

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Luiz Henrique Cantarino Adriano**

**Avaliação do perfil dos extratos aquoso, etanólico e glicólico de antocianinas obtidos a partir de genótipos de capim elefante com coloração arroxeadada**

**Juiz de Fora**

**2024**

**Luiz Henrique Cantarino Adriano**

**Avaliação do perfil dos extratos aquoso, etanólico e glicólico de antocianinas obtidos a partir de genótipos de capim elefante com coloração arroxeada**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial a obtenção do grau de Mestre em Química. Área de concentração: Química Analítica.

**Orientador:** Prof. Dr. Marccone Augusto Leal de Oliveira

**Coorientador:** Dr. Juarez Campolina Machado

**Juiz de Fora**

**2024**

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

Adriano, Luiz Henrique.

Avaliação do perfil dos extratos aquoso, etanólico e glicólico de antocianinas obtidos a partir de genótipos de capim elefante com coloração arroxeada / Luiz Henrique Adriano. -- 2024.

103 f. : il.

Orientador: Marcone Augusto Leal de Oliveira

Coorientador: Juarez Campolina Machado

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, ICE/Engenharia. Programa de Pós-Graduação em Química, 2024.

1. antocianinas. 2. capim-elefante. 3. extração. 4. planejamento de misturas. 5. perfil fitoquímico. I. Leal de Oliveira, Marcone Augusto, orient. II. Campolina Machado, Juarez, coorient. III. Título.

**Luiz Henrique Cantarino Adriano**

**Avaliação do perfil dos extratos aquoso, etanólico e glicólico de antocianinas obtidos a partir de genótipos de capim elefante com coloração arroxeadada**

Dissertação  
apresentada ao  
Programa de Pós-  
Graduação em  
Química  
da Universidade  
Federal de Juiz de  
Fora como requisito  
parcial à obtenção do  
título de Mestre em  
Química. Área de  
concentração: Química.

Aprovada em 16 de fevereiro de 2024.

**BANCA EXAMINADORA**

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

**Dr. Juarez Campolina Machado** - Coorientador  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

**Prof. Dr. Paulo Henrique Fidêncio**  
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

**Prof. Dr. Richard Michael Grazul**  
Universidade Federal de Juiz de Fora

Juiz de Fora, 15/02/2024.



Documento assinado eletronicamente por **Marcone Augusto Leal de Oliveira, Professor(a)**, em 16/02/2024, às 15:24, 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 16/02/2024, às 15:37, 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 **Paulo Henrique Fidêncio, Usuário Externo**, em 16/02/2024, às 16:35, 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 **Richard Michael Grazul, Professor(a)**, em 19/02/2024, às 17:51, 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-Ufjf ([www2.ufjf.br/SEI](http://www2.ufjf.br/SEI)) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1706290** e o código CRC **ED9B21BB**.

## RESUMO

Este trabalho investigou o perfil de antocianinas no capim-elefante com técnicas de separação como a eletroforese capilar e a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta visível. Devido à ausência de fluxo eletrosmótico não foi possível a detecção das antocianinas por eletroforese capilar, porém a cromatografia líquida permitiu a detecção e visualização do perfil das antocianinas extraídas. Além disso focamos na otimização da extração usando solventes à base de água e etanol por meio do planejamento de misturas. Os resultados revelaram informações essenciais sobre as antocianinas nos extratos hidroalcoólicos do capim-elefante, identificando cinco antocianinas, com a cianidina-3-glicosídeo predominante. Embora proporções iguais dos solventes tenham aumentado a eficiência global de extração, essa eficácia não se traduziu diretamente no teor de antocianinas. Um modelo polinomial de misturas mostrou que a proporção entre 75 e 90% de etanol otimiza o teor de antocianinas extraídos. O tempo de extração também foi estudado otimizando em 4 horas para a taxa e em 18 horas para o teor de antocianinas nos extratos.

**Palavras-chave:** antocianinas; capim-elefante; extração; planejamento de misturas; perfil fitoquímico

## ABSTRACT

This study delves into unraveling the anthocyanin profile of elephant grass hydroalcoholic extracts using capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography. The capillary electrophoresis was unable to detect the anthocyanins due to lack of electroosmotic flow, although high performance liquid chromatography allowed the construction of the profile. Besides the extraction process with water and ethanol was optimized through mixture design. Despite higher overall mass extraction efficiency with equal solvent proportions, this doesn't linearly translate to anthocyanin content, hinting at additional compounds in the extracts. Identification of five anthocyanins, with cyanidin-3-glucoside as the most abundant, underscores the extract's complexity. The 25-10:75-90 Water:EtOH ratio emerges with the highest anthocyanin content according to validated polynomial mixture model. A 4-hour extraction optimizes rates, while 18 hours maximizes anthocyanins. These findings hold promise for positively impacting anthocyanin-enriched product production, enhancing nutritional and sensory qualities across diverse industries in agriculture, nutrition, and pharmaceuticals, offering novel avenues for functional and appealing product development.

**Keywords:** anthocyanins; elephant-grass; extraction; mixture design; phytochemical profiling

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha mais profunda gratidão a todos vocês por seu apoio inabalável ao longo deste percurso acadêmico. Sem o suporte caloroso e encorajador de minha família, eu não teria chegado tão longe. A presença constante de vocês em todos os momentos, sejam eles de triunfos ou desafios, tem sido o pilar fundamental sobre o qual construí minha jornada acadêmica.

Para minha mãe, Luciana, gostaria de dizer que eu me lembro e nunca vou esquecer os sacrifícios que você teve que fazer para permitir que tudo isso possível. Ao meu pai Edmilson, eu digo muito obrigado por me mostrar o valor do trabalho duro. Para os meus irmãos eu reforço o quanto me faz feliz ter a responsabilidade de pautar as minhas ações sabendo que vocês estão olhando, na esperança de que de alguma forma eu inspire a vocês da mesma forma que vocês me inspiram e me motivam. Aos meus avós Sr. Geraldo e Sra Maria, as pessoas mais simples e puras que tive a sorte de conhecer, eu direciono um agradecimento especial, pois foram vocês que me ensinaram o mais importante na vida, algo que eu não aprenderia em nenhuma aula, em nenhum livro acadêmico. Vocês me ensinaram que o maior sucesso que eu posso alcançar é ser uma pessoa boa, assim como vocês são.

Patrícia, sua paciência, amor e compreensão foram fundamentais durante este período. Seu apoio incondicional trouxe luz aos dias mais sombrios e inspirou meu melhor trabalho. Sou profundamente grato por ter você ao meu lado.

Aos meus amigos, Jeferson, Bia, Matheus e Iohrran, obrigado por serem uma fonte constante de motivação, diversão e camaradagem nos momentos felizes, mas também nas dificuldades. As risadas compartilhadas, os desafios superados juntos e as memórias feitas ao longo dos anos são tesouros que guardarei para sempre.

Aos meus estimados orientador Marcone e corientador Juarez, minha mais profunda gratidão por sua orientação sábia, expertise acadêmica e dedicação incansável. Suas sugestões perspicazes, feedback construtivo e apoio inabalável foram fundamentais para moldar esta dissertação.

Agradeço à UFJF e ao programa de pós graduação em química, em especial às funcionárias Mariana e Maristela que por muitas e muitas vezes elucidaram de forma sempre prestativa e

atenciosa as curvas burocráticas em que eu me encontrava. Agradeço também às agências de fomento, CNPQ, Capes e Fapemig pelo apoio à pesquisa.

Por fim, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para esta jornada, meu sincero obrigado. Este trabalho é tão de vocês quanto meu.

Com gratidão eterna,

Luiz Henrique.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Estrutura dos principais tipos de antocianidinas.....	10
<b>Figura 2</b> - Modelo esquemático da forma química das antocianinas em função do pH.....	11
<b>Figura 3</b> - Esquema da rota biossintética para produção natural de antocianinas.....	17
<b>Figura 4</b> - Visão gráfica do planejamento experimental.....	35
<b>Figura 5</b> - Coloração dos extratos para o planejamento binário <b>(A)</b> antes e <b>(B)</b> depois do ajuste de pH. ....	41
<b>Figura 6</b> - Extratos da segunda rodada de extração.....	43
<b>Figura 7</b> - Espectros UV-Vis para os pontos do planejamento ternário.....	45
<b>Figura 8</b> - Cromatogramas para a proporção de diluição da amostra.....	49
<b>Figura 9</b> - Cromatogramas sobrepostos para o planejamento de mistura e suas réplicas.....	50
<b>Figura 10</b> - Cromatogramas por nível do PM.....	51
<b>Figura 11</b> - Espectros individuais para as espécies detectadas. ....	52
<b>Figura 12</b> - Máximos de interesse no espectro UV-Vis das antocianinas.....	53
<b>Figura 13</b> - Perfil cromatográfico e os espectros relativos a cada um dos picos.....	56
<b>Figura 14</b> - Cromatograma do extrato E12 obtido em 250 nm. ....	57
<b>Figura 15</b> - RSD para os sinais cromatográficos nos níveis experimentais. ....	59
<b>Figura 16</b> – Destaque no pico 4 para réplicas do ponto experimental C.....	60
<b>Figura 17</b> - Previsões para valores de área teórica pelo modelo linear. ....	62
<b>Figura 18</b> - Previsões para valores de área teórica pelo modelo quadrático. ....	63
<b>Figura 19</b> - Gráfico de efeito individuais para as variáveis explicativas.....	65
<b>Figura 20</b> – Métricas de avaliação de modelo obtidos pela validação cruzada.....	68
<b>Figura 21</b> - Previsões de área pelo modelo 3.....	69
<b>Figura 22</b> - Espectro geral dos extratos de capim-elefante.....	70
<b>Figura 23</b> - Espectro dos extratos de capim-elefante entre 400 e 600 nm.....	72
<b>Figura 24</b> - Absorção dos extratos de capim-elefante em função do tempo de extração. ....	74
<b>Figura 25</b> - Absorção média dos extratos de capim-elefante em função do tempo de extração. ....	76
<b>Figura 26</b> - Ajuste linear entre absorbância e logaritmo do tempo. ....	77
<b>Figura 27</b> – Gráfico dos quantis normais para resíduos da regressão logarítmica. ....	78
<b>Figura 28</b> - Curva experimental e ajuste logarítmico. ....	79
<b>Figura 29</b> - Derivadas do modelo experimental. ....	81

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Proporções relativas dos componentes para cada delineamento experimental.....	35
<b>Tabela 2</b> - Gradiente de análise HPLC.....	38
<b>Tabela 3</b> - Identificação dos pontos amostrais.....	42
<b>Tabela 4</b> - Eficiência de extração para as amostras estudadas.....	43
<b>Tabela 5</b> - Razões entre os máximos espectrais característicos das antocianinas.....	54
<b>Tabela 6</b> - Dados para a construção dos modelos de PM.....	61
<b>Tabela 7</b> - Absorção das amostras em 536 nm.....	73

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>BGE</b>	Eletrólito de corrida
<b>CE</b>	Eletroforese Capilar
<b>CTAB</b>	Brometo de centrimônio
<b>C3G</b>	Cianidina-3-glicosídeo
<b>DAD</b>	Detector de arranjo de diodos
<b>ESI</b>	Ionização por eletrospray
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>FDA</b>	<i>Food and Drugs Administration</i>
<b>FID</b>	Detector de ionização de chama
<b>GC</b>	Cromatografia Gasosa
<b>HPLC</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<b>MIR</b>	Infravermelho médio
<b>NIR</b>	Infravermelho próximo
<b>MAE</b>	Média dos erros absolutos
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>MS</b>	Espectroscopia de massas
<b>MQO</b>	Mínimos quadrados ordinários
<b>NMR</b>	Ressonância Magnética Nuclear
<b>PM</b>	Planejamento de misturas
<b>PF</b>	Planejamento fatoriais
<b>PPG</b>	Propilenoglicol
<b>RMSE</b>	Raiz quadrada dos erros médios
<b>RSD</b>	Desvio padrão relativo
<b>TLC</b>	Cromatografia em Camada Delgada
<b>UPLC</b>	Cromatografia Líquida de Ultra Performance
<b>UV-Vis</b>	Ultravioleta visível

## LISTA DE SÍMBOLOS

$x_i$	Proporção individual de cada componente do planejamento de misturas
$y'$	Resposta teórica do planejamento de experimentos
$y$	Respostas experimentais do planejamento de experimentos
$b_i^*$	Coefficientes do modelo de regressão para o planejamento de misturas
$\varepsilon$	Erro associado ao modelo de regressão
$X$	Matriz de dados experimental
$s_p^2$	Variância amostral
$E_{440}$	Máximo de absorção em 440 nm
$E_{Acy1}$	Máximo de absorção entre 310 e 340 nm
$E_{vis}$	Máximo de absorção na região do visível
$\lambda_{max\ vis}$	Comprimento de onda de máxima absorção na região do visível
$F_{cal}$	Valor de F calculado para teste de variância
$F_{tab}$	Valor de F tabelado para teste de variância

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	9
1.1 ANTOCIANINAS .....	9
1.2 CAPIM-ELEFANTE .....	12
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	14
2.1 PRODUTOS NATURAIS .....	14
2.2 QUÍMICA DAS ANTOCIANINAS .....	16
<b>2.2.1 Biossíntese das antocianinas</b> .....	16
<b>2.2.2 Estabilidade das Antocianinas</b> .....	20
<b>2.2.3 Processo de extração das antocianinas</b> .....	23
2.3 ANÁLISE DAS ANTOCIANINAS .....	24
<b>2.3.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para a análise de antocianinas</b> .....	24
<b>2.3.2 Eletroforese Capilar para a análise de antocianinas</b> .....	25
<b>2.3.3 Espectrofotometria UV-Visível para a análise de antocianinas</b> .....	27
2.4 PLANEJAMENTO DE MISTURAS .....	28
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	32
3.1 OBJETIVOS GERAIS .....	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	32
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	33
4.1 MATERIAIS, REAGENTES E ANÁLISE DE DADOS .....	33
4.2 COLETA E PROCESSAMENTO DO MATERIAL VEGETAL .....	33
4.3 PLANEJAMENTO DE MISTURAS PARA A EXTRAÇÃO DE ANTOCIANINAS NO CAPIM-ELEFANTE .....	34
4.4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE ANTOCIANINAS NO CAPIM-ELEFANTE .....	36
4.4 METODOLOGIA DA ANÁLISE PRELIMINAR DOS EXTRATOS UTILIZANDO ESPECTROFOTOMETRIA ULTRAVIOLETA-VISÍVEL .....	36
4.5 ANÁLISE DO EXTRATO POR ELETROFORESE CAPILAR .....	36
4.7 PREPARO DOS EXTRATOS PARA A ANÁLISE POR CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA .....	37
4.8 ANÁLISE DOS EXTRATOS POR CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA .....	37
4.9 ESTUDO CINÉTICO DA EXTRAÇÃO DE ANTOCIANINAS DO CAPIM-ELEFANTE COM COLORAÇÃO ARROXEADA .....	38
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	40

5.1 ESTUDO DOS EXTRATOS DO CAPIM-ELEFANTE COM COLORAÇÃO ARROXEADA.....	40
5.2 ANÁLISE PRELIMINAR DOS EXTRATOS POR ESPECTROFOTOMETRIA ULTRAVIOLETA-VISÍVEL.....	44
5.3 RESULTADOS DO MÉTODO DE SEPARAÇÃO: ELETROFORESE CAPILAR.....	47
5.4 RESULTADOS DO MÉTODO DE SEPARAÇÃO: CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	48
5.4 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE ANTOCIANINAS DO CAPIM-ELEFANTE COM PLANEJAMENTO DE MISTURAS.....	57
5.5 ESTUDO DA CINÉTICA DE EXTRAÇÃO.....	70
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>83</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As antocianinas são fitoquímicos da classe dos flavonoides que despertam um interesse crescente tanto em vias acadêmicas como comerciais. A ampla variabilidade de antocianinas associadas a fenômenos químicos permite que essas substâncias assumam as mais diversas colorações no reino vegetal. As potencialidades do uso das antocianinas variam desde seu uso como corantes naturais até usos terapêuticos devido às suas capacidades antioxidantes reconhecidas. Pelos motivos citados, se faz necessário o estudo aprofundado de possíveis fontes de antocianinas. Nesse contexto, surge o capim-elefante, uma forrageira com alto potencial de produção de biomassa. A elucidação do perfil de antocianinas do capim-elefante fornecerá informações importantes sobre o potencial dessa biomassa como produtora de fitoquímicos e qual o seu real valor agregado.

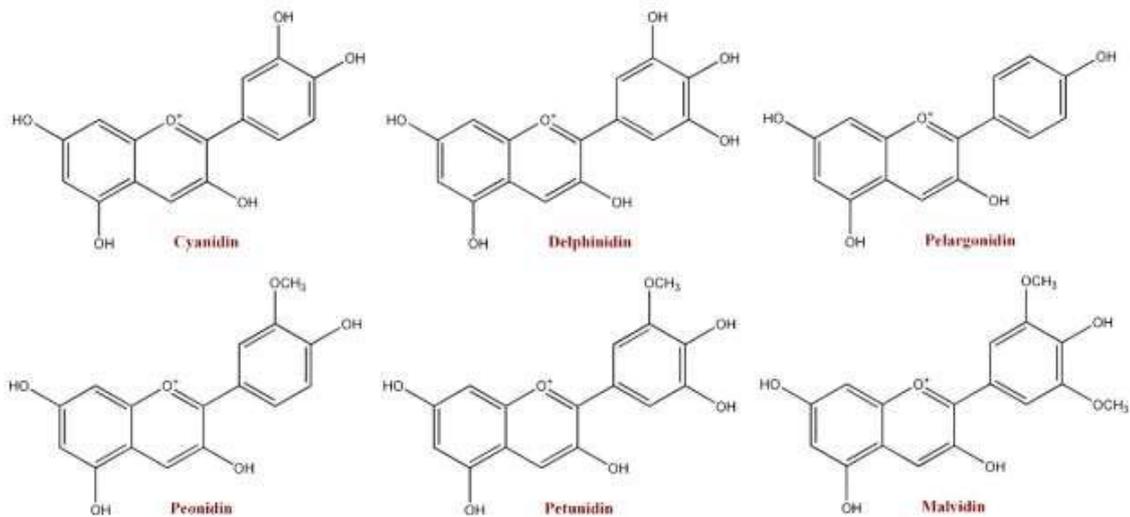
### 1.1 ANTOCIANINAS

As antocianinas, pigmentos naturais vibrantes encontrados em plantas vasculares, desempenham um papel crucial na diversidade de cores vistas em frutas e flores, indo do laranja e vermelho ao rosa, violeta e azul. Esses compostos, solúveis em água, contribuem para o apelo visual de vários tecidos vegetais, adicionando não apenas valor estético, mas também possíveis benefícios à saúde, uma vez que têm sido estudados por suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. Apesar da falta de características aromáticas ou de sabor, as antocianinas têm um gosto moderadamente adstringente. Dada a sua ampla distribuição, as antocianinas são comumente encontradas em uma variedade de frutas e vegetais, como uvas, repolho roxo, amoras e maçãs. A diversidade de alimentos ricos em antocianinas oferece aos consumidores uma ampla gama de opções para incorporar esses compostos em suas dietas, potencialmente promovendo o bem-estar geral por meio do consumo de frutas e vegetais coloridos e ricos em nutrientes (SANGEETA et al., 2023).

Antocianinas são uma classe de flavonoides da via do ácido chiquímico, sendo derivadas diretas das antocianidinas. Esses compostos possuem a estrutura comum de 15 carbonos na forma de C6-C3-C6. A estrutura básica das antocianinas envolve antocianidinas, que são moléculas combinadas com uma porção de açúcar sendo assim a distinção entre antocianidinas e antocianinas é que a primeira é uma estrutura aglicona e a segunda uma espécie glicosilada (LIN et al., 2023). A diferenciação química entre antocianinas se dá pela quantidade e posição dos ligantes, sendo eles hidroxilas e grupos metoxila (VALLS et al., 2009). A **Figura 1** mostra

os principais tipos de espécies de antocianidinas e um exemplo de antocianina ligada a um glicosídeo.

**Figura 1** - Estrutura dos principais tipos de antocianidinas.



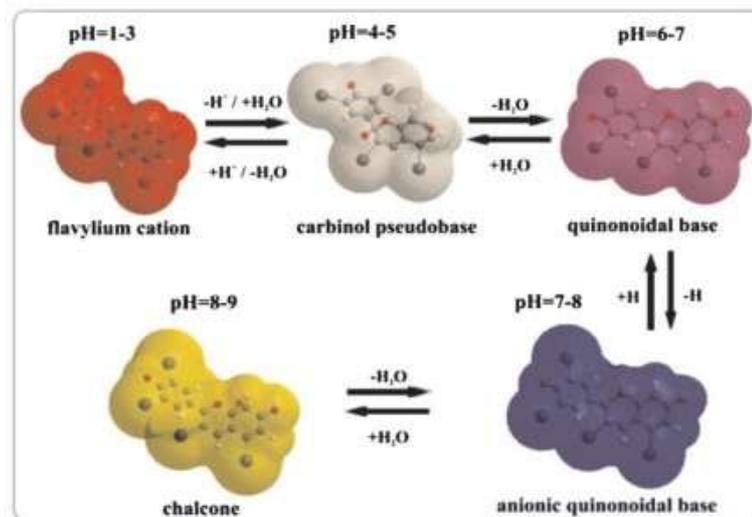
**Fonte:** Adaptado de VALLS et al. (2009).

As antocianinas são geralmente solúveis em água e estão presentes no tecido vegetal das plantas. Por absorverem luz na região do ultravioleta e visível (UV-Vis) são as principais classes responsáveis pela coloração das plantas, junto com a clorofila (MARÇO; POPPI; SCARMINIO, 2008). As antocianinas possuem a função de proteger as plantas de fatores abióticos, como seca e frio (XIAOWEI et al., 2014) e bióticos, como pragas e doenças (KRUGER et al., 2014; WALLACE, 2011). Portanto, aumentam as respostas antioxidantes das plantas e preservam a fisiologia dos tecidos (BROUILLARD, 1983), além de atrair espécies dispersoras (SINOPOLI; CALOGERO; BARTOLOTTA, 2019). As antocianinas possuem interesses nutricionais e medicinais (HE; GIUSTI, 2010), uma vez que podem ser utilizadas para controlar a obesidade, diabetes e como neuro-protetor. Seu consumo traz benefícios para a visão, protege de riscos cardiovasculares e pode inibir o crescimento de alguns tipos de câncer (POJER et al., 2013). Além disso, possui interesse comercial, já que podem ser usadas como corantes naturais (DA COSTA; HORTON; MARGOLIS, 2000).

Estruturalmente, as antocianinas podem ser diferenciadas pela quantidade de hidroxilas, grau de metilação e pela presença de outros ligantes como açúcares e ácidos orgânicos. São compostos instáveis e se degradam sob a ação de luz, temperatura e quando expostos ao ar (MARÇO; POPPI; SCARMINIO, 2008). Outro fato de grande importância no estudo das

antocianinas é o pH, uma vez que sua estrutura se modifica de acordo com a variação do mesmo. De modo geral, em pH ácidos existe a predominância do ácido flavílico, o que favorece uma coloração avermelhada, enquanto em pH acima de 6 a estrutura quinodal é favorecida, caracterizada pela coloração azulada. Outras formas incolores também existem, sendo elas pseudo-base carbinol e chalcona, conforme mostra a **Figura 2** (ÖZGÜR; ÇIMEN, 2018).

**Figura 2** - Modelo esquemático da forma química das antocianinas em função do pH.



**Fonte:** Adaptado de ÖZGÜR; ÇIMEN (2018).

A estabilidade das antocianinas pode ser aumentada com a presença de ácidos fenólicos e outros flavonoides devido à copigmentação, que é a interação entre as espécies por ligações de hidrogênio (MARÇO; POPPI; SCARMINIO, 2008). A copigmentação também influencia nas cores das plantas e é um fator importante a se ser levado em conta, uma vez que diferentes antocianinas podem apresentar as mesmas cores em diferentes partes das plantas devido a esse processo (TROUILLAS et al., 2016).

De forma geral, a extração de antocianinas de fontes naturais é mais fácil que sua síntese. Dessa forma, métodos de extração levando em conta as particularidades de diferentes matrizes merecem ser estudados (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009). O procedimento padrão para a extração de antocianinas de plantas envolve inicialmente uma extração sólido-líquido, seguida por uma extração líquido-líquido, onde outras classes indesejadas, tais como outros flavonoides, açúcares e ácidos fenólicos são retirados (NAVAS et al., 2012).

Na indústria alimentícia, as antocianinas são comumente utilizadas devido às suas cores atrativas e benefícios promotores da saúde. Elas são aplicadas em alimentos para intensificar a cor ou criar novos tons, e técnicas de copigmentação são frequentemente empregadas para

proteger e estabilizar as antocianinas durante o processamento de alimentos. No entanto, são necessárias pesquisas adicionais para compreender a estabilidade, biodisponibilidade, toxicidade e metabolismo das antocianinas modificadas, o que pode acelerar sua aplicação na indústria alimentícia e garantir um uso seguro (LIN et al., 2023).

Além disso, as antocianinas apresentam potenciais aplicações na área da medicina. Elas têm sido objeto de estudo devido aos seus efeitos na prevenção e tratamento de doenças, e métodos modificados de uso de antocianinas, como modificações químicas e físicas, podem melhorar sua biodisponibilidade e estabilidade, potencializando seus efeitos terapêuticos (YAÑEZ-APAM et al., 2023).

Essa compreensão aprimorada é essencial para acelerar sua aplicação na indústria alimentícia e assegurar sua utilização em diversas áreas. De maneira geral, as antocianinas oferecem oportunidades para o desenvolvimento de produtos diversos, com aplicações tanto na indústria alimentícia, quanto medicinal. Estratégias integradas são necessárias para melhorar a estabilização das antocianinas, promovendo assim seu uso contínuo na criação de produtos coloridos e benéficos à saúde.

## 1.2 CAPIM-ELEFANTE

O capim-elefante [*Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone syn. *Pennisetum purpureum* Schumach.] é uma gramínea forrageira de origem africana e comum em países tropicais como o Brasil. É uma espécie que atrai bastante interesse por possuir um ciclo de colheita curto, entre 3 e 4 meses, e potencial de produção de até 50 toneladas de biomassa seca por hectare por ano (FERREIRA et al., 2021). Possui alta eficiência fotossintética, longevidade, persistência, crescimento rápido, ampla adaptação, além de capacidade de fixação biológica de nitrogênio (ROCHA et al., 2017). Seu uso é voltado especialmente para alimentação animal devido ao alto valor nutritivo, além de outras potencialidades como a produção de bioenergia (DE O. LESSA et al., 2021; STREZOV; EVANS; HAYMAN, 2008) e de papel (DAUD et al., 2014). Além disso, o plantio do capim-elefante pode contribuir na manutenção da fertilidade do solo e proteger contra erosões (LOTFY; MOSTAFA, 2014).

Resultados promissores relativo à produção de biomassa de capim-elefante (ANDERSON; CASLER; BALDWIN, [s.d.]; ZENG-HUI; HONG-BO, 2010) o torna atraente para diferentes frentes, sejam acadêmicas ou industriais. Este diferencial tem gerado grande demanda de trabalhos com a cultura, visando à implantação da mesma para produção de compostos de alto valor agregado, sobretudo considerando genótipos com características de

destaque, como aqueles de coloração arroxeadas (YAN et al., 2021). Essas características são em parte devido a presença de antocianinas em suas folhas e colmos. É estimado que o capim-elefante cultivar “roxo” possua por volta de 0,76 mg de antocianinas por 100 g de biomassa (YAN et al., 2021).

Devido ao interesse crescente em relação às antocianinas na contemporaneidade, novas técnicas de extração e determinação se fazem necessárias, assim como novas fontes naturais para sua obtenção. Dessa forma, no presente trabalho buscamos estudar a potencialidade do capim-elefante de coloração arroxeadada se revelar uma possível fonte de antocianinas, sobretudo pelas características químicas e agronômicas muito promissoras dessa biomassa.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Nessa sessão serão abordados os pontos mais importantes para o bom entendimento do estudo realizado, além de uma revisão bibliográfica que permitiu traçar as diretrizes desse trabalho.

### 2.1 PRODUTOS NATURAIS

Produtos naturais são substâncias químicas produzidas por organismos vivos, incluindo plantas, animais e microrganismos. A função biológica desses compostos envolve a produção de aroma, sabor, cor e proteção contra estresses bióticos e abióticos (LEE SIMAS PORTO et al., 2023). Essas substâncias são caracterizadas por uma estrutura química complexa e diversa, muitas vezes contendo múltiplos grupos funcionais. Os produtos naturais têm sido uma fonte importante de medicamentos, fornecendo uma grande variedade de compostos bioativos com potencial terapêutico (NACZK; SHAHIDI, 2006). Além disso, essas substâncias têm sido amplamente utilizadas em diversos setores, como alimentício, cosmético e agrícola, devido às suas propriedades funcionais e benefícios para a saúde (NEWMAN; CRAGG, 2012).

A utilização de plantas com compostos bioativos não é novidade, uma vez que os produtos naturais têm sido uma importante fonte de medicamentos desde os primórdios da humanidade. A história da medicina tradicional, que se baseia no uso de plantas e outros recursos naturais para tratar doenças, remonta há mais de 5.000 anos, em civilizações antigas como a chinesa, egípcia e grega. Na Grécia Antiga, por exemplo, Hipócrates, considerado o pai da medicina moderna, prescrevia plantas medicinais para seus pacientes. A partir do século XIX, com o desenvolvimento da química orgânica e da farmacologia, os produtos naturais passaram a ser mais estudados e utilizados em medicamentos. Cerca de 25% dos medicamentos comercializados são derivados de produtos naturais, incluindo desde antibióticos e antivirais até analgésicos e quimioterápicos (CALIXTO, 2019).

A importância dos produtos naturais na medicina se deve, em grande parte, à sua grande diversidade química. As plantas e outros organismos produzem uma ampla variedade de compostos químicos, muitos dos quais possuem atividades biológicas úteis para o tratamento de doenças. Os alcaloides, por exemplo, compostos nitrogenados produzidos por plantas, têm sido amplamente utilizados em medicamentos para o tratamento de dor, câncer e outras condições. Outros grupos importantes de compostos bioativos incluem os terpenoides, flavonoides e fenóis. A descoberta e utilização desses compostos têm sido fundamental para o

desenvolvimento de novos medicamentos e para o avanço da medicina (ATANASOV et al., 2021).

Além disso, os produtos naturais são frequentemente utilizados em medicina tradicional, em que são prescritos para tratar uma ampla variedade de doenças e condições. Na China, por exemplo, a medicina tradicional utiliza cerca de 6.000 plantas diferentes para tratar doenças. Em muitos casos, a eficácia desses tratamentos tem sido comprovada por estudos científicos. Além disso, os produtos naturais também são frequentemente utilizados em suplementos alimentares e cosméticos, devido às suas propriedades benéficas para a saúde e beleza (DAI et al., 2022).

A fitoquímica se dedica ao estudo dos compostos químicos produzidos naturalmente pelas plantas, muitos dos quais possuem propriedades farmacológicas, tais como antioxidante, anti-inflamatória, anticancerígena, antimicrobiana, entre outras (NEWMAN; CRAGG, 2020). Portanto, a análise de compostos bioativos em produtos naturais é um campo importante de pesquisa e desenvolvimento de novos produtos terapêuticos com base em compostos naturais (ALTEMIMI et al., 2017).

É natural, tendo em vista as razões supracitadas, que a análise e elucidação de compostos bioativos que compõem os perfis fitoquímicos das mais variadas fontes possua interesse científico e econômico, sendo uma área de grande concentração de publicações e inovações. Nesse sentido, diversas técnicas têm sido desenvolvidas para a análise de fitoquímicos, incluindo cromatografia líquida (LC), cromatografia com fase gasosa (GC) e eletroforese capilar (CE), além de técnicas espectroscópicas, como espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) e médio (MIR) (HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015).

