

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

**IDENTIFICAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ANTIOXIDANTE
DE FLAVONÓIDES E VITAMINA C PRESENTES EM GELÉIAS DE FRUTAS**

Raquel Grando de Oliveira
Engenheira de Alimentos

Prof. Doutor Marcelo Alexandre Prado
Orientador

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos para a obtenção de título de
Doutor em Ciência de Alimentos.

Campinas – SP, 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

OL4ic Oliveira, Raquel Grando de
Identificação, quantificação, e caracterização antioxidante de
flavonóides e vitamina C em geléias de frutas / Raquel Grando de
Oliveira -- Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientador: Marcelo Alexandre Prado
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Engenharia de Alimentos

1. Flavonóides. 2. Vitamina C. 3. Antioxidantes. 4. Geléias. I.
Prado, Marcelo Alexandre. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Título em inglês: Identification, quantification and antioxidant characterization of flavonoids and
vitamin C in fruit jellies.

Palavras-chave em inglês (Keywords): Flavonoids, Vitamin C, Antioxidants, Jellies

Titulação: Doutor em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Marcelo Alexandre Prado

Cláudia Hoffmann Kowalski Schroder

Helena Teixeira Godoy

Severino Matias de Alentar

Shirley de Mello Pereira Abrantes

Juliana Azevedo Lima Pallone

Myrna Sabino

Carla Beatriz Grespan Bottoli

Data de defesa: 26/02/2010

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Dr. Marcelo Alexandre Prado
FEA – UNICAMP
Presidente

Carla Beatriz Grespan Bottoli
IQM - UNICAMP
Membro

Cláudia Hoffmann Kowalski Schroder
Laboratório Nacional Agropecuário - SP
Membro

Dra. Helena Teixeira Godoy
FEA – UNICAMP
Membro

Juliana Azevedo Lima-Pallone
FEA – UNICAMP
Membro

Myrna Sabino
Instituto Adolfo Lutz.
Membro

Severino Matias de Alencar
ESALQ-USP
Membro

Shirley de Mello Pereira Abrantes
FIOCRUZ
Membro

Valeu a pena? Tudo vale a pena
Se a alma não é pequena.
Quem quer passar além do Bojador
Tem que passar além da dor.
Deus ao mar o perigo e o abismo deu,
Mas nele é que espelhou o céu.

Fernando Pessoa

Dedico e agradeço

Ao meu marido e à minha mãe,

Raul e Cármem.

*As melhores e mais belas coisas do mundo não podem ser vistas nem
tocadas... mas o coração as sente.*

Helen Keller

Agradecimentos

Meu agradecimento maior a *Deus*, que me guiou, me fortaleceu e me deu todos os meios para chegar até aqui.

Ao meu marido *Raul*, agradeço por ser meu porto seguro e por ser meu companheiro. Obrigada pelo total apoio, pelos conselhos, pela compreensão, pelo carinho e pelo amor!

À minha mãe *Cármem* e às minhas irmãs *Priscila e Sara*, agradeço a amizade, o amor, as alegrias, a paciência e os auxílios nas minhas decisões.

Aos meus avôs, *Antônio e Margarida*, obrigado pelo exemplo de vida, pela dedicação e pela crença no meu potencial.

À *Minha família*, como um todo, seja de sangue ou de coração, agradeço pela presença e apoio.

Agradeço à *Faculdade de Engenharia de Alimentos*, em especial ao *Departamento de Ciência de Alimentos*, que me auxiliou na formação profissional na graduação e pós-graduação, possibilitando que este trabalho fosse desenvolvido.

À *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Capes*, obrigado pelo financiamento dos estudos no Brasil e em Portugal.

Aos membros da *Banca Examinadora*, obrigado pelas sugestões e contribuições apresentadas.

Ao Prof. Marcelo, agradeço pela orientação, pelo estímulo, pelos desafios assumidos e encarados e também pela amizade durante todo o projeto, dentro e fora da faculdade.

À Prof.^a Maria do Rosário, obrigado pela orientação e acolhimento no Doutorado sanduíche em Portugal.

Aos amigos e colaboradores de trabalho Cristina, Gislaine e Dirceu, agradeço por todo auxílio, companheirismo e longos papos.

Às minhas grandes amigas Ana Cecília, Jacqueline, Luana e Solange, muitíssimo obrigado pelo ombro na hora em que precisei, pela confiança e confidência, pelas alegrias e, principalmente, muita diversão!

Agradeço aos meus amigos de todos os lados, do Brasil e de Portugal, sem os quais minha caminhada seria bem mais difícil.

Em fim, meu profundo agradecimento a todos que conviveram comigo no dia a dia de trabalho e também fora dele, agradeço aos que participaram de minha formação acadêmica, mas principalmente, aos que participaram, e sempre participarão, da minha formação como pessoa, seja junto a um copo de cerveja, de suco ou a um erlenmeyer com solvente orgânico.

Resumo Geral

O presente estudo buscou aperfeiçoar e validar metodologias de análise de ácido ascórbico e flavonóides em geléias de frutas. A identificação e a quantificação do ácido ascórbico se deram por três formas: (1) método colorimétrico, utilizando o reagente 2,6-diclorofenol-indofenol, (2) Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, (3) Eletroforese Capilar. O primeiro e o segundo método foram aplicados em 10 geléias naturais. Em vista dos resultados obtidos, o fabricante modificou a formulação das geléias para aumentar a quantidade de ácido ascórbico. Posteriormente, seis novas geléias foram analisadas pelo segundo e terceiro método. Os resultados foram comparados entre si e a Eletroforese Capilar foi considerada mais adequada. O ácido ascórbico presente nas geléias variou de “não detectado” a 608 mg em 100 g de amostra. A identificação e a quantificação de flavonóides se deram por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e também pela Eletroforese Capilar. Os flavonóides quantificados foram: (+)-catequina, (-)-epicatequina, rutina, narirutina, kaempferol, miricetina e quercetina. Os métodos mostraram boa aptidão para a análise em questão. A verificação da composição dos flavonóides nas amostras exige uma etapa extrativa complexa, com isso, o estudo englobou o aperfeiçoamento dessa extração visando resultados mais precisos. Os flavonóides foram encontrados em concentrações de até 23,3 mg por kg de geléia, sendo que a amostra acerola e maracujá foi a que apresentou menor quantidade total e a contendo acerola e rosela foi a de maior valor. Quanto à capacidade antioxidante, os testes foram realizados utilizando o radical livre difenilpicrazil-hidrazina (DPPH[•]). Entre os compostos analisados, a quercetina foi aquela que apresentou maior capacidade antioxidante isolada. Foram realizadas combinações em pares dos antioxidantes estudados e apenas a composição de (+)-catequina com ácido ascórbico apresentou sinergismo. Reações antagônicas foram verificadas para as combinações, entre elas: (+)-catequina e (-)-epicatequina, (+)-catequina e rutina, (-)-epicatequina e rutina, (-)-epicatequina e ácido ascórbico. Das amostras analisadas, aquela que apresentou maior capacidade antioxidante foi a geléia de acerola com abacaxi.

Palavras-chave: Flavonóides, Ácido Ascórbico, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, Eletroforese Capilar, Geléia de frutas, Antioxidantes.

Abstract

The aims of this study were improving and validate methods to analyze ascorbic acid and flavonoids in fruit jellies. The identification and quantification of ascorbic acid occurred in three ways: (1) a colorimetric method, using the 2,6-dichlorophenol-indophenol, (2) a method using the High Performance Liquid Chromatography and, (3) a method by Capillary Electrophoresis. The first and the second methods were applied in 10 natural jellies. In view of the results, the manufacturer modified the formulation of the jellies to increase de amount of the acid ascorbic. Later, six new jellies were analyzed by the second and the third methods. The results were compared with each other and the Capillary Electrophoresis was considered most appropriate. The ascorbic acid in the jellies varied between “not detected” and 608 mg per gram of sample, considering all samples. The identification and quantification of flavonoids occurred by High Performance Liquid Chromatography and Capillary Electrophoresis. The flavonoids quantified were: (+)-catechin, (-)-epicatechin, rutin, narirutin, kaempferol, myricetin and quercetin. Both methods showed good performance for this analysis. The composition verification of flavonoids in the samples requires a complex extraction step, and then, this study included the improvement of this extraction for more accurate results. The antioxidant capacity was analyzed employing the free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH[•]). Between the analyzed compounds, the quercetin was the one that showed the highest antioxidant capacity. Combinations were performed in pairs of antioxidant studied and only the composition of (+)-catechin with ascorbic acid showed synergism. Antagonistic reactions were verified to these combinations: (+)-catechin and (-)-epicatechin, (+)-catechin and myricetin, (+)-catechin and rutin, (-)-epicatechin and rutin, (-)-epicatechin and ascorbic acid, kaempferol and rutin, myricetin and rutin, myricetin and ascorbic acid. Between the samples, the acerola with pineapple was the one that showed the greatest antioxidant capacity.

Keywords: flavonoids, ascorbic acid, high performance liquid chromatography, capillary electrophoresis, antioxidant capacity, fruit jellies.

