; ALNADHARI, Saleh; AL-HOMAIDAN, Ali A.. Marine microorganisms as an untapped source of bioactive compounds. **Saudi Journal Of Biological Sciences**, [S.L.], v. 28, n. 1, p. 224-231, jan. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.09.052>.

AOAC INTERNATIONAL. **PH DIFFERENTIAL METHOD 37.1.68**: AOAC Official Method 2005.02 Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines. [S.I.]: AOAC, 2005.

ARAÚJO, Saulo Alberto do Carmo; VASQUEZ, Hernan Maldonado; CAMPOSTRINI, Eliemar; NETTO, Alena Torres; DEMINICIS, Bruno Borges; LIMA, Érico da Silva. Características fotossintéticas de genótipos de capim-elefante anão (*Pennisetum purpureum* Schum.), em estresse hídrico. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, Maringá, v. 32, n. 1, p. 1-7, 2010.

AYALEW, Wuletaw Andargie; AYELE, Delele Worku. Dye-sensitized solar cells using natural dye as light-harvesting materials extracted from *Acanthus sennii* chiovenda flower and *Euphorbia cotinifolia* leaf. **Journal of Science: Advanced Materials and Devices**, [S.L.], v. 1, n. 4, p. 488-494, 2016.

AZEVEDO, Ana Luisa Sousa; COSTA, Pricila Palla; MACHADO, Juarez Campolina; MACHADO, Marco Antonio; PEREIRA, Antônio Vander; LÉDO, Francisco José da Silva. Cross Species Amplification of *Pennisetum glaucum* Microsatellite Markers in *Pennisetum purpureum* and Genetic Diversity of Napier Grass Accessions. **Crop Science**, [S.L.], v. 52, n. 4, p. 1776-1785, 2012.

BARROS NETO, Benício de; SCARMINO, Ieda Spacino; BRUNS, Roy Edward. **Como Fazer Experimentos**. Campinas: Unicamp, 2001.

CHEN, Bing-Huei; INBARAJ, Baskaran Stephen. Nanoemulsion and Nanoliposome Based Strategies for Improving Anthocyanin Stability and Bioavailability. **Nutrients**, [S.L.], v. 11, n. 5, p. 1052, 2019. MDPI AG.

CHEN, Ting; SHEN, Mingyue; YU, Qiang; CHEN, Yi; WEN, Huiliang; LU, Hanyu; CHEN, Shuai; XIE, Jianhua. Purple red rice anthocyanins alleviate intestinal damage in cyclophosphamide-induced mice associated with modulation of intestinal barrier function and gut microbiota. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 397, p. 133768, 2022.

CORTEZ, Regina; LUNA-VITAL, Diego A.; MARGULIS, Daniel; MEJIA, Elvira Gonzalez de. Natural Pigments: stabilization methods of anthocyanins for food applications. **Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety**, [S.L.], v. 16, n. 1, p. 180-198, 2016.

COSTA, Cristina T da; HORTON, Derek; A MARGOLIS, Sam. Analysis of anthocyanins in foods by liquid chromatography, liquid chromatography–mass spectrometry and capillary electrophoresis. **Journal Of Chromatography A**, [S.L.], v. 881, n. 1-2, p. 403-410, jun. 2000.

DERESZ, Fermino; PAIM-COSTA, Matheus Linhares; CÓSER, Antônio Carlos; MARTINS, Carlos Eugênio; ABREU, João Batista Rodrigues de. Composição química, digestibilidade e disponibilidade de capim-elefante cv. Napier manejado sob pastejo rotativo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, [S.L.], v. 35, n. 3, p. 863-869, 2006.

DEWICK, Paul M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**.³⁵ Nottingham: John Wiley & Sons Ltd., 2009.

FANG, Jim. Classification of fruits based on anthocyanin types and relevance to their health effects. **Nutrition**, [S.L.], v. 31, n. 11-12, p. 1301-1306, 2015.

FREITAS, Victor. O mundo colorido das antocianinas. **Revista de Ciência Elementar**, [S.L.], v. 7, n. 2, p. 1-6, 2019.

