

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM TECIDOS VEGETAIS

ELIANA BADIALE FURLONG^{*}
ELIANE COLLA
DANILA SÁ BORTOLATO
ANA LUIZA MUCCILLO BAISCH
LEONOR ALMEIDA DE SOUZA-SOARES

RESUMO

O objetivo do trabalho é padronizar uma metodologia para determinação do conteúdo de fenóis totais em amostras de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill), bagaço de laranja (*Citrus sinensis*, Osbeck) e polpa de berinjela (*Solanum melongina*, L.). Estudos quanto a suas atividades funcionais, e mais especificamente a hipocolesterolêmica, vêm sendo desenvolvidos na Fundação Universidade Federal do Rio Grande, RS. Foram testados três procedimentos quanto a sua capacidade de extrair e clarificar extratos dos tecidos para quantificação de fenóis, empregando a propriedade redutora com o reagente de Folin-Ciocalteu. Os resultados mostraram que adaptações num procedimento que consiste em extração metanólica a frio, partição com hexano e clarificação com Ba(OH)_2 e ZnSO_4 apresentaram valores de recuperação e coeficientes de recuperação em bagaço de laranja, polpa de berinjela e erva-mate de 89%, 117% e 70% e 9,85%; 4,99% e 6,32%, respectivamente. Nas amostragens dos tecidos estudados, os teores de fenóis variaram entre 353 e 2137 μg fenol. g^{-1} de amostra, sendo a ordem crescente de conteúdo: polpa de berinjela, bagaço de laranja e erva-mate.

PALAVRAS-CHAVE: fenóis totais, erva-mate, berinjela, laranja.

ABSTRACT

The objective of the work was to standardize a method for determination of total phenolic compound in ilex (*Ilex paraguariensis*, St. Hill), orange wastes (*Citrus sinensis*, Osbeck) and egg-plant pulp (*Solanum melongina*, L.) samples. Their functional activities and specifically hypocholesterolemic properties were studied at the Fundação Universidade Federal do Rio Grande, RS, Brazil. Three procedures were tested, their capacities for extracting, clarifying and quantifying total phenolic compounds, using their reduction properties, with Folin-Ciocalteu reagent. The results were shown by a procedure of adaptation consisting in a cold methanolic extraction, partition to hexan and clarification with Ba(OH)_2 a ZnSO_4 . The

Dep. de Química – FURG; E-mail: dqmebf@super.furg.br

recovery levels and coefficients of variation for orange wastes, egg-plants pulp and ilex were 89%; 117%; 70% and 10%; 5%; 6% respectively. Different samples resulted in total phenolic levels between 353 and 2137 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. The level increased from egg-plant pulp, orange wastes and ilex.

KEY-WORDS: phenolics, ilex, orange and egg-plant.

1 – INTRODUÇÃO

Atualmente vem sendo observado um crescente interesse no estudo de alimentos que desempenhem mais que a função puramente nutritiva, ou seja, apresentem atividades funcionais, tais como prevenir ação de radicais livres, hipercolesterolemia, hipertensão e outros. Na composição destes alimentos encontram-se compostos químicos que, mesmo em pequenas quantidades, podem exercer efeitos preventivos e/ou curativos em distúrbios fisiológicos (1, 7, 10).

Entre as estruturas químicas às quais se atribui atividade antioxidante e conseqüentemente sua função fisiológica, destacam-se os compostos fenólicos tais como ácidos fenólicos derivados do ácido hidroxicinâmico e flavonóides (3, 6, 8, 10).

As substâncias fenólicas podem aparecer livres ou na forma de glicosídeos. Poliglucosídeos são muito solúveis em água e pouco solúveis em solventes orgânicos apolares. A posição do açúcar na estrutura fenólica influi na solubilidade e em outras propriedades físico-químicas. As agliconas apresentam uma grande variedade de solubilidade e estabilidade. Estas diferenças podem ser usadas para separá-los, quantificá-los e desenvolver estudos de suas atividades fisiológicas (1, 3, 5, 8).