Sumário

CAPÍTULO I. ANTIOXIDANTES: CARACTERÍSTICAS FUNCIONAIS E METODOLOGIAS DE QUANTIFICAÇÃO.7

<i>RESUMO</i>	7
<i>ABSTRACT</i>	8
1. Radicais livres e defesas antioxidantes	9
2. Compostos Fenólicos	11
2.1. Flavonóides	12
2.2. Vitamina C, um ácido fenólico.	15
3. Interações entre antioxidantes	18
4. Métodos de análise	18
4.1. Identificação e quantificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	19
4.2. Identificação e quantificação por Eletroforese Capilar	21
4.3. Quantificação de Ácido ascórbico por DCFI	24
4.4. Avaliação do potencial antioxidante	25
5. Geléia de Fruta, um alimento a ser explorado	26
6. Referências	28

CAPÍTULO II. OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA COLORIMÉTRICA PARA A DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO PRESENTE EM GELÉIAS DE FRUTAS.35

<i>RESUMO</i>	35
<i>ABSTRACT</i>	36
1. Introdução	37
2. Experimento	39
2.1. Reagentes	39
2.2. Extração das amostras	39
2.3. Quantificação por titulação direta (método I)	40
2.4. Quantificação por titulação inversa (método II)	40

2.5. Equipamento e condições Cromatográficas (método III)	41
2.6. Validação da metodologia desenvolvida	41
3. Resultados e discussão	42
4. Conclusão	50
5. Referências.....	51

CAPÍTULO III. IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO L-ASCÓRBICO E ÁCIDO D-ISOASCÓRBICO EM GELÉIAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA..... 53

<i>RESUMO:</i>	53
<i>ABSTRACT:</i>	54
1. Introdução:	55
2. Experimento	58
2.1. Reagentes	58
2.2. Extração da amostra.....	58
2.3. Equipamento e condições Cromatográficas.	58
2.4. Metodologia de validação.....	59
2.5. Recuperação	59
3. Resultados e discussão.	60
4. Conclusão	66
5. Referências.....	67

CAPÍTULO IV. QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO L – ASCÓRBICO EM GELÉIAS DE FRUTAS POR ELETROFORESE CAPILAR E COMPARAÇÃO COM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA..... 71

<i>RESUMO</i>	71
<i>ABSTRACT</i>	72
1. Introdução	73
2. Experimento	76
2.1. Reagentes	76
2.2. Extração das amostras.....	76

2.3. Equipamentos e condições Eletroforéticas.	76
2.4. Equipamentos e condições Cromatográficas.....	77
2.5. Validação da metodologia Eletroforética.....	77
2.6. Recuperação	78
3. Resultados e discussão	78
4. Conclusão	85
5. Referências.....	86

CAPÍTULO V. OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA PARA A EXTRAÇÃO DE FLAVONÓIDES EM GELÉIAS DE FRUTAS..... 89

<i>RESUMO</i>	89
<i>ABSTRACT:</i>	90
1. Introdução:	91
2. Experimento	94
2.1. Reagentes	94
2.2. Extração da amostra.....	94
2.3. Equipamentos e condições Cromatográficas.....	95
2.4. Recuperação	95
3. Resultados e discussão	96
4. Conclusão	103
5. Referências.....	104

CAPÍTULO VI. QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE SEIS FLAVONÓIDES PRESENTES EM GELÉIAS DE FRUTAS POR CROMATOGRAPHIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA..... 107

<i>RESUMO</i>	107
<i>ABSTRACT</i>	108
1. Introdução:	109
2. Experimento	112
2.1. Reagentes	112
2.2. Extração da amostra.....	113

2.3. Equipamentos e condições Cromatográficas.....	113
2.4. Metodologia de validação.....	114
3. Resultados e discussão	114
4. Conclusão	120
5. Referências.....	121

CAPÍTULO VII. OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA PARA A SEPARAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM ALIMENTOS E BEBIDAS POR ELETROFORESE CAPILAR..... 123

<i>RESUMO</i>	123
<i>ABSTRACT</i>	124
1. Introdução	125
2. Experimento	127
2.1. Reagentes	127
2.2. Extração das amostras.....	127
2.3. Equipamento e condições Eletroforéticas.....	128
2.4. Metodologia de Validação	129
3. Resultados e discussão	129
4. Conclusões	140
5. Referências.....	141

CAPÍTULO VIII. QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONÓIDES EM GELÉIAS DE FRUTAS, UMA COMPARAÇÃO ENTRE ELETROFORESE CAPILAR E CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA..... 144

<i>RESUMO</i>	144
<i>ABSTRACT</i>	145
1. Introdução	146
2. Experimento	148
2.1. Reagentes	148
2.2. Extração das amostras.....	149
2.3. Equipamento e condições Eletroforéticas.....	149

2.4. Equipamento e condições Cromatográficas.	150
2.5. Metodologia de Validação	150
3. Resultados e discussão	151
4. Conclusões	157
5. Referências.....	158

CAPÍTULO IX. INTERAÇÃO ANTIOXIDANTE ENTRE COMPOSTOS FENÓLICOS BASEADO NO SEQÜESTRO DE RADICAIS LIVRES. 162

<i>RESUMO</i>	162
<i>ABSTRACT</i>	163
1. Introdução	164
2. Experimento	166
2.1. Reagentes	166
2.2. Avaliação do seqüestro de radicais livres.	166
2.3. Avaliação das interações entre os antioxidantes perante o seqüestro de radicais livres.....	167
3. Resultados e discussão	168
4. Conclusões	172
5. Referências.....	173

CAPÍTULO X. CAPACIDADE SEQÜESTRANTE DE RADICAIS LIVRES DE SEIS GELÉIAS DE FRUTAS..... 174

<i>RESUMO</i>	174
<i>ABSTRACT</i>	175
1. Introdução	176
2. Experimento	177
2.1. Reagentes	177
2.2. Extração das amostras.....	177
2.3. Avaliação do seqüestro de radicais livres.	178
2.4. Quantificação de fenólicos totais	179

3. Resultados e discussão	179
4. Conclusão.....	183
5. Referências.....	184
CONCLUSÃO GERAL.....	186
ANEXO.....	190

Lista de figuras

Figura I-1. Estrutura geral dos flavonóides.	13
Figura I-2. Estrutura do ácido ascórbico e seus isômeros (Boyce, 1999).	17
Figura I-3. Mecanismo de oxidação do ácido ascórbico	17
Figura I-4. Mecanismo de ação do DPPH [•]	25
Figura I-5 Fluxograma do processamento de geléias. Fonte: Lopes, 2007.	27
Figura II-1. Curva de linearidade obtida a partir da variação na quantidade de ácido ascórbico titulada com DCFI.....	45
Figura II-2. Variação do volume de amostra titulado pelo método II versus concentração presente de AA na mesma amostra.....	46
Figura III-1. Estruturas isoméricas do ácido ascórbico	55
Figura III-2. Perfil cromatográfico obtido através da análise de LAA e DIAA. As condições de análise estão descritas no item 2.3 do presente capítulo.	63
Figura IV-1. Eletroferograma da amostra J6 adicionada de padrão interno. Estão identificados os sinais do LAA (1) e do DIAA (2). Condições: o tampão empregado foi 200 mmol L ⁻¹ de tampão borato a pH 9,0; a detecção foi feita a 265 nm, a temperatura do capilar foi mantida a 25°C, e voltagem foi selecionada a 15 kV.....	80
Figura V-1. Comparação entre os solventes usados na extração de flavonóides presentes na geléia de morango e acerola. Metanol 50%, acetona 25% e etanol 80% foram testados.	98
Figura V-2. Comparação entre os tempos de homogeneização aplicados à geléia de morango e acerola. Metanol 50% foi utilizado como solvente. (a) (+)-catequina, (b) (-)-epicatequina, (c) quercetina e (d) rutina foram os flavonóides encontrados na amostra.....	99
Figura V-3. Perfil cromatográfico obtido na extração da geléia de morango com acerola sem o uso da SPE. Condições cromatográficas descritas no item 2.3 do presente capítulo.	100

Figura V-4. Comparação dos perfis cromatográficos do extrato metanólico (A) e do extrato aquoso (B) obtidos através da SPE. Condições cromatográficas descritas no item 2.3 do presente capítulo.	101
Figura VI-1. Estrutura básica dos flavonóides.	109
Figura VI-2. Perfil cromatográfico obtido da mistura dos padrões (+)-catequina (1), (-)-epicatequina (2), rutina (3), narirutina (4), miricetina (5), quercetina (6) e kaempferol (7). As condições de análise estão descritas no item 2.3. Comprimento de onda apresentado é 260 nm.	115
Figura VI-3. Perfil cromatográfico obtido na análise do extrato de geléia de acerola com morango. As condições de análise estão descritas no item 2.3. Comprimento de onda apresentado é 260 nm.	116
Figura VII-1. Separação de 16 compostos fenólicos em diferentes concentrações de ácido bórico, em pH 9,0, capilar de 50 μm x 68 cm, 25°C, 30 kV e detecção a 217 nm. Foram analisados seguintes fenólicos: narirutina (1), <i>trans</i> -resveratrol (2), (-)-epicatequina (3), (+)-catequina (4), rutina (5), ácido cinâmico (6), ácido ferrúlico (7), kaempferol (8), ácido <i>p</i> -coumárico (9), ácido vanílico (10), miricetina (11), quercetina (12), morina (13), ácido caféico (14), ácido gálico (15) e ácido 3,4-dihidroxibenzoico (16). Todos os compostos estavam em concentração de 20 mg L ⁻¹	131
Figura VII-2. Comportamento dos fenólicos em estudo de acordo com a variação de pH entre 8,0 e 9,2. Foram analisados seguintes fenólicos: narirutina (1), <i>trans</i> -resveratrol (2), (-)-epicatequina (3), (+)-catequina (4), rutina (5), ácido cinâmico (6), ácido ferrúlico (7), kaempferol (8), ácido <i>p</i> -coumárico (9), ácido vanílico (10), miricetina (11), quercetina (12), morina (13), ácido caféico (14), ácido gálico (15) e ácido 3,4-dihidroxibenzoico (16).	132
Figura VII-3. Ensaios de injeção realizados: (A) solução com 20 mg L ⁻¹ de cada fenólico, injetada a 50 mbar por 5 s; (B) solução com 20 mg L ⁻¹ de cada fenólico, injetada a 50 mbar por 30 s; (C) solução com 20 mg L ⁻¹ de cada fenólico, injetada a 50 mbar por 30 s seguida de voltagem inversa a -20 kV por 5 s; (D) solução com 1 mg L ⁻¹ de cada fenólico, injetada a 50 mbar por 30 s seguida de voltagem inversa a -20 kV	

por 5 s. Condições de análise: tampão borato a 175 mmol L^{-1} , pH 9,0, 30kV, 25°C, capilar de $50 \mu\text{m} \times 68 \text{ cm}$, detecção a 217 nm.....	134
Figura VII-4. Eletroferograma da análise de amostra de geléia de acerola com morango. Condições de análise idênticas à Figura VII-3 “C”.....	139
Figura VII-5. Eletroferograma da análise de amostras de vinho tinto, rosè e branco. Condições de análise idênticas à Figura VII-3 “C”.....	139
Figura IX-1. Mecanismo de ação do DPPH•.....	165
Figura IX-2. Modelo analítico ajustado à porcentagem de inibição do DPPH frente à variação de concentração de quercetina.....	168
Figura X-1. Comparação entre a quantidade de fenólicos totais e a capacidade de sequestrar radicais livres.	182