FULEKI, Tibor; FRANCIS, F. J. Quantitative Methods for Anthocyanins. **Journal of Food Science**, [S.L.], v. 33, n. 1, p. 78-83, 1968.

GARCIA, Chelsea; BLESSO, Christopher N. Antioxidant properties of anthocyanins and their mechanism of action in atherosclerosis. **Free Radical Biology and Medicine**, [S.L.], v. 172, p. 152-166, 2021.

GOIFFON, Jean-Paul; MOULY, Pierre P; GAYDOU, Emile M. Anthocyanic pigment determination in red fruit juices, concentrated juices and syrups using liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, [S.L.], v. 382, n. 1-2, p. 39-50, 1999.

GUO, Lu; KANG, Jum Soon; KANG, Nam Jun; JE, Byoung Il; LEE, Yong Jae; PARK, Young Hoon; CHOI, Young Whan. Pelargonidin suppresses adipogenesis in 3T3-L1 cells through inhibition of PPAR- γ signaling pathway. **Archives Of Biochemistry And Biophysics**, [S.L.], v. 686, p. 108365, 2020.

HARBORNE, Jeffrey. B. THE CHROMATOGRAPHIC IDENTIFICATION OF ANTHOCYANIN PIGMENTS. **Journal of Chromatograph**, Hertford, v. 1, n. 1, p. 473-488, 1958.

HONG, H.T.; NETZEL, M.e.; O'HARE, T.J.. Optimisation of extraction procedure and development of LC–DAD–MS methodology for anthocyanin analysis in anthocyanin-pigmented corn kernels. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 319, p. 126515, jul. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126515>.

IGLESIAS, Dario E.; CREMONINI, Eleonora; HESTER, Shelly N.; WOOD, Steven M.; BARTLETT, Mark; FRAGA, Cesar G.; OTEIZA, Patricia I. Cyanidin and delphinidin restore colon physiology in high fat diet-fed mice: involvement of tlr-4 and redox-regulated signaling. **Free Radical Biology and Medicine**, [S.L.], v. 188, p. 71-82, 2022.

ITALIANO, Edson Câmara. **Recomendações para o Cultivo e Utilização do Capim-Elefante**. 2004. Disponível em:

<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/36209/1/Doc98.pdf>. Acesso em: 13 jul. 2023.

KAMAL, Mehnaz; NAZ, Mamuna; JAWAID, Talha; ARIF, Muhammad. Natural products and their active principles used in the treatment of neurodegenerative diseases: a review. **Oriental Pharmacy And Experimental Medicine**, [S.L.], v. 19, n. 4, p. 343-365, 18 set. 2019.

KOUR, Harpreet; KOUR, Divjot; KOUR, Satvinder; SINGH, Shaveta; HASHMI, Syed Azhar Jawad; YADAV, Ajar Nath; KUMAR, Krishan; SHARMA, Yash Pal; AHLUWALIA, Amrik Singh. Bioactive compounds from mushrooms: emerging bioresources of food and nutraceuticals. **Food Bioscience**, [S.L.], v. 50, p. 102124, dez. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbio.2022.102124>.

LANÇAS, Fernando M. et al. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”. **Scientia chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35-61, 2009.

LEE, Jungmin; DURST, Robert W; WROLSTAD, Ronald; EISELE, T; GIUSTI, M M; HACHÉ, J; HOF SOMMER, H; KOSWIG, S; A KRUEGER, D; KUPINA; S. Determination of Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines by the pH Differential Method: collaborative study. **Journal of Aoac International**, [S.L.], v. 88, n. 5, p. 1269-1278, 2005.

LI, Wang; PENG, Cheng; ZHAOJIE, Li; WEI, Wu. Chemopreventive and therapeutic properties of anthocyanins in breast cancer: a comprehensive review. **Nutrition Research**, [S.L.], v. 107, p. 48-64, 2022.

LOPES, Toni Jefferson; XAVIER, Marcelo Fonseca; QUADRI, Mara Gabriela Novy; QUADRI, Marinho Bastos. ANTOCIANINAS: UMA BREVE REVISÃO DAS CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E DA ESTABILIDADE. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 13, n. 3, p. 291-297, 2007.