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*) é uma das técnicas mais utilizadas para a análise de fitoquímicos, pois permite a separação e identificação de diferentes componentes presentes em um extrato. Essa técnica pode ser combinada com diversos tipos de detectores, como espectrômetros de massa (LC-MS) (MARQUES et al., 2018; RIFFAULT et al., 2014), detectores de arranjo de diodos (LC-DAD) (FU et al., 2020; NAHAR; ONDER; SARKER, 2020).

A técnica de GC também é utilizada na análise de fitoquímicos, especialmente para voláteis. Essa técnica pode ser combinada com diversos tipos de detectores, como espectrômetros de massa (GC-MS) (BHALLA et al., 2021; BHAWSAR, 2016) e detectores de ionização em chama (GC-FID) (ÖZGENÇ et al., 2017; SHARMA et al., 2021).

Outras técnicas também podem ser aplicadas à análise fitoquímica, seja de forma isolada ou hifenada, como é o caso da ressonância magnética nuclear (RMN) (BENDIF et al., 2020;

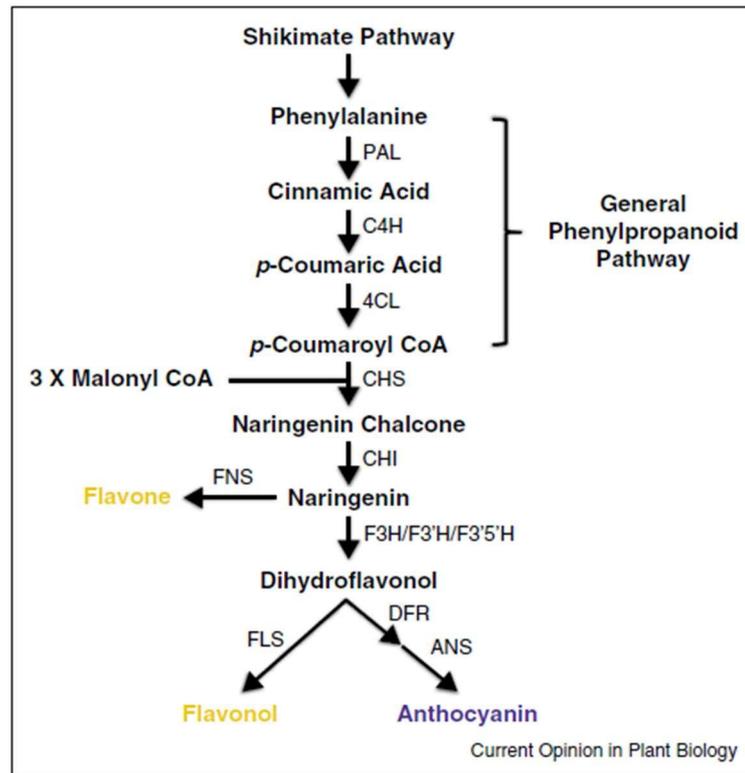
VERPOORTE; CHOI; KIM, 2007), usada para elucidar estruturas de compostos bioativos ou de técnicas espectroscópicas como MIR (JOHNSON et al., 2023) ou NIR (KUMAR; SINGH; DHANANI, 2017) que consegue elucidar o perfil fotoquímico de espécies através do seu espectro vibracional, o mesmo se aplica a espectroscopia RAMAN (WANG et al., 2020).

## 2.2 QUÍMICA DAS ANTOCIANINAS

### 2.2.1 Biossíntese das antocianinas

A síntese das antocianinas envolve um processo intrincado com várias etapas enzimáticas. Inicialmente, a enzima chalcona sintase catalisa a fusão entre malonil CoA e p-coumaroil CoA, resultando na criação da chalcona, um composto intermediário. Posteriormente, a chalcona é convertida pela chalcona isomerase em naringenina, que atua como precursor na síntese de antocianinas. A naringenina passa então por hidroxilação pela flavanona 3-hidroxilase, gerando dihidroflavonol. A etapa subsequente envolve a redução do dihidroflavonol pela dihidroflavonol 4-redutase, resultando em leucoantocianidina. Finalmente, a leucoantocianidina é oxidada pela antocianidina sintase, dando origem a antocianidinas. Essas fases compõem a rota biossintética fundamental para a produção de antocianinas em plantas, como pode ser verificado na **Figura 3** (ZHANG; BUTELLI; MARTIN, 2014).

**Figura 3** - Esquema da rota biossintética para produção natural de antocianinas.



**Fonte:** Adaptado de ZHANG; BUTELLI; MARTIN (2014).

Adicionalmente, a modificação do anel B das antocianidinas desempenha um papel crucial na determinação das diversas cores visíveis. A hidroxilação do anel B ocorre em posições específicas, como 3', 4', 5' e 7', resultando em uma ampla gama de tonalidades para as antocianidinas. A variação na hidroxilação em diferentes posições pode resultar em antocianidinas que proporcionam uma paleta de cores, indo de tons laranjas a azulados. Essa diversidade cromática é essencial para a coloração de flores e frutas, contribuindo para atrair visualmente polinizadores e dispersores de sementes (ZHANG; BUTELLI; MARTIN, 2014).

Além disso, a síntese de antocianinas é fortemente influenciada por fatores ambientais e de desenvolvimento. A regulação da expressão gênica das enzimas envolvidas na síntese de antocianinas é crucial para a produção e acúmulo desses pigmentos em diversos tecidos e estágios de desenvolvimento das plantas. Compreender a regulação da síntese de antocianinas é essencial para a engenharia bem-sucedida desses pigmentos em plantas, visando modificar cores e propriedades funcionais desejadas.

Após a formação das antocianidinas, ocorrem processos de substituições nos anéis B e C por meio da glicosilação e acilação, que desempenham papéis fundamentais na estabilidade, coloração e funcionalidade desses pigmentos. A glicosilação das antocianidinas envolve a

adição de grupos de açúcares em posições específicas, principalmente no carbono 3 (C3), e é catalisada por enzimas glicosiltransferases (MAZZA; BROUILLARD, 1987). Essa modificação contribui significativamente para a estabilidade dos pigmentos, influenciando sua longevidade e intensidade de cor. Além disso, a presença de grupos glicosílicos pode sutilmente alterar a tonalidade das cores das antocianidinas, deslocando-as ligeiramente em direção ao vermelho, o que é crucial para a diversidade de cores observadas em flores e frutas. Por outro lado, a acilação das antocianidinas ocorre em posições específicas e envolve a adição de grupos acila, influenciando tanto a estabilidade, quanto a coloração dos pigmentos. A acilação das antocianidinas pode resultar em uma variedade de compostos com propriedades distintas, incluindo tons mais azulados. Esse processo é catalisado por enzimas específicas, conhecidas como aciltransferases, que desempenham um papel crucial na diversidade de cores observadas em plantas. Além disso, as antocianinas podem sofrer processos de copigmentação, nos quais os grupos acila e glicosila interagem para aumentar a estabilidade e intensificar as cores dos pigmentos, tanto intramolecularmente, quanto intermolecularmente. A compreensão dos mecanismos de glicosilação e acilação das antocianidinas é crucial para a engenharia metabólica visando a produção de plantas com características de cor e estabilidade desejadas (D'AURIA, 2006).

A manipulação genética e bioquímica dos processos de biossíntese, decoração e transporte das antocianinas abre perspectivas para a criação de plantas com cores e propriedades específicas, tendo aplicações potenciais na indústria de corantes naturais, alimentos funcionais e produtos farmacêuticos. Uma abordagem de engenharia metabólica consiste na modificação dos genes relacionados à biossíntese das antocianinas, incluindo a regulação da expressão gênica e a alteração das enzimas que participam na via metabólica. A manipulação genética pode ser efetuada por meio de técnicas como CRISPR/Cas9 ou pela inserção de genes exógenos nas plantas. Adicionalmente, a manipulação bioquímica dos processos de decoração das antocianinas pode ser realizada introduzindo enzimas específicas, como glicosiltransferases e aciltransferases, ou ajustando fatores ambientais como pH e temperatura (NISHIHARA; NAKATSUKA, 2011).

Outra estratégia de engenharia metabólica diz respeito à manipulação dos processos de transporte das antocianinas, que têm um papel crucial na distribuição e acúmulo desses pigmentos em diferentes tecidos vegetais. A alteração dos transportadores de antocianinas pode ser feita através da modificação da expressão gênica ou da introdução de transportadores exógenos nas plantas (MATHEWS et al., 2003).

A exploração da manipulação genética e bioquímica emerge como uma estratégia para aumentar a produção de pigmentos desejáveis em plantas, apresentando potenciais aplicações em várias indústrias, incluindo alimentos, corantes naturais e produtos farmacêuticos. Destaca-se como exemplo a obtenção de tomates de tonalidade roxa com níveis elevados de antocianinas. Esse feito foi alcançado ao expressar genes regulatórios específicos (R2R3MYB e bHLH), sob o controle de um promotor específico do gene E8 do tomate. Essa abordagem possibilitou a ativação da biossíntese de antocianinas em estágios tardios do desenvolvimento do fruto, resultando em altos níveis desses pigmentos sem prejudicar o rendimento da colheita (BUTELLI et al., 2008).

A capacidade de modificar e controlar as propriedades das antocianinas por meio da manipulação genética e bioquímica proporciona oportunidades para criar plantas com cores e características específicas, com potenciais aplicações em diversas indústrias.

Além da glicosilação, as antocianinas têm suas propriedades definidas pela natureza dos seus substituintes, sendo que diferentes modificações em suas estruturas podem alterar as propriedades físicas e químicas das antocianinas, influenciando diretamente suas cores, estabilidade e, por vezes, até mesmo suas propriedades biológicas. Dentre as principais modificações nas estruturas das antocianinas está a acilação.

A acilação é o processo de adição de um ácido orgânico a unidade glicosídica já ligada a antocianina. Esses ácidos podem ser alifáticos ou aromáticos, e ocorrem através da substituição de hidrogênios em posições específicas da estrutura da antocianina por grupos acil, resultando em modificações na sua composição química. A acilação pode ser realizada quimicamente ou enzimaticamente (YAÑEZ-APAM et al., 2023).

No contexto natural, no que diz respeito à acilação química, as antocianinas geralmente passam por acilação nos grupos hidroxila dos glicosídeos substituídos por meio de ligações éster, resultando nas chamadas antocianinas glicosiladas aciladas. A acilação das antocianinas geralmente se dá por meio de interações hidrofóbicas e " $\pi$ - $\pi$ " entre o doador acila e a molécula de antocianina. Os substituintes acila são comumente ligados ao açúcar na posição 3 ou na posição 6, ou menos frequentemente no grupo 4, sendo ácido cafeico, ácido p-cumárico e ácido palmítico alguns dos ácidos encontrados como substituintes acil em antocianinas (LIN et al., 2023).

O principal benefício de antocianinas aciladas diz respeito a sua estabilidade quando comparadas a espécies não aciladas, uma vez que é mostrado na literatura que antocianinas que possuem o grupo acil em sua estrutura exibem estabilidade elevada. Antocianinas di-aciladas mantêm uma porcentagem mais elevada de formas catiônicas e de cor em condições levemente

ácidas quando frente a espécies não aciladas. Julga-se que a acilação pode proteger o cromóforo da antocianina contra ataques da água, resultado do empilhamento  $\pi$  das antocianinas aciladas. O efeito protetor da acilação sobre as antocianinas aumenta com o número de grupos acila (MOLONEY et al., 2018).

Além disso, a acilação em antocianinas é frequentemente utilizada em contextos industriais e de pesquisa para modular as características desses pigmentos naturais, permitindo a obtenção de tonalidades específicas e a adaptação das propriedades das antocianinas para diferentes aplicações, como na indústria alimentícia e na produção de corantes naturais (DÍAZ-GARCÍA et al., 2015) ou outras propriedades químicas como, por exemplo, o caso em que a acilação enzimática pode aumentar a solubilidade das antocianinas, tornando-as mais fáceis de serem incorporadas em alimentos e bebidas (LUO et al., 2022).

### **2.2.2 Estabilidade das Antocianinas**

Um dos grandes desafios relacionados à química e aplicações das antocianinas diz respeito a sua estabilidade. As antocianinas são moléculas susceptíveis a degradação por diferentes fontes, dentre as principais se destacam temperatura, oxidação e luz (AYVAZ et al., 2022).

A temperatura é um dos fatores mais críticos que afetam a estabilidade da antocianina. Na primeira etapa da degradação térmica das antocianinas, por volta de 60 °C, essas substâncias se transformam em estruturas de chalcona, seguido pela abertura hidrolítica do anel de pirílio. Nas etapas posteriores de degradação, são formados compostos polifenólicos insolúveis (MARKARIS; LIVINGSTON; FELLERS, 1957). Em processos que envolvem calor, como fervura, pasteurização e esterilização, a magnitude e o tempo de aquecimento aplicados podem afetar significativamente o conteúdo de antocianina. De modo geral, é mostrado na literatura que o aumento de temperatura tem um efeito substancial na estabilidade da antocianina do que o aumento de pH (SUI; DONG; ZHOU, 2014), e que a luz também acelera a taxa de degradação das antocianinas (BAKHSHAYES et al., 2006).

A presença de oxigênio também provoca um efeito que acelera a degradação de antocianinas, seja por meio de um mecanismo direto de oxidação e/ou pela ação de enzimas oxidantes, como polifenoloxidase e peroxidase. Além disso, o oxigênio pode estar relacionado a outros fatores além de enzimas que afetam a estabilidade das antocianinas. Dois estudos mostraram que antocianinas puras são estáveis em altas temperaturas na ausência de oxigênio,

mas degradam rapidamente na presença desse gás (JAISWAL; DERMARDEROSIAN; PORTER, 2010; KIM et al., 2021).

Tendo sido mencionados os fatores que prejudicam a estabilidade das antocianinas, vale mencionar que, alguns fatores são benéficos e aumentam a estabilidade da espécie frente a estresses abióticos. O pH age de forma significativa, uma vez que as antocianinas possuem estabilidade elevada em pH ácidos quando comparados a pH neutro ou alcalino. Isso se deve ao fato de estarem na forma do cátion flavílico por tanto menos susceptíveis à ataques de agentes degradantes (BUENO et al., 2012). Como já citado, a presença de substituintes acilados na estrutura das antocianinas também aumentam a estabilidade da molécula (ZHAO et al., 2017). Por fim, um fenômeno de extrema importância para proteção das antocianinas contra degradação é a copigmentação.

Geralmente, os copigmentos são moléculas predominantemente incolores ou amareladas, naturalmente presentes nas células vegetais juntamente com as antocianinas. Diversas moléculas foram identificadas como copigmentos, destacando-se os fenóis, aminoácidos, alcaloides e ácidos orgânicos como os mais comuns entre eles. A copigmentação é reconhecida como um método eficaz para estabilizar as antocianinas diante de condições ambientais adversas (ZHAO et al., 2020). Este fenômeno refere-se à interação não covalente entre as formas coloridas das antocianinas (tanto o cátion flavílico quanto as bases quinoidais) e moléculas orgânicas incolores (copigmento). Essas interações englobam tanto deslocamentos hipercromáticos, que escurecem conforme a absorbância aumenta, quanto deslocamentos batocrômicos, que aumentam positivamente o comprimento de onda na absorbância máxima. Além da estabilidade das moléculas, a copigmentação também afeta a cor obtida pelas antocianinas (CHATHAM; HOWARD; JUVIK, 2020). Forças intermoleculares, como interações por ligação de hidrogênio e efeitos hidrofóbicos, especialmente as interações dispersivas-empilhamento ( $\pi$ - $\pi$ ) entre os orbitais polarizáveis dos anéis aromáticos, promovem a associação entre antocianina e copigmento. A ligação de hidrogênio e a interação de van der Waals cria um empilhamento vertical entre os núcleos planares polarizáveis da antocianina constituem a força de copigmentação. Essas interações não covalentes podem proteger a molécula de antocianina contra ataques nucleofílicos pela água (GENÇDAĞ et al., 2022).

As dinâmicas de interação entre a antocianina e o copigmento são categorizadas em copigmentação intermolecular, copigmentação intramolecular, autoassociação e complexação metálica. Contudo, é crucial salientar que, entre essas diversas interações, os mecanismos intermoleculares e intramoleculares destacam-se como os mais cruciais.

A formação de complexos intermoleculares e intramoleculares em antocianinas pode envolver ligações covalentes, de hidrogênio, van der Waals e complexação. A copigmentação intermolecular, por sua vez, é a interação de uma antocianina colorida com um copigmento incolor, ligado não covalentemente à molécula de antocianina (ZHAO et al., 2020). Tanto a forma de cátion flavílico, quanto as bases quinonoides de antocianinas podem participar de interações intermoleculares, sendo facilitadas por características estruturais semelhantes nos copigmentos (ZIA UL HAQ; RIAZ; SAAD, 2016).

Contrastando com essas interações, as forças hidrofóbicas associadas à estrutura terciária de dobramento, rotação e empilhamento de diferentes grupos são responsáveis pela copigmentação intramolecular. Isso leva à formação de uma estrutura em camadas tipo "sanduíche" entre antocianinas e resíduos aromáticos acílicos (QIAN et al., 2017). A estabilidade das antocianinas aciladas é assegurada pelo empilhamento de grupos acila com o anel de pirílio do cátion flavílico, protegendo os cromóforos contra o ataque nucleofílico da água (ZIA UL HAQ; RIAZ; SAAD, 2016).

Quando as concentrações de antocianina ultrapassam  $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ , ocorre a autoassociação, que envolve a agregação de duas ou mais moléculas de antocianina. Esse processo eficaz é utilizado para aumentar a estabilidade da antocianina, protegendo-a contra a hidratação e promovendo a conversão em bases quinonoides. A autoassociação das bases quinonoides neutras é mais forte do que a dos cátions flavílicos, sendo influenciada pela substituição hidroxila e metoxila no anel B. A autoassociação está correlacionada positivamente com o grau de metoxilação do anel B (ZHAO et al., 2020).

Embora a complexação de metais não seja de grande interesse na indústria alimentícia devido ao risco de contaminação, ela desempenha um papel na estabilização de antocianinas em frutas como morango, mirtilo e oxicoco. Algumas antocianidinas, como cianidina, delphinidina e petunidina, são capazes de quelar íons metálicos como sódio ( $\text{Na}^+$ ), ferro ( $\text{Fe}^{2+/3+}$ ), alumínio ( $\text{Al}^{3+}$ ), magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) e zinco ( $\text{Zn}^{2+}$ ). Essa interação metal-antocianina é crucial para a obtenção da cor azul, especialmente em antocianinas aciladas livres de metal, controlando continuamente o pH do vacúolo (TROUILLAS et al., 2016).

Diversas abordagens são utilizadas para aumentar a estabilidade das antocianinas. Uma dessas abordagens é a micro encapsulação, na qual as antocianinas são revestidas com uma camada protetora de biopolímeros, como proteínas, polissacarídeos ou lipídios, visando evitar a degradação causada por fatores ambientais. A adição de componentes para forçar a copigmentação é uma estratégia adicional que implica adicionar outros pigmentos naturais, como flavonoides, ácidos fenólicos ou íons metálicos, para formar complexos com as

antocianinas, intensificando sua cor e estabilidade. Por fim, os antioxidantes podem ser incorporados para neutralizar os radicais livres e inibir reações oxidativas que poderiam degradar as antocianinas. Esses antioxidantes podem ser de origem natural ou sintética, incluindo ácido ascórbico, ácido cítrico ou sulfitos (CORTEZ et al., 2017)..

### **2.2.3 Processo de extração das antocianinas**

Extração por solvente tem sido um método amplamente adotado para obter uma variedade de compostos presentes em frutas, incluindo flavonoides. Os compostos fenólicos são extraídos por meio de diferentes técnicas, como moagem, secagem ou liofilização. No universo das antocianinas, moléculas polares, os solventes mais comumente empregados são misturas aquosas de etanol (EtOH), metanol (MeOH) ou acetona. Vale ressaltar que, essas metodologias acarretam a coextração de substâncias não fenólicas, como açúcares, ácidos orgânicos e proteínas, demandando processos adicionais de purificação, como a extração em fase sólida (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009).

Entre os métodos prevalentes, destacam-se aqueles que se utilizam de EtOH ou MeOH acidificado como extratores (AMR; AL-TAMIMI, 2007; AWIKA; ROONEY; WANISKA, 2005). Em investigações envolvendo a extração de antocianinas da polpa de uva, verificou-se que o MeOH é mais eficiente do que o EtOH e água (AWIKA; ROONEY; WANISKA, 2005). Contudo, na indústria alimentícia, o EtOH é preferido devido à toxicidade associada ao MeOH.

Cuidados especiais devem ser tomados em extrações com solventes acidificados para evitar meios ácidos fortes, uma vez que as antocianinas acetiladas podem sofrer degradação por hidrólise, e, no caso das antocianinas 3-monosídeos, as ligações glicosídicas podem ser destruídas (CORTEZ et al., 2017). Em outro estudo, observou-se que as antocianinas no extrato realizado com a combinação de água e acetona não foram identificadas. Aparentemente, as moléculas de antocianina sofrem modificações estruturais significativas em acetona aquosa, um fenômeno que não ocorre em MeOH acidificado (METIVIER; FRANCIS; CLYDESDALE, 1980). Portanto, a acetona não é um solvente apropriado para extrair antocianinas.

A escolha do método de extração é uma fase de extrema importância na determinação de antocianinas uma vez que possui efeito direto na quantidade e qualidade das espécies recuperadas. Alguns métodos de extração são relatados na literatura, dentre eles métodos tradicionais como a extração de Soxhlet (CELLI; BROOKS, 2017) e a extração por maceração dinâmica (AZMIR et al., 2013). Técnicas mais elaboradas também foram utilizadas, tais como extração com líquido pressurizado (GARCIA-MENDOZA et al., 2017), extração com fluido

supercrítico (PAES et al., 2014), extração assistida por micro-ondas (ZHENG et al., 2013), dentre outros. A purificação dos extratos pode ser feita por extração por fase sólida, que se baseia na adsorção das substâncias em uma superfície sólida com posterior recuperação, e também por cromatografia (FAROOQ et al., 2020).

## 2.3 ANÁLISE DAS ANTOCIANINAS

### 2.3.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para a análise de antocianinas

Uma última etapa importante no estudo das antocianinas é a separação, identificação e determinação analítica das espécies presentes no extrato, uma vez que diferentes antocianinas possuem diferentes valores biológicos e comerciais. O perfil de antocianinas pode ser também usado como uma “impressão digital” característica de uma espécie (NAVAS et al., 2012). Dessa forma, se fazem necessários métodos analíticos que sejam não só capazes de identificar o teor total de antocianinas em uma espécie, mas também o tipo e a quantidade relativa presente. A detecção de antocianinas é comumente feita por HPLC combinada com detector de massas ou detecção por arranjo de fotodiodos (BORGES et al., 2013; CHOI; SHIM; KIM, 2016; HUANG et al., 2009; PRADHAN; SAHA, 2016). Espécies individuais também foram separadas por HPLC-DAD (HUA et al., 2018; ZHOU et al., 2021), onde as seis principais antocianinas de mirtilo foram o foco do estudo. A Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC, do inglês, *Ultra Performance Liquid Chromatography*) com DAD também foi utilizada para a determinação de antocianinas em extratos de palmeira Jussara (VIEIRA et al., 2017). Técnicas de separação alternativas como CE também foram consideradas (PETERSSON et al., 2008; SEGURA-CARRETERO et al., 2008).

Em um estudo de Li et al. (2016), por exemplo, as antocianinas presentes no mirtilo foram determinadas utilizando-se HPLC acoplado a um detector UV-VIS, proporcionando uma análise precisa e confiável desses compostos. Nesse estudo, a combinação de HPLC com a detecção UV-Vis permitiu a separação eficiente das antocianinas presentes na amostra, bem como a quantificação de cada composto individual. Através da análise dos espectros de absorção, foi possível identificar e quantificar as diferentes antocianinas presentes na amostra de mirtilos chinesa, fornecendo informações valiosas sobre sua composição e concentração. Essa abordagem analítica robusta e sensível possibilita um maior entendimento das propriedades das antocianinas e seu papel em várias aplicações, como alimentos, medicamentos e pesquisas relacionadas à saúde.

Outro exemplo notável é o estudo de Saha et al. (2021), no qual o perfil de antocianinas foi analisado utilizando-se HPLC em conjunto com a espectroscopia de massas. A espectrometria de massas fornece informações adicionais sobre a estrutura molecular das antocianinas, permitindo a identificação e confirmação dos compostos presentes na amostra. Essa combinação de técnicas possibilita uma análise mais abrangente e detalhada das antocianinas, contribuindo para um maior entendimento de sua composição e características.

O uso do HPLC nesse tipo de análise é justificado pela alta sensibilidade alcançada pela técnica e pelo seu alto poder de separação. A capacidade de separar eficientemente as antocianinas presentes em amostras complexas e a possibilidade de quantificação precisa tornam o HPLC uma ferramenta atrativa no estudo das antocianinas.

Contudo, formas alternativas também são relatadas na literatura, como é o caso da cromatografia de camada delgada (TLC), que também foi utilizada para o estudo de antocianinas no trabalho de BINDER; LÄMMLE (2019), por exemplo. A TLC apresenta algumas vantagens no estudo de antocianinas uma vez que possui um custo menor e rapidez na análise, resultando em uma maior frequência analítica. Contudo, seus resultados são puramente qualitativos e a técnica é menos robusta e precisa quando comparada ao HPLC, sendo mais bem aplicada como uma técnica de triagem.

### **2.3.2 Eletroforese Capilar para a análise de antocianinas**

A exploração da CE para a separação de antocianinas é uma abordagem promissora, dada a alta solubilidade desses compostos e a facilidade de obter espécies carregadas. Dessa forma, CE surge como uma técnica com potencial para a separação, identificação e quantificação de antocianinas.

O marco inicial na análise de antocianinas por CE foi registrado em 1996 (BRIDLE; GARCÍA-VIGUERA; TOMÁS-BARBERÁN, 1996). Nesse estudo, empregou-se um tubo capilar de sílica fundida, tampão de borato (pH 8) e detector UV-Vis. Devido à instabilidade das antocianinas em pH básico, a resolução e sensibilidade do método eram reduzidas, permitindo resultados apenas para concentrações elevadas de antocianinas. Posteriormente, esses pesquisadores propuseram uma metodologia alternativa, utilizando tampão de fosfato (pH 2,1) e brometo de centrônio (CTAB) como tensoativo catiônico (BRIDLE; GARCÍA-VIGUERA; TOMÁS-BARBERÁN, 1996). O CTAB foi aplicado para revestir a superfície capilar, evitando interações entre a parede e as antocianinas, além de alterações na direção do

fluxo eletrosmótico, que impactam nos resultados de separação e quantificação (BICARD; FOUGEROUSSE; BROUILLARD, 1999).

Outros modos de CE foram explorados para a determinação quantitativa de antocianinas em vinhos, constituindo uma alternativa à HPLC (SAENZLOPEZ; FERNANDEZZURBANO; TENA, 2003; SÁENZ-LÓPEZ; FERNÁNDEZ-ZURBANO; TENA, 2004). Esses estudos foram conduzidos com um capilar de sílica fundida e um tampão de  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  (pH 8,4) com 15% de MeOH como modificador. Os eletroferogramas foram captados a 599 nm, e para fins de quantificação, curvas de calibração foram geradas utilizando Mv-3-glc como padrão.

Um método semelhante foi proposto para antocianinas acetiladas e não acetiladas, bem como derivados de 3-glucosídeos. (CALVO et al. (2004) conduziram experimentos de CE para pigmentos que foram previamente separados por LC, concentrados e liofilizados, visando identificar os compostos, a ordem de migração e determinar o tempo de migração, baseando-se nas razões massa/carga e na possibilidade de formação de complexos com moléculas de tampão de  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ .

Outra abordagem de CE na análise de antocianinas é a Cromatografia Eletrocínética Micelar (BEDNAR et al., 2003). Mediante esse modo, desenvolveu-se um método para a separação simultânea de seis antocianinas (Mv-3,5-diglc, Mv-3-glc, Mv-3-gal, Pg-3-glc, Cy-3,5-diglc e Cy-3-gal). As condições de análise envolveram um tampão de fosfato 30 mM + borato-TRIS 400 mM + dodecil sulfato de sódio 50 mM, pH 7,0. A concentração elevada de borato foi fundamental para separar pares diastereoisoméricos, como Mv-3-glc e Mv-3-gal. Quanto ao dodecil sulfato de sódio, sabe-se que a formação de micelas carregadas negativamente confere estabilidade química às antocianinas em soluções aquosas. Os resultados dessas pesquisas indicam que o número de cargas negativas na superfície e uma distribuição organizada dessas cargas na superfície da micela são fatores determinantes para permitir a estabilidade e a retenção da cor nas antocianinas.

A CE com acoplamento à espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS, do inglês, *Electrospray Ionization*) foi empregada para monitorar antocianinas e flavonoides no vinho. As condições experimentais abrangeram um tampão de cloreto de amônio (pH 2) e um tampão de borato de amônio pH 9. O método de MS foi otimizado, e as fragmentações das antocianinas foram estudadas detalhadamente (BEDNÁŘ et al., 2005).

### 2.3.3 Espectrofotometria UV-Visível para a análise de antocianinas

Quando o objetivo for somente a quantificação de antocianinas totais, a espectroscopia UV-Vis também tem seu espaço através do método de ponto único, onde a absorção de luz em uma faixa característica de absorção das antocianinas é medida e a concentração determinada por uma aproximação que considera como padrão o coeficiente de extinção para todas as antocianinas presentes na amostra.

Uma outra maneira é o diferencial de pH, que é uma técnica utilizada para determinar o teor de antocianinas em uma amostra. Essa técnica é baseada na variação de cor das antocianinas em função do pH do meio em que estão presentes. Uma vez que as antocianinas apresentam diferentes formas moleculares, dependendo do pH do meio em que estão dissolvidas, a cor dessas formas moleculares varia, e a intensidade da cor está diretamente relacionada à concentração de antocianinas na amostra. Dessa forma, o método de diferencial de pH consiste em realizar duas leituras de absorbância da solução contendo as antocianinas em dois valores de pH diferentes: um ácido e outro alcalino. Geralmente, o pH ácido utilizado é em torno de 1,0 a 1,5, onde as antocianinas normalmente se encontram na coloração avermelhada e o pH alcalino em torno de 4,5 a 5,0 onde estão incolores. Para realizar a análise, primeiramente, uma solução da amostra é preparada e ajustada para o pH ácido desejado. Em seguida, a absorbância dessa solução é medida em um comprimento de onda específico usando um espectrofotômetro. Depois disso, a mesma solução é ajustada para o pH alcalino e a absorbância é novamente medida. A diferença entre as duas leituras de absorbância é calculada. Essa diferença de absorbância é proporcional ao teor de antocianinas na amostra. Quanto maior a diferença, maior é o teor de antocianinas (TURAK; OZGUR, 2013).

É importante ressaltar que, tanto o método do ponto único quanto o método do diferencial de pH fazem uso de aproximações para estimar o teor de antocianinas em uma amostra, logo apresentam um erro maior inerente ao método quando comparado à outras técnicas (BETZ; BROWN; ROMAN, 2011).

Na literatura também são encontrados trabalhos onde o teor de antocianina total foi medido por espectrofotometria UV-Vis em amostras frutas da espécie *Euterpe oleracea Mart.* (KURDYUKOV et al., 2021) e em pétalas de rosa (ÖZGÜR; ÇIMEN, 2018). O teor total de antocianinas também pode ser determinado por técnicas como espectroscopia no infravermelho próximo (STUPPNER et al., 2020), associada ou não ao uso de ferramentas quimiométricas, as quais são muito relevantes como ferramenta auxiliar para o pré-processamento dos sinais dos

espectros, assim como para a construção dos modelos de calibração e previsão (CHOI; SHIM; KIM, 2016; DE OLIVEIRA et al., 2018; GARDANA et al., 2018).

