

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**COMPOSTOS ANTIOXIDANTES EM POLPA DE TOMATE:  
EFEITO DO PROCESSAMENTO E DA ESTOCAGEM**

**ADRIANA BARRETO ALVES**

Engenheira de Alimentos

**Profa. Dra. NEURA BRAGAGNOLO**

Orientadora

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos

Campinas, 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

AL87c      Alves, Adriana Barreto  
Compostos antioxidantes em polpa de tomate: efeito do  
processamento e da estocagem / Adriana Barreto Alves. -- Campinas,  
SP: [s.n.], 2009.

Orientador: Neura Bragagnolo  
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.Faculdade  
de Engenharia de Alimentos

1. Compostos antioxidantes. 2. Polpa de tomate. 3. Flavonóides.  
4. Atividade antioxidante. 5. Processamento. I. Bragagnolo,  
Neura. II. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de  
Engenharia de Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Título em inglês: Antioxidant compounds in tomato paste: effect of processing and storage

Palavras-chave em inglês (Keywords): Antioxidant compounds, Tomato paste, Flavonoids,  
Antioxidant activity, Processing

Titulação: Doutor em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Neura Bragagnolo

Adriana Zerlotti Mercadante

Célia Maria de Sylos

Eduardo Vicente

Lilian Regina Barros Mariutti

Data de defesa: 28/08/2009

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

## **BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Neura Bragagnolo  
FEA-UNICAMP  
(Orientadora)

---

Prof. Dra. Adriana Zerlotti Mercadante  
FEA-UNICAMP  
(Membro)

---

Prof. Dra. Célia Maria de Sylos  
FCFar - UNESP  
(Membro)

---

Dr. Eduardo Vicente  
CCQA - ITAL  
(Membro)

---

Dra. Lilian Regina Barros Mariutti  
LANAGRO/SP - MAPA  
(Membro)



Ao meu grande e querido amigo  
Fernando da Fonseca Rodrigues (*in  
memoriam*).



## AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar, por estar sempre à minha frente iluminando meu caminho.

Aos meus pais, José Roberto e Marinalva, por serem a minha base, o meu exemplo e por todo apoio que me deram durante a realização deste trabalho.

Ao meu noivo Fábio, o amor da minha vida, por estar sempre ao meu lado, com muita paciência e amor, me incentivando e me apoiando.

À toda minha família, que sempre me cercou de amor e carinho.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, ao Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos do ITAL e ao Departamento de Ciência de Alimentos da Universidade de Copenhague, por proporcionarem a realização deste trabalho.

À Predilecta Alimentos Ltda, na pessoa do Sr. Antônio Carlos, que prontamente aceitou colaborar com este trabalho, e também a todos os funcionários que nos receberam tão bem e muito ajudaram na coleta das amostras.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro ao projeto, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estágio de doutorado.

À minha orientadora, Prof. Neura Bragagnolo, pela orientação e oportunidades de intercâmbio e aprendizado.

Aos professores Leif Skibsted e Vibeke Orlie, pela orientação durante o estágio na Universidade de Copenhague.

À banca examinadora, pelas valiosas contribuições a este trabalho.

Aos amigos do ITAL. Ao pesquisador Eduardo Vicente, por sempre acreditar no meu trabalho e me apoiar. Às minhas grandes companheiras, Camila, Cláudia e Ercília,

que seguraram a onda nos seis meses em que estive fora. À pesquisadora Marta Gomes, responsável pelas análises de vitaminas, e a todos os técnicos e auxiliares que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Às estagiárias Bárbara, Bruna e Paula, que muito ajudaram na realização das análises.

À minha grande amiga Rita, pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida.

Aos amigos da Unicamp, em especial à Lilian e à Gislaine, pela ajuda nos assuntos acadêmicos.

Aos amigos da Universidade de Copenhague, Bente, Henriette, Tina, e todos os outros que tornaram este período da minha vida uma experiência inesquecível.

Sem vocês, nada disso seria possível. Muito obrigada.

Adriana



## SUMÁRIO

<b>RESUMO GERAL .....</b>	<b>XV</b>
<b>GENERAL SUMMARY .....</b>	<b>XVII</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>3</b>
<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>3</b>
<b>COMPOSTOS ANTIOXIDANTES NO TOMATE: EFEITO DO PROCESSAMENTO E USO EM ALIMENTOS .....</b>	<b>3</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>5</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>6</b>
<b>2. COMPOSTOS FENÓLICOS.....</b>	<b>8</b>
2.1. Flavonóides.....	9
2.2. Métodos de análise.....	13
2.2.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) .....	13
2.3. Propriedades antioxidantes.....	19
<b>3. EFEITO DO PROCESSAMENTO E DA ESTOCAGEM SOBRE OS COMPOSTOS ANTIOXIDANTES DO TOMATE .....</b>	<b>21</b>
<b>4. USO DE PRODUTOS DE TOMATE COMO ANTIOXIDANTE EM CARNE DE FRANGO PROCESSADA A ALTA PRESSÃO .....</b>	<b>24</b>
4.1. Efeito da alta pressão sobre a oxidação lipídica em carne de frango e uso de antioxidantes naturais .....	24
4.2. ESR e a oxidação lipídica .....	26
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>27</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>28</b>

<b>CAPÍTULO 2 .....</b>	<b>35</b>
<b>USE OF RESPONSE SURFACE METHODOLOGY FOR OPTIMIZATION AND VALIDATION OF EXTRACTION CONDITIONS FOR FLAVONOIDS QUANTIFICATION IN TOMATO PASTE USING LC-DAD-MS/MS .....</b>	<b>35</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>37</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>38</b>
<b>MATERIALS AND METHODS .....</b>	<b>39</b>
Chemicals and Standards .....	39
Samples.....	39
Extraction Procedure .....	40
Experimental Design.....	40
Total Phenolics Assay.....	42
Total Flavonoids Assay .....	42
Flavonoids by HPLC .....	42
Method Validation .....	43
HPLC-ESI-MS Analysis.....	44
Statistical Analysis .....	45
<b>RESULTS AND DISCUSSION .....</b>	<b>45</b>
Optimization of Extraction Conditions.....	45
Validation of Total Phenolics and Total Flavonoids .....	49
Validation of Flavonoids by HPLC .....	49
Flavonoids in tomato samples.....	54
<b>ACKNOWLEDGEMENT .....</b>	<b>55</b>
<b>LITERATURE CITED .....</b>	<b>55</b>
<b>SUPPORTING INFORMATION .....</b>	<b>58</b>

<b>CAPÍTULO 3 .....</b>	<b>61</b>
<b>EFEITO DO PROCESSAMENTO E DA ESTOCAGEM SOBRE OS COMPOSTOS ANTIOXIDANTES EM POLPA DE TOMATE CONCENTRADA.....</b>	<b>61</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>63</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>64</b>
<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>66</b>
Amostras.....	66
Reagentes e padrões.....	67
Caracterização físico-química .....	68
Extração dos compostos fenólicos e concentração dos flavonóides .....	69
Determinação dos compostos fenólicos totais .....	70
Determinação de flavonóides totais .....	70
Determinação de flavonóides por CLAE .....	71
Determinação de ácido ascórbico por CLAE.....	72
Determinação de licopeno e $\beta$ -caroteno por CLAE .....	72
Determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS.....	73
Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH .....	74
Análise estatística.....	74
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>75</b>
<b>EFEITO DO PROCESSAMENTO.....</b>	<b>75</b>
Caracterização físico-química .....	75
Ácido ascórbico, compostos fenólicos e atividade antioxidante do extrato fenólico.....	77
Flavonóides e atividade antioxidante do extrato concentrado .....	81
Carotenóides e atividade antioxidante da fração lipofílica .....	87
<b>EFEITO DA ESTOCAGEM.....</b>	<b>90</b>
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>98</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>99</b>

<b>CAPÍTULO 4 .....</b>	<b>103</b>
<b>ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PHENOLICS FROM TOMATO DETERMINED BY IN-VITRO AND MODEL SYSTEMS: EFFECT OF INDUSTRIAL PROCESSING.....</b>	<b>103</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>105</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>106</b>
<b>MATERIALS AND METHODS .....</b>	<b>107</b>
Chemicals and Standards .....	107
Samples.....	107
Phenolics Extraction .....	109
Total Phenolics Assay.....	109
ABTS Radical Cation Decolorization Assay .....	109
DPPH Radical Assay .....	110
ESR Assay Based on Reduction of Fremy’s Salt Radical.....	110
Antioxidant Activity in Liposomes .....	111
Statistical Analysis .....	112
<b>RESULTS AND DISCUSSION .....</b>	<b>112</b>
Total Phenolics .....	112
Antioxidant Activity.....	114
<b>ACKNOWLEDGEMENT .....</b>	<b>121</b>
<b>LITERATURE CITED .....</b>	<b>122</b>

<b>CAPÍTULO 5 .....</b>	<b>125</b>
<b>ANTIOXIDANT PROTECTION OF HIGH-PRESSURE PROCESSED MINCED CHICKEN MEAT BY INDUSTRIAL TOMATO PRODUCTS .....</b>	<b>125</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>127</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>128</b>
<b>MATERIALS AND METHODS .....</b>	<b>128</b>
Tomato samples .....	128
Total phenolics content .....	129
Carotenoids content .....	129
Preparation of chicken meat samples .....	130
High-pressure processing .....	131
Storage .....	131
Electron spin resonance spectroscopy .....	131
Analysis of thiobarbituric acid reactive substances.....	132
Vitamin E determination .....	133
Color measurement .....	133
Statistical analysis.....	133
<b>RESULTS AND DISCUSSION .....</b>	<b>133</b>
<b>ACKNOWLEDGEMENTS.....</b>	<b>142</b>
<b>REFERENCES .....</b>	<b>143</b>
<b>CONCLUSÃO GERAL .....</b>	<b>145</b>



## RESUMO GERAL

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que o consumo de frutas e vegetais tem um efeito benéfico na redução da incidência de várias doenças como o câncer e doenças cardiovasculares. Esse efeito tem sido relacionado com a presença de compostos antioxidantes nesses alimentos, sobretudo os flavonóides. O tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) é um dos vegetais mais consumidos no mundo, *in natura* ou processado, e também é rico em compostos antioxidantes como carotenóides, vitaminas e flavonóides. Os alimentos processados, frequentemente, são tidos como menos nutritivos que os alimentos *in natura*, devido, principalmente, ao fato de que alguns nutrientes são degradados pelas altas temperaturas empregadas. Assim, torna-se importante avaliar o efeito do processamento e da estocagem sobre os compostos antioxidantes do tomate e também sobre sua atividade antioxidante.

Um planejamento experimental foi realizado para otimizar as condições de extração dos compostos fenólicos e concentração dos flavonóides em polpa de tomate concentrada. O método otimizado foi validado para as determinações de compostos fenólicos totais e flavonóides totais por espectrofotometria e também para a determinação de flavonóides por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os métodos espectrofotométricos foram validados nos parâmetros repetibilidade e exatidão. A determinação de flavonóides por CLAE foi validada nos parâmetros seletividade, linearidade, precisão, exatidão e sensibilidade.

O efeito do processamento e da estocagem sobre os compostos antioxidantes do tomate foi avaliado. Foram analisados os teores de compostos fenólicos totais, flavonóides totais, flavonóides por CLAE, ácido ascórbico, licopeno e  $\beta$ -caroteno, bem como a atividade antioxidante das frações hidrofílicas e lipofílicas pelos métodos ABTS e

DPPH. Verificou-se que, durante o processamento, em geral, não houve perdas dos compostos antioxidantes. Durante o armazenamento, observou-se grande degradação do ácido ascórbico, porém, os demais compostos mantiveram-se estáveis, e não foi observada nenhuma alteração na atividade antioxidante.

O efeito do processamento sobre a atividade antioxidante do extrato fenólico foi também avaliado por espectroscopia de ressonância de elétron-spin (ESR) usando sal de Fremy e em sistema-modelo de lipossomas. Esses e os outros resultados de atividade antioxidante obtidos previamente foram correlacionados com os teores de compostos fenólicos totais a fim de melhor estudar os mecanismos de ação antioxidante envolvidos.

A ação antioxidante das amostras de tomate, coletadas em diferentes etapas do processamento, foi testada em carne de frango processada sob alta pressão a 300, 600 e 800 MPa e armazenada sob refrigeração por 15 dias. A adição de 0,30% de subproduto (pele + semente) ou 0,10% de polpa concentrada resultou em uma fase lag de 6 dias para a formação de produtos secundários da oxidação lipídica na carne de frango processada a 600 MPa. O subproduto apresentou efeito similar também para a carne de frango processada a 800 MPa.

O resultado deste trabalho mostrou que, embora o processamento e a estocagem de polpa de tomate possam ter degradado substâncias mais sensíveis como o ácido ascórbico, os demais compostos antioxidantes não sofreram alterações deletérias, e, para alguns, o processamento foi benéfico, aumentando sua disponibilidade. De forma semelhante, as atividades antioxidantes dos produtos processados foram iguais ou maiores que as das amostras *in natura* e se mantiveram estáveis durante o armazenamento por um ano. Além disso, o subproduto do processamento pode ter boas chances de aplicação como antioxidante em outros produtos alimentícios.



## GENERAL SUMMARY

Epidemiological studies have shown that the consumption of fruits and vegetables has a beneficial effect on reducing some diseases like cancer and cardiovascular diseases. These benefits have been associated to the presence of antioxidant compounds in those foods, mainly flavonoids. Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) is one of the most worldwide consumed vegetables, *in natura* or processed. Moreover, tomato is rich in many antioxidant compounds like carotenoids, vitamins and flavonoids. Frequently, thermoprocessed foods are taken as less healthy than *in natura* foods, mainly because nutrient losses caused by high temperature. So, it is very important to evaluate the effect of processing and storage on tomato antioxidant compounds and on their antioxidant activity.

A response surface methodology was used to optimize the phenolics extraction conditions and flavonoids concentration from concentrated tomato paste. The optimized method was validated for total phenolics and total flavonoids spectrophotometric determinations and also for flavonoids quantification by high performance liquid chromatography (HPLC). The spectrophotometric methods were validated for repeatability and recovery. Flavonoids determination by HPLC was validated for selectivity, linearity, precision, recovery and sensibility.

Processing and storage effect on tomato antioxidant compounds was evaluated. Total phenolics, total flavonoids, flavonoids by HPLC, ascorbic acid, lycopene and  $\beta$ -carotene were determined and also the antioxidant activity of hydrophilic and lipophilic fractions were studied using ABTS and DPPH methodologies. It was observed that during processing, in general, there was no loss of the antioxidant compounds present in tomato.

During the storage time there was a great loss of ascorbic acid, but all other antioxidant compounds were stable and no changes in their antioxidant activity were observed.

The effect of tomato paste processing on the antioxidant activity of phenolic extract was also analyzed through electron-spin resonance spectroscopy (ESR) using Fremy's salt, and in a liposome model-system. These and the other antioxidant activity results previously obtained were correlated with the total phenolics content found in the samples in order to better study the antioxidant mechanisms involved.

The antioxidant action of tomato samples, collected at different processing steps, was analyzed during 15 days chill storage of high-pressure treated chicken meat balls at 300, 600, and 800 MPa. Addition of 0.30% tomato waste (skin + seeds) or of 0.10% final tomato paste to minced meat led to a lag phase of 6 days for formation of secondary oxidation products in meat treated at 600 MPa. The waste product seemed especially efficient in protecting chicken meat pressurized at 800 MPa, as a notably lower rate of formation of secondary oxidation products was found.

This work showed that, although processing and storage of tomato paste might result in loss of the most labile substances like ascorbic acid, the other antioxidant compounds were not affected, and, for some of them, processing increased their availability. Similarly, the antioxidant activities of final products were equal to or greater than the *in natura* ones and remained unaltered during one year storage. In addition, waste material may have good chances of application as antioxidant in other foods.

## INTRODUÇÃO GERAL

Estudos epidemiológicos têm demonstrado consistentemente que há uma associação positiva entre o consumo de frutas, verduras e legumes com a redução da taxa de mortalidade por doenças do coração, câncer e outras doenças degenerativas. Recentemente, esses benefícios têm sido associados com a presença de substâncias antioxidantes nesses alimentos, como vitaminas, carotenóides e compostos fenólicos como os flavonóides. Além disso, a população está cada vez mais preocupada em consumir alimentos que tragam benefícios à saúde.

O tomate é um alimento que contém muitos compostos antioxidantes como vitaminas C e E, carotenóides (licopeno e  $\beta$ -caroteno) e compostos fenólicos, principalmente flavonóides. É também um dos vegetais mais consumidos no mundo, tanto *in natura* quanto processado. No Brasil, a produção anual de tomates gira em torno de 3,5 milhões de toneladas, sendo que 2/3 desse total são destinados ao consumo de mesa e 1/3 ao processamento industrial. Assim, o tomate é uma importante fonte de ingestão de compostos antioxidantes na dieta humana e também pode ser uma importante fonte de antioxidantes naturais para a indústria alimentícia.

O processamento de alimentos, muitas vezes, é tido como responsável pela perda de seu valor nutricional, em particular, devido às altas temperaturas empregadas. No entanto, muitos compostos, como os flavonóides e o licopeno, além de resistirem ao processamento térmico, sendo encontrados em diversos produtos processados, podem ter sua disponibilidade aumentada durante o processamento.

Para avaliar adequadamente a ação antioxidante dos compostos fenólicos, é necessário primeiro identificar e quantificar os compostos presentes em um determinado produto. Depois, usando métodos distintos, determinar a capacidade dos diferentes

antioxidantes presentes nesse produto de sequestrar radicais livres. Deve-se também avaliar a habilidade dos antioxidantes em inibir ou interromper a oxidação lipídica em sistemas-modelo relevantes. Para completar, é necessário realizar estudos de estocagem usando os antioxidantes analisados incorporados a produtos alimentícios.

Diante do exposto, os objetivos deste trabalho foram: (1) otimizar e validar um método de extração dos compostos fenólicos e concentração dos flavonóides do tomate para as determinações de compostos fenólicos totais e flavonóides totais por espectrofotometria e para a quantificação de flavonóides por cromatografia líquida de alta eficiência; (2) avaliar o efeito do processamento e da estocagem de polpa de tomate concentrada sobre os teores de fenóis totais, flavonóides, ácido ascórbico, licopeno e  $\beta$ -caroteno, bem como sobre a atividade antioxidante dos extratos hidrofílicos e lipofílicos; (3) avaliar o efeito do processamento sobre a atividade antioxidante dos extratos fenólicos (hidrofílicos) por meio de espectroscopia de ressonância de elétron-spin (ESR) e sistema-modelo de lipossomas; e (4) investigar a ação antioxidante dos produtos de tomate adicionados à carne de frango processada sob alta pressão e armazenada sob refrigeração por 15 dias.

## **CAPÍTULO 1**

### **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **COMPOSTOS ANTIOXIDANTES NO TOMATE: EFEITO DO PROCESSAMENTO E USO EM ALIMENTOS**



## RESUMO

O tomate, um dos vegetais mais consumidos no mundo, é uma rica fonte de antioxidantes na dieta humana, com destaque para os flavonóides. Os flavonóides representam a maior parte dos compostos fenólicos e podem ser encontrados em praticamente todos os alimentos de origem vegetal. Na literatura, encontram-se diversos métodos para a identificação e quantificação dos flavonóides. Entretanto, é importante observar que um mesmo método dificilmente é adequado à extração dos flavonóides de diferentes matrizes. Os compostos fenólicos são potentes antioxidantes, agindo como interceptadores de radicais livres, agentes quelantes de metais e retardadores de peroxidação lipídica. Estudos recentes têm mostrado que os antioxidantes presentes no tomate, sobretudo os flavonóides, resistem ao processamento térmico podendo ser encontrados em diversos produtos processados. No mundo, crescem o interesse por alimentos minimamente processados e a busca por novas tecnologias capazes de oferecer segurança microbiológica sem perda das características nutricionais dos alimentos. Dentre essas tecnologias, destaca-se o uso da alta pressão hidrostática. No processamento de carne de frango, porém, um dos efeitos negativos dessa tecnologia é a indução da oxidação lipídica. Uma maneira de minimizar esse efeito é fazer uso de antioxidantes naturais. A técnica de espectroscopia de ressonância de elétron-spin tem se mostrado uma grande aliada no estudo dos primeiros eventos relacionados com a oxidação lipídica.

## 1. INTRODUÇÃO

O tomate pertence à família *Solanaceae* e é comumente denominado *Lycopersicon esculentum* Miller. A família *Solanaceae* é grande e diversificada, compreendendo mais de 3000 espécies, e é extensivamente usada como fonte de alimentos, especiarias e plantas medicinais. Nessa família estão incluídos alimentos importantes como o próprio tomate, a batata, o pimentão e a berinjela (SLIMESTAD *et al.*, 2008).

O tomateiro é originário da região andina, do norte do Chile até o Peru. No século XV, foi levado para o México, onde foi domesticado, e daí introduzido na Europa. Para o Brasil, foi trazido na época da colonização, mas seu cultivo só teve grande expansão depois das imigrações nas regiões Sudeste e Sul. A partir de 1970, o cultivo do tomateiro expandiu sua fronteira para todos os estados brasileiros (MAKISHIMA, 2003).

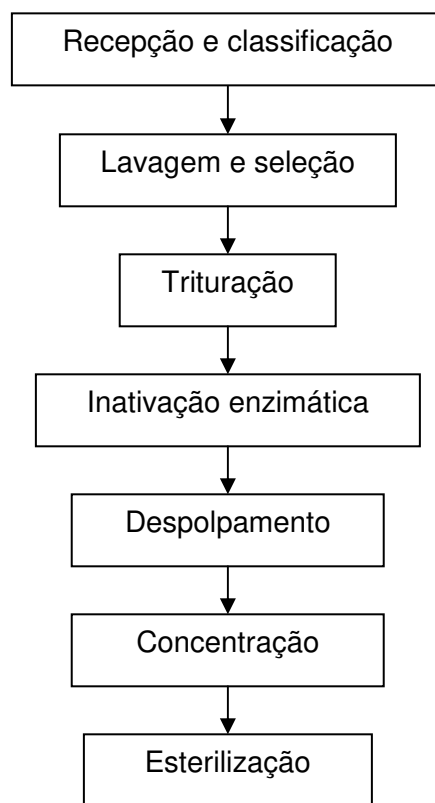
Hoje, o tomate é um dos vegetais mais consumidos no mundo, tanto na forma *in natura* quanto sob a forma de produtos processados. O processamento do tomate inclui várias etapas (**Figura 1**), dando origem a produtos variados, tais como polpa, extrato, molhos e ketchup. No Brasil, a produção anual de tomates é de aproximadamente 3,5 milhões de toneladas, sendo que cerca de 2/3 desse total são destinados ao consumo de mesa e 1/3 ao processamento industrial (CAMARGO, 2006). Em 2007, o Brasil produziu 3.364.438 toneladas de tomate, sendo o nono maior produtor mundial (FAO, 2009).

O tomate é uma importante fonte de  $\beta$ -caroteno, vitamina C, vitamina E, flavonóides e licopeno (WILLCOX *et al.*, 2003). A ingestão de tomate e produtos derivados de tomate tem sido associada a uma diminuição do risco de doenças cardiovasculares e também de vários tipos de câncer, sobretudo câncer de pulmão, estômago e próstata (GIOVANNUCCI, 1999; WILLCOX *et al.*, 2003). Frequentemente, esses benefícios têm sido atribuídos à presença de licopeno nesses alimentos.



Entretanto, um benefício direto do licopeno ainda não foi totalmente provado e a ação de outros compostos presentes no tomate, sozinhos ou interagindo com o licopeno, deve ser considerada (GIOVANNUCCI, 1999).

Dentre os demais compostos antioxidantes presentes no tomate, os flavonóides têm despertado grande interesse dos pesquisadores devido ao fato de atuarem direta e indiretamente sobre vários sistemas geradores de radicais livres (WILLCOX *et al.*, 2003).



**Figura 1.** Fluxograma básico de processamento de tomate.

## 2. COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos são espécies orgânicas de ocorrência natural que possuem pelo menos um anel aromático com um ou mais grupos hidroxílicos (ESCARPA & GONZALEZ, 2001).

Por se tratar de um grupo muito grande, com mais de 8.000 compostos já identificados, os compostos fenólicos podem ser classificados segundo diferentes critérios. Quanto à sua estrutura básica, por exemplo, eles podem ser divididos em fenóis simples, benzoquinonas, ácidos fenólicos, acetofenonas, ácidos fenilacéticos, ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropenos, cumarinas, cromonas, naftoquinonas, xantonas, estilbenos, antraquinonas, flavonóides, lignanas e ligninas (BRAVO, 1998; WOLLGAST & ANKLAM, 2000). No entanto, de uma maneira mais simplificada e para uma melhor compreensão, as principais classes de compostos fenólicos podem ser divididas de acordo com o peso molecular como mostra a **Tabela 1** (ESCARPA & GONZALEZ, 2001).

A classe dos compostos fenólicos de baixo peso molecular compreende os ácidos hidroxibenzóicos e os ácidos hidroxicinâmicos. Os principais representantes dos hidroxibenzóicos são os ácidos vanílico, gálico, elágico e salicílico e dos hidroxicinâmicos são os ácidos cumárico, caféico, ferúlico, sinápico e clorogênico. Nas plantas, esses ácidos têm importante papel na germinação da semente e no crescimento da mesma (ESCARPA & GONZALEZ, 2001).

Já a classe dos flavonóides, compostos fenólicos de peso molecular intermediário, compreende o maior número de compostos e pode ser dividida em, pelo menos, sete sub-classes: flavonas (apigenina, luteolina), flavonóis (kaempferol, quercetina, miricetina), flavanonas (naringenina, hesperidina), flavanóis ((+)-catequina, (-)-epicatequina), antocianidinas (apigenidina, cianidina), isoflavonas (genisteína, daidzeína) e chalconas (BRAVO, 1998; ESCARPA & GONZALEZ, 2001; WOLLGAST & ANKLAM, 2000).

Entre os compostos fenólicos de alto peso molecular estão os taninos condensados e os taninos hidrolizáveis (ESCARPA & GONZALEZ, 2001).

**Tabela 1.** Principais classes de compostos fenólicos em função do peso molecular.

Peso molecular	Estrutura	Classe	Subclasse	Exemplos
Baixo <sup>1</sup>	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	Ácidos hidroxibenzoicos		vanílico, gálico, elágico, salicílico.
	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Ácidos hidroxicinâmicos		cumárico, caféico, ferúlico, sinápico, clorogênico.
Intermediário <sup>1</sup>	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	Flavonóides	Antocianidinas	apigenidina, cianidina
			Flavonóis	kaempferol, quercetina, miricetina
			Flavanóis	(+)-catequina, (-)-epicatequina
			Flavanonas	naringenina, hesperidina
			Flavonas	apigenina, luteolina
			Isoflavonas	genisteína, daidzeína
Alto <sup>2</sup>	(C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> ) <sub>n</sub>	Taninos hidrolizáveis		
	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>	Taninos condensados		

<sup>1</sup> Fração fenólica solúvel; <sup>2</sup> fração fenólica não solúvel.

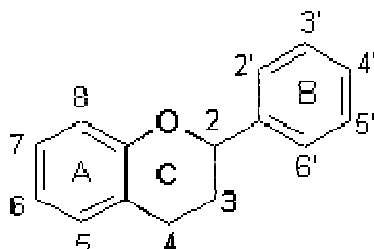
Fonte: Escarpa & Gonzalez (2001).

## 2.1. Flavonóides

Dentre os compostos fenólicos, os flavonóides constituem o grupo mais comum e mais largamente distribuído entre os vegetais (BRAVO, 1998).

Os flavonóides são derivados da benzopirona, sendo constituídos por um anel fenólico e um pirano (HEIM *et al.*, 2002). Comumente, a estrutura básica desses compostos é conhecida como difenilpropano (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) em referência aos dois anéis

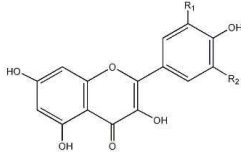
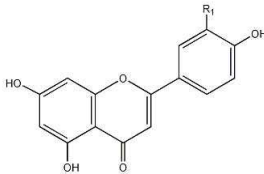
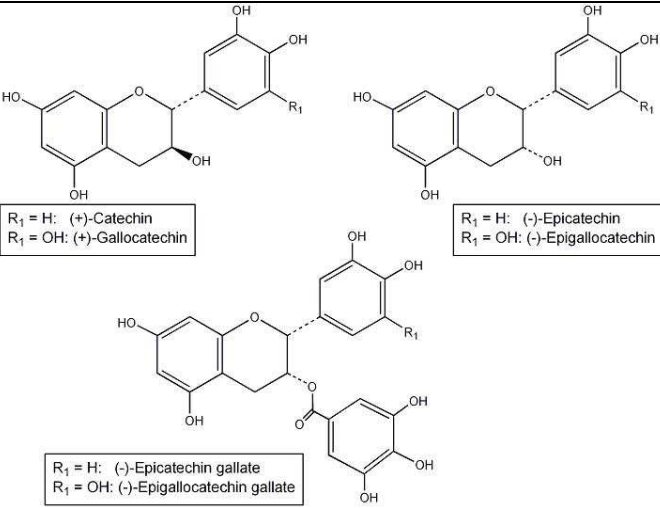
aromáticos ligados por meio de três carbonos que usualmente formam um heterociclo oxigenado (**Figura 2**) (COOK & SAMMAN, 1996; BRAVO, 1998; PIETTA, 2000).




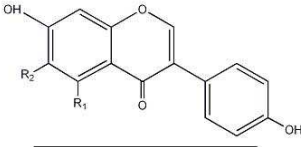
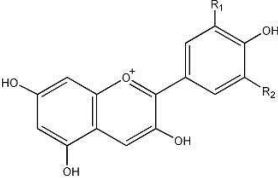
**Figura 2.** Estrutura básica dos flavonóides.

Os flavonóides diferem entre si pelo modo como os grupos hidroxilas, metoxilas e glicosídicos estão ligados à estrutura básica e pela conjugação entre os anéis A- e B- (HEIM *et al.*, 2002). A **Tabela 2** mostra os principais flavonóides e suas estruturas.

**Tabela 2.** Principais subclasses dos flavonóides e suas estruturas.

Subclasse	Estrutura
Flavonóis	 <div data-bbox="878 558 1065 625" style="border: 1px solid black; padding: 2px;"> <p> <math>R_1 = H; R_2 = H</math>: Kaempferol  <math>R_1 = OH; R_2 = H</math>: Quercetin  <math>R_1 = OH; R_2 = OH</math>: Myricetin  <math>R_1 = OCH_3; R_2 = H</math>: Isorhamnetin                 </p> </div>
Flavonas	 <div data-bbox="932 932 1045 978" style="border: 1px solid black; padding: 2px;"> <p> <math>R_1 = H</math>: Apigenin  <math>R_1 = OH</math>: Luteolin                 </p> </div>
Flavanóis	 <div data-bbox="656 1268 850 1314" style="border: 1px solid black; padding: 2px;"> <p> <math>R_1 = H</math>: (+)-Catechin  <math>R_1 = OH</math>: (+)-Gallocatechin                 </p> </div> <div data-bbox="1105 1268 1312 1314" style="border: 1px solid black; padding: 2px;"> <p> <math>R_1 = H</math>: (-)-Epicatechin  <math>R_1 = OH</math>: (-)-Epigallocatechin                 </p> </div> <div data-bbox="699 1520 954 1566" style="border: 1px solid black; padding: 2px;"> <p> <math>R_1 = H</math>: (-)-Epicatechin gallate  <math>R_1 = OH</math>: (-)-Epigallocatechin gallate                 </p> </div>

**Tabela 2.** Principais subclasses dos flavonóides e suas estruturas (continuação).

Sub-classe	Estrutura
Flavanonas	 <div data-bbox="885 583 1101 646" style="border: 1px solid black; padding: 2px;"> <p>R<sub>1</sub> = H; R<sub>2</sub> = OH; Naringenin                      R<sub>1</sub> = OH; R<sub>2</sub> = OH; Eriodictyol                      R<sub>1</sub> = OH; R<sub>2</sub> = OCH<sub>3</sub>; Hesperetin</p> </div>
Isoflavonas	 <div data-bbox="865 955 1088 1024" style="border: 1px solid black; padding: 2px;"> <p>R<sub>1</sub> = H; R<sub>2</sub> = H; Daidzein                      R<sub>1</sub> = OH; R<sub>2</sub> = H; Genistein                      R<sub>1</sub> = H; R<sub>2</sub> = OCH<sub>3</sub>; Glycitein</p> </div>
Antocianidinas	 <div data-bbox="870 1360 1101 1465" style="border: 1px solid black; padding: 2px;"> <p>R<sub>1</sub> = H; R<sub>2</sub> = H; Pelargonidin                      R<sub>1</sub> = OH; R<sub>2</sub> = H; Cyanidin                      R<sub>1</sub> = OH; R<sub>2</sub> = OH; Delphinidin                      R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub>; R<sub>2</sub> = OH; Petunidin                      R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub>; R<sub>2</sub> = OCH<sub>3</sub>; Malvidin</p> </div>

A maior parte dos flavonóides encontrados nos alimentos ocorre na forma de glicosídeo, isto é, com alguma molécula de açúcar ligada à sua estrutura. A unidade glicosídica mais comumente encontrada é a glicose, mas outros açúcares também podem ser encontrados, tais como glicoramnose, galactose, arabinose e ramnose (COOK & SAMMAN, 1996; HEIM *et al.*, 2002). Os flavonóides que não se encontram ligados a nenhuma substância química são chamados de agliconas.

## **2.2. Métodos de análise**

Vários métodos têm sido descritos na literatura para a determinação de compostos fenólicos em alimentos. Em geral, esses métodos utilizam as seguintes técnicas analíticas: cromatografia em camada delgada, cromatografia gasosa, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), eletroforese capilar e espectrometria UV-VIS. A espectrometria de UV-VIS utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu tem sido o método mais utilizado para determinar o teor de compostos fenólicos totais. Para a determinação de flavonóides totais, existem na literatura métodos espectrofotométricos utilizando nitrito de sódio e/ou cloreto de alumínio. Entretanto, a técnica de CLAE é a mais utilizada, pois permite a identificação e a quantificação de vários flavonóides simultaneamente.

### **2.2.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**

Diversas metodologias utilizando CLAE para separação e quantificação de compostos fenólicos em diferentes matrizes são reportadas por vários autores, como mostra a **Tabela 3**. Pode-se observar que a grande maioria dos trabalhos utiliza coluna de fase reversa de C18 com comprimento variando entre 100 e 300 mm e com 4,6 mm de diâmetro interno (SIVAM, 2002).

De acordo com Escarpa & Gonzalez (2001) a eluição isocrática é empregada quando a composição fenólica da amostra é formada por compostos de uma mesma classe estrutural. Para analisar matrizes mais complexas, que têm uma composição fenólica mais ampla, a eluição com gradiente de fase móvel é a mais adequada.

As fases móveis mais utilizadas são compostas por uma fase aquosa com a adição de um ácido, como o acético, o fórmico, o perclórico ou o fosfórico, e outra fase orgânica, como metanol ou acetonitrila, possivelmente acidificada (SIVAM, 2002). A temperatura da coluna não deve ser muito alta. Embora alguns autores recomendem o uso de 40 °C para a análise de vinhos e sucos cítricos, a maioria dos trabalhos apresenta boa separação à temperatura ambiente (ESCARPA & GONZALEZ, 2001; SIVAM, 2002). O tempo de análise é, em geral, de no máximo 1 hora, com um tempo de equilíbrio entre as injeções. A vazão usualmente varia entre 1,0 e 1,5 mL/min e o volume de injeção entre 1 e 100 µL (SIVAM, 2002).

O sistema de detecção mais empregado é o de arranjo de diodos (**Tabela 3**), utilizado, em geral, para monitorar dois ou mais comprimentos de onda simultaneamente e para a obtenção dos espectros de absorvância que são usados como parâmetro de identificação (SIVAM, 2002). Para alguns compostos, como a catequina e a epicatequina, existe a possibilidade de se trabalhar com detector de fluorescência, o que aumenta a seletividade e a sensibilidade da técnica (RODRÍGUEZ-DELGADO, 2001).

Recentemente, o uso de CLAE acoplada a um espectrômetro de massas vem crescendo. Essa técnica permite a identificação mais precisa dos compostos, principalmente quando há interesse em se identificar as formas glicosídicas dos flavonóides. O uso da espectrometria de massas na análise de flavonóides glicosídeos aumentou com as recentes técnicas de ionização. Compostos dessa classe são polares, não voláteis e termicamente instáveis. As técnicas tradicionais de ionização por elétrons e



ionização química não são adequadas para análise de flavonóides glicosídios não derivados, pois requerem que o analito esteja na fase gasosa para a ionização, e, para isso, a derivação dos grupos hidroxilas é necessária. A introdução das interfaces de *termospray* (TSP) e *electrospray* (ESI) permitiu o acoplamento direto do espectrômetro de massas com o cromatógrafo líquido (CLAE-MS), o que possibilitou o estudo dos flavonóides em produtos vegetais, pois ambas são técnicas de ionização brandas que permitem a análise dos flavonóides em sua forma natural sem a necessidade de derivação (SIVAM, 2002).