MACHADO, Juarez Campolina; MARTINS, Carlos Eugênio; AUAD, Alexander Machado; SOUZA SOBRINHO, Fausto; BENITES, Flávio Rodrigo Gandolfi. **Banco Ativo de Germoplasma de Capim-Elefante: Avaliação da Resistência à Cigarrinha-das-pastagens e Tolerância à Toxidez por Alumínio**. Disponível em: <https://pt.engormix.com/pecuaria-leite/artigos/banco-ativo-germoplasma-capim-t38445.htm>. Acesso em: 20 jan. 2023.

MACKERT, Jessica D.; MCINTOSH, Michael K. Combination of the anthocyanidins malvidin and peonidin attenuates lipopolysaccharide-mediated inflammatory gene expression in primary human adipocytes. **Nutrition Research**, [S.L.], v. 36, n. 12, p. 1353-1360, 2016.

MADRERA, Roberto Rodríguez; VALLES, Belén Suárez. Development and validation of ultrasound assisted extraction (UAE) and HPLC-DAD method for determination of polyphenols in dry beans (*Phaseolus vulgaris*). **Journal of Food Composition and Analysis**, [S.L.], v. 85, p. 103334, 2020.

MARCHEFAVE, Gustavo G.; TORMENA, Cláudia D.; PAULI, Elis Daiane; RAKOCEVIC, Miroslava; BRUNS, Roy E.; SCARMINIO, Ieda S. Experimental mixture

design solvent effects on pigment extraction and antioxidant activity from *Coffea arabica* L. leaves. **Microchemical Journal**, [S.L.], v. 146, p. 713-721, 2019.

MARÇO, Paulo Henrique; POPPI, Ronei Jesus; SCARMINIO, Ieda Spacino. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. *Química Nova*, [S.L.], v. 31, n. 5, p. 1218-1223, 2008.

MARTÍN, Julia; NAVAS, María José; JIMÉNEZ-MORENO, Ana María; ASUERO, Agustín G. Anthocyanin Pigments: importance, sample preparation and extraction. **Phenolic Compounds - Natural Sources, Importance and Applications**, Rijeka, v. 1, n. 5, p. 117-152, 2017.

MATTIOLI, Roberto; FRANCIOSO, Antonio; MOSCA, Luciana; SILVA, Paula. Anthocyanins: a comprehensive review of their chemical properties and health effects on cardiovascular and neurodegenerative diseases. **Molecules**, [S.L.], v. 25, n. 17, p. 3809, 2020.

Nascimento TEIXEIRA, Luciana Nascimento, STRINGHETA, Paulo César, Alves de Oliveira, Fabiano Comparação de métodos para quantificação de antocianinas. *Revista Ceres [em linha]*. 2008, 55(4), 297-304[data de Consulta 10 de Setembro de 2021]. ISSN: 0034-737X.

NEIVA, Rubens. **Cultivar de capim-elefante rende 30% a mais e é adotada em todas as regiões do País**. 2019. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/46543710/cultivar-de-capim-elefante-rende-30-a-mais-e-e-adotada-em-todas-as-regioes-do-pais>. Acesso em: 10 jul. 2023.

NOVAES, Cleber G.; YAMAKI, Regina T.; PAULA, Vanderlúcia F. de; NASCIMENTO JUNIOR, Baraquizio B. do; BARRETO, Jeferson A.; VALASQUES, Gisseli S.; BEZERRA, Marcos A. Optimization of Analytical Methods Using Response Surface Methodology - Part II: mixture variables. **Revista Virtual de Química**, [S.L.], p. 393-420, 2018.

OIANO Neto, João. **Aspectos químicos e qualidade nutricional dos alimentos**. [S.I.]: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2010.