A determinação dos níveis de compostos fenólicos totais em tecidos vegetais é a etapa inicial de qualquer investigação de funcionalidade fisiológica para posterior estímulo ao consumo, visando a prevenção de doenças crônico-degenerativas. A capacidade redutora desses compostos pode ser uma das propriedades utilizadas para nortear a quantificação inicial, porém, em tecidos vegetais, a presença de carboidratos e outros interferentes com as mesmas característica requer metodologias confiáveis para tais avaliações (1, 9).

Os hábitos nutricionais da população da região sul do Brasil vêm motivando um estudo sistematizado que avalia o efeito hipocolesterolêmico, atribuído pela cultura popular a alguns alimentos que compõem o hábito local: a erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill), a laranja (*Citrus sinensis*, Osbeck) e a berinjela (*Solanum melongina*, L.), relacionando-o ao seu conteúdo em compostos fenólicos (3, 7, 10).

O estudo biológico gerou a necessidade de se dispor de metodologia analítica que permitisse inicialmente conhecer o teor total desses compostos, e que se ajustasse aos diferentes componentes químicos dos tecidos vegetais que compunham o estudo. Esses aspectos nortearam o trabalho, que objetivou padronizar uma metodologia para a determinação de compostos fenólicos totais nos três tecidos vegetais em estudo, baseada no poder redutor desses compostos.

Para tal, foram avaliados e adaptados procedimentos de extração, clarificação e quantificação empregando o reagente de Folin-Ciocalteu (FC), explorando os diferentes aspectos analíticos que poderiam interferir nos resultados.

2 – MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – Preparação das amostras

As amostras de bagaço de laranja foram coletadas em estabelecimentos comerciais, que empregavam as variedades disponíveis no mercado de hortifrutigranjeiros da região sul do Brasil para produção de suco. Esses resíduos foram secos em estufas com circulação de ar, a 60°C, até atingirem valores de umidade de 12%. O material foi homogeneizado em moinhos de faca até uma granulometria de 60 mesh.

Para constituir as matrizes representativas da berinjela, foram realizadas coletas em feiras, supermercados e mercados de exemplares em diferentes estádios de conservação. Todos foram descascados, secos e homogeneizados até apresentar as mesmas condições de umidade e granulometria que os resíduos de laranja.

Para a composição de amostras analíticas de erva-mate, foram coletadas representativamente (1% do total disponível no estabelecimento amostrado) três marcas comerciais do produto, tomando como critério a preferência do consumidor. Estas foram homogeneizadas para serem analisadas com a mesma granulometria que as demais (60-80 mesh).

De todas as matrizes, foram realizadas quatro amostragens em diferentes épocas do ano. Em todas os procedimentos de preparação seguiram o descrito anteriormente.

2.2 – Padronização do procedimento para quantificação de fenóis totais

A tirosina, a quercetina e a rutina foram escolhidas para serem avaliadas quanto à capacidade de reduzir o reagente de Folin-Ciocalteu em meio alcalino e usadas como indicadoras da presença de compostos fenólicos em vegetais. Para isto, foram preparadas soluções em séries

de concentrações que variavam entre 2 e 20 $\mu\text{g. ml}^{-1}$, alcalinizadas com carbonato de sódio 2% em NaOH 0,1M e reagente de F.-C. diluído 1:2 com água e leitura a 660nm após 10 minutos.

Os parâmetros adotados como critério para escolha do composto fenólico a ser usado como padrão foram comprimento de onda de máxima absorção, linearidade e declividade da curva padrão e estabilidade do complexo formado com o reagente de derivação.