O preparo da amostra para análise por CLAE depende do tipo de matriz e da forma como os compostos serão analisados, isto é, na forma glicosídica ou agliconas. As amostras vegetais são, normalmente, liofilizadas, moídas e armazenadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  antes de serem analisadas. Os processos de extração, geralmente, utilizam misturas de água e metanol em concentrações que variam de 50 a 80% de metanol. Na análise de agliconas, a hidrólise dos glicosídios é a etapa mais importante. Hertog *et al.* (1992a) otimizaram as condições de hidrólise para determinação de flavonóis em legumes. Tal processo consiste na hidrólise com HCl 1,2 M e extração com metanol 65% (HERTOG *et al.*, 1992a; ESCARPA & GONZALEZ, 2001). Mais recentemente, estudos têm verificado a importância do uso do delineamento composto central rotacional (DCCR) para a otimização das condições ótimas de hidrólise para a determinação de flavonóides em diferentes frutas e hortaliças (HOFFMANN-RIBANI & RODRIGUEZ-AMAYA, 2008; HUBER *et al.*, 2007)

**Tabela 3.** Uso da CLAE na determinação de compostos fenólicos em diferentes matrizes.

Matriz	Extração	Coluna	Fase móvel	Detector	Compostos analisados	Referência
Chá	Método 1: Água fervente Método 2: Metanol	C18 (ODS)	A: Ácido acético 2% B: Acetonitrila (gradiente de 8% a 100% B)	Arranjo de diodos (280, 310, 340, 380, 450 e 510 nm)	21 compostos fenólicos	Yao <i>et al.</i> (2004)
Chás, vinhos e sucos de frutas	HCl em metanol aquoso 50%	C18	Acetonitrila/tampão fosfato (25+75)	Arranjo de diodos (370 nm)	Quercetina, kaempferol, miricetina, luteolina e apigenina	Hertog <i>et al.</i> (1993)
Frutas	Metanol 70% em água	C18	A: Tampão acetato B: Acetonitrila (gradiente de 0% a 100% de B)	Arranjo de diodos (280, 320, 360 e 520 nm)	25 compostos fenólicos	Tsao & Yang (2003)
Frutas e legumes	Liofilização HCl em metanol aquoso 50%	C18	Acetonitrila/tampão fosfato (25+75)	Arranjo de diodos (370 nm)	Quercetina, kaempferol, miricetina, luteolina e apigenina	Hertog <i>et al.</i> (1992b)
Frutas, legumes e bebidas	Liofilização HCl 1,2M em metanol aquoso 50%	C18	A: Metanol/H <sub>2</sub> O (30+70) com 1% ácido fórmico B: metanol (gradiente de 25% a 86% de B)	Arranjo de diodos (290, 365 nm) e espectrômetro de massa	Quercetina, kaempferol, hesperidina, naringenina, miricetina, apigenina e luteolina	Justesen <i>et al.</i> (1998)
Frutas e verduras	Homogeneização com nitrogênio líquido Metanol 70 % em água Evaporação do metanol e extração em fase sólida de poliamida – limpeza com água e eluição com metanol	C18 (ODS 3)	A: H <sub>2</sub> O/tetraidrofurano/ácido trifluoroacético (98+2+0,1) B: Acetonitrila (gradiente de 17% a 90% de B)	Arranjo de diodos (270, 370 e 525 nm)	Luteolina, apigenina, kaempferol, quercetina, catequina, epicatequina, cianidina, pelargonidina, delfinidina, malvidina, peonidina, naringenina, hesperitina e chalconas	Arabbi <i>et al.</i> (2004)
Legumes e verduras	Liofilização HCl 6,0 N em metanol aquoso 62,5% com 0,1g TBHQ Refluxo por 2 horas	C18	Metanol/tampão fosfato (45+55)	UV (365 nm)	Quercetina, luteolina, miricetina, kaempferol e apigenina	Lugasi & Hóvári (2000)

**Tabela 3.** Uso da CLAE na determinação de compostos fenólicos em diferentes matrizes (continuação).

Matriz	Extração	Coluna	Fase móvel	Detector	Compostos analisados	Referência
Maçã e produtos derivados	Liofilização Extração com Metanol:Água:Ácido Acético (70:30:5) Evaporação do metanol e extração em fase sólida de poliamida – limpeza com água e eluição com metanol	C18 (ODS 3)	A: H <sub>2</sub> O/tetrahidrofurano/ácido . trifluoroacético (98+2+0,1) B: Acetonitrila (gradiente de 17% a 90% de B)	Arranjo de diodos (370 nm)	Rutina, hyperin, isoquercitrin, reynoutrin, avicularim e quercitrina	Price <i>et al.</i> (1999)
Maçã e pera	Extração com acetona 70% em água. Evaporação da acetona e extração com acetato de etila. Evaporação do acetato e dissolução em metanol.	C18	A: Ácido acético 2% B: Ácido acético 0,5% em acetonitrila + H <sub>2</sub> O (1:1) (gradiente de 10% a 100% B)	Arranjo de diodos (280, 320 e 370 nm) e espectrômetro de massa	Ácido gálico, caféico, p-cumárico e clorogênico, catequina, epicatequina, quercetina, kaempferol	Schieber <i>et al.</i> (2001)
Manga (purê)	Extração com acetona e metanol. Partição com hexano. Fracionamento com acetato de etila pH 7 e pH 2. Adsorção em Sephadex LH-20 e eluição com metanol-água.	C18	A: Ácido acético 2% B: Ácido acético 0,5% em acetonitrila + H <sub>2</sub> O (1:1) (gradiente de 10% a 100% B)	Arranjo de diodos (280, 320 e 370 nm) e espectrômetro de massa	Ácido gálico, ácido caféico, quercetina, kaempferol e seus glicosídeos	Schieber <i>et al.</i> (2000)
Manga (purê)	Extração com acetona e metanol. Partição com hexano. Fracionamento com acetato de etila pH 7 e pH 2. Adsorção em Sephadex LH-20 e eluição com metanol-água.	C18	A: Ácido acético 2% B: Ácido acético 0,5% em acetonitrila + H <sub>2</sub> O (1:1) (gradiente de 10% a 100% B)	Arranjo de diodos (280, 320 e 370 nm) e espectrômetro de massa	Ácido gálico, ácido caféico, quercetina, kaempferol e seus glicosídeos	Schieber <i>et al.</i> (2000)
Sucos de frutas	Acidificação e extração em fase sólida de C18 / HCl / Metanol	C18 (ODS)	Tampão fosfato/ acetonitrila (41+9)	Arranjo de diodos (280 nm)	Ácidos gálico, clorogênico, caféico, elágico e ferúlico	Amakura <i>et al.</i> (2000)

**Tabela 3.** Uso da CLAE na determinação de compostos fenólicos em diferentes matrizes (continuação).

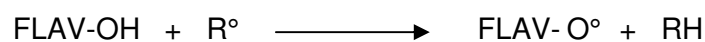
Matriz	Extração	Coluna	Fase móvel	Detector	Compostos analisados	Referência
Tomate e derivados de tomate	Liofilização HCl 1,2M em metanol aquoso 50%	C18	A: H <sub>2</sub> O + ácido trifluoroacético até pH 2,5 B: Acetonitrila (gradiente de 20% a 40% de B)	UV-Vis (365 nm) e Fluorescência (exc.: 425; em.: 480)	Quercetina e kaempferol	Stewart <i>et al.</i> (2000)
Tomate, cebola, alface e aipo	Liofilização HCl 1,2M em metanol aquoso 50%	C18	A: H <sub>2</sub> O + ácido trifluoroacético até pH 2,5 B: Acetonitrila (gradiente de 15% a 35% de B)	UV-Vis (365 nm)	Rutina, quercetina-3-glicosídeo, quercitrina, miricetina, luteolina, quercetina, apigenina, kaempferol, isoramnetina	Crozier <i>et al.</i> (1997)
Vinho	Concentração, acidificação e extração em fase sólida de C18. Eluição de interferentes com acetonitrila 20% em solução aquosa pH 2,5. Eluição com acetonitrila.	C18	A: THF 1% + ácido fosfórico – pH 3 B: Acetonitrila (gradiente de 30% a 100% de B)	Arranjo de diodos (270 nm)	Ácido caféico, miricetina, luteolina, quercetina, apigenina, naringenina, kaempferol, esperetina, baicaleína, galangina	Wang & Huang (2004)
Vinho	Acidificação a pH 2 com HCl 0,1M. Extração com éter dietílico.	C18	A: Metanol/ácido acético/água (10:2:88) B: Metanol/ácido acético/água (90:2:8) (gradiente de 0% a 70% de B)	DAD (280 nm) e Fluorescência (exc.: 278 e 330; em.: 360 e 374)	Ácido gálico, caféico, ferúlico, <i>p</i> -cumárico, quercetina, miricetina, kaempferol, <i>t</i> -resveratrol, catequina, epicatequina	Rodríguez-Delgado <i>et al.</i> (2001)

### 2.3. Propriedades antioxidantes

Os compostos fenólicos são antioxidantes potentes, agindo como interceptadores de radicais livres, agentes quelantes de metais e retardadores de peroxidação lipídica (ESCARPA & GONZALEZ, 2001).

Nas plantas, além de contribuir na formação da cor e do sabor, os compostos fenólicos conferem proteção contra radiação ultravioleta, patógenos e herbívoros (HARBORNE & WILLIAMS, 2000; HEIM *et al.*, 2002). No homem, algumas propriedades vêm sendo atribuídas aos flavonóides, como prevenção de inflamação, alergias e câncer (ESCARPA & GONZALEZ, 2001). Os flavonóides também podem reduzir a pressão arterial e regular o ritmo cardíaco, sendo esse efeito facilmente explicado pelo alto poder anti-radical livre dos flavonóides que protegem a camada lipoprotéica interna das artérias (ESCARPA & GONZALEZ, 2001). Outros efeitos cardioprotetores dos flavonóides incluem a alteração da produção de eicosanóides das células endoteliais, a redução da agregação de plaquetas e o decréscimo na oxidação de LDL-colesterol (SCHRAMM & GERMAN, 1998; WILLCOX *et al.*, 2003).

Os flavonóides também podem interferir direta ou indiretamente em muitos sistemas geradores de radicais livres, pois, com seus grupos hidroxílicos reativos, sequestram radicais livres, sendo oxidados a um radical mais estável e menos reativo que o radical livre, como mostra o esquema da **Figura 3** (WILLCOX *et al.*, 2003).

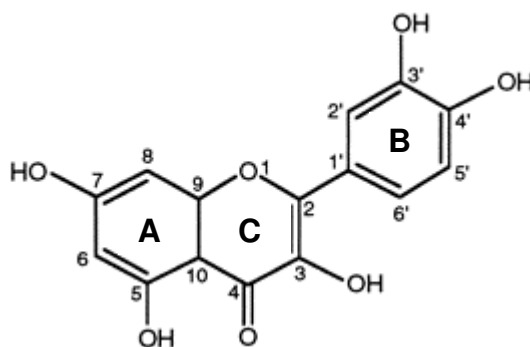


**Figura 3.** Mecanismo de ação dos flavonóides como anti-radical livre.

A atividade anti-radical livre dos flavonóides *in vitro*, medida em TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*), varia muito, dependendo, principalmente, do arranjo dos

grupos funcionais em torno da estrutura básica. O valor de TEAC indica a capacidade do flavonóide de sequestrar radicais livres comparada a uma referência, o Trolox (um análogo sintético de  $\alpha$ -tocoferol solúvel em água), cujo valor de TEAC é igual a 1 mM (HEIM *et al.*, 2002).

Existem 3 fatores determinantes na capacidade dos flavonóides de sequestrar radicais livres: (1) a presença da estrutura o-dihidroxila no anel B, a qual confere grande estabilidade ao radical e participa do deslocamento eletrônico; (2) a presença da dupla ligação 2-3 em conjugação com a função oxo no C-4 do anel C é responsável pelo deslocamento eletrônico no anel B; os radicais fenoxilos formados são estabilizados pelo efeito de ressonância do núcleo aromático; e (3) a presença de grupos OH no C-3 e C-5, e a função oxo no C-4 são requisitos para o máximo potencial sequestrante. A quercetina (**Figura 4**), por exemplo, satisfaz todos os requisitos, apresentando atividade antioxidante maior que a maioria dos flavonóides (FERNANDES & BARROS, 2003).



**Figura 4.** Estrutura molecular da quercetina.

Segundo Becker *et al.* (2004), para se avaliar a ação antioxidante de um composto ou de uma classe de compostos como os fenólicos, é necessário seguir um protocolo de quatro passos: (1) identificar e quantificar os compostos fenólicos presentes no produto em questão; (2) determinar a capacidade dos diferentes antioxidantes de sequestrar

radicais usando diferentes métodos e considerando o efeito do solvente; (3) avaliar a habilidade do antioxidante em inibir ou interromper a oxidação lipídica em sistemas-modelo; e (4) realizar estudos de estocagem usando os antioxidantes analisados incorporados a produtos alimentícios de relevância.

### **3. EFEITO DO PROCESSAMENTO E DA ESTOCAGEM SOBRE OS COMPOSTOS ANTIOXIDANTES DO TOMATE**

Estudos recentes encontraram quantidades significativas de flavonóis (quercetina e kaempferol) em tomates. Quantidades maiores foram encontradas após a hidrólise ácida, indicando que a maior parte dos flavonóis presentes no tomate se encontra sob a forma glicosídica, onde o principal glicosídeo é a rutina (quercetina-3-rutinosídeo ou quercetina-3-ramnoglicosídeo) (CROZIER *et al.*, 1997; STEWART *et al.*, 2000).

Os flavonóides são sintetizados e armazenados, principalmente, na casca do tomate e, por esse motivo, a concentração desses compostos é maior nas variedades menores como o tomate cereja. Além disso, fatores como a exposição a altos níveis de luz solar, temperatura, ataque de patógenos e estado nutricional da planta também podem influenciar nos níveis de flavonóis encontrados em espécies vegetais (STEWART *et al.*, 2000; WILLCOX *et al.*, 2003; TOOR & SAVAGE, 2005). Esses e outros estudos também observaram diferenças nos níveis de flavonóis entre diferentes variedades de tomate (ARABBI *et al.*, 2004; CROZIER *et al.*, 1997; STEWART *et al.*, 2000; TOOR & SAVAGE, 2005) e também nos teores de compostos fenólicos totais, licopeno e ácido ascórbico entre genótipos de uma mesma variedade (GEORGE *et al.*, 2004).

O cozimento do tomate em água fervente ou em microondas resultou em perdas de quercetina; no entanto, perdas menores ocorreram após a fritura em óleo (CROZIER *et al.*, 1997). Outro estudo observou que o cozimento em água a 100 °C por 15 min e o

forneamento a 200 °C por 18 min resultaram em uma pequena diminuição dos teores de ácido ascórbico, fenóis totais e licopeno, enquanto a fritura em azeite de oliva a 110 °C por 4 min reduziu significativamente os teores desses compostos (SAHLIN *et al.*, 2004).

Os flavonóides do tomate são resistentes aos processos industriais, sendo encontrados em diversos produtos processados (STEWART *et al.*, 2000). Vários estudos mostraram que os flavonóides se mantêm estáveis durante o processamento, e, em alguns casos, foi observado um aumento nos teores desses compostos (GAHLER *et al.*, 2003; CAPANOGLU *et al.*, 2008; RE *et al.*, 2002).

Os processos de secagem de tomate podem aumentar ou diminuir os teores de flavonóides totais e compostos fenólicos totais dependendo do tipo de secagem e da temperatura utilizada (CHANG *et al.*, 2006; TOOR & SAVAGE, 2006a; LAVELLI *et al.*, 1999). Segundo Chang *et al.* (2006), a secagem do tomate, tanto em alta quanto em baixa temperatura, pode levar a um aumento significativo nos teores de compostos fenólicos totais e flavonóides totais. Os autores sugeriram que o aumento nos teores de compostos fenólicos totais possivelmente ocorre devido à liberação desses compostos da matriz. Eles consideraram que o processamento pode acelerar a liberação de mais compostos fenólicos a partir do rompimento dos constituintes celulares. Para esses autores, o aumento no teor de flavonóides totais pode ser explicado por muitas reações bioquímicas que ocorrem na polpa e na casca do tomate durante o processo de secagem. Chang *et al.* também observaram aumento nos teores de licopeno após a secagem com ar quente e atribuíram esse aumento ao fato de o processamento térmico promover a quebra das paredes celulares e o enfraquecimento das ligações entre o licopeno e os tecidos celulares, tornando o licopeno mais acessível. Lavelli *et al.* (1999) também observaram aumento nos teores de fenóis totais após a secagem com ar a 80 °C por 400 minutos e



reportaram que esse aumento pode ser devido à liberação dos compostos fenólicos da parede celular ou a um aumento no número de grupos fenólicos com hidroxilas livres.

Por outro lado, Toor & Savage (2006a) observaram uma diminuição significativa nos teores de fenóis e flavonóides após uma secagem parcial a 42 °C. Nessa secagem, ocorreu uma diminuição de 10 a 15% no teor total de flavonóides. A maioria das perdas dos compostos fenólicos durante a secagem ocorre devido à ação das enzimas oxidativas como a polifenoxidase e a peroxidase (SHAHIDI & NACZK, 1995). O tratamento térmico a 88 °C inativa essas enzimas, evitando perdas de ácidos fenólicos (DEWANTO *et al.*, 2002). A perda dos compostos fenólicos em alguns tipos de secagem pode ser explicada pela baixa temperatura utilizada, que, provavelmente, não inativa completamente as enzimas oxidativas, resultando em uma oxidação dos compostos fenólicos e em um menor teor de fenóis totais nos tomates que sofreram uma secagem parcial quando comparados aos tomates crus (TOOR & SAVAGE, 2006a).

Os compostos antioxidantes do tomate também são estáveis durante a estocagem, tanto do produto *in natura* quanto dos produtos processados. Toor & Savage (2006b) verificaram que a estocagem de tomates a 7, 15 e 25 °C por 10 dias não teve efeito deletério nos teores de fenólicos totais, flavonóides e ácido ascórbico, nem na sua atividade antioxidante medida em TEAC. Giovanelli *et al.* (2001) detectaram um pequeno aumento nos teores de fenóis totais em polpa e purê de tomate estocados a 40 °C durante 3 meses, sendo que, nesse mesmo estudo, não foram observadas alterações nos teores de fenóis totais em extrato de tomate. Em um estudo acelerado de vida de prateleira em polpa, purê e extrato de tomate, foi observado um aumento no teor de fenóis totais durante a estocagem a temperatura maior ou igual a 40 °C, o que pode estar relacionado com a hidrólise de glicosídeos; porém, os compostos fenólicos se apresentaram estáveis a temperaturas menores que 40 °C (LAVELLI *et al.*, 1999). Lavelli

& Giovanelli (2003) observaram a degradação da rutina e um aumento nos teores de compostos fenólicos totais em extrato de tomate estocado a 40 °C por 90 dias e em polpa e extrato de tomate estocados a 50 °C pelo mesmo período. No entanto, não conseguiram estabelecer uma correlação entre os dois fenômenos.

#### **4. USO DE PRODUTOS DE TOMATE COMO ANTIOXIDANTE EM CARNE DE FRANGO PROCESSADA A ALTA PRESSÃO**

##### **4.1. Efeito da alta pressão sobre a oxidação lipídica em carne de frango e uso de antioxidantes naturais**

Durante os últimos anos, vem crescendo consideravelmente a demanda dos consumidores por alimentos minimamente processados. Tecnologias emergentes têm sido investigadas a fim de substituir ou complementar as tecnologias convencionais empregadas no processamento de alimentos. Tais tecnologias incluem alta pressão hidrostática, aquecimento por microondas, radiação gama e ultra-som, entre outras (RODRIGO *et al.*, 2006).

O processamento a alta pressão consiste na aplicação de pressão hidrostática aos alimentos. As pressões que vêm sendo usadas variam entre 100 e 800 MPa, o equivalente a um intervalo de 1000 a 8000 atm. Em geral, a tecnologia de alta pressão é simples. O alimento a ser processado é acondicionado em uma embalagem flexível, que é colocada em uma câmara pressurizadora. Essa câmara é fechada e preenchida com um fluido de transferência de pressão, na maioria dos casos, água. A água é comprimida e o alimento é mantido sob pressão por um tempo determinado. Por fim, a câmara é descomprimida e uma nova batelada é processada (KAREL & LUND, 2003).

A aplicação de alta pressão oferece à indústria de alimentos uma tecnologia com segurança alimentar semelhante à da pasteurização térmica, com a vantagem de manter o sabor dos produtos e os seus nutrientes (SUN, 2005). Em alguns países já se comercializam produtos processados com alta pressão, como geléias, iogurtes e bifes no Japão; guacamole, sucos de frutas, presunto e ostras nos EUA; e sucos de frutas na França, em Portugal e no Reino Unido (SUN, 2005).

O consumo de carne de frango tem crescido fortemente em todo o mundo. O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de carne de frango e o principal exportador, com destaque para o aumento da exportação de produtos com maior valor agregado.

A carne de frango processada com alta pressão pode ter um grande potencial mercadológico como um produto minimamente processado. No entanto, estudos prévios mostraram que as altas pressões utilizadas podem induzir a oxidação lipídica devido ao alto teor de ácidos graxos insaturados presentes na carne de frango (BRAGAGNOLO *et al.*, 2005; MARIUTTI *et al.*, 2008). O processamento de peito de frango usando alta pressão induziu a oxidação lipídica, a qual foi observada pelo aumento das substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico (TBARS) e pela formação de pentanal e hexanal (BRAGAGNOLO *et al.*, 2005; MARIUTTI *et al.*, 2008).

Alguns estudos têm mostrado que o uso de antioxidantes naturais, presentes em algumas ervas e condimentos adicionados à carne de frango, pode prevenir ou retardar a oxidação lipídica. O uso de alecrim foi efetivo como antioxidante em peito e coxa de frango processados a alta pressão (BRAGAGNOLO *et al.*, 2005; BRAGAGNOLO *et al.*, 2007). Mariutti *et al.* (2008) verificaram que a sálvia atuou como antioxidante em carne de frango processada a alta pressão e estocada sob refrigeração, enquanto o alho atuou como pró-oxidante.

## 4.2. ESR e a oxidação lipídica

A espectroscopia de ressonância de elétron-spin (ESR) é uma técnica de microondas que pode detectar pequenas quantidades de elétrons desemparelhados em materiais gasosos, líquidos e sólidos (HEDEGAARD & NANNERUP, 2000). Na presença de um campo magnético externo, o momento magnético de um radical com elétron desemparelhado assume duas diferentes orientações com relação à direção do campo, isto é, na mesma direção ou na direção oposta. Como resultado, dois diferentes estados de energia são obtidos, e a diferença de energia entre esses dois estados é uma função da força do campo magnético (ANDERSEN *et al.*, 2005).

A técnica analítica se resume em colocar a amostra em um campo magnético que muda os níveis de energia dos elétrons desemparelhados de acordo com seus números de spin quantum ( $M_s$ ). Usualmente, a amostra é irradiada com radiação eletromagnética com uma frequência constante, tipicamente na região de microondas, e o campo magnético é variado para atingir a condição de ressonância. A absorção da radiação eletromagnética é observada quando os níveis de energia do sistema de spin coincidem com a energia da irradiação, e a maioria dos espectrômetros de ESR registra a primeira derivada da absorção como uma função da força do campo magnético aplicada. A sensibilidade depende da largura do sinal de ESR, mas a concentração mínima de radicais detectada é de cerca de  $10^{-9}$  M (ANDERSEN & SKIBSTED, 2002).

As etapas iniciais da oxidação lipídica envolvem reações em cadeia com importantes radicais intermediários de vida curta. A extensão dessas reações pode ser acompanhada pelo consumo de oxigênio ou pela formação de hidroperóxidos, também classificados como os primeiros produtos da oxidação lipídica. Os hidroperóxidos são precursores dos produtos secundários da oxidação lipídica, tais como aldeídos e cetonas, normalmente associados com rancidez (ANDERSEN & SKIBSTED, 2002).

Análises de hidroperóxidos são frequentemente usadas na caracterização da qualidade de óleos e gorduras e na determinação da tendência de desenvolvimento de rancidez. Entretanto, métodos baseados na detecção de radicais ou na tendência de formação de radicais em um dado produto têm um grande potencial na predição da resistência à oxidação em estágios iniciais. Os radicais podem ser detectados por ESR e essa técnica agora está sendo explorada para a predição de estabilidade na fase inicial da oxidação. Essa predição já é possível em sistemas de alimentos complexos como maionese, leite em pó, carne desidratada para sopas instantâneas e produtos de baixo teor lipídico como a cerveja (ANDERSEN & SKIBSTED, 2002).

A aplicação da ESR na área da oxidação lipídica é relativamente recente, e somente as indústrias mais inovadoras em países desenvolvidos usam a espectroscopia de ESR como um método padrão no controle de qualidade. O uso da espectroscopia de ESR na área de alimentos deverá aumentar devido à possibilidade de medição direta de uma grande variedade de produtos sem a necessidade de procedimentos de extração e purificação (ANDERSEN *et al.*, 2005).

## **5. CONCLUSÃO**

O tomate é uma grande fonte de antioxidantes que, além de ser muito importante na dieta humana, pode ser de grande valia para a indústria de alimentos em sua busca cada vez mais crescente do uso de antioxidantes naturais em substituição ao uso de antioxidantes sintéticos.

O uso de alta pressão é uma tecnologia recente que tem grande aplicação na produção de alimentos minimamente processados. A utilização de antioxidantes naturais tem se mostrado eficiente na prevenção de oxidação lipídica da carne de frango processada usando alta pressão.

---

**REFERÊNCIAS**

- AMAKURA, Y.; OKADA, M.; TSUJI, S.; TONOGAI, Y. Determination of phenolic acids in fruit juices by isocratic column liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.891, p.183-188, 2000.
- ANDERSEN, M.L. & SKIBSTED, L.H. Detection of early events in lipid oxidation by electron spin resonance spectroscopy. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.104, p.65-68, 2002.
- ANDERSEN, M.L.; VELASCO, J.; SKIBSTED, L.H. Analysis of Lipid Oxidation by ESR Spectroscopy. *In*: KAMAL-ELDIN, A.; POKORNY, J. (Ed.) **Analysis of lipid oxidation**. Champaign, Illinois : AOCS Press, 2005. cap.6, p.127-151.
- ARABBI, P.R.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the Brazilian population. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.1124-1131, 2004.
- BECKER, E.M.; NISSEN, L.R.; SKIBSTED, L.H. Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. **European Food Research Technology**, v.219, p.561-571, 2004.
- BRAGAGNOLO, N.; DANIELSEN, B.; SKIBSTED, L.H. Effect of rosemary on lipid oxidation in pressure-processed, minced chicken breast during refrigerated storage and subsequent heat treatment. **European Food Research Technology**, v.221, p.610-615, 2005.
- BRAGAGNOLO, N.; DANIELSEN, B., SKIBSTED, L.H. Rosemary as antioxidant in pressure processed chicken during subsequent cooking as evaluated by electron spin resonance spectroscopy. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.8, p.24-27, 2007.

- BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v.56, p.317-333, 1998.
- CAMARGO, A.M.M.P.; CAMARGO, F.P.; ALVES, H.S.; CAMARGO FILHO, W.P. Desenvolvimento do sistema agroindustrial do tomate. **Informações Econômicas**, v.36, p.53-58, 2006.
- CAPANOGLU, E.; BEEKWILDER, J.; BOYACIOGLU, D.; HALL, R.; DE VOS, R. Changes in antioxidant and metabolite profiles during production of tomato paste. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p.964-973, 2008.
- CHANG, C.-H.; LIN, H.-Y.; CHANG, C.-Y.; LIU, Y.-C. Comparisons on the antioxidant properties of fresh, freeze-dried and hot-air-dried tomatoes. **Journal of Food Engineering**, v.77, p.478-485, 2006.
- COOK, N.C. & SAMMAN, S. Flavonoids: Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.7, p.66-76, 1996.
- CROZIER A.; LEAN, M.E.J.; McDONALD, M.S.; BLACK, C. Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce, and celery. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, p.590-595, 1997.
- DEWANTO, V.; WU, X.; ADOM, K.-K.; LIU, R.-H. Thermal Processing Enhances the Nutritional Value of Tomatoes by Increasing Total Antioxidant Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.3010-3014. 2002.
- ESCARPA, A. & GONZALEZ, M.C. An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v.31, p.57-139, 2001.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em: 18 jun. 2009.

- FERNANDES, C.; BARROS, S. Efeito farmacológico de compostos fenólicos antioxidantes em alimentos. **Universidade de Aveiro**, Portugal, 2003.
- GAHLER, S.; OTTO, K.; BÖHM, V. Alterations of vitamin C, total phenolics, and antioxidant capacity as affected by processing tomatoes to different products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.7962-7968, 2003.
- GEORGE B.; KAUR, C.; KHURDIYA, D.S.; KAPOOR, H.C. Antioxidants in tomato (*Lycopersium esculentum*) as a function of genotype. **Food Chemistry**, v.84, p.45-51, 2004.
- GIOVANELLI, G.L.; LAVELLI, V.; PERI, C.; PAGLIARINI, E.; ZANONI, B.; PETRONE, P. The antioxidant activity of tomato. IV. Effects of storage on oxidative and heat damage. **Acta Horticulturae**, v.542, p.221-223, 2001.
- GIOVANNUCCI, E. Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: Review of the epidemiologic literature. **Journal of the National Cancer Institute**, v.91, p.317-331, 1999.
- HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v.55, p.481-504, 2000.
- HEDEGAARD, R.V.; NANNERUP, L.D. **Formation of radicals in dough**. 2000. M. Sc. Thesis - The Department of Dairy and Food Science, Food Chemistry Department, The Royal Veterinary and Agricultural University of Copenhagen. Copenhagen, 2000.
- HEIM, K.E.; TAGLIAFERRO, A.R.; BOBILYA, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.13, p.572-584, 2002.
- HERTOG, M.G.L.; HOLLMAN, P.C.H.; VENEMA, D.P. Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.40, p.1591-1598, 1992a.



- HERTOG, M.G.L.; HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in The Netherlands. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.40, p.2379-2383, 1992b.
- HERTOG, M.G.L.; HOLLMAN, P.C.H.; van de PUTTE, B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines, and fruit juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.41, p.1242-1246, 1993.
- HOFFMANN-RIBANI, R.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; Otimização de método para determinação de flavonóis e flavonas em frutas por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando delineamento estatístico e análise de superfície de resposta. **Química Nova**, v.31, p.1378-1384, 2008.
- HUBER, L.S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; RODRIGUES, M.I. Otimização e validação de metodologia analítica para determinação de flavonóis e flavonas por CLAE em hortaliças. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.66, p.142-151, 2007.
- JUSTESEN, U.; KNUTHSEN, P.; LETH, T. Quantitative analysis of flavonóis, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v.799, p.101-110, 1998.
- KAREL, M.; LUND, D.B. **Physical principles of food preservation**. 2<sup>nd</sup> ed. New York, USA : Marcel Dekker, Inc, 2003. 603p.
- LAVELLI, V.; HIPPELI, S.; PERI, C.; ELSTNER, E.F. Evaluation of radical scavenging activity of fresh and air-dried tomatoes by three model reactions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, p.3826-3831, 1999.
- LAVELLI, V.; GIOVANELLI, G. Evaluation of heat and oxidative damage during storage of processed tomato products. II. Study of oxidative damage indices. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.83, p.966-971, 2003.

- LUGASI, A.; HÓVÁRI, J. Flavonoid aglycons in foods of plant origin I. Vegetables. **Acta Alimentaria**, v.29, p.345-352, 2000.
- MAKISHIMA, N. O popular e importante tomate. **Programa Brasileiro para Modernização da Horticultura. Norma de Classificação do Tomate**. Centro de Qualidade em Horticultura. (CQG. Documentos, 26). CQG/CEAGESP, São Paulo, 2003.
- MARIUTTI, L.R.B.; ORLIEN, V.; BRAGAGNOLO, N.; SKIBSTED, L.H. Effect of sage and garlic on lipid oxidation in high-pressure processed chicken meat. **European Food Research Technology**, v.227, p.337-344, 2008.
- PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v.63, p.1035-1042, 2000.
- PRICE, K.R.; PROSSER, T.; RICHTIN, 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.
- RE, R.; BRAMLEY, P.M.; RICE-EVANS, C. Effects of food processing on flavonoids and lycopene status in a Mediterranean tomato variety. **Free Radical Research**, v.36, p.803-810, 2002.
- RODRIGO, D.; CORTÉS, C.; CLYNEN, E.; SCHOOF, L.; LOEY, A.V.; HENDRICKX, M. Thermal and high-pressure stability of purified polygalacturonase and pectinmethylesterase from four different tomato processing varieties. **Food Research International**, v.39, p.440-448, 2006.
- RODRÍGUEZ-DELGADO, M.A.; MALOVANÁ, S.; PÉREZ, J.P.; BORGES, T.; MONTELONGO, F.J.G. Separation of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography with absorbance and fluorimetric detection. **Journal of Chromatography A**, v.912, p.249-257, 2001.

- SAHLIN, E.; SAVAGE, G.P.; LISTER, C.E. Investigation of the antioxidant properties of tomatoes after processing. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.17, p.635-647, 2004.
- SCHIEBER, A.; ULLRICH, W.; CARLE, R. Characterization of polyphenols in mango puree concentrate by HPLC with diode array and mass spectrometric detection. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.1, p.161-166, 2000.
- SCHIEBER, A.; KELLER, P.; CARLE, R. Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.910, p.265-273, 2001.
- SCHRAMM, D.D.; GERMAN, J.B. Potential effects of flavonoids on the etiology of vascular disease. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.9, p.560-566, 1998.
- SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Food phenolics: Sources, Chemistry, Effects, Applications**. Lancaster, USA : Technomic Publishing Company, Inc., 1995. 331p.
- SIVAM, G. Analysis of Flavonoids. *In*: HURST, W. J., (Ed.) **Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals**. Florida, EUA : CRC Press LLC, 2002. cap. 9.
- SLIMESTAD, R.; FOSSEN, T.; VERHEUL, M.J. The flavonoids of tomatoes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p.2436-2441, 2008.
- STEWART, A.J.; BOZONNET, S.; MULLEN, W.; JENKINS, G.I.; LEAN, M.E.J.; CROZIER, A. Occurrence of flavonoids in tomatoes and tomato-based products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.2663-2669, 2000.
- SUN, D.-W. (Ed). **Emerging Technologies for Food Processing**. Londres, Inglaterra : Elsevier Academic Press, 2005. 792p.

- TOOR, R.K.; SAVAGE, G.P. Antioxidant activity in different fractions of tomatoes. **Food Research International**, v.38, p.487-494, 2005.
- TOOR, R.K.; SAVAGE, G.P. Effect of semi-drying on the antioxidant components of tomatoes. **Food Chemistry**, v.94, p.90-97, 2006a.
- TOOR, R.K.; SAVAGE, G.P. Changes in major antioxidant components of tomatoes during post-harvest storage. **Food Chemistry**, v.99, p.724-727, 2006b.
- TSAO, R.; YANG, R. Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.1018, p.29-40, 2003.
- WANG, S.-P.; HUANG, K.-J. Determination of flavonoids by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v.1032, p.273-279, 2004.
- WILLCOX, J.K.; CATIGNANI, G.L.; LAZARUS, S. Tomatoes and cardiovascular health. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.43, p.1-18, 2003.
- WOLLGAST, J.; ANKLAM, E. Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. **Food Research International**, v.33, p.423-447, 2000.
- YAO, L.; JIANG, Y.; DATTA, N.; SINGANUSONG, R.; LIU, X.; DUAN, J.; RAYMONT, K.; LISLE, A.; XU, Y. HPLC analyses of flavanols and phenolic acids in the fresh young shoots of tea (*Camellia sinensis*) grown in Australia. **Food Chemistry**, v.84, p.253-263, 2004.

## **CAPÍTULO 2**

# **USE OF RESPONSE SURFACE METHODOLOGY FOR OPTIMIZATION AND VALIDATION OF EXTRACTION CONDITIONS FOR FLAVONOIDS QUANTIFICATION IN TOMATO PASTE USING LC-DAD-MS/MS**

ARTIGO A SER SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA *JOURNAL OF  
AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY*



**ABSTRACT**

An experimental design was used to optimize a method for phenolic compounds extraction from tomato paste and flavonoids clean up. This method can be used for spectrophotometric determinations of total phenolics and total flavonoids and also for flavonoids determination (glycosides and aglycones) by high performance liquid chromatography (HPLC). The optimized method was validated for total phenolics and total flavonoids with recovery between 101% and 102% for total phenolics and 90% and 112% for total flavonoids. Relative standard deviation (RSD) values were of 3.2% for total phenolics and 4.7% for total flavonoids. The chromatographic conditions established allowed the separation of 11 different flavonoids glycosides and aglycones with good selectivity, linearity, and limits of quantification ranging from 0.1 to 0.9 mg/100g. Repeatability (RSD) was of 5.0% for rutin and 3.7% for naringenin and recovery was higher than 82% for all flavonoids studied at three levels of concentration. The flavonoids identities were confirmed by HPLC-DAD-MS/MS. The optimized and validated method was applied for tomato paste and for *in natura* tomato samples.