Lista de tabelas

Tabela I-1. Classificação dos flavonóides segundo a estrutura molecular.....	14
Tabela I-2. Presença de ácido ascórbico em alimentos.	15
Tabela II-1: Concentrações e desvios padrões relativos (DPR) de AA, segundo as metodologias empregadas, presentes em 100 g de amostras. Índices $A^{a, b, c}$ relativos ao teste estatístico “t de student”.	47
Tabela III-1. Métodos de separação de LAA e DIAA por CLAE. Uma revisão.....	61
Tabela III-2. Concentração de ácido ascórbico encontrada nas amostras de geléia analisadas	64
Tabela IV-1. Metodologias de análise de ácido ascórbico por EC: uma revisão.	75
Tabela IV-2. Acido ascórbico presente nas amostras, quantificações realizadas por EC e CLAE e comparadas entre linhas pelo teste estatístico t de Student.	82
Tabela IV-3. Parâmetros de validação obtidos para as metodologias eletroforética e cromatográfica	82
Tabela IV-4. Presença de ácido ascórbico em alimentos.	84

Tabela IV-5. Porcentagem da IDR de Vitamina C apresentada pelas geléias analisadas. ...	84
Tabela V-1. Metodologias de extração de flavonóides, uma revisão.....	92
Tabela V-2. Taxa de recuperação dos flavonóides no método de extração V.....	102
Tabela VI-1. Classificação dos flavonóides segundo a estrutura molecular	110
Tabela VI-2. Flavonóides encontrados em acerola e morango de acordo com a literatura	112
Tabela VI-3. Parâmetros dos modelos ajustados às curvas analíticas ($y = A + Bx$), coeficientes de correlação e limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para cada flavonóide.	117
Tabela VI-4. Repetibilidade do método para os flavonóides em solução.	117
Tabela VI-5. Repetibilidade do método e desvio padrão relativo (DPR) para os flavonóides presentes na amostra de geléia de morango com acerola	118
Tabela VI-6. Ensaio de recuperação dos flavonóides.....	119
Tabela VII-1. Média e desvio padrão relativo (DPR) para os fenólicos em metanol:água (30:50).....	136
Tabela VII-2. Parâmetros dos modelos ajustados às curvas analíticas ($y = A + Bx$), coeficientes de correlação e limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para cada fenólico.	137
Tabela VII-3. Recuperação dos fenólicos em geléia de fruta.....	138
Tabela VIII-1. Flavonóides presentes em frutas, uma revisão.	151
Tabela VIII-2. Comparação entre a repetibilidade dos tempos da CLAE e da EC na análise de seis flavonóides, estão descritos as médias e os desvios padrões relativos (DPR)	153
Tabela VIII-3. Comparação entre os desvios padrões relativos (DPR) do sinal do detector da CLAE e da EC.	153
Tabela VIII-4. Comparação entre os limites de detecção e quantificação da CLAE e da EC.	154
Tabela VIII-5. Comparação entre a recuperação dos flavonóides entre CLAE e EC	154

Tabela VIII-6. Comparação entre a sensibilidade da CLAE e da EC na presente análise de flavonóides.....	155
Tabela VIII-7. Quantidades de flavonóides e respectivos desvios padrões encontrados nas amostras J1, J2 e J3 analisadas por CLAE e EC. Valores expressos em mg por kg de amostra.....	156
Tabela VIII-8. Quantidades de flavonóides e respectivos desvios padrões encontrados nas amostras J4, J5 e J6 analisadas por CLAE e EC. Valores expressos em mg por kg de amostra.....	156
Tabela IX-1. Modelos ajustados à variação de concentração dos compostos frente a inibição do DPPH. Estão discriminados os coeficientes angulares (a), os coeficientes lineares (b), os coeficientes de correlação (r^2) e os índices IC50, IC20 e AAI.....	169
Tabela IX-2. Comparação entre o I% observado (OI%) e o I% esperado (EI%) na combinação dois a dois dos compostos (+)-catequina (CAT.), (-)-epicatequina (EPI.), kaempferol (KAE.), miricetina (MIR.), quercetina (QUE.), rutina (RUT.) e a Vitamina C (VITC.).....	170
Tabela X-1. Valores do IC50 (mg L^{-1}), desvio padrão relativo (DPR) (%) e AAI obtidos para as amostras.....	180
Tabela X-2. Quantidade de fenólicos totais (EAG mg g^{-1}) e desvio padrão relativo (DPR) (%) encontrados nas geléias.....	181

INTRODUÇÃO GERAL

O nome “alimentos funcionais” foi usado primeiramente no Japão na década de 80 e foi aplicado a alimentos processados que continham ingredientes capazes de conferir benefícios a algumas funções biológicas. Atualmente este termo é empregado para produtos que conferem benefícios para uma ou mais funções fisiológicas, aumentam o bem-estar, e/ou diminuem o risco de sofrer determinada doença. Entre os alimentos funcionais, a preferência do consumidor está naqueles de origem natural (não sintético) (Herrero, Ibanez e Cifuentes, 2005).

A família dos antioxidantes apresenta características que merecem grande destaque. Esses compostos têm sido relacionados à prevenção de diversas doenças, tais como câncer, doenças coronárias, desordens inflamatórias, degeneração neurológica e envelhecimento. Como exemplos de antioxidantes naturais, podem ser citados, com relevância, os flavonóides e o ácido ascórbico, presentes abundantemente em frutas e vegetais (Herrero, Ibanez e Cifuentes, 2005).

Os Flavonóides, além da capacidade antioxidante, podem agir em atividades bioquímicas, fisiológicas e farmacêuticas, incluindo, as ações vasodilatadoras, antiinflamatórias, antibactericidas, imuno-estimulantes, e efeitos antialérgicos e antivirais (Baby et al., 2007; Hassimotto, Genovese e Lajolo, 2005). Ácido ascórbico, ou Vitamina C, atua prevenindo doenças cardiovasculares, algumas complicações pré-natais, tumores malignos, inflamações, catarata, Mal de Parkinson e Alzheimer, e a aceleração do processo de envelhecimento celular (Sikora, Cieslik e Leszczynska, 2008). Atua ainda junto à formação de tecido conjuntivo e transporte de íons (Barata-Soares et al., 2004).

Em produtos industrializados, o uso destes antioxidantes também é visto como um predicado importante, uma vez que são capazes de preservar os alimentos da degradação oxidativa (Herrero, Ibanez e Cifuentes, 2005). Dano que pode causar perda nutricional, alterações na cor dos alimentos, como escurecimento de pedaços de carne vermelha e descoloração de frutas e vegetais, e também alterações no odor e no sabor, como a rancidez em produtos a base de gordura (Katalinic et al, 2004).

Por meio de uma pesquisa bibliográfica sobre a presença dos antioxidantes em alimentos funcionais, foi possível verificar que a maioria dos trabalhos encontrados estuda

antioxidantes presentes em frutas, sucos, polpas congeladas e extratos. Pouco pode ser encontrado sobre a análise de produtos com certo grau de processamento, como, por exemplo, geléias de frutas. Na produção destas geléias ocorre a maceração e a cocção da matéria prima e estas etapas resultam em perdas nutricionais (Silva, Lopes e Valente-Mesquita, 2006), mas não se sabe o quanto isso pode influenciar no resultado final.

Neste sentido desenvolver e validar métodos como, por exemplo, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e a Eletroforese Capilar (EC), que não apenas identifiquem, mas também quantifiquem fenólicos em geléias é muito importante,

Comparando-se essas duas metodologias de um modo geral, é possível apontar vantagens e desvantagens de cada uma. A CLAE é uma técnica mais antiga e muito utilizada na separação de compostos fenólicos, por exemplo, e está disponível na maioria dos laboratórios analíticos. Apresenta limites de detecção e quantificação mais baixos que a EC, possibilitando a análise de menores concentrações (Herrero, Ibanez e Cifuentes, 2005). Já a EC, uma técnica relativamente nova e vem ganhando muito espaço na comunidade científica devido sua versatilidade, baixo consumo de reagentes, baixa geração de resíduos e rapidez de análise (Silva et al., 2007; Cancalon, 2003; Kim et al., 2002; Riaz e Chung, 2006).