2.3 – Escolha do método de extração

Foram avaliados três procedimentos mais freqüentemente mencionados na literatura (1, 3, 5, 8) para extração de compostos fenólicos em diferentes tecidos vegetais, cujos princípios consistiam em:

1. – extração com álcool etílico, empregando o método de Soxleht, seguida da purificação do extrato em coluna cromatográfica de sílica e carvão ativo (1:0,5);

2. – extração com álcool etílico em extrator de Soxleht por seis horas e purificação dos extratos através de partição com éter de petróleo e acetona, seguida da precipitação dos fenóis com soluções de acetato de chumbo básico;

3. – extração a frio com álcool metílico, utilizando agitadores magnéticos, seguida de partição com hexano e clarificação com hidróxido de bário e sulfato de zinco.

O conteúdo de fenóis totais, das diferentes matrizes e procedimentos testados, foi determinado empregando-se o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu estabelecido. O fluxograma que aparece na Figura 1 ilustra os procedimentos de extração e purificação avaliados.

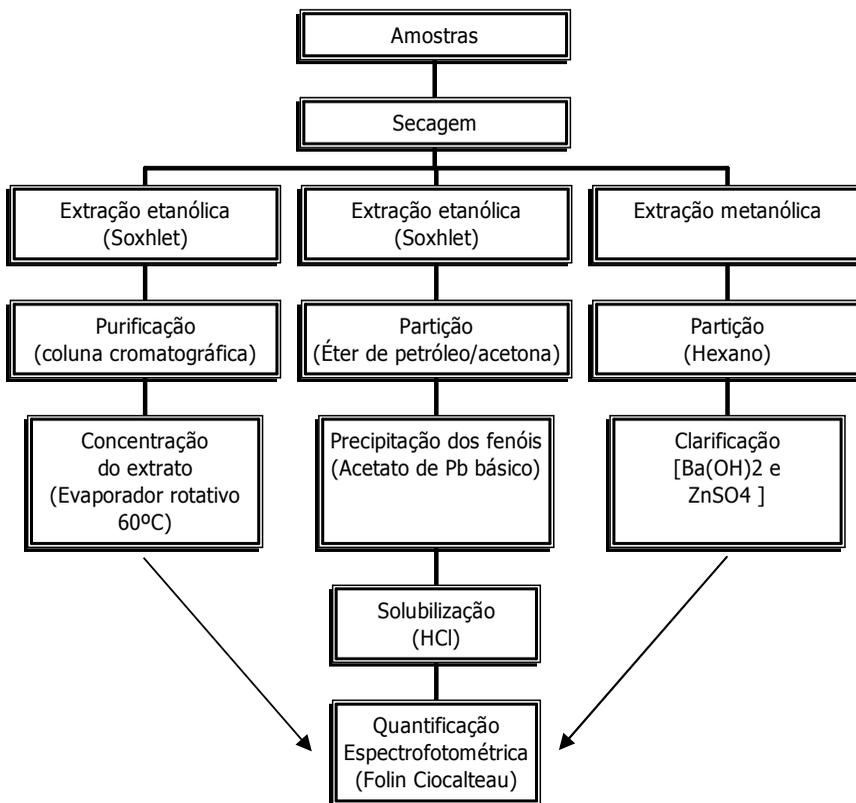


FIGURA 1 – Fluxograma dos procedimentos de extração de compostos fenólicos

2.3 – Recuperação do procedimento de extração metanólica a frio

O procedimento 3 foi o que apresentou os menores coeficientes de variação nos níveis de fenóis determinados, respectivamente, 14%, 19% e 8%. Este último, também o mais simples, foi escolhido para ter sua exatidão avaliada. Esta foi testada determinando-se a recuperação de quercetina adicionada na forma de solução metanólica em amostras analíticas antes do início do processo de extração.

Os níveis de concentração de quercetina utilizados para a determinação da porcentagem de recuperação, adicionando níveis específicos para berinjela e laranja (1,5; 3,0 e 5,0 mg.g⁻¹) e erva-mate (3,0; 7,5 e 15 mg.g⁻¹), foram escolhidos conforme o limite de detecção do método colorimétrico e os valores mais frequentes dos fenóis mencionados na literatura.