**KEYWORDS:** experimental design, response surface methodology, total phenolics, flavonoids, tomato paste, HPLC-DAD-MS/MS.

## INTRODUCTION

Phenolic compounds are naturally occurring organic species that possess at least one aromatic ring with one or more hydroxyl groups attached to it (Escarpa & Gonzalez, 2001). Over 8000 different phenolic compounds have been identified. The main classes of polyphenols can be divided based on molecular size, e. g., low, median, and high molecular weight (Escarpa & Gonzalez, 2001).

The low molecular weight class includes hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids that have an important role at vital plant activities such as the seed germination and the proper growth of the plant (Escarpa & Gonzalez, 2001).

Flavonoids are representative of intermediate molecular weight compounds, and it is the major class of polyphenols. Because of this, flavonoids can be divided in groups such as chalcones, flavones, flavonols, flavanones, flavanols, anthocyanins and isoflavones (Bravo, 1998; Escarpa & Gonzalez, 2001; Wollgast, 2000). The common structure of these compounds is the diphenylpropane ( $C_6-C_3-C_6$ ), which consists of two aromatic rings connected by three carbons that usually form an oxygenated heterocycle. In foods, flavonoids occur primarily as *O*-glycosides. The most common glycosidic unit is glucose, but other examples include glucorhamnose, galactose, arabinose, and rhamnose (Cook & Samman, 1996; Heim *et al.*, 2002).

Different methods for extraction of phenolic compounds can be found in the literature (Nuutila *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2003; Toor & Savage, 2005; Toor *et al.*, 2006; Arabbi *et al.*, 2004; Price *et al.*, 1999; Chang *et al.*, 2006; Sahlin *et al.*, 2004). Usually, these methods differ in terms of solvent and mechanism of extraction. The most common solvents used are methanol, ethanol, and acetone, pure or in aqueous solution, acidified or not. The methods used for extraction could vary from a simple Soxhlet extraction to a more complex procedure including several steps like magnetic stirring, ultra-sonic bath and



centrifuges. Some of them also used a solid phase extraction (SPE), as a clean up step, to purify and/or concentrate the extracts (Arabbi *et al.*, 2004; Price *et al.*, 1999).

The aim of this study was to optimize and validate a method for phenolic compounds extraction and flavonoids concentration from tomato samples to be used for spectrophotometric determination of total phenolics and total flavonoids, as well as for identification and quantification of individual flavonoids (aglycones and glycosides) by high performance liquid chromatography connected in series to a photodiode array detector and to a mass spectrometer (LC-DAD-MS/MS).

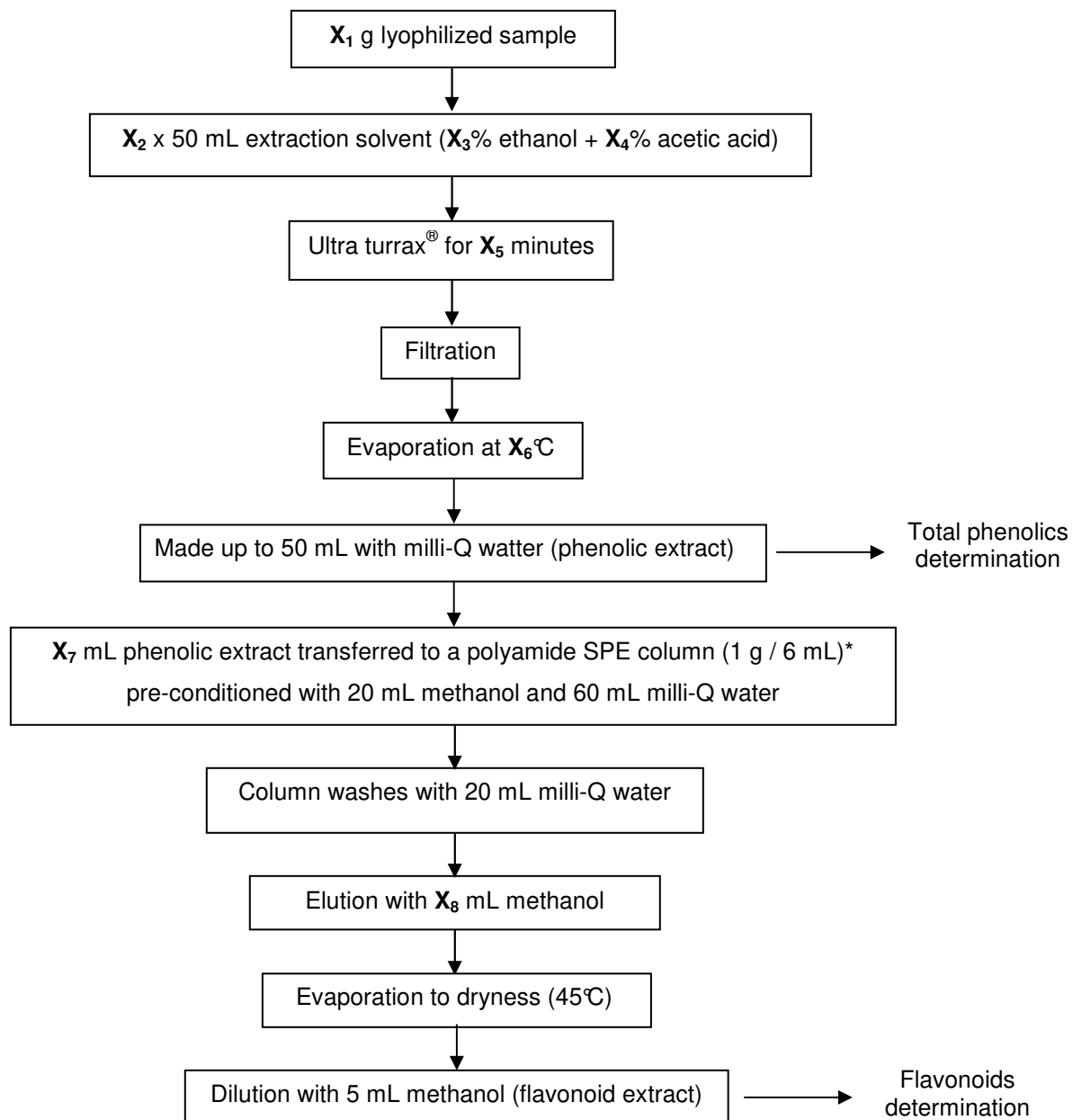
## **MATERIALS AND METHODS**

**Chemicals and Standards.** Folin-Ciocalteu reagent, sodium carbonate, sodium nitrite, aluminum chloride, and sodium hydroxide were analytical grade. Methanol, absolute ethanol, glacial acetic acid, acetone and acetonitrile were HPLC grade. Standards of gallic acid, quercetin, rutin (quercetin-3-rutinoside), naringenin, luteolin, and quercetin-3- $\beta$ -D-glucoside were purchased from Sigma (St. Louis, Missouri, USA); kaempferol, miricetin, apigenin, and naringin were obtained from Fluka (Buchs, Switzerland); quercetin-galactoside (hyperoside) and quercetin-rhamnoside (quercitrin) were purchased from Extrasynthese (Genay, France). All standards with at least 95% of purity.

**Samples.** Sample of tomato paste and one of *in natura* tomato were collected at a tomato processing factory (Predilecta Alimentos Ltda., Matão, São Paulo, Brazil). Each of them was sampled 3 times during a normal processing day with 3 hours of interval between each sample, totalizing 4 kg. Immediately after sampling, the samples were frozen on dry ice, freeze-dried and stored at -20 °C until use.

**Extraction Procedure.** After a preliminary evaluation of five different methods found in the literature (Chang *et al.*, 2006; Price *et al.*, 1999; Toor & Savage, 2005; Toor *et al.*, 2006 and Berhow, 2002), the method described by Price *et al.* (1999) was chosen for optimization using the solvent mixture described by Berhow (2002). **Figure 1** shows a general scheme of the method optimized and validated in this work. The studied variables were sample weight ( $X_1$ ), number of extractions ( $X_2$ ), ethanol concentration ( $X_3$ ), acetic acid concentration ( $X_4$ ), extraction time ( $X_5$ ), evaporation temperature ( $X_6$ ), sample volume for SPE ( $X_7$ ), and methanol volume ( $X_8$ ).

**Experimental Design.** A response surface methodology was used to optimize the extraction procedure as described by Rodrigues & Iemma (2005). First, a screening of 8 independent variables was made using a Plackett & Burman matrix (PB 12) designed with 15 experiments (12 independents + 3 central points) (Plackett & Burman, 1946). Since two of these variables belong to the SPE step, for this first experiment the responses analyzed were only about flavonoids: total flavonoids and flavonoids by HPLC. As previous analysis showed that rutin and naringenin were the most abundant flavonoids in tomato paste, only these two compounds were used to analyze the results from the experimental design for flavonoids by HPLC. After the selection of the statistically significant variables ( $p < 0.10$ ), a central composite design  $2^3$  with 6 axial points and 3 central points was used in order to determine the optimum extraction conditions. In this second experiment, the total phenolic content of the phenolic extract was also considered as a response. A sample of lyophilized tomato paste was used for these tests.



**Figure 1.** General scheme of the optimized method.  $X_i$  are the independent variables studied.

\*Chromabond<sup>®</sup> (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha)

**Total Phenolics Assay.** Total phenolics content was determined in the phenolic extract using Singleton & Rossi (1965) method adapted by Kim *et al.* (2003). Measurements were carried out in a UV-VIS spectrophotometer Varian Cary 50 (Varian Australia Pty Ltd, Mulgrave, Victoria, Australia) at 750 nm against a blank of reagents. Gallic acid was used as standard and the results were expressed as gallic acid equivalents (mg GAE/100 g), in dry basis, using a calibration curve from 20 to 500 µg/mL ( $\text{conc} = 211.46 \times \text{abs} + 0.53$ ,  $r^2 = 0.9999$ ).

**Total Flavonoids Assay.** For total flavonoids determination, a method based on Zhishen *et al.* (1999) with some modifications was used: 1.0 mL of flavonoid extract was added to a tube containing 4.0 mL of milli-Q water. 0.3 mL 5% NaNO<sub>2</sub> was added and, after 5 min, 0.3 mL 10% AlCl<sub>3</sub> was added to the tube. After 6 min, 2 mL 2 M NaOH was added and the volume was made up to 10 mL with milli-Q water. The tube was then mixed in a vortex for 20 s. Measurements were carried out in a UV-VIS spectrophotometer Varian Cary 50 (Varian Australia Pty Ltd, Mulgrave, Victoria, Australia) at 510 nm against a blank of reagents. Rutin was used as standard and the results were expressed as rutin equivalents (mg RE/100 g), dry basis, using a calibration curve from 40 to 800 µg/mL ( $\text{conc} = 807.32 \times \text{abs} - 21.19$ ,  $r^2 = 0.9968$ ).

**Flavonoids by HPLC.** For determination of flavonoids by HPLC, a liquid chromatograph (Shimadzu, model 10Avp, Kyoto, Japan) composed by a quaternary pump (LC-10Avp), a column heater (CTO-10Avp), photodiode array detector (PDA) (SPD-10Avp) and a Rheodyne® injector with a 20 µL sample loop, was used. Separation was carried out at 20 °C using an Inertsil ODS-3 column (250 x 4.6 mm, 5 µm, GL Sciences, Tokyo, Japan), mobile phase composed by 0.1% acetic acid solution (A) and acetonitrile:methanol (96:4,

v/v) (B). The elution gradient at a flow of 1 mL/min was as shown in **Table 1**, including column cleaning and equilibration time. Detection was made at 290 nm for naringenin and naringin, and at 365 nm for rutin, quercetin-galactoside, quercetin-glucoside, quercetin-rhamnoside, miricetin, luteolin, quercetin, apigenin and kaempferol. Primary identification was made by comparison between the retention time of the peaks in the sample and of authentic standards, and by UV-VIS spectra in the region between 190 and 600 nm.

**Table 1.** Elution gradient used in HPLC analysis

Time (min)	%B
0	20
10	20
15	30
30	30
60	40
65	40
66	90
70	20
85	20

**Method Validation.** The optimized method for phenolics extraction and flavonoids concentration was then validated for spectrophotometrical determinations of total phenolics and total flavonoids, and also for flavonoids quantification by HPLC.

For total phenolics and total flavonoids determinations, the method was validated in terms of repeatability and recovery. Repeatability was checked within 8 independent analyses of a lyophilized tomato paste carried out at optimum extraction conditions and the relative standard deviations (RSD) of these analyses were compared with the RSD

obtained by Horwitz equation ( $RSD \max(\%) = 2^{(1-0.5 \log C)}$ ) (Horwitz, 1982) for the concentrations found in the sample. Recovery was carried out in the same sample at two fortification levels: level I, addition of 120 mg rutin/100 g, and level II, addition of 240 mg rutin/100 g. The results were calculated in terms of mg RE/100 g for both determinations.

For flavonoids analyses by HPLC, the optimized method was validated in terms of selectivity, linearity, repeatability, recovery, and sensibility. Selectivity was checked by UV-VIS spectra between 200 and 700 nm and by mass spectrometry. Linearity was observed through determination coefficients ( $r^2$ ) of the calibration curves constructed with 5 calibration points of standards solutions in methanol with concentrations ranging from 1 to 200  $\mu\text{g/mL}$ . Calibration curves were made for all compounds except for quercetin-glucoside, quercetin-galactoside, and quercetin-rhamnoside wich concentrations were calculated using quercetin calibration curve in molar concentrations. Repeatability was evaluated through 10 independent analyses of a tomato paste sample and the RSD of these analyses was compared with the RSD from Horwitz equation. Recovery was performed at 3 different levels in triplicate for each level: level I, addition of 6 mg of each flavonoid / 100 g of sample (dry basis); level II, 24 mg; and level III, 36 mg. For this study a sample of tomato *in natura*, previously freeze-dried, was used due to its lower naringenin content. Sensitivity was evaluated by determining the limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ). LOD was defined as the lowest concentration of compound that gives a peak with a signal/noise ratio of 3, whereas LOQ was the minimum concentration of compound with a signal/noise ratio of 10 (ICH, 1996).

**HPLC-ESI-MS Analysis.** To confirm the identity of the flavonoids, the samples were injected into a HPLC (Shimadzu, model 20A, Kyoto, Japan) equipped with a quaternary

pump (LC-20AD) and a degasser unit (DGU-20A5) connected in series to a photodiode array detector (PDA) (SPD-M20A) and to a mass spectrometer (MS) from Bruker Daltonics (Esquire 4000 model, Bremen, Germany) with electron spray ionization source (ESI) and an ion-trap analyzer. The HPLC conditions were the same as described above. The MS parameters were set as follows: negative mode; capillary voltage: 1500 V; end plate offset: -500 V; capillary exit: -120 V; skimmer 1: -10 V; skimmer 2: -5 V; dry gas (N<sub>2</sub>) 325 °C, 8 L/min flow, and 30 psi nebulizer; scan range from *m/z* 100 to 1000. MS/MS was set in automatic mode applying fragmentation energy of 0.90 V.

**Statistical Analysis.** Statistica for Windows – release 5.0 (StatSoft Inc., Tulsa, USA) was used to design the experiments and to analyze the results.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Optimization of Extraction Conditions.** A Plackett & Burman (PB12) screening design was used in order to determine the statistically significant variables ( $p < 0.10$ ) for flavonoids extraction. Eight different variables were tested at three levels (**Table 2**). For all responses, acetic acid concentration ( $X_4$ ), extraction time ( $X_5$ ), evaporation temperature ( $X_6$ ), sample volume for SPE ( $X_7$ ) and methanol volume ( $X_8$ ) were not statistically significant ( $p > 0.10$ ). Thus, for the central composite design,  $X_4$  was fixed at 0.1 %,  $X_5$  at 1.5 minutes,  $X_6$  at 45 °C,  $X_7$  at 20 mL and  $X_8$  at 50 mL as the tendency pointed out by effects on the screening design (**Table 3**). For total flavonoids, naringenin and rutin, number of extraction ( $X_2$ ) and ethanol concentration ( $X_3$ ) were statistically significant ( $p < 0.10$ ), and for total flavonoids and naringenin, also sample weight ( $X_1$ ) was statistically significant ( $p < 0.10$ ). In the central composite design the levels of these three variables were changed in order to reach the optimum extraction conditions (**Table 4**).

**Table 2.** Variables and levels tested with PB12 screening experimental design

Variables		-1	0	+1
Sample weight (g)	X <sub>1</sub>	2.0	3.5	5.0
Number of extractions	X <sub>2</sub>	1	2	3
Ethanol concentration (%)	X <sub>3</sub>	60	70	80
Acetic acid concentration (%)	X <sub>4</sub>	0	0.1	1
Extraction time (min)	X <sub>5</sub>	0.5	1.0	1.5
Evaporation temperature (°C)	X <sub>6</sub>	40	45	50
Sample volume for SPE (mL)	X <sub>7</sub>	10	15	25
Methanol volume (mL)	X <sub>8</sub>	40	50	60

**Table 3.** Effects obtained with PB12 experiment for the responses studied

	Total flavonoids	Rutin	Naringenin
Mean	382.31*	21.85*	18.41*
Sample weight	-163.15*	-2.93	-2.80*
Number of extractions	209.56*	6.30*	6.41*
Ethanol concentration	123.53*	-5.49*	-3.12*
Acetic acid concentration	-0.87	-0.15	-0.26
Extraction time	72.01	1.51	1.35
Evaporation temperature	-42.73	-1.45	-0.45
Sample volume for SPE	-38.89	-1.89	-0.78
Methanol volume	11.57	0.45	0.43

\* Statistically significant ( $p < 0.10$ ).



**Table 4.** Levels of independent variables used in the central composite design  $2^3$ 

Variables			-1.68	-1	0	+1	+1.68
Sample weight (g)	$X_1$	(SW)	1.0	1.4	2.0	2.6	3.0
Number of extractions	$X_2$	(EXT)	1	2	3	4	5
Ethanol concentration (%)	$X_3$	(ETOH)	50	54	60	66	70

**Table 5** shows the regression coefficients of the quadratic equation (**Eq. 1**) for each response analyzed.

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 \quad (\text{Eq. 1})$$

where Y is the studied response,  $X_i$  is each independent variable analyzed and  $b_i$  is the correspondent regression coefficient.

**Table 5.** Regression coefficients for total phenolics, total flavonoids, rutin and naringenin

	Total phenolics	Total flavonoids	Rutin	Naringenin
Mean	518.50*	420.84*	27.02*	24.09*
SW (L)	-17.79*	23.68*	-0.53	-0.39
SW (Q)	-10.61*	-15.45	0.29	-0.01
EXT (L)	-77.05*	-35.07*	1.59*	1.52*
EXT (Q)	-67.76*	-67.29*	-0.88	-0.71*
ETOH (L)	24.16*	63.60*	-0.37	-0.31
ETOH (Q)	-58.73*	-53.22*	-0.93	-0.59
SW X EXT	0.27	-26.84*	-0.52	-0.35
SW X ETOH	9.36*	28.20*	0.22	0.44
EXT X ETOH	6.61	-8.84	0.62	0.29

\* Statistically significant ( $p < 0.05$ ); (L) = linear, (Q) = quadratic

The quadratic response surface fitted models for total phenolics (**Eq. 2**) and total flavonoids (**Eq. 3**) used only the statistically significant ( $p < 0.05$ ) terms. Analysis of variance (ANOVA) showed that both models are valid and had a good correlation ( $r^2 = 0.81$  for total phenolics and  $r^2 = 0.83$  for total flavonoids).

$$Y = 518.50 - 17.79X_1 - 77.05X_2 + 24.16X_3 - 10.61X_1^2 - 67.76X_2^2 - 58.73X_3^2 + 9.36X_1X_3 \quad (\text{Eq. 2})$$

$$Y = 420.84 + 23.68X_1 - 35.07X_2 + 63.60X_3 - 67.29X_2^2 - 53.22X_3^2 - 26.84X_1X_2 + 28.20X_1X_3 \quad (\text{Eq. 3})$$

For rutin, only the linear term of number of extractions was statistically significant ( $p < 0.05$ ), but the mathematical model that better adjusted for this response included all linear terms, quadratic terms of number of extractions and ethanol concentration, and the interactions between number of extractions and the other variables (**Eq. 4**). ANOVA showed that this model is valid and had a good correlation ( $r^2 = 0.81$ ).

$$Y = 27.02 - 0.53X_1 + 1.59X_2 - 0.37X_3 - 0.88X_2^2 - 0.93X_3^2 - 0.52X_1X_2 + 0.62X_2X_3 \quad (\text{Eq. 4})$$

For naringenin only the linear and quadratic terms of number of extractions were statistically significant ( $p < 0.05$ ). The mathematical model that better adjusted for this response also included the other linear terms, quadratic terms of ethanol concentration, and interactions between number of extractions and the other variables (**Eq. 5**). ANOVA showed that this model is valid and had a good correlation ( $r^2 = 0.76$ ).

$$Y = 24.09 - 0.39X_1 + 1.52X_2 - 0.31X_3 - 0.71X_2^2 - 0.59X_3^2 - 0.35X_1X_2 + 0.44X_1X_3 \quad (\text{Eq. 5})$$

Response surfaces for these models were generated (**Supplemental Figures 1 and 2**) and, based on them, the optimum extraction conditions were established as: 1.5 g of sample, 3 extractions and 60% ethanol concentration.

**Validation of Total Phenolics and Total Flavonoids.** The optimized method was validated in terms of repeatability and recovery for total phenolics and total flavonoids spectrophotometrical determinations. Coefficients of variations for repeatability were of 3.2% for total phenolics and 4.7% for total flavonoids. As both of them were below the RSD obtained by Horwitz equation for the concentration level studied, the method was considered precise. Recovery for total phenolics was very good for both levels studied, 101% for level I and 102% for level II (2% RSD for level I and 4% RSD for level II). Our results are close to those presented by Singleton & Rossi (1965) for wine samples (101%) and by Marinova *et al.* (2005) for fruits and vegetables (97%). For total flavonoids, recovery for level II (90%) was lower than the one found for level I (112%), with a RSD of 2% for level I and 3 % for level II. A possible explanation for this difference might be the very high rutin amount used at level II that probably had saturated the polyamide column resulting in losses of this compound. Even though, our results are close to the 96% found by Marinova *et al.* (2005).

**Validation of Flavonoids by HPLC.** The chromatographic conditions used allowed the separation of 11 flavonoids as can be observed in **Figure 2 A** and **B**. The identity of all peaks was confirmed by UV-VIS spectra and mass spectrometry (**Table 6**). All curves were linear with coefficients of determination ( $r^2$ ) between 0.9924 and 0.9998 (**Supplemental Table 1**). Recovery of all flavonoids studied ranged from 83% to 137% for level I, 84% to 102% for level II, and 88% to 106% for level III. **Table 7** shows the recovery

for each flavonoid at each studied level. Limits of detection (LOD) determined were between 0.03 and 0.19 mg/100 g and limits of quantification (LOQ) were between 0.10 and 0.86 mg/100 g (**Table 8**). Repeatability was determined for rutin and naringenin and the relative standard deviations (RSD) found were 5.0% and 3.7% for rutin and naringenin, respectively. Both of them were below the RSD calculated by Horwitz equation (7.0%) for the concentrations found in the sample.

**Table 6.** UV-VIS and mass spectra parameters used for flavonoids identification

RT (min)	Flavonoid	UV-VIS $\lambda$ max	[M-H] <sup>-</sup> ( <i>m/z</i> )	MS <sup>2</sup> ( <i>m/z</i> ) fragments
16.9	Rutin	255, 354	609	301
19.3	Quercetin-galactoside	255, 354	463	301
19.7	Quercetin-glucoside	255, 353	463	301
21.6	Naringin	220, 282	579	459, 271
22.4	Quercetin-rhamnoside	255, 348	447	301
25.8	Miricetin	247, 373	317	315
36.7	Luteolin	252, 347	285	285
37.7	Quercetin	254, 369	301	299
49.1	Naringenin	227, 289	271	151
50.3	Apigenin	220, 267, 337	269	269
53.5	Kaempferol	228, 266, 366	285	285

RT = Retention time

**Table 7.** Recovery (%) of flavonoids at three levels

Flavonoid	Level I	Level II	Level III
Quercetin	117.7 (1.3)*	91.8 (2.7)*	94.3 (2.2)*
Rutin	103.9 (2.5)*	102.3 (1.2)*	105.5 (2.1)*
Naringenin	87.4 (1.0)*	92.0 (0.7)*	94.2 (0.5)*
Naringin	98.4	98.2 (0.9)*	88.3
Kaempferol	115.1 (2.3)*	93.1 (2.0)*	92.7 (1.3)*
Miricetin	82.9 (5.3)*	95.8 (5.3)*	93.7 (3.8)*
Apigenin	84.2 (1.8)*	88.7 (1.6)*	91.7 (1.1)*
Luteolin	114.1 (3.9)*	93.0 (4.0)*	94.6 (3.2)*
Quercetin-glucoside	134.9 (2.3)*	93.8 (2.1)*	96.8 (3.4)*
Quercetin-galactoside	136.9 (2.6)*	96.4 (1.8)*	97.1 (1.9)*
Quercetin-rhamnoside	87.1 (1.2)*	84.3 (1.5)*	88.1 (1.7)*

\*Mean (standard deviation) of three independent analyses.

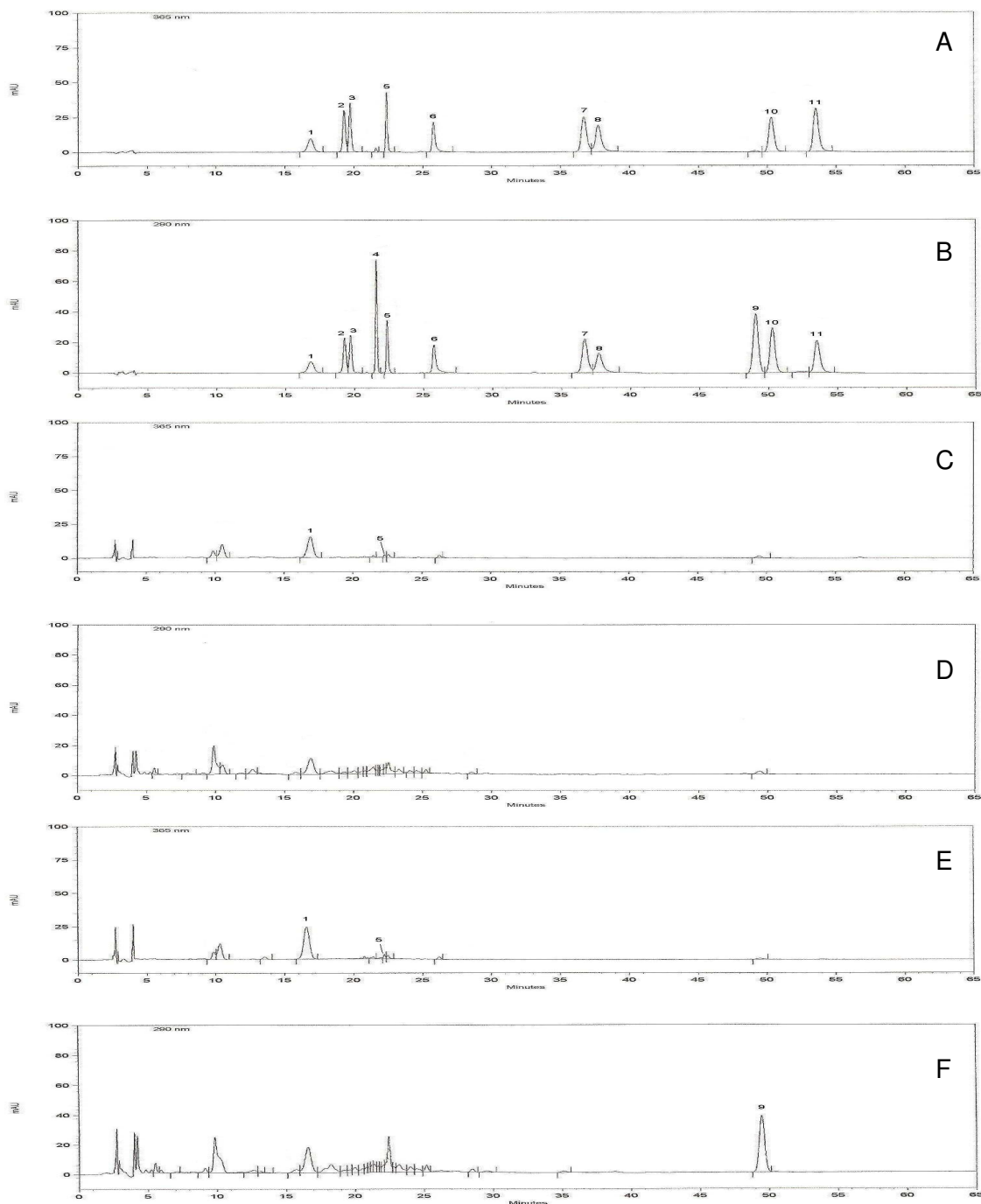
**Table 8.** LOD and LOQ values determined for each flavonoid analyzed

<b>Flavonoid</b>	LOD (mg/100g)	LOQ (mg/100g)
Quercetin	0.19	0.86
Rutin	0.12	0.35
Naringenin	0.03	0.13
Naringin	0.03	0.13
Kaempferol	0.06	0.35
Miricetin	0.13	0.42
Apigenin	0.06	0.25
Luteolin	0.14	0.47
Quercetin-glucoside	0.05	0.17
Quercetin-galactoside	0.05	0.17
Quercetin-rhamnoside	0.03	0.10

---

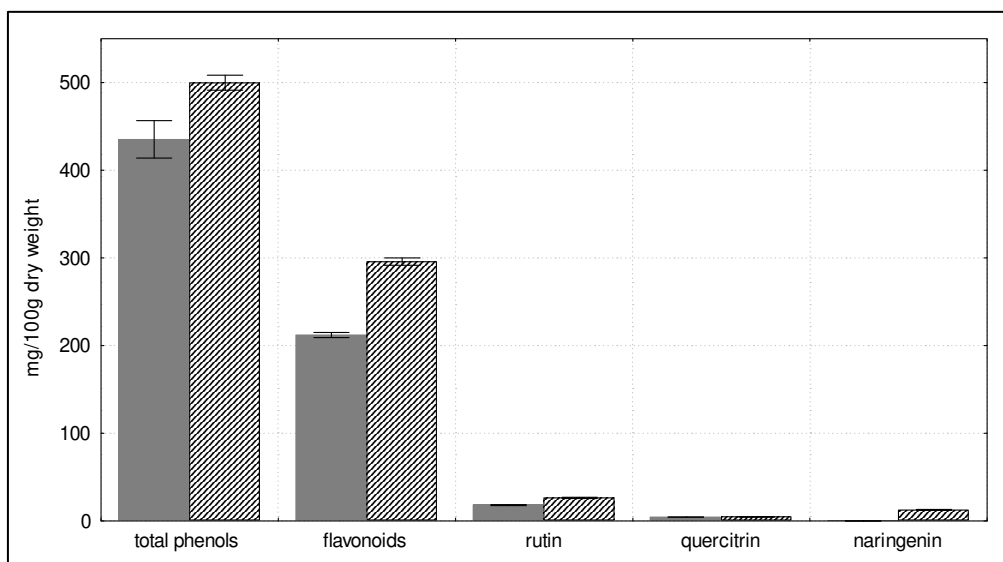
LOD = Limit of detection

LOQ = Limit of quantification



**Figure 2.** Chromatogram of flavonoids rutin (1), quercetin-galactoside (2), quercetin-glucoside (3), naringin (4), miricetin (5), quercetin-rhamnoside (6), luteolin (7), quercetin (8), naringenin (9), apigenin (10), and kaempferol (11) of a standard solution at 365 (A) and 290 nm (B), an *in natura* sample at 365 (C) and 290 nm (D), and a tomato paste sample at 365 (E) and 290 nm (F).

**Flavonoids in tomato samples.** The optimized method was used to determine the total phenolics and flavonoids contents in tomato *in natura* and tomato paste samples (**Figure 3**). Tomato paste had significantly higher contents of total phenolics, total flavonoids and rutin than the *in natura* sample. Quercetin-rhamnoside (quercitrin) showed no significant changes. Naringenin was not detected in the *in natura* sample and was found at a significant amount in the tomato paste sample. This result is in agreement with Capanoglu *et al.* (2008), which reported a conversion of naringenin chalcone into its isomeric flavanone form, naringenin, during tomato paste production. The other flavonoids studied were not detected in these samples. The results showed that tomato paste processing has a positive effect on the contents of phenolic compounds.



**Figure 3.** Results of total phenolics (expressed as GAE), total flavonoids (expressed as RE) and specific flavonoids (rutin, quercitrin and naringenin) found in tomato paste and *in natura* tomato samples.



## ACKNOWLEDGEMENT

The authors thank the financial support of the Brazilian agencies CNPq and FAPESP, the Institute of Food Technology (ITAL – Campinas, SP, Brazil) for the technical support, and Predilecta Alimentos Ltda for the tomato samples.

## LITERATURE CITED

- Arabbi, P. R.; Genovese, M. I.; Lajolo, F. M. Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by Brazilian population. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2004**, *52*, 1124-1131.
- 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. **2002**, 61-76.
- Bravo, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*. **1998**, *56*, 317-333.
- Capanoglu, E.; Beekwilder, J.; Boyacioglu, D.; Hall, R.; de Vos, R. Changes in antioxidant profiles during production of tomato paste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2008**, *56*, 964-973.
- Chang, C-H.; Lin, H-Y.; Chang, C-Y.; Liu, Y-C. Comparisons on the antioxidant properties of fresh, freeze-dried and hot-air-dried tomatoes. *Journal of Food Engineering*. **2006**, *77*, 478-485.
- Cook, N. C. & Samman, S. Flavonoids: Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Journal of Nutritional Biochemistry*. **1996**, *7*, 66-76.
- Escarpa, A. & Gonzalez, M. C. An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. **2001**. *31*, 57-139.

- Heim, K. E.; Tagliaferro, A. R.; Bobilya, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*. **2002**, *13*, 572-584.
- Horwitz, W. Evaluation on analytical methods used for regulation of foods and drugs. *Analytical Chemistry*. **1982**, *54*, 67-76.
- International Conference on Harmonization (ICH); *Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2B, Step 4, Consensus Guideline*. **1996**.
- Kim, D-O.; Jeong, S. W.; Lee, C. Y. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry*. **2003**, *81*, 321-326.
- Nuutila, A. M.; Puupponen-Pimiä, R.; Aarni, M.; Oksman-Caldentey, K. -M. Comparison of antioxidant activities of onion and garlic extracts by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity. *Food Chemistry*. **2003**, *81*, 485-493.
- 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*. **2005**, *40*, 255-260.
- Plackett, R. L. & Burman, J. P. The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*. **1946**, *33*, 305-325.
- 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*. **1999**, *66*, 489-494.
- Rodrigues, M. I. & Iemma, A. F. *Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: Uma estratégia seqüencial de planejamentos*. 1<sup>st</sup> ed. Campinas, SP, Brazil. **2005**.