A espectrofotometria UV-Vis também pode ser usada como técnica preliminar para a elucidação de estruturas das antocianinas proporcionando informações cruciais sobre sua composição química e características estruturais. A análise destes dados permite prever o número e tipo de glicosilação presente nas antocianinas.

O índice de absorvidade molar de uma molécula de antocianina, indicado pela razão  $E_{440}/E_{vis}$ , pode antecipar a presença de um grupamento de açúcar. Uma razão de 29-35% sugere um monossídeo, por exemplo, enquanto um valor menor de 15-24% é observado para um biossídeo. Além disso, a ligação de grupos de açúcar em posições específicas, como 3 e 5, resulta em características distintas nos espectros de antocianinas, possibilitando inferências a partir dos dados UV-Vis. Dessa forma, a análise espectral UV-Vis é crucial para determinar o número e a natureza da glicosilação nas antocianinas, fornecendo informações essenciais sobre sua composição química (SAHA et al., 2021).

A segunda consideração recai sobre a ausência ou presença de acilação nas antocianinas. O número de acilações em uma molécula de antocianina pode ser determinado medindo a razão entre o máximo de acilação ( $E_{acyl}$ ) e o máximo visível ( $E_{vis}$ ) no espectro UV-Vis do composto. O pico de máximo de acilação geralmente está entre 310 e 340 nm, e a razão do valor de acilação para o máximo visível está entre 0,5 e 0,7 para uma única acilação e entre 0,8 e 1,1 para duas acilações (SAHA et al., 2021).

## 2.4 PLANEJAMENTO DE MISTURAS

O planejamento de mistura (PM) fundamenta-se nos princípios da estatística multivariada, representando ferramentas altamente eficazes na otimização de processos empíricos. Essas abordagens abrangem a maximização da geração de informações relevantes e a minimização do esforço experimental ou laboratorial, resultando em impactos substanciais no tempo e no custo dos procedimentos efetivos. Inserido na vasta área da quimiometria, o PM visa selecionar e modelar fatores ou variáveis considerados nos ensaios experimentais. A resposta está sob a influência da proporção quantitativa de cada constituinte presente na mistura, garantindo que o somatório das proporções de cada variável seja sempre igual a 1 ou 100%. Durante a construção, ajuste e otimização do modelo, o PM foca em abranger o maior número possível de parâmetros essenciais para descrever a realidade empírica, assegurando a relevância heurística do problema em questão juntamente com a significância estatística. O

acompanhamento da(s) resposta(s) ocorre por meio do ajuste de uma função polinomial, considerando níveis independentes das variáveis dependentes para os componentes da mistura. Vale ressaltar que, as aplicações do PM transcendem o ambiente acadêmico, permeando diversos setores de interesse no mercado, como alimentos, combustíveis, biocombustíveis, polímeros, farmacêutica, novos materiais, entre outros (DO NASCIMENTO et al., 2023; LIU et al., 2019).

Quando o objetivo do estudo é a construção de modelos empíricos, a modelagem por Mínimos Quadrados Ordinários (MQO) é comumente empregada como técnica predominante. Contudo, na avaliação da influência das variáveis do sistema, a aplicação equivocada de PM ou de planejamentos fatoriais (PF) pode ocorrer. Existe uma distinção fundamental entre PM e PF. No PM, a resposta depende exclusivamente da mudança na proporção relativa entre seus componentes, ou seja, a soma das proporções deve permanecer constante. Nesse tipo de planejamento experimental, o foco está em descobrir a proporção dos componentes de uma mistura que gera a melhor resposta. Ao contrário do PF, cujo objetivo, além da otimização, é medir a influência na resposta quando ocorre a variação do nível entre os diversos fatores avaliados, seja em quantidades intensivas como temperatura ou extensivas como concentrações (CORNELL, 2002).

Os níveis desses fatores podem ser alterados independentemente uns dos outros. Além disso, em oposição aos PF, em problemas envolvendo misturas, as variáveis são matematicamente dependentes, de modo que as proporções dos componentes somam uma unidade, conforme a **Equação 1** (CORNELL, 2002).

$$\sum_{i=1}^q x_i = 1 \quad 0 \leq x_i \leq 1 \quad (1)$$

Existem várias abordagens em PM, como os planejamentos em rede simplex, centroide-simplex propostos por Scheffé, e vértices extremos propostos por McLean e Anderson, que possibilitam a exploração de diversas regiões experimentais. Na seleção do modelo mais adequado, é crucial considerar o número de fatores e interações a serem estudadas, a complexidade do planejamento, a validade estatística e eficácia da modelagem sobre o sistema, bem como a viabilidade da implementação, os custos e o tempo associados a cada modelo (MCLEAN; ANDERSON, 1966).

O modelo linear pode ser usado para descrever misturas de componentes formando soluções ideais. Para uma mistura de dois componentes, a resposta é determinada pela **Equação 2** (CORNELL, 2002).

$$y' = b_1^*x_1 + b_2^*x_2 + \varepsilon \quad (2)$$

Nota-se que, diferentemente dos modelos para variáveis independentes, este modelo não tem um termo constante porque a **Equação 1** foi usada na sua derivação. Os dois coeficientes de regressão  $b_i^*$  ( $i = 1, 2$ ) são descritos com um sobrescrito em asterisco, para enfatizar que foram determinados através das variáveis vinculadas à **Equação 1**, e não de variáveis independentes. Os coeficientes podem ser determinados sem a necessidade empírica de realizar qualquer mistura, pois os valores das respostas são simplesmente as médias ponderadas das respostas dos componentes puros. Contudo, um maior número de experimentos com misturas deve ser executado para descrever possíveis interações de sinergismo ou antagonismo entre os componentes através de coeficientes de interação cruzadas entre os componentes (CORNELL, 2002).

Interações binárias são contempladas no planejamento em rede simplex, quando, além dos pontos que representam as componentes puras também estão presentes as misturas binárias no planejamento de experimentos. Sendo assim, é possível construir o modelo quadrático, conforme descrito na **Equação 3**, no qual os últimos termos do modelo correspondem às possíveis interações binárias no sistema de dois componentes (CORNELL, 2002).

$$y' = b_1^*x_1 + b_2^*x_2 + b_3^*x_3 + b_{12}^*x_1x_2 + \varepsilon \quad (3)$$

Neste modelo, é mandatório a realização de no mínimo cinco experimentos para determinar os coeficientes. Para verificar se o modelo quadrático descreve adequadamente o sistema de misturas, é necessário realizar experimentos, com proporções de misturas, correspondentes a pontos ao longo de um triângulo retângulo, com a finalidade de validar o modelo, ou seja, mostrar que o modelo está bem ajustado aos pontos experimentais, sem a ocorrência de falta de ajuste no intervalo de significância considerado (CORNELL, 2002).

Ainda considerando a **Equação 1**, um recorte pode ser analisado mediante limitações nos valores assumidos por cada constituinte na mistura, em função de restrições intrínsecas a cada sistema. Tais limitações, sejam elas superiores e/ou inferiores, dificultam a manipulação do espaço experimental cuja condição de contorno advém da aplicação do conceito de

pseudocomponentes, que auxiliam na descrição de situações nas quais não é possível utilizar um componente com total pureza no modelo (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

É importante destacar que, de forma rigorosa, os pseudocomponentes são definidos como combinações dos componentes originais. O principal motivo para introduzir os pseudocomponentes em um ensaio experimental é simplificar tanto o planejamento experimental quanto o ajuste dos modelos, em comparação com quando são realizados com base no sistema de componentes original. Contudo, é muito importante destacar que os pseudocomponentes são “pseudo”, e se alguém deseja fazer inferências sobre os componentes que realmente compõem o sistema de mistura, é mandatório ajustar um modelo com os componentes originais ou fazer a transformação inversa do pseudocomponente, de volta aos componentes originais, para produzir um modelo ajustado nas componentes originais. Uma vez respeitado todo o formalismo inerente ao uso das pseudocomponentes, uma nova região pode ser visualizada como uma fração do espaço experimental original, preservando a geometria e propriedades (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

Tais considerações são preconizadas para a descrição dos polinômios canônicos de Scheffé. Para determinar a equação de tais polinômios, as estimativas dos parâmetros do modelo podem ser encontradas através do método dos MQO, bem como os erros padrão associados, segundo as **Equações 4 e 5**, sendo  $X$  a matriz cujos elementos são determinados pelas proporções dos componentes da mistura,  $y$  um vetor das respostas dos experimentos,  $b^*$  o vetor dos coeficientes do modelo, e  $s_p^2$  a variância determinada a partir das réplicas das misturas.

$$b^* = (X^T X)^{-1} X^T y \quad (4)$$

$$\text{var}(b^*) = (X^T X)^{-1} s_p^2 \quad (5)$$

### 3 OBJETIVOS

Nesta sessão serão apresentados o objetivo geral, bem como os objetivos específicos do trabalho proposto.

#### 3.1 OBJETIVOS GERAIS

- Determinar o perfil de antocianinas em extratos hidroalcoólicos a partir de genótipos de capim-elefante com coloração arroxeadada utilizando técnicas cromatográficas ou por eletromigração.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar as proporções de solventes usados para extrair as antocianinas de genótipos de capim-elefante por meio de planejamento de misturas.
- Otimizar o tempo de extração das antocianinas no genótipo de capim-elefante.
- Identificar as espécies de antocianinas presentes no capim-elefante por detecção UV-Visível.
- Criar um protocolo de extração que favoreça a obtenção de antocianinas a partir da biomassa de capim-elefante.
- Evidenciar o perfil de antocianinas de genótipos de capim-elefante em termos de componentes e proporções.

## 4 METODOLOGIA

Nesta seção serão apresentadas as metodologias pelas quais foram realizados os experimentos que permitiram buscar elucidar as questões referentes ao estudo proposto e buscar a conclusão dos objetivos supracitados.

### 4.1 MATERIAIS, REAGENTES E ANÁLISE DE DADOS

Os reagentes foram adquiridos da VETEC Química Fina Ltda., Dinâmica Química Contemporânea Ltda., Sigma Aldrich Corporation e Cromoline Química Fina. A água foi purificada por meio de um sistema de osmose reversa. Foram utilizados reagentes de grau analítico, como EtOH, propilenoglicol (PPG) e HCl para a extração do capim-elefante.

Para as análises estatísticas, construção de modelos e dos gráficos foi utilizado o *software* livre R na sua versão 4.3.1 de 2023 associado ao uso da IDE RStudio na versão 2023.06.1

### 4.2 COLETA E PROCESSAMENTO DO MATERIAL VEGETAL

O genótipo T44.1 foi escolhido por ser um genótipo elite do programa de melhoramento de capim-elefante da Embrapa, sendo selecionado em função da alta produção de biomassa e alta intensidade de coloração arroxeadas nas flores e nos colmos. Para realização das amostragens, foram implantadas plantas individuais 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 em campo, seguindo as recomendações técnicas para o cultivo do capim-elefante.

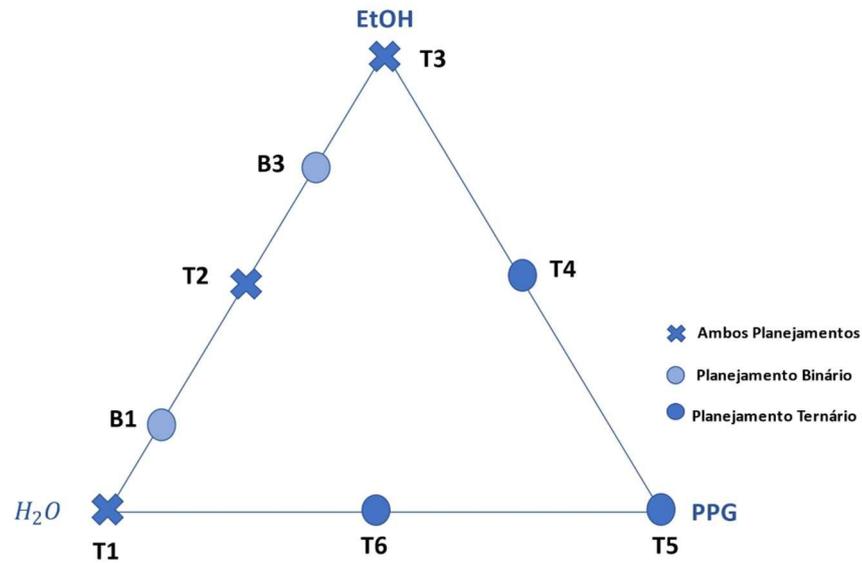
Uma massa de 2 quilos de folhas foi separada, picada e armazenada em sacos plásticos em freezer a -20 °C até o momento da extração. Dessa massa foram retirados 200 gramas, de forma aleatória, para serem posteriormente processados. A fim de aumentar a reprodutibilidade e a representatividade dos métodos de análise, esses 200 gramas de capim-elefante foram, inicialmente, cortados em tiras com o auxílio de uma tesoura e, em seguida, teve suas dimensões reduzidas com o auxílio de um processador de alimentos elétrico.

#### 4.3 PLANEJAMENTO DE MISTURAS PARA A EXTRAÇÃO DE ANTOCIANINAS NO CAPIM-ELEFANTE

Para o trabalho realizado, buscou-se um processo de extração que estivesse de acordo com as diretrizes da Química Verde. Portanto, optou-se pela maceração estática, onde nenhuma instrumentação auxiliar é utilizada, além de não se fazer necessário o uso de energia elétrica. Em relação aos solventes, optou-se pelo uso de água e de EtOH, uma vez que possuem a polaridade necessária para uma boa eficiência na extração das antocianinas, além de baixa toxicidade, sendo considerados *ecofriendly*. Nesse sentido, o uso do PPG também foi proposto uma vez que agrega um aumento na amplitude em escala de polaridade dos solventes envolvidos, buscando um maior conhecimento agregado sobre o comportamento do processo de extração em uma faixa maior de polaridade. Além disso, um outro motivo seria a aplicação corriqueira do PPG em formulações farmacêuticas, incluindo cosméticos, de modo que os resultados desse trabalho podem dar uma ideia sobre possíveis aplicações tecnológicas do extrato de capim-elefante. No entanto, uma limitação relevante sobre o uso do PPG diz respeito a sua alta viscosidade, o que impossibilita o uso no HPLC.

Existem diferentes modelos que dão suporte ao formalismo matemático envolvido no PM que se adequam ao número de variáveis escolhidas para serem estudadas. Em resumo, neste projeto, contamos com dois delineamentos experimentais, destacados na **Figura 4** e explicitados na **Tabela 1**: um planejamento binário entre água e EtOH contando com 5 pontos experimentais realizados em triplicata (T1, B1, T2, B2 e T4) e um planejamento ternário envolvendo água, EtOH e PPG com outros 6 pontos experimentais (T1, T2, T3, T4, T5 e T6).

**Figura 4** - Visão gráfica do planejamento experimental.



**Fonte:** Elaborado pelo autor (2024).

**Tabela 1** - Proporções relativas dos componentes para cada delineamento experimental.

Ponto	H <sub>2</sub> O (%)	EtOH (%)	PPG (%)	Planejamento	Análise
T1	100	0	0	Ambos	LC; UV-VIS
T2	50	50	0	Ambos	LC; UV-VIS
T3	0	100	0	Ambos	LC; UV-VIS
T4	0	50	50	Ternário	UV-VIS
T5	0	0	100	Ternário	UV-VIS
T6	50	0	50	Ternário	UV-VIS
B1	80	20	0	Binário	LC
B2	20	80	0	Binário	LC

**Fonte:** Elaborado pelo autor (2024).

A fim de modular a concentração de antocianinas no extrato de capim-elefante, uma réplica da extração B1 teve o volume reduzido no rota-evaporador e posteriormente foi liofilizada para que a concentração de antocianinas aumentasse. Essa amostra concentrada (C1) foi usada como padrão de controle para confirmar que os métodos utilizados estavam obtendo êxito na detecção de antocianinas.

#### 4.4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE ANTOCIANINAS NO CAPIM-ELEFANTE

Para a extração, foram pesados em um béquer aproximadamente 5 gramas do capim-elefante processado, cuja massa foi anotada. O material foi então extraído com 50 mL da solução extratora de acordo com o planejamento descrito anteriormente. Vale destacar que, antes da extração todas as soluções extradoras tiveram o pH ajustado com o uso de HCl 5% v/v. Para as análises preliminares, o pH ajustado foi de 2,5, mas no decorrer das atividades o pH de trabalho foi de 1,5 (modificação a ser discutida na sessão '*Resultados e Discussões*'). O béquer foi então vedado com parafilme e recoberto com papel alumínio para impedir a degradação das antocianinas pela luz ambiente. O recipiente, então, foi deixado em repouso por 24h. Após esse período, a extração foi interrompida retirando o capim do meio de extração. A solução foi filtrada, fazendo-se uso de filtro de papel, e o pH foi novamente ajustado, levando em conta que a própria extração ocasiona alteração no pH do meio.

#### 4.4 METODOLOGIA DA ANÁLISE PRELIMINAR DOS EXTRATOS UTILIZANDO ESPECTROFOTOMETRIA ULTRAVIOLETA-VISÍVEL

A análise do espectro UV-Vis do extrato de capim-elefante tinha como objetivo dar uma noção preliminar da ocorrência de antocianinas nas amostras. Dessa forma, os resultados obtidos nesse procedimento eliminariam a necessidade de análises posteriores com técnicas mais avançadas, salvando tempo e recursos.

Para isso, as amostras do planejamento ternário foram transferidas para uma cubeta de quartzo e os espectros foram obtidos pelo equipamento Shimadzu UV-1800 em uma faixa que contempla toda a região do espectro que compreende o ultravioleta e o visível, variando de 200 a 600 nm. Diferentes soluções extradoras para cada um dos pontos experimentais foram utilizadas como branco instrumental. Para uma boa representação dos espectros foi necessário diluições diferentes para cada extrato, logo a intensidade do sinal obtido nessa etapa não possui valor quantitativo.

#### 4.5 ANÁLISE DO EXTRATO POR ELETROFORESE CAPILAR

Uma vez confirmada a presença de antocianinas nas amostras se faz necessária a separação entre as espécies para uma informação mais apurada do perfil dos extratos. Com esse

fim, experimentos foram realizados em um equipamento de CE modelo 7100 CE (Agilent Technologies, Palo Alto, EUA), disponível no Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), equipado com DAD e *software* para aquisição e tratamento de dados OpenLAB CDS ChemStation Edition (Agilent Technologies, Palo Alto, EUA).

Foram testados dois eletrólitos de corrida (BGE), sendo eles TRIS/HCl no pH 2,5 e um tampão fosfato em pH 2,1. O uso do CTAB como inversor de fluxo e protetor da parede capilar também foi testado. O capilar utilizado para todas as análises foi um capilar de sílica fundida com 50 µm de diâmetro interno e extensão de 48,5 cm, sendo 40 cm o tamanho efetivo. A injeção de amostra ocorreu por 50 mbar de pressão durante 8 s. A voltagem aplicada foi de 25 kV, exceto na presença do CTAB, onde foi utilizado -25 kV, uma vez que o fluxo foi invertido. A detecção foi feita com DAD em 520 nm. A corrida ocorreu por 50 minutos. As análises por CE foram feitas apenas para as amostras B1 e C1.

#### 4.7 PREPARO DOS EXTRATOS PARA A ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

O volume do filtrado da extração foi reduzido por rota-evaporador de forma que todo o EtOH fosse retirado. Os extratos livres de EtOH foram recobertos com papel alumínio, vedados com parafilme e armazenados a -20 °C em balões ou tubos *falcon* para serem posteriormente liofilizados. A liofilização ocorreu durante 5 dias no equipamento do Laboratório Integrado de Pesquisas (LIP) em um liofilizador de modelo Alpha 1-2 LD Plus da marca Christ sob vácuo a -55 °C durante 5 dias.

Os extratos liofilizados foram suspensos em água deionizada com volume suficiente para solubilizar todo o conteúdo do balão. Em seguida, os volumes individuais foram padronizados para 5 mL em balão volumétrico. Esse volume foi centrifugado e posteriormente filtrado com o auxílio de um filtro de seringa 0,22 µm e armazenado no *freezer* até o momento da análise.

#### 4.8 ANÁLISE DOS EXTRATOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Para a análise por HPLC, foram usados os pontos do planejamento binário. Essa análise foi executada através de um procedimento experimental modificado, tendo como referência o estudo feito por Šimerdová et al. (2021). Utilizou-se um equipamento Agilent Technologies

modelo 1260 Infinity II, também disponível no Departamento de Química da UFJF. A coluna utilizada foi uma coluna Agilent eclipse plus C18 com 100 mm x 4.6 mm x 3.5  $\mu$ m com a temperatura do forno controlada em 50 °C.

O eluente consistia em um gradiente segmentado de MeOH (Solvente B) e água acidificada com 10% de ácido fórmico (Solvente A), com uma taxa de fluxo de 0,8 mL/min. O perfil do gradiente foi o seguinte e está destacado na **Tabela 2**: 0 min, 5% B; 0-4 min, 5-20% B; 4-8 min, 20-25% B; 8-10 min, 25-90% B; 10-10,15 min, 90% B; 10,15-10,30 min, 90-5% B; 10,30-13 min, 5% B.

Foi injetado 15  $\mu$ L de amostra sem diluição. Os espectros UV foram registrados com o DAD em intervalos de um segundo em 190 a 600 nm, usando uma largura de banda de 1,2 nm. Os cromatogramas foram obtidos em 520 nm.

**Tabela 2** - Gradiente de análise HPLC.

Tempo (min)	% Solvente A	% Solvente B
0	95	5
4	80	20
8	75	25
10	10	90
10,15	10	90
10,30	95	5
13	95	5

**Fonte:** Elaborado pelo autor (2024).

#### 4.9 ESTUDO CINÉTICO DA EXTRAÇÃO DE ANTOCIANINAS DO CAPIM-ELEFANTE COM COLORAÇÃO ARROXEADA

Para a análise da cinética de extração das antocianinas do capim-elefante foram realizados onze experimentos individuais e independentes, todos em duplicata. Para essas análises foram pesados aproximadamente 0,5 gramas de amostra de capim e extraídos com 5 mL da solução extratora na proporção otimizada nas etapas anteriores.

Cada um dos ensaios teve um tempo de extração diferente. O início da extração foi definido como sendo o momento em que a solução extratora entrou em contato com o capim-elefante previamente pesado e o fim da extração foi definido como o momento em que foi retirada uma alíquota do meio extrator e transferida para uma cubeta de quartzo, onde o espectro UV da amostra em questão foi medido. Nessa etapa, o ajuste do pH foi feito somente para a

solução extratora antes do início da extração. Os tempos de medição foram: 5 min, 10 min, 20 min, 30 min, 60 min, 120 min (2h), 240 min (4h), 360 min (6h), 600 min (10h), 1080 min (18h) e 1440 min (24h).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

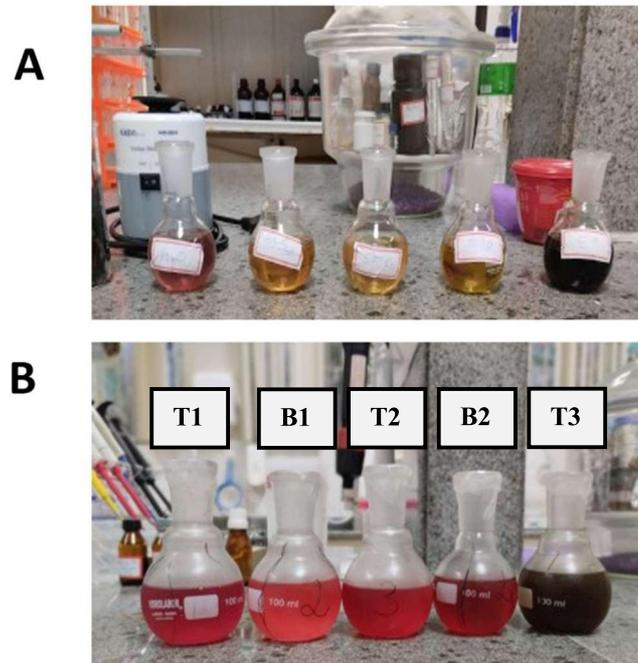
Nesta sessão serão abordados e discutidos os principais resultados encontrados ao longo do estudo e a suas implicações para a efetivação dos objetivos propostos.

### 5.1 ESTUDO DOS EXTRATOS DO CAPIM-ELEFANTE COM COLORAÇÃO ARROXEADA

Em um primeiro momento, o pH das soluções extratoras foi ajustado para 2,5, porém, esse ajuste retornou resultados que poderiam ser melhorados. Após a extração, verificou-se a coloração dos extratos, uma vez que a coloração avermelhada é um bom indicativo da eficiência de extração de antocianinas. Como supracitado, o pH do meio naturalmente se altera após a extração, devido à natureza das amostras e dos compostos extraídos. Logo, os extratos não apresentaram a coloração avermelhada esperada. Contudo, isso não significou que as espécies desejadas não se encontravam em solução, portanto, o pH voltou a ser ajustado, alterando o equilíbrio químico do meio e favorecendo que as antocianinas estivessem majoritariamente na forma do cátion flavílico, que possui a coloração avermelhada. A coloração anterior pode ser justificada pela presença de clorofila nos extratos. Para os extratos com uma alta proporção relativa de água, a coloração verde das clorofilas se combinava com o vermelho das antocianinas, resultando na coloração amarela e, por tanto, mascarava a presença das antocianinas.

Após o ajuste do pH, com o aumento da quantidade de moléculas na forma do cátion flavílico, a cor vermelha aumentou de intensidade e tornou-se predominante no extrato, evidenciando a presença das antocianinas. Especialmente para o ponto T3, onde foi utilizado 100% de EtOH, a extração de clorofila foi substancialmente maior, resultando em um tom verde escuro. Mesmo após o ajuste do pH, a intensidade de vermelho das antocianinas não foi o suficiente para sobrepor o verde, resultando em um extrato não vermelho, mas com uma coloração alterada devido a combinação de cores das espécies presentes. As imagens dos extratos antes e após o ajuste de pH podem ser vistas na **Figura 5**.

**Figura 5** - Coloração dos extratos para o planejamento binário (A) antes e (B) depois do ajuste de pH.



**Fonte:** Elaborado pelo autor (2024).

Tendo em vista a necessidade do reajuste mencionado acima, optou-se por alterar o ajuste do pH para a solução extratora para 1,5, sabendo que esse pH mais baixo favoreceria ainda mais a presença dos cátions flavílicos e que por meio do mecanismo de copigmentação por auto associação a estabilidade das antocianinas poderia aumentar (GENÇDAĞ et al., 2022). Dessa forma, para as análises subsequentes essa metodologia foi definida como padrão. Uma nova rodada de extrações foi realizada e será explicada a seguir.

Para fins de melhor o entendimento, as amostras foram enumeradas de 1 a 15 seguindo a proporção de solventes utilizadas na extração, sendo três réplicas para cada um dos cinco níveis amostrais. Estão resumidos na **Tabela 3** as informações para cada uma das amostras analisadas nesse trabalho.

**Tabela 3** - Identificação dos pontos amostrais.

Nível	Amostra	Água (%)	EtOH (%)
A	E1	100	0
A	E2	100	0
A	E3	100	0
B	E4	80	20
B	E5	80	20
B	E6	80	20
C	E7	50	50
C	E8	50	50
C	E9	50	50
D	E10	20	80
D	E11	20	80
D	E12	20	80
E	E13	0	100
E	E14	0	100
E	E15	0	100

**Fonte:** Elaborado pelo autor (2024).

Para essa segunda rodada de extrações o pH pouco se alterou durante a extração, resultando em extratos avermelhados para todos os níveis com exceção do nível E, onde a predominância de clorofila tornou a solução esverdeada. A **Figura 6** mostra os extratos dessa segunda rodada de extração sem o ajuste do pH. Apesar da coloração que evidencia uma maior população das antocianinas na forma do cátion flavílico, o pH voltou a ser ajustado para valores próximos a 1,5 para garantir a estabilidade dos extratos.

**Figura 6** - Extratos da segunda rodada de extração.

**Fonte:** Elaborado pelo autor (2024).

Além disso, a fim de estimar a eficiência de extração para cada nível amostral, o balão onde as soluções foram alocadas foram pesados antes e após a liofilização. A **Tabela 4** mostra a condição experimental, a identificação da amostra, a massa de material vegetal pesada, a massa do extrato seco e, por fim, a eficiência da extração.

**Tabela 4** - Eficiência de extração para as amostras estudadas.

Nível	Amostra	Massa pesada (g)	Massa de extrato seco (g)	Eficiência (%)
A	E1	5,0466	0,2155	4,27
A	E2	5,1572	0,2043	3,96
A	E3	5,0590	0,2285	4,52
B	E4	5,1908	0,2201	4,24
B	E5	5,2006	0,2280	4,38
B	E6	5,0803	0,2219	4,37
C	E7	5,1959	0,2300	4,43
C	E8	5,0658	0,2257	4,46
C	E9	5,2454	0,2282	4,35
D	E10	5,1895	0,2161	4,16
D	E11	5,0378	0,2071	4,11
D	E12	5,1705	0,2200	4,25
E	E13	5,0120	0,2048	4,09
E	E14	5,0225	0,1894	3,77
E	E15	5,0904	0,1173	2,30

**Fonte:** Elaborado pelo autor (2024).

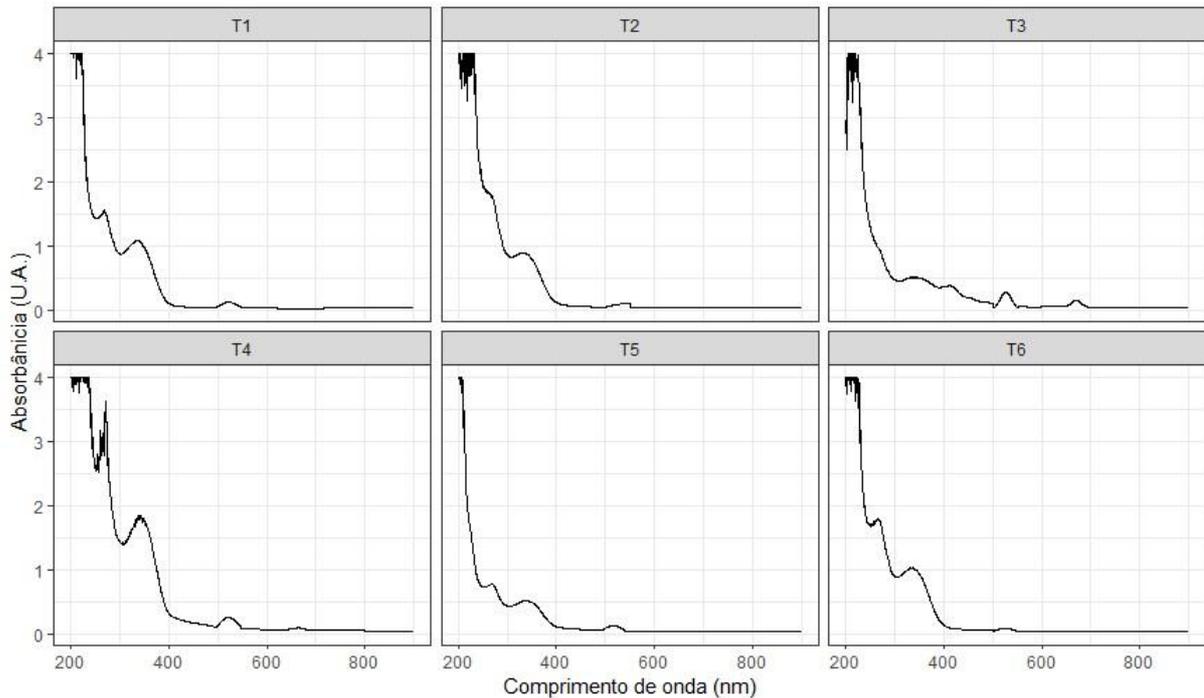
Podemos perceber pelos valores mostrados que dentro do mesmo grupo existe uma variação considerável na quantidade de material extraído, algo esperado dada a complexidade da matriz estudada. A maior média de material extraído foi para a condição C, onde existe proporções iguais dos solventes nas soluções extratoras. A menor média de massa extraída foi para a condição E com 100% de EtOH. Para as condições A, B e D, as médias de extração foram de 4,25, 4,33, 4,18, respectivamente. É importante destacar que, a extração não é um processo seletivo às antocianinas, sendo extraídos também outros constituintes polares do capim-elefante. Dessa forma, para evitar o erro de inferir sobre a massa do extrato na concentração de antocianinas das soluções é necessário o uso de um método de separação seletivo para essas espécies. Esse passo será relatado na sequência desse texto.

