

OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E FLAVONÓIDES TOTAIS EM POLPA DE TOMATE

BÁRBARA R. **BANHARA**¹, EDUARDO **VICENTE**², ADRIANA B. **ALVES**³

Nº 0701009

RESUMO

Um planejamento experimental seqüencial foi realizado para determinar as condições ideais de extração de compostos fenólicos para as análises de fenóis totais e flavonóides totais. Depois de estabelecidas as condições ótimas, a recuperação e a repetibilidade do método otimizado foram avaliadas. As taxas de recuperação para fenóis totais do extrato foram de 105% e 103% para os dois níveis estudados; após a etapa de extração em fase sólida os resultados, para os mesmos níveis de adição, foram 103% e 98%. A recuperação na análise de flavonóides totais foi de 112% e 103%, para os dois níveis avaliados. O método mostrou boa repetibilidade, com coeficientes de variação de 3,2% para fenóis totais do extrato, 1,6% para fenóis totais após extração em fase sólida e 4,7% para flavonóides totais.

ABSTRACT

An experimental design was carried out to study the best conditions for analysis of phenolics compounds and total flavonoids in tomatoes. After established the optimum extraction conditions, the recovery and the repeatability were evaluated. The recovery rates for the two studied levels was about 105% and 103% for phenolic compounds on the extract and 103% and 98% after clean up. The recovery of total flavonoids determination was 112% e 103%, for the same levels of addition. The repeatability was evaluated by the coefficients of variation that were 3,2% for phenolic compound in the extract, 1,6% after *clean up*, and 4,7% for total flavonoids determination.

1. Bolsista CNPq: Graduação em Engenharia de Alimentos, FEA/UNICAMP, Campinas-SP, ✉ babi04@fea.unicamp.br

2. Orientador: Pesquisador, CENTRO DE QUÍMICA - ITAL, Campinas-SP

3. Colaborador: Assistente, CENTRO DE QUÍMICA - ITAL, Campinas - SP, ✉ drialves@ital.sp.gov.br.

1. INTRODUÇÃO

Compostos fenólicos são espécies orgânicas de ocorrência natural que possuem pelo menos um anel aromático com um ou mais grupos hidroxílicos ligados a ele (Escarpa & Gonzalez, 2001). Os flavonóides são compostos fenólicos de peso molecular intermediário, que têm ação antioxidante, reduzindo a peroxidação lipídica e o efeito dos radicais livres (Kinsella *et al.*, 1993). Algumas propriedades vêm sendo atribuídas aos flavonóides como prevenção de inflamação, alergias e câncer, além de reduzir a pressão arterial e regular o ritmo cardíaco. (Escarpa & Gonzalez, 2001).

Estudos recentes encontraram quantidades significativas de flavonóides em tomates. Quantidades maiores foram encontradas após a hidrólise ácida, indicando que a maior parte dos flavonóides presentes no tomate encontra-se sob a forma glicosídica, isto é, com alguma molécula de açúcar ligada à sua estrutura, onde o principal glicosídeo é a rutina (quercetina 3-ramnosilglicosídeo). Os flavonóides do tomate podem resistir aos processos industriais, sendo encontrados em diversos produtos processados (Stewart *et al.*, 2000).

Existe grande variedade entre os métodos encontrados na literatura para extração de compostos fenólicos, sobretudo no que diz respeito aos solventes e aos procedimentos de extração. Os solventes mais utilizados são metanol, etanol e acetona, puros ou em soluções aquosas podendo estas serem acidificadas. Diferentes técnicas de extração foram empregadas, desde uma simples extração em extrator Soxhlet até procedimentos mais complexos que fazem uso de vários equipamentos como agitadores, ultra-som e centrífugas. Alguns métodos acrescentam uma etapa de extração em fase sólida (*clean up*) para purificar e/ou concentrar os flavonóides.