OJO, Oluwafemi Adeleke; OJO, Adebola Busola; BARNABAS, Morayo; IYOBHEBHE, Matthew; ELEBIYO, Tobiloba Christiana; EVBUOMWAN, Ikponmwoosa Owen; MICHAEL, Towobola; AJIBOYE, Basiru Olaitan; OYINLOYE, Babatunji Emmanuel; OLOYEDE, Omotade Ibidun. Phytochemical properties and pharmacological activities of the genus *Pennisetum*: a review. **Scientific African**, [S.L.], v. 16, p. 1-9, 2022.

ONGKOWIJOYO, Paulina; LUNA-VITAL, Diego A.; MEJIA, Elvira Gonzalez de. Extraction techniques and analysis of anthocyanins from food sources by mass spectrometry: an update. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 250, p. 113-126, 2018.

OTEIZA, Patricia I.; CREMONINI, Eleonora; FRAGA, Cesar G. Anthocyanin actions at the gastrointestinal tract: relevance to their health benefits. **Molecular aspects of Medicine**, [S.L.], v. 89, p. 101156, 2023.

PAI, Sanidhya; HEBBAR, Akshatha; SELVARAJ, Subbalaxmi. A critical look at challenges and future scopes of bioactive compounds and their incorporations in the

food, energy, and pharmaceutical sector. **Environmental Science and Pollution Research**, [S.L.], v. 29, n. 24, p. 35518-35541, 2022.

PEREIRA, Antônio Vander; LÉDO, Francisco José da Silva; MACHADO, Juarez Campolina. BRS Kurumi and BRS Capiacu - New elephant grass cultivars for grazing and cut-and-carry system. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, [S.L.], v. 17, n. 1, p. 59-62, 2017.

PETRUK, Ganna; ILLIANO, Anna; GIUDICE, Rita del; RAIOLA, Assunta; AMORESANO, Angela; RIGANO, Maria Manuela; PICCOLI, Renata; MONTI, Daria Maria. Malvidin and cyanidin derivatives from açai fruit (*Euterpe oleracea* Mart.) counteract UV-A-induced oxidative stress in immortalized fibroblasts. **Journal Of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [S.L.], v. 172, p. 42-51, 2017.

POLISELI, Camila B.; RIBEIRO, Marcos; TONIN, Angelica P.P.; VAGULA, Julianna M.; SANTOS, Oscar O.; VISENTAINER, Jesuí V.; PONTES, Rodrigo M.; MORAES, Luiz A.B.; MEURER, Eduardo C. Anthocyanidins structural study using positive electrospray ionization triple quadrupole mass spectrometry and H/D exchange. **Journal of Mass Spectrometry**, [S.L.], v. 53, n. 12, p. 1230-1237, 2018.

ROCHA, João Romero do Amaral Santos de Carvalho; MACHADO, Juarez Campolina; CARNEIRO, Pedro Crescêncio Souza; CARNEIRO, Jailton da Costa; RESENDE, Marcos Deon Vilela; LÉDO, Francisco José da Silva; CARNEIRO, José Eustáquio de Souza. Bioenergetic potential and genetic diversity of elephantgrass via morpho-agronomic and biomass quality traits. **Industrial Crops and Products**, [S.L.], v. 95, p. 485-492, 2017.

RODRIGUES, L.R.A., MONTEIRO, F.A., RODRIGUES, T.J.D. Capim elefante. In: PEIXOTO, A.M., PEDREIRA, C.G.S., MOURA, J.V., FARIA, V.P. (Eds.) Simpósio sobre manejo da pastagem, 17, Piracicaba, 2001. 2ª edição. Anais... Piracicaba:FEALQ, 2001, p.203-224.

SAHA, Supradip; SINGH, Jashbir; PAUL, Anindita; SARKAR, Rohan; KHAN, Zareen; BANERJEE, Kaushik. Anthocyanin Profiling Using UV-Vis Spectroscopy and Liquid Chromatography Mass Spectrometry. **Journal of Aoac International**, [S.L.], v. 103, n. 1, p. 23-39, 2020.

SCHEFFE, Henry. The Simplex-Centroid Design for Experiments with Mixtures. **Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)**, v. 25, n. 2, 1963.