## 5.2 ANÁLISE PRELIMINAR DOS EXTRATOS POR ESPECTROFOTOMETRIA ULTRAVIOLETA-VISÍVEL

Os espectros de seis pontos experimentais foram registrados com finalidade puramente qualitativa. A análise por UV-Vis teve a função de fazer uma varredura para determinar se, de fato, há presença de antocianinas nos extratos de capim-elefante, de forma mais objetiva que a pura visualização da coloração. Como é registrado na literatura, as antocianinas possuem alguns pontos característicos em seus espectros de UV-Vis, como sinais proeminentes próximos a 300 nm e, principalmente, em 520 nm. Esse comprimento de onda em específico apresenta uma grande importância devido a sua seletividade na identificação dessa classe de compostos. Isso acontece pois em outras regiões espectrais uma multiplicidade de fitoquímicos também possuem atividade de absorção, enquanto em 520 nm existem poucos compostos que podem atuar como interferentes ou mascarar esse sinal. Um dos possíveis compostos que também absorvem nessa região espectral, por exemplo, são as betalaínas, contudo, como é encontrado na literatura, as betalaínas e as antocianinas não ocorrem simultaneamente nos mesmos táxons vegetais (MARÇO; POPPI; SCARMINIO, 2008).

Dessa forma, o perfil dos espectros de varreduras para os pontos do planejamento ternário foi analisado, como mostrado na **Figura 7**. Para todos os pontos, foi possível constatar a presença de antocianinas, uma vez que todos os espectros apresentaram sinais na região esperada para a absorção desses compostos.

**Figura 7** - Espectros UV-Vis para os pontos do planejamento ternário.



**Fonte:** Elaborado pelo autor (2024).

Sabe-se que a cor de uma substância está intrinsecamente relacionada à sua interação com a luz. Quando a luz branca incide sobre um composto, ela pode ser refletida, transmitida ou absorvida. A cor percebida é determinada pelos comprimentos de onda que são refletidos ou transmitidos.

Nesse contexto, como foi observado, as antocianinas apresentam uma estrutura química complexa, caracterizada por um cromóforo central, denominado anel de flavílico, que desempenha um papel fundamental na determinação da cor observada (MARÇO; POPPI; SCARMINIO, 2008). Esse anel contém uma cadeia de carbono conjugada, na qual ocorre uma ressonância eletrônica extensiva. A ressonância eletrônica é um fenômeno no qual os elétrons se movem entre os orbitais moleculares conjugados, resultando em uma distribuição eletrônica ampliada ao longo da molécula. Essa cadeia de carbono conjugada presente nas antocianinas confere a capacidade de absorção de luz visível em uma faixa específica de comprimentos de onda devido à interação dos elétrons da cadeia com a radiação eletromagnética. Mais especificamente, a absorção se manifesta quando os elétrons são excitados de um estado fundamental para um estado excitado de maior energia (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009).

As antocianinas exibem uma absorção acentuada na região de 520 nm, na faixa do verde-amarelo. Tal absorção é atribuída à ressonância eletrônica na cadeia conjugada, que demonstra uma eficiência particularmente elevada nessa região do espectro. A luz verde-

amarela é, portanto, absorvida pelas moléculas de antocianina, enquanto as demais cores são refletidas ou transmitidas, resultando na percepção visual de uma coloração avermelhada.

Em síntese, a absorção das antocianinas na região de 520 nm, bem como sua coloração avermelhada, podem ser compreendidas em virtude da presença de uma cadeia de carbono conjugada em sua estrutura, propiciando a ressonância eletrônica e a absorção seletiva de luz na faixa do espectro correspondente ao verde-amarelo. A cor resultante é uma combinação das cores não absorvidas, incluindo o vermelho.

É importante ressaltar que, nesta etapa, não houve nenhum processo de purificação ou de isolamento das antocianinas. Logo, toda a análise foi feita com base no espectro dos extratos de capim-elefante, onde existem uma grande variedade de compostos químicos com características estruturais e, conseqüentemente, eletrônicas diferentes e isso possui impacto no perfil de absorção mostrado.

Muitos compostos absorvem em 200 nm. Dessa forma, é natural que a soma da absorção de todos esses compostos aumente a intensidade nessa região, como observado nos espectros da Figura 7. Uma região característica para a absorção de flavonoides, por exemplo, é entre 300 e 400 nm. Assim, considerando os espectros obtidos, é possível imaginar também a presença desses compostos nos extratos de capim-elefante em quantidade significativa. Além disso, outros compostos também absorvem na região citada contribuindo para o aumento da intensidade do sinal.

Novamente, quando se fala do perfil dos espectros acima de 500 nm, é possível notar uma baixa intensidade relativa observada, o que pode ser justificado por somente antocianinas absorverem nessa região, como já mencionado. Além disso, a fim de conseguir um perfil representativo dos extratos, diferentes diluições foram tomadas anterior à análise, logo a intensidade do sinal não possui relevância para a análise nem em mérito quantitativo, quanto qualitativo.

Por fim, ainda observando os perfis obtidos, é possível notar outro sinal próximo a 600 nm, sendo esses mais intensos para os pontos com maior quantidade de EtOH (T3 e T4). Essa banda pode ser atribuída à grande extração de clorofila por esses extratores. Para o ponto T2, onde também existe uma quantidade significativa de EtOH na solução extratora, essa banda não é observada. Isso pode ser explicado pela alta extração de outros compostos que, mesmo incolores, possuem maior intensidade de sinal na região ultravioleta. Dessa forma, a banda da clorofila torna-se imperceptível no espectro devido a sua quantidade relativa no extrato.

Uma vez que os espectros obtidos são dos extratos e não somente das antocianinas, não é possível tirar nenhuma conclusão sobre a natureza das espécies presentes, fazendo necessário o uso de técnicas de separação como CE e HPLC.

### 5.3 RESULTADOS DO MÉTODO DE SEPARAÇÃO: ELETROFORESE CAPILAR

Com a intenção de conseguir separar as antocianinas para averiguar seus perfis individuais, procedeu-se com a análise por CE. A primeira tentativa foi a injeção de B1, tendo como BGE uma solução de TRIS/HCl no pH 2,5. Contudo, nenhum sinal foi detectado. Sob a hipótese de que as concentrações das antocianinas não eram suficientes para serem detectadas, C1 foi injetado sob as mesmas condições, mas novamente nenhum sinal foi detectado.

Em uma outra tentativa, usou-se então o tampão fosfato no pH 2,1, não obtendo sucesso. Formou-se a hipótese de que as antocianinas estariam se ligando irreversivelmente à parede do capilar, uma vez que possuem carga positiva, enquanto os grupos silanóis presentes na parede interna do capilar são carregados negativamente. Dessa forma, foi proposto a adição de uma espécie que se ligasse a parede interna do capilar e permitisse o fluxo livre das antocianinas.

Tendo como base o trabalho de BICARD; FOUGEROUSSE; BROUILLARD (1999), optou-se pelo uso do CTAB, uma vez que essa substância satisfaz as condições mencionadas, mas ainda assim nenhum sinal foi detectado. Este resultado levantou questões, já que o artigo citado se mostrou eficiente em promover a separação esperada. Contudo, o trabalho em questão foi realizado com padrões de algumas antocianinas monossubstituídas, o que provavelmente não é o único caso em matrizes complexas como extrato vegetal. Além disso, o tamanho das antocianinas também influencia na sua capacidade de detecção por CZE, uma vez que espécies maiores já possuem naturalmente uma mobilidade eletroforética menor, e que em pH fortemente ácido o fluxo eletrosmótico também é reduzido.

O fluxo eletrosmótico é o movimento de líquido em um capilar carregado eletricamente impulsionado por uma diferença de potencial elétrico aplicada. Esse fenômeno é geralmente observado em pH neutro a levemente ácido, onde a maioria das espécies iônicas apresenta mobilidade eletroforética significativa (BICARD; FOUGEROUSSE; BROUILLARD, 1999).

Em soluções ácidas, o excesso de íons  $H^+$  resulta em uma alta concentração de íons  $H_3O^+$ , que torna o meio altamente condutor. Como resultado, a mobilidade eletroforética de outras espécies iônicas, como íons de amostra, é reduzida significativamente devido à forte interação eletrostática entre esses íons e os íons  $H_3O^+$  (BICARD; FOUGEROUSSE; BROUILLARD, 1999).

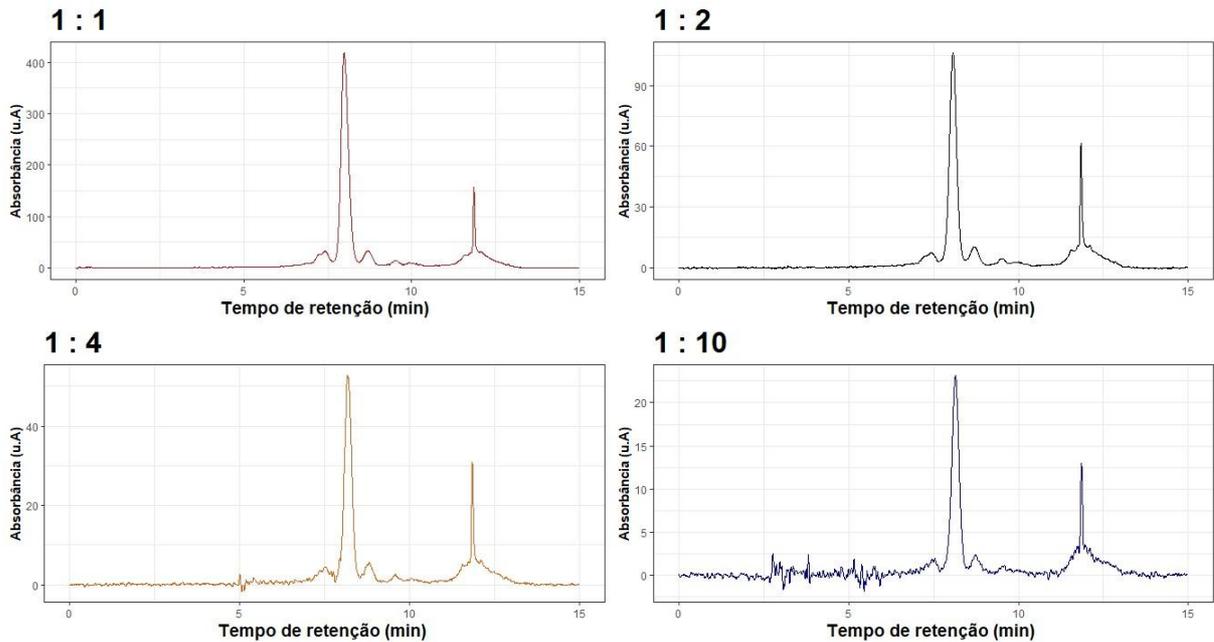
Além disso, em pHs muito ácidos, o excesso de íons  $H^+$  pode levar à hidrólise de muitos compostos iônicos, resultando em mudanças na carga líquida efetiva desses compostos. Essas mudanças de carga afetam ainda mais a mobilidade eletroforética e diminuem a eficácia do fluxo eletrosmótico (BICARD; FOUGEROUSSE; BROUILLARD, 1999).

Portanto, em soluções com pH muito ácido, as baixas mobilidades eletroforéticas das espécies iônicas e as mudanças na carga líquida efetiva limitam ou eliminam completamente o fluxo eletrosmótico observado em pHs mais neutros. Dessa forma, moléculas de antocianinas maiores podem não possuir mobilidade eletroforética forte o suficiente para migrar pelo capilar e chegar ao detector.

#### 5.4 RESULTADOS DO MÉTODO DE SEPARAÇÃO: CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Após a liofilização, os extratos foram solubilizados em água e avolumados em um balão de 5 mL, anterior a injeção foram centrifugados à 8000 rpm por 3 minutos, sendo posteriormente filtrados com microfiltro de 22  $\mu$ m. Nesse momento tomou-se uma das amostras, extraídas com 100% de água para determinar qual diluição apresentaria a melhor relação visual entre sinal ruído de modo que não comprometesse a detecção das antocianinas minoritárias nas análises subsequentes. A **Figura 8** ilustra os resultados dos testes de diluição, tendo sido eles realizados com diluições nas proporções 1:10, 1:4, 1:2 e sem diluição.

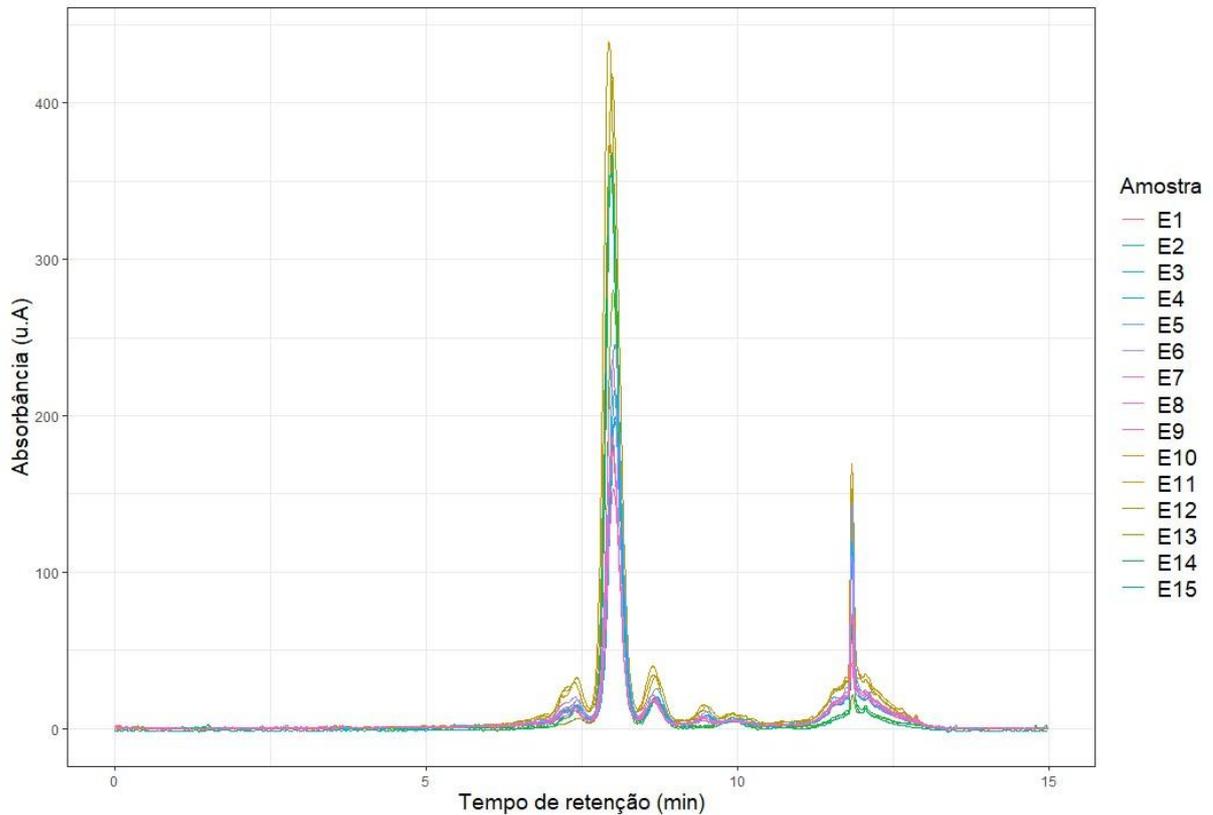
**Figura 8** - Cromatogramas para a proporção de diluição da amostra.



**Fonte:** Elaborado pelo autor (2024).

Como é possível notar, a injeção sem qualquer diluição no extrato foi a que apresentou melhor clareza na visualização dos picos e melhor estabilidade da linha base, uma vez que em pontos com diluição maior os picos menos expressivos se confundem com ruídos da linha base prejudicando a avaliação do perfil estudado. Por esse motivo, ficou determinado que as análises dos 15 extratos realizados de acordo com o PM seriam feitas sem nenhuma diluição adicional. É mostrado na **Figura 9** os cromatogramas sobrepostos para as análises realizadas.

**Figura 9** - Cromatogramas sobrepostos para o planejamento de mistura e suas réplicas.



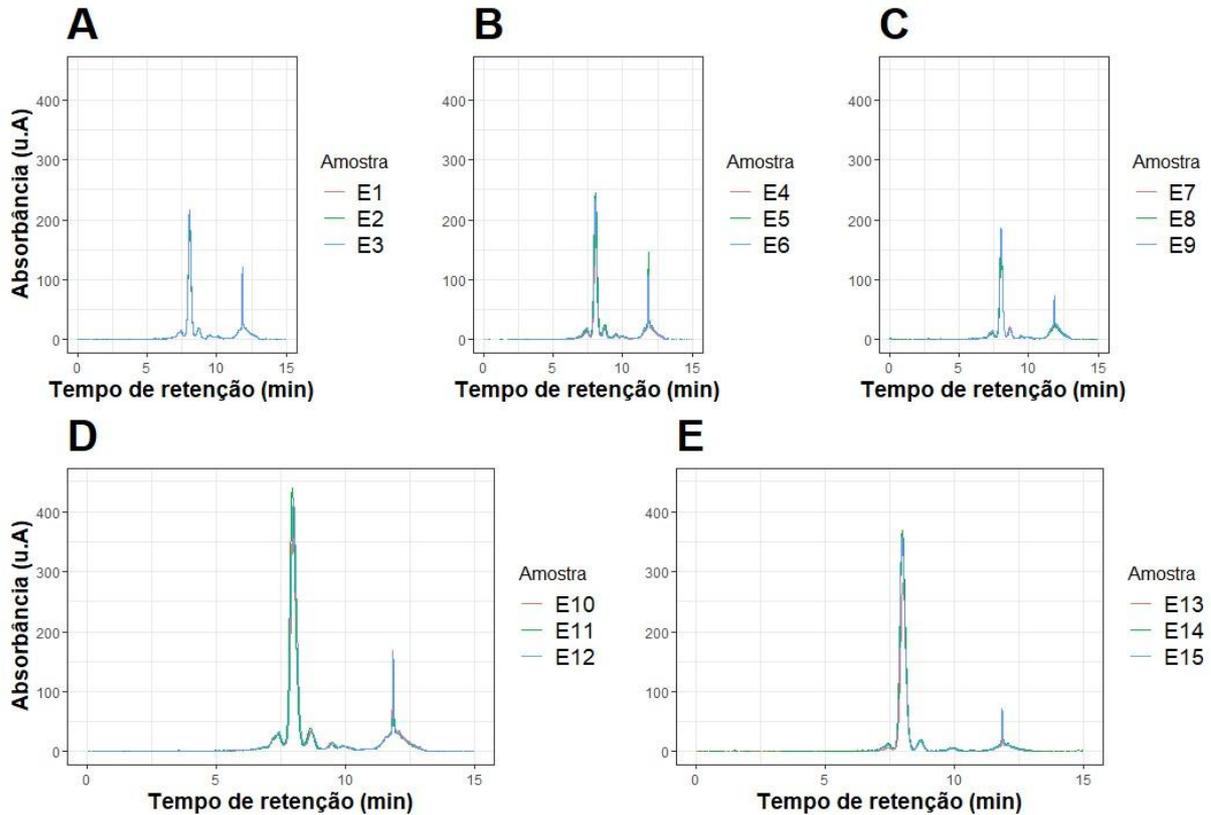
**Fonte:** Elaborado pelo autor (2024).

É possível observar pela imagem cinco picos evidentes, tendo o majoritário tempo de retenção de 7,497 minutos. Além dele, é possível observar a detecção de outros quatro compostos minoritários que apresentam um perfil cromatográfico algumas vezes distorcido, o que pode ser justificado pela baixa concentração desses analitos nos extratos. Além disso, os resultados evidenciam boa reprodutibilidade do método em termos de tempo de retenção. É notável baixa variação horizontal entre os cromatogramas, reforçando que o método cromatográfico escolhido é adequado para a análise proposta de antocianinas. Contudo, vale reforçar que o trabalho de referência fez uso de uma coluna com dimensões diferentes da coluna utilizada nesse estudo. Essa diferença no tamanho da coluna pode ter comprometido a eficiência na separação dos analitos e a estabilização do formato de pico usual para alguns dos sinais detectados. Apesar disso, os cromatogramas obtidos apresentaram resolução entre picos suficiente para um bom prosseguimento das análises propostas.

Ademais, é possível observar mudanças significativas nas alturas e, conseqüentemente, nas áreas dos picos obtidos. Essa é uma variação esperada, tendo em vista que diferentes soluções extratoras proporcionam teores de antocianinas diferentes, o que é evidenciado por

essas alterações. Ainda dentro dos níveis, como é possível verificar nos gráficos da **Figura 10**, essas variações são menores, mas ainda expressivas.

**Figura 10** - Cromatogramas por nível do PM.



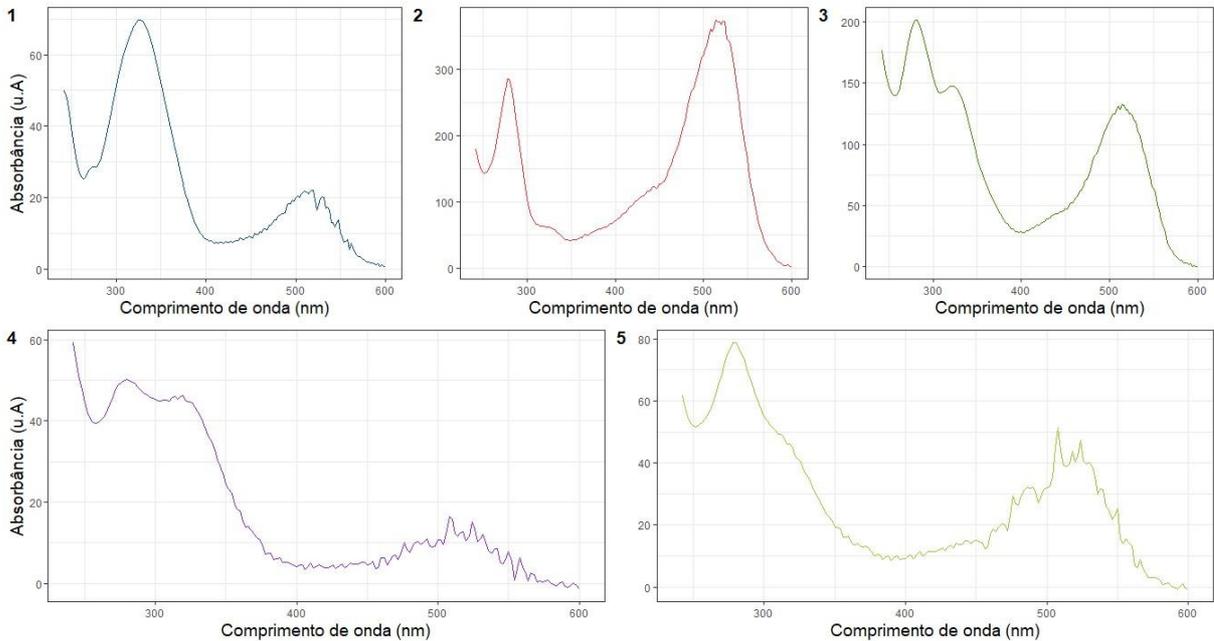
Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

A **Figura 10** foi dimensionada para que todos os grupos ficassem na mesma escala. Desse modo, podemos ver de forma clara que a condição de extração D apresentou sinais mais intensos de absorção. Ainda no que tange as variações das áreas, podemos ver que dentro dos níveis existem diferentes graus de variação, o que também é esperado por se tratar de uma matriz complexa em réplicas autênticas. Tais variâncias serão discutidas e tratadas estatisticamente na próxima sessão.

Uma vez determinado o perfil cromatográfico das amostras, podemos prosseguir para uma avaliação aprofundada sobre a natureza de cada um dos compostos. Tal análise só é possível pois a separação física dos constituintes permite uma avaliação espectral de cada uma das espécies individualmente, o que justifica o uso de uma técnica de separação. Durante a detecção no método cromatográfico foi adquirido também o espectro de varredura contínuo

para todos os picos pelo DAD. Na **Figura 11** podemos ver em detalhes os cinco espectros UV-Vis obtidos para as substâncias detectadas.

**Figura 11** - Espectros individuais para as espécies detectadas.



**Fonte:** Elaborado pelo autor (2024).

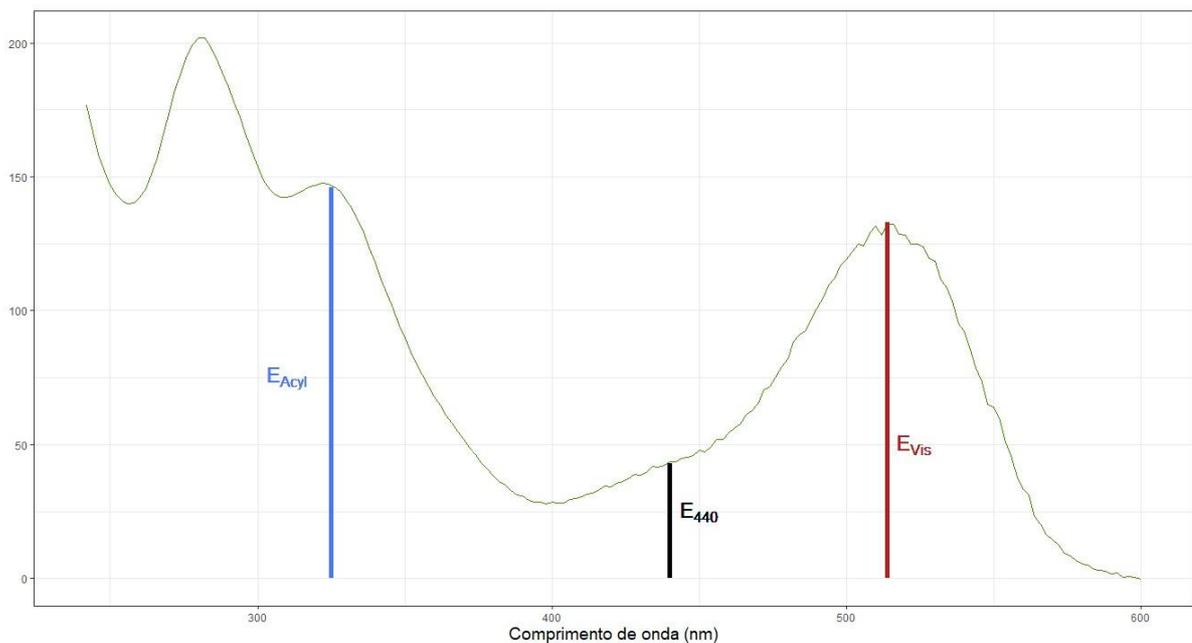
É importante notar que os espectros acima possuem intensidades diferentes e suas escalas foram ajustadas de forma que permitissem uma boa visualização do perfil encontrado. Ademais, essa diferenciação de intensidades mostra que o uso do espectro do extrato para determinação do teor total de antocianinas, que é uma prática comum, acontece ao custo de informações valiosas sobre o perfil real de antocianinas no sistema. Cada antocianina possui características e aplicações diferentes que não podem ser ignoradas.

Em relação à **Figura 11**, podemos notar três grupos com máximos de absorção de intensidades diferentes, um deles próximo a 280 nm, outro na região de 340 nm e, por fim, outro máximo na região de 520 nm. O primeiro e o último são máximos de absorção comuns a todas as antocianinas, sendo o último responsável pela coloração vermelha característica. Como podemos notar, o segundo máximo de absorção está presente em 4 dos 5 picos, porém não é evidente no segundo espectro. Esse máximo de absorção, entre 310 e 340, está fortemente associado a natureza do substituinte ligado à antocianina, sendo mais evidentes em antocianinas com substituintes acilados e pouco evidentes ou não existentes em antocianinas não aciladas. Dessa forma, podemos dizer que o espectro referente ao segundo pico provavelmente se trata

de uma espécie de antocianinas que não possui grupos acilados nos seus substituintes (SAHA et al., 2021).

Além de informações sobre as acilações dos substituintes é possível obter mais informações a respeito das estruturas. Entre 400-450 nm, por exemplo, existe um pequeno máximo local com o qual é possível inferir sobre o número de açúcares ligados à unidade de antocianinas. De modo geral, o espectro UV-Vis das antocianinas fornece informações importantes sobre as estruturas químicas das espécies, que podem ser inferidas a partir de valores de absorvância em regiões específicas, sendo  $E_{440}$  o valor de absorvância em 440 nm, normalmente ocorrendo como um pequeno “ombro” nessa região,  $E_{acyl}$  o valor de absorvância entre 310 e 340 nm e  $E_{vis}$  o máximo de absorção na região do visível. A **Figura 12** mostra as regiões citadas, enquanto a **Tabela 5** traz as principais razões entre esses termos para os espectros das espécies encontradas nos extratos estudados (SAHA et al., 2021)

**Figura 12** - Máximos de interesse no espectro UV-Vis das antocianinas.



**Fonte:** Elaborado pelo autor (2024).

Em resumo essas regiões permitem obter informações sobre a quantidade açúcares nos substituintes e as suas posições pela razão  $E_{440}/E_{vis}$ , além do nível de acilação e possíveis informações sobre isômeros geométricos através da razão  $E_{Acyl}/E_{vis}$ .

**Tabela 5** - Razões entre os máximos espectrais característicos das antocianinas.

Pico	$E_{440}/E_{vis}$	$E_{Acyl}/E_{vis}$	Grupos acilados	$\lambda_{max}$ Vis
1	0,41	3,17	$\geq 2$	520
2	0,29	0,15	0	520
3	0,35	1,12	2	514
4	0,32	2,81	$\geq 2$	508
5	0,23	1,04	2	508

**Fonte:** Elaborado pelo autor (2024).

A razão  $E_{440}/E_{vis}$  permite inferir a presença de um monossídeo como substituinte na unidade aglicona de antocianinas quando essa proporção varia entre 29-35%. Esse valor geralmente tem como base medições feitas em MeOH. O aumento da polaridade do solvente causa um aumento da razão, ao mesmo tempo que diminui a intensidade do máximo de absorção global localizado na região do visível ( $\lambda_{max}$  Vis). A partir dessas informações podemos sugerir que os picos 2, 3 e 4 aparentam ser monossídeos (PÉREZ-GREGORIO et al., 2010).

Uma vez que o aumento do grau de metilação causa deslocamento do máximo de absorção para comprimentos de onda menores, chamado de efeito hipsocrômico, é possível sugerir que o pico 3, por apresentar um  $\lambda_{max}$  Vis de 514 nm, seja derivado da cianidina ou peodina. Para o pico 4, esse máximo ocorre em 508 nm, o que indica que essa espécie possa ser derivada da perlagodina. Para o pico 2, o máximo acontece muito próximo a 520 nm, indicando a possibilidade de este ser derivado de malvidina ou cianidina (FOSSEN et al., 1996).