O presente trabalho propõe a adequação dos métodos disponíveis para a quantificação de compostos fenólicos/flavonóides em tomate e derivados.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. MATERIAIS

Reagentes: Reagente para fenol segundo Folin-Ciocalteu, carbonato de sódio p.a., nitrito de sódio p.a., cloreto de alumínio p.a., hidróxido de sódio p.a.. Reagentes grau HPLC/UV: Metanol, etanol absoluto, acetona. Padrões: Ácido gálico, quercetina e rutina (Sigma-Aldrich). Equipamentos: Espectrofotômetro de UV/Vis Varian Cary 50. Amostras: polpa de tomate concentrada e posteriormente liofilizada em laboratório.

2.2. MÉTODOS

2.2.1. Determinação do teor de compostos fenólicos totais (fenóis totais)

A determinação de fenóis totais foi feita segundo metodologia de Singleton & Rossi, 1965, adaptada por Kim *et al.*, 2003: Transferir 1,0 mL do extrato fenólico para um tubo de ensaio com 9,0 mL de água deionizada. Adicionar 1,0 mL do reagente de Folin-Ciocalteu e misturar. Após 5 minutos, adicionar 10,0 mL de carbonato de sódio a 7% p/v. Em seguida, completar o volume para 25 mL com água deionizada. Agitar por 20 segundos e incubar à temperatura ambiente no escuro por 90 min. Fazer a leitura da absorbância em 750 nm contra um branco. Quantificar contra uma curva-padrão de ácido gálico e expressar os resultados em mg de equivalente de ácido gálico/100g (mg EAG/100g).

2.2.2. Determinação do teor de flavonóides totais

Para a determinação de flavonóides totais foi utilizada a metodologia segundo Zhishen *et al.*, 1999: Transferir 1,0 mL do extrato fenólico para um tubo de ensaio com 4,0 mL de água deionizada. Adicionar 0,3 mL de NaNO₂ 5% e, após 5 min, 0,3 mL de AlCl₃ 10%. Após 6 min, adicionar 2 mL de NaOH 2M e completar o volume para 10 mL com água deionizada. Agitar por 20 segundos. Fazer a leitura da absorbância a 510 nm contra um branco. Quantificar contra uma curva-padrão de quercetina ou rutina e expressar os resultados em mg de equivalente de quercetina (ou rutina)/100g (mg EQ (ER)/100g).

2.2.3. Obtenção dos extratos fenólicos

A partir dos métodos descritos por Price *et. al.*, 1999 e Berhow, 2002 elaborou-se o procedimento analítico (Figura 1) que foi submetido ao planejamento experimental e posterior validação.

2.2.4. Planejamento experimental e validação

Adotou-se uma estratégia de planejamento experimental seqüencial, segundo Rodrigues & lemma, 2005. Para a seleção das variáveis utilizou o delineamento de Plackett & Burman (PB12) e, posteriormente, um delineamento composto central rotacional (DCCR). O planejamento experimental foi gerado e analisado através do software Statistica versão 5.0. Após a definição das condições ótimas, foram avaliadas a repetibilidade e a recuperação. Para a determinação da precisão, foram realizadas 8 repetições analíticas independentes do procedimento de extração. A exatidão do método foi avaliada através das taxas de recuperação obtidas em 2 níveis de adição.