SHARMA, Natasha; TIWARI, Vandita; VATS, Shreya; KUMARI, Anita; CHUNDURI, Venkatesh; KAUR, Satveer; KAPOOR, Payal; GARG, Monika. Evaluation of Anthocyanin Content, Antioxidant Potential and Antimicrobial Activity of Black, Purple and Blue Colored Wheat Flour and Wheat-Grass Juice against Common Human Pathogens. **Molecules**, [S.L.], v. 25, n. 24, p. 5785, 2020.

SINOPOLI, Alessandro; CALOGERO, Giuseppe; BARTOLOTTA, Antonio. Computational aspects of anthocyanidins and anthocyanins: a review. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 297, p. 124898, 2019.

STAVENGA, Doekele G.; LEERTOUWER, Hein L.; DUDEK, Bettina; KOOL, Casper J. van Der. Coloration of Flowers by Flavonoids and Consequences of pH Dependent Absorption. **Frontiers in Plant Science**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 1-11, 2021.

STRUGAIA-DANAK, Paulina; SPIEGEL, Maciej; HURYNOWICZ, Kacper; GABRIELSKA, Janina. Interference of malvidin and its mono- and di-glucosides on the membrane — Combined in vitro and computational chemistry study. **Journal of Functional Foods**, [S.L.], v. 99, p. 105340, 2022.

SURESH, Swathi; BEGUM, Rukaiah Fatma; S, Ankul Singh; V, Chitra. Anthocyanin as a therapeutic in Alzheimer's disease: a systematic review of preclinical evidences. **Ageing Research Reviews**, [S.L.], v. 76, p. 101595, 2022.

TERRA, Luciana Assis. **UV-Vis e Fluorescência: teoria e aplicações**. 2020. Disponível em: https://files.cercomp.ufg.br/weby/up/516/o/UFCAT-UV-Vis_e_Fluoresc%C3%Aancia__teoria_e_aplica%C3%A7%C3%B5es.pdf. Acesso em: 14 jul. 2022.

TSAO, Rong; YANG, Raymond. 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**, [S.L.], v. 1018, n. 1, p. 29-40, 2003.

WANG, Yuying; CHEN, Lihang; LIU, Huimin; XIE, Jiahua; YIN, Wandi; XU, Zhenghang; MA, Huijing; WU, Wenzhuo; ZHENG, Mingzhu; LIU, Meihong. Characterization of the synergistic inhibitory effect of cyanidin-3-O-glucoside and catechin on pancreatic lipase. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 404, p. 134672, 2023.

WESTON, Max; PHAN, Minh Anh Thu; ARCOT, Jayashree; CHANDRAWATI, Rona. Anthocyanin-based sensors derived from food waste as an active use-by date indicator for milk. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 326, p. 127017, 2020.

YANG, Heejung; KIM, Hyun Woo; KWON, Yong Soo; KIM, Ho Kyong; SUNG, Sang Hyun. Fast and Simple Discriminative Analysis of Anthocyanins-Containing Berries Using LC/MS Spectral Data. **Phytochemical Analysis**, [S.L.], v. 28, n. 5, p. 416-423, 2017.

YILDIZ, Elif; GULDAS, Metin; ELLERGEZEN, Pinar; ACAR, Asli Gul; GURBUZ, Ozan. Obesity-associated Pathways of Anthocyanins. **Food Science and Technology**, [S.L.], v. 41, n. 1, p. 1-13, 2021.

ZHANG, Yuanyuan; CAI, Ping; CHENG, Guanghui; ZHANG, Yongqiang. A Brief Review of Phenolic Compounds Identified from Plants: their extraction, analysis, and biological activity. **Natural Product Communications**, [S.L.], v. 17, n. 1, p. 1-14, 2022.

ZHOU, Sifan; CHEN, Jing; LAI, Yunsong; YIN, Guohua; CHEN, Peilin; PENNERMAN, Kayla K.; YAN, Haidong; WU, Bingchao; ZHANG, Huan; YI, Xianfeng. Integrative analysis of metabolome and transcriptome reveals anthocyanins biosynthesis regulation in grass species *Pennisetum purpureum*. **Industrial Crops and Products**, [S.L.], v. 138, p. 111470, 2019.