Esse mesmo procedimento foi testado quanto a sua repetibilidade em seis experimentos para as amostras dos tecidos vegetais preparados de acordo com o procedimento descrito no item referente ao preparo de amostras.

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 – Escolha do padrão para quantificação dos fenóis nos extratos

A literatura menciona que mais freqüentemente são encontrados em porções vegetais comestíveis a rutina, a quercetina e fenóis mais simples, como os ácidos gálico, caféico e tirosina (1, 2, 6, 8). A diferença estrutural entre eles indica a possibilidade de apresentarem diferentes potenciais de óxido-redução, que precisam ser avaliados antes de se adotar um como o padrão para a determinação dos níveis totais presentes em uma dada amostra.

Considerando isto, foram avaliados os compostos de base estrutural fenólica tirosina, quercetina e rutina quanto a sua capacidade de serem empregados como padrão de determinação de teores totais. Os resultados da atuação destes sobre o reagente de F.-C. em diferentes concentrações aparecem na Tabela 1.

TABELA 1 – Propriedades das curvas padrão obtidas com reagente de F.-C.

Padrão	Conc. $\mu\text{g. ml}^{-1}$	Faixa de linearidade	Correlação (%)	Absort/de $\mu\text{g. ml}^{-1}$	Complexo* (minutos)
Tirosina	2 a 20	85 – 32	99	0,047	50
Quercetina	2 a 20	80 – 37	97,2	0,043	45
Rutina	2 a 20	83 – 28	96,9	0,036	45

* estabilidade do complexo formado com o reagente de Folin-Ciocalteu.

Os resultados da tabela acima indicam que a tirosina, que apresentou uma faixa de linearidade adequada dos valores da transmitância, declividade que não difere das demais (correlação próxima a 1) e estabilidade do complexo, é, portanto, adequada como padrão para quantificação dos fenóis redutores presentes em extratos metanólicos obtidos dos tecidos vegetais quando se emprega o reagente de F.C. Além disso, alguns autores mencionam que a tirosina, o ácido clorogênico e seus derivados são comumente encontrados em tecidos parenquimatosos de vegetais consumidos na dieta, semelhantes aos do presente trabalho (1, 2, 6, 7).

3.2 – Avaliação dos procedimentos de extração

Os procedimentos de extração e clarificação dos compostos fenólicos testados foram aqueles freqüentes nos relatos da literatura, para determinação dos teores totais ou para posterior separação das diferentes famílias de redutores fenólicos presentes (1, 3, 5, 6, 8, 9). Na Figura 1, o fluxograma ilustra os experimentos realizados nessa etapa.

Os coeficientes de variação determinados para os diferentes procedimentos, o número de etapas e a simplicidade foram os critérios adotados para a escolha de um deles para a determinação de fenóis totais em tecido de folha (erva-mate), polpa (berinjela) e bagaço (laranja).

A Tabela 2 mostra os níveis detectados usando o procedimento colorimétrico do reagente de F.-C. em meio alcalino na etapa quantitativa.

TABELA 2 – Teores de fenóis totais detectados pelos diferentes métodos e seus coeficientes de variação (CV%).

Método	Res. laranja mg fenóis. g ⁻¹	C.V. (%)	Berinjela mg fenóis. g ⁻¹	C.V. (%)	Erva-mate mg fenóis. g ⁻¹	C.V. (%)
1	2,19	12,4	-		3,17	15,7
2	0,16	27,1	0,48	32,3	7,61	27,8
3	5,30	6,1	10,82	4,4	8,50	7,7

Obs: os resultados referem-se à média de seis determinações.

A observação dos resultados da tabela acima demonstra o esperado, diferentes formas e associações de fenóis nos tecidos, pois cada um apresentou uma resposta característica em cada procedimento de extração estudado.

Comparativamente, o procedimento 1 não permitiu a detecção dos compostos fenólicos em berinjela e mostrou os menores valores para os demais tecidos, levando a considerar que estes ficaram retidos na coluna cromatográfica empregada na etapa de purificação.