Para um estudo preciso, é necessário que, além de um sistema separativo eficiente, se tenha um adequado sistema extrativo, com seletividade, baixa manipulação de amostra, baixa quantidade de compostos indesejáveis e alta concentração do analito de interesse. Esta etapa é de grande importância para fenólicos, principalmente quando são empregadas amostras alimentícias onde existem componentes bioativos e inúmeros outros compostos, muitos ainda não identificados. Com todos esses problemas, aliados à alta instabilidade dos fenólicos frente à luz, calor e oxigênio, baixas taxas de recuperação podem ser encontradas quando produtos de origem natural são os alvos do estudo. Extremos cuidados devem então ser tomados para garantir a correta extração, desprovida de modificação química, como oxidação e isomerização, durante o processo extrativo (Antolovich et al., 2000).

Ainda em relação à extração dos compostos, dependendo do fenólico alvo, diferentes métodos podem ser necessários. No caso do ácido ascórbico, uma rápida homogeneização é suficiente para uma eficiente extração e mínima degradação (Aldrigue, 1998). No caso dos flavonóides, um tempo maior de extração é necessário, uma vez que os

compostos estão mais ligados à matriz. Cordenunsi e colaboradores (2002) usaram uma homogeneização de duas horas para retirar os flavonóides presentes em morango, já Kosar e colaboradores (2004) usaram apenas uma hora nesta etapa do processo para a mesma fruta.

É importante ressaltar que apenas a detecção e a quantificação destes compostos não são suficientes para mensurar o quanto um alimento ou composto é benéfico para a saúde. A capacidade antioxidante das substâncias difere entre si de acordo com a estrutura química, a presença de grupos hidroxilas e de anéis aromáticos hidroxilados. Estas estruturas são as responsáveis por neutralizar a ação dos radicais livres, gerando radicais fenólicos com ressonância estável (Boyce, 1999). Para se verificar o quão antioxidante é cada um dos compostos encontrados nos alimentos, algumas técnicas já foram desenvolvidas e, entre elas, destaca-se a análise utilizando o radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazina (DPPH[•]) (Jiménez-Escrig et al., 2000). Ainda cabe ressaltar que a análise de compostos isolados também não é suficiente na verificação do potencial antioxidante de um alimento, uma vez que tais compostos nunca estão sozinhos e podem ter reações sinérgicas ou antagônicas entre si. Assim, a verificação destas interações também é importante perante as análises, e ainda, a verificação da capacidade antioxidante do alimento como um todo também é relevante (Iacopini et al., 2008).

Referências

- ALDRIGUE, M.L. (1998) *Desenvolvimento e validação de metodologia analítica, utilizando a CLAE, para determinação de Vitamina C em frutas e seus principais produtos*. Tese (Doutor em Ciência de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, BR.
- ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.; ROBARDS, K. & RYAN, D. (2000). Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *Analyst*, 125, 989-1009.
- BABY, A.R.; MIGLIATO, K.F.; MACIEL, C.P.M.; ZAGUE, V.; PINTO, C.A.S.O.; SALGADO, H.R.N.; KANEKO, T.M. & VELASCO, M.V.R. (2007). Accelerated chemical stability data of O/W fluid emulsion contain the extract of *Trichilia catigua* Adr. Juss (e) *Ptychopetalum olacoides* Benth. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 43, 405-412.
- BAKER, R.A.; BERRY, N.; HUI, Y.H. & BARRET, D.M. (2005). Fruit preserves and Jams. IN: *Processing Fruit: Science and Technology*, Second Edition, Cap 6.
- BARATA-SOARES, A.D.; GOMEZ, M.L.P.A.; MESQUITA, C.H. & LAJOLO, F.M. (2004). Ascorbic acid biosynthesis: a precursor study on plants. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 16, 147-154.
- BOYCE, M.C. (1999). Simultaneous determination of antioxidants, preservatives and sweeteners permitted as additives in food by mixed micellar eletrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A*, 847, 369-375.
- CANCALON, P.F. (2003). Vitamin Analysis by Capillary Electrophoresis. *CE Currents*, march.
- CORDENUNSI, B. R.; NASCIMENTO, J. R. O.; GENOVESE, M. I. & LAJOLO, F. M. (2002) Influence of Cultivar on Quality Parameters and Chemical Composition of Strawberry Fruits Grown in Brazil. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 50, 2581-2586.
- HASSIMOTTO, N.M.A.; GENOVESE, M.I. & LAJOLO, F.M. (2005). Antioxidant Activity of Dietary Fruits, Vegetables, and Commercial Frozen Fruit Pulps. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2928-2935.
- HENRIQUE, C.M. & CEREDA, M.P. (1999). Utilização de biofilmes na conservação pós-colheita de morango (*Fragaria Ananassa* Duch) cv IAC Campinas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 19, 231-233.
- HERRERO, M.; IBANEZ, E. & CIFUENTES, A. (2005). Analysis of natural antioxidants by capillary electromigration methods. *Journal of Separation Science*, 28, 883-897.
- IACOPINI, P.; BALDI, M.; STORCHI, P. & SEBASTIANI, L. (2008). Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions. *Journal of Food Composition Analysis*, 21, 589-598.
- JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; JIMÉNEZ-JIMÉNEZ, I. ; SÁNCHEZ-MORENO, C. & SAURA-CALIXTO, F. (2000). Evaluation of free radical scavenging of dietary carotenoids by the stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1686-1890.

- KATALINIC, V.; MILOS, M.; MODUN, D. & BOBAN, M. (2004). Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+) – catechin. *Food Chemistry*, 86, 596-600.
- KIM, W.S.K.; DAHLGREN, R.L.; MOROZ, L.L. & SWEEDLER, J.V. (2002). Ascorbic Acid Assays of Individual Neurons and Neuronal Tissues Using Capillary Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence Detection. *Analytical Chemistry*, 74, 5614-5620.
- KOSAR, M.; KAFKAS, E.; PAYDAS, S. & BASER, K.H.C. (2004). Phenolic Composition of Strawberry Genotypes at Different Maturation Stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1586-1589.
- RIAZ, A. & CHUNG, D.S. (2006). Calibration of migration times of variable salinity samples with internal standards in capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 27, 553-562.
- SIKORA, E.; CIESLIK, E. & LESZCZYNSKA, T. (2008). The antioxidant activity of selected cruciferous vegetables subjected to aquathermal processing. *Food Chemistry*, 107, 55-59.
- SILVA, J.A.F.; COLTRO, W.K.T.; CARRILHO, E. & TAVARES, M.F.M. (2007). Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares. *Química Nova*, 30, 740-744.
- SILVA, P.T.; LOPES, M.L.M. & VALENTE-MESQUITA, V.L. (2006). Efeito de diferentes processamentos sobre o teor de ácido ascórbico em suco de laranja utilizado na elaboração de bolo, pudim e geléia. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26, 678-682.

CAPÍTULO I.

ANTIOXIDANTES: CARACTERÍSTICAS FUNCIONAIS E METODOLOGIAS DE QUANTIFICAÇÃO.

Resumo

A comunidade científica tem associado os radicais livres ao surgimento de algumas doenças degenerativas, como, por exemplo, câncer, doenças coronárias, distúrbios dermatológicos, envelhecimento, entre outras. Para inibir ou diminuir a formação de tais substâncias nocivas, existem os compostos chamados de “antioxidantes”. Mais de 8000 estruturas destes inibidores já são conhecidas, sendo que compostos fenólicos representam a maioria delas. Entre os fenólicos, destacam-se os flavonóides e a Vitamina C. Para quantificar este tipo de substâncias em alimentos, fármacos e cosméticos, diversos métodos já foram desenvolvidos, entre eles, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e a Eletroforese Capilar (EC). Comparando às duas técnicas, a CLAE é conhecida por apresentar menores limites de detecção e quantificação, enquanto que a EC realiza a separação em menor tempo. Os compostos antioxidantes apresentam potenciais diferentes de acordo com sua estrutura molecular. Entre as técnicas existentes para a avaliação de tal característica, destaca-se aquela realizada utilizando-se o radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazila. O presente trabalho realizou um estudo para verificar quais as condições de análise mais utilizadas na detecção e quantificação dos flavonóides e da Vitamina C e ainda como estes compostos atuam em relação à atividade antioxidante.

Palavras-chave: antioxidante; flavonóides; Vitamina C; Cromatografia Líquida de Alta Eficiência; Eletroforese Capilar.

ANTIOXIDANTS: FUNCTIONAL CHARACTERISTICS AND METHODS OF QUANTIFICATION.

Abstract

The scientific community has linked free radicals to the emergence of some degenerative diseases, such as cancer, coronary diseases, dermal disorders and aging, among others. To inhibit or decrease the formation of these substances, there are compounds called “antioxidants”. More than 8000 structures of these inhibitors are already known, and the most of them are phenolic compounds. Among the phenolics, there are the flavonoids and the Vitamin C. Several methods have been developed to quantify these substances in foods, pharmacos and cosmetics, between these methods, there are the High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and the Capillary Electrophoresis (CE). Comparing the two techniques, HPLC is known to have lower limits of detection and quantification, as the EC is one that performs the separation in less time. The antioxidant compounds have different potentials according to their molecular structure. Among the existing techniques to quantify this characteristic, the most commonly used is the reaction with the free radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. This paper realized a study to verify the conditions of analysis used in the detection and quantification of flavonoids and Vitamin C and also how these compounds work in relation to antioxidant activity.

Keywords: antioxidant; flavonoid; Vitamin C; High Performance Liquid Chromatography; Capillary Electrophoresis.

1. Radicais livres e defesas antioxidantes

Responsáveis por iniciar doenças degenerativas como câncer, doenças coronárias, desordens dermais e envelhecimento, os radicais livres têm ganhado grande importância na comunidade científica (Iacopini et al., 2008). Podem ser gerados, dependendo do seu sítio ativo de formação, no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana, e atacar proteínas, lipídeos, carboidratos, DNA entre outros. Sua origem *in vivo* ocorre via ação catalítica de enzimas durante os processos de transferência de elétrons no metabolismo celular e pela exposição a fatores exógenos (Boyce, 1999). Como exemplos destes tipos de substâncias têm-se: o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), o radical superóxido (O_2^-), o radical hidroxila ($\text{OH}^\bullet$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Jung et al, 2006).