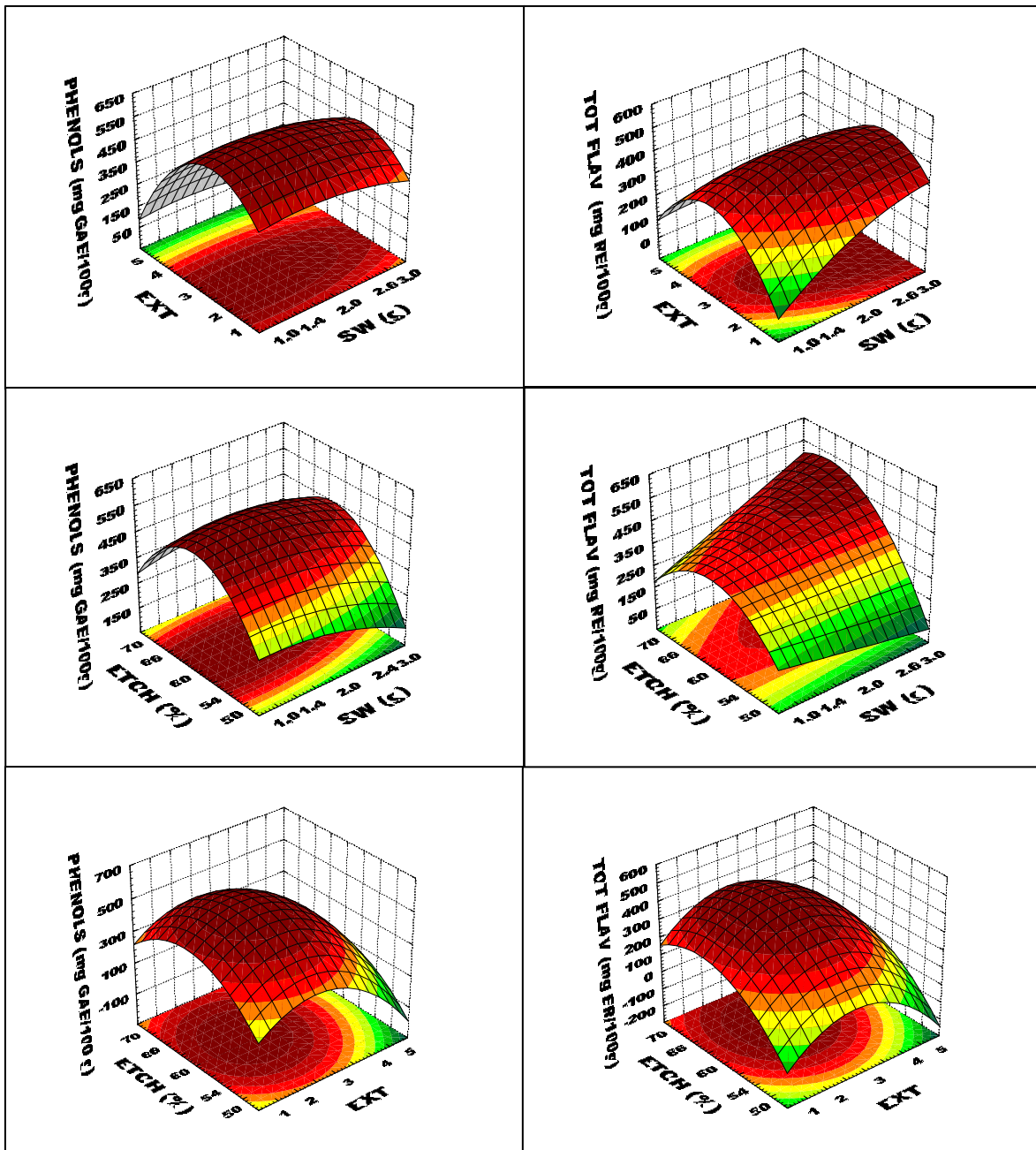
- Sahlin, E.; Savage, G. P.; Lister, C. E. Investigation of the antioxidante properties of tomatoes after processing. *Journal of Food Composition and Analysis*. **2004**, *17*, 635-647.
- Singleton, V. L.; Rossi, J. A. Jr. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. **1965**, *16*, 144-158.
- Toor, R. K.; Savage, G. P. Antioxidant activity in different fractions of tomatoes. *Food Research International*. **2005**, *38*, 487-494.
- Toor, R. K.; Savage, G. P.; Lister, C. E. Seasonal variations in the antioxidant composition of greenhouse grown tomatoes. *Journal of Food Composition and Analysis*. **2006**, *19*, 1-10.
- Wollgast, J. & Anklam, E. Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International*. **2000**, *33*, 423-447.
- Zhishen, J.; Mengcheng, T.; Jianming, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*. **1999**, *64*, 555-559.

## SUPPORTING INFORMATION

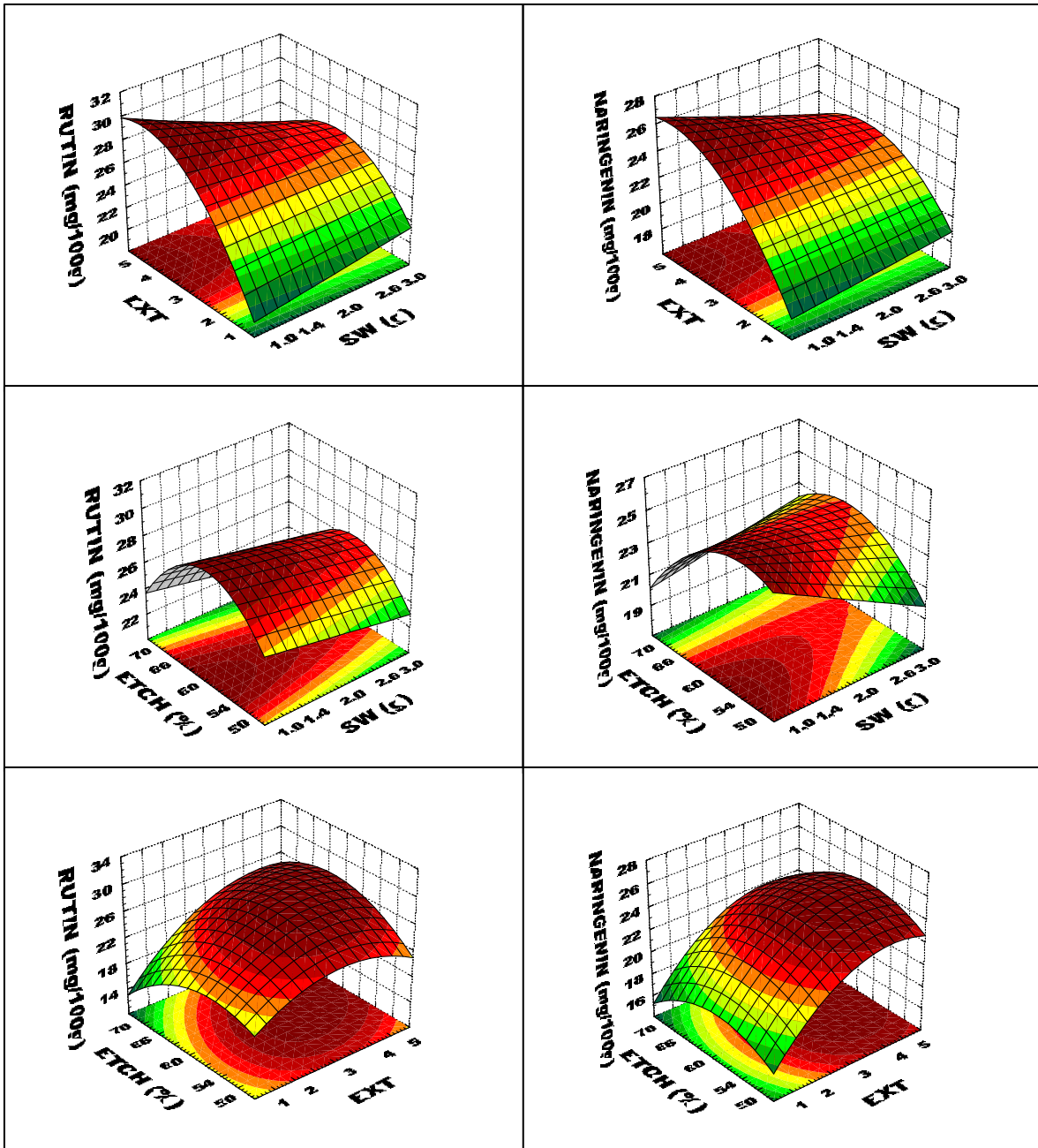
**Supplemental Table 1.** Calibration curves and determination coefficients ( $r^2$ ) for flavonoids.

Flavonoid	Calibration curve <sup>a</sup>	$r^2$ <sup>b</sup>
Quercetin	$y = 76409.8 x - 376703.6$	0.9976
Rutin	$y = 26438.5 x - 57796.8$	0.9992
Naringenin	$y = 74965.3 x + 125980.2$	0.9989
Naringin	$y = 29358.9 x + 53414.1$	0.9986
Kaempferol	$y = 73352.0 x - 253941.9$	0.9988
Miricetin	$y = 52308.1 x - 517909.7$	0.9924
Apigenin	$y = 47768.0 x + 16162.1$	0.9998
Luteolin	$y = 55518.1 x - 220554.7$	0.9985

<sup>a</sup>  $y$  is the peak area in the HPLC chromatogram, and  $x$  is the flavonoid concentration in  $\mu\text{g/mL}$ . <sup>b</sup> Determination coefficients are statistically significant ( $p < 0.0001$ ).



Supplemental Figure 1. Response surfaces for total phenolics and total flavonoids.



Supplemental Figure 2. Response surfaces for rutin and naringenin.

## **CAPÍTULO 3**

# **EFEITO DO PROCESSAMENTO E DA ESTOCAGEM SOBRE OS COMPOSTOS ANTIOXIDANTES EM POLPA DE TOMATE CONCENTRADA**





**RESUMO**

O efeito do tratamento térmico sobre os compostos antioxidantes do tomate foi avaliado durante o processamento de polpa de tomate concentrada. Foram analisados os teores de compostos fenólicos totais, flavonóides totais, flavonóides por CLAE, ácido ascórbico, licopeno e  $\beta$ -caroteno, bem como a atividade antioxidante das frações hidrofílicas (usando os métodos ABTS e DPPH) e lipofílicas (pelo método ABTS). Também foi estudado o efeito da estocagem da polpa, por 12 meses à temperatura ambiente, sobre esses mesmos constituintes. Verificou-se que, durante o processamento, em geral, não houve perdas dos compostos antioxidantes presentes no tomate. Para a maioria deles, os teores encontrados no produto final foram iguais ou maiores aos encontrados nas amostras *in natura*, e apenas para o ácido ascórbico foi observada alguma perda. Durante o armazenamento, observou-se grande degradação do ácido ascórbico, sendo que, após 12 meses, esse composto não foi mais detectado nas amostras. Porém, os demais constituintes mantiveram-se estáveis, e não foi observada alteração da atividade antioxidante durante a estocagem.

## INTRODUÇÃO

O tomate é uma rica fonte de compostos antioxidantes tais como vitaminas, carotenóides e compostos fenólicos, principalmente os flavonóides (WILLCOX *et al.*, 2003; KAUR *et al.*, 2004). O teor desses constituintes pode variar de acordo com a variedade do tomate, com as condições de cultivo, com o grau de maturação e também com a época do ano em que é plantado e colhido (GEORGE *et al.*, 2004; MARTÍNEZ-VALVERDE *et al.*, 2002; SLIMESTAD & VERHEUL, 2005).

Toor & Savage (2005) encontraram teores maiores de compostos fenólicos totais, flavonóides totais, licopeno e ácido ascórbico na pele do tomate, o que também resultou em uma maior atividade antioxidante dessa fração do tomate quando comparada com a polpa e a semente. Os flavonóides são sintetizados e armazenados principalmente na pele do tomate e, por isso, a concentração desses compostos é maior nas variedades menores como o tomate cereja (STEWART *et al.*, 2000; WILLCOX *et al.*, 2003; ARABBI *et al.*, 2004; TOOR & SAVAGE, 2005). Entre outras variedades também foram observadas diferenças nos níveis de flavonóides (CROZIER *et al.*, 1997; STEWART *et al.*, 2000).

Geralmente, os produtos processados são vistos como detentores de menor valor nutricional quando comparados aos vegetais e frutas frescos, devido à perda de compostos tais como as vitaminas. Entretanto, ao contrário do que se acredita, estudos recentes mostraram que o teor de compostos antioxidantes, como os carotenóides e os compostos fenólicos, pode aumentar durante o processamento de tomates (CHANG *et al.*, 2006; GIOVANELLI *et al.*, 2001; TAKEOKA *et al.*, 2001).

Durante processos que envolvem altas temperaturas, como a secagem e o cozimento, ocorre perda de ácido ascórbico. Em contrapartida, os teores de compostos fenólicos totais, flavonóides totais e licopeno aumentam, fazendo com que a atividade antioxidante também aumente (DEWANTO *et al.*, 2002).

Estudos em planta-piloto mostraram que os teores de vitamina C diminuíram com o aumento do tempo ou número de etapas do processamento devido ao fato dessa vitamina ser termicamente instável. Já os compostos fenólicos se mantiveram estáveis durante o processamento, e, em alguns casos, foi observado um aumento desses teores (GAHLER *et al.*, 2003).

Os trabalhos que analisaram as diferentes etapas envolvidas no processamento de tomates encontraram resultados contraditórios a respeito dos carotenóides. Capanoglu *et al.* (2008) observaram uma diminuição dos teores de licopeno durante o processamento, enquanto Re *et al.* (2002) detectaram um aumento na concentração de licopeno com o processamento. Quanto aos flavonóides, em ambos os trabalhos, os teores encontrados não sofreram alteração, sendo que os teores de alguns flavonóides aumentaram durante o processamento.

Os compostos antioxidantes do tomate também têm se mostrado estáveis durante a estocagem, tanto no produto *in natura* quanto nos produtos processados. Toor & Savage (2006) verificaram que a estocagem de tomates a 7, 15 e 25 °C por 10 dias não teve efeito deletério nos teores de fenólicos totais, flavonóides e ácido ascórbico, nem na atividade antioxidante da fração hidrofílica. Giovanelli *et al.* (2001) detectaram um pequeno aumento nos teores de fenóis totais em polpa e purê de tomate estocados a 40 °C durante 3 meses e, nesse mesmo estudo, não foram observadas alterações nos teores de fenóis totais em extrato de tomate. Em um estudo acelerado de vida-de-prateleira em polpa, purê e extrato de tomate, foi observado um aumento no teor de fenóis totais durante a estocagem a temperatura maior ou igual a 40 °C, o que pode estar relacionado com a hidrólise de glicosídeos. Os compostos fenólicos se apresentaram estáveis a temperaturas menores que 40 °C (LAVELLI & GIOVANELLI, 2003).

Baseado nesses fatos, o objetivo do presente trabalho foi verificar o efeito do processamento de polpa de tomate concentrada e da sua estocagem por 12 meses sobre os compostos antioxidantes presentes nesse produto. Para tanto, foram analisados os teores de compostos fenólicos totais, flavonóides totais, flavonóides por CLAE, ácido ascórbico, licopeno e  $\beta$ -caroteno e a atividade antioxidante das frações hidrofílicas (usando os métodos ABTS e DPPH) e lipofílicas (pelo método ABTS).

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Amostras**

Para a realização deste estudo, as amostras de polpa de tomate concentrada foram coletadas em uma indústria processadora de tomate (Predilecta Alimentos Ltda, Matão, SP) nos seguintes pontos: (1) tomate *in natura*, (2) após a inativação enzimática (“hot break”), (3) após o despulpamento, (4), (5) e (6) após cada um dos três estágios de concentração e (7) após a esterilização seguida de envase asséptico (produto final). Também foi coletada uma amostra do resíduo (subproduto) do processamento (pele + semente). Foram feitas três coletas, em dias normais de processamento, sendo a primeira realizada no início da safra (julho/2006), a segunda no meio da safra (agosto/2006) e a terceira no final da safra do tomate (setembro/2006). A amostragem de cada etapa do processamento foi composta por três coletas realizadas com intervalo de três horas entre elas, totalizando no final do dia, aproximadamente, 4 kg de amostra dos pontos (1) a (4), 3 kg de amostra do ponto (5), 2 kg de amostra dos pontos (6) e (7) e 1 kg de amostra do subproduto. As amostras foram congeladas imediatamente após cada coleta, utilizando-se gelo seco. Parte das amostras foi congelada separadamente para ser utilizada na

caracterização físico-química. O restante das amostras congeladas foi liofilizado para a realização dos demais ensaios.

Em cada coleta também foram amostrados 13 *bags* para a avaliação da estocagem, cada um contendo entre 1,7 e 2,0 kg de produto final. Um *bag* foi aberto no primeiro dia subsequente à coleta, representando o tempo zero. Os demais *bags* foram armazenados no escuro, à temperatura ambiente (com mínima de 15 °C e máxima de 31 °C) e, mensalmente, um deles foi tomado para análise até completar um ano, tempo usual de armazenamento da polpa de tomate concentrada na indústria. Depois de aberto o *bag*, uma parte da amostra foi separada para caracterização físico-química e o restante da amostra foi congelado e liofilizado para as demais análises.

As amostras liofilizadas foram armazenadas a -20 °C até o momento das análises.

Devido ao planejamento de produção da empresa, o produto final da primeira coleta diferia das demais por se tratar de polpa de tomate concentrada para refogado. Essa diferença se deu, basicamente, na presença de pele e semente e no Brix final do produto.

### **Reagentes e padrões**

Os reagentes de Folin-Ciocalteu, carbonato de sódio, nitrito de sódio, cloreto de alumínio, fosfato de potássio monobásico, hidróxido de sódio, éter de petróleo e acetona foram de grau analítico. Metanol, etanol absoluto, ácido acético glacial, acetona, acetonitrila e acetato de etila usados nas fases-móveis foram de grau cromatográfico. Os padrões de ácido gálico, quercetina, rutina (quercetina-3-rutinosídeo), quercetina-3-β-D-glicosídeo, naringenina, luteolina e *trans*-β-caroteno foram adquiridos da Sigma (St. Louis, Missouri, USA); kaempferol, miricetina, apigenina e naringina (naringenina-7-

neohesperidosídeo) foram obtidos da Fluka (Buchs, Switzerland); hiperosídeo (quercetina-3- $\beta$ -D-galactosídeo) e quercitrina (quercetina-3-L-ramnosídeo) foram adquiridos da Extrasynthese (Z.I. Lyon Nord, Genay, France); e ácido ascórbico da QM (Merck, Alemanha). Todos os padrões foram adquiridos com pureza mínima de 95%. ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)), persulfato de potássio, Trolox (ácido ( $\pm$ )-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromona-2-carboxílico) e DPPH<sup>•</sup> (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) também foram adquiridos da Sigma (St. Louis, Missouri, USA). O padrão de licopeno foi obtido em laboratório a partir do extrato de uma amostra de tomate. O licopeno foi isolado do extrato de carotenóides por cromatografia em coluna aberta, tendo como adsorvente óxido de magnésio e *Hyflosupercel* (1:2 m/m). A primeira fração de carotenóides foi eluída com éter de petróleo:éter etílico (7:3 v/v), seguido pela eluição do licopeno com acetona. A fração com licopeno foi seca sob nitrogênio e suspendida em éter de petróleo. A concentração foi determinada por espectrofotometria a 472 nm utilizando o coeficiente de absorção de 3450, e a pureza foi avaliada por CLAE-DAD, sendo encontrado um teor 99% de pureza.

### **Caracterização físico-química**

A determinação do teor de umidade das amostras foi realizada antes e após a liofilização. Foi utilizado o método AOAC 964.22 por secagem em estufa a vácuo a 70°C (HORWITZ, 2000).

As análises de pH (met. 981.12), sólidos solúveis em °Brix (met. 970.59) e acidez total (met. 925.53) foram realizadas nas amostras não liofilizadas utilizando-se métodos da AOAC (HORWITZ, 2000).

### **Extração dos compostos fenólicos e concentração dos flavonóides**

A extração dos compostos fenólicos e a concentração dos flavonóides foram realizadas utilizando-se o método otimizado no presente estudo (Capítulo 2): 50 mL de solvente extrator (etanol 60% com 0,1% de ácido acético) foram adicionados a 1,5 g de amostra liofilizada. A mistura foi homogeneizada por 1,5 min em Ultra turrax<sup>®</sup> (Ika, Junke & Kunkel, Alemanha) e filtrada em papel de filtro para um balão de 250 mL. A extração foi repetida 2 vezes e os filtrados foram adicionados ao mesmo balão. O extrato combinado foi concentrado em evaporador rotativo a 45 °C (Rotavapor R-110, Büchi, Suíça) com auxílio de uma bomba de vácuo (Marconi, Brasil). O concentrado foi transferido para um balão volumétrico de 50 mL e o volume foi completado com água deionizada (Milli-Q Ultra Pure System, USA). Nesse extrato, denominado extrato fenólico, foram realizadas as determinações de compostos fenólicos totais e de atividade antioxidante pelos métodos ABTS e DPPH.

Uma alíquota de 20 mL do extrato fenólico foi adicionada a uma coluna de poliamida (1g/6mL) Chromabond<sup>®</sup> (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha) pré-condicionada com 20 mL de metanol e 60 mL de água deionizada. A coluna foi lavada com 20 mL de água deionizada e todos os eluatos foram descartados. A eluição dos flavonóides foi feita com 50 mL de metanol. O extrato foi recolhido em um balão de 100 mL e o metanol foi seco em evaporador rotativo a 45°C. Adicionaram-se ao resíduo 5 mL de metanol, e esse extrato, chamado de extrato concentrado, foi utilizado para as determinações de flavonóides totais, flavonóides por CLAE e atividade antioxidante pelos métodos ABTS e DPPH.

### **Determinação dos compostos fenólicos totais**

A determinação dos compostos fenólicos totais foi feita segundo Singleton & Rossi (1965) adaptada por Kim *et al.* (2003). Resumidamente, foram pipetados 0,5 mL do extrato fenólico e transferidos para um tubo de ensaio contendo 9,5 mL de água deionizada. Foi adicionado 1 mL do reagente de Folin-Ciocalteu e o tubo foi tampado e agitado. Após 5 min, foram adicionados 10 mL de carbonato de sódio 7% (m/v) e, em seguida, 4 mL de água deionizada, perfazendo um volume total de 25 mL. O tubo foi tampado, agitado em agitador tipo “vortex” por 20 s e incubado por 90 min à temperatura ambiente no escuro. A leitura da absorbância foi realizada em um espectrofotômetro de UV-VIS Varian Cary 50 (Varian Australia Pty Ltd, Mulgrave, Victoria, Austrália) a 750 nm contra um branco. Ácido gálico foi utilizado como padrão e os resultados foram expressos em termos de equivalente de ácido gálico (mg EAG/100 g), em base seca, usando uma curva de calibração de 50 a 400 µg/mL.

### **Determinação de flavonóides totais**

Os teores de flavonóides totais foram determinados de acordo com a metodologia descrita por Zhishen *et al.* (1999), modificada conforme segue. Foi pipetado 1 mL do extrato concentrado em um tubo de ensaio contendo 4 mL de água deionizada. Em seguida, foi adicionado 0,3 mL de NaNO<sub>2</sub> 5% e, após 5 min, foram adicionados 0,3 mL de AlCl<sub>3</sub> 10%. Após 6 min, foram adicionados 2 mL de NaOH 2 M e 2,4 mL de água deionizada. O tubo foi tampado e agitado em agitador tipo “vortex” por 20 s. A leitura da absorbância foi realizada em um espectrofotômetro de UV-VIS Varian Cary 50 (Varian Australia Pty Ltd, Mulgrave, Victoria, Austrália) a 510 nm contra um branco. Rutina foi utilizada como padrão e os resultados foram expressos em equivalente de rutina (mg ER/100 g), em base seca, usando uma curva de calibração de 50 a 400 µg/mL.



### Determinação de flavonóides por CLAE

Para a análise cromatográfica dos flavonóides, o extrato concentrado foi filtrado em membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  e injetado em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu, modelo 10Avp, Kyoto, Japão), com bomba quaternária (LC-10ATvp), forno para coluna (CTO-10ASvp), detector de arranjo de diodos (DAD) (SPD-M10Avp) e válvula de amostragem Rheodyne<sup>®</sup> com *loop* de 20  $\mu\text{L}$ . As condições cromatográficas utilizadas foram: coluna Inertsil ODS-3 250 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$  (GL Sciences, Tokyo, Japão); temperatura da coluna: 20 °C; fase móvel: (A) Ácido acético 0,1% em água deionizada, (B) acetonitrila:metanol (96:4, v/v); vazão da fase móvel: 1 mL/min; gradiente de concentração: conforme **Tabela 1**. A detecção foi feita a 290 nm para naringina e naringenina e 365 nm para rutina, hiperosídio, quercetina-3-glicosídeo, quercitrina, miricetina, luteolina, quercetina, apigenina e kaempferol.

**Tabela 1.** Gradiente de concentração usado para a separação de flavonóides por CLAE.

Tempo (min)	%B
0	20
10	20
15	30
30	30
60	40
65	40
66	90
70	20
85	20

### Determinação de ácido ascórbico por CLAE

Os teores de ácido ascórbico foram determinados seguindo a metodologia de Arakawa *et al.* (1981), com algumas modificações. Aproximadamente 2 g de amostra, foram adicionados 50 mL de fase móvel, e a mistura foi agitada em banho de ultrassom por 15 minutos e filtrada. 250 µL foram injetados no cromatógrafo líquido (Shimadzu, modelo 10A, Kyoto, Japão), com bomba modelo LC-10AD e detector de arranjo de diodos (SPD-M10A). A separação foi feita em uma coluna LiCrospher® 100 RP 18, 250 x 4 mm, 5 µm, (Merck, Alemanha). A fase móvel foi constituída de: (A) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,12 M + heptanossulfonato de sódio 1,25 mM + trietilamina 5 mM, pH 2,5 : metanol (97:3, v/v) e (B) metanol:água (1:1, v/v). A vazão foi de 0,8 mL/min com o seguinte gradiente de concentração: iniciou com 0% de B e permaneceu até 6 min; de 6 a 8,5 min, aumentou para 20% B e permaneceu nesta concentração até 13,5 min; de 13,5 a 16 min, voltou para 0% B e permaneceu por 10 min para reequilibrar o sistema. A detecção foi feita em 260 nm e a quantificação realizada por padronização externa com uso de curva de calibração de 1 a 8 µg/mL (área = 1092353xconc -15776, r<sup>2</sup> = 0,9994).

### Determinação de licopeno e β-caroteno por CLAE

O método utilizado foi baseado na metodologia descrita por Carvalho *et al.* (1992). Para a extração dos carotenóides foram tomados cerca de 0,5 g de amostra liofilizada, adicionados de *Hyflosupercel*, homogeneizados e hidratados com 20 mL de água. Os carotenóides foram extraídos com uma porção de 50 mL e três de 30 mL de acetona em desintegrador por 1 min. Em um funil de separação contendo 50 mL de éter de petróleo, alíquotas de 20 mL do extrato em acetona foram transferidas, e a acetona foi eliminada com adição de água. Após a completa transferência dos carotenóides e eliminação da acetona, os carotenóides dissolvidos no éter de petróleo foram transferidos para balão de

50 mL e o volume completado com éter de petróleo. Esse extrato, denominado extrato lipofílico, foi utilizado para as determinações de  $\beta$ -caroteno, licopeno e atividade antioxidante pelo método ABTS.

Para a análise de  $\beta$ -caroteno, uma alíquota de 1 mL foi seca sob nitrogênio e suspendida em 1 mL de fase móvel, e, para licopeno, foram secos 0,5 mL de extrato e suspensos em 5 mL de fase móvel. As amostras suspensas em fase móvel foram colocadas em vortex por um minuto, filtradas em membrana de 0,45  $\mu$ m e injetadas no cromatógrafo líquido (Shimadzu, modelo CLASS-10, Kyoto, Japão) com bomba modelo LC10 e detector de arranjo de diodos modelo SPD-M10A. Para a separação, foi utilizada uma coluna LiCrospher<sup>®</sup> 100 RP 18, 125 x 4 mm, 5  $\mu$ m, (Merck, Alemanha). A separação foi isocrática, tendo como fase móvel acetonitrila:metanol:acetato de etila (73:20:7, v/v/v) com vazão de 1,5 mL/min. A detecção foi feita a 450 nm e a quantificação foi realizada por padronização externa utilizando-se padrões de  $\beta$ -caroteno e licopeno com concentrações próximas às encontradas nas amostras.

### **Determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS**

Seguindo o método de Re *et al.* (1999), foi preparada uma solução padrão de Trolox 2,5 mM em etanol. A solução estoque de ABTS foi preparada em água na concentração de 7 mM. O cátion radical ABTS<sup>•+</sup> foi gerado adicionando-se, a essa solução, persulfato de potássio a 2,45 mM (concentração final) e deixando a mistura no escuro, à temperatura ambiente, por 12 a 16 horas antes do uso. A solução de ABTS<sup>•+</sup> foi diluída em etanol grau cromatográfico até a absorbância de 0,70 ( $\pm$  0,02) a 750 nm. A 3 mL dessa solução foram adicionados 100  $\mu$ L da solução em estudo (extrato fenólico, extrato concentrado, extrato lipofílico ou padrão de Trolox, em 5 diferentes

concentrações). Exatamente após 10 min, foi feita a leitura da absorbância a 750 nm das amostras, do padrão e de um branco. A porcentagem de inibição da absorbância ocasionada pela amostra foi calculada em relação à ocasionada pelo padrão de Trolox, e os resultados foram expressos em TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*). As leituras da absorbância foram realizadas em um espectrofotômetro de UV-VIS Varian Cary 50 (Varian Australia Pty Ltd, Mulgrave, Victoria, Austrália).

### **Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH**

Para a determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH, foi utilizada a metodologia descrita por Brand-Williams *et al.* (1995). Uma solução de DPPH• a  $6 \times 10^{-5}$  M foi preparada em metanol grau cromatográfico. 100  $\mu$ L da solução em estudo (extrato fenólico ou extrato concentrado, em 5 diferentes concentrações) foram adicionados a 3 mL da solução de DPPH•. A medida da absorbância em 515 nm foi realizada exatamente após 1 hora. A atividade antioxidante, medida em termos de ARP (*anti-radical power*) foi expressa como a quantidade de amostra necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH•, a qual foi determinada por meio de uma curva de calibração de  $1,22 \times 10^{-5}$  M a  $6,09 \times 10^{-5}$  M. As leituras da absorbância foram realizadas em um espectrofotômetro de UV-VIS Varian Cary 50 (Varian Australia Pty Ltd, Mulgrave, Victoria, Austrália).

### **Análise estatística**

As determinações foram realizadas em triplicata para o cálculo da média e da estimativa de desvio-padrão.

Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e teste Tukey para comparação das médias, utilizando-se o programa Statistica versão 5.5 (StatSoft, Inc., 1984 –2000).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### EFEITO DO PROCESSAMENTO

#### Caracterização físico-química

As características físico-químicas de todas as amostras foram avaliadas quanto aos parâmetros de umidade, pH, sólidos solúveis (°Brix) e acidez total (expressa em ácido cítrico). Os valores obtidos podem ser observados nas **Tabelas 2 a 4**. Durante o processamento, o teor de sólidos solúveis aumentou de 4,5-5,0 °Brix no tomate *in natura* para 19,3 °Brix no produto final da primeira coleta e para 24,7 °Brix no produto final das demais coletas. O tomate *in natura* apresentou umidade média de 94,3%; já o produto final apresentou umidade de 78,8% na primeira coleta e, em média, 73,7% nas demais coletas, devido ao processo de concentração. O pH manteve-se praticamente constante durante o processamento, apresentando valores entre 4,3 e 4,6 em todas as etapas de todas as coletas, exceto para o subproduto de setembro que apresentou pH de 5,3. A acidez passou de 0,3 g ácido cítrico/100 g no tomate *in natura* para 1,1-1,4 g ácido cítrico /100 g nos produtos finais.

**Tabela 2.** Teores de umidade, sólidos solúveis, pH e acidez total durante o processamento de polpa de tomate concentrada para refogado produzida julho/2006.

<b>Etapas do Processamento</b>	<b>Umidade (g/100g)*</b>	<b>Sólidos Solúveis (°Brix)*</b>	<b>pH*</b>	<b>Acidez Total (g ác. cítrico/100 g)*</b>
<i>In natura</i>	94,25 ± 0,03	4,9 ± 0,1	4,3 ± 0,0	0,35 ± 0,00
<i>Hot-break</i>	94,21 ± 0,08	4,8 ± 0,1	4,5 ± 0,0	0,31 ± 0,00
Despolpamento	93,86 ± 0,02	4,8 ± 0,0	4,5 ± 0,0	0,31 ± 0,00
1ª Concentração	92,34 ± 0,04	6,5 ± 0,0	4,5 ± 0,0	0,41 ± 0,00
2ª Concentração	89,37 ± 0,05	9,0 ± 0,0	4,4 ± 0,0	0,65 ± 0,01
3ª Concentração	79,71 ± 0,08	18,3 ± 0,1	4,4 ± 0,0	1,11 ± 0,01
Produto final	78,76 ± 0,15	19,3 ± 0,0	4,4 ± 0,0	1,14 ± 0,01
Subproduto	80,27 ± 0,17	-	4,5 ± 0,1	0,28 ± 0,00

\*Resultados expressos como média ± estimativa de desvio padrão de três repetições analíticas independentes.

**Tabela 3.** Teores de umidade, sólidos solúveis, pH e acidez total durante o processamento de polpa de tomate concentrada produzida em agosto/2006.

<b>Etapas do Processamento</b>	<b>Umidade (g/100g)*</b>	<b>Sólidos Solúveis (°Brix)*</b>	<b>pH*</b>	<b>Acidez Total (g ác. cítrico/100 g)*</b>
<i>In natura</i>	94,28 ± 0,07	5,0 ± 0,1	4,4 ± 0,0	0,35 ± 0,00
<i>Hot-break</i>	94,53 ± 0,08	5,0 ± 0,0	4,5 ± 0,0	0,32 ± 0,00
Despolpamento	94,38 ± 0,02	5,1 ± 0,1	4,5 ± 0,0	0,35 ± 0,01
1ª Concentração	92,90 ± 0,02	6,5 ± 0,0	4,5 ± 0,0	0,42 ± 0,01
2ª Concentração	89,15 ± 0,02	10,1 ± 0,2	4,6 ± 0,0	0,61 ± 0,01
3ª Concentração	73,73 ± 0,09	25,5 ± 0,3	4,6 ± 0,0	1,44 ± 0,01
Produto final	74,28 ± 0,09	24,7 ± 0,6	4,6 ± 0,0	1,43 ± 0,01
Subproduto	71,32 ± 0,29	-	4,6 ± 0,0	0,27 ± 0,00

\*Resultados expressos como média ± estimativa de desvio padrão de três repetições analíticas independentes.

**Tabela 4.** Teores de umidade, sólidos solúveis, pH e acidez total durante o processamento de polpa de tomate concentrada produzida em setembro/2006.

<b>Etapas do Processamento</b>	<b>Umidade (g/100g)*</b>	<b>Sólidos Solúveis (°Brix)*</b>	<b>pH*</b>	<b>Acidez Total (g ác. cítrico/100 g)*</b>
<i>In natura</i>	94,39 ± 0,09	4,5 ± 0,0	4,5 ± 0,0	0,31 ± 0,00
<i>Hot-break</i>	94,59 ± 0,07	4,5 ± 0,0	4,5 ± 0,0	0,30 ± 0,00
Despolpamento	94,72 ± 0,14	4,5 ± 0,0	4,6 ± 0,0	0,27 ± 0,00
1ª Concentração	92,95 ± 0,03	6,0 ± 0,0	4,6 ± 0,0	0,36 ± 0,00
2ª Concentração	89,17 ± 0,04	10,0 ± 0,0	4,6 ± 0,0	0,57 ± 0,01
3ª Concentração	71,88 ± 0,03	25,3 ± 0,0	4,6 ± 0,0	1,36 ± 0,02
Produto final	73,18 ± 0,00	24,7 ± 0,6	4,6 ± 0,0	1,31 ± 0,01
Subproduto	68,68 ± 0,20	-	5,3 ± 0,0	0,23 ± 0,00

\*Resultados expressos como média ± estimativa de desvio padrão de três repetições analíticas independentes.

#### **Ácido ascórbico, compostos fenólicos e atividade antioxidante do extrato fenólico**

Uma grande perda de ácido ascórbico foi verificada durante o processamento da primeira coleta, uma vez que o produto final apresentou menos de um terço do teor encontrado na amostra *in natura*. Esse resultado foi semelhante ao encontrado por Capanoglu *et al.* (2008), em que cerca da metade do conteúdo de vitamina C foi perdido durante o processamento. Já para o processamento das amostras coletadas em agosto e setembro, essa perda foi menor, ficando em torno de 10 e 20%, respectivamente (**Tabelas 5 a 7**).

Os resultados mostraram que, embora ocorram variações durante o processamento, os teores de fenóis totais encontrados no produto final (após envase) foram significativamente maiores que os encontrados no produto *in natura* (**Tabelas 5 a 7**). Assim como foi observado por Chang *et al.* (2006), essa diferença pode ser explicada por uma maior liberação dos compostos fenólicos da matriz, a partir da quebra dos

constituintes celulares que ocorre durante o processamento. Ainda que o rompimento das paredes celulares possa também facilitar a liberação das enzimas oxidativas e hidrolíticas, a alta temperatura do processamento inativa essas enzimas e evita a perda dos ácidos fenólicos e, assim, leva ao aumento dos teores de fenóis totais (Chang *et al.*, 2006). O aumento do teor de fenóis totais também pode ser explicado pela hidrólise das formas glicosídicas, que é favorecida pelo meio ácido (Giovanelli *et al.*, 2001).

Não foi observada diferença significativa nas atividades antioxidantes medidas pelo método ABTS dos extratos fenólicos das amostras coletadas em julho e setembro, exceto para o subproduto. Já na coleta de agosto, foi observado um aumento da atividade antioxidante medida pelo método ABTS durante o processamento. Em todas as coletas, as amostras de subproduto apresentaram cerca da metade da atividade antioxidante das demais amostras. Já a atividade antioxidante dos extratos fenólicos medida pelo método DPPH apresentou variações durante o processamento, mas, para todas as coletas, os valores obtidos para as amostras de produto final foram significativamente maiores que os obtidos para as amostras *in natura* (**Tabelas 5 a 7**).