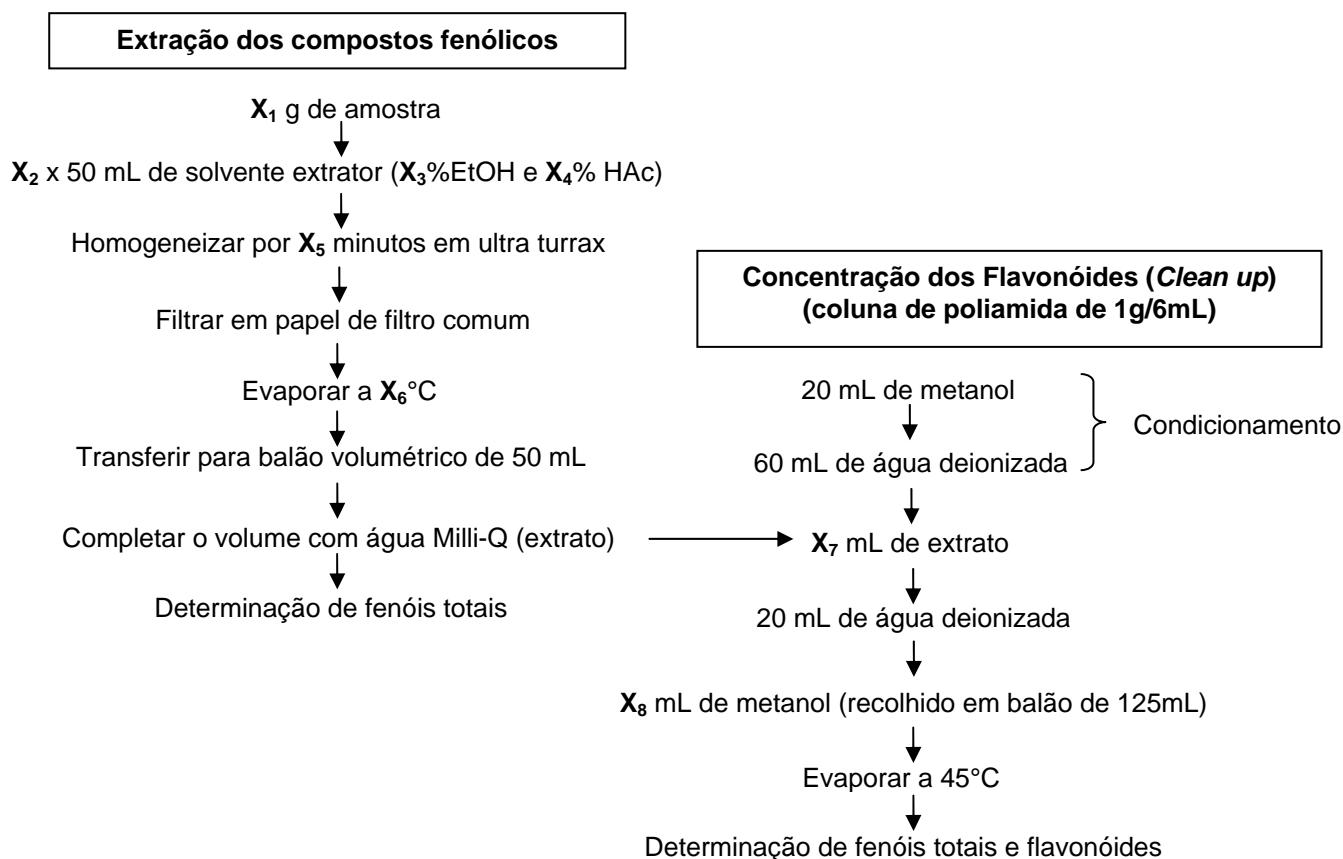


Figura 1. Fluxograma do método a ser otimizado com as variáveis que foram testadas em negrito.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Planejamento experimental I (Plackett e Burman - PB12) – Seleção das variáveis

As variáveis apresentadas na Figura 1 foram testadas nas seguintes faixas: massa de amostra (X_1) entre 2 e 5 g; número de extrações (X_2) entre 1 e 3; concentração de etanol (X_3) entre 60 e 80%; concentração de ácido acético (X_4) entre 0 e 1%; tempo de extração (X_5) entre 0,5 e 1,5 min; temperatura de extração (X_6) entre 40 e 50°C; volume de extrato para o *clean up* (X_7) entre 10 e 25 mL; e volume de metanol (X_8) entre 40 e 60 mL. Os resultados mostraram que, para a análise de fenóis totais, apenas o número de extrações (X_2) e o volume de amostra (X_7) utilizado no *clean up* foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$). Já para a determinação de flavonóides totais as variáveis estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram a massa de amostra (X_1), o número de extrações (X_2) e a concentração de etanol no solvente extrator (X_3).