Esses radicais podem ser moléculas orgânicas, inorgânicas e átomos com um ou mais elétrons não pareados de existência independente. Suas configurações fazem deles substâncias altamente instáveis, com meia-vida curta e quimicamente muito reativas, capazes de conferir os danos citados anteriormente às células e tecidos (Boyce, 1999). Para inibir ou diminuir a formação e a ação desses compostos de tal potencial danoso às células e tecidos, os organismos utilizam mecanismos de defesa antioxidantes enzimáticos e endógenos não enzimáticos (Mira et al., 2002). Antioxidante, num sentido lato, é “qualquer substância que, presente em baixas concentrações, quando comparada a do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz” (Kulkarni, Aradhya e Divakar, 2004).

O desequilíbrio entre moléculas oxidantes e as defesas antioxidantes tem sido denominado estresse oxidativo (Hassimotto, Genovese e Lajolo, 2005). Esse estresse pode causar perda nutricional e injúrias resultando em alterações nas cores dos alimentos, como, por exemplo, o escurecimento de pedaços de carne vermelha e a descoloração de frutas e vegetais. Além da cor, alterações no odor e no sabor também podem ser verificadas, como, por exemplo, a rancidez em produtos a base de gordura, proporcionando sensações desagradáveis, na maioria dos casos (Katalinic et al, 2004). Quando a quantidade de radicais livres continua aumentando, ou seja, as defesas antioxidantes naturais dos alimentos não são capazes de inibir por completo os danos causados por eles, o fornecimento de reforço antioxidante pode ser de grande valia (Mira et al., 2002).

Em indústrias de alimentos, sozinhos ou combinados com outros compostos, a adição de antioxidantes tem o propósito de aumentar a vida de prateleira dos produtos, retardando a oxidação lipídica e evitando degradações durante a estocagem e processamento (Boyce, 1999). Para serem utilizados em alimentos, é importante que os antioxidantes possuam uma atividade efetiva em baixa concentração, tenham compatibilidade com o substrato da oxidação, não influenciem sensorialmente no produto (cor, odor e gosto) e não ofereçam toxicidade para os consumidores (Hudson, 1990). A adição de compostos antioxidantes encontrados na dieta ou mesmo sintéticos é um dos mecanismos de defesa empregados também nas indústrias de cosméticos e de fármacos. É importante ressaltar que muitas vezes os próprios medicamentos aumentam a geração intracelular desses radicais (Boyce, 1999).

Além da utilização de antioxidantes, algumas medidas podem ser aplicadas para diminuir o estresse oxidativo em alimentos, como, por exemplo: (a) minimizar a ação de agentes exógenos, estocando o produto em ambiente frio, com a mínima quantidade de luz possível e, especialmente, mínima radiação UV; (b) eliminar agentes endógenos, diminuindo ou retirando totalmente metais (cobre e ferro), fosfato de tiamina, pigmentos (clorofila e heme pigmentos) ou peróxidos; (c) reduzir o oxigênio a níveis mais baixos possíveis e manter níveis baixos também durante a estocagem, e; (d) utilizar embalagens apropriadas e com material apropriado (Hudson, 1990).

A capacidade antioxidante dos compostos difere entre si de acordo com o potencial de inibição da oxidação. O número de grupos hidroxilas e a presença de anéis aromáticos hidroxilados estão diretamente relacionados com sua eficiência. Estes grupamentos são os responsáveis por neutralizar a ação dos radicais livres, gerando radicais fenólicos com ressonância estável. A facilidade de doar o radical hidrogênio é a característica responsável pela habilidade antioxidante (Boyce, 1999).

Os compostos antioxidantes podem ser classificados em:

- Antioxidantes primários: são geralmente compostos fenólicos que agem ligando-se aos radicais livres, impedindo a ação destes. Como exemplos, podem ser citados:

flavonóides, tocoferóis, butil-hidroxianisol (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT) e terc-butil hidroxiquinona (TBHQ);

- Aprisionadores de oxigênio: reagem com o oxigênio, deixando-o indisponível para a reação de oxidação, são exemplos: ácido ascórbico, palmitato ascórbico, ácido eritrórbico entre outros;
- Antioxidantes secundários: atuam decompondo hidroperóxidos lipídicos em compostos estáveis. Como exemplos, podem ser citados o dilaúril propionato e o ácido tridipropiônico;
- Antioxidantes enzimáticos: são enzimas responsáveis por retirar o oxigênio do meio ou remover espécies oxidativas de sistemas alimentares. Como exemplos: a glicose oxidase, o superóxido dismutase, a catalase, a glutathione peroxidase;
- Agentes quelantes ou sequestrantes: ligam-se e inibem a ação de íons metálicos, responsáveis por acelerar a oxidação. Exemplos: ácido cítrico, aminoácidos, ácido etileno diamino tetraacético (EDTA), etc. (Hudson, 1990).

2. Compostos Fenólicos

Presentes em todas as plantas, os compostos fenólicos têm suas origens orgânicas ligadas ao caminho metabólico do ácido chiquímico e ao metabolismo de fenil propanoidios, sendo considerados metabolitos secundários (Antolovich et al., 2000). Estruturalmente, possuem em geral um anel aromático ligado a um ou mais grupamentos hidroxilas e pelo menos 8000 estruturas já são conhecidas (Herrero, Ibanez e Cifuentes, 2005). Sua grande importância está diretamente relacionada com a atividade fisiológica, a habilidade de capturar espécies reativas de oxigênio, a habilidade de inibir a nitroação e quelar íons metálicos, o potencial de auto-oxidação e a capacidade de modular certas enzimas celulares ativas (Antolovich et al., 2000).

A respeito de suas potencialidades funcionais, já foram relatadas atividades anticancerígena, antiinflamatória, antiarterogênica, antitrombótica, imuno-moduladora, e atividade analgésica, entre outras, além das funções antioxidantes (Herrero, Ibanez e Cifuentes, 2005). Tecnicamente, estes compostos são responsáveis por fornecer cor e sabor a alimentos (Bravo et al., 2006).

Os compostos fenólicos podem ser divididos em classes: simples fenóis, ácidos fenólicos, ácidos hidroxicinâmicos, coumarinos e isocoumarinos, naftoquinonas, xantonas, estilbenzenos, antarquionas, flavonóides e ligninas.

2.1. Flavonóides

Em 1936, o Professor Szent-Gyorgyi relatou o isolamento de uma substância com elevado potencial antioxidante agindo como cofator na reação entre a enzima peroxidase e o ácido ascórbico. Essa substância foi chamada de Vitamina P e posteriormente foi renomeada como Rutina (Yanez, Andrews e Davies, 2007). A partir de então, mais de 5000 compostos semelhantes já foram descritos e ao grupo foi dado o nome de flavonóides (Herrero, Ibanez e Cifuentes, 2005). São compostos que podem ser absorvidos pelo corpo humano e muitos já foram encontrados no plasma (Kosar et al., 2004).

Os flavonóides exercem um grande número de atividades bioquímicas, fisiológicas e farmacêuticas, incluindo, além das atividades antioxidantes, as ações vasodilatadoras, antiinflamatórias, antibactericidas, imuno-estimulantes, e efeitos antialérgicos e antivirais (Baby et al., 2007; Hassimotto, Genovese e Lajolo, 2005).

A atividade antiinflamatória pode estar associada à capacidade de inibição de algumas enzimas, como proteínaquinase C, fosfodiesterase, fosfolipase, lipoxigenase e ciclooxigenase. Essas enzimas controlam a formação de mediadores biológicos responsáveis pela ativação de células endoteliais e células especializadas envolvidas na inflamação. A ação contra a arteriosclerose pode acontecer pela inibição da formação do ateroma em muitas etapas dessa patogênese. Quanto à atividade antimicrobiana, estudos já comprovaram que a quercetina e hesperidina inibem a infecção e a replicação do herpes, poliovírus, vírus da parainfluenza, entre outros (Tripoli et al., 2007).

A ação dos flavonóides contra o câncer está ligada a efeitos antimutagênicos, pois protegem o DNA de absorver luz ultravioleta. Eles neutralizam também radicais que promovem mutações, podendo ainda atuar interagindo diretamente com agentes tumorais, como em aberrações cromossômicas induzidas pela bleomicina. Durante o desenvolvimento do câncer, os flavonóides podem inibir o ciclo da glicólise, o principal caminho metabólico das células tumorais. Podem ainda afetar a atividade enzimática

envolvida na transdução da mitogênese (quinase, fosfatase, fosfodiesterase) e regular a proliferação crítica dessas enzimas. Por fim, estes antioxidantes naturais, ainda são capazes de inibir a proliferação de células tumorais (Hassimotto, Genovese e Lajolo, 2005).

Muitos estudos demonstram que a atividade antioxidante de flavonóides está ligada à habilidade de sequestrar espécies oxidativas, como o ânion peróxido, radicais hidroxilas e radicais peroxilas, além da habilidade de quelar metais. *In vitro*, são capazes de prevenir a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) por meio da extensão da fase lag (Hassimotto, Genovese e Lajolo, 2005). Quanto à classificação antioxidante, flavonóides atuam geralmente como antioxidantes primários (Herrero, Ibanez e Cifuentes, 2005).