Capanoglu *et al.* (2008) também avaliaram o efeito do processamento de extrato de tomate sobre os compostos fenólicos e a atividade antioxidante. Os resultados obtidos mostraram que os teores de fenólicos totais não mudaram significativamente durante o processamento. Nesse mesmo estudo, foi verificado que a atividade antioxidante do extrato hidrofílico não sofreu alteração significativa quando medida pelo método ABTS (TEAC), enquanto que, pelo método DPPH, a atividade antioxidante mostrou um decréscimo significativo durante o processamento. Esses resultados estão de acordo com os encontrados no presente trabalho no que diz respeito às análises por ABTS. No entanto, pelo método DPPH, os resultados foram divergentes, já que foi percebido um aumento na atividade antioxidante durante o processamento, e não uma diminuição como



apresentado no trabalho de Capanoglu *et al.* (2008). Re *et al.* (2002) também observaram um aumento da atividade antioxidante determinada pelo método ABTS do extrato hidrofílico após o processamento.

**Tabela 5.** Teores de fenóis totais, ácido ascórbico e atividade antioxidante do extrato fenólico (ABTS expresso em TEAC e DPPH expresso em ARP) durante o processamento de polpa de tomate concentrada para refogado produzida em julho/2006.

<b>Etapas do Processamento</b>	<b>Fenóis totais (mg EAG/100g)*</b>	<b>Ácido ascórbico (mg/100g)*</b>	<b>TEAC (mmol Trolox/kg)*</b>	<b>ARP (g DPPH/kg)*</b>
<i>In natura</i>	457,5 ± 5,3 <sup>D</sup>	153,30 ± 6,60 <sup>A</sup>	19,33 ± 0,53 <sup>A</sup>	16,41 ± 0,09 <sup>C</sup>
<i>Hot-break</i>	494,2 ± 2,4 <sup>BC</sup>	41,56 ± 0,49 <sup>E</sup>	20,17 ± 0,80 <sup>A</sup>	19,86 ± 0,35 <sup>B</sup>
Despolpamento	447,0 ± 1,7 <sup>D</sup>	61,67 ± 1,24 <sup>BC</sup>	18,51 ± 0,56 <sup>A</sup>	17,35 ± 0,19 <sup>C</sup>
1ª Concentração	453,9 ± 7,2 <sup>D</sup>	65,73 ± 1,92 <sup>B</sup>	19,27 ± 0,78 <sup>A</sup>	17,65 ± 0,50 <sup>C</sup>
2ª Concentração	486,9 ± 8,7 <sup>C</sup>	42,12 ± 0,37 <sup>D</sup>	19,37 ± 0,22 <sup>A</sup>	19,73 ± 0,58 <sup>B</sup>
3ª Concentração	507,6 ± 2,4 <sup>B</sup>	51,87 ± 1,99 <sup>CDE</sup>	18,63 ± 0,78 <sup>A</sup>	20,84 ± 0,57 <sup>AB</sup>
Produto final	549,7 ± 3,5 <sup>A</sup>	46,67 ± 2,63 <sup>DE</sup>	20,06 ± 0,33 <sup>A</sup>	21,88 ± 0,51 <sup>A</sup>
Subproduto	233,7 ± 3,1 <sup>E</sup>	2,09 ± 0,11 <sup>F</sup>	10,36 ± 0,53 <sup>B</sup>	6,98 ± 0,40 <sup>D</sup>

\*Resultados expressos em base seca como média ± estimativa de desvio padrão de, no mínimo, duas repetições analíticas independentes. Letras diferentes na mesma coluna representam diferenças estatisticamente significativas (p<0,05).

EAG = equivalente de ácido gálico

TEAC = capacidade antioxidante em equivalente de Trolox

ARP = poder anti-radical

**Tabela 6.** Teores de fenóis totais, ácido ascórbico e atividade antioxidante do extrato fenólico (ABTS expresso em TEAC e DPPH expresso em ARP) durante o processamento de polpa de tomate concentrada produzida em agosto/2006.

<b>Etapas do Processamento</b>	<b>Fenóis totais (mg EAG/100g)*</b>	<b>Ácido ascórbico (mg/100g)*</b>	<b>TEAC (mmol Trolox/kg)*</b>	<b>ARP (g DPPH/kg)*</b>
<i>In natura</i>	428,1 ± 10,8 <sup>BC</sup>	119,96 ± 0,40 <sup>BC</sup>	17,33 ± 0,11 <sup>BCD</sup>	19,69 ± 0,25 <sup>B</sup>
<i>Hot-break</i>	429,9 ± 5,6 <sup>BC</sup>	76,23 ± 3,88 <sup>D</sup>	17,03 ± 0,56 <sup>CD</sup>	16,15 ± 0,46 <sup>C</sup>
Despolpamento	433,0 ± 5,0 <sup>BC</sup>	109,28 ± 2,77 <sup>C</sup>	16,51 ± 0,25 <sup>D</sup>	14,46 ± 0,08 <sup>CD</sup>
1ª Concentração	421,5 ± 9,2 <sup>C</sup>	111,21 ± 6,65 <sup>C</sup>	18,68 ± 0,59 <sup>B</sup>	15,83 ± 0,16 <sup>CD</sup>
2ª Concentração	422,8 ± 5,4 <sup>C</sup>	131,74 ± 5,91 <sup>B</sup>	17,95 ± 0,45 <sup>BC</sup>	14,55 ± 0,23 <sup>D</sup>
3ª Concentração	449,2 ± 8,2 <sup>B</sup>	157,87 ± 0,78 <sup>A</sup>	18,23 ± 0,87 <sup>BC</sup>	18,27 ± 0,83 <sup>B</sup>
Produto final	494,7 ± 13,6 <sup>A</sup>	106,94 ± 4,78 <sup>C</sup>	23,97 ± 0,37 <sup>A</sup>	24,55 ± 0,80 <sup>A</sup>
Subproduto	188,0 ± 0,4 <sup>D</sup>	4,68 ± 0,33 <sup>E</sup>	9,70 ± 0,08 <sup>E</sup>	6,19 ± 0,09 <sup>E</sup>

\*Resultados expressos em base seca como média ± estimativa de desvio padrão de, no mínimo, duas repetições analíticas independentes. Letras diferentes na mesma coluna representam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

EAG = equivalente de ácido gálico

TEAC = capacidade antioxidante em equivalente de Trolox

ARP = poder anti-radical

**Tabela 7.** Teores de fenóis totais, ácido ascórbico e atividade antioxidante do extrato fenólico (ABTS expresso em TEAC e DPPH expresso em ARP) durante o processamento de polpa de tomate concentrada produzida em setembro/2006.

<b>Etapas do Processamento</b>	<b>Fenóis totais (mg EAG/100g)*</b>	<b>Ácido ascórbico (mg/100g)*</b>	<b>TEAC (mmol Trolox/kg)*</b>	<b>ARP (g DPPH/kg)*</b>
<i>In natura</i>	435,1 ± 21,2 <sup>C</sup>	165,07 ± 5,19 <sup>AB</sup>	19,09 ± 1,21 <sup>A</sup>	16,69 ± 0,35 <sup>D</sup>
<i>Hot-break</i>	495,8 ± 16,0 <sup>A</sup>	135,49 ± 3,53 <sup>C</sup>	20,15 ± 0,88 <sup>A</sup>	20,92 ± 0,72 <sup>BC</sup>
Despolpamento	497,3 ± 7,6 <sup>A</sup>	116,45 ± 6,84 <sup>D</sup>	19,48 ± 0,47 <sup>A</sup>	22,48 ± 1,00 <sup>AB</sup>
1ª Concentração	488,1 ± 5,6 <sup>AB</sup>	157,23 ± 3,24 <sup>B</sup>	18,57 ± 1,53 <sup>A</sup>	23,57 ± 0,70 <sup>A</sup>
2ª Concentração	456,2 ± 3,0 <sup>BC</sup>	137,70 ± 3,18 <sup>C</sup>	18,57 ± 0,69 <sup>A</sup>	19,84 ± 0,77 <sup>C</sup>
3ª Concentração	489,0 ± 11,7 <sup>A</sup>	172,15 ± 4,97 <sup>A</sup>	18,49 ± 0,67 <sup>A</sup>	18,90 ± 0,47 <sup>CD</sup>
Produto final	499,9 ± 8,6 <sup>A</sup>	125,50 ± 0,60 <sup>CD</sup>	19,92 ± 0,11 <sup>A</sup>	24,51 ± 0,43 <sup>A</sup>
Subproduto	172,6 ± 4,9 <sup>D</sup>	1,23 ± 0,06 <sup>E</sup>	9,36 ± 0,28 <sup>B</sup>	5,68 ± 0,06 <sup>E</sup>

\*Resultados expressos em base seca como média ± estimativa de desvio padrão de, no mínimo, duas repetições analíticas independentes. Letras diferentes na mesma coluna representam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

EAG = equivalente de ácido gálico

TEAC = capacidade antioxidante em equivalente de Trolox

ARP = poder anti-radical

### Flavonóides e atividade antioxidante do extrato concentrado

As **Tabelas 8 a 10**, mostram os resultados de flavonóides totais e a atividade antioxidante do extrato concentrado das amostras coletadas durante o processamento de polpa de tomate. Observa-se que, na coleta de julho não houve diferença significativa entre as amostras das diferentes etapas do processamento. Já para as coletas de agosto e setembro, algumas diferenças foram observadas durante o processamento e as amostras de produto final apresentaram teores significativamente maiores que as amostras *in natura*. Chang *et al.* (2006) também observaram um aumento nos teores de flavonóides totais após a secagem de tomates e atribuíram esse aumento às possíveis transformações bioquímicas que podem acontecer na polpa e na pele do tomate durante o processamento. Capanoglu *et al.* (2008) também verificaram um aumento nos teores de flavonóides durante o processamento de extrato de tomate e, a fim de verificar se esse aumento se devia a uma maior extratibilidade, a uma desglicosilação parcial ou a uma desesterificação de espécies de flavonóides mais complexas, realizaram análises de flavonóides por cromatografia antes e após a hidrólise dos extratos. Os resultados obtidos por esses autores sugeriram que esse aumento estava mais associado com a síntese *de novo* desses compostos que a uma liberação de formas mais complexas (CAPANOGLU *et al.*, 2008).

As atividades antioxidantes dos extratos concentrados, de modo geral, apresentaram poucas diferenças entre os diferentes estágios do processamento (**Tabelas 8 a 10**).

**Tabela 8.** Teores de flavonóides totais e atividade antioxidante do extrato concentrado (ABTS expresso em TEAC e DPPH expresso em ARP) durante o processamento de polpa de tomate concentrada para refogado produzida em julho/2006.

<b>Etapas do Processamento</b>	<b>Flavonóides totais (mg ER/100g)*</b>	<b>TEAC (mmol Trolox/kg)*</b>	<b>ARP (g DPPH/kg)*</b>
<i>In natura</i>	223,2 ± 5,3 <sup>A</sup>	2,63 ± 0,21 <sup>BC</sup>	5,44 ± 0,77 <sup>A</sup>
<i>Hot-break</i>	228,0 ± 3,6 <sup>A</sup>	2,81 ± 0,01 <sup>AB</sup>	4,75 ± 0,12 <sup>AB</sup>
Despolpamento	254,8 ± 4,5 <sup>A</sup>	2,93 ± 0,06 <sup>AB</sup>	5,45 ± 0,25 <sup>A</sup>
1ª Concentração	261,1 ± 43,0 <sup>A</sup>	2,86 ± 0,13 <sup>AB</sup>	5,36 ± 0,41 <sup>AB</sup>
2ª Concentração	270,4 ± 35,3 <sup>A</sup>	3,20 ± 0,26 <sup>A</sup>	5,75 ± 0,98 <sup>A</sup>
3ª Concentração	257,0 ± 1,4 <sup>A</sup>	2,83 ± 0,13 <sup>AB</sup>	5,31 ± 0,33 <sup>AB</sup>
Produto final	246,9 ± 3,1 <sup>A</sup>	2,93 ± 0,00 <sup>AB</sup>	5,69 ± 0,45 <sup>A</sup>
Subproduto	255,4 ± 12,6 <sup>A</sup>	2,31 ± 0,10 <sup>C</sup>	3,89 ± 0,27 <sup>B</sup>

\*Resultados expressos em base seca como média ± estimativa de desvio padrão de três repetições analíticas independentes. Letras diferentes na mesma coluna representam diferenças estatisticamente significativas (p<0,05).

ER = equivalente de rutina

TEAC = capacidade antioxidante em equivalente de Trolox

ARP = poder anti-radical

**Tabela 9.** Teores de flavonóides totais e atividade antioxidante do extrato concentrado (ABTS expresso em TEAC e DPPH expresso em ARP) durante o processamento de polpa de tomate concentrada produzida em agosto/2006.

<b>Etapas do Processamento</b>	<b>Flavonóides totais (mg ER/100g)*</b>	<b>TEAC (mmol Trolox/kg)*</b>	<b>ARP (g DPPH/kg)*</b>
<i>In natura</i>	235,57 ± 9,83 <sup>BC</sup>	2,80 ± 0,13 <sup>DE</sup>	5,61 ± 0,46 <sup>BCD</sup>
<i>Hot-break</i>	218,39 ± 11,32 <sup>C</sup>	2,67 ± 0,05 <sup>DE</sup>	4,85 ± 0,50 <sup>CD</sup>
Despolpamento	251,99 ± 6,50 <sup>BC</sup>	2,86 ± 0,13 <sup>CE</sup>	5,76 ± 0,22 <sup>BCD</sup>
1ª Concentração	259,47 ± 4,13 <sup>AB</sup>	3,10 ± 0,04 <sup>BCD</sup>	5,78 ± 0,39 <sup>BCD</sup>
2ª Concentração	241,21 ± 3,95 <sup>BC</sup>	3,39 ± 0,10 <sup>AB</sup>	6,13 ± 0,11 <sup>ABC</sup>
3ª Concentração	237,02 ± 0,41 <sup>BC</sup>	3,08 ± 0,08 <sup>BCD</sup>	6,72 ± 0,43 <sup>AB</sup>
Produto final	288,15 ± 13,53 <sup>A</sup>	3,50 ± 0,26 <sup>A</sup>	7,15 ± 0,67 <sup>A</sup>
Subproduto	261,77 ± 19,84 <sup>AB</sup>	3,28 ± 0,10 <sup>AC</sup>	4,68 ± 0,35 <sup>D</sup>

\*Resultados expressos em base seca como média ± estimativa de desvio padrão de três repetições analíticas independentes. Letras diferentes na mesma coluna representam diferenças estatisticamente significativas (p<0,05).

ER = equivalente de rutina

TEAC = capacidade antioxidante em equivalente de Trolox

ARP = poder anti-radical

**Tabela 10.** Teores de flavonóides totais e atividade antioxidante do extrato concentrado (ABTS expresso em TEAC e DPPH expresso em ARP) durante o processamento de polpa de tomate concentrada produzida em setembro/2006.

<b>Etapas do Processamento</b>	<b>Flavonóides totais (mg ER/100g)*</b>	<b>TEAC (mmol Trolox/kg)*</b>	<b>ARP (g DPPH/kg)*</b>
<i>In natura</i>	212,0 ± 2,8 <sup>C</sup>	2,91 ± 0,22 <sup>AB</sup>	4,15 ± 0,02 <sup>CD</sup>
<i>Hot-break</i>	274,1 ± 0,2 <sup>AB</sup>	2,91 ± 0,29 <sup>B</sup>	7,07 ± 0,25 <sup>AB</sup>
Despolpamento	244,2 ± 1,9 <sup>BC</sup>	3,22 ± 0,22 <sup>AB</sup>	7,81 ± 0,90 <sup>AB</sup>
1ª Concentração	279,2 ± 8,9 <sup>A</sup>	3,14 ± 0,36 <sup>AB</sup>	8,63 ± 1,01 <sup>A</sup>
2ª Concentração	276,1 ± 3,1 <sup>AB</sup>	3,04 ± 0,06 <sup>AB</sup>	7,06 ± 0,46 <sup>AB</sup>
3ª Concentração	288,3 ± 5,6 <sup>A</sup>	3,24 ± 0,20 <sup>AB</sup>	6,04 ± 0,81 <sup>BC</sup>
Produto final	295,7 ± 4,3 <sup>A</sup>	3,61 ± 0,26 <sup>A</sup>	7,57 ± 0,79 <sup>AB</sup>
Subproduto	232,1 ± 26,1 <sup>C</sup>	2,21 ± 0,21 <sup>C</sup>	3,61 ± 0,22 <sup>D</sup>

\*Resultados expressos em base seca como média ± estimativa de desvio padrão de três repetições analíticas independentes. Letras diferentes na mesma coluna representam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

ER = equivalente de rutina

TEAC = capacidade antioxidante em equivalente de Trolox

ARP = poder anti-radical

De acordo com o Banco de Dados dos Teores de Flavonóides de Alimentos Selecionados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2007), os flavonóis presentes em diferentes tipos de tomate e produtos de tomate são kaempferol (de 0,01 a 0,84 mg/100 g), miricetina (de 0,03 a 0,92 mg/100 g) e quercetina (de 0,03 a 20,30 mg/100 g).

Os teores de flavonóides no tomate podem variar de acordo com a variedade, como foi observado por Crozier *et al.* (1997), Stewart *et al.* (2000) e Arabbi *et al.* (2004). Crozier *et al.* (1997) encontraram, após hidrólise ácida, quantidades de quercetina que variaram de 0,2 a 20,3 mg/100 g. Stewart *et al.* (2000) encontraram, também após hidrólise ácida, teores de quercetina entre 0,12 e 2,15 mg/100 g e teores de kaempferol entre 0,01 e 0,15 mg/100g, sendo que, em uma amostra, esse flavonol não foi detectado. Arabbi *et al.* (2004) encontraram quantidades de quercetina entre 0,5 e 4,2 mg/100 g,

chalconaringenina entre 1,3 e 4,0 mg/100 g e não detectaram kaempferol em nenhuma das amostras de tomate analisadas.

Slimestad *et al.* (2008) analisaram 9 diferentes cultivares de tomate e identificaram 4 flavonóides nessas variedades, sendo eles, quercetina 3-O-(2''-O- $\beta$ -apiofuranosil-6''-O- $\alpha$ -rhamnopyranosil)- $\beta$ -glucopiranosídeo, quercetina 3-O-(6''-O- $\alpha$ -rhamnopyranosil)- $\beta$ -glucopiranosídeo), floretina 3',5'-di-C- $\beta$ -glucopiranosídeo e chalconaringenina, sendo esta última encontrada em maior quantidade (35 a 71% do total do teor de flavonóides). Além desses, eles também detectaram a naringenina como um produto formado a partir da chalconaringenina. Em 6 dos 9 cultivares estudados, detectaram a presença de kaempferol 3-O-(6''-O- $\alpha$ -rhamnopyranosyl)- $\beta$ -glucopyranoside).

Nas **Tabelas 11 a 13**, estão relacionados os teores dos flavonóides determinados por cromatografia líquida. De modo semelhante aos teores de flavonóides totais, os flavonóides individuais analisados também parecem não sofrer alterações durante o processamento, sendo que, em alguns casos, os teores encontrados no produto final foram significativamente maiores que os encontrados na amostra *in natura* (**Tabelas 11 a 13**). Dos onze flavonóides que poderiam ser quantificados pelo método otimizado no presente trabalho (Capítulo 2), apenas 3 foram encontrados nas amostras analisadas, rutina, quercitrina e naringenina, sendo que, nas amostras *in natura*, não foi detectada a presença de naringenina. O estudo mostra que esse flavonóide aparece logo após a primeira etapa do processamento (onde ocorre o primeiro aquecimento), em função, provavelmente, da transformação da chalconaringenina. Capanoglu *et al.* (2008) também observaram ausência de naringenina no tomate *in natura* e o aparecimento desse flavonóide logo após a primeira etapa ("*breaking*") do processamento, e um aumento do seu teor até o produto final. Nesse mesmo estudo, também foram determinados os teores de chalconaringenina, que apareceu em grande quantidade no produto *in natura*,

aumentou após o “*breaking*” e não foi detectada no produto final, sugerindo que pode ocorrer a conversão da chalconaringenina para sua forma isomérica, naringenina, bem como a perda da chalcona na etapa de separação da pele+semente, já que essa fração apresentou grandes quantidades desse composto (CAPANOGLU *et al.*, 2008).

Re *et al.* (2002) observaram um decréscimo de cerca de 90% nos teores de naringenina em tomates processados por três diferentes métodos: *hot break* (90 °C), *cold break* (65 °C) e *super cold break* (65 °C sob vácuo). A rutina foi afetada principalmente no processamento por *cold break*, com uma redução de aproximadamente 50%. Durante a concentração do suco para o extrato, houve um pequeno aumento nos teores de rutina e naringenina, porém, esse aumento não foi estatisticamente significativo.

**Tabela 11.** Teores de flavonóides determinados por CLAE durante o processamento de polpa de tomate concentrada para refogado produzida em julho/2006.

<b>Etapas do Processamento</b>	<b>Rutina (mg/100g)*</b>	<b>Quercitrina (mg/100g)*</b>	<b>Naringenina (mg/100g)*</b>
<i>In natura</i>	22,89 ± 0,11 <sup>BC</sup>	4,61 ± 0,05 <sup>AB</sup>	ND
<i>Hot-break</i>	27,37 ± 1,21 <sup>A</sup>	4,68 ± 0,11 <sup>A</sup>	16,12 ± 0,28 <sup>D</sup>
Despolpamento	25,94 ± 0,04 <sup>AB</sup>	4,72 ± 0,07 <sup>A</sup>	18,84 ± 0,27 <sup>C</sup>
1ª Concentração	25,10 ± 0,40 <sup>ABC</sup>	4,71 ± 0,14 <sup>A</sup>	14,49 ± 0,71 <sup>E</sup>
2ª Concentração	27,24 ± 3,04 <sup>A</sup>	4,66 ± 0,08 <sup>A</sup>	16,52 ± 0,37 <sup>D</sup>
3ª Concentração	27,27 ± 2,27 <sup>A</sup>	4,53 ± 0,05 <sup>AB</sup>	18,89 ± 0,63 <sup>C</sup>
Produto final	25,41 ± 0,25 <sup>AB</sup>	4,52 ± 0,01 <sup>AB</sup>	21,60 ± 0,31 <sup>B</sup>
Subproduto	20,99 ± 0,26 <sup>C</sup>	4,43 ± 0,05 <sup>B</sup>	38,74 ± 0,22 <sup>A</sup>

\*Resultados expressos em base seca como média ± estimativa de desvio padrão de três repetições analíticas independentes. Letras diferentes na mesma coluna representam diferenças estatisticamente significativas (p<0,05).

ND = Não detectado (< 0,13 mg/100g).

**Tabela 12.** Teores de flavonóides determinados por CLAE durante o processamento de polpa de tomate concentrada produzida em agosto/2006.

<b>Etapas do Processamento</b>	<b>Rutina (mg/100g)*</b>	<b>Quercitrina (mg/100g)*</b>	<b>Naringenina (mg/100g)*</b>
<i>In natura</i>	25,28 ± 0,12 <sup>CD</sup>	4,76 ± 0,31 <sup>A</sup>	ND
<i>Hot-break</i>	28,43 ± 2,61 <sup>BCD</sup>	4,39 ± 0,15 <sup>A</sup>	17,46 ± 0,11 <sup>ABC</sup>
Despolpamento	31,88 ± 1,91 <sup>AB</sup>	4,56 ± 0,11 <sup>A</sup>	16,85 ± 0,35 <sup>BD</sup>
1ª Concentração	33,57 ± 1,37 <sup>A</sup>	4,69 ± 0,03 <sup>A</sup>	15,89 ± 0,22 <sup>D</sup>
2ª Concentração	32,65 ± 0,76 <sup>AB</sup>	4,66 ± 0,02 <sup>A</sup>	16,39 ± 0,16 <sup>CD</sup>
3ª Concentração	29,83 ± 1,07 <sup>ABC</sup>	4,54 ± 0,02 <sup>A</sup>	18,19 ± 0,31 <sup>A</sup>
Produto final	30,06 ± 1,97 <sup>AB</sup>	4,38 ± 0,02 <sup>A</sup>	17,73 ± 0,27 <sup>AB</sup>
Subproduto	24,25 ± 0,94 <sup>D</sup>	4,33 ± 0,01 <sup>A</sup>	13,77 ± 0,82 <sup>E</sup>

\*Resultados expressos em base seca como média ± estimativa de desvio padrão de três repetições analíticas independentes. Letras diferentes na mesma coluna representam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).  
ND = Não detectado ( $< 0,13$  mg/100g).

**Tabela 13.** Teores de flavonóides determinados por CLAE durante o processamento de polpa de tomate concentrada produzida em setembro/2006.

<b>Etapas do Processamento</b>	<b>Rutina (mg/100g)*</b>	<b>Quercitrina (mg/100g)*</b>	<b>Naringenina (mg/100g)*</b>
<i>In natura</i>	18,18 ± 0,53 <sup>F</sup>	4,61 ± 0,03 <sup>C</sup>	ND
<i>Hot-break</i>	24,47 ± 0,46 <sup>D</sup>	4,84 ± 0,05 <sup>B</sup>	9,15 ± 0,41 <sup>D</sup>
Despolpamento	29,16 ± 0,14 <sup>AB</sup>	5,13 ± 0,04 <sup>A</sup>	12,81 ± 0,19 <sup>AB</sup>
1ª Concentração	30,14 ± 1,58 <sup>AB</sup>	5,15 ± 0,10 <sup>A</sup>	13,33 ± 0,13 <sup>A</sup>
2ª Concentração	31,26 ± 0,86 <sup>A</sup>	4,75 ± 0,12 <sup>BC</sup>	12,55 ± 0,17 <sup>BC</sup>
3ª Concentração	28,48 ± 1,36 <sup>BC</sup>	4,81 ± 0,06 <sup>B</sup>	12,42 ± 0,12 <sup>BC</sup>
Produto final	26,46 ± 0,70 <sup>CD</sup>	4,70 ± 0,02 <sup>BC</sup>	12,71 ± 0,41 <sup>AB</sup>
Subproduto	18,74 ± 0,23 <sup>E</sup>	4,40 ± 0,03 <sup>D</sup>	11,91 ± 0,07 <sup>C</sup>

\*Resultados expressos em base seca como média ± estimativa de desvio padrão de três repetições analíticas independentes. Letras diferentes na mesma coluna representam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).  
ND = Não detectado ( $< 0,13$  mg/100g).



### Carotenóides e atividade antioxidante da fração lipofílica

Os resultados das análises de carotenóides e atividade antioxidante da fração lipofílica são apresentados nas **Tabelas 14 a 16**. Embora tenham ocorrido variações nos teores de carotenóides durante o processamento, verificou-se que as amostras de produto final apresentaram quantidades de licopeno e  $\beta$ -caroteno significativamente maiores que as amostras *in natura*, com exceção do licopeno das amostras de setembro, nas quais não foi verificada diferença significativa entre o produto final e a amostra *in natura*. Também foi observado um aumento na atividade antioxidante da fração lipofílica durante os processamentos dos meses de agosto e setembro/2006, mas para o processamento do mês de julho, praticamente, não houve diferença na atividade antioxidante. Os teores de licopeno nos processamentos de agosto e setembro/2006 foram semelhantes. Já o produto final de julho apresentou menor teor de licopeno, o que pode ser devido ao fato da amostra *in natura* também ter apresentado um teor de licopeno menor, bem como ao fato de que o primeiro processamento diferia dos demais em termos de menor concentração do produto final, o que requer temperaturas mais baixas na etapa de concentração. Os teores de  $\beta$ -caroteno foram semelhantes, independentemente do período da safra ou processamento, exceto para o subproduto.

Re *et al.* (2002) observaram um aumento nos teores de licopeno após o processamento por *hot break*, *cold break* e *super cold break*. Após o *hot break*, a concentração de licopeno dobrou, porém, não houve alteração durante o processo de evaporação. A atividade antioxidante do extrato lipofílico medida em TEAC também aumentou após o processamento. Dewanto *et al.* (2002) também relataram um aumento significativo nos teores de licopeno em tomate após processamento térmico a 88 °C e atribuíram esse aumento a uma maior acessibilidade do licopeno. Segundo esses autores, a maior parte do licopeno está localizada no pericarpo externo e na pele junto à

porção de fibra insolúvel do tomate. O processamento térmico rompe as membranas e as paredes celulares e libera o licopeno da porção insolúvel do tomate, aumentando a sua disponibilidade para a extração (DEWANTO *et al.*, 2002).

**Tabela 14.** Teores de licopeno,  $\beta$ -caroteno e atividade antioxidante do extrato lipofílico (ABTS expresso em TEAC) durante o processamento de polpa de tomate concentrada para refogado produzida em julho/2006.

<b>Etapas do Processamento</b>	<b>Licopeno (mg/100g)*</b>	<b><math>\beta</math>-caroteno (mg/100g)*</b>	<b>TEAC (mmol Trolox/kg)*</b>
<i>In natura</i>	34,63 $\pm$ 0,68 <sup>D</sup>	5,16 $\pm$ 0,09 <sup>E</sup>	4,47 $\pm$ 0,86 <sup>A</sup>
<i>Hot-break</i>	48,48 $\pm$ 0,57 <sup>A</sup>	5,65 $\pm$ 0,15 <sup>CDE</sup>	3,58 $\pm$ 0,18 <sup>AB</sup>
Despolpamento	44,93 $\pm$ 1,10 <sup>AB</sup>	5,64 $\pm$ 0,08 <sup>DE</sup>	3,69 $\pm$ 0,29 <sup>AB</sup>
1ª Concentração	44,04 $\pm$ 1,27 <sup>B</sup>	6,82 $\pm$ 0,32 <sup>B</sup>	3,22 $\pm$ 0,17 <sup>AB</sup>
2ª Concentração	38,80 $\pm$ 1,35 <sup>C</sup>	6,26 $\pm$ 0,33 <sup>BD</sup>	4,59 $\pm$ 0,63 <sup>A</sup>
3ª Concentração	37,05 $\pm$ 1,57 <sup>CD</sup>	6,72 $\pm$ 0,26 <sup>BC</sup>	3,78 $\pm$ 0,24 <sup>AB</sup>
Produto final	44,09 $\pm$ 0,97 <sup>B</sup>	7,02 $\pm$ 0,37 <sup>B</sup>	4,59 $\pm$ 1,16 <sup>A</sup>
Subproduto	13,03 $\pm$ 0,69 <sup>E</sup>	9,59 $\pm$ 0,52 <sup>A</sup>	2,54 $\pm$ 0,22 <sup>B</sup>

\*Resultados expressos em base seca como média  $\pm$  estimativa de desvio padrão de, no mínimo, duas repetições analíticas independentes. Letras diferentes na mesma coluna representam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

TEAC = capacidade antioxidante em equivalente de Trolox

**Tabela 15.** Teores de licopeno,  $\beta$ -caroteno e atividade antioxidante do extrato lipofílico (ABTS expresso em TEAC) durante o processamento de polpa de tomate concentrada produzida em agosto/2006.

<b>Etapas do Processamento</b>	<b>Licopeno (mg/100g)*</b>	<b><math>\beta</math>-caroteno (mg/100g)*</b>	<b>TEAC (mmol Trolox/kg)*</b>
<i>In natura</i>	88,41 $\pm$ 2,69 <sup>B</sup>	4,12 $\pm$ 0,20 <sup>D</sup>	3,52 $\pm$ 0,70 <sup>C</sup>
<i>Hot-break</i>	55,21 $\pm$ 0,08 <sup>C</sup>	4,37 $\pm$ 0,08 <sup>D</sup>	4,23 $\pm$ 0,27 <sup>BC</sup>
Despolpamento	51,88 $\pm$ 2,67 <sup>C</sup>	3,99 $\pm$ 0,32 <sup>D</sup>	3,30 $\pm$ 0,93 <sup>CD</sup>
1ª Concentração	55,52 $\pm$ 1,85 <sup>C</sup>	4,56 $\pm$ 0,08 <sup>D</sup>	2,75 $\pm$ 0,07 <sup>CD</sup>
2ª Concentração	57,83 $\pm$ 0,73 <sup>C</sup>	5,24 $\pm$ 0,16 <sup>C</sup>	4,32 $\pm$ 0,69 <sup>C</sup>
3ª Concentração	117,58 $\pm$ 5,88 <sup>A</sup>	7,46 $\pm$ 0,18 <sup>A</sup>	6,77 $\pm$ 1,20 <sup>AB</sup>
Produto final	120,09 $\pm$ 3,79 <sup>A</sup>	6,93 $\pm$ 0,10 <sup>B</sup>	8,70 $\pm$ 1,12 <sup>A</sup>
Subproduto	3,46 $\pm$ 0,25 <sup>D</sup>	1,26 $\pm$ 0,07 <sup>E</sup>	1,04 $\pm$ 0,09 <sup>D</sup>

\*Resultados expressos em base seca como média  $\pm$  estimativa de desvio padrão de, no mínimo, duas repetições analíticas independentes. Letras diferentes na mesma coluna representam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

TEAC = capacidade antioxidante em equivalente de Trolox

**Tabela 16.** Teores de licopeno,  $\beta$ -caroteno e atividade antioxidante do extrato lipofílico (ABTS expresso em TEAC) durante o processamento de polpa de tomate concentrada produzida em setembro/06.

<b>Etapas do Processamento</b>	<b>Licopeno (mg/100g)*</b>	<b><math>\beta</math>-caroteno (mg/100g)*</b>	<b>TEAC (mmol Trolox/kg)*</b>
<i>In natura</i>	91,41 $\pm$ 1,58 <sup>A</sup>	5,05 $\pm$ 0,26 <sup>C</sup>	4,93 $\pm$ 0,95 <sup>CD</sup>
<i>Hot-break</i>	55,07 $\pm$ 1,66 <sup>DE</sup>	5,40 $\pm$ 0,14 <sup>C</sup>	5,18 $\pm$ 0,42 <sup>C</sup>
Despolpamento	75,53 $\pm$ 1,45 <sup>C</sup>	6,61 $\pm$ 0,11 <sup>B</sup>	5,21 $\pm$ 0,55 <sup>C</sup>
1ª Concentração	50,50 $\pm$ 1,64 <sup>E</sup>	5,25 $\pm$ 0,10 <sup>C</sup>	4,88 $\pm$ 0,78 <sup>CD</sup>
2ª Concentração	60,27 $\pm$ 1,86 <sup>D</sup>	5,29 $\pm$ 0,20 <sup>C</sup>	6,22 $\pm$ 0,74 <sup>BC</sup>
3ª Concentração	82,54 $\pm$ 3,66 <sup>B</sup>	7,77 $\pm$ 0,25 <sup>A</sup>	7,92 $\pm$ 1,44 <sup>AB</sup>
Produto final	89,26 $\pm$ 0,62 <sup>A</sup>	6,65 $\pm$ 0,30 <sup>B</sup>	8,77 $\pm$ 0,85 <sup>A</sup>
Subproduto	4,21 $\pm$ 0,12 <sup>F</sup>	2,03 $\pm$ 0,09 <sup>D</sup>	2,80 $\pm$ 0,16 <sup>D</sup>

\*Resultados expressos em base seca como média  $\pm$  estimativa de desvio padrão de, no mínimo, duas repetições analíticas independentes. Letras diferentes na mesma coluna representam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

TEAC = capacidade antioxidante em equivalente de Trolox

## EFEITO DA ESTOCAGEM

Durante o período de estocagem, não foram observadas grandes variações nos teores de sólidos totais, sólidos solúveis (<sup>o</sup>Brix), pH e acidez total (**Figuras 1 e 2**).