A razão característica de um biosídeo, junto ao máximo de absorção deslocado para 508 nm e a baixa absorvidade na região do visível indica que o pico 5 possa ser um derivado diglicosilado da perlagodina. Enquanto o pico 1 apresenta uma razão pouco característica dentre as antocianinas, um valor alto dessa razão sugere se tratar de um derivado de perlagodina ou de uma cianidina com duas substituições, sendo uma delas na posição 4 do anel C (FOSSEN; SLIMESTAD; ANDERSEN, 2003).

Em relação ao grau de acilação, com base nos dados da **Tabela 5**, existe indicativos para dizer que os picos 3 e 5 possuam duas acilações. Sendo o pico 3 mono-glicosilado, ambos agrupamentos acil se encontram ligados a uma única unidade de açúcar, enquanto para o pico 5 é possível que a antocianidina correspondente esteja ligada a dois açúcares acilados. Os picos 1 e 4 parecem ter mais de dois grupos acil ligados à sua estrutura, porém é possível que a baixa concentração nos extratos deturpe os resultados da análise. Finalmente, o pico 2, referente à antocianina majoritária, aparenta não ter acilações em sua estrutura, sendo substituído somente

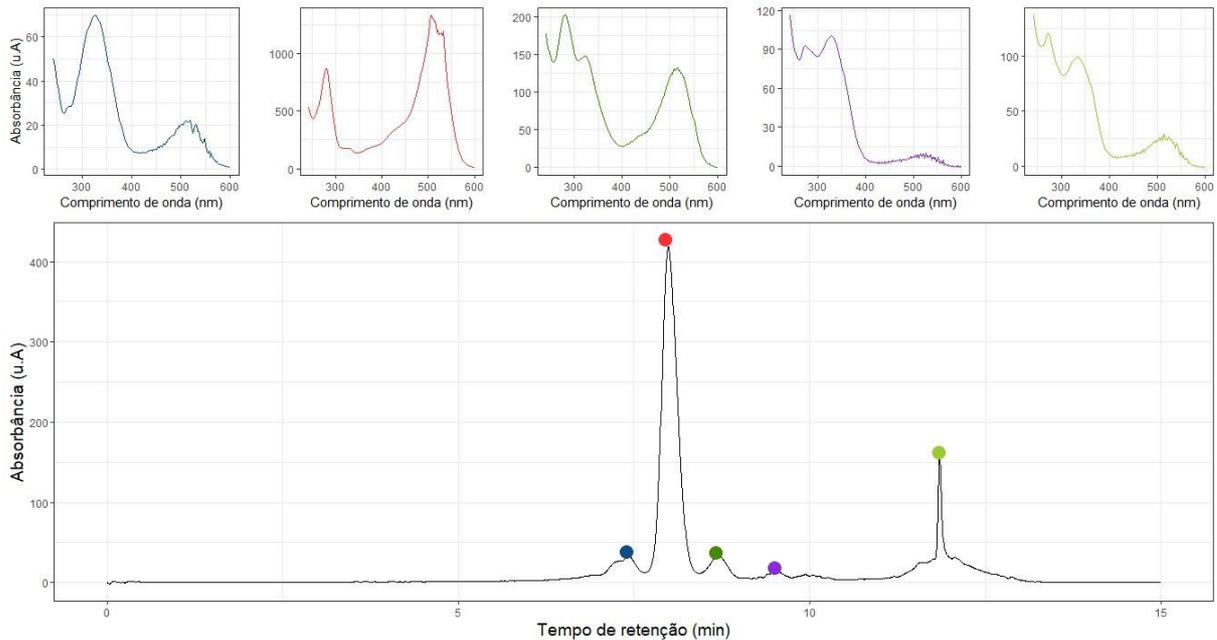
com um glicosídeo. Essa informação associada ao valor da razão  $E_{440}/E_{vis}$  sugere que essa espécie seja de fato a cianidina-3-glicosídeo (C3G), uma vez que os valores encontrados são característicos dessa substância (FOSSSEN et al., 1996).

A C3G é uma das antocianinas mais comumente encontradas em frutos. A sua alta disponibilidade motivou uma grande quantidade de estudos sobre as suas aplicações. É reportado que essa espécie pode aliviar os efeitos da doença de Alzheimer e melhorar funções cognitivas, além de reduzir inflamações e aumentar a capacidade antioxidante atenuando a fosforilação de proteínas e a apoptose neural, podendo ainda aumentar a autofagia e plasticidade neural (BAEK et al., 2023). Outros estudos mostram que a espécie reconhecidamente possui atividade quimiopreventiva e quimioterápica (DING et al., 2006). Resultados que mostram a inibição do crescimento de células tumorais (CHEN et al., 2005), incluindo a inibição da migração de células pulmonares cancerígenas em humanos (CHEN et al., 2006), também podem ser encontrados. Por fim, as propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes da substância podem ter efeitos positivos no intestino (TAN et al., 2019).

As principais fontes de C3G são amoras, framboesas, jaboticabas, açaí, mirtilo e groselha preta (DING et al., 2006), fazendo do capim-elefante uma fonte promissora para a extração dessa espécie de antocianina, por possuir um alto potencial produtivo e maior custo-benefício associado em frente às outras fontes citadas.

Além disso, as espécies minoritárias das antocianinas também podem possuir propriedades terapêuticas ou tecnológicas de interesse comercial e acadêmico. A **Figura 13** traz uma visão geral do perfil cromatográfico e os espectros relativos a cada um dos picos.

**Figura 13** - Perfil cromatográfico e os espectros relativos a cada um dos picos.

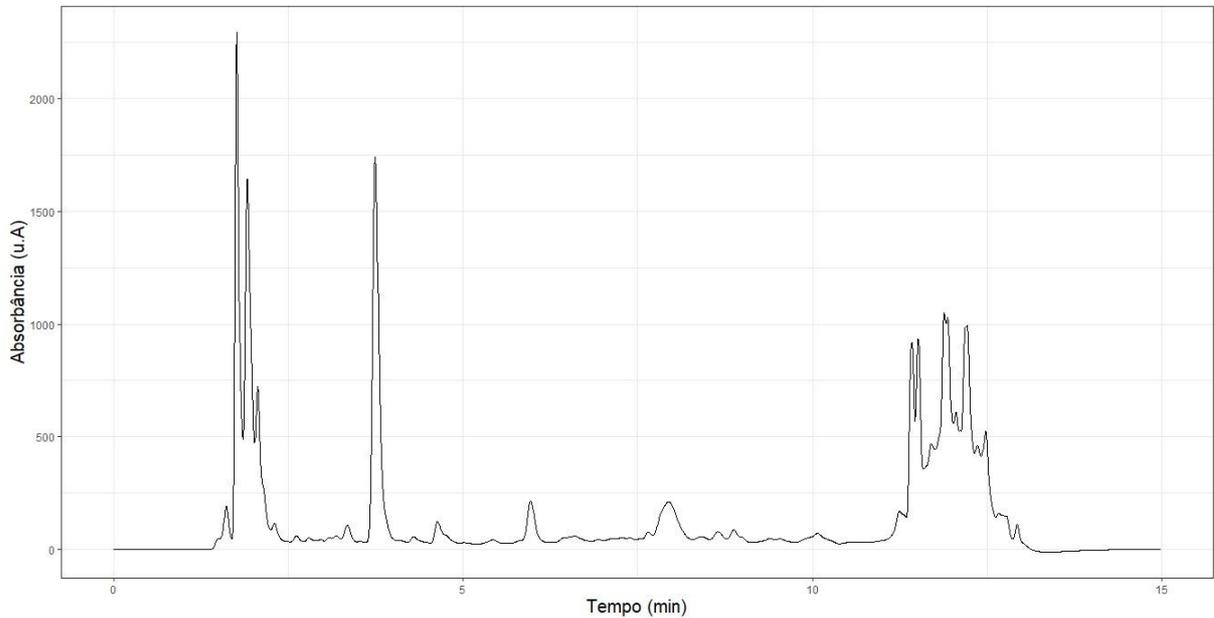


**Fonte:** Elaborado pelo autor (2024).

É importante destacar que a espectrofotometria UV-Vis fornece somente uma identificação parcial e preliminar das espécies presentes nos extratos. Enquanto a mesma possui certo grau de confiabilidade em alguns aspectos, a similaridade entre os espectros de algumas espécies faz com que essa técnica não possa ser usada de forma inequívoca. Valores semelhantes para as razões destacadas acima, associados a erros de medições e erros instrumentais podem ocasionar falsa identificação dos picos. Dessa forma, se faz necessário técnicas de detecções mais robustas como complemento para esse trabalho e identificação definitiva dos compostos, como por exemplo a espectroscopia de massas.

Para finalizar a discussão, com o fim de ilustrar a complexidade química presente no extrato de capim-elefante estudado, adiciono na **Figura 14** um cromatograma do extrato E12, obtido em 250 nm.

**Figura 14** - Cromatograma do extrato E12 obtido em 250 nm.



**Fonte:** Elaborado pelo autor (2024).

Nesse cromatograma foram identificados, pela integração automática do *software*, 46 picos distintos, mostrando que a matriz vegetal estudada possui grande potencial acadêmico e tecnológico relacionado aos fitoquímicos passíveis de extração. Vale dizer que, esse número citado se refere somente a compostos obtidos a partir de extrações hidroalcólicas, de forma que compostos com maior grau de apolaridade não fazem parte desse recorte. Por fugir do escopo do trabalho proposto, esse tema não foi aprofundado no presente momento, porém é importante destacar as potencialidades envolvidas nessa área de estudo. Por fim, vale destacar que, como pode ser visto na **Figura 14**, a região entre 10 min e 12,5 min possui uma alta densidade de picos, o que pode ser o fator pelo qual o pico 5 possua uma tendência de linha e perfil cromatográfico pouco usual.

#### 5.4 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE ANTOCIANINAS DO CAPIM-ELEFANTE COM PLANEJAMENTO DE MISTURAS

Mostrado o perfil geral de antocianinas presentes nos extratos de capim-elefante, podemos prosseguir nossa análise lançando mão do PM para construir um modelo de regressão que permita estimar a proporção ótima entre água e EtOH, fornecendo a melhor condição de extração do material estudado. Inicialmente, é necessário definir qual será a medida a ser usada como nossa variável de resposta *y*. Idealmente, como o objetivo da extração é maximizar o teor

de antocianinas extraídas, a concentração de antocianinas se apresenta como uma escolha razoável. Porém, o presente trabalho possui um grau superior de desafio, tendo em vista que não é possível a quantificação nominal das espécies estudadas devido à ausência de padrões analíticos necessários para a realização desse procedimento.

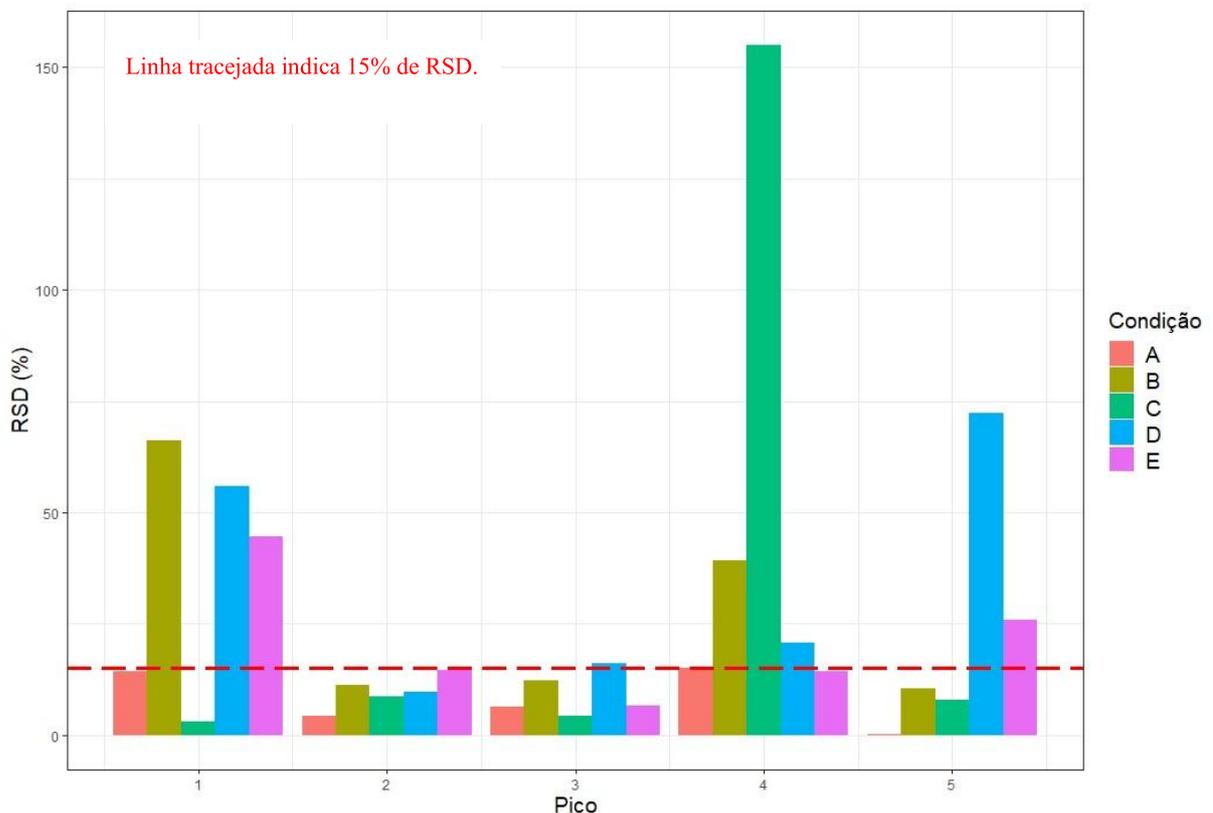
Uma vez que, até o momento da elaboração desse texto as antocianinas presentes nos extratos hidroalcoólicos de capim-elefante não foram formalmente identificadas na literatura, nos deparamos com uma vasta gama de possibilidades de padrões analíticos a serem comprados, o que obviamente é inviável em termos econômicos. Os resultados da sessão anterior filtram e minimizam os possíveis padrões a serem adquiridos para fins da quantificação, contudo como já discutido, o resultado anterior não é definitivo, o que poderia ocasionar quantificações errôneas. Ao mesmo tempo, os resultados desse trabalho foram obtidos ao final do processo de estudo, o que impossibilitaria a quantificação das espécies em tempo hábil.

Pelas razões supracitadas, decidiu-se tomar  $y$  como uma medida semiquantitativa, sendo a área dos picos encontrados a melhor estimativa para a concentração formal dos analitos nos extratos, uma vez que para comprimentos de onda fixos, a área da curva que define o pico de cada analito detectado é diretamente proporcional a sua concentração. O valor da área foi calculado automaticamente pelo *software* no modo de integração Agile 2. Essa abordagem não permite dizer o quanto de cada antocianina está presente no extrato, porém é possível dizer com alto grau de confiabilidade qual extrato possui o maior teor de antocianina, além de determinar a proporção relativa entre as espécies.

A proposta inicial para esse estudo de otimização, seria usar a soma das áreas de todas as antocianinas encontradas. Contudo ao se analisar os dados, observamos a presença natural de variações das áreas medidas entre réplicas do mesmo nível amostral. Além de erros aleatórios associados a cada parte do processo, desde a coleta, até erros instrumentais no momento da detecção, também existem erros intrínsecos ao processo de análise de extratos de materiais vegetais tendo em vista que cada uma das réplicas trata-se de materiais diferentes e as extrações foram feitas de forma autêntica. Dessa forma, essas variações são razoáveis e esperadas. Somado a isso, também existem erros inerentes ao processo de extração, uma vez que extrações possuem um intervalo de eficiência que individualiza cada um dos extratos. Em resumo, cada extrato é único, com material vegetal de características únicas e processo de extração individualizado, porém o formalismo matemático associado a construção dos modelos de regressão requer a aproximação onde consideramos todos os extratos como partindo da mesma fonte vegetal, o que explica e justifica as variações encontradas.

Não existe na literatura uma normatização específica para lidar com o problema elaborado acima. Dessa forma, decidiu-se tomar um desvio padrão relativo (RSD, do inglês, *Relative Standard Deviation*) de 15% como o ponto de corte para uma boa reprodutibilidade entre as áreas. Essa decisão foi respaldada pela RDC N° 27 de 2012 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e pela *Bioanalytical Method Validation Guidance* de maio de 2018 da agência de controle americana FDA (do inglês, *Food and Drugs Administration*) (ANVISA, 2012; FDA, 2018). É importante considerar que ambas as diretrizes são definidas para amostras bioanalíticas e não para plantas especificamente, porém devido à complexidade das duas matrizes, é a que melhor se aproxima do desafio enfrentado. Na **Figura 15** podemos ver os RSD para cada um dos 5 picos nos 5 níveis amostrais propostos.

**Figura 15** - RSD para os sinais cromatográficos nos níveis experimentais.

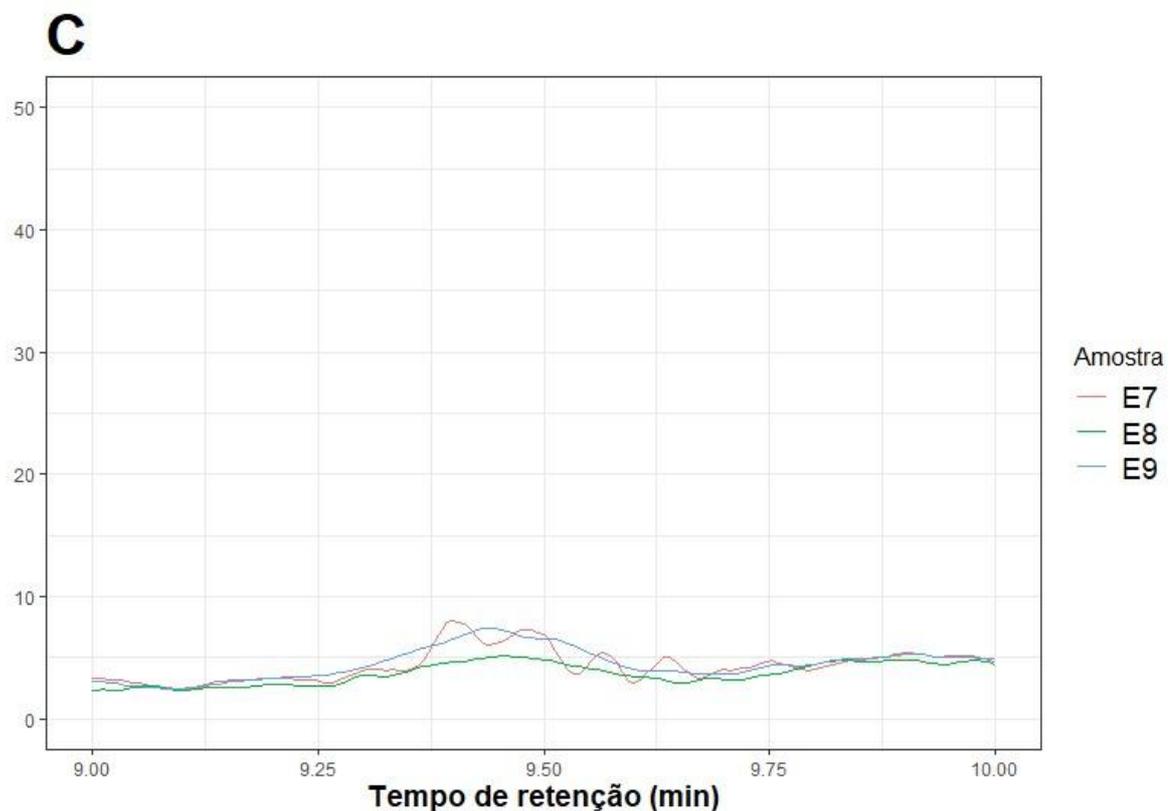


**Fonte:** Elaborado pelo autor (2024).

A linha vermelha tracejada no gráfico anterior mostra o limite de 15% anteriormente estabelecido. Dessa forma, podemos notar que os picos 1, 4 e 5 possuem valor de RSD excessivamente elevados para determinadas réplicas, tornando inviável o uso de suas áreas para a construção do modelo de regressão. Essa variabilidade pode ser justificada por serem picos

com menor valor absoluto de área registrada, sendo mais propensos a sofrer variações causadas pelo ruído instrumental. Além disso, picos com menores áreas possuem maior sensibilidade a variações pequenas em relação à média amostral do grupo, tendo em vista que o RSD é uma medida relativa e não absoluta. É possível notar um valor anormal para o pico 4 no ponto amostral C (Água:EtOH - 50:50). Esse ponto, em média, foi o que apresentou a menor expressividade de área dentre os pontos experimentais estudados, o que corroborando com os motivos previamente citados, resulta em uma variação maior. Contudo, a fim de entender o motivo de um valor tão discrepante dos demais, fez-se uma averiguação mais aprofundada desse pico nos cromatogramas correspondentes, sendo o perfil mostrado na **Figura 16**. Nesse perfil podemos observar que para uma das réplicas, amostra E7, o pico 4 não foi integrado, uma vez que é impossível distinguir o sinal cromatográfico de ruídos da linha base. As tabelas com as médias amostrais de cada nível e o seu respectivo RSD se encontra no material suplementar.

**Figura 16** – Destaque no pico 4 para réplicas do ponto experimental C.



**Fonte:** Elaborado pelo autor (2024).

Ainda considerando o gráfico da **Figura 15**, temos que os picos 2 e 3 atendem ao critério estabelecido. A partir de agora a variável resposta do modelo,  $y$ , passa a ser definida como a

soma dos picos 2 e 3 dos cromatogramas de cada uma das amostras. Após a definição, tornou-se possível o início do cálculo do modelo de regressão. Fundamentado no princípio da parcimônia, inicialmente foi ajustado um modelo linear aditivo e, em seguida, um modelo quadrático, para buscar entender o sistema estudado. Os dados utilizados para a construção desses modelos e dos que serão posteriormente citados estão na **Tabela 6**, sendo  $x_1$  e  $x_2$  as variáveis experimentais proporção de água e de EtOH, respectivamente; e  $y$  a soma das áreas dos picos 2 e 3.

**Tabela 6** - Dados para a construção dos modelos de PM.

Condição	Amostra	$x_1$	$x_2$	$y$
A	E1	1,0	0,0	3487,95
A	E2	1,0	0,0	3293,80
A	E3	1,0	0,0	3497,03
B	E4	0,8	0,2	3292,90
B	E5	0,8	0,2	4104,00
B	E6	0,8	0,2	3870,35
C	E7	0,5	0,5	2894,47
C	E8	0,5	0,5	2599,99
C	E9	0,5	0,5	3058,01
D	E10	0,2	0,8	6195,34
D	E11	0,2	0,8	7543,16
D	E12	0,2	0,8	7097,23
E	E13	0,0	1,0	4550,80
E	E14	0,0	1,0	5952,12
E	E15	0,0	1,0	5766,10

**Fonte:** Elaborado pelo autor (2024).

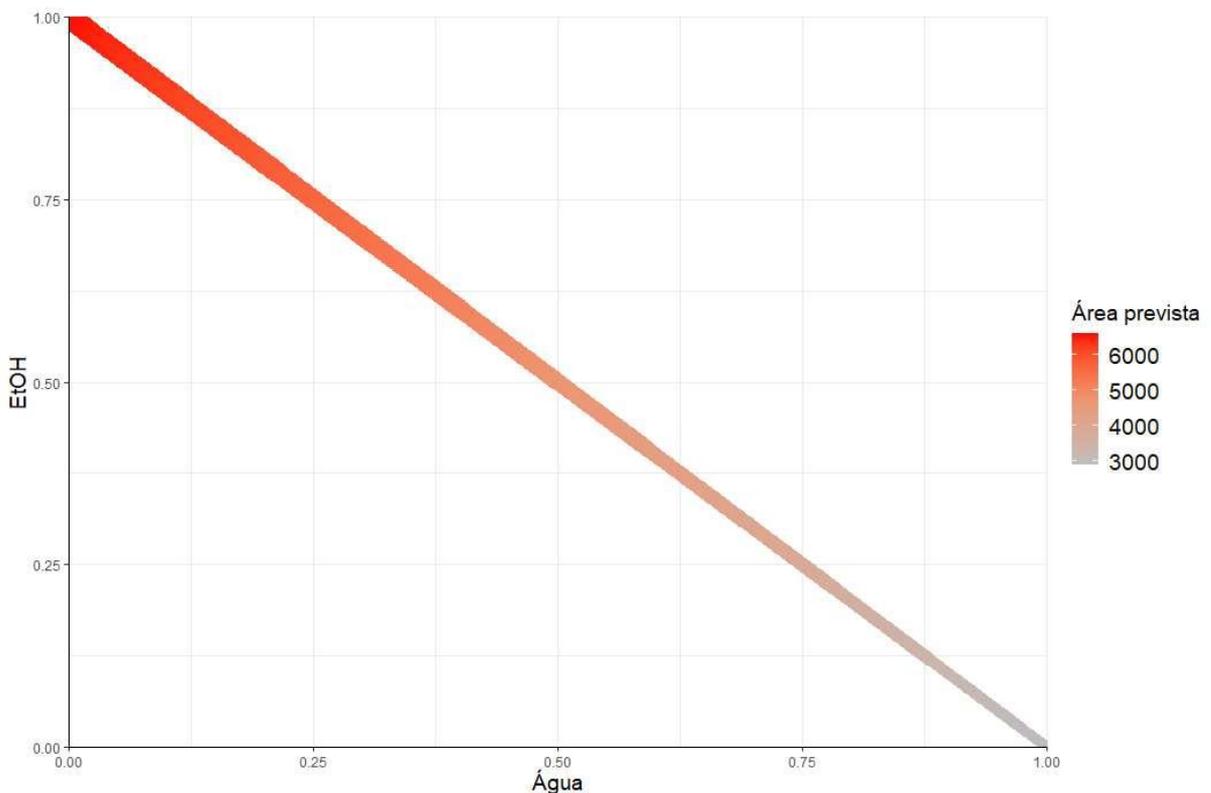
Como pressuposto para a construção de um modelo de regressão paramétrico é necessário a verificação da normalidade dos dados da variável resposta. Isso foi feito através do teste de Shapiro-Wilk que retornou um p-valor de 0,065. Portanto a hipótese nula é rejeitada e assume-se a normalidade dos dados testados.

Assim, o modelo linear resultou na **Equação 6**:

$$y' = 3042,6(\pm 532,6)x_1 + 5917,9(\pm 532,6)x_2 \quad (6)$$

Ambos os coeficientes do modelo linear foram considerados significativos, o que quer dizer que alterações tanto na proporção de água quanto na proporção do EtOH influenciam de forma importante na área projetada pelo modelo. Apesar da significância, o modelo não representa bem o sistema estudado, uma vez sugere que o aumento contínuo da proporção de EtOH resulta em maiores teores de antocianinas. As projeções para o modelo podem ser vistas na **Figura 17**. Verificou-se a presença de falta de ajuste no modelo resultando em um  $F_{cal}$  de 21,802 frente a um  $F_{tab}$  de 8,23. A falta de ajuste pode ser verificada e observada no gráfico de resíduos na **Figura S1** no material suplementar.

**Figura 17** - Previsões para valores de área teórica pelo modelo linear.



**Fonte:** Elaborado pelo autor (2024).

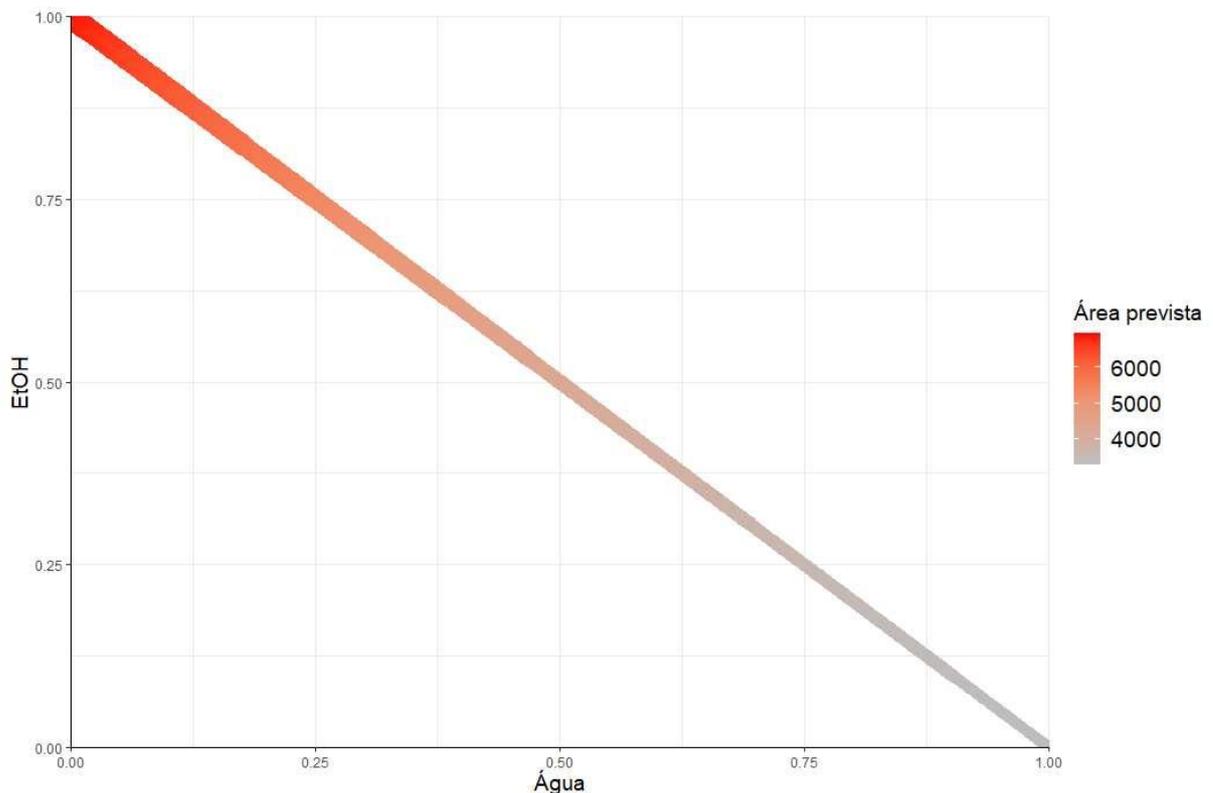
O modelo linear projeta áreas menores para altas concentrações de água e o aumento progressivo da área com o aumento da quantidade de EtOH. Esse modelo não considera as interações entre os dois solventes e o efeito que isso iria proporcionar à extração. Dessa forma, os valores para condições experimentais com alta quantidade de água são subestimados, enquanto o efeito da adição de EtOH é superestimado.