Os flavonóides apresentam uma estrutura muito semelhante entre si, sendo que a diferença entre eles está nos grupamentos ligantes dos anéis e a presença, ou não, de duplas ligações (Figura I-1 e Tabela I-1). Algumas dessas diferenças estruturais podem definir o potencial antioxidante destes compostos: (a) a presença de duas hidroxilas no anel B (posições 3' e 4'), o que confere grande estabilidade ao anel através das ligações de hidrogênio, e com participações no deslocamento de elétrons; (b) dupla ligação entre as posições 2 e 3 do anel C, juntamente com a oxidril na posição 4 do mesmo anel, responsáveis pelo deslocamento de elétrons para o anel B, e; (c) presença de grupos hidroxilas nas posições 3 e 5.

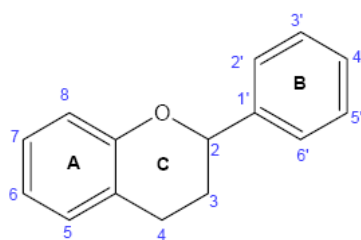


Figura I-1. Estrutura geral dos flavonóides.

A capacidade antioxidante também está relacionada com a interação entre os substituintes e estruturas, como por exemplo, a presença ou não de glicose ligada (gliconas e agliconas) e a presença de hidroxilas livres ou número e posição de hidroxilas eventualmente esterificadas. Formas glicosiladas em geral têm menor atividade antioxidante que agliconas. Esta capacidade também está ligada à concentração dos flavonóides, por exemplo: o kaempferol tem sua atividade contra o íon superóxido apenas

numa gama de concentração entre 60 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Tripoli et al., 2007). A promoção da oxidação também pode acontecer para flavonóides em circunstâncias particulares, como em presença de grande concentração de metais de transição (Almares-Abarca et al., 2007).

Tabela I-1. Classificação dos flavonóides segundo a estrutura molecular

Classificação	C ₃	C ₄	Ligação dupla
Flavanol	- OH	- H	
Flavanona	- O	= O	
Flavanonol	- OH	= O	
Flavona	- H	= O	2 = 3
Flavonol	- OH	= O	2 = 3
Isoflavona	- anel B	= O	2 = 3
Antocianina	- OH	- H	O = 2; 3 = 4

De acordo com a Tabela I-1, os flavonóides podem ser divididos em diversas classes, entre elas, destacam-se: flavonas, flavonóis, flavanonas, isoflavonas e antocianinas (Yanez, Andrews e Davies, 2007). Dentre os flavonóis, rutina (quercetina-3-rutinosídeo) é o mais encontrado em plantas diversas. Pode atuar como pigmento natural, antioxidante, estabilizante, preservadora, absorção de radiação UV, em indústrias de alimentação animal e humana, de cosméticos e de produtos farmacêuticos (Baby et al., 2007).

Dados sobre a ingestão de flavonóides na dieta são poucos. A ingestão diária na Holanda está estimada em 23 mg por dia, sendo 48% proveniente do chá seguido pelo alho (29%) e pela maçã (7%). No Japão, a ingestão de flavonols e flavonas foi estimada em 16,7 mg por dia para mulheres, sendo 46% proveniente do alho, e em 42,2 mg por dia de isoflavonas, sendo 37% vindo do tofu. Na Europa, o consumo pode variar de 50 a 800 mg diários, sendo os flavonóides provenientes de chás e vinhos principalmente. O consumo no Brasil está estimado em 70,5 mg diárias para mulheres, sendo que 68% são provenientes da laranja, 12% de vegetais, e 2,5% do tomate (Hassimotto, Genovese e Lajolo, 2005).

2.2. Vitamina C, um ácido fenólico.

Ácido ascórbico, ou ‘Vitamina C’, é um ácido fenólico de grande importância, tanto nutricional, quanto industrial. Foi descoberto em 1937 pelo Albert Von Szent Gyorgyi, que, com este composto, ganhou o prêmio Nobel. Gyorgyi descobriu que o ácido ascórbico era capaz de acabar com uma doença comum na época, o escorbuto, síndrome que ocorre em humanos com dieta pobre em frutas e vegetais. Atualmente, o escorbuto não é mais uma doença de grande importância, porém, a fama do ácido ascórbico de fazer bem à saúde não mudou. Agora seus benefícios estão ligados à sua capacidade antioxidante (Arrigoni e Tullio, 2002).

Todas as plantas são capazes de sintetizar o ácido ascórbico, alguns animais também possuem essa habilidade, porém os humanos, algumas espécies de primatas e alguns pássaros não se encontram entre eles (Arrigoni e Tullio, 2002). As quantidades encontradas em frutas e vegetais dependem de grande variedade de fatores, como diferentes genótipos, condições climáticas pré-colheita e procedimentos pós-colheita (Cordenunsi et al., 2002). Vários trabalhos já foram publicados quantificando essa vitamina em vegetais e, entre as frutas que mais apresentam este composto, destaca-se a acerola (Tabela I-2).

Tabela I-2. Presença de ácido ascórbico em alimentos.

Fonte	Ácido ascórbico (mg em 100 g)	Fonte	Ácido ascórbico (mg em 100 g)
Acerola	1300	Maracujá	25
Goiaba	230 – 300	Tomate	16
Kiwi	60	Abacate	15 – 20
Morango	60	Abacaxi	12 - 25
Agrião	68 - 79	Melão	10 – 35
Espinafre	51	Banana	10 – 30
Limão	50	Cenoura	6
Laranja	50	Maçã	2 - 10

Fonte: Adaptado de Davey e colaboradores, 2000.

No organismo humano, a Vitamina C é absorvida pelo intestino pela ação do transporte dependente de sódio, sendo que também pode ocorrer, mas em menor proporção, na boca e no estômago. A taxa de absorção da Vitamina C proveniente de suplementos é maior que 80% em adultos e, após a absorção, é transportada para os tecidos e o excesso é excretado na urina. Embora seja distribuída por todo o corpo, sua concentração se dá nas glândulas adrenais e hipófise, no cérebro, nos olhos, neutrófilos e linfócitos (Emadi-Konjin et al., 2005).

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2005), a ingestão diária recomendada (IDR) de Vitamina C para adultos é de 45 mg. Para lactentes, a IDR é de 25 mg nos seis primeiros meses e 30 mg do sétimo ao décimo primeiro mês. Crianças de 1 a 6 anos, têm sua IDR estipulada em 30 mg, para crianças de 7 a 10 anos, essa taxa passa a ser de 35 mg.

Casos envolvendo toxicidade provocada por esta vitamina são poucos, uma vez que se trata de um composto hidrossolúvel e é regularmente excretado pelo corpo, no entanto, doses excessivas podem estar relacionadas a cálculos renais e, em casos mais raros, à anemia, causada pela interferência na absorção de Vitamina B12 (Wolkoff, 2004).

Quanto aos benefícios ao organismo, o ácido ascórbico atua prevenindo danos e doenças, como as cardiovasculares, certas complicações pré-natais, tumores malignos, inflamações, catarata, mal de Parkinson e Alzheimer, bem como aceleração do processo de envelhecimento celular (Sikora, Cieslik e Leszczynska, 2008). Atua ainda junto à formação de tecido conjuntivo e transporte de íons (Barata-Soares et al., 2004).

Abaixo está ilustrada a estrutura do ácido ascórbico (ácido L-ascórbico - LAA) e de seus isômeros (Figura I-2). Entre estes, apenas o ácido d-isoascórbico (DIAA) apresenta atividade semelhante ao L-ascórbico em relação à ação antioxidante, quanto à atividade como Vitamina C, apresenta apenas 5% (Cordenunsi et al., 2002; Herrero, Ibanez e Cifuentes, 2005).

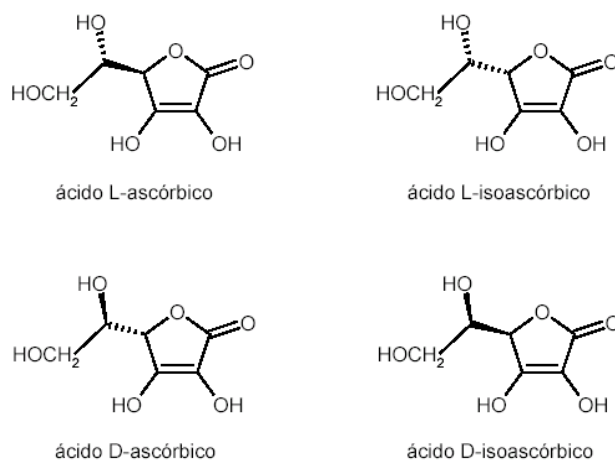


Figura I-2. Estrutura do ácido ascórbico e seus isômeros (Boyce, 1999).

Sua ação antioxidante está relacionada com o aprisionamento de peróxidos tóxicos e com a estabilização de radicais livres, protegendo lipídios, proteínas e outros biocomponentes do dano oxidativo (Zinellu et al., 2004). Quando o ferro está presente em grande quantidade, o ácido ascórbico pode atuar como um pró-oxidante (Almares-Abarca et al., 2007).

O mecanismo de oxidação do ácido ascórbico pode ser visto na Figura I-3. A primeira degradação produz o ácido dehidroascórbico (DHAA), que possui 80% da bioatividade do LAA (Liao et al., 2001). Essa reação pode ser revertida apenas por compostos de elevado potencial redutor, como o ditiotreitól (DTT). O DHAA pode ainda ser hidrolisado ou oxidado para o ácido 2,3-dicetoglucônico, que não tem qualquer atividade vitamínica C (Gibbons et al., 2001).