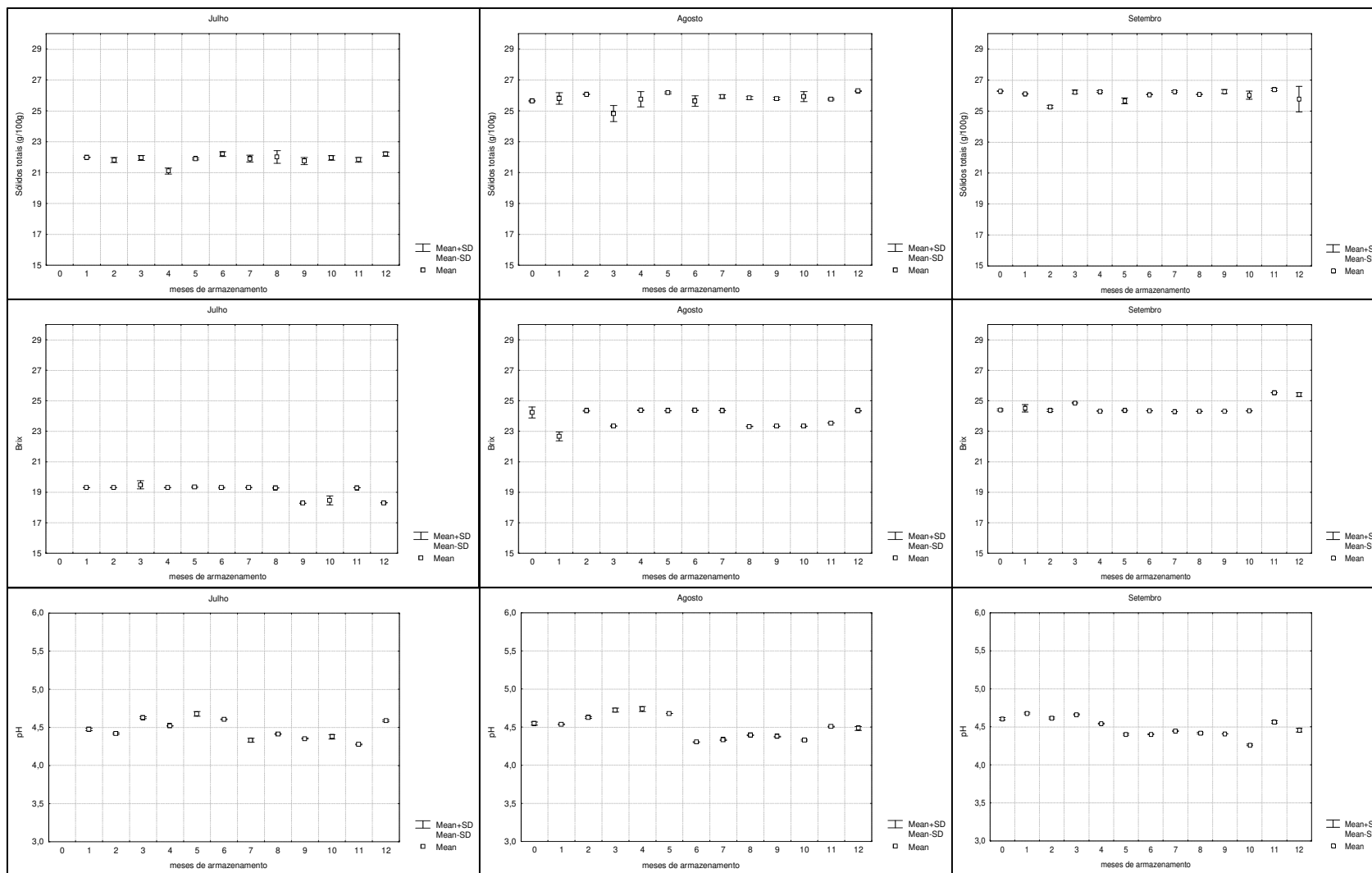
Os teores de ácido ascórbico mantiveram-se constantes para as amostras de julho e agosto até, aproximadamente, o 6<sup>o</sup> mês de armazenamento, sendo que, após isso, diminuíram significativamente e não foram detectados nas amostras com 12 meses de estocagem. Nas amostras de setembro, foi observado um decaimento constante nos teores de ácido ascórbico desde o primeiro mês até não ser mais detectado após os 12 meses de estocagem (**Figura 3**). Giovanelli *et al.* (2001) também reportaram um decréscimo nos teores de ácido ascórbico durante a estocagem por 3 meses a 40<sup>o</sup> C, sendo esse decréscimo maior para o purê e o extrato que para a polpa de tomate. A redução total foi de aproximadamente 35% para a polpa e 50% para o purê e o extrato (GIOVANELLI *et al.*, 2001).

Os valores de fenóis totais diminuíram no início da estocagem e depois se mantiveram estáveis (**Figura 4**). Giovanelli *et al.* (2001) observaram um leve aumento nos teores de fenóis totais em polpa e purê de tomate estocado a 40 °C durante 3 meses, e, para o extrato de tomate, o teor de fenóis se manteve estável durante a estocagem.

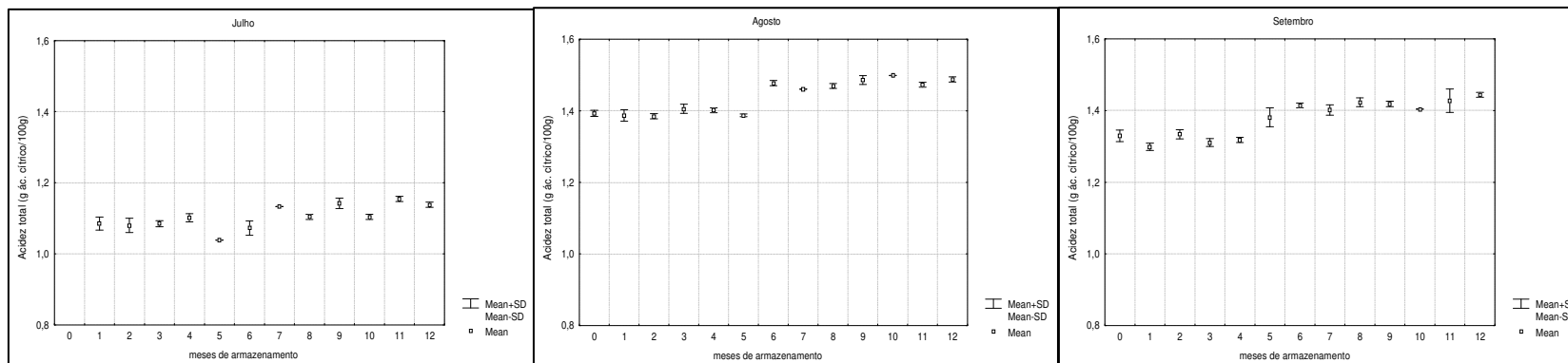
Os teores de flavonóides totais apresentaram uma significativa diminuição durante a estocagem para as amostras processadas em agosto e setembro/2006 (**Figura 5**).

Não foram observadas grandes variações nos teores de rutina e quercitrina durante a estocagem, com exceção das amostras de julho, cujos resultados de rutina apresentaram grandes desvios. Os resultados de naringenina mostraram uma leve tendência de diminuição durante os 12 meses de estocagem para as 3 coletas analisadas (**Figura 6**).

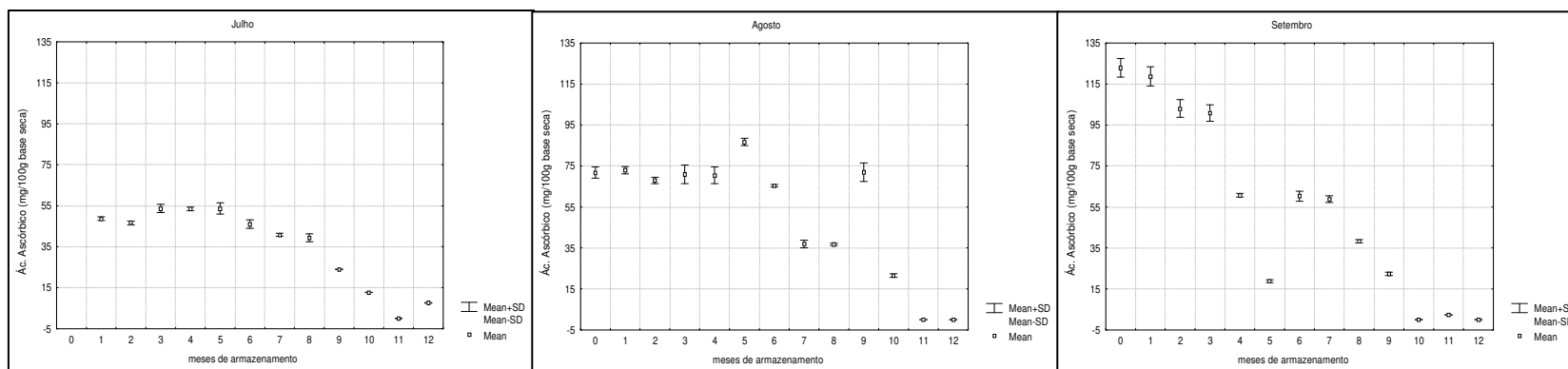
Embora tenham sido observadas algumas variações nos resultados de licopeno e  $\beta$ -caroteno durante a estocagem (**Figuras 7**), nenhuma tendência de degradação foi verificada. Resultados semelhantes foram encontrados por Giovanelli *et al.* (2001) para o licopeno que, no entanto, observaram a redução do  $\beta$ -caroteno durante a estocagem de polpa, purê e extrato de tomate.



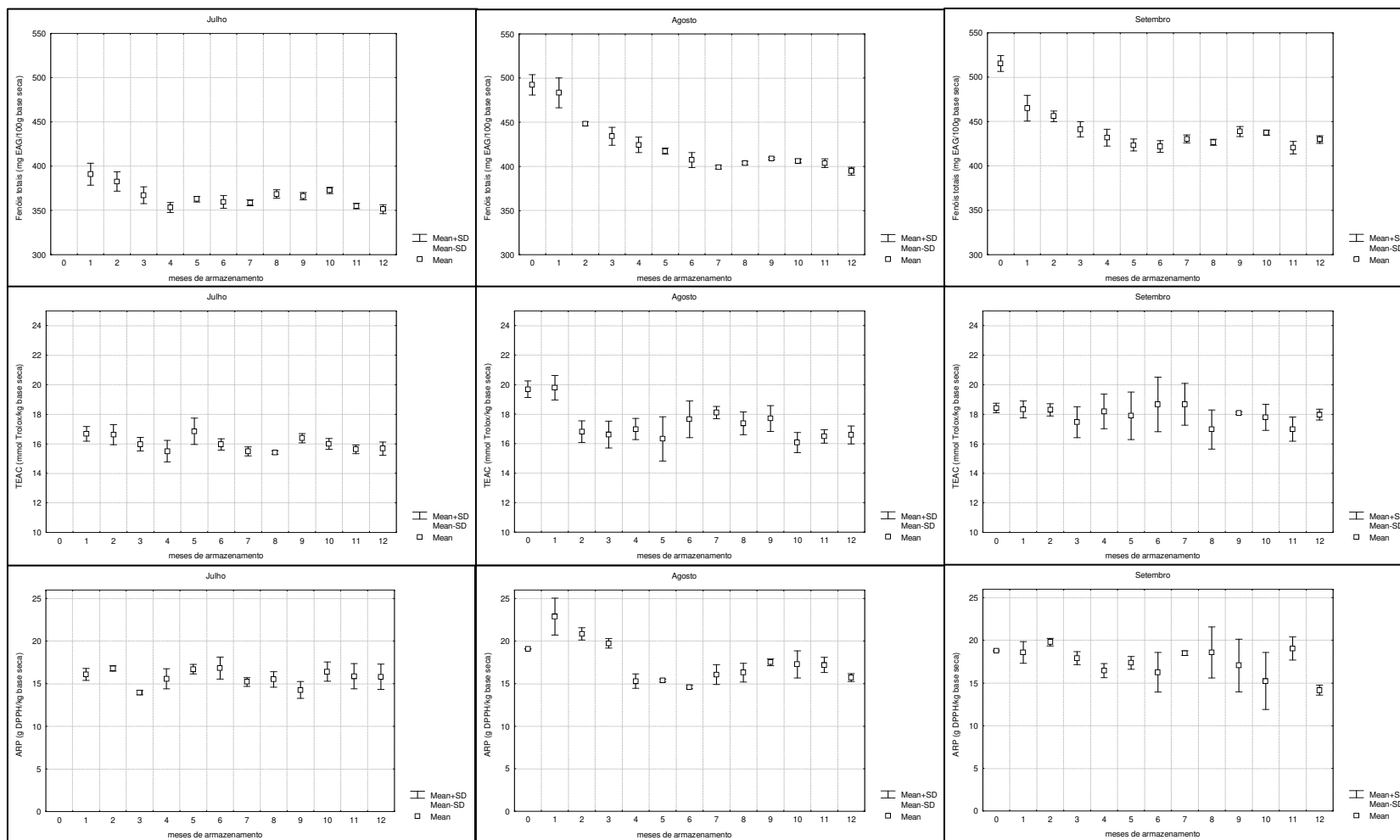
**Figura 1.** Teores de sólidos totais (g/100g), sólidos solúveis (em Brix) e pH em polpa de tomate concentrada produzida em julho, agosto e setembro/2006, durante 12 meses de estocagem.



**Figura 2.** Valores de acidez total (g de ácido cítrico/100g) em polpa de tomate concentrada produzida em julho, agosto e setembro/2006, durante os 12 meses de estocagem.

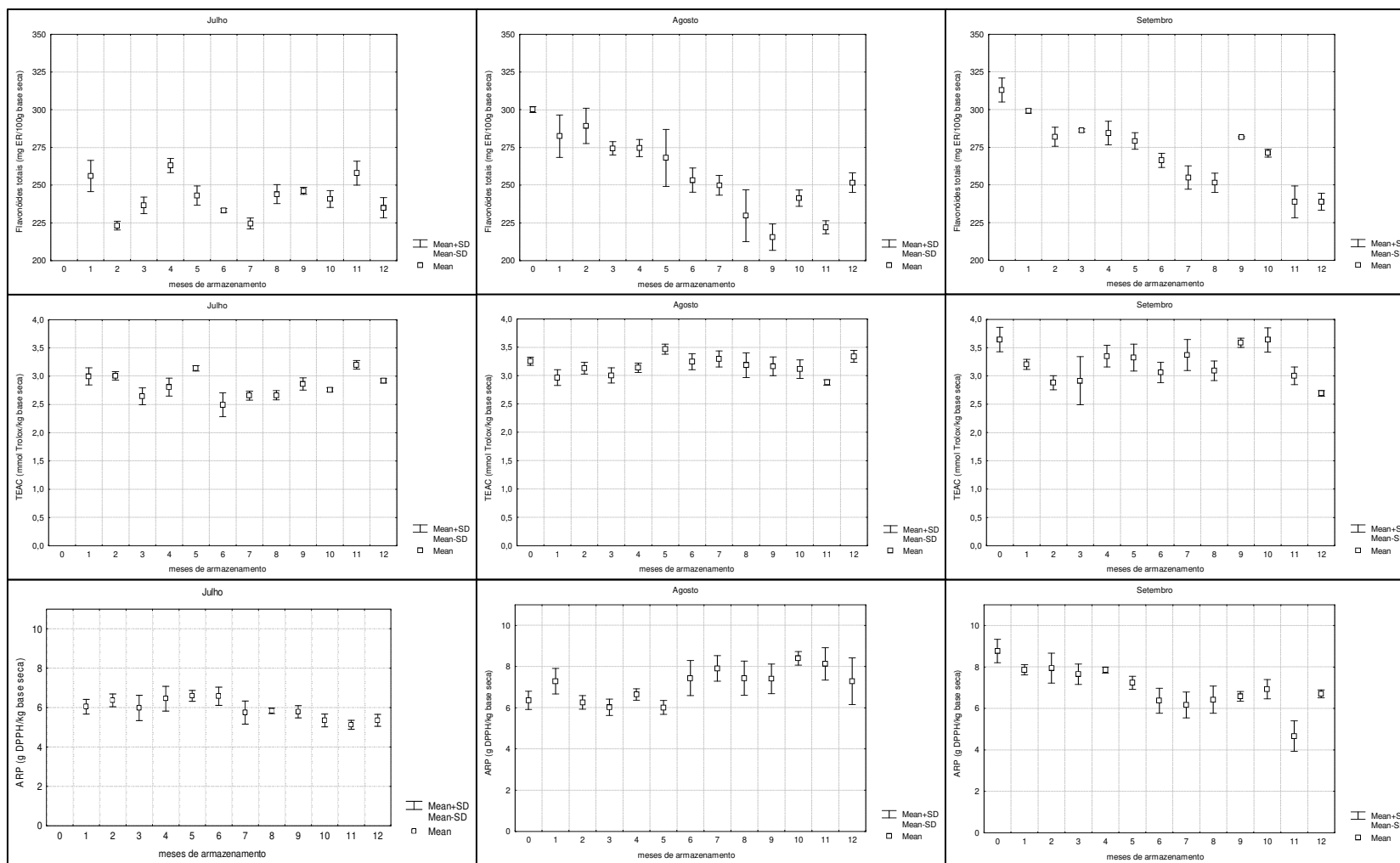


**Figura 3.** Teores de ácido ascórbico (mg/100g, base seca) em polpa de tomate concentrada produzida em julho, agosto e setembro/2006, durante os 12 meses de estocagem.

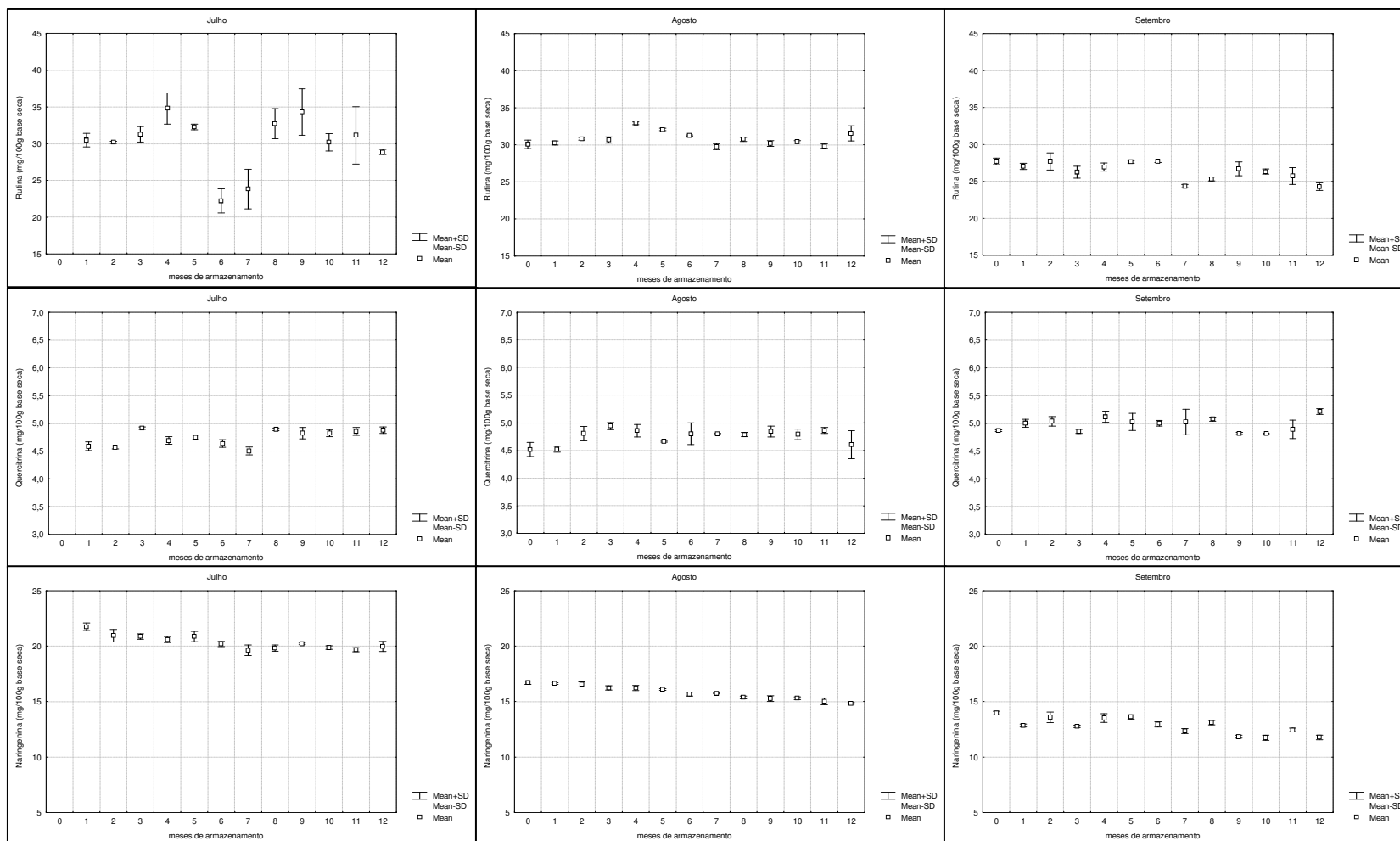


**Figura 4.** Valores de fenóis totais (mg equivalente de ácido gálico/100g, base seca), TEAC (mmol/kg no extrato fenólico, base seca) e ARP (mmol/kg no extrato fenólico, base seca) em polpa de tomate concentrada produzida em julho, agosto e setembro/2006, durante os 12 meses de estocagem.

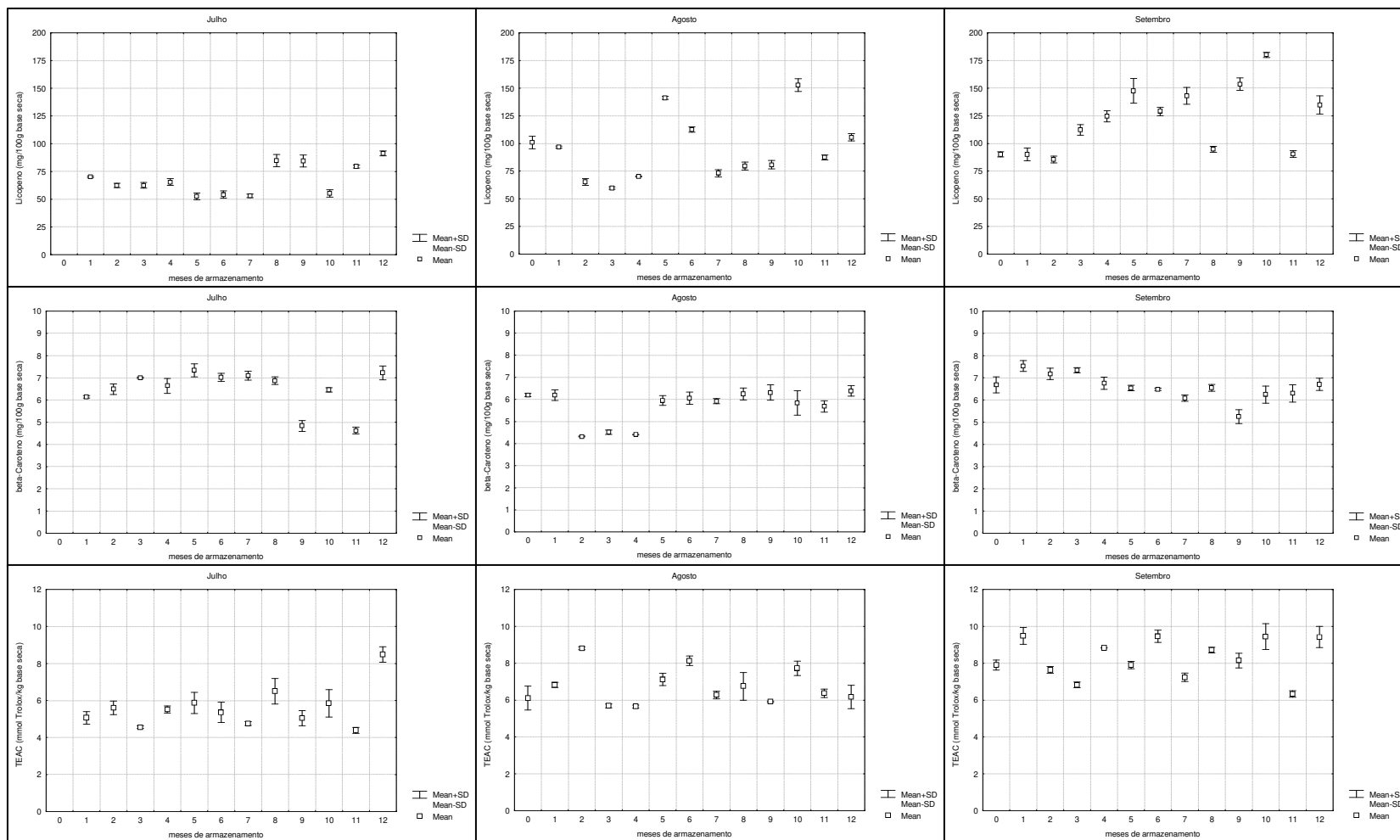




**Figura 5.** Valores de flavonóides totais (mg de rutina/100g, base seca), TEAC (mmol/kg no extrato purificado, base seca) e ARP (mmol/kg no extrato purificado, base seca) em polpa de tomate concentrada produzida em julho, agosto e setembro/2006, durante os 12 meses de estocagem.



**Figura 6.** Valores de rutina (mg/100g, base seca), quercitrina (mg/100g, base seca) e naringenina (mg/100g, base seca) em polpa de tomate concentrada produzida em julho, agosto e setembro/2006, durante os 12 meses de estocagem.



**Figura 7.** Valores de licopeno (mg/100g, base seca),  $\beta$ -caroteno (mg/100g, base seca) e TEAC (mmol/kg no extrato lipofílico, base seca) em polpa de tomate concentrada produzida em julho, agosto e setembro/2006, durante os 12 meses de estocagem.

## CONCLUSÃO

Embora haja variação nos teores dos compostos analisados e nas suas atividades antioxidantes avaliadas durante o processamento, o produto final (após envase) apresentou teores iguais ou significativamente maiores aos da amostra *in natura*. Isso mostra que o valor nutricional do produto, no que diz respeito a seus compostos antioxidantes, é mantido mesmo após o processamento.

Durante o período de estocagem, não houve grande variação nos resultados de sólidos totais, pH, acidez total, licopeno,  $\beta$ -caroteno, rutina, quercitrina e naringenina, como também não houve alteração da atividade antioxidante das frações hidrofílicas e lipofílicas. Os valores de fenóis totais diminuíram no início da estocagem e depois se mantiveram constantes; os teores de ácido ascórbico foram estáveis até, aproximadamente, o 6º mês de estocagem, sendo que depois diminuíram significativamente; e os flavonóides totais apresentaram uma ligeira diminuição durante a estocagem para as amostras de agosto e setembro/2006. Assim, verificou-se que, os compostos antioxidantes do tomate, com exceção do ácido ascórbico, podem ser encontrados em quantidades significativas em produtos processados, mesmo após 1 ano de estocagem.

---

**REFERÊNCIAS**

- ARABBI, P.R.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the Brazilian population. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.1124-1131, 2004.
- ARAKAWA, N.; OTSUKA, M.; KURATA, T.; INAGKI, C. Separative determination of ascorbic acid and erythorbic acid by high-performance liquid chromatography. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v.27, p.1-7, 1981.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v.28, p.25-30, 1995.
- CAPANOGLU, E.; BEEKWILDER, J.; BOYACIOGLU, D.; HALL, R.; DE VOS, R. Changes in antioxidant and metabolite profiles during production of tomato paste. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p.964-973, 2008.
- CARVALHO, P.R.N.; COLLINS, C.A.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Comparison of provitamin A determination by normal-phase gravity-flow chromatography and reversed phase high performance liquid chromatography. **Chromatographia**, Wiesbaden, v.33, p.133-137, 1992.
- CHANG, C-H.; LIN, H-Y.; CHANG, C-Y.; LIU, Y-C. Comparisons on the antioxidant properties of fresh, freeze-dried and hot-air-dried tomatoes. **Journal of Food Engineering**, v.77, p.478-485, 2006.
- CROZIER A.; LEAN, M.E.J.; McDONALD, M.S.; BLACK, C. Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce, and celery. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, p.590-595, 1997.

- DEWANTO, V.; WU, X.; ADOM, K.-K.; LIU, R.-H. Thermal Processing Enhances the Nutritional Value of Tomatoes by Increasing Total Antioxidant Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.3010-3014, 2002.
- GAHLER, S.; OTTO, K.; BÖHM, V. Alterations of vitamin C, total phenolics, and antioxidant capacity as affected by processing tomatoes to different products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.7962-7968, 2003.
- GEORGE, B.; KAUR, C.; KHURDIYA, D.S.; KAPOOR, H.C. Antioxidants in tomato (*Lycopersium esculentum*) as a function of genotype. **Food Chemistry**, v.84, p.45-51, 2004.
- GIOVANELLI, G.L.; LAVELLI, V.; PERI, C.; PAGLIARINI, E.; ZANONI, B.; PETRONE, P. The antioxidant activity of tomato. IV. Effects of storage on oxidative and heat damage. **Acta Horticulturae**, v.542, p.221-223, 2001.
- HORWITZ, W. (Ed.). **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 17<sup>th</sup> ed. Gaithersburg, Maryland : AOAC, 2000.
- KAUR, C.; GEORGE, B.; DEEPA, N.; SINGH, B.; KAPOOR, H.C. Antioxidant status of fresh and processed tomato – A Review. **Journal of Food Science and Technology**, v.41, p.479-486, 2004.
- 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.
- LAVELLI, V.; GIOVANELLI, G. Evaluation of heat and oxidative damage during storage of processed tomato products. II. Study of oxidative damage indices. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.83, p.966-971, 2003.

- MARTÍNEZ-VALVERDE, I.; PERIAGO, M.J.; PROVAN, G.; CHESSON, A. Phenolics compounds, lycopene and antioxidant activity in commercial varieties of tomato (*Lycopersicum esculentum*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.82, p.323-330, 2002.
- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v.26, p.1231-1237, 1999.
- RE, R.; BRAMLEY, P.M.; RICE-EVANS, C. Effects of food processing on flavonoids and lycopene status in a Mediterranean tomato variety. **Free Radical Research**, v.36, p.803-810, 2002.
- SINGLETON, V.L.; ROSSI Jr., J.A.. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.16, p.144-158, 1965.
- SLIMESTAD, R.; VERHEUL, M.J. Seasonal variations in the level of plant constituents in greenhouse production of cherry tomatoes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.3114-3119, 2005.
- SLIMESTAD, R.; FOSSEN, T.; VERHEUL, M.J. The flavonoids of tomatoes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p.2436-2441, 2008.
- STEWART, A.J.; BOZONNET, S.; MULLEN, W.; JENKINS, G.I.; LEAN, M.E.J.; CROZIER, A. Occurrence of flavonoids in tomatoes and tomato-based products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.2663-2669, 2000.
- TAKEOKA, G.R.; DAO, L.; FLESSA, S.; GILLESPIE, D.M.; JEWELL, W.T.; HUEBNER, B.; BERTOW, D.; EBELER, S.E. Processing effects on lycopene content and antioxidant activity of tomatoes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.3713-3717, 2001.

TOOR, R.K.; SAVAGE, G.P. Antioxidant activity in different fractions of tomatoes. **Food Research International**, v.38, p.487-494, 2005.

TOOR, R.K.; SAVAGE, G.P. Changes in major antioxidant components of tomatoes during post-harvest storage. **Food Chemistry**, v.99, p.724-727, 2006.

U.S. Department of Agriculture. **USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods**. Release 2.1., Agricultural Research Service: Beltsville, Maryland, 2007. Disponível em: <<http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=6231>>. Acesso em: 02 ago. 2009

WILLCOX, J.K.; CATIGNANI, G.L.; LAZARUS, S. Tomatoes and cardiovascular health. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.43, p.1-18, 2003.

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.



## **CAPÍTULO 4**

### **ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PHENOLICS FROM TOMATO DETERMINED BY IN-VITRO AND MODEL SYSTEMS: EFFECT OF INDUSTRIAL PROCESSING**

ARTIGO A SER SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA *JOURNAL OF  
AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY*



**ABSTRACT**

Tomato samples collected during tomato paste processing in three different months were analyzed using four different methods (ABTS, DPPH, electron spin resonance spectroscopy – ESR, and liposome) to evaluate the effect of processing on the antioxidant capacity (AOC) of phenolics in tomato paste. Total phenolic contents were also determined. Results showed that total phenolic contents had a small increase during processing. ABTS and DPPH methods showed that during processing the antioxidant activity of the hydrophilic tomato extracts increased significantly from the *in natura* sample to the final sample and both of them had a good correlation with phenolic contents. Except for July samples, ESR also showed an increase during processing but with a lower correlation with total phenolics. These could be explained by the different antioxidant mechanisms involved. The model-system with liposomes confirmed the results obtained by the other *in vitro* methods.

**KEYWORDS:** tomato processing, total phenolic, antioxidant activity, ABTS, DPPH, Fremy's salt, ESR, liposome.

## INTRODUCTION

Tomatoes are an important source of dietary antioxidants such as carotenoids, vitamins, and phenolic compounds (George *et al.*, 2004; Kaur *et al.*, 2004). In general, industrial processing has an extensive use of high temperatures that are supposed to damage the more labile compounds and consequently their antioxidant activity.

Flavonoids are potent antioxidants and epidemiological studies indicate that high flavonoid intake is correlated with a decrease in the risk of cardiovascular diseases (Kaur *et al.*, 2004; Hollman, 1996). Current researches also suggest a role for quercetin and other flavonoids in cancer prevention (Kris-Etherton, 2002; Khanduja, 1999). These benefits are mostly attributed to flavonoids antioxidant capacity. Flavonoids can exert their antioxidant activities in several ways. They may directly scavenge some radical species by acting as chain-breaking antioxidants, suppress lipid peroxidation by recycling other antioxidants, and they can also chelate pro-oxidant metal ions (Kris-Etherton, 2002; Escarpa & Gonzalez, 2001).

On scientific literature there are several methods that can be used to determine the antioxidant activity (or capacity) of antioxidant compounds. Most of them are based on one or a combination of two mechanisms: Hydrogen Atom Transfer (HAT) and Single Electron Transfer (SET). These methods give a direct measurement of hydrogen atom donation or electron transfer from the potential antioxidant to the free radical molecules in simple “lipid free” systems. However, these assays lack oxidative substrates, and do not reflect the situation in a peroxidating-food or *in vivo* situation. So, it is important to evaluate the ability of the antioxidant to inhibit or halt lipid oxidation in relevant model systems (Becker, 2004). Since multiple reaction characteristics and mechanisms as well phase location are usually involved, no single assay will accurately reflect all of the radical sources or all antioxidants in a mixed or complex system (Prior, 2005).

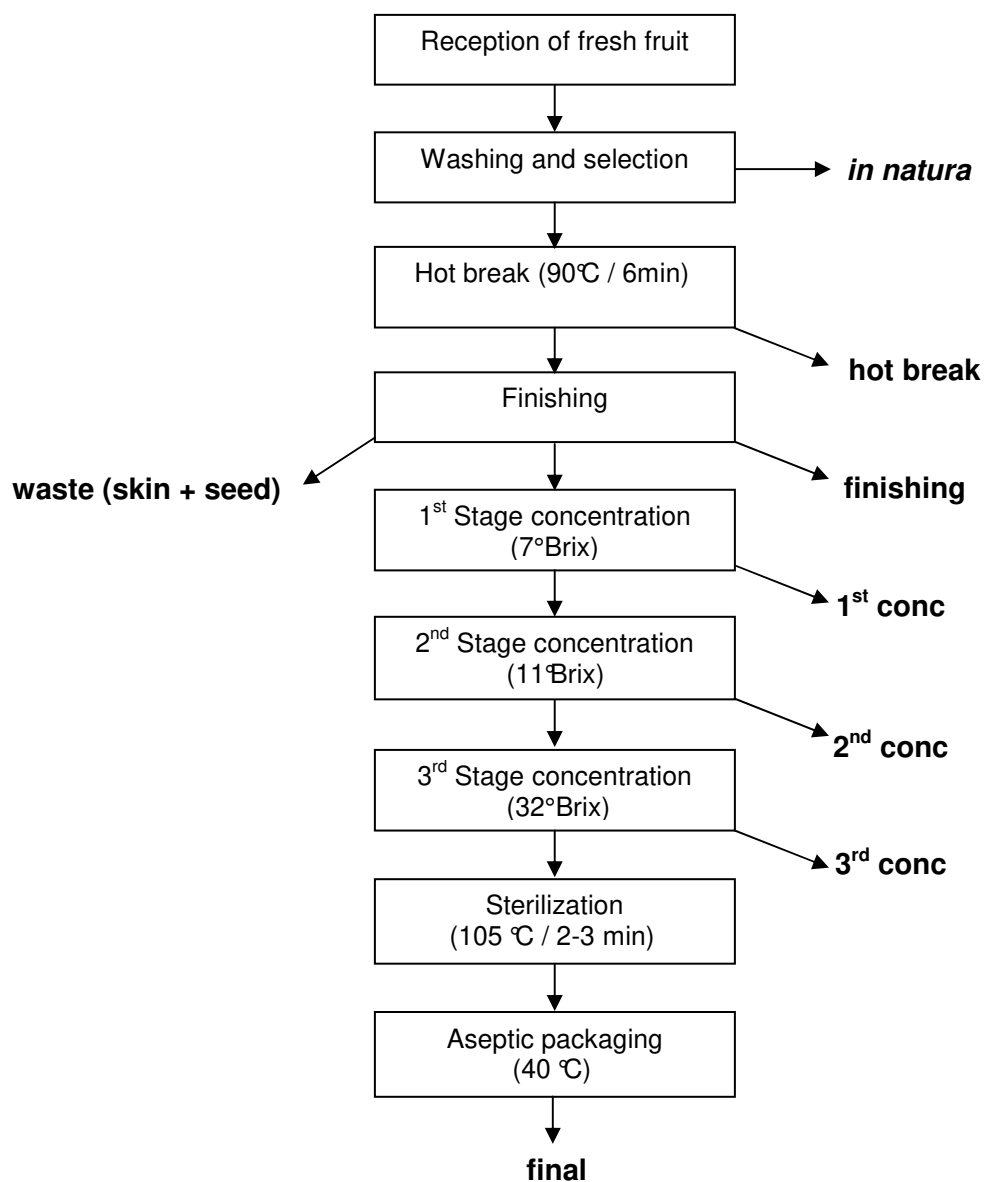
The aim of this work was to verify the effect of thermal processing on the antioxidant activity of phenolic extracts during tomato paste production. For this purpose, four different methods were used: ABTS, DPPH, and ESR (electron spin resonance spectroscopy) using Fremy's salt, as HAT and SET methods, and liposomes, as a model-system method. The correlation between these methods and the total phenolics was also studied.