3.2. Planejamento experimental II (DCCR) – Otimização das variáveis

Após o primeiro planejamento, algumas variáveis foram fixadas: $X_4 = 0,1\%$; $X_5 = 1,5$ min; $X_6 = 45^\circ\text{C}$; $X_7 = 20$ mL e $X_8 = 50$ mL. As demais foram alteradas a fim de se encontrar a condição ótima. As novas faixas testadas foram: massa de amostra (X_1) entre 1 e 3 g; número de extrações (X_2) entre 1 e 5; concentração de etanol (X_3) entre 50 e 70%.

O modelo quadrático proposto foi válido apenas para as determinações de fenóis totais do extrato e flavonóides totais. Desta forma, foram geradas as curvas de contorno para estes modelos (Figuras 2 e 3) e a partir destas foram determinadas as condições ótimas de análise: massa de amostra = 1,5 g; número de extrações = 3; e concentração de etanol no solvente extrator = 60%.

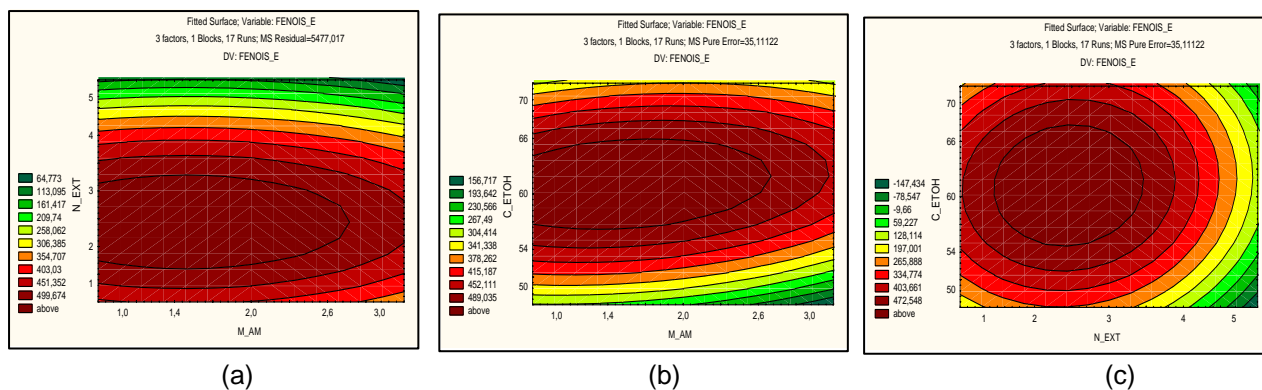


Figura 2. Curvas de contorno dos testes de fenóis do extrato: (a) massa de amostra *versus* número de extrações, (b) massa de amostra *versus* concentração de etanol, (c) número de extrações *versus* concentração de etanol.