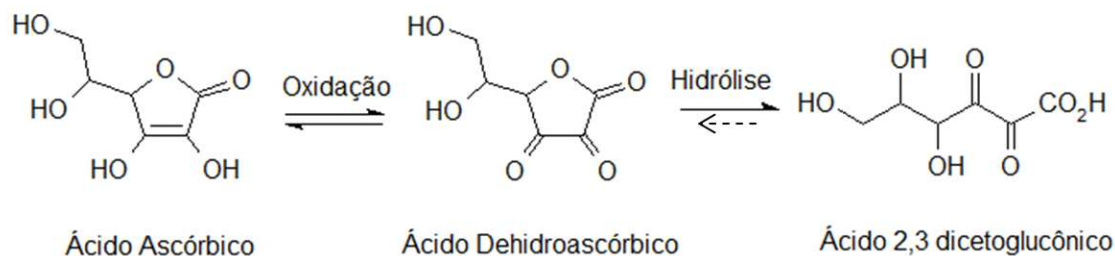


Figura I-3. Mecanismo de oxidação do ácido ascórbico

3. Interações entre antioxidantes

Produtos de origem vegetal constituem matrizes complexas com elevado número de substâncias. Como enunciado anteriormente, grande quantidade destas substâncias são compostos fenólicos com pronunciada atividade antioxidante. Iacopini e colaboradores (2008), no entanto, verificaram baixa associação entre a quantidade de fenólicos presentes em amostras e a capacidade antioxidante do extrato das mesmas. Estes autores inferiram que esta incoerência é resultante de interações existente entre estes tipos de compostos, sendo algumas vezes sinérgicas e outras antagônicas.

Alonso e colaboradores (1999) demonstraram a existência de sinergismo entre o ácido ascórbico e a rutina e entre o ácido ascórbico e o ácido caféico, mas houve um antagonismo quando se associou ácido ascórbico com quercetina, avaliando-os pela metodologia de capacidade antioxidante total plasmática (TRAP). Saucier e Waterhouse (1999) verificaram a ação sinérgica na mistura de (+)-catequina com ácido ascórbico e também de (+)-catequina com SO_2 , empregando uma técnica de avaliação com mioglobina. Iacopini e colaboradores (2008) verificaram ações antagônicas entre (+)-catequina e (-)-epicatequina, quercetina e rutina, por meio do DPPH^{*}.

4. Métodos de análise

É de significativa importância que sejam desenvolvidos métodos capazes de determinar, simultaneamente, uma grande gama de compostos, com rapidez, custos relativamente baixos e com resultados de qualidade (Agostini e Godoy, 1997). Seguindo esse objetivo, diversos procedimentos já foram otimizados para identificar e quantificar flavonóides em alimentos, incluindo Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Cromatografia Gasosa (CG), Eletroforese Capilar (EC) e Eletrocromatografia Capilar (CEC) (Molnár-Perl e Füzfai, 2005).

Para o ácido ascórbico, a situação não é diferente, estudos que utilizam CLAE e EC são facilmente encontradas. Há ainda métodos convencionais, como o realizado por meio da titulação do ácido ascórbico por 2,6-diclorofenol-indofenol, e métodos enzimáticos, que

são muito caros e lentos, dificultando análises de muitas amostras (Galiana-Balaguer et al., 2001).

Quanto à avaliação do potencial antioxidante, também existem várias metodologias, sendo que, entre elas, a análise utilizando o radical sintético 2,2-difenil-1-picrilhidrazina (DPPH[•]) é a mais empregada quando se quer determinar a capacidade de sequestrar radicais livres (Iacopini et al., 2008)

4.1. Identificação e quantificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Inovações nos equipamentos e recheios de colunas cromatográficas estão tornando esta técnica cada vez mais eficiente. Este fato, aliado às descobertas sobre as ações benéficas que os polifenóis possuem no organismo humano, fazem da CLAE um artifício atrativo e importante instrumento na análise de compostos fenólicos (Malovaná et al., 2001; Prado e Godoy, 1998).

As características físico-químicas apresentadas por este tipo de substâncias permitem que possam ser analisadas amplamente pela CLAE equipada com colunas de fase reversa, em geral empacotadas com partículas esféricas de sílica ligadas à cadeia de octadecil (C₁₈) (Castellari, Fabiani e Arfelli, 2002; Molnár-Perl e Füzai, 2005). Em se tratando de sistema de detecção, o detector de arranjo de díodos (DAD) é o mais simples e o mais usado em laboratórios de análises de alimentos e de material biológico. Baseado no espectro característico de cada composto fornecido pelo DAD é possível identificar e quantificar compostos com alto grau de certeza (Molnár-Perl e Füzai, 2005). Outro detector que também é bastante empregado é o eletroquímico e pode ser usado como técnica complementar, uma vez que mede característica bem seletiva.

Em relação aos flavonóides, pesquisas bibliográficas demonstraram que a fase móvel utiliza, majoritariamente, eluições em gradiente com duas composições: uma aquosa acidificada e outra orgânica. Na fase aquosa, soluções de ácido acético são bastante empregadas (Bramati et al., 2002; Carmona et al., 2007; Gürbüz et al., 2007). Também foram encontradas soluções ácidas de ácido fórmico (Careri et al., 2003; Matsubara e Rodriguez-Amaya, 2006) e de ácido fosfórico (Matilla, Astola e Kumpulainen, 2000; Wang

e Huang, 2004). Para a fase orgânica, a acetonitrila é a mais usada (Bramati et al., 2002; Careri et al., 2003; Fang et al., 2007; Gürbüz et al., 2007; Matilla, Astola e Kumpulainen, 2000; Wang e Huang, 2004). Essas pesquisas comprovaram também que a coluna cromatográfica mais utilizada é aquela com recheio de C₁₈ (Careri et al., 2003; Carmona et al., 2007; Fang et al., 2007; Gürbüz et al., 2007; Matsubara e Rodriguez-Amaya, 2006). Quanto ao detector, além do DAD, foram encontrados trabalhos usando o detector de Fluorescência (Gürbüz et al., 2007) e detector eletroquímico (Matilla, Astola e Kumpulainen, 2000).

Os métodos desenvolvidos por CLAE para a determinação dos compostos fenólicos podem ser aplicados desde uma verificação quantitativa até a determinação de adulterações e de autenticidade. Pesquisas utilizando a CLAE em fase reversa com eluição por gradiente puderam determinar constituintes fenólicos biologicamente ativos presentes em vinhos, entre eles o ácido gálico, *trans*-resveratrol, quercetina e rutina (López et al., 2001). Escarpa e Gonzales (1998) utilizaram esta técnica para verificar diferenças significativas na concentração de fenólicos da casca de quatro variedades de maçãs, sendo que as principais distinções estão nas quantidades de (+)-catequina e rutina.

As análises por CLAE de ácido ascórbico geralmente verificam não só esse ácido, mas também alguns de seus isômeros. Podem ser realizadas empregando colunas de fase-reversa associadas à troca iônica, colunas amino-ligadas, colunas revestidas com aminoácidos poliméricos, ou, mais frequentemente, colunas C₁₈. A detecção pode ser feita por detectores eletroquímicos, fluorescentes ou por arranjo de diodos (Sánchez-Mata et al., 2000).

Vários trabalhos que utilizam colunas C₁₈ foram encontrados (Esteve et al., 1997; Fontannaz, Kiliç e Heudi, 2006; Gardiner et al., 2000; Gibbons et al., 2001), mas também foram vistas análises com coluna de NH₂ (Margolis e Schapira, 1997). Quanto ao par iônico, há predominância no uso de brometo de alquiltrimetil amônio (Esteve et al., 1997; Fontannaz, Kiliç e Heudi, 2006; Gardner et al., 2000). Dos autores citados no presente parágrafo, a maioria utilizou detector de arranjo de diodos, com exceção de Margolis e Schapira (1997) que usaram detector eletroquímico. Quanto ao pH, a pesquisa encontrou uma variação de 4,5 a 7,8.

4.2. Identificação e quantificação por Eletroforese Capilar

As similaridades químicas dos compostos fenólicos e a complexidades de amostras como os alimentos tornam o uso de métodos cromatográficos de alta eficiência necessários para a determinação qualitativa e quantitativa desses compostos. Embora esses métodos sejam amplamente utilizados, é necessário o uso de solventes muitas vezes tóxicos, com altos tempos de análise e desenvolvimento de sistemas de gradiente extremamente complexos para a separação (Herrero, Ibanez e Cifuentes, 2005).

A Eletroforese Capilar vem sendo apontada recentemente como um método bastante satisfatório para a determinação simultânea de diferentes compostos, entre eles os polifenóis e alguns minerais. É uma técnica de separação relativamente nova quando comparada a outros métodos, tais como a CG e a CLAE (Altria, 1999). Suas características são a alta eficiência de separação (acima de 10^5 pratos teóricos), baixo consumo de amostras (em ordem de grandeza de nL) e reagentes (mL), tempos de análises reduzidos e alto grau de automação (Gu et al., 2000; Prado, Boas e Godoy, 2002; Silva, 2003; Tavares, Jager e Silva, 2003). Quanto à versatilidade, a EC apresenta sistemas de separação iguais aos da CLAE, além de outros que a CLAE não permite. Esta característica faz com que as duas técnicas possam ser utilizadas de forma complementar (Herrero, Ibanez e Cifuentes, 2005).

Entre os fatores que influenciam na separação dos compostos estão: o tipo de técnica de introdução da amostra, o volume injetado da amostra, o tipo de amostra, a temperatura do capilar na separação, a composição do tampão de corrida, a força iônica do mesmo, as técnicas de tratamento da superfície do capilar, o pH e a voltagem aplicados (Gong et al., 2007; Silva et al., 2007)

A EC pode englobar diferentes mecanismos de separação em um único sistema, com diferentes características operacionais e diferentes princípios de separação: Eletroforese Capilar de Zona (CZE), Eletroforese Capilar em Gel (CGE), Cromatografia Eletrocínética Micelar (MEKC), Eletrocromatografia Capilar (CEC), Focalização Eletrocínética Capilar (CIEF), e Isotacoforese (CITP). Todas essas modalidades diferem no seu fundamento e no eletrólito de base utilizado, porém todas apresentam uma

característica em comum: a separação é baseada na diferença de eletromigração existente entre os analitos quando um campo elétrico é aplicado (Herrero, Ibanez e Cifuentes, 2005).