Frente a ineficiência do modelo linear em representar o sistema estudado também foi construído um modelo quadrático. Este apresenta um termo de interação cruzada  $x_1x_2$  que pode indicar efeitos sinérgicos ou antagônicos entre os componentes da mistura proposta. O modelo quadrático resultou na **Equação 7**:

$$y' = (3344,1 \pm 654,2)x_1 + (6219,4 \pm 654,2)x_2 - (2644,9 \pm 3244,5)x_1x_2 \quad (7)$$

Para o modelo quadrático somente os coeficientes lineares foram considerados significativos, de forma que nenhum efeito antagônico ou sinérgico foi considerado importante para a descrição matemática do sistema. Porém, a descrição prevista também não é fiel a realidade uma vez que a falta de ajuste resultou em um  $F_{cal}$  de 30,72 frente a um  $F_{tab}$  de 5,46. Na **Figura 18** podemos ver as previsões feitas pelo modelo quadrático

**Figura 18** - Previsões para valores de área teórica pelo modelo quadrático.



**Fonte:** Elaborado pelo autor (2024).

O modelo quadrático falha em capturar a interação real entre os componentes da mistura estudada, porém em diferença frente ao modelo linear, esse novo modelo causa uma atenuação

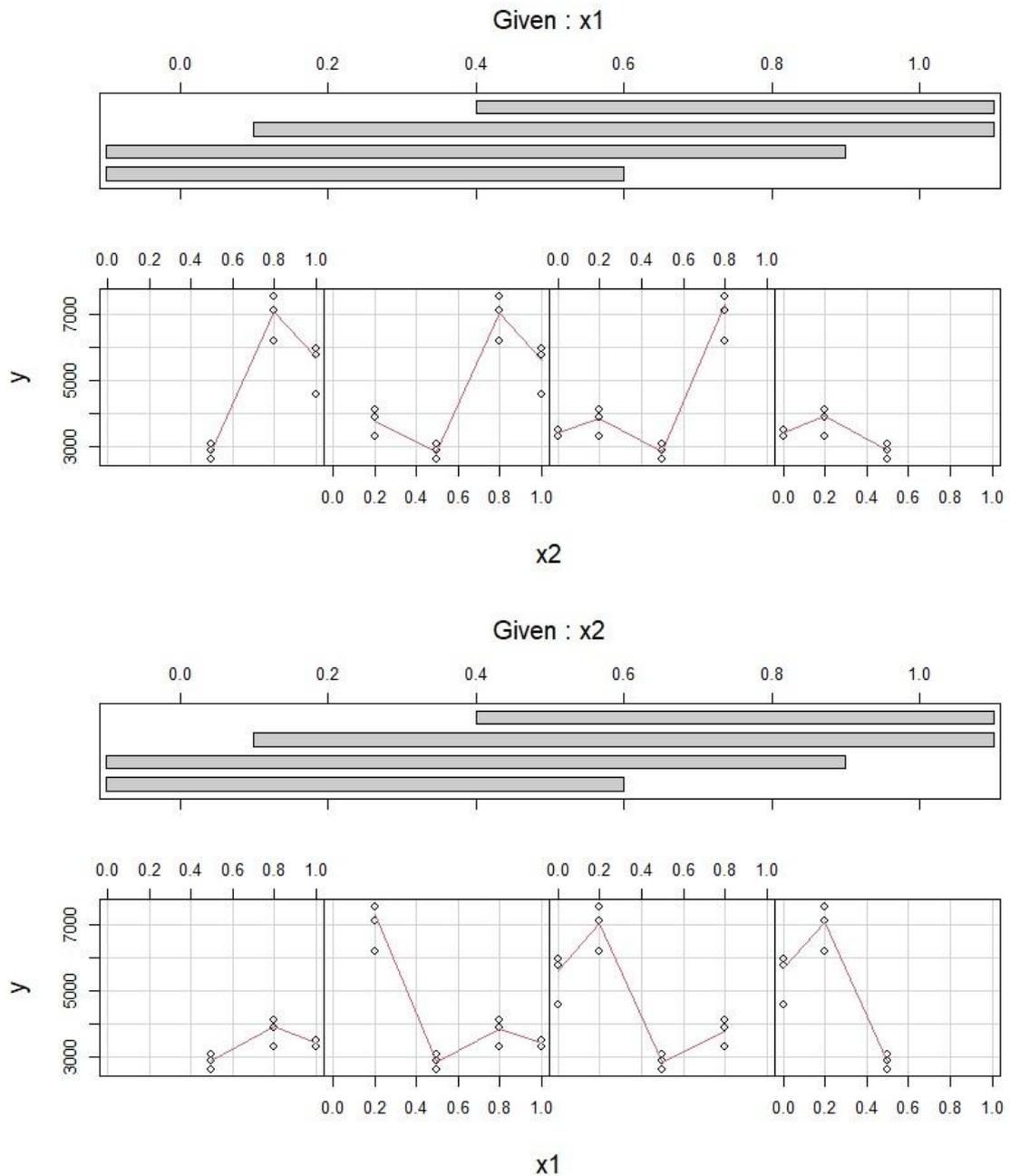
na influência do EtOH na área projetada. De toda forma, o perfil de evolução da resposta projetada é bastante similar ao proposto pelo modelo linear, uma baixa área para as soluções com maior teor de água e um aumento contínuo com o incremento da quantidade de EtOH, sendo em ambos os casos o máximo previsto para a condição com 100% de EtOH. O gráfico de resíduos para esse modelo também pode ser visto na **Figura S2** do material suplementar.

Os resultados encontrados mostram que as regressões propostas sob a premissa de um PM não foram o suficiente para capturar os nuances da extração proposta. Ficou nítido pela falta de significância do coeficiente de interação cruzada do modelo quadrático que a abordagem de uma regressão linear não consegue emular a interação dos solventes envolvidos na solução extratora com as antocianinas do material vegetal. Devido à falta de ajuste evidente os modelos de regressão encontrados com o PM não podem ser utilizados para realizar previsões.

Os resultados aqui mostrados, porém, ainda possuem valores qualitativos e exploratórios e mostram que dentre os pontos estudados aquele com a proporção 20:80 Água:EtOH é o que fornece a maior eficiência de extração de antocianinas. Por fim, para melhor a descrição matemática do sistema estudado, modelos mais complexos devem ser considerados, incluindo regressões polinomiais que deem um efeito maior à interação cruzada entre as duas variáveis experimentais.

Para a utilização de modelos polinomiais mais complexos é necessário primeiro entender a relação entre a variável de resposta  $y$  e cada uma das variáveis explicativas,  $x_1$  e  $x_2$ . Para isso, por se tratar de um sistema bivariado, cada uma das variáveis explicativas foram fixadas em intervalos pré-definidos enquanto o efeito da outra variável foi observado de forma individual. Os resultados dessa análise estão na **Figura 19**.

**Figura 19** - Gráfico de efeito individuais para as variáveis explicativas.



**Fonte:** Elaborado pelo autor (2024).

Como pode ser observado, em nenhum dos intervalos observados a relação entre a resposta e as variáveis explicativas é estritamente linear, dessa forma se faz necessário a inserção de termos de ordem superior na elaboração do modelo. Para isso devemos levar em conta a ordem dos termos individuais além da ordem e tipo de interação cruzada. Portanto chegamos a 3 possíveis modelos:

O modelo 1 é definido pela equação 8 a seguir, este modelo é essencialmente o modelo quadrático do planejamento de misturas com a inserção do termo de segunda ordem nos termos das componentes individuais do sistema.

$$y' = b_0 + b_1x_1^2 + b_2x_2^2 + b_{12}x_1x_2 \quad (8)$$

Para o modelo 2, na equação 9, temos os termos individuais e o termo de interação cruzada como sendo de segunda ordem. Enquanto para o modelo 3, mostrado na equação 10, temos os termos individuais de primeira ordem, sendo os termos de segunda ordem colocados de forma alternada nos termos referentes as interações cruzadas do sistema.

$$y' = b_0 + b_1x_1^2 + b_2x_2^2 + b_{12}x_1^2x_2^2 \quad (9)$$

$$y' = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2x_2 + b_{22}x_1x_2^2 + b_{12}x_1^2x_2^2 \quad (10)$$

Vale dizer que os modelos citados estão em uma forma genérica onde não é levado em conta a particularidade de um sistema de misturas, onde a condição em que  $x_1+x_2$  deve ser igual a 1. Dessa forma os modelos foram trabalhados algebricamente para se adequar a essa condição, nesse sentido temos:

$$\text{Modelo 1: } y' = b_1^*x_1^2 + b_2^*x_2^2 + b_{12}^*x_1x_2$$

$$\text{Modelo 2: } y' = b_1^*x_1^2 + b_2^*x_2^2 + b_3^*x_1x_2 + b_{12}^*x_1^2x_2^2$$

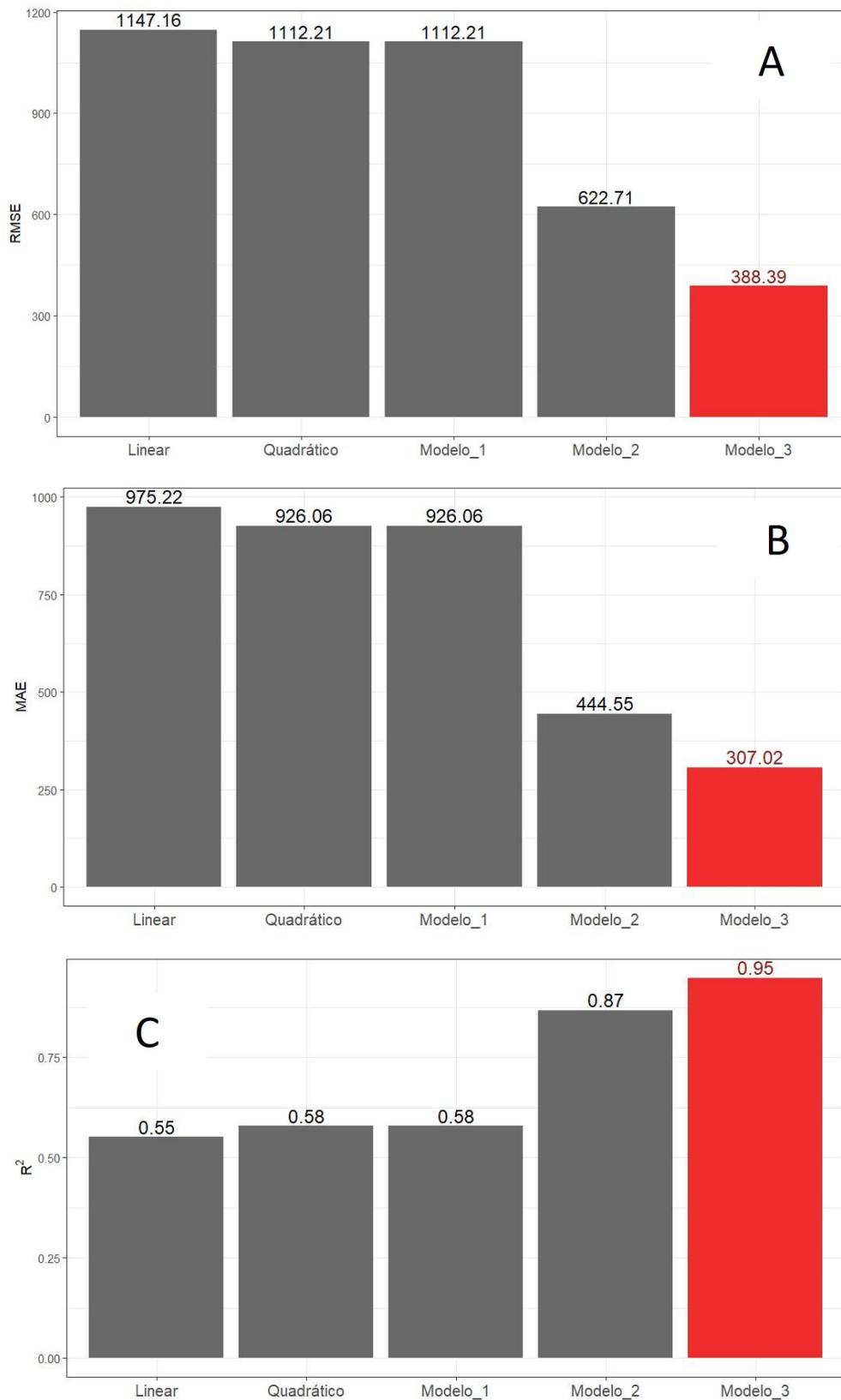
$$\text{Modelo 3: } y' = b_1^*x_1 + b_2^*x_2 + b_{11}x_1^2x_2 + b_{22}x_1x_2^2 + b_{12}x_1^2x_2^2$$

Os detalhes para as modificações no modelo serão mostrados oportunamente no material suplementar desse trabalho. Além disso por conta do aumento de complexidade dos modelos propostos se fez necessário a realização de experimentos em um outro ponto experimental, tendo sido escolhido o ponto com 10% de Água e 90% de EtOH por questões de praticidade uma vez que nessa proporção foi possível avolumar o extrato seco para as mesmas condições do demais pontos sem a necessidade da liofilização. O cromatograma da triplicata autêntica para esse ponto experimental também se encontra no material suplementar na figura S3.

Para testar e definir o modelo que representa o sistema estudado foi realizado o processo de validação cruzada dos com os dados experimentais. Essa metodologia estatística é utilizada para assegurar que o modelo proposto se adequa aos dados utilizados para construção do

modelo de forma efetiva, mas também tem a potencialidade de generalizar e produzir boas previsões para dados que não foram utilizados além dos utilizados no treinamento do modelo. Dentre os vários algoritmos propostos para esse fim, optou-se por utilizar a metodologia do “*leave one out cross validation*”. Nesse sentido, são construídos 18 modelos, cada um deles deixa um dos pontos experimentais fora da construção, em seguida a resposta experimental para o ponto deixado de fora é comparado com a resposta proposta pelo modelo construído através de diferentes métricas. Ao final essas métricas foram comparadas em média para cada um dos modelos propostos acima. O resultado está mostrado na **Figura 20**.

Foram avaliadas três métricas. A primeira delas, destacada na Figura 20 – A é a raiz quadrada dos erros médios (RMSE – do inglês *Root Mean Square Error*), que nos diz de modo geral o quão distante dos valores experimentais estão os valores ajustados. Para essa métrica quando menor o valor melhor é o ajuste do modelo, dessa forma podemos perceber que os modelos propostos no planejamento de misturas são os dois piores em relação ao ajuste, o modelo 1 não apresenta nenhuma diferença em relação ao modelo quadrático. O modelo dois já apresenta uma melhora significativa em relação aos demais, mas é o modelo 3 que melhor se adequa aos dados experimentais. O mesmo é observado para a segunda métrica, a média absoluta dos erros médios (MAE – do inglês *Mean Absolute Error*). Para o coeficiente de determinação  $R^2$  o valor é melhor quanto mais próximo de 1, nesse sentido novamente temos o modelo 3 como sendo o que melhor se adequa aos dados, dessa forma podemos definir este como sendo o melhor dentre todos os modelos ajustados. Por fim, é possível dizer que o modelo 3 pode ser utilizado de forma segura para fazer previsões dentro do sistema, possuindo valor tanto descritivo quanto preditivo uma vez que pelo teste de falta de ajuste não foi encontrado indicativos de falta de ajuste. Além disso através da análise de resíduos o modelo foi considerado normal pelo teste de Shapiro-Wilk com um p-valor de 0.9968, homocedástico através do teste de Breusch-Pagan que retornou um valor de  $\chi^2$  de 1.62 com 1 grau de liberdade. Enquanto o teste de Durbin-Watson mostra que não há auto-correlação entre os resíduos retornando um p-valor de 0.79. Apesar da validação matemática considera-se razoável a necessidade da validação experimental desse modelo.

**Figura 20** – Métricas de avaliação de modelo obtidos pela validação cruzada.

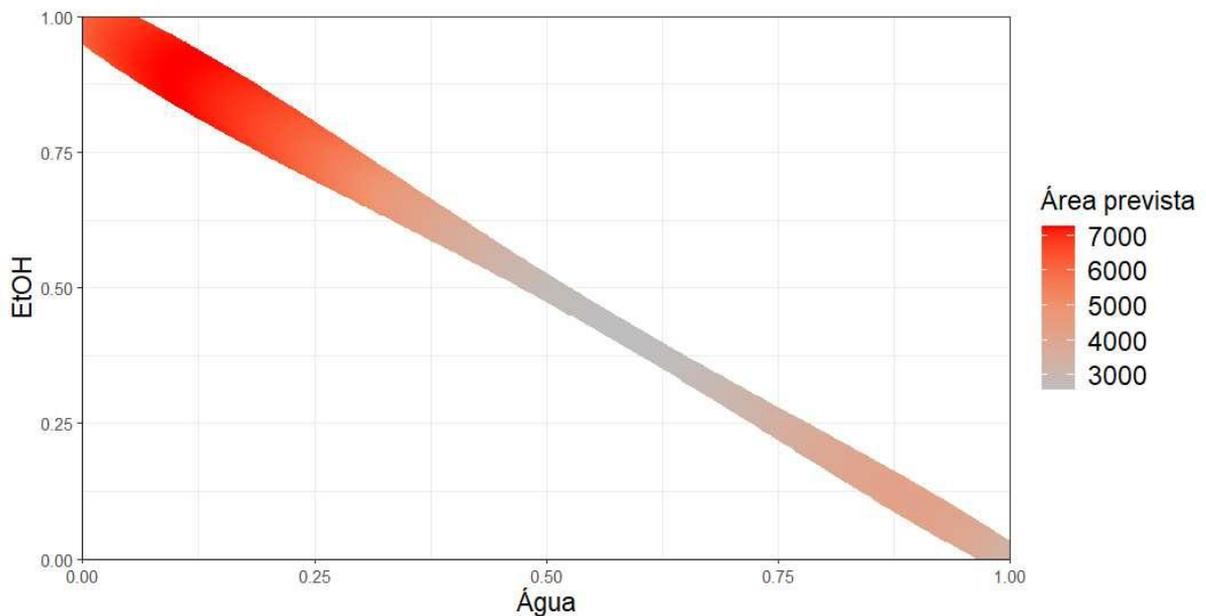
**(A)** - RMSE; **(B)** – MAE; **(C)** – R<sup>2</sup>.

**Fonte:** Elaborado pelo autor (2024).

A equação 11 define o modelo 3, enquanto na **Figura 21** podemos observar o comportamento previsto para o sistema de acordo com esse modelo. Podemos observar que assim como observado experimentalmente o valor de área prevista diminui próximo a proporção igual de água e EtOH, fato que pode ser explicado devido a alta interação entre os dois solventes oque faz com que a afinidade entre eles seja maior que a afinidade com as antocianinas no meio de extração, reduzindo dessa forma a quantidade extraída. O máximo de extração pode ser obtido entre 75-90% de EtOH uma vez que nessa proporção a interação mencionada anteriormente é menor ao mesmo tempo essa proporção fornecesse a capacidade necessária de rompimento das paredes celulares proporcionadas pelo EtOH e a solubilidade aumentada com a presença de água.

$$y' = (3431,4 \pm 263,8)x_1 + (5376,6 \pm 257,1)x_2 + (24754,1 \pm 4463,5)x_1^2x_2 + (44668,8 \pm 4014,9)x_1 - (127803,9 \pm 16016,7)x_1^2x_2^2 \quad (11)$$

**Figura 21** - Previsões de área pelo modelo 3



**Fonte:** Elaborado pelo autor (2024).

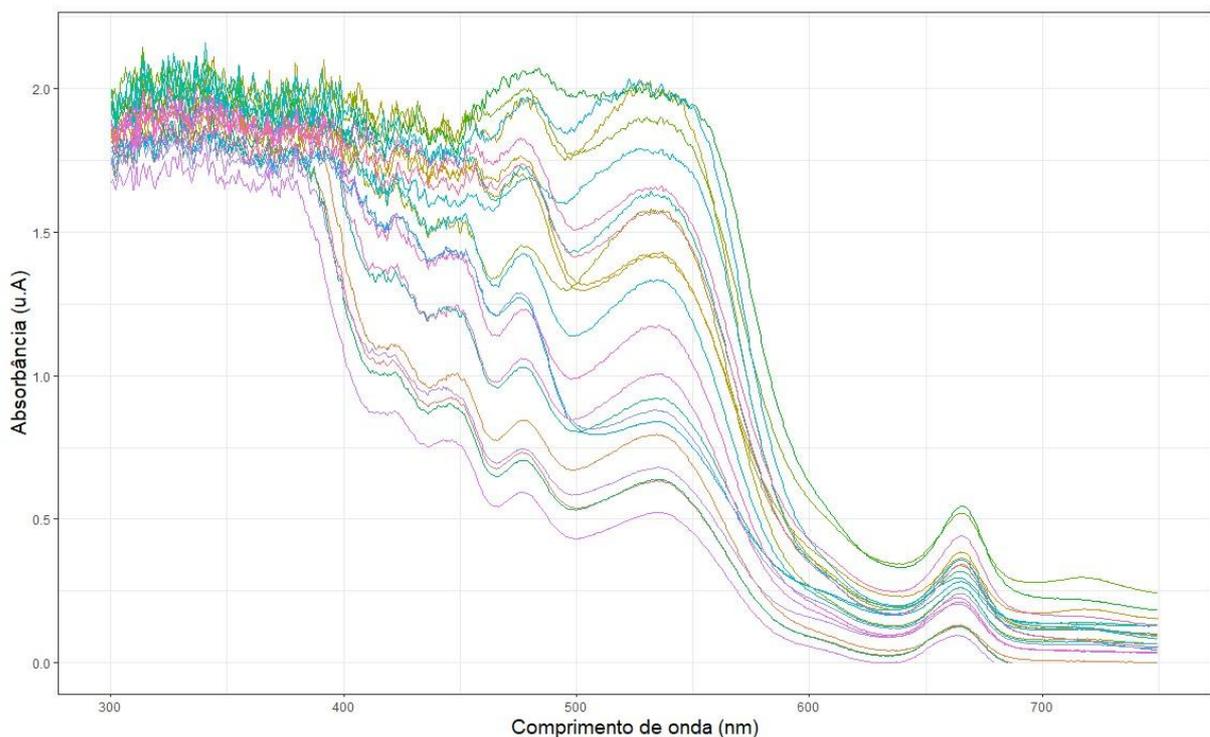
## 5.5 ESTUDO DA CINÉTICA DE EXTRAÇÃO

O monitoramento contínuo das antocianinas no extrato de capim-elefante ao longo do período evidencia que o perfil global do extrato permanece constante. No entanto, é perceptível um incremento no teor relativo das antocianinas evidenciado pelo aumento da intensidade de sinal em algumas bandas características. A **Figura 20** ilustra os resultados de 22 experimentos, nos quais se pode observar essa progressão na intensidade do sinal.

Para obter uma visualização exata da região entre 520 e 540 nm, área seletiva para a identificação das antocianinas, optou-se por não realizar diluições no extrato. Como resultado, é comum identificar saturação de detecção em comprimentos de onda menores. No entanto, dado que a abordagem primordial deste experimento é uma análise focada exclusivamente no perfil e nas informações relacionadas às antocianinas, essa saturação não compromete as implicações a serem discutidas.

O entendimento das causas e implicações dessas variações nos teores observados pode fornecer *insights* valiosos sobre a complexidade molecular desses compostos e suas possíveis interações no extrato. A compreensão aprofundada dessas características contribui significativamente para a interpretação dos resultados e para a contextualização das ações biológicas e tecnológicas associadas ao perfil das antocianinas no extrato analisado.

**Figura 22** - Espectro geral dos extratos de capim-elefante.

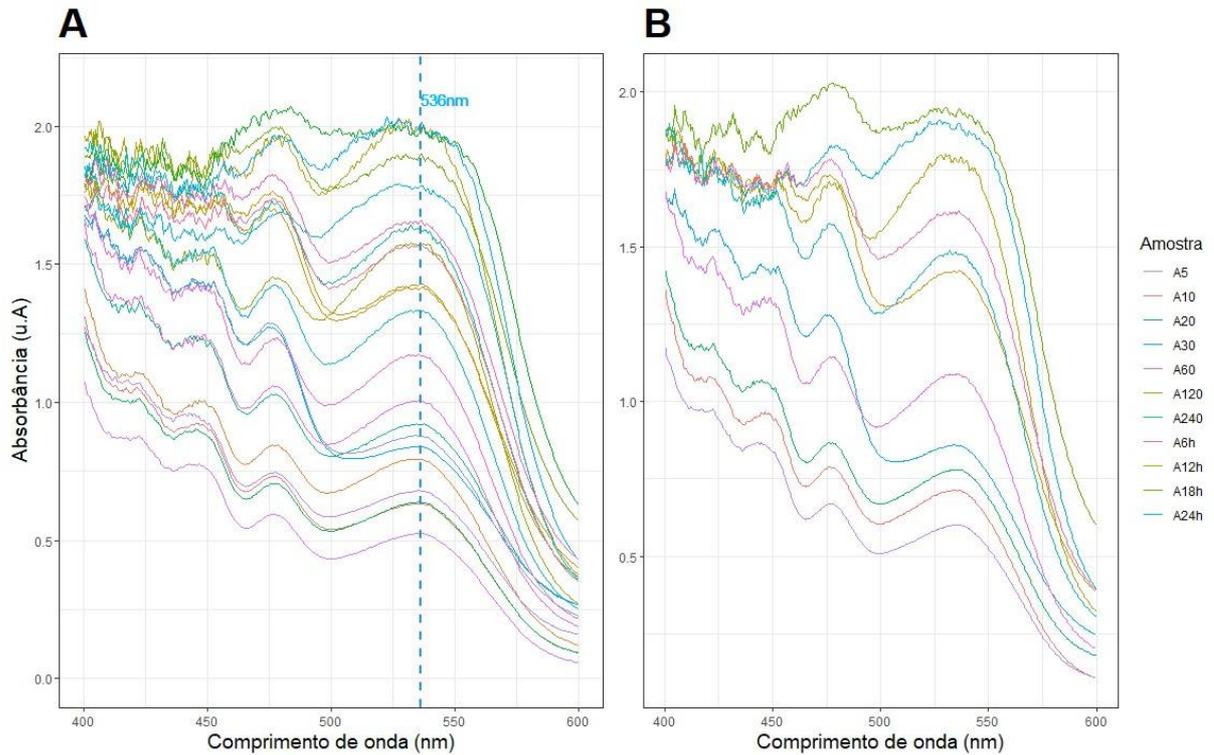


**Fonte:** Elaborado pelo autor (2024).

Na representação gráfica, é possível discernir três regiões distintas. A primeira, situada anterior a 450 nm, evidencia a saturação do sinal no detector, atribuível à elevada concentração de compostos que absorvem nesses comprimentos de onda. A segunda região, abrangendo a faixa entre 500 e 600 nm, destaca a banda característica das antocianinas no espectro visível. Por fim, a terceira região, compreendida entre 600 e 700 nm, corresponde à absorção relacionada à clorofila. Conforme observado, a intensidade de sinal nessas regiões exibe variações entre os diferentes extratos, indicando de forma clara uma diversidade nos teores das espécies detectadas.

Ao concentrar a análise na segunda região, como evidenciado na **Figura 20A**, é possível identificar que o máximo de absorção para o extrato ocorre em 536 nm. Além disso, ao examinar a **Figura 20B**, nota-se que o perfil descrito se mantém consistente ao longo do espectro médio em cada intervalo de tempo de medição. Este padrão constante sugere uma estabilidade no comportamento espectral das antocianinas ao longo do monitoramento temporal, além de evidenciar o aumento do teor de antocianinas em função do tempo de extração. Também é possível notar que a taxa de extração desses compostos não aparenta ser constante durante o intervalo estudado, sendo aparentemente maior no início da extração.

**Figura 23** - Espectro dos extratos de capim-elefante entre 400 e 600 nm.



(A) - Máximo de absorção em 536nm; (B) - Espectros médios por tempo de extração.

**Fonte:** Elaborado pelo autor (2024).

Considerando 536 nm como o máximo de absorção para todas as amostras analisadas, definiu-se a absorbância referente a esse comprimento de onda como sendo um bom estimador para a concentração de antocianinas nos extratos. Dessa forma, procedeu-se com a avaliação dos dados a fim de determinar a relação entre o teor de antocianinas e o tempo de extração.

A **Tabela 7** mostra o valor de absorbância em 536 nm para cada uma das amostras estudadas, além disso podemos verificar graficamente a informação na **Figura 21**. Como podemos observar, as réplicas possuem valores relativamente próximos entre si, sendo as maiores discrepâncias nas réplicas das extrações com durações de 4h e nas de 6h. De modo geral, podemos observar o aumento do teor de antocianina com a evolução do tempo. No entanto, para os pontos destacados acima, uma das réplicas extraiu menos que o nível anterior. Para esses casos, acredita-se tratar de erros aleatórios influenciando no momento da análise.

**Tabela 7 - Absorção das amostras em 536 nm.**

<b>Absorbância (u.A.)</b>	<b>Tempo (min)</b>
0,68001	5
0,52437	5
0,63267	10
0,79347	10
0,63783	20
0,91807	20
0,83901	30
0,87756	30
1,17025	60
1,00756	60
1,41385	120
1,42894	120
1,62195	240
1,33056	240
1,65821	360
1,57041	360
1,97306	600
1,57282	600
1,89947	1080
1,98284	1080
1,78681	1440
2,01267	1440

**Fonte:** Elaborado pelo autor (2024).

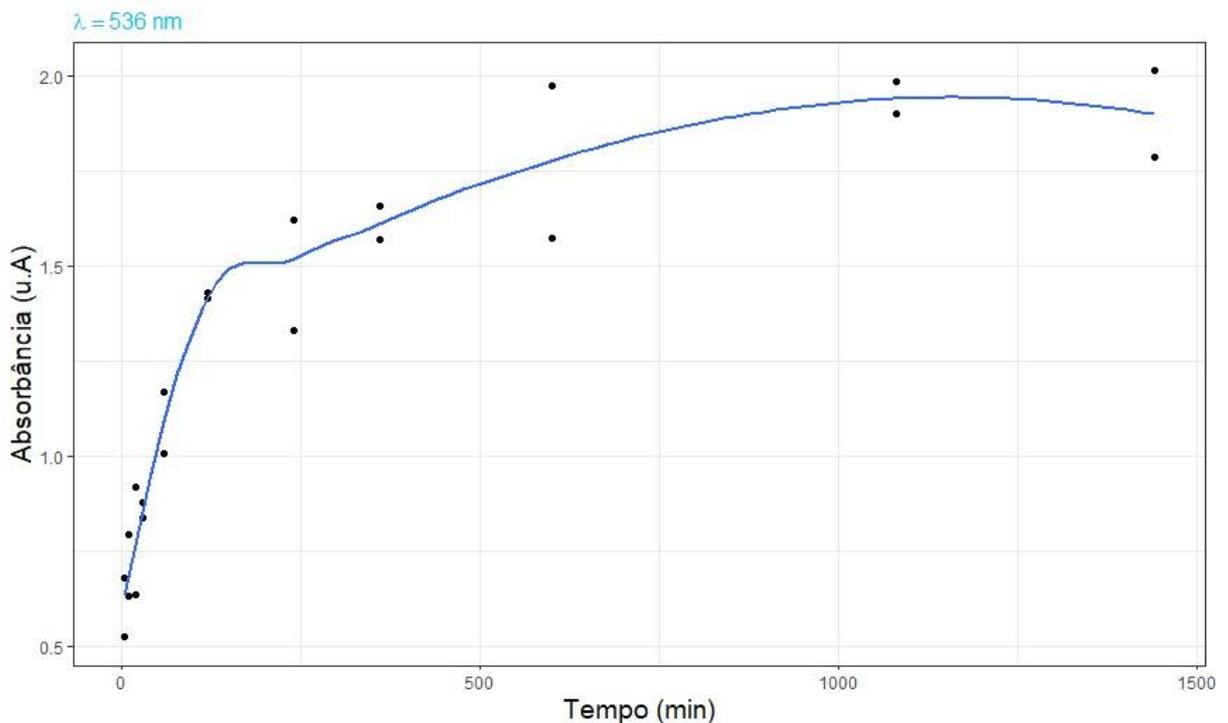
Vale destacar que, todos os experimentos foram feitos de forma autêntica, ou seja, apesar da mesma origem e da busca por homogeneizar o material vegetal anterior a extração, cada uma das réplicas ainda possui diferenças no que tange a individualidade do material usado na extração. Dessa forma, apesar da discrepância nos extratos medidos, a variância entre as amostras de mesmo nível não é grande em valor absoluto, o que implica que está inerente à análise uma sensibilidade alta a pequenas variações entre as réplicas.

Esse problema poderia ser corrigido ou mitigado aumentando-se o número de réplicas por nível, mas essa solução não foi possível devido a limitação na quantidade de amostra disponível. Outro fator que poderia melhorar diminuindo a variação entre esses níveis específicos seria o aumento da massa utilizada no ensaio, uma vez que aumentaria a representatividade de cada um dos ensaios em relação à média global da massa total de capim-

elefante possuído. Contudo, essa também uma solução que foi limitada pela quantidade de amostra disponível.