O procedimento 2, que consistiu na obtenção dos fenóis por precipitação, apresentou os maiores coeficientes de variação, o que pode indicar que outros compostos foram arrastados pelo agente precipitante e que estes interferem na quantificação. O maior número de passos necessários para obtenção dos analitos também pode justificar a maior variabilidade dos resultados.

No último procedimento, observaram-se os maiores níveis de fenóis determinados, seguidos pelos menores coeficientes de variação. Tendo em vista este resultado, a simplicidade do método e o fato de que os níveis mais altos poderiam ser decorrentes da presença de

interferentes, optou-se por avaliar a exatidão do método através do estudo de sua recuperação.

A quercetina foi escolhida para a determinação dos níveis de recuperação dos fenóis, pelo fato de a literatura citá-la como presente nos diferentes tecidos vegetais estudados, por sua absorvidade não diferir consideravelmente do padrão de tirosina, e por possuir solubilidade mais similar aos fenóis de maior peso molecular. Essas características possivelmente aumentariam as possibilidades de avaliar adequadamente a efetividade do sistema de extração e limpeza (1, 2).

O gráfico da Figura 2 mostra os valores de recuperação encontrados nos diferentes níveis de quercetina adicionados nas amostras analíticas dos tecidos estudados. Pode-se observar que estes apresentaram resultados em torno de 80% para os resíduos de laranja, de 100% para a berinjela e 70% para a erva-mate.

Quando se adicionaram níveis em torno de 3mg. g^{-1} de amostra de erva-mate, a recuperação obtida foi de 56%, o que indica que a exatidão do método, para esse material, possui uma faixa mais restrita de linearidade. O procedimento foi adotado para a determinação, pois dados de literatura mencionam conteúdos mais elevados desses compostos em erva-mate, necessitando, para seu emprego, de tomadas de alíquotas menores desta matriz para a etapa quantitativa (10).

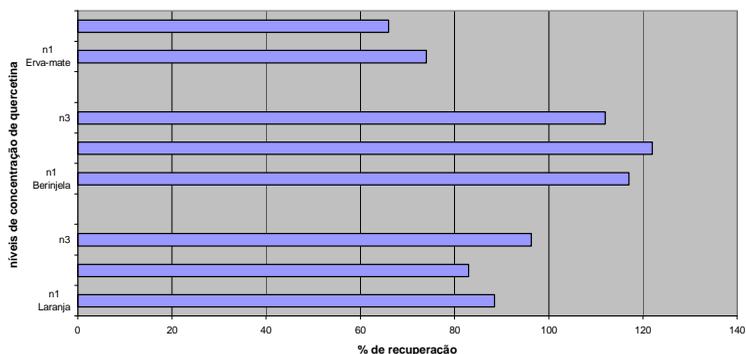


FIGURA 2 – Porcentagem de recuperação nos três níveis de concentração de quercetina (mg.g^{-1}) em extratos metanólicos

3.3 – Procedimento proposto para quantificação de fenóis totais em tecidos vegetais

Pesar $5,0 (+/- 0,01)$ g de amostra de tecido vegetal, com 12% de umidade, homogeneizado para uma granulometria entre 60 e 80 mesh. Em recipiente adequado, adicionar 20 ml de metanol e agitar durante

uma hora em agitador magnético ou “shaker”. Interromper a agitação por 15 minutos e reiniciar, após adição de 5 ml de metanol, durante 30 minutos.

Filtrar o homogeneizado, empregando papel de filtro Wathman nº 1, para um balão volumétrico de 25 ml, completando o volume com metanol. Passar o extrato para um funil de separação e lavar três vezes com 10 ml de hexano.