## MATERIALS AND METHODS

**Chemicals and Standards.** All chemicals used were of analytical grade. Special reagents and standards were gallic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) (Sigma-Aldrich, USA), potassium persulfate (Sigma-Aldrich, USA), Trolox ((±)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), DPPH• (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (Sigma-Aldrich, USA), Fremy's salt (potassium nitrosodisulfonate) (Sigma-Aldrich, Germany), L- $\alpha$ -phosphatidylcholine (PC) (Sigma-Aldrich, USA), and AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride) (Wako Chemicals, Richmond, VA, USA).

**Samples.** All samples were collected at a tomato processing factory (Predilecta Alimentos Ltda., Matão, São Paulo, Brazil) at 8 different points of the tomato processing, as shown in **Figure 1**, and accordingly labeled: *in natura*, hot break, finishing, 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>, and 3<sup>rd</sup> concentration, final (after sterilization and aseptic filling), and waste (skin + seed). Each processing step was sampled 3 times during a normal processing day with 3 hours of interval between each sample, totalizing 4 kg of *in natura*, hot break, finishing, and 1<sup>st</sup> concentration samples, 3 kg of 2<sup>nd</sup> concentration sample, 2 kg of 3<sup>rd</sup> concentration and final samples, and 1 kg of waste material. Immediately after sampling, samples were

frozen on dry ice, freeze-dried and stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  until use. Sampling was done in July, August, and September 2006. Due to the factory schedule, in July the final product obtained was a concentrated pulp for tomato sauce and the other two were concentrated tomato paste. It means that the first one was a product with a certain content of seeds and skin in contrast to the others that had no seed nor skin.



**Figure 1.** Tomato paste production scheme and points where samples were collected.

**Phenolics Extraction.** The phenolics extracts were obtained using a previous optimized method developed by Alves *et al.* (2009) as follows: 50 mL of the extraction solution (60% ethanol with 0.1% acetic acid) were added to 1.5 g of freeze-dried tomato sample. The mixture was homogenized for 1.5 min in an Ultra turrax<sup>®</sup> (Ika, Junke & Kunkel, Germany) and filtrated through a filter paper to a 250 mL round bottom flask. The extraction was repeated twice and the filtrates were added to the same flask. The combined extract was concentrated in a rotary evaporator (Rotavapor R-144, Büchi, Flawil, Switzerland) with a vacuum pump (Julabo F25, Seelbach, Germany) in a waterbath (Waterbath B-840, Büchi) set at 45 °C. The concentrate was transferred to a 50 mL volumetric flask and the volume was completed with milli-Q water (milli-Q ultra pure system, USA).

**Total Phenolics Assay.** Total phenolics content was determined using Singleton & Rossi (1965) method adapted by Kim *et al.* (2003). Measurements were carried out in a UV-VIS spectrophotometer Varian Cary 50 (Varian Australia Pty Ltd., Mulgrave, Victoria, Australia) at 750 nm against a blank of reagents. Gallic acid was used as standard and the results were expressed as gallic acid equivalent (mg GAE/100 g) in dry basis.

**ABTS Radical Cation Decolorization Assay.** The antioxidant activity of the extracts was carried out based on the method developed by Re *et al.* (1999), with few modifications. Since the maximum absorption wavelength of the ABTS<sup>•+</sup> was observed at 750 nm, the readings were taken at this wavelength instead of 734 nm as described by Re *et al.* (1999). The time of reaction was set to 10 min as the time to reach the steady state at room temperature. Trolox was used as standard and appropriate solvent blanks were run in each assay. Measurements were carried out in a UV-VIS spectrophotometer Varian

Cary 50 (Varian Australia Pty Ltd., Mulgrave, Victoria, Australia). The results were expressed as TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) calculated by the ratio between the gradient of the percentage inhibition of absorbance vs. concentration of the extract and the gradient of the same plot for Trolox.

**DPPH Radical Assay.** The free radical scavenging capacities were determined as described by Brand-Williams *et al.* (1995). The end time used to this reaction was 1 hour when it reaches the steady state for the tomato extracts. Measurements were carried out in a UV-VIS spectrophotometer Varian Cary 50 (Varian Australia Pty Ltd., Mulgrave, Victoria, Australia) at 515 nm. The efficient concentration ( $EC_{50}$  = g tomato sample / kg DPPH') was determined as the amount of tomato extract necessary to decrease 50% of the initial DPPH' concentration and the results were expressed as ARP (anti-radical power =  $1/EC_{50}$ ).

**ESR Assay Based on Reduction of Fremy's Salt Radical.** According to the method of Rødtjer *et al.* (2006), tomato phenolic extracts were diluted with milli-Q water at six different concentrations. 3 mL of diluted solution were mixed with 200  $\mu$ L of Fremy's salt (820  $\mu$ M) dissolved in a 25% saturated sodium carbonate solution. The concentration of Fremy's salt was adjusted based on spectrophotometric measurement ( $\epsilon_{270} = 933 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). The ESR spectra were recorded with a Miniscope MS200 ESR spectrometer (Magnettech, Berlin, Germany) exactly 5 min after mixing. The measurements were carried out at room temperature with a microwave power of 4 mW, and a modulation width of 0.25 mT. The intensity of the ESR signal was measured as the height of the first line on the ESR spectra. The radical scavenging capacity was calculated based on linear regression of



results from experiments with five to six different concentrations of each sample. The antioxidant activity was expressed as millimols of Fremy's radicals reduced by 1 g of tomato sample.

**Antioxidant Activity in Liposomes.** This assay was performed according to Roberts and Gordon (2003) description with the modifications described by Schroeder *et al.* (2006). Liposomes suspension was prepared by adding 2 mL of 0.75 mM soybean PC solution and 1 mL of hexane to a 25 mL pear-shaped flask. The flask was covered with aluminum foil throughout the experiment to avoid light-induced oxidation of the lipid. The solvent was removed under reduced pressure on a rotary evaporator (Rotavapor R-144, Büchi, Flawil, Switzerland) with a vacuum pump (Julabo F25, Seelbach, Germany) in a waterbath (Waterbath B-840, Büchi) set at 30 °C. Thereafter, nitrogen was introduced to reestablish atmospheric pressure. The lipid residue was rehydrated with phenolic extract diluted in 10 mL of 0.01M phosphate buffer pH 7.4 (only phosphate buffer was used in the control). The flask was flushed with nitrogen and quickly closed with a cap before it was vortex-mixed for 10 min, producing a homogeneous white suspension of multilamellar liposomes. The multilamellar liposome suspension was then shaken while being sonicated for 30 s in an ultrasonic bath. Large unilamellar liposomes were obtained by transferring the liposome suspension to an Avestin Lipsofast Basic small volume extrusion device (Avestin, Mannheim, Germany). The suspension was passed 21 times through a double layer of polycarbonate membranes with 100 nm pore diameter. 3 mL of the unilamellar liposome suspension were pipetted into quartz cuvettes and incubated for 10 min at 37 °C within the temperature-regulated cell holder of a PerkinElmer UV-VIS spectrophotometer model Lambda 25 (Shelton, USA). Lipid peroxidation was initiated by the addition of 30 µL of 0.75

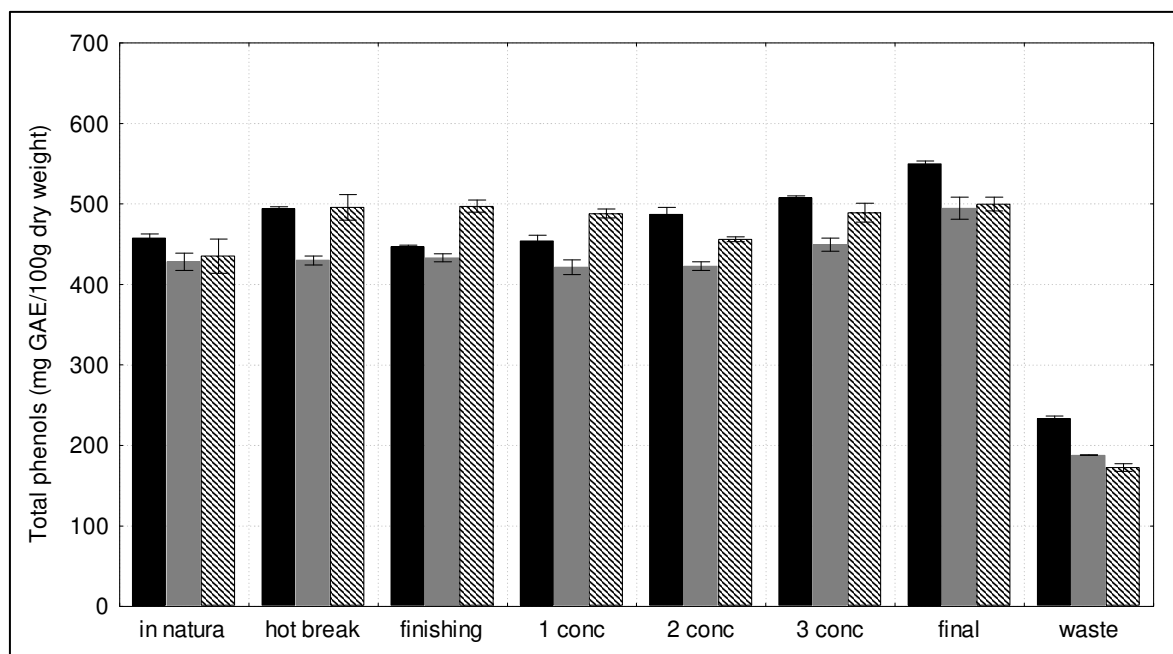
mM AAPH solution. In addition, a blank consisting of 3 mL of sodium phosphate buffer and 30  $\mu$ L of AAPH solution was incubated to measure the AAPH absorbance, which was subtracted from the measure of all samples and controls. The resistance to oxidation was expressed in terms of the IP (induction period) for increase in absorbance at 234 nm as an indication of the formation of conjugated dienes.

**Statistical Analysis.** Statistica for Windows – release 5.0 (StatSoft Inc., Tulsa, USA) was used for the analysis of variance (ANOVA) and significant differences among the extracts were made by Tukey test ( $p < 0.05$ ). This program was also employed to estimate the correlation between the total phenolics and antioxidant assays by simple linear regression.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Total Phenolics.** Figure 2 shows the amount of total phenolics in tomato samples collected at different stages of processing in July, August, and September. Although there is no regular tendency among processing samples, it is clear that the final sample had higher phenolic content than *in natura* samples. The findings that the final sample had a significantly higher level of phenolics compared to the samples *in natura* are in agreement with the literature. Giovanelli *et al.* (2001) found a higher concentration of total phenolics in tomato paste and dried tomatoes compared to fresh tomatoes and attributed this increase to hydrolysis of glycosylated forms, due to heat treatments favored by the acid medium. Gahler *et al.* (2003) and Chang *et al.* (2006) attributed an increase in total phenolics during thermal processing of tomatoes to liberation of phenolic compounds from the matrix. It is assumed that food processing may accelerate more bound phenolic compounds releasing from the breakdown of cellular constituents. However, disruption of cell walls may also

trigger the release of oxidative and hydrolytic enzymes destroying the antioxidants in fruits, but high temperature should deactivate the enzymes (Chang *et al.*, 2006).



**Figure 2.** Total phenolics in tomato samples during processing stages collected in July (black bars), August (gray bars) and September (hatched bars).

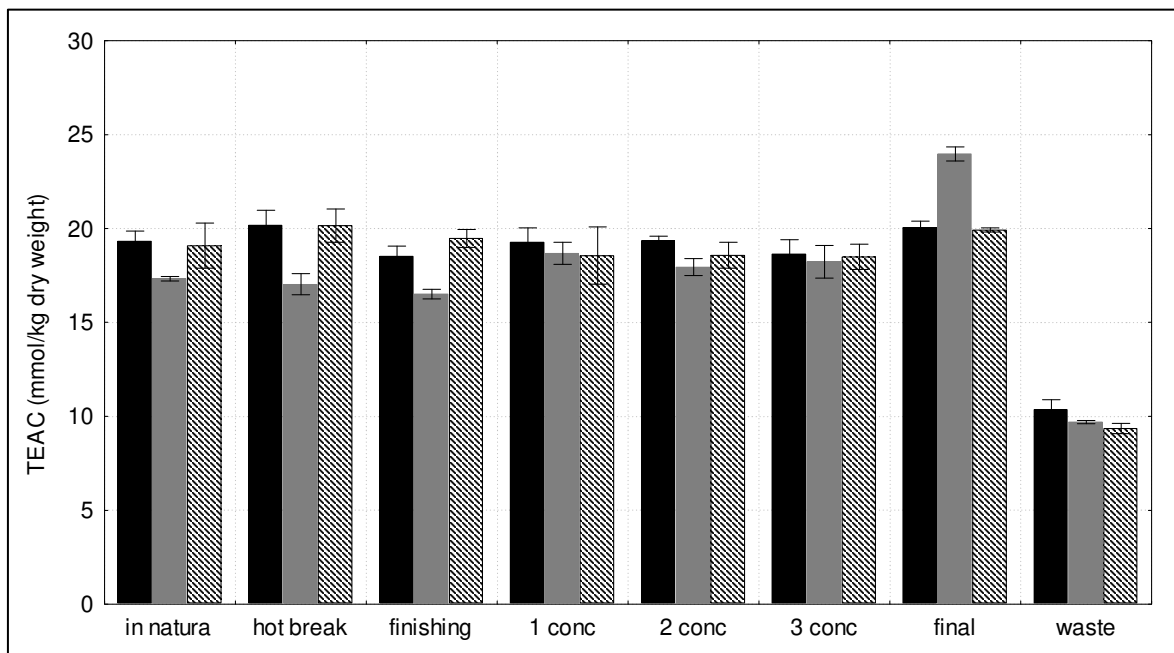
Phenolics content of the waste sample was significantly lower than the other samples. Although Stewart *et al.* (2000) and Willcox *et al.* (2003) have found a high level of phenolic compounds in tomato skin and despite it is well known that vegetables concentrate these compounds in their outer parts, the high temperatures used on processing together with the acid condition of the product might be responsible for the migration of phenolics from the skin to the pulp. In addition, as the waste material was collected from an open tank, exposed to light and oxygen, and it was not treated after that, the possibility of oxidation of phenolics should be considered to explain these low values.

**Antioxidant Activity.** Four different methods were used in order to determine the antioxidant activity of tomato samples: the three chemical assays ABTS, DPPH and ESR and the liposome assay resembling food system.

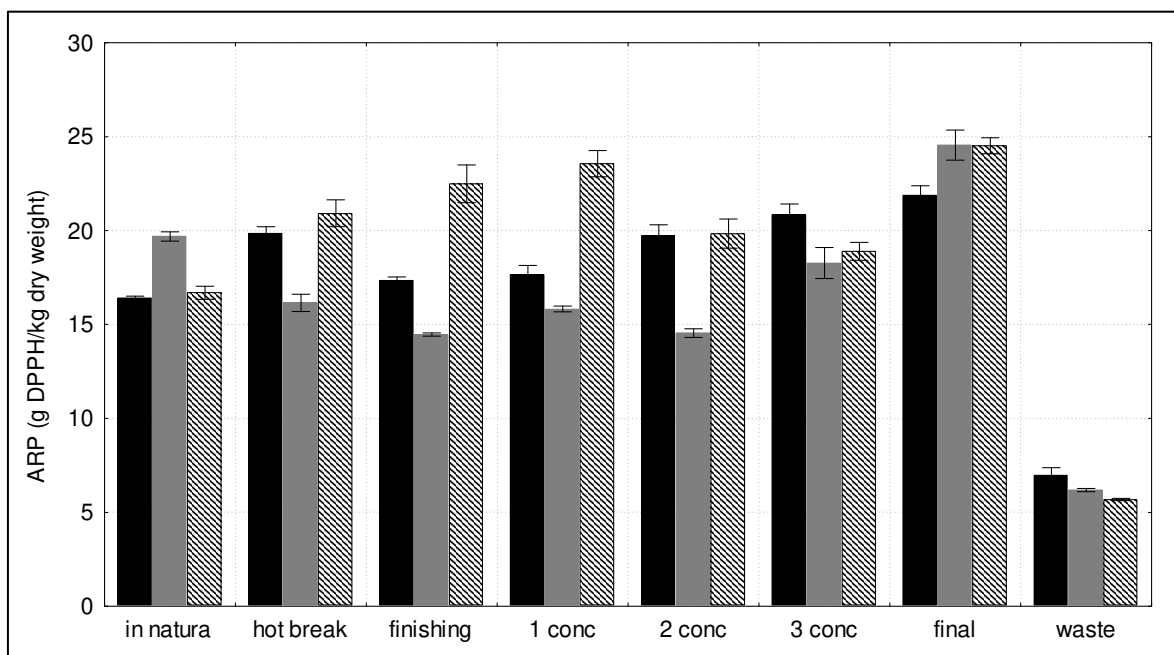
The ABTS and DPPH assays can be classified as Hydrogen Atom Transfer (HAT) and Single Electron Transfer (SET) mechanisms, meaning that the two indicator radicals may be neutralized either by radical quenching via H atom transfer or by direct reduction via electron transfer (Jiménez *et al.*, 2004 cited by Prior *et al.*, 2005). However, the ESR method based on Fremy's salt reduction may only be associated with SET mechanism.

Generally, the chemical methods, ABTS and DPPH, based on both HAT and SET mechanisms, showed that during processing the antioxidant activity of the hydrophilic tomato extracts increased significantly from the *in natura* sample to the final sample, as shown in **Figures 3** and **4**. This indicates an improvement in the availability of the antioxidant compounds. Re *et al.* (2008) found similar results of increasing antioxidant activity of the hydrophilic extract analyzed by the ABTS method when evaluating three types of tomato processing: hot break, cold break, and super cold break.

As seen in **Figure 4**, there is a marked deviation in the measurement of antioxidant capacity by DPPH with respect to the different months of collecting the tomato samples.

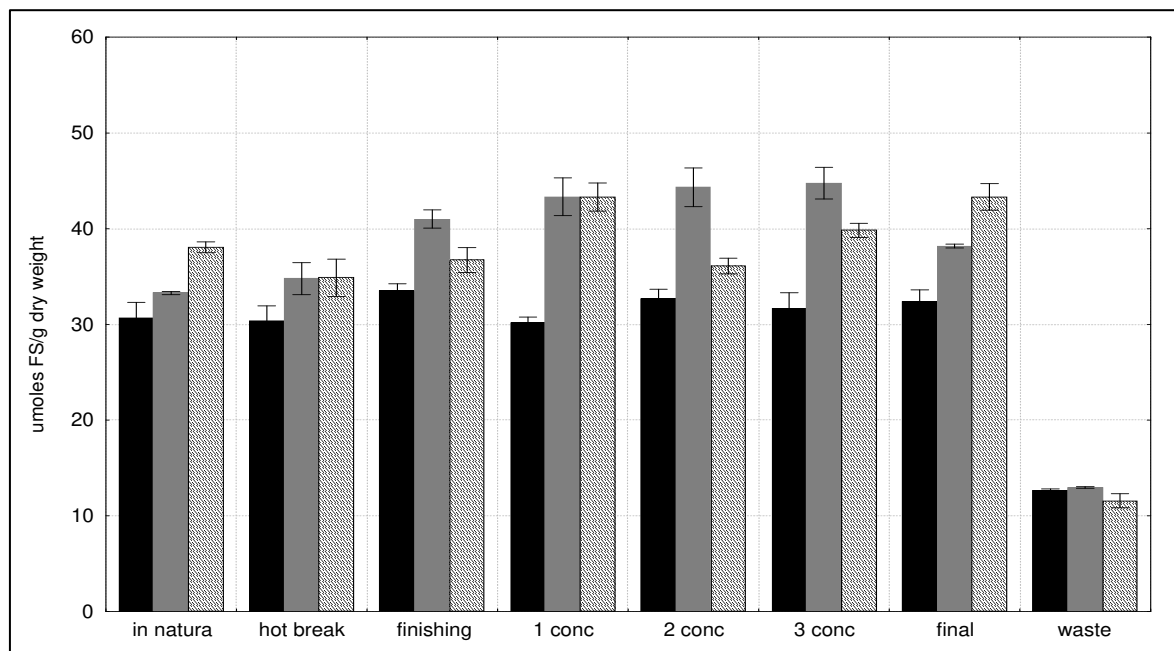


**Figure 3.** TEAC values of tomato samples during processing stages collected in July (black bars), August (gray bars) and September (hatched bars).



**Figure 4.** ARP values of tomato samples during processing stages collected in July (black bars), August (gray bars) and September (hatched bars).

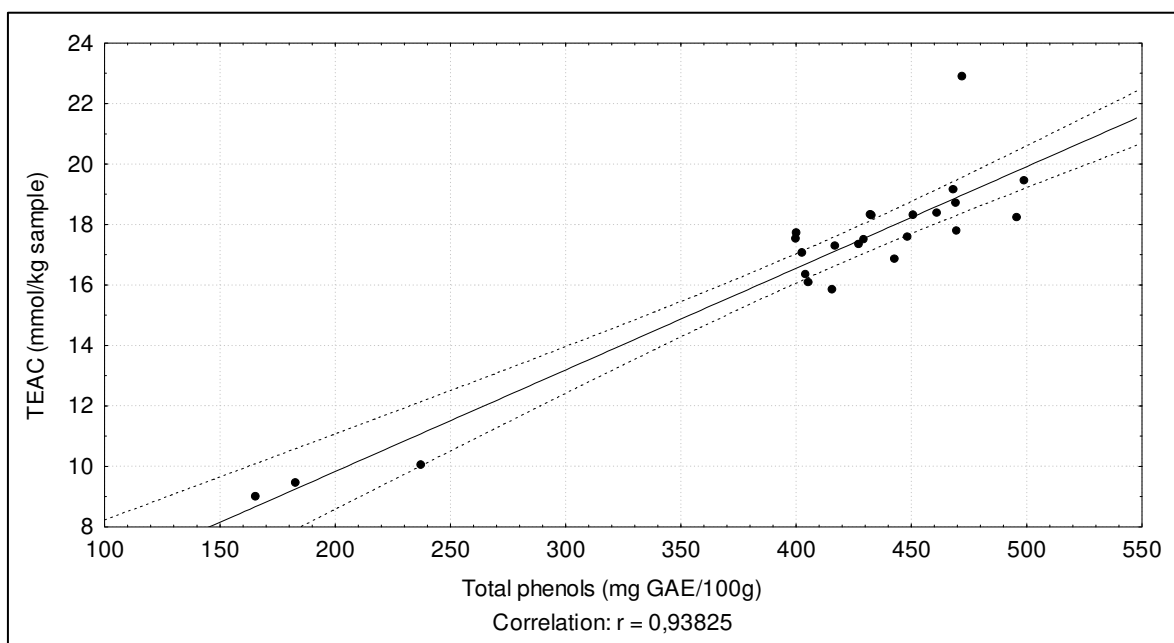
ESR methods also showed an increase in antioxidant activity during processing of August and September samples, but not for July samples that, except for waste sample, had a lower antioxidant activity than the other months (**Figure 5**).



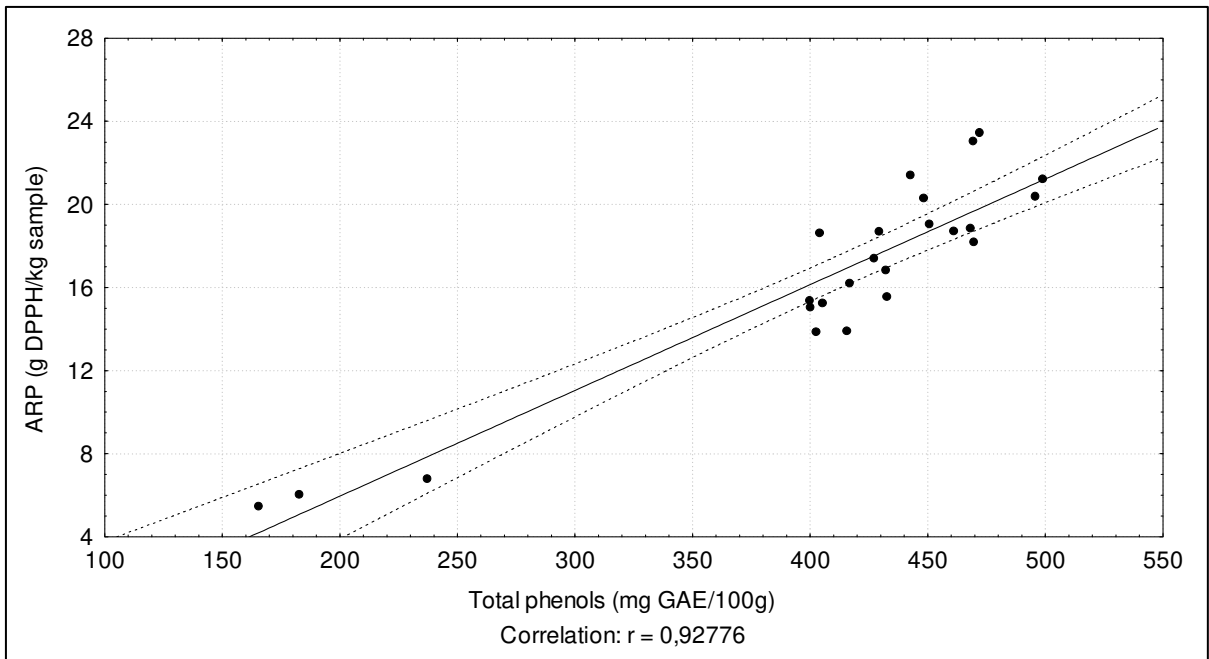
**Figure 5.** ESR results of tomato samples during processing stages collected in July (black bars), August (gray bars) and September (hatched bars).

**Figures 6 to 8** show the correlations between total phenolics and the antioxidant capacity as measured by the chemical analysis, ABTS, DPPH and ESR, respectively. The methods ABTS and DPPH correlated well with the phenolic content ( $r_{\text{ABTS}}=0.94$  and  $r_{\text{DPPH}}=0.93$ ), while the ESR method showed less correlation ( $r_{\text{ESR}}=0.77$ ). A possible explanation is in the mechanisms involved. ABTS and DPPH radicals can be reduced either by electron transfers or hydrogen donation depending on the substrate. On the other hand,

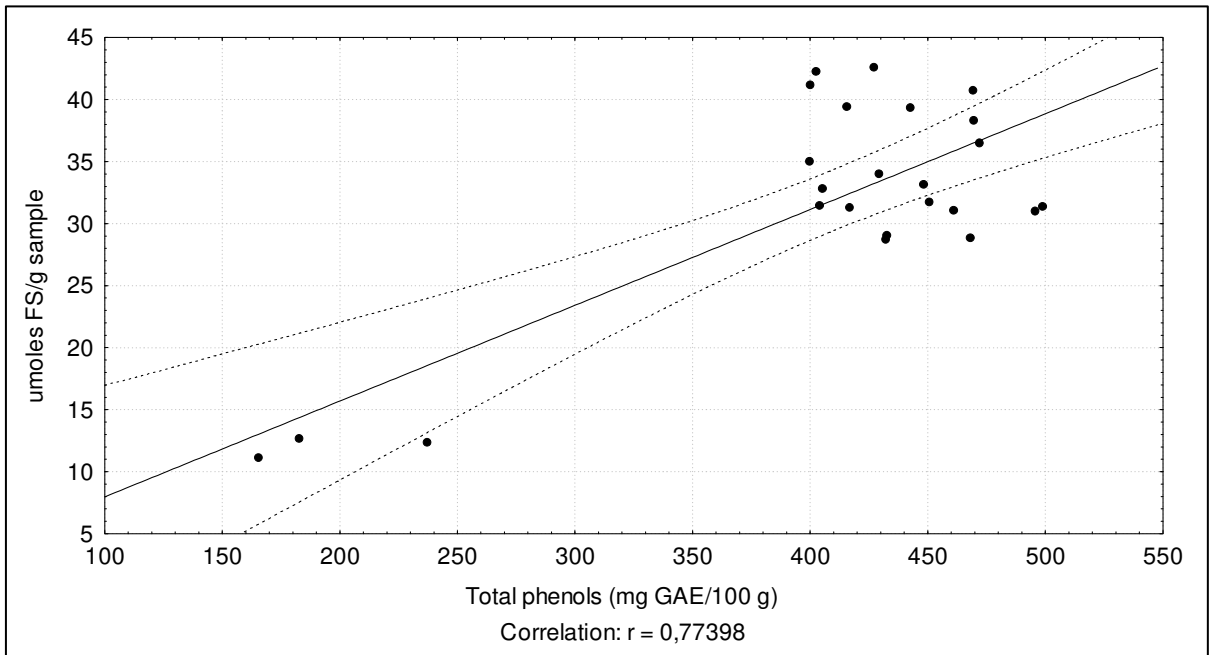
Fremy's salt used in the ESR assay is mainly reduced by electron transfer. Phenolic compounds and flavonoids, mainly the ones with a higher number of hydroxyl groups, are good antioxidants because of their ability to transfer hydrogen. Flavonoids, such as quercetin, that have conjugation between rings A and B (**Figure 9**), may further possess electron transfer properties because this conformation results in a maximum electron delocalization across the structure. Presumably, ABTS and DPPH showed better correlations with total phenolics, due to reaction with a greater number of compounds, while in the ESR assay some compounds quantified as total phenolics are unable to transfer electrons. This may explain the results below the lower limit of confidence where a greater ESR value was expected for the samples according to their total phenolics contents. Coincidentally or not, all these samples belong to the July group. Otherwise, the ESR method is more sensitive and more affected by small variations which can be an explanation to the dispersed results.



**Figure 6.** Correlation between TEAC and total phenols.

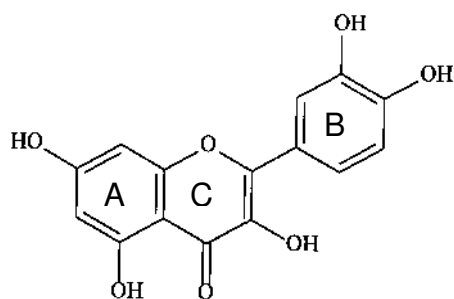


**Figure 7.** Correlation between ARP and total phenols.



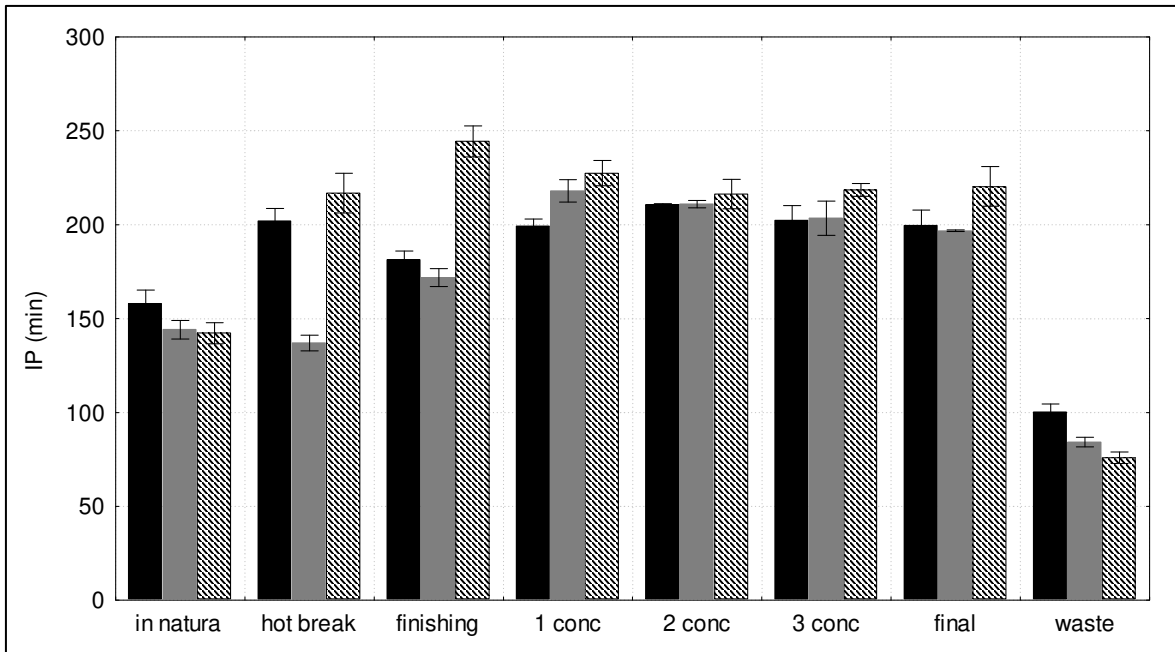
**Figure 8.** Correlation between ESR and total phenols.



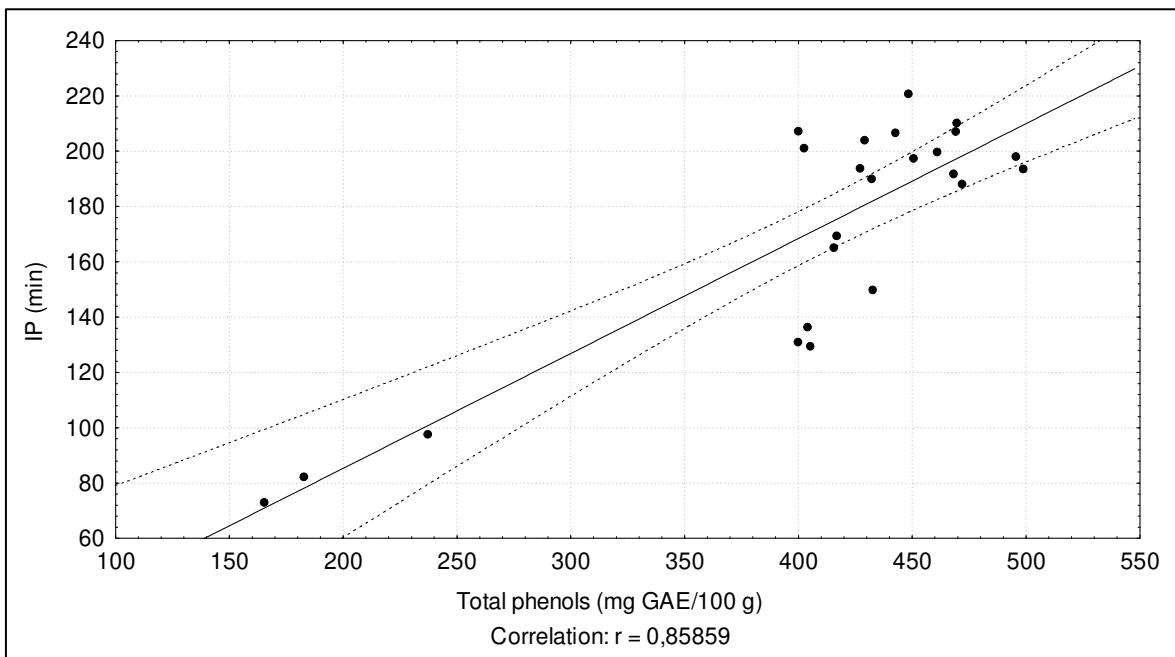


**Figure 9.** Quercetin structure.

**Figures 10** and **11** show the results of induction period from the liposome assay and its correlation with total phenolics, respectively. In accordance with the other methods used, the induction period for liposome showed an increase in antioxidant activity during processing from *in natura* to final samples. In general, it does not change after first concentration until the final product, but for the three months studied, the final product had a significantly greater induction period compared to *in natura* samples ( $p < 0.05$ ). The correlation with total phenolics was also good ( $r = 0.86$ ). All *in natura* samples and the hot break sample of August are below the lower limit of confidence. The finishing sample collected in September and the samples of first and second concentration of August and September are over the upper limit of confidence.



**Figure 10.** Induction period (IP) of tomato samples during processing stages collected in July (black bars), August (gray bars) and September (hatched bars).



**Figure 11.** Correlation between IP and total phenols.

In conclusion, the mechanism involved in the antioxidant activity of the hydrophilic tomato extracts might be better explained by hydrogen donation, since the results obtained with ABTS and DPPH methods had better correlation with phenolics contents than the ESR method. Liposome assay confirmed these results.

#### **ACKNOWLEDGEMENT**

The authors thank the Brazilian agencies CAPES, CNPq and FAPESP for the financial support, and the Institute of Food Technology (ITAL – Campinas, SP, Brazil) and the Department of Food Science - University of Copenhagen (Copenhagen, Denmark) for the technical support. The authors also thank Predilecta Alimentos Ltda for all the tomato samples.