Para as amostras do último nível em relação ao nível anterior também há uma diminuição aparente no teor de antocianinas medido. Contudo, diferente do caso abordado anteriormente, não se acredita que para essa situação a causa seja experimental, mas sim uma diminuição natural do teor de antocianinas, uma vez que para as réplicas em questão o desvio entre elas não se mostrou tão grande. Portanto, a diminuição do teor de antocianinas para esse nível será abordada e discutida posteriormente nessa sessão.

**Figura 24** - Absorção dos extratos de capim-elefante em função do tempo de extração.



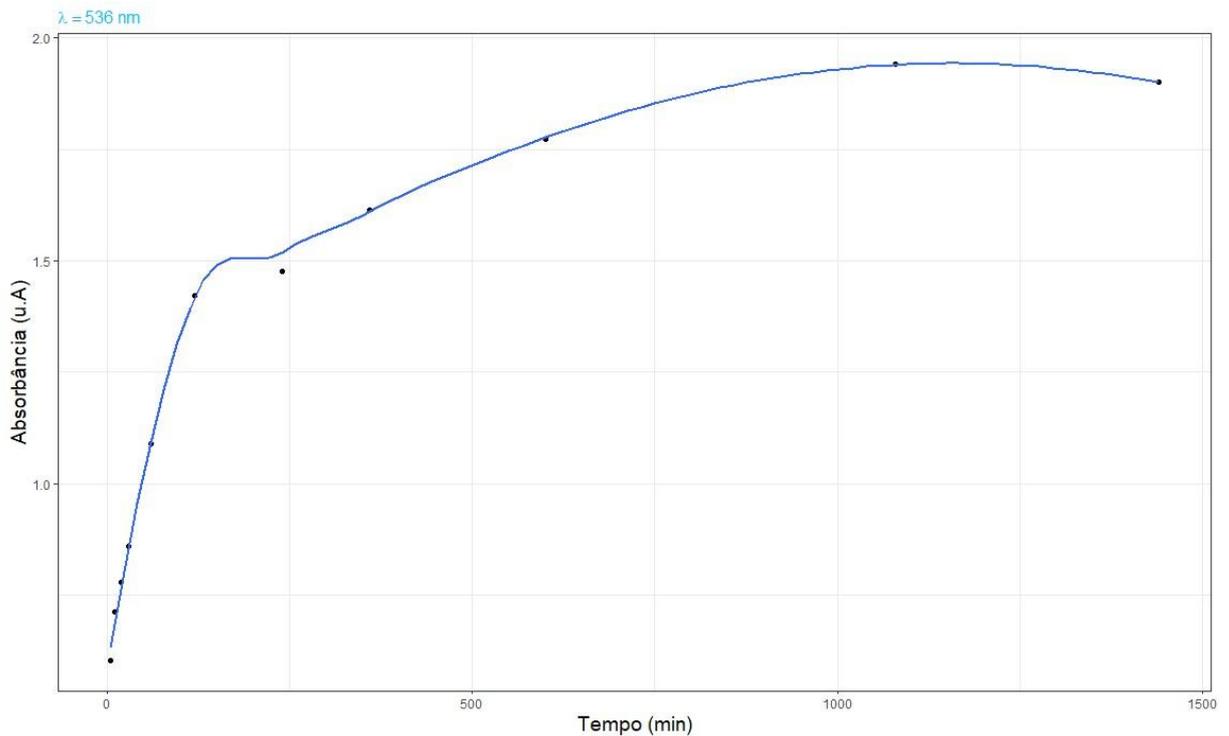
**Fonte:** Elaborado pelo autor (2024).

De modo geral, apesar das eventuais anomalias relatadas, acredita-se que o experimento possua valor científico e que a influência dos erros não causará grandes impactos nas análises posteriores. É importante destacar que erros aleatórios fazem parte de uma rotina experimental e que a ciência e entendimento das possíveis causas engrandecem o debate científico e possibilitam a formulação de hipóteses sobre os dados estudados. Tão logo, para prosseguir com as análises dos dados tomaremos não a informação das réplicas individuais, mas sim das médias para cada nível amostral, uma vez que essa possui maior valor e significância em relação à análise como um todo.

Na **Figura 22** observamos um gráfico que mostra a evolução média da absorvância medida em função do tempo de extração. Grande parte das observações feitas para o gráfico anterior se mantém para essa. É possível notar o aumento contínuo do valor de absorvância em função do tempo de extração, com exceção do último ponto. Em relação a isso, formula-se duas possíveis hipóteses. A primeira é que essa variação seja de fato causada por erros aleatórios no processo de análise, desde a amostragem até a leitura em si. Contudo, também se trabalha com a possibilidade de que nesse intervalo de tempo a taxa de degradação das antocianinas passe a ser maior que a taxa de extração das mesmas. Como é sabido, as antocianinas são espécies de baixa estabilidade que se degradam com facilidade, e fatores como a temperatura e o pH são determinantes para isso. As análises ocorreram em temperatura controlada de 25 °C, mas para essa etapa não houve recobrimento para evitar a interação com a luz por motivos operacionais. Além disso, como visto, subprodutos da extração das antocianinas causam o aumento do pH do extrato, uma vez que após 24 horas de extração o teor desses outros componentes também aumentaram. Logo é de se esperar que o pH tenha passado por alterações mais impactantes quando comparado aos pontos anteriores, deixando as antocianinas mais susceptíveis à degradação.

Outro ponto importante a se levar em conta é que existe a possibilidade de que em algum momento entre os pontos de medição 18h e 24h a extração parou de ocorrer, seja por saturação do solvente ou mesmo por indisponibilidade das espécies no material vegetal. Para fim de discussões, consideraremos como 18h o ponto onde o teor de antocianina no extrato é máximo, após isso esse teor passa a diminuir.

**Figura 25** - Absorção média dos extratos de capim-elefante em função do tempo de extração.



**Fonte:** Elaborado pelo autor (2024).

Um detalhe importante a ser observado nesse gráfico é a clara alteração na taxa de extração de antocianinas em função do tempo. É possível notar uma curva mais íngreme no início do gráfico, o que indica uma maior taxa de extração. Para fins de esclarecimento, vale dizer que a taxa de extração é o quanto de antocianina é extraído no mesmo intervalo de tempo. É esperado que o início da extração possua uma taxa de extração maior, tendo em vista que o solvente extrator está longe de sua saturação e toda a antocianina presente no tecido vegetal está disponível para a extração. Com o passar do tempo, a concentração de antocianinas no solvente passa a aumentar, saturando o meio extracelular em relação aos tecidos vegetais. Ao mesmo tempo, a quantidade de antocianinas no interior das células vegetais está menor. Por esses motivos, passa-se a extrair menos antocianinas. Mesmo que o teor de antocianinas acumulado na solução continue aumentando gradualmente, esse aumento ocorre em uma velocidade menor.

Uma taxa de crescimento maior no início com suavização gradual é característica de uma curva logarítmica. Isso, juntamente com a percepção visual da tendência da curva amostral, nos leva a crer que existe uma relação logarítmica entre a absorbância e o tempo de extração. Uma relação logarítmica pode ser interpolada por uma função linear do tipo (**Equação 8**):

$$y = a\text{Log}(x) + b \quad (8)$$

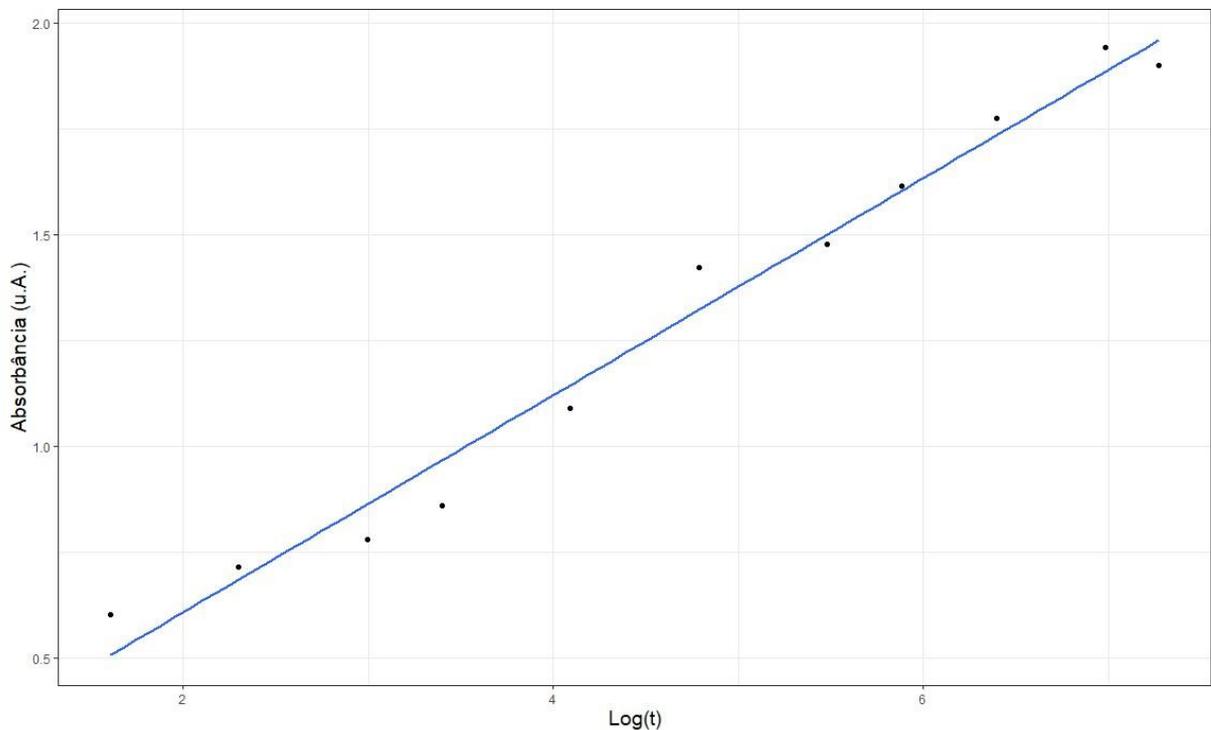
onde “Log(x)” é a variável independente e “y” é a variável dependente; “a” e “b” são os coeficientes do modelo, sendo “a” a inclinação da reta e “b” o intercepto. Para o caso estudado, “y” se trata da absorvância, enquanto “x” é o tempo de extração.

Como é sabido que em um tempo de extração igual a zero não há a presença de antocianinas nos extratos de capim-elefante, o coeficiente “b” deve ser por definição igual a zero. Seguindo essa premissa, foi realizado um ajuste de modelo que descreve o sistema estudado. Tal modelo resultou na **Equação 9** com um coeficiente de correlação  $R^2$  de 0.9966.

$$A = 0.273904\text{Log}(t) \quad (9)$$

Essa equação mostra uma forte tendência linear com um alto valor de correlação, implicando em uma forte relação logarítmica entre a absorvância e o tempo de extração. O gráfico mostrado na **Figura 23** ilustra essa forte tendência linear mencionada.

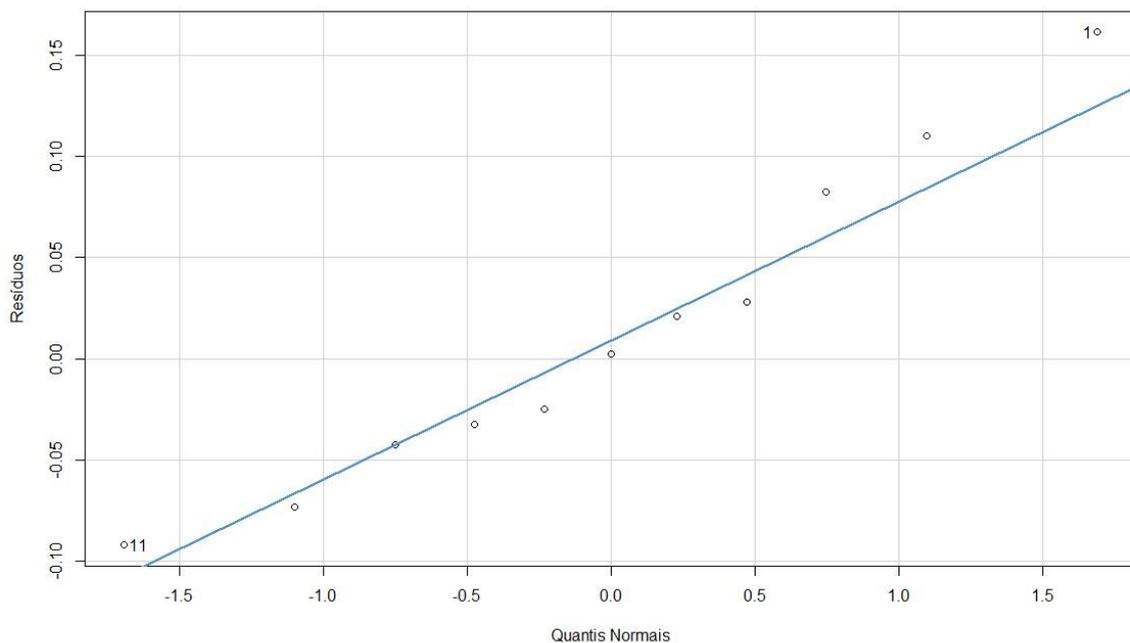
**Figura 26** - Ajuste linear entre absorvância e logaritmo do tempo.



**Fonte:** Elaborado pelo autor (2024).

Desde o princípio, essa análise possuía somente um caráter descritivo, de forma que construir um modelo preditivo do teor de antocianinas em função do tempo não era um dos objetivos. A premissa era simplesmente buscar uma forma matemática para descrever o sistema estudado. Por tal motivo, o modelo descrito anteriormente não pode ser usado de forma preditiva uma vez que as execuções das atividades experimentais não foram realizadas seguindo os critérios necessários para esse fim, como a randomização dos experimentos, por exemplo. Além disso, diferentes massas de capim-elefante foram pesadas. Embora todas elas estivessem por volta de um valor definido de 0,5 gramas, houveram alterações menores durante as pesagens e essas massas não foram anotadas para serem levadas em conta no momento de ajuste do modelo. Por fim, somente duas réplicas de cada nível foram realizadas. Sabe-se que em um experimento de ajuste linear duas réplicas são insuficientes para o estudo da falta de ajuste do modelo, diminuindo a confiabilidade do modelo para fazer previsões, podendo ocasionar em resultados significativamente discrepantes dos experimentais. Apesar disso, o modelo é o suficiente para ser o que foi proposto: um modelo descritivo dentro do recorte estudado. Os resíduos deixam claro que não existem erros sistemáticos associados à análise em questão, além de seguir distribuição normal, como pode ser visto no gráfico de quantis da **Figura 25** e pelo valor de 0,7104 no teste de Shapiro-Wilk. Dessa forma é possível usar o modelo e a equação obtida acima para inferir sobre o experimento realizado.

**Figura 27** – Gráfico dos quantis normais para resíduos da regressão logarítmica.

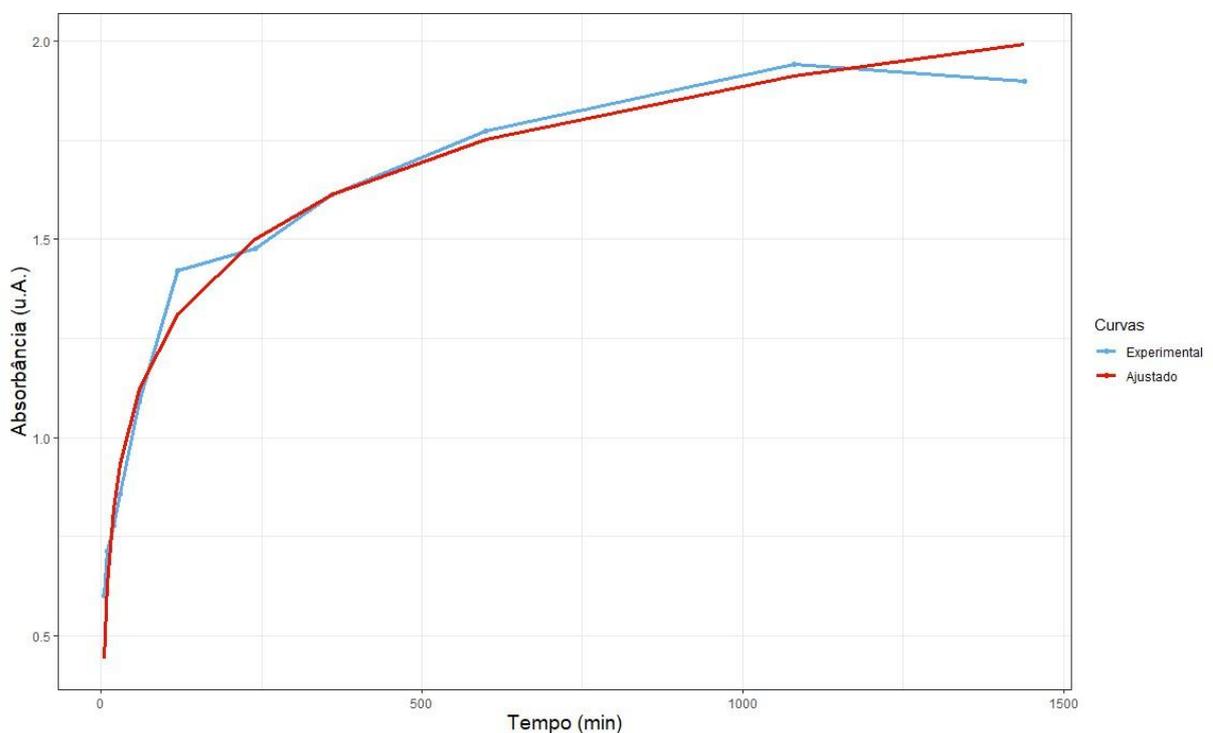


**Fonte:** Elaborado pelo autor (2024).

Dessa forma, uma curva logarítmica é o que melhor descreve a relação entre o sinal medido, conseqüentemente a concentração de antocianinas no extrato, e o tempo de extração. A relação logarítmica entre o sinal de absorvância medido e o tempo de extração de antocianinas tem implicações significativas na interpretação dos dados e no desenvolvimento de métodos eficazes de extração, sugerindo que a extração desses compostos não ocorre de maneira linear ao longo do tempo, mas sim de forma mais eficiente em fases iniciais. O bom ajuste da curva experimental com o modelo pode ser visto na **Figura 26**.

Essa tendência logarítmica pode ser explicada pelo fato de que, inicialmente, a extração de antocianinas é mais rápida, aumentando rapidamente a concentração em um curto período. À medida que o tempo de extração progride, a taxa de extração diminui, atingindo um platô onde a variação na concentração de antocianinas torna-se mais lenta. Essa informação é crucial para otimizar os processos de extração, determinando o momento ideal para interromper o procedimento e obter concentrações desejadas de antocianinas.

**Figura 28** - Curva experimental e ajuste logarítmico.



**Fonte:** Elaborado pelo autor (2024).

Além disso, a relação logarítmica pode indicar a presença de diferentes fases ou componentes na matriz de extração, cada um contribuindo de maneira distinta para a liberação

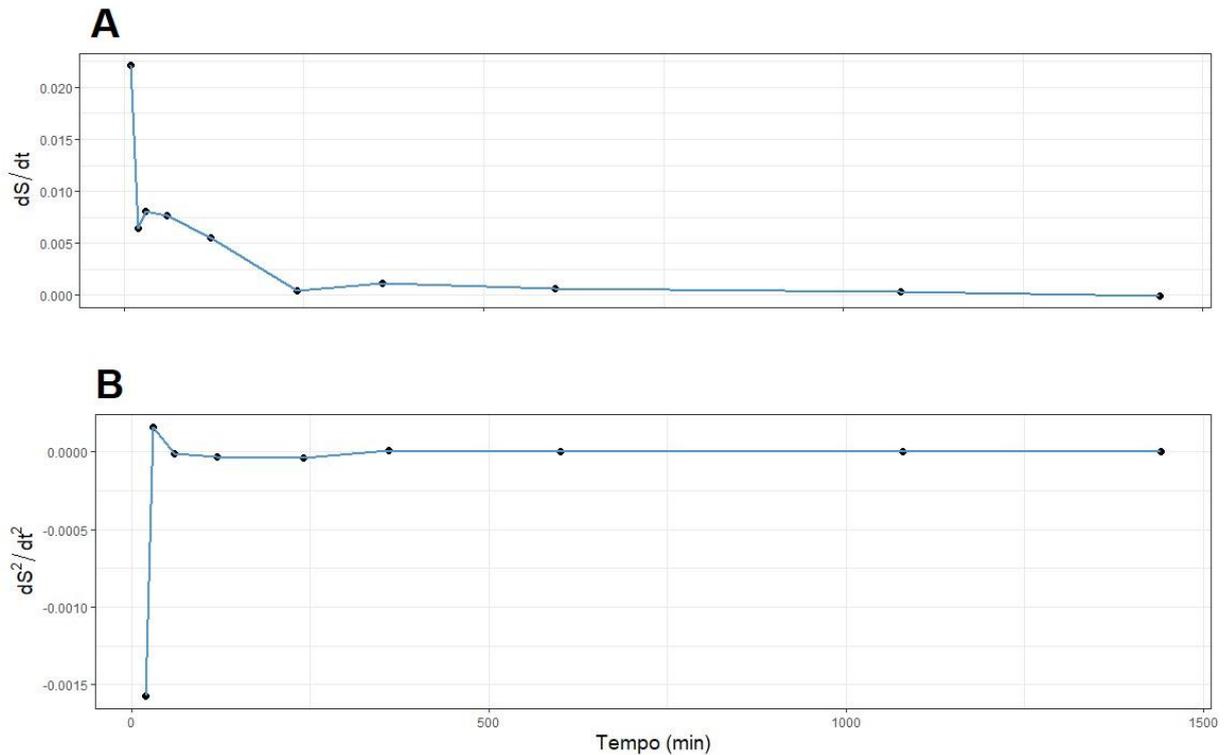
de antocianinas. Compreender essa dinâmica temporal permite ajustar variáveis experimentais, como a escolha do solvente ou a temperatura, para maximizar a eficiência da extração.

O coeficiente de correlação do modelo proposto juntamente com a avaliação visual das curvas indica proximidade entre o resultado experimental e o modelo teórico. Se os dados experimentais se aproximam bem dessa curva logarítmica proposta, isso indica uma concordância significativa entre a teoria modelada e os resultados práticos. Quando a proximidade é alta, isso sugere que a taxa de aumento no sinal de absorbância diminui de maneira consistente à medida que o tempo de extração aumenta, em conformidade com a natureza logarítmica da equação como pode ser visto na **Figura 27**.

A proximidade da curva experimental com a curva logarítmica proposta implica que o modelo é capaz de capturar e descrever efetivamente as mudanças na concentração de antocianinas ao longo do tempo durante o processo de extração. Isso fortalece a confiança na validade do modelo proposto, indicando que ele pode ser uma representação matemática precisa do comportamento das antocianinas durante o processo de extração.

A utilidade dessa concordância vai além da mera descrição matemática, fornecendo uma base sólida para prever e controlar eficazmente o processo de extração em condições variadas. A implementação desse modelo pode ser valiosa em ambientes industriais ou de pesquisa, permitindo uma otimização mais precisa das variáveis do processo para atender a objetivos específicos de concentração de antocianinas.

**Figura 29** - Derivadas do modelo experimental.



(A) - Primeira derivada do sinal em função do tempo; (B) - Segunda derivada do sinal em função do tempo.

**Fonte:** Elaborado pelo autor (2024).

A primeira derivada, responsável por definir a taxa de extração de antocianinas em relação ao tempo, pode ser interpretada como a velocidade com que as antocianinas se deslocam do meio celular no tecido vegetal para o meio externo, onde está presente o solvente extrator. Inicialmente, a extração se inicia com uma elevada taxa de migração, pois inicialmente não há antocianinas no extrato, e todas as espécies disponíveis são captadas pelo solvente. Naturalmente, ocorre uma diminuição nessa taxa, conforme evidenciado na **Figura 27A**. Entretanto, é possível notar que essa taxa experimenta um leve aumento a partir de 10 minutos. Esse acréscimo pode ser compreendido como o tempo necessário para o rompimento de parte da parede celular do tecido vegetal pelo solvente de extração, liberando as antocianinas para migrarem para o meio extracelular. Após essa ocorrência, a taxa de extração volta a diminuir até os 240 minutos, momento em que se torna constante, permanecendo igual a zero até o término da extração. Isso implica que, a partir desse momento, a quantidade de antocianina extraída em relação ao tempo se torna constante até o fim da extração.

Ao analisarmos o gráfico da segunda derivada (**Figura 27B**), que ilustra como a taxa de extração se altera em função do tempo, podemos corroborar com o exposto anteriormente. Há

uma queda inicial na taxa de extração, seguida por um leve aumento em 10 minutos. Contudo, essa variação atinge o equilíbrio, evidenciado pela segunda derivada igual a zero até o encerramento da extração. Isso implica que, na maior parte do tempo, a extração ocorre a uma taxa fixa em relação ao tempo, uma informação crucial para determinar o tempo de duração ideal para o processo de extração.

Tendo essas informações em mente podemos ponderar sobre o tempo de extração ideal para as antocianinas. Considerando um cenário onde objetiva-se maximizar a quantidade extraída de antocianinas e levando em conta o declínio do teor de antocianinas após 18h de extração, podemos considerar esse como o tempo ideal para a extração. Também vale destacar que em média 76,1% do teor total de antocianinas são extraídas nas primeiras 4 horas de extração, ademais a extração de 83,2% do teor máximo ocorre em 6h de extração e 91,4% em 10h. Portanto é razoável inferir que 4h de extração é o tempo que otimiza a eficiência do processo. Os tempos de 6h e 10h apresentam boas opções intermediárias onde eficiência em relação ao tempo do processo e a maximização da quantidade extraída são ponderadas de forma diferente.

Ao fim, o tempo ideal de extração depende de outras variáveis, incluindo a motivação pelo qual a extração está sendo feita. Questões operacionais também devem ser levadas em conta como os custos envolvido no processo além da disponibilidade de material vegetal e recursos para a extração. Acredita-se, porém, que o estudo realizado possa servir de apoio e auxiliar a tomada de decisão.

## 6 CONCLUSÕES

O estudo realizado proporcionou respostas importantes que ampliam o conhecimento sobre as antocianinas presentes nos extratos hidroalcoólicos de capim-elefante.

Ficou evidente que, embora os extratos com proporções iguais dos solventes de extração resultem em maior eficiência global em termos de massa extraída, isso não se traduz diretamente no teor de antocianinas, sugerindo a presença de outros compostos nos extratos analisados e justificando o uso de técnicas de separação e detecção seletivas às antocianinas. Identificamos cinco antocianinas nos extratos, sendo a mais abundante preliminarmente identificada como cianidina-3-glicosídeo. Além disso, obtivemos informações iniciais sobre as demais antocianinas.

Por meio de técnicas semiquantitativas definiu-se através de um modelo polinomial de misturas que o intervalo entre 75% e 90% de EtOH como sendo o ótimo para a extração de antocianinas. No entanto, reconhecemos a necessidade da validação experimental desse modelo uma vez que matematicamente o mesmo se mostra adequado para análises descritivas e preditivas do sistema. Quanto ao tempo de extração, determinamos que 4 horas otimizam a taxa de extração, enquanto 18 horas maximizam o teor de antocianinas nos extratos.

Em última análise, os desdobramentos práticos dessas descobertas podem impactar positivamente a produção de alimentos, suplementos e produtos farmacêuticos enriquecidos com antocianinas, aprimorando tanto seus benefícios nutricionais quanto sensoriais.

## REFERÊNCIAS

ALTEMIMI, A. et al. **Phytochemicals: Extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts.** PlantsMDPI AG, , 1 dez. 2017.

AMR, A.; AL-TAMIMI, E. Stability of the crude extracts of *Ranunculus asiaticus* anthocyanins and their use as food colourants. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 42, n. 8, p. 985–991, ago. 2007.

ANDERSON, W. F.; CASLER, M. D.; BALDWIN, B. S. Improvement of Perennial Forage Species as Feedstock for Bioenergy. Em: **Genetic Improvement of Bioenergy Crops.** New York, NY: Springer New York, [s.d.]. p. 347–376.

ANVISA. **RESOLUÇÃO - RDC Nº 27, DE 17 DE MAIO DE 2012.** Disponível em: [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0027\\_17\\_05\\_2012.html](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0027_17_05_2012.html). Acesso em: 23 de janeiro de 2024.

ATANASOV, A. G. et al. **Natural products in drug discovery: advances and opportunities.** *Nature Reviews Drug Discovery* Nature Research, , 1 mar. 2021.

AWIKA, J. M.; ROONEY, L. W.; WANISKA, R. D. Anthocyanins from black sorghum and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 90, n. 1–2, p. 293–301, mar. 2005.

AYVAZ, H. et al. Anthocyanins: Metabolic Digestion, Bioavailability, Therapeutic Effects, Current Pharmaceutical/Industrial Use, and Innovation Potential. **Antioxidants**, v. 12, n. 1, p. 48, 26 dez. 2022.

AZMIR, J. et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 426–436, ago. 2013.

BAEK, H. et al. Cyanidin-3-O-glucoside protects the brain and improves cognitive function in APPswe/PS1ΔE9 transgenic mice model. **Journal of Neuroinflammation**, v. 20, n. 1, p. 268, 17 nov. 2023.

BAKSHAYES, M. A. et al. The Effects of Light, Storage Temperature, pH and Variety on Stability of Anthocyanin Pigments in Four Malus Varieties. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 9, n. 3, p. 428–433, 15 jan. 2006.

BARROS NETO, B. DE.; SCARMINIO, I. SPACINO.; BRUNS, R. EDWARD. **Como fazer experimentos pesquisa e desenvolvimeno na ciência e na indústria.** [s.l.] Editora da Unicamp, 2001.

BEDNAR, P. et al. Separation of Structurally Related Anthocyanins by MEKC. **Chromatographia**, v. 58, n. 5–6, p. 283–287, set. 2003.

BEDNÁŘ, P. et al. Utilization of capillary electrophoresis/mass spectrometry (CE/MS<sup>n</sup>) for the study of anthocyanin dyes. **Journal of Separation Science**, v. 28, n. 12, p. 1291–1299, ago. 2005.

BENDIF, H. et al. Total phytochemical analysis of *Thymus munbyanus* subsp. *coloratus* from Algeria by HS-SPME-GC-MS, NMR and HPLC-MS<sup>n</sup> studies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 186, 15 jul. 2020.

BETZ, J. M.; BROWN, P. N.; ROMAN, M. C. Accuracy, precision, and reliability of chemical measurements in natural products research. **Fitoterapia**, v. 82, n. 1, p. 44–52, jan. 2011.

BHALLA, N. et al. Phytochemical analysis of Moringa Oleifera leaves extracts by GC-MS and free radical scavenging potency for industrial applications. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 12, p. 6915–6928, 1 dez. 2021.

BHAWSAR, J. **Phytochemical analysis of Mentha spicata plant extract using UV-VIS, FTIR and GC/MS technique CORROSION INHIBITIVE ABILITY EVALUATION OF GREEN CORROSION INHIBITOR FOR METAL SURFACE IN ACIDIC MEDIUM** View project Article in **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <www.jocpr.com>.

BICARD, V.; FOUGEROUSSE, A.; BROUILLARD, R. Analysis of natural anthocyanins by capillary zone electrophoresis in acidic media. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 22, n. 4, p. 541–550, 1999.

BINDER, R.; LÄMMLE, C. Reversed Phase High Performance Thin Layer Chromatography of Aqueous Samples in Student Laboratories Using the Example of Anthocyanin Patterns from Flower Petals. **Journal of Chemical Education**, v. 96, n. 9, p. 1922–1927, 10 set. 2019.