Clarificar o extrato aquoso com 5 ml de solução de hidróxido de bário 0,3M e 5 ml de solução de sulfato de zinco 5%. Deixar em repouso durante 20 minutos e centrifugar. Tomar 2 ml de extrato clarificado e adicionar 2 ml de solução de carbonato de sódio 2% em NaOH 0,1 M e 1 ml de reagente de F.-C. diluído 1:2. Após 10 minutos a 37°C, realizar a leitura da amostra em espectrofotômetro em 660nm.

Para quantificar os teores de fenóis, empregar uma curva padrão de tirosina com concentrações variando entre 2 e 20 $\mu\text{g. ml}^{-1}$ de metanol.

Os resultados da concentração de fenóis totais obtidos a partir de extrato metanólico são apresentados na Tabela 3 e são decorrentes da média de quatro amostragens dos tecidos estudados.

TABELA 3 – Concentração de compostos fenólicos em bagaço de laranja, polpa de berinjela e erva-mate

Amostras	$\mu\text{g fenol. G}^{-1}$	C V (%)
Bagaço de laranja	697,70	10,07
Polpa de berinjela	352,70	14,67
Erva-mate	2136,98	5,43

4 – CONCLUSÕES

- O método de extração metanólica a frio, partição com hexano e clarificação com hidróxido de bário e sulfato de zinco foi escolhido pela simplicidade de execução e pelos teores de recuperação obtidos para o bagaço de laranja, berinjela e erva-mate, que foram respectivamente 89%, 117% e 70%.
- A repetibilidade pode ser considerada satisfatória para o mesmo método, sendo que os coeficientes de variação dos resultados de fenóis totais para a laranja, berinjela e erva-mate foram respectivamente 10%; 5% e 6%.
- Nas amostragens dos tecidos estudados, os teores de fenóis avaliados variaram entre 353 e 2137 $\mu\text{g fenol /g}$ de amostra, sendo a ordem crescente de conteúdo, polpa de berinjela, bagaço de laranja e erva-mate.

REFERÊNCIAS

1. ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, K. R.; RYAN, D. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *Analyst*, n. 125, p. 989-1009, 2000.
2. BAJAJ, K. L.; DIEZ DE BETHENCOURT, C. A.; JUNQUEIRA, B.; GONZALEZ SAN JOSE, M. L. In vitro enzymic oxidation of apple phenols. *Journal Food Science and Technology*, v. 34, n. 4, p. 296-302, 1997.
3. CHEN, Z. Y.; CHAN, P. T.; ZHANG, Z.; CHUNG, H. Y. Antioxidative activity of green tea catechin extract compared with that of Rosemeay extract. *Journal Analytical Official Chemistry Society*, v. 75, n. 9, p. 327-333, 1998.
4. COSTA, A. F. *Farmacognosia: farmacognosia experimental*. v. 3. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1972. 512p.
5. DOMÍNGUEZ, Xorge Alejandro. *Métodos de investigación fitoquímica*. México: Limusa, 1973. 295p.
6. EWALD, C.; MODIG, S. E.; JOHAANSSON, K.; SJOHOLM, I.; AKESSON, B. Effect of processing on major flavonoids in processed onions, green beans, and peas. *Food Chemistry*, n. 64, p. 231-235, 1999.
7. JORGE, P. A. R.; NEYRA, R. M. O.; ALMEIDA, E.; BRAGNOLO, N. Efeito da berinjela sobre os lípidos plasmáticos, a peroxidação lipídica e a reversão da disfunção endotelial na hipercolesterolemia experimental. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*, v. 70, n. 2, p. 87-91, 1998.
8. SWAIN, T.; HILLIS, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica* I Quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal Science and Food Agricultural*, n. 10, p. 63-68, 1959.
9. TORRES, A. M.; MAU LASTOVICKA, T. REZAALYAN, R. Total phenolics and high-performance liquid chromatography of phenolic acids of avocado. *Journal Agricultural Food Chemistry*, n. 35, p. 921-925, 1987.
10. WINGE, Helga et al. *Erva-mate: biologia e cultura no Cone Sul*. Porto Alegre: Ed. da UFRGS, 1995. 410p.