---

**LITERATURE CITED**

- ALVES, A. B.; BANHARA, B. R.; VICENTE, E.; BRAGAGNOLO, N. Use of response surface methodology for optimization and validation of extraction conditions for flavonoids quantification in tomato paste using LC-DAD-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2009 (to be submitted).
- BECKER, E. M.; NISSEN, L. R.; SKIBSTED, L. H. Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. **European Food Research and Technology**, v. 219, p. 561-571, 2004.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v. 28, p. 25-30, 1995.
- CAPANOGLU, E.; BEEKWILDER, J.; BOYACIOGLU, D.; HALL, R.; de VOS, R. Changes in antioxidant and metabolite profiles during production of tomato paste. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 964-973, 2008.
- CHANG, C-H.; LIN, H-Y.; CHANG, C-Y.; LIU, Y-C. Comparisons on the antioxidant properties of fresh, freeze-dried and hot-air-dried tomatoes. **Journal of Food Engineering**, v. 77, n. 3, p. 478-485, 2006.
- GAHLER, S.; OTTO, K.; BÖHM, V. Alterations of vitamin C, total phenolics, and antioxidant capacity as affected by processing tomatoes to different products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 7962-7968, 2003.
- GEORGE, B.; KAUR, C.; KHURDIYA, D. S.; KAPOOR, H. C. Antioxidants in tomato (*Lycopersium esculentum*) as a function of genotype. **Food Chemistry**, v. 84, p. 45-51, 2004.

- GIOVANELLI, G., L., LAVELLI V., PERI C., PAGLIARINI E., ZANONI B., PETRONE P. The antioxidant activity of tomato. IV. Effects of storage on oxidative and heat damage. **Acta Horticulturae**, v. 542, p.221-223, 2001.
- HOLLMAN, P. C. H.; HERTOOG, M. G. L.; KATAN, M. B. Analysis and health effects of flavonoids. *Food Chemistry*, v. 57, n. 1, p. 43-46, 1996.
- KHANDUJA, K. L.; GANDHI, R. K.; PATHANIA, V.; SYAL, N. Prevention of *N*-nitrosodiethylamine-induced lung tumorigenesis by ellagic acid and quercetin in mice. *Food and Chemical Toxicology*, v. 37, p. 313-318, 1999.
- KAUR, C.; GEORGE, B.; DEEPA, N.; SINGH, B.; KAPOOR, H. C. Antioxidant status of fresh and processed tomato – A Review. *J. Food Sci. Technol.*, v. 41, n. 5, p. 479-486, 2004.
- 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.
- KRIS-ETHERTON, P. M.; HECKER, K. D.; BONANOME, A.; COVAL, S. M.; BINKOSKI, A. E.; HILPERT, K. F.; GRIEL, A. E.; ETHERTON, T. D. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American Journal of Medicine*, v. 113 (9b), p. 71-88, 2002.
- 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.
- PRIOR, R. L.; WU. X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4290-4302, 2005.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 9/10, p. 1231-1237, 1999.

ROBERTS, W. G. & GORDON, M. H. Determination of the total antioxidant activity of fruits and vegetables by a liposome assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 1486-1493, 2003.

RØDTJER, A.; SKIBSTED, L. H.; ANDERSEN, M. L. Antioxidative and prooxidative effects of extracts made from cherry liqueur pomace. **Food Chemistry**, v. 99, p. 6-14, 2006.

SCHROEDER, M. T.; BECKER, E. M.; SKIBSTED, L. H. Molecular mechanism of antioxidant synergism of tocotrienols and carotenoids in palm oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 3445-3453, 2006.

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.

STEWART, A. J.; BOZONNET, S.; MULLEN, W.; JENKINS, G.I.; LEAN, M. E. J.; CROZIER, A. Occurrence of flavonoids in tomatoes and tomato-based products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 2663-2669, 2000.

WILLCOX, J. K.; CATIGNANI, G. L.; LAZARUS, S. Tomatoes and cardiovascular health. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 43, n. 1, p. 1-18, 2003.

## **CAPÍTULO 5**

### **ANTIOXIDANT PROTECTION OF HIGH-PRESSURE PROCESSED MINCED CHICKEN MEAT BY INDUSTRIAL TOMATO PRODUCTS**

ARTIGO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA *EUROPEAN FOOD  
RESEARCH AND TECHNOLOGY*





**ABSTRACT**

Pressure-treatment at 300 MPa of minced chicken breast meat did not induce significant lipid oxidation during chill storage for up to 15 days, while pressure-treatment at 600 and 800 MPa enhanced formation of secondary lipid oxidation products measured as thiobarbituric acid reactive substances. However, a waste product from industrial tomato paste production was found to yield efficient protection against lipid oxidation in pressurised chicken meat. Addition of 0.30% tomato waste or of 0.10% final tomato paste to minced meat led to a lag phase of 6 days for formation of secondary oxidation products in meat pressure-treated at 600 MPa. The waste product seemed specially efficient in protecting chicken meat pressurized at 800 MPa, as a notably lower rate of formation of secondary oxidation products was found. Important phenols washed out with the waste fraction may be more efficient as antioxidant than the phenolic compounds in the other paste processing fractions. Addition of tomato paste fractions did not influence radical formation measured by electron spin resonance spectroscopy and the tomato waste can be considered to be effective as antioxidant at subsequent reactions leading to secondary lipid oxidation products.

**Keywords** *High pressure; Chicken breast meat; Tomato paste products; Lipid oxidation; ESR*

## INTRODUCTION

High-pressure processed chicken meat seems to have a market potential as a minimal processed meat product due to less lipid oxidation resulting from pressure processing compared to thermal processing and due to less pressure-induced discoloration of chicken meat compared to pork and beef muscle. Previous studies have shown that lipid oxidation in vacuum-packed chicken meat is initiated during high pressure treatment due to the relatively high content of unsaturated fatty acids in poultry fat [1-5]. It is well-documented that the use of natural antioxidants from herbs and spices in meat products may prevent or delay lipid oxidation. Specially, rosemary and sage were found to be effective antioxidants in high-pressure treated chicken meat during chill storage [4, 5]. However, it was found that garlic showed prooxidative effects in chicken meat treated at pressures above 300 MPa [5]. Moreover, both sage and garlic were found to act as radical scavengers in an isolated chicken lipid phase, while sage acted as a prooxidant and garlic showed no effect in an isolated chicken aqueous phase [5]. This remarkable result calls for a detailed evaluation of the effect of any potential antioxidant on the progression of lipid oxidation in the real food product prior to practical use. Tomato is rich in antioxidants like carotenoids, flavonoids, and vitamins, and it is also a vegetable often used in meat dishes. In order to evaluate tomato as a source of natural antioxidants to be used for protection of pressure treated chicken meat during subsequent storage, the effect of working pressure on lipid oxidation in chicken meat without or with various industrial tomato paste processing fractions including waste was investigated.

## MATERIALS AND METHODS

**Tomato samples.** The various tomato products were collected at Predilecta Alimentos Ltda (Matão, São Paulo, Brazil) in September 2006. The products were collected at 4 different

sites of the tomato paste processing line and accordingly labeled: *in natura*, finishing, final, and waste (**Fig. 1**). Each processing step was sampled 3 times during a normal processing day with 3 hours of interval between each sample, totalizing 4 kg of *in natura* and finishing products, 2 kg of final product, and 1 kg of waste product. Immediately after collection, the products were frozen on dry ice followed by freeze-drying and stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  until use.

**Total phenolics content.** The tomato products were characterized with respect to total phenolics. The phenolic extracts were obtained as follow: 50 mL of the extraction solution (60% ethanol with 0.1% acetic acid) was added to 1.5 g of freeze-dried tomato sample. The mixture was homogenized for 1.5 min in an Ultra turrax<sup>®</sup> (Ika, Junke & Kunkel, Germany) and filtrated through a filter paper to a 250 mL round bottom flask. The extraction was repeated twice and the filtrates were added to the same flask. The combined extract was concentrated on a rotary evaporator (Rotavapor R-144, Büchi, Flawil, Switzerland) with a vacuum pump (Julabo F25, Seelbach, Germany) in a water bath (Waterbath B-840, Büchi) set at  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The concentrate was transferred to a 50 mL volumetric flask and the volume was made up with milli-Q water (milli-Q ultra pure system, USA). Total phenolic content was determined using Singleton & Rossi [6] method adapted by Kim *et al.* [7]. Measurements were carried out in a UV-Vis spectrophotometer Varian Cary 50 (Varian Australia Pty Ltd, Mulgrave, Victoria, Australia) at 750 nm against a blank of reagents. Gallic acid was used as standard and the results were expressed as gallic acid equivalents (in mg gallic acid equivalents/100 g freeze-dried products).

**Carotenoids content.** Lycopene and  $\beta$ -carotene contents of tomato products were determined as described by Carvalho *et al.* [8]. HyfloSupercel was added to 0.5 g of freeze-dried tomato sample, homogenized and hydrated with 20 mL of water. Carotenoids were

extracted one time with 50 mL of acetone and then three times with 30 mL of acetone for 1 min using an Ultra turrax<sup>®</sup> (Ika, Junke & Kunkel, Germany). 20 mL of acetone extract were transferred to a separation funnel containing 50 mL of petroleum ether. Acetone was removed with water and a new acetone aliquot was added. The process was repeated until all acetone extract was transferred and washed. Petroleum ether with carotenoids was collected in a 50 mL volumetric flask and the volume was made up with petroleum ether. For  $\beta$ -carotene quantification, 1 mL of the extract was dried under nitrogen and dissolved in 1 mL of mobile phase. For lycopene, 0.5 mL of extract was dried and dissolved in 5 mL of mobile phase. Carotenoids were analyzed using a liquid chromatograph (Shimadzu, model 10, Kyoto, Japan) composed by a binary pump (Shimadzu LC-10, Kyoto, Japan) and diode array detector (DAD-UV-Vis) (Shimadzu SPD-M10A, Kyoto, Japan). Separation was made using an Lichrospher<sup>®</sup> 100 RP18 column (125 x 4 mm, 5  $\mu$ m, Merck, Germany), and mobile phase composed by acetonitrile:methanol:ethyl acetate (73:20:7, v/v/v) at 1.5 mL/min isocratic flow. Detection was done at 450 nm and quantification was made using external standards at 0.9  $\mu$ g/mL for  $\beta$ -carotene and 2.0  $\mu$ g/mL for lycopene.

**Preparation of chicken meat samples.** Frozen chicken breast was obtained from Rose Poultry A/S (Vinderup, Denmark) and was thawed for 48 h at 5 °C. The chicken breasts were minced in an electric mincer after removing connective and adipose tissues. All the minced meat was manually mixed and divided into five portions of 1.34 kg each. One portion was mixed with 0.10% w/w *in natura*, one portion was mixed with 0.10% w/w finishing, and one portion was mixed with 0.10% w/w final. The fourth portion was mixed with 0.30% w/w waste, while the last portion was the control with no addition of tomato products. Each chicken portion was well homogenized with a fork to incorporate the tomato products and sequentially

divided in polyethylene bags containing two portions of 10 g each, vacuum-packed and stored at 5 °C for 1 or 2 days before high-pressure processing.

**High-pressure processing.** The vacuum-packed meat samples were submerged in the pressurizing chamber of a QUINTUS Food Processing Cold Isostatic Press QFP-6 (Avure Technologies AB, Västerås, Sweden) with water thermostated at 10 °C as the pressure transmission fluid. The meat samples were treated at 300, 600, or 800 MPa hydrostatic pressures for 10 min (20 bags of each chicken sample were treated at each pressure). During high-pressure treatment, the temperatures in the pressure chamber increased and the maximum temperatures reached were 16.1 °C at 300 MPa, 29.1 °C at 600 MPa, and 43.4 °C at 800 MPa, as measured by a built-in thermocouple. The depressurizing was initiated automatically after 10 min and instantly resulted in a decrease in temperature to approximately 5, 0, and –2 °C after working at 300, 600, and 800 MPa, respectively.

**Storage.** Immediately after high-pressure processing all 20 bags of each combination of tomato products and pressure treatment were stored at 5 °C in the dark. Samples (2 bags each containing two meat portions) were taken for analysis of color, ESR, and TBARS on days 0, 3, 6, 8, 10, 13, and 15. Vitamin E was analyzed on samples of days 0 and 15. Raw sample, without addition of any tomato products and not subjected to high-pressure treatment, was also analyzed.

**Electron spin resonance spectroscopy.** The relative radical content was measured by electron spin resonance (ESR) spectroscopy as described by Nissen *et al.* [9]. Samples were freeze-dried at –40 °C in an Edwards Modulyo F reeze-Drier (Edwards High Vacuum, Britain) in order to trap radicals in the rigid structure of the low water-activity product. The

freeze-dried samples were grinded in an A10 Janke & Kunkel Mill (Janke & Kunkel GmbH & Co. KG – IKA-Labortechnik, Staufen-Br, Germany) with water refrigeration for 7 cycles of 15 s each, until a fine chicken meat powder was obtained. Between 0.3 and 0.6 g of sample (accurately weighed) was transferred to a cylindrical, thin-walled 702-PQ-7 clear-fused quartz (CFQ) tube (*o.d.* 5 mm; Wilmad Glass Company Inc, Buena, NJ) which was gently tapped against the table in order to establish a dense and uniform packing (column height, approximately 6 cm; density, approximately 0.07 g/cm, calculated for each individual meat sample). The ESR measurements were performed using a JES FR30 Free Radical Monitor (JEOL, Tokyo, Japan) with the following parameters: sweep time 1 min, sweep width 7.5 mT, microwave power 4 mW, modulation width 0.63 mT, and time constant 0.1 s. The amount of radicals was quantified as the height of the ESR signals relative to the signals from a built-in manganese standard and normalized by the density (g/cm) of the meat sample in the ESR tube. Results are expressed as mean of two different samples submitted to the same treatment. Standard deviation was around 1.2 with a few outliers.

**Analysis of thiobarbituric acid reactive substances.** The thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were determined in  $5.00 \pm 0.10$  g of homogenized meat samples according to Sørensen & Jørgensen [10]. TBARS are expressed in  $\mu\text{mol}$  malonaldehyde equivalent (MDA) per kg meat. A standard curve between 0.1 and 12.0  $\mu\text{mol/L}$  of TEP (1,1,3,3-tetraethoxypropane, Merck, Darmstadt, Germany) was used. The results presented are the means of measurements on two different samples exposed to the same treatment. Standard deviation was around 1.9 with a few outliers.

**Vitamin E determination.** Analysis of  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherol content in chicken meat were performed as previously described [11]. Vitamin E was expressed as mg of  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherol per kg of meat using an external standard curve (concentration range from 0.5 to 10 mg/L) for  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherol, respectively (Merck, Darmstadt, Germany and Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany). The reported values are means of duplicate measurements each on two different samples exposed to the same treatment.

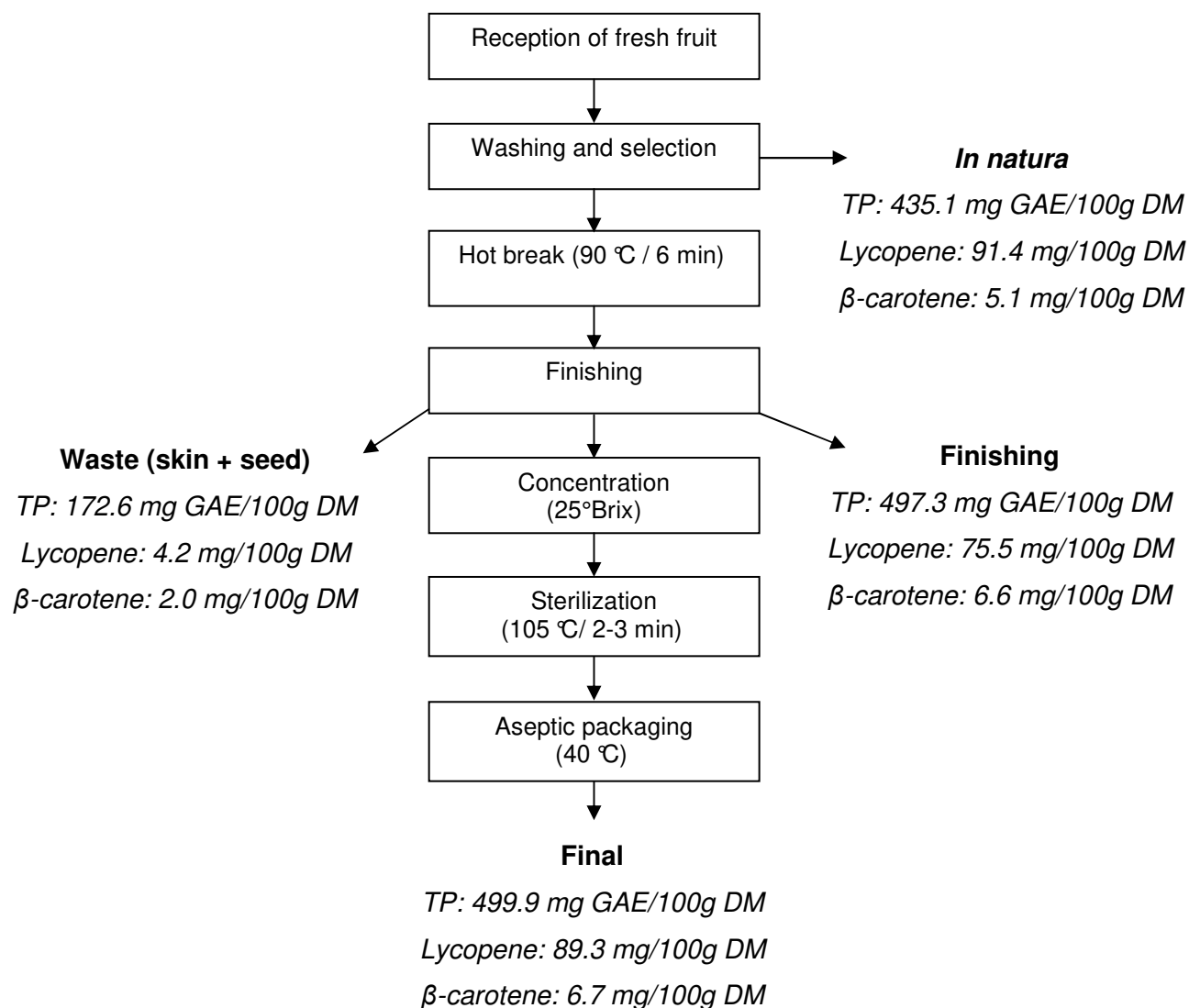
**Color measurement.** The color measurements were performed using a Color-Guide 45/0 (Byk-Gardner, Geretsried, Germany). The  $L^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$  values were measured three times on the surface of meat samples processed in duplicate (Illuminant D65/10°).

**Statistical analysis.** The results were submitted to analyses of variance and the means were classified by LSD ("least square difference" at  $p < 0.05$ ). The adjusted means were calculated by multiple regression by the General Linear Model (GLM) procedure. All the calculations were performed using the software Statistica for Windows 5.5 (StatSoft Inc., Tulsa, USA).

## RESULTS AND DISCUSSION

The production of tomato paste includes several processing steps some at high temperatures and resulting in fractionating in effect changing the antioxidative activity of the product compared to the raw material and likely in the potential to act as antioxidant with respect to lipid oxidation in a real meat product. The tomato waste product differs from the other products in the content of total phenolic compounds, lycopene content, and  $\beta$ -

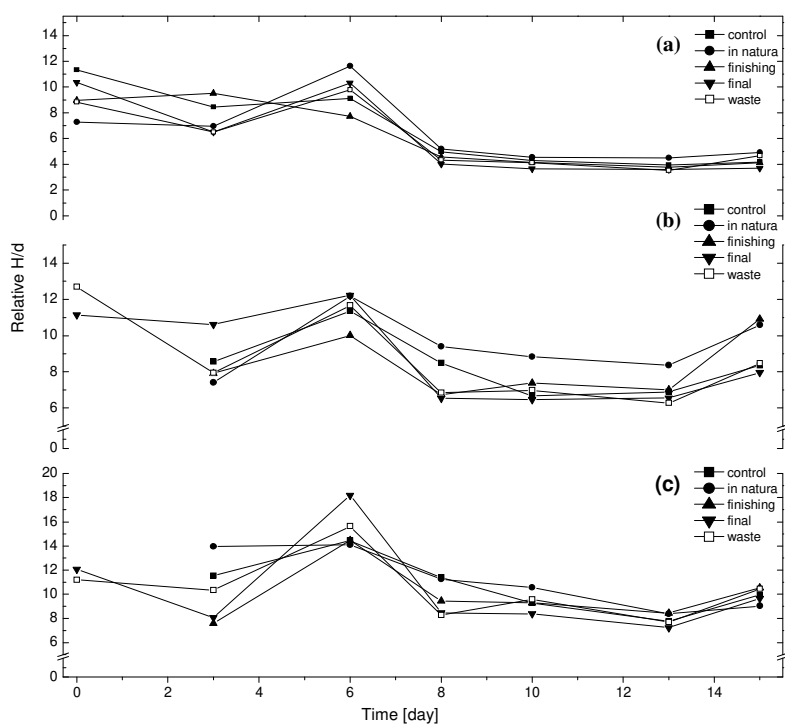
carotene content (**Fig. 1**), but adding 3 times as much waste product to the meat gives comparable phenolic and  $\beta$ -carotene content.



**Fig. 1** The tomato paste processing scheme showing the 4 different sites of collecting the tomato products with the total phenolic (TP), lycopene, and  $\beta$ -carotene contents to be used in high-pressure processed chicken meat. DM = dry matter.



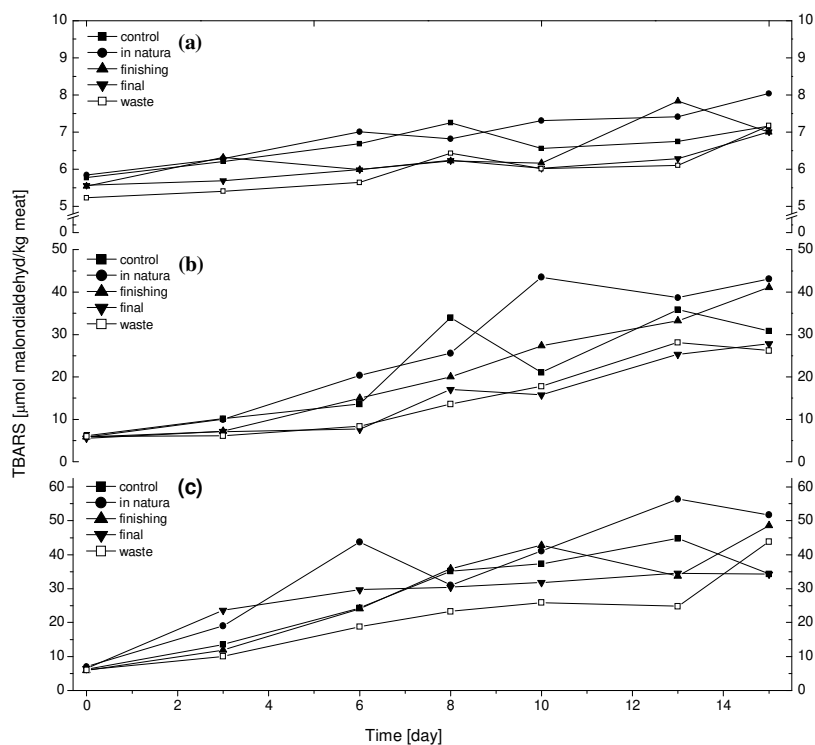
The potential of the different tomato products to diminish the pressure-induced lipid oxidation in chicken breast meat during chill storage at 5 °C for up to 15 days was quantified as the formation of radicals using electron spin resonance spectroscopy (ESR). **Fig. 2** shows that approximately similar levels of radicals was obtained immediately after pressure treatment (Day 0), indicating that high pressure treatment initiated lipid oxidation to the same extent irrespective of pressure level and addition of tomato products to the meat. The radical formation is an early event in lipid oxidation and, thus, a predecessor for the further development of lipid oxidation resulting in lipid hydroperoxides and secondary lipid oxidation products. Due to the autocatalytic nature of the progression phase in the over-all lipid oxidation process, an increase in radical formation as a result of high-pressure treatment was expected. However, a decline in the content of radicals during storage was observed for the meat pressurised at 300 MPa (Fig. 2 (a)), indicating that the radicals formed during pressure treatment is scavenging and may not enhance lipid oxidation further. The steady-state level of radical content at 600 and 800 MPa (Fig. 2 (b) and (c)) indicates a continuous formation and scavenging of radicals. Surprisingly, no difference in the development of radical formation between meat with or without addition of tomato products is noted within the same pressure treatment as seen in Fig. 2. Apparently, the compounds present in the tomato products does not limit the radical formation, although radical scavenging has been identified as important for the protective effect of antioxidants against lipid oxidation. In addition, rosemary has previously been shown to inhibit lipid oxidation in chicken meat processed at 600 MPa by lowering radical formation as shown by ESR spectroscopy [12]. Lycopene, which otherwise is known as a very efficient radical scavenger, seems to be of little importance in protections against pressure induced lipid oxidation [13].



**Fig. 2** Formation of radicals (H, the relative height of the ESR signal normalized by the density) in freeze-dried pressurized minced breast chicken meat with and without addition of tomato products during subsequent chill storage in the dark: (a) 300 MPa (b) 600 MPa, and (c) 800 MPa.

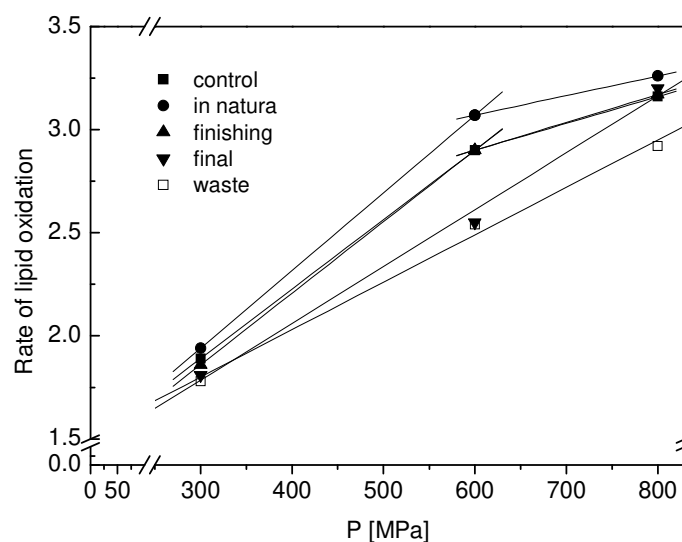
The effect of the different tomato products on the further progression of lipid oxidation in high pressure treated chicken meat during chill storage at 5 °C for up to 15 days was investigated using TBARS as a measure of the extent of lipid oxidation. Initially, after pressure treatment (Day 0), the extent of lipid oxidation is the same, but during storage the extent of lipid oxidation was found to vary with the pressure level as seen from the developments in the TBARS curves (Fig. 3). Similar levels of TBARS-values and developments in lipid oxidation in pressure-treated chicken breast meat were found by Mariutti *et al.* [5]. From the TBARS-values it is directly seen that pressure at 300 MPa did not induce significant lipid oxidation during the entire storage period for chicken meat, as the level of TBARS was below 8  $\mu\text{mol/kg}$  for all meat samples (Fig. 3 (a)), in agreement with the ESR results. In contrast, pressure treatments at 600 and 800 MPa had a prooxidative effect on chicken meat, as lipid oxidation was observed to increase significantly during storage (Fig. 3 (b) and (c)). A critical working pressure for oxidative damage seems to exist between 300 and 600 MPa in agreement with previous findings [1, 2, 5, 13]. From the development of the secondary lipid oxidation products as indicated by the TBARS-values, it is seen that the final product and the waste product are effective in protecting chicken meat against pressure-induced lipid oxidation. For meat pressurized at 600 MPa a lag phase of 6 days was identified for chicken meat with the two most efficient tomato products added (Fig. 3 (b)). Moreover, a tendency of a lower rate of development of secondary oxidation products was observed for the meat with the waste product added and pressure treated at 800 MPa (Fig. 3 (c)). Notably, the tomato product waste with the lowest lycopene content, showed the most protective effect against lipid oxidation. Specific phenols washed out with the waste fraction may be more efficient as antioxidant than the phenolic compounds in the other tomato products with respect to preventing lipid oxidation

in pressurized chicken meat. This observation is considered to be of practical importance to the meat processing industry.



**Fig. 3** Formation of secondary lipid oxidation products (TBARS) in pressurized minced chicken breast meat with and without addition of tomato products during subsequent chill storage in the dark: (a) 300 MPa (b) 600 MPa, and (c) 800 MPa.

An assessment of the effect of the tomato samples on the progression of lipid oxidation in pressure-treated chicken breast meat emerged from the statistical analysis based on the adjusted means of the  $\ln(\text{TBARS})$ -values (Fig. 4). The adjusted mean yield the average rate by which TBARS changes with time in each meat product, and the effect of the different tomato products on this rate is shown in Fig. 4 for increasing pressure. In accordance with Fig. 3, the pressure treatment at 300 MPa was milder with respect to the induction of lipid oxidation, as the rate of development in TBARS during storage was not significantly different between the meat samples. However, at higher pressures the effect of addition of tomato products to the meat resulted in the following increasing order to delay lipid oxidation; at 600 MPa: waste ~ final < finishing ~ in natura ~ control, and at 800 MPa: waste < final ~ finishing ~ in natura ~ control (where ~ denotes no mutual significant difference and < denotes significant difference between the treatments). In conclusion, only the tomato waste acted as an effective antioxidant in pressure-processed minced chicken breast meat during chill storage.



**Fig. 4** Rate of development of lipid oxidation expressed as  $\ln(\text{TBARS}/t)$  (adjusted means of TBARS/ $t$  in  $\mu\text{mol kg}^{-1} \text{day}^{-1}$ ) as a function of working pressure.

The effect of increasing hydrostatic pressure used for meat processing on the subsequent progression of lipid oxidation during chill storage is clear, and the pressure treatment above 300 MPa accelerates lipid oxidation as may be seen in Fig. 4. Moreover, the rate of lipid oxidation appears not to increase linearly with pressure for chicken meat without addition of tomato products and with the in natura and finishing tomato products added. A similar non-linear relationship was previously demonstrated by Orlien *et al.* [1], who established 500 MPa as a threshold pressure for whole chicken breast fillet with respect to lipid oxidation. Beltran *et al.* [13] observed no effect on the oxidative stability of minced chicken breast subjected to pressure treatments for up to 500 MPa, supporting the suggestion of a threshold pressure. There is a tendency of a linear correlation between lipid oxidation development and applied pressure for the chicken meat added the final and

waste tomato products, a relationship also found for minced chicken breast [5] and turkey meat [14]. Other meat muscles seem to be susceptible to pressure-induced lipid oxidation, as pressure-treatment above 300 MPa of pork resulted in increased rates of lipid oxidation [15] and pressure-treatment at 400 MPa of cod increased the rate of oxidation [16].

$\alpha$ -Tocopherol and  $\gamma$ -tocopherol are the most important antioxidants present in chicken meat, and the content of  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherol were measured prior to storage and at the last day of storage in order to evaluate the interaction in the pressure-treated meat product between the tocopherols and the compounds present in the different tomato products. Raw chicken breast meat was found to have  $3.97 \pm 0.51$  mg/100 g meat and  $0.35 \pm 0.02$  mg/100 g meat of  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherol, respectively. Slightly higher initial contents of the tocopherols were found for the products with addition of the different tomato products after pressure treatment, most likely due to tocopherols present in the tomato products. According to Capanoglu *et al.* [17], tomato products contain between 24-39 mg/100 g of dry weight. A small decrease in the content of  $\alpha$ -tocopherol occurred in the meat without and with the different tomato samples during the storage time, while no significant changes in the  $\gamma$ -tocopherol contents were observed (results not shown). Apparently, no natural protection of  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherol present in chicken meat by tomato antioxidants was observed. Similar results were found when rosemary was added in high pressure chicken meat [4].

From the viewpoint of the consumer, the physical appearance of processed meat products is of importance, especially for meat added colored spices or vegetables used as natural antioxidants. High-pressure treatment of chicken meat was found to result in an altered

appearance and all of the pressurized samples had higher  $L^*$  values indicating a more white color, an appearance similar to heat-treated chicken meat. In accordance, the pressurized meat products was found to have lower  $a^*$  values and  $b^*$  values and appeared less red. None of the color parameters were affected by the applied pressure or storage time, irrespective of addition of tomato products (data not shown). It should, however, be noted that the tomato products were added in very small amounts in order not to contribute to the color of the meat. Similar meat discoloration resulting from a whitening effect and a loss of red color due to high pressure processing has previously been observed for chicken [5], beef [18], and pork [19], but the mechanism of pressure-induced color changes does not seem to have been established yet.

Two findings are of importance for strategies for production of high-pressure processed meat using tomato fractions for antioxidant protection. The most efficient protection is obtained by the waste fraction which seems to contain more efficient phenolic compounds. Moreover, the antioxidative effect is concluded not to be on the initial pressure-induced radical formation as lycopene would be an efficient radical scavenger, but rather on the subsequent reactions leading to secondary lipid oxidation products for which the chain-breaking antioxidants like plant phenols become important.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors thank the Brazilian agencies CAPES and FAPESP for the financial support and Predilecta Alimentos Ltda for the tomato samples.



## REFERENCES

1. Orlien V, Hansen E, Skibsted LH (2000) *Eur Food Res Technol* 211:99-104
2. Beltran E, Pla R, Yuste J, Mor-Mur M (2004) *Meat Sci* 66:719-725
3. Wiggers SB, Kröger-Ohlsen MV, Skibsted LH (2004) *Eur Food Res Technol* 219:167-170
4. Bragagnolo N, Danielsen B, Skibsted LH (2005) *Eur Food Res Technol* 221:610-615
5. Mariutti LRB, Orlien V, Bragagnolo N, Skibsted LH (2008) *Eur Food Res Technol* 227:337-344
6. Singleton VL, Rossi JA Jr. (1965) *Am J Enol Vitic* 16:144-158
7. Kim DO, Jeong SW, Lee CY (2003) *Food Chem* 81:321-326
8. Carvalho PRN, Collins CA, Rodriguez-Amaya DB (1992) *Chromatographia* 33:133-137
9. Nissen LR, Månsson L, Bertelsen G, Huynh-ba T, Skibsted LH (2000) *J Agric Food Chem* 48:5548-5556
10. Sørensen G, Jørgensen SS (1996) *Z Lebensm Unter Forsch* 202:205–210
11. Jensen C, Guidera J, Skovgaard IM, Staun H, Skibsted LH, Jensen SK, Møller AJ, Buckley J, Bertelsen G (1997) *Meat Sci* 45:491–500
12. Bragagnolo N, Danielsen B, Skibsted LH (2007) *Innovative Food Sci Emerging Technol* 8:24-29

13. Mortensen A, Skibsted LH (1997) Free Rad Res 27:229-234
14. Beltran E, Pla R, Yuste J, Mor-Mur M (2003) Meat Sci 64:19-25
15. Dissing J, Bruun-Jensen L, Skibsted LH (1997) Z Lebensm Unters Forsch A 205:11-13
16. Cheah PB, Ledward Da (1996) Meat Sci 43:123-134
17. Angsupanich K, Ledward Da (1998) Food chem 63:39-50
18. Capanoglu, E, Beekwilder, J., Boyacioglu, D., Hall, R., De Vos, R. (2008) J Agric Food Chem 56:964-973
19. Carlez A, Veciana-Nogues MT, Cheftel JC (1995) Lebens-Wiss u Technol 28:528-538
20. Shigehisa T, Ohmori T, Saito A, Taji S, Hayashi R (1991) Int J Food Microbio 12:207-216

## CONCLUSÃO GERAL

O processamento e a estocagem de polpa de tomate concentrada podem degradar substâncias mais sensíveis como o ácido ascórbico, porém os demais compostos antioxidantes não sofrem alterações significativas, e, para alguns deles, o efeito do processamento é benéfico, elevando seus teores. De forma semelhante, a atividade antioxidante desses produtos pode aumentar durante o processamento e se manter inalterada durante o armazenamento por um ano. Para uma melhor compreensão dos mecanismos de ação antioxidante, estudos complementares são necessários para se verificar a relação sinérgica entre os diferentes antioxidantes presentes no tomate.

O subproduto do processamento (pele + semente), embora tenha quantidades reduzidas de ácido ascórbico, licopeno e  $\beta$ -caroteno, possui quantidades de flavonóides equivalentes às encontradas no produto *in natura*, o que faz com que a atividade antioxidante dessa fração nos dois produtos também seja semelhante. Estudos de estocagem realizados em carne de frango processada sob alta pressão indicam que esse subproduto pode atuar como antioxidante na prevenção da oxidação lipídica e pode ser de grande interesse como uma fonte alternativa de antioxidantes naturais para a indústria alimentícia. Para tanto, é necessário que mais estudos sejam realizados a fim de se verificar a segurança do uso desse subproduto como fonte de antioxidantes naturais, particularmente no que se refere às questões microbiológicas e toxicológicas.