BORGES, G. D. S. C. et al. Protective effect of Euterpe edulis M. on Vero cell culture and antioxidant evaluation based on phenolic composition using HPLC–ESI-MS/MS. **Food Research International**, v. 51, n. 1, p. 363–369, abr. 2013.

BRIDLE, P.; GARCÍA-VIGUERA, C.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Analysis of Anthocyanins by Capillary Zone Electrophoresis. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 19, n. 4, p. 537–545, 15 fev. 1996.

BROUILLARD, R. The in vivo expression of anthocyanin colour in plants. **Phytochemistry**, v. 22, n. 6, p. 1311–1323, jan. 1983.

BUENO, J. M. et al. Analysis and Antioxidant Capacity of Anthocyanin Pigments. Part I: General Considerations Concerning Polyphenols and Flavonoids. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 42, n. 2, p. 102–125, abr. 2012.

BUTELLI, E. et al. Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 11, p. 1301–1308, 26 nov. 2008.

CALIXTO, J. B. The role of natural products in modern drug discovery. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, 2019.

CALVO, D. et al. Migration order of wine anthocyanins in capillary zone electrophoresis. **Analytica Chimica Acta**, v. 524, n. 1–2, p. 207–213, out. 2004.

CASTAÑEDA-OVANDO, A. et al. Chemical studies of anthocyanins: A review. **Food Chemistry**, v. 113, n. 4, p. 859–871, abr. 2009.

CELLI, G. B.; BROOKS, M. S.-L. Impact of extraction and processing conditions on betalains and comparison of properties with anthocyanins — A current review. **Food Research International**, v. 100, p. 501–509, out. 2017.

CHATHAM, L. A.; HOWARD, J. E.; JUVIK, J. A. A natural colorant system from corn: Flavone-anthocyanin copigmentation for altered hues and improved shelf life. **Food Chemistry**, v. 310, p. 125734, abr. 2020.

CHEN, P.-N. et al. Cyanidin 3-Glucoside and Peonidin 3-Glucoside Inhibit Tumor Cell Growth and Induce Apoptosis In Vitro and Suppress Tumor Growth In Vivo. **Nutrition and Cancer**, v. 53, n. 2, p. 232–243, nov. 2005.

CHEN, P.-N. et al. Mulberry anthocyanins, cyanidin 3-rutinoside and cyanidin 3-glucoside, exhibited an inhibitory effect on the migration and invasion of a human lung cancer cell line. **Cancer Letters**, v. 235, n. 2, p. 248–259, abr. 2006.

CHOI, M.-H.; SHIM, S.-M.; KIM, G.-H. Protective effect of black raspberry seed containing anthocyanins against oxidative damage to DNA, protein, and lipid. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 2, p. 1214–1221, 15 fev. 2016.

CORNELL, J. A. **Experiments with Mixtures**. [s.l.] Wiley, 2002.

CORTEZ, R. et al. Natural Pigments: Stabilization Methods of Anthocyanins for Food Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 16, n. 1, p. 180–198, 25 jan. 2017.

DA COSTA, C. T.; HORTON, D.; MARGOLIS, S. A. Analysis of anthocyanins in foods by liquid chromatography, liquid chromatography–mass spectrometry and capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 881, n. 1–2, p. 403–410, jun. 2000.

DAI, Z. et al. Cochrane systematic reviews on traditional Chinese medicine: What matters—the quantity or quality of evidence? **Phytomedicine**, v. 98, 1 abr. 2022.

DAUD, Z. et al. Analysis of Napier grass (*Pennisetum purpureum*) as a potential alternative fibre in paper industry. **Materials Research Innovations**, v. 18, n. sup6, p. S6-18-S6-20, 8 dez. 2014.

D'AURIA, J. C. Acyltransferases in plants: a good time to be BAHD. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, n. 3, p. 331–340, jun. 2006.

DE O. LESSA, M. et al. Energetic characterization and flash pyrolysis of different elephant grass cultivars (*Pennisetum purpureum* Schum.). **Canadian Journal of Chemical Engineering**, 2021.

DE OLIVEIRA, I. R. N. et al. New strategy for determination of anthocyanins, polyphenols and antioxidant capacity of Brassica oleracea liquid extract using infrared spectroscopies and multivariate regression. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 194, p. 172–180, abr. 2018.

DÍAZ-GARCÍA, M. C. et al. Production of an anthocyanin-rich food colourant from *Thymus moroderi* and its application in foods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 6, p. 1283–1293, abr. 2015.

- DING, M. et al. Cyanidin-3-glucoside, a Natural Product Derived from Blackberry, Exhibits Chemopreventive and Chemotherapeutic Activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 25, p. 17359–17368, jun. 2006.
- DO NASCIMENTO, M. P. et al. Mixture design of an electrolyte system for the simultaneous separation of  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ , and  $\text{HCO}_3^-$  in shrimp-farming water by CZE-UV. **Analytical Methods**, v. 15, n. 3, p. 311–321, 2023.
- FAROOQ, S. et al. Recent trends in extraction techniques of anthocyanins from plant materials. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 14, n. 6, p. 3508–3519, 9 dez. 2020.
- FDA. **Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry**. Disponível em: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry>. Acesso em: 23 de janeiro de 2024.
- FERREIRA, F. M. et al. Optimal harvest number and genotypic evaluation of total dry biomass, stability, and adaptability of elephant grass clones for bioenergy purposes. **Biomass and Bioenergy**, v. 149, p. 106104, jun. 2021.
- FOSSEN, T. et al. Characteristic Anthocyanin Pattern from Onions and other *Allium* spp. **Journal of Food Science**, v. 61, n. 4, p. 703–706, 26 jul. 1996.
- FOSSEN, T.; SLIMESTAD, R.; ANDERSEN, Ø. M. Anthocyanins with 4'-glucosidation from red onion, *Allium cepa*. **Phytochemistry**, v. 64, n. 8, p. 1367–1374, dez. 2003.
- FU, C. et al. Phytochemical analysis and geographic assessment of flavonoids, coumarins and sesquiterpenes in *Artemisia annua* L. based on HPLC-DAD quantification and LC-ESI-QTOF-MS/MS confirmation. **Food Chemistry**, v. 312, 15 maio 2020.
- GARCIA-MENDOZA, M. DEL P. et al. Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from juçara (*Euterpe edulis* Mart.) residues using pressurized liquids and supercritical fluids. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 119, p. 9–16, jan. 2017.
- GARDANA, C. et al. Near-Infrared Spectroscopy and Chemometrics for the Routine Detection of Bilberry Extract Adulteration and Quantitative Determination of the Anthocyanins. **Journal of Spectroscopy**, v. 2018, p. 1–8, 16 jul. 2018.
- GENÇDAĞ, E. et al. Copigmentation and stabilization of anthocyanins using organic molecules and encapsulation techniques. **Current Plant Biology**, v. 29, p. 100238, jan. 2022.
- HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. **The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era**. **Nature Reviews Drug Discovery** Nature Publishing Group, , 1 jan. 2015.
- HE, J.; GIUSTI, M. M. Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 1, n. 1, p. 163–187, 1 abr. 2010.
- HUA, M. et al. Determination of Anthocyanins and Flavonols in *Paeonia delavayi* by High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array and Mass Spectrometric Detection. **Analytical Letters**, v. 51, n. 15, p. 2331–2339, 13 out. 2018.

HUANG, Z. et al. Identification of anthocyanins in muscadine grapes with HPLC-ESI-MS. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 4, p. 819–824, maio 2009.

JAISWAL, V.; DERMARDEROSIAN, A.; PORTER, J. R. Anthocyanins and polyphenol oxidase from dried arils of pomegranate (*Punica granatum* L.). **Food Chemistry**, v. 118, n. 1, p. 11–16, jan. 2010.

JOHNSON, J. B. et al. Prediction of Phytochemical Constituents in Cayenne Pepper Using MIR and NIR Spectroscopy. **Applied Sciences**, v. 13, n. 8, p. 5143, 20 abr. 2023.

KIM, A.-N. et al. Thermal processing under oxygen-free condition of blueberry puree: Effect on anthocyanin, ascorbic acid, antioxidant activity, and enzyme activities. **Food Chemistry**, v. 342, p. 128345, abr. 2021.

KRUGER, M. J. et al. Proanthocyanidins, anthocyanins and cardiovascular diseases. **Food Research International**, v. 59, p. 41–52, maio 2014.

KUMAR, S.; SINGH, R.; DHANANI, T. Rapid Estimation of Bioactive Phytochemicals in Vegetables and Fruits Using Near Infrared Reflectance Spectroscopy. Em: **Fruit and Vegetable Phytochemicals**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2017. p. 781–802.

KURDYUKOV, E. E. et al. Spectrophotometric Determination of the Total Anthocyanin Content of Euterpe oleracea Fruits. **Moscow University Chemistry Bulletin**, v. 76, n. 6, p. 405–406, 6 nov. 2021.

LEE SIMAS PORTO, B. et al. **Capillary electrophoresis in phytochemical analysis: Advances and applications in the period 2018–2021**. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry** Elsevier B.V., , 1 abr. 2023.

LI, D.; MENG, X.; LI, B. Profiling of anthocyanins from blueberries produced in China using HPLC-DAD-MS and exploratory analysis by principal component analysis. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 47, p. 1–7, 1 abr. 2016.

LIN, Y. et al. Anthocyanins: Modified New Technologies and Challenges. **Foods**, v. 12, n. 7, p. 1368, 23 mar. 2023.

LIU, Z. et al. Mixture Design Approach to optimize the rheological properties of the material used in 3D cementitious material printing. **Construction and Building Materials**, v. 198, p. 245–255, 20 fev. 2019.

LOTFY, S. M.; MOSTAFA, A. Z. Phytoremediation of contaminated soil with cobalt and chromium. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 144, p. 367–373, set. 2014.

LUO, X. et al. Acylation of Anthocyanins and Their Applications in the Food Industry: Mechanisms and Recent Research Advances. **Foods**, v. 11, n. 14, p. 2166, 21 jul. 2022.

MARÇO, P. H.; POPPI, R. J.; SCARMINIO, I. S. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1218–1223, 2008.

- MARKARIS, P.; LIVINGSTON, G. E.; FELLERS, C. R. QUANTITATIVE ASPECTS OF STRAWBERRY PIGMENT DEGRADATION<sup>a, b</sup>. **Journal of Food Science**, v. 22, n. 2, p. 117–130, 25 mar. 1957.
- MARQUES, J. I. et al. Phytochemical analysis by HPLC–HRESI-MS and anti-inflammatory activity of *Tabernaemontana catharinensis*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, 24 fev. 2018.
- MATHEWS, H. et al. Activation Tagging in Tomato Identifies a Transcriptional Regulator of Anthocyanin Biosynthesis, Modification, and Transport. **The Plant Cell**, v. 15, n. 8, p. 1689–1703, ago. 2003.
- MAZZA, G.; BROUILLARD, R. Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products. **Food Chemistry**, v. 25, n. 3, p. 207–225, jan. 1987.
- MCLEAN, R. A.; ANDERSON, V. L. Extreme Vertices Design of Mixture Experiments. **Technometrics**, v. 8, n. 3, p. 447–454, ago. 1966.
- METIVIER, R. P.; FRANCIS, F. J.; CLYDESDALE, F. M. SOLVENT EXTRACTION OF ANTHOCYANINS FROM WINE POMACE. **Journal of Food Science**, v. 45, n. 4, p. 1099–1100, 25 jul. 1980.
- MOLONEY, M. et al. Red cabbage anthocyanins: The influence of d-glucose acylation by hydroxycinnamic acids on their structural transformations in acidic to mildly alkaline conditions and on the resulting color. **Dyes and Pigments**, v. 158, p. 342–352, nov. 2018.
- NACZK, M.; SHAHIDI, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, n. 5, p. 1523–1542, ago. 2006.
- NAHAR, L.; ONDER, A.; SARKER, S. D. **A review on the recent advances in HPLC, UHPLC and UPLC analyses of naturally occurring cannabinoids (2010–2019). Phytochemical Analysis** John Wiley and Sons Ltd, , 1 jul. 2020.
- NAVAS, M. J. et al. Analysis and Antioxidant Capacity of Anthocyanin Pigments. Part IV: Extraction of Anthocyanins. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 42, n. 4, p. 313–342, out. 2012.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. **Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. Journal of Natural Products**, 23 mar. 2012.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. **Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. Journal of Natural Products**American Chemical Society, , 27 mar. 2020.
- NISHIHARA, M.; NAKATSUKA, T. Genetic engineering of flavonoid pigments to modify flower color in floricultural plants. **Biotechnology Letters**, v. 33, n. 3, p. 433–441, 4 mar. 2011.
- ÖZGENÇ et al. Comparative phytochemical analysis of volatile organic compounds by SPME-GC-FID/MS from six coniferous and nine deciduous tree bark species grown in Turkey. **South African Journal of Botany**, v. 113, p. 23–28, 1 nov. 2017.

ÖZGÜR, M. Ü.; ÇİMEN, E. Ultrasound-Assisted Extraction of Anthocyanins from Red Rose Petals and New Spectrophotometric Methods for the Determination of Total Monomeric Anthocyanins. **Journal of AOAC INTERNATIONAL**, v. 101, n. 4, p. 967–980, 1 jul. 2018.

PAES, J. et al. Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.) residues using supercritical CO<sub>2</sub> and pressurized liquids. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 95, p. 8–16, nov. 2014.

PÉREZ-GREGORIO, R. M. et al. Identification and quantification of flavonoids in traditional cultivars of red and white onions at harvest. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, n. 6, p. 592–598, set. 2010.

PETERSSON, E. V. et al. Analysis of anthocyanins in red onion using capillary electrophoresis-time of flight-mass spectrometry. **ELECTROPHORESIS**, v. 29, n. 12, p. 2723–2730, jun. 2008.

POJER, E. et al. The Case for Anthocyanin Consumption to Promote Human Health: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 5, p. 483–508, set. 2013.

PRADHAN, P. C.; SAHA, S. Anthocyanin profiling of *Berberis lycium* Royle berry and its bioactivity evaluation for its nutraceutical potential. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 2, p. 1205–1213, 18 fev. 2016.

QIAN, B.-J. et al. The effects of gallic/ferulic/caffeic acids on colour intensification and anthocyanin stability. **Food Chemistry**, v. 228, p. 526–532, ago. 2017.

RIFFAULT, L. et al. Phytochemical analysis of *Rosa hybrida* cv. “Jardin de Granville” by HPTLC, HPLC-DAD and HPLC-ESI-HRMS: Polyphenolic fingerprints of six plant organs. **Phytochemistry**, v. 99, p. 127–134, mar. 2014.

ROCHA, J. R. DO A. S. DE C. et al. Elephant grass ecotypes for bioenergy production via direct combustion of biomass. **Industrial Crops and Products**, v. 95, p. 27–32, jan. 2017.

SAENZLOPEZ, R.; FERNANDEZZURBANO, P.; TENA, M. Development and validation of a capillary zone electrophoresis method for the quantitative determination of anthocyanins in wine. **Journal of Chromatography A**, v. 990, n. 1–2, p. 247–258, 21 mar. 2003.

SÁENZ-LÓPEZ, R.; FERNÁNDEZ-ZURBANO, P.; TENA, M. T. Analysis of aged red wine pigments by capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1052, n. 1–2, p. 191–197, out. 2004.

SAHA, S. et al. **Anthocyanin profiling using UV-vis spectroscopy and liquid chromatography mass spectrometry**. **Journal of AOAC International** Oxford University Press, , 2021.

SANGEETA, S. et al. Chemical Properties of Anthocyanins Sourced from Different Subtropical Fruits. Em: **Anthocyanins in Subtropical Fruits**. New York: CRC Press, 2023. p. 33–58.

SEGURA-CARRETERO, A. et al. Selective extraction, separation, and identification of anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa* L. using solid phase extraction-capillary

- electrophoresis-mass spectrometry (time-of-flight /ion trap). **ELECTROPHORESIS**, v. 29, n. 13, p. 2852–2861, jul. 2008.
- SHARMA, A. D. et al. Phytochemical analysis using GC-FID, FPLC fingerprinting, antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory activities analysis of traditionally used Eucalyptus globulus essential oil. **Drug Analytical Research**, v. 5, n. 1, p. 26–38, 30 jun. 2021.
- ŠIMERDOVÁ, B. et al. Evaluation of Anthocyanin Profiles in Various Blackcurrant Cultivars over a Three-Year Period Using a Fast HPLC-DAD Method. **Foods**, v. 10, n. 8, p. 1745, 29 jul. 2021.
- SINOPOLI, A.; CALOGERO, G.; BARTOLOTTA, A. Computational aspects of anthocyanidins and anthocyanins: A review. **Food Chemistry**, v. 297, p. 124898, nov. 2019.
- STREZOV, V.; EVANS, T. J.; HAYMAN, C. Thermal conversion of elephant grass (Pennisetum Purpureum Schum) to bio-gas, bio-oil and charcoal. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 17, p. 8394–8399, nov. 2008.
- STUPPNER, S. et al. Near-Infrared Spectroscopy as a Rapid Screening Method for the Determination of Total Anthocyanin Content in Sambucus Fructus. **Sensors**, v. 20, n. 17, p. 4983, 2 set. 2020.
- SUI, X.; DONG, X.; ZHOU, W. Combined effect of pH and high temperature on the stability and antioxidant capacity of two anthocyanins in aqueous solution. **Food Chemistry**, v. 163, p. 163–170, nov. 2014.
- TAN, J. et al. The Effects and Mechanisms of Cyanidin-3-Glucoside and Its Phenolic Metabolites in Maintaining Intestinal Integrity. **Antioxidants**, v. 8, n. 10, p. 479, 12 out. 2019.
- TROUILLAS, P. et al. Stabilizing and Modulating Color by Copigmentation: Insights from Theory and Experiment. **Chemical Reviews**, v. 116, n. 9, p. 4937–4982, 11 maio 2016.
- TURAK, F.; OZGUR, M. U. Simultaneous Determination of Allura Red and Ponceau 4R in Drinks with the Use of Four Derivative Spectrophotometric Methods and Comparison with High-Performance Liquid Chromatography. **Journal of AOAC INTERNATIONAL**, v. 96, n. 6, p. 1377–1386, 1 nov. 2013.
- VALLS, J. et al. **Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols**. **Journal of Chromatography A** Elsevier B.V., , 23 out. 2009.
- VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H.; KIM, H. K. **NMR-based metabolomics at work in phytochemistry**. *Phytochemistry Reviews*. **Anais...abr.** 2007.
- VIEIRA, G. S. et al. Determination of anthocyanins and non-anthocyanin polyphenols by ultra performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry (UPLC/ESI-MS) in jussara (Euterpe edulis) extracts. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 7, p. 2135–2144, 28 jun. 2017.
- WALLACE, T. C. Anthocyanins in Cardiovascular Disease. **Advances in Nutrition**, v. 2, n. 1, p. 1–7, 1 jan. 2011.

WANG, C.-H. et al. The Chemical Aspects of Raman Spectroscopy: Statistical Structure-Spectrum Relationship in The Analyses of Bioflavonoids. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 28, n. 2, p. 239–247, 15 jun. 2020.

XIAOWEI, H. et al. Measurement of total anthocyanins content in flowering tea using near infrared spectroscopy combined with ant colony optimization models. **Food Chemistry**, v. 164, p. 536–543, dez. 2014.

YAN, Q. et al. The elephant grass (*Cenchrus purpureus*) genome provides insights into anthocyanidin accumulation and fast growth. **Molecular Ecology Resources**, v. 21, n. 2, p. 526–542, 1 fev. 2021.

YAÑEZ-APAM, J. et al. Pharmacological Activities and Chemical Stability of Natural and Enzymatically Acylated Anthocyanins: A Comparative Review. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 5, p. 638, 23 abr. 2023.

ZENG-HUI, L.; HONG-BO, S. Comments: Main developments and trends of international energy plants. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 1, p. 530–534, jan. 2010.

ZHANG, Y.; BUTELLI, E.; MARTIN, C. Engineering anthocyanin biosynthesis in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 19, p. 81–90, jun. 2014.

ZHAO, C.-L. et al. Stability-increasing effects of anthocyanin glycosyl acylation. **Food Chemistry**, v. 214, p. 119–128, jan. 2017.

ZHAO, L. et al. Protective effect and mechanism of action of xanthan gum on the color stability of black rice anthocyanins in model beverage systems. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 3800–3807, dez. 2020.

ZHENG, X. et al. Extraction characteristics and optimal parameters of anthocyanin from blueberry powder under microwave-assisted extraction conditions. **Separation and Purification Technology**, v. 104, p. 17–25, fev. 2013.

ZHOU, Y. et al. Optimization and application of HPLC for simultaneous separation of six well-known major anthocyanins in blueberry. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 51, n. 10, p. 961–970, 2 nov. 2021.

ZIA UL HAQ, M.; RIAZ, M.; SAAD, B. **Anthocyanins and Human Health: Biomolecular and therapeutic aspects**. Cham: Springer International Publishing, 2016.

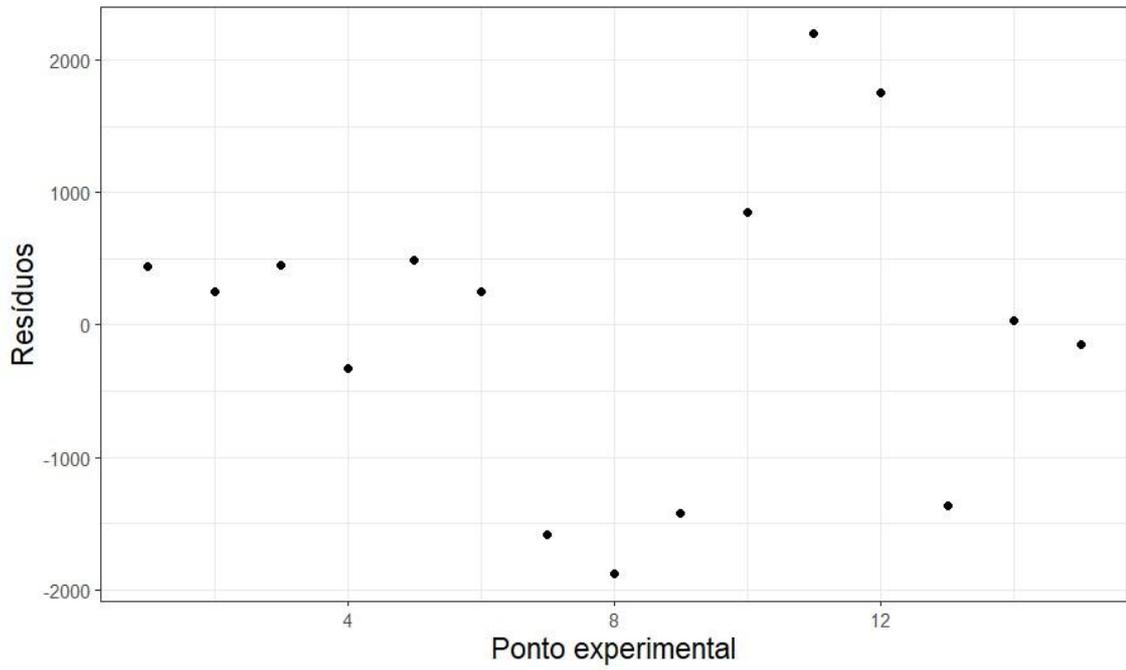
#### Material suplementar

**Tabela S1** – Parâmetros de valor central para os sinais obtidos pela análise de HPLC

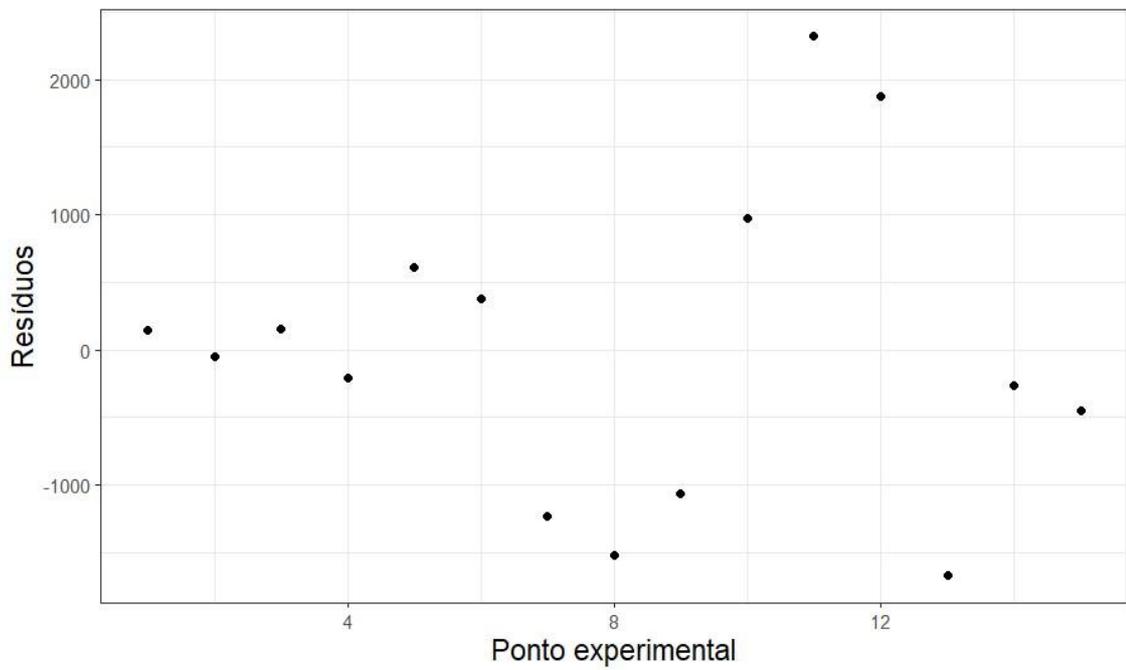
Grupo	Pico	Média	Desvio Padrão	RSD(%)
A	1	303.8009	43.77518	14.40917

A	2	3146.778	132.5625	4.212643
A	3	279.4842	17.97193	6.430394
A	4	69.31086	10.41702	15.02942
A	5	1218.834	2.895762	0.237585
B	1	297.3833	197.0283	66.254
B	2	3426.847	387.1611	11.29788
B	3	328.9033	40.07971	12.18586
B	4	85.61667	33.63228	39.2824
B	5	1324.9	138.1109	10.42425
C	1	218.3833	6.50311	2.977841
C	2	2585.63	222.3495	8.599432
C	3	265.1933	11.51102	4.340615
C	4	466.02	722.3017	154.9937
C	5	1225.305	95.8059	7.818943
D	1	480.0767	268.4732	55.92299
D	2	6402.317	628.7277	9.820315
D	3	542.9267	86.80208	15.98781
D	4	129.75	26.86589	20.70589
D	5	1167.077	843.3806	72.26437
E	1	207.4767	92.66079	44.66082
E	2	5117.503	746.194	14.58121
E	3	305.5033	19.92462	6.5219
E	4	114.7867	16.38595	14.27513
E	5	307.5833	79.26198	25.76927

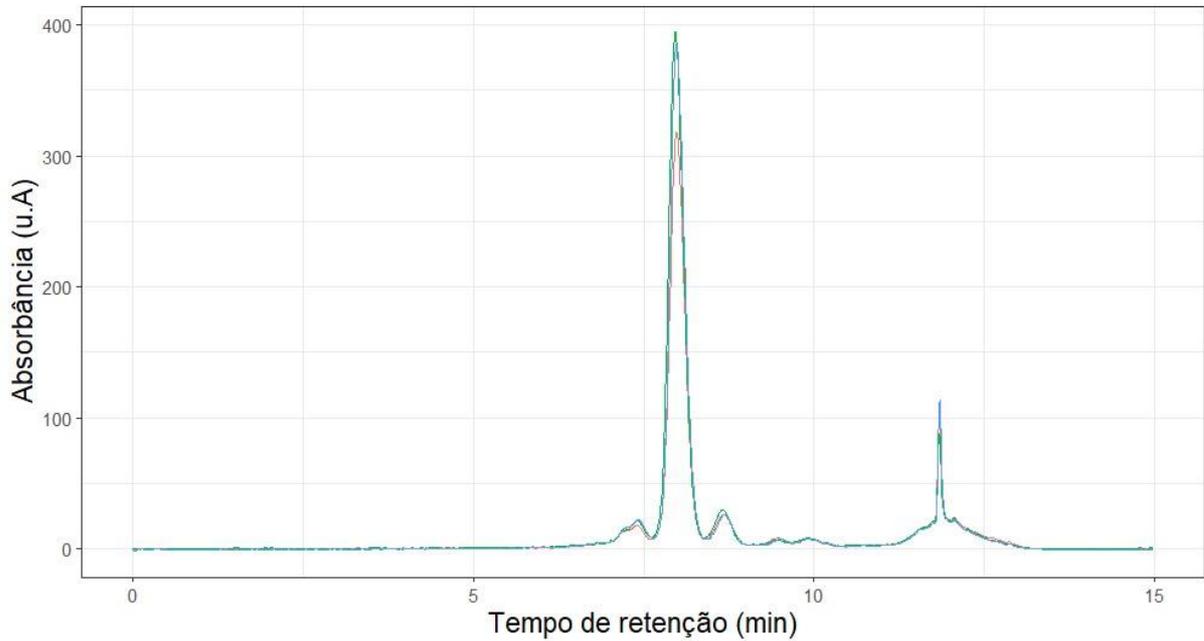
**Fonte:** Elaborado pelo autor (2024).

**Figura S1 – Resíduos da regressão Modelo Linear**

**Fonte:** Elaborado pelo autor (2024).

**Figura S2 – Resíduos da regressão Modelo Quadrático**

**Fonte:** Elaborado pelo autor (2024).

**Figura S3** – Cromatogramas ponto experimental 10:90 Água:EtOH

**Fonte:** Elaborado pelo autor (2024).

Condições de dependência modelo para misturas

$$x_1 + x_2 = 1 \quad (\text{I})$$

$$x_1^2 + 2x_1x_2 + x_2^2 = 1 \quad (\text{II})$$

Transformações algébricas modelo 1:

$$y' = b_0 + b_1x_1^2 + b_2x_2^2 + b_{12}x_1x_2$$

Utilizando (II) temos:

$$y' = (x_1^2 + 2x_1x_2 + x_2^2)b_0 + b_1x_1^2 + b_2x_2^2 + b_{12}x_1x_2$$

$$y' = (b_0 + b_1)x_1^2 + (b_0 + b_2)x_2^2 + (2b_0b_{12})x_1x_2$$

$$y' = b_1^*x_1^2 + b_2^*x_2^2 + b_{12}^*x_1x_2$$

Transformações algébricas modelo 2:

$$y' = b_0 + b_1x_1^2 + b_2x_2^2 + b_{12}x_1^2x_2^2$$

Utilizando (II) temos:

$$y' = (x_1^2 + 2x_1x_2 + x_2^2)b_0 + b_1x_1^2 + b_2x_2^2 + b_{12}x_1^2x_2^2$$

$$y' = (b_0 + b_1)x_1^2 + (b_0 + b_2)x_2^2 + 2b_0(x_1x_2 + b_{12}x_1^2x_2^2)$$

$$y' = b_1^*x_1^2 + b_2^*x_2^2 + b_3^*x_1x_2 + b_{12}^*x_1^2x_2^2$$

Transformações algébricas modelo 3:

$$y' = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2x_2 + b_{22}x_1x_2^2 + b_{12}x_1^2x_2^2$$

Utilizando (I) temos:

$$y' = (x_1 + x_2)b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2x_2 + b_{22}x_1x_2^2 + b_{12}x_1^2x_2^2$$

$$y' = (b_0 + b_1)x_1 + (b_0 + b_2)x_2 + b_{11}x_1^2x_2 + b_{22}x_1x_2^2 + b_{12}x_1^2x_2^2$$

$$y' = b_1^*x_1 + b_2^*x_2 + b_{11}x_1^2x_2 + b_{22}x_1x_2^2 + b_{12}x_1^2x_2^2$$