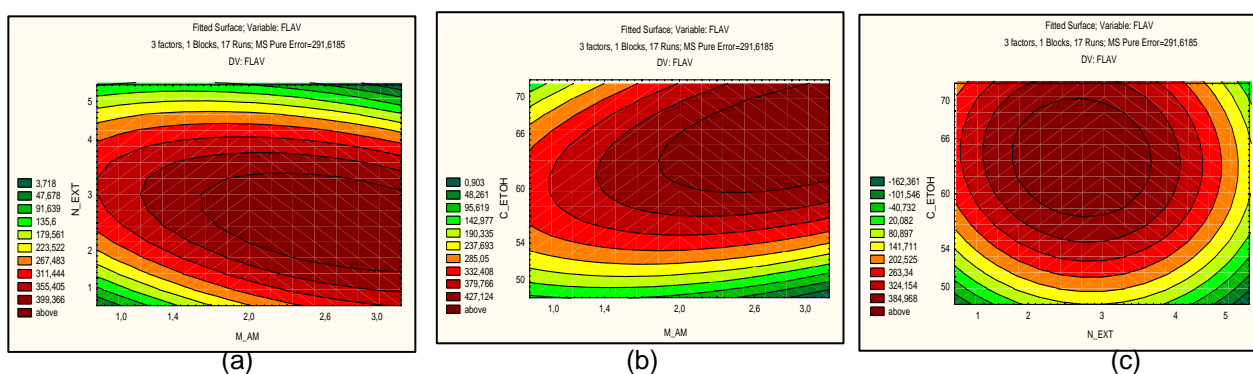


Figura 3. Curvas de contorno dos testes de flavonóides totais: (a) massa de amostra *versus* número de extrações, (b) massa de amostra *versus* concentração de etanol, (c) número de extrações *versus* concentração de etanol.

3.3. Validação do método

A metodologia otimizada foi validada nos parâmetros exatidão e precisão para as determinações de compostos fenólicos totais (antes e após o *clean up*) e flavonóides totais. No teste de repetibilidade para fenóis totais do extrato foi obtido um CV de 3,2%, após o *clean up* o CV foi de 1,6% para fenóis totais e 4,7% para flavonóides totais. Todos estes valores ficaram abaixo do CV máximo aceitável, segundo Horwitz, 1982. A metodologia otimizada também apresentou boa exatidão para a determinação de fenóis totais com médias de recuperação entre 103 e 105% para a análise do extrato e entre 98 e 103% para a determinação após o *clean up*. Estes resultados estão próximos aos obtidos por Singleton & Rossi, 1965, que obtiveram uma recuperação média de 100,5%, e aos resultados obtidos por Marinova *et al.*, 2005, que determinaram uma recuperação de 97% para a quantificação

de fenóis totais. As taxas de recuperação de flavonóides totais também foram de 112 e 103%, estando acima da encontrada por Marinova *et al.*, 2005 (96%).

4. CONCLUSÃO

Através da estratégia seqüencial de planejamentos, foi possível otimizar uma metodologia de extração de compostos fenólicos para a determinação simultânea de fenóis e flavonóides totais em polpa de tomate. O método otimizado foi validado, apresentou boa repetibilidade e bons níveis de recuperação.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERHOW, M. A. Modern analytical techniques for flavonoid determination. In: BUSLIG, B. S.; MANTHEY, J. A. (ed.) *Flavonoids in the living cell*. New York: Klusher Academic, p. 61-76, 2002. (Adv. Exp. Med. Biol., v. 505).
- ESCARPA, A. & GONZALEZ, M. C. An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 57-139, 2001.
- KIM, D-O.; JEONG, S. W.; LEE, C. Y. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. **Food Chemistry**, v. 81, p. 321-326, 2003.
- KINSELLA J. E.; FRANKEL E.; GERMAN B.; KANNER J. Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. **Food Technology**, v. 47, n. 4, p. 85-89, 1993.
- HORWITZ, W. Evaluation on analytical methods used for regulation of foods and drugs. **Analytical Chemistry**, v. 54, n.1, p. 67-76, 1982.
- MARINOVA, D.; RIBAROVA, F.; ATANASSOVA, M. Total phenolics and total flavonoids in bulgarian fruits and vegetables. **Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy**, v. 40, n. 3, p. 255-260, 2005.
- PRICE, K., R.; PROSSER, T.; RICHETIN, A. M. F.; RHODES, M. J. C. A comparison of the flavonol content and composition in dessert, cooking and cider-making apples; distribution within the fruit and effect of juicing. **Food Chemistry**, v. 66, p. 489-494, 1999.
- RODRIGUES, M. I. & IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: Uma estratégia seqüencial de planejamentos**. 1ª Ed. Campinas, SP – Casa do Pão Editora, 2005.
- STEWART, A. J.; BOZONNET, S.; MULLEN, W.; JENKINS, G.I.; LEAN, M. E. J.; CROZIER, A. Occurrence of flavonóis in tomatoes and tomato-based products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 2663-2669, 2000.
- SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Jr. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-158, 1965.
- ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v. 64, p. 555-559, 1999.