Para compostos fenólicos, as duas técnicas mais usadas são CZE e MEKC. Na CZE, a separação dos compostos é dada pela diferença entre a mobilidade de espécies carregadas, em eletrólitos que podem ser aquosos ou orgânicos, sendo que a mobilidade fica condicionada à razão carga/massa. Os eletrólitos podem conter aditivos, como, por exemplo, ciclodextrinas, complexantes ou ligantes, que reagem com os analitos alterando sua mobilidade (Silva et al., 2007). Na MEKC, ao contrário do que acontece para a CZE, compostos neutros também podem ser analisados. É baseada na combinação da eletroforese com interações com aditivos, de modo a formar uma fase dispersa no capilar que se move com velocidade diferente do analito. Esse aditivo forma micelas no eletrólito, daí vem seu nome (Silva et al., 2007).

Watanabe e colaboradores (1998) realizaram uma comparação entre os métodos de CLAE e MEKC na determinação de compostos fenólicos em cinco amostras de shochu, uma bebida destilada alcoólica popular no Japão. Os autores chegaram à conclusão que a MEKC apresentava um tempo muito menor de trabalho e uma resolução maior, podendo desta forma ser utilizada como uma análise de rotina para o controle de qualidade em shochu, ao contrário da CLAE, que apresenta um longo tempo de processo.

Outros trabalhos, também de comparação das técnicas de CLAE e CZE descrevem que ambos os métodos apresentam bons resultados para a análise de compostos fenólicos não coloridos em vinhos. Os autores relatam ainda que a CZE apresenta baixa resolução e que esta pode ser uma técnica complementar à CLAE. As análises realizadas em vinhos portugueses apontaram que a maior vantagem da CZE em relação à CLAE é o menor tempo de análise (Bronze e Boas, 1998; Bronze, Boas e Belchior, 1997).

Cao e colaboradores (2002) desenvolveram metodologia para a detecção de flavonóides em *Ginkgo biloba* L. Análises realizadas nesta planta por CLAE apresentam baixa resolução, grande tempo de separação, coluna com pequena vida útil e resultados não confiáveis. A utilização de EC para este caso foi de grande benefício.

Pietta (1991), citado por Cao e colaboradores (2002), comparou as metodologias de análise de flavonóides em CLAE e EC também para *Ginkgo biloba*. Segundo o autor, o sistema isocrático em CLAE não apresentou resultados eficientes quando comparados com

os resultados obtidos por EC, o mesmo foi verificado quando utilizou gradiente de reagentes, sendo que o processo apresentou menor rapidez e simplicidade. Pietta ressalta ainda que a EC tornou-se uma importante técnica de separação, com rapidez, eficiência, reprodutibilidade, utilizando mínima quantidade de amostra, baixa quantidade de solventes e apresentando fácil remoção de contaminantes.

Assim como para a CLAE, pesquisa bibliográfica foi realizada visando verificar as condições mais utilizadas para esta técnica quando flavonóides e ácido ascórbico são o alvo do estudo.

Para os flavonóides, foi comprovada a informação de que a maioria dos métodos utiliza a MEKC ou a CZE. Entre os métodos de CZE, predomina o uso de tampão de corrida composto por borato ou tetraborato (Chu et al., 2003; Fu et al., 2005; Peng, Liu e Ye, 2006; Volpi, 2005; Wang e Huang, 2004), associação entre borato e fosfato também pode ser usada (Xu et al., 2006). Para a MEKC, além do borato, tetraborato e fosfato, os estudos utilizam um surfactante, que, em geral, é o dodecil sulfato de sódio (SDS) (Aucamp, Hara e Apostolides, 2000; Fu et al., 2005). Alguns destes métodos também utilizam um solvente orgânico como modificador, na maioria das vezes metanol (Aucamp, Hara e Apostolides, 2000; Fu et al., 2005). Quanto ao pH de análise, valores entre 7,0 e 9,5 foram encontrados em todos os artigos pesquisados. A temperatura do capilar durante as análises se manteve a 25°C para todos. O DAD novamente foi o detector mais empregado (Aucamp, Hara e Apostolides, 2000; Fu et al., 2005; Volpi, 2005; Wang e Huang, 2004). O detector eletroquímico também foi empregado por alguns autores para estes tipos de análises (Chu et al., 2003; Peng, Liu e Ye, 2006; Xu et al., 2006). A injeção, em geral, foi hidrodinâmica (Aucamp, Hara e Apostolides, 2000; Wang e Huang, 2004) ou eletrocinética (Chu et al., 2003; Fu et al., 2005; Peng, Liu e Ye, 2006; Xu et al., 2006).

No caso do ácido ascórbico, Sádeká e Polonský (2001) utilizaram a isotacoforese para a separação dos ácidos L-ascórbico e D-isoascórbico, porém, a técnica de CZE é a de mais comum uso, sendo que o tampão borato novamente foi o mais empregado (Choi e Jo, 1997; Galiana-Balaguer et al., 2001; Liao et al., 2000; Tang e Wu, 2005; Versari et al., 2004; Zinellu et al., 2004), mas o tampão fosfato (Jin e Jiang, 2002) e tricina (Versari et al., 2004) também são encontrados. Como modificadores desse tampão de corrida, têm-se a

acetonitrila (Galiana-Balaguer et al., 2001). A MEKC foi aplicada por Wang e Wu (2006) com tampão borato adicionado de SDS.

O detector de arranjo de diodos foi também o mais usado (Choi e Jo, 1997; Galiana-Balaguer et al., 2001; Liao et al., 2000; Tang e Wu, 2005; Zinellu et al., 2004), porém o detector eletroquímico pode ser encontrado nos trabalhos de Jin e Jiang (2002). Tanto a injeção hidrodinâmica (Choi e Jo, 1997; Galiana-Balaguer et al., 2001; Liao et al., 2000; Tang e Wu, 2005; Versari et al., 2004; Wang e Wu, 2006; Zinellu et al., 2004) quanto à eletrocínética (Jin e Jiang, 2002), podem ser empregadas, sendo que há predominância da primeira técnica. O pH do tampão variou de 8,0 a 9,5.

4.3. Quantificação de Ácido ascórbico por DCFI

A análise de ácido ascórbico pode ser realizada não apenas por métodos instrumentais, mas também por métodos convencionais. Uma simples titulação com o indicador 2,6-diclorofenol-indofenol (DCFI) é capaz de quantificar o ácido ascórbico em alimentos. Neste método, o ácido ascórbico reduz o DCFI a uma solução incolor e, no ponto final da titulação o excesso do indicador não reduzido confere à solução ácida uma coloração rosa, sendo este o ponto final da reação. É uma técnica de fácil aplicação e baixo custo, principalmente quando comparada à CLAE e a EC, por exemplo.

O uso do DCFI é freqüente, tanto para a análise de produtos alimentícios quanto para produtos farmacêuticos, além de ser empregado como base de comparação para novas metodologias. Esta técnica é ainda aquela indicada pela AOAC (1997) para a determinação da Vitamina C em preparados e sucos de frutas.

Araújo e colaboradores (2007) usaram esta metodologia para verificar a degradação da quantidade de Vitamina C presente em polpa de acerola conservada por 12 meses de congelamento. McErlain e colaboradores (2001) aplicaram essa técnica para verificar a perda na quantidade de ácido ascórbico presente em vegetais após o cozimento dos mesmos, chegando até a 76%.

4.4. Avaliação do potencial antioxidante

A atividade antioxidante dos compostos pode ser avaliada de diversas formas, dentre elas, destacam-se aquelas que utilizam espécies reativas ao oxigênio e ao nitrogênio, como, por exemplo, o radical 1,1-difenil-2-picril hidrazila (DPPH[•]), radicais hidroxilas (HO[•]), superóxidos (O₂^{•-}), radicais peróxilas (ROO[•]), e hipoclorito (Firusi et al., 2005). Entre essas técnicas, uma das mais utilizadas para avaliar compostos isolados e amostras é baseada na complexação do radical livre DPPH[•] (Jiménez-Escrig et al., 2000).

Quando um agente antioxidante (AH) é adicionado ao DPPH[•], o elétron livre do radical é pareado e sua coloração inicial púrpura é perdida, passando para amarela, de acordo com a reação expressa na Figura I-4. A diferença de absorbância gerada com a perda de coloração do meio é a base da avaliação do potencial antioxidante por esta técnica (Iacopini et al., 2008).

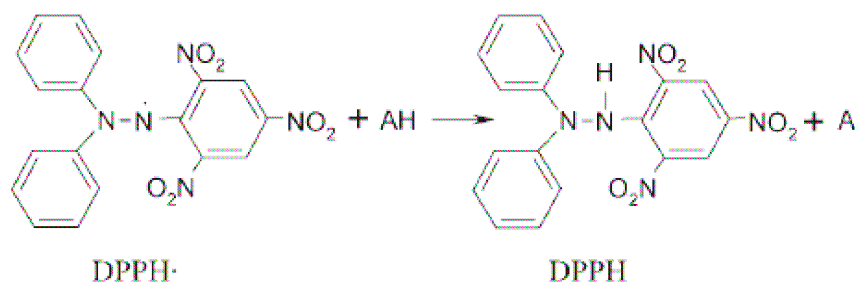


Figura I-4. Mecanismo de ação do DPPH[•]

Kuskoski e colaboradores (2005) analisaram por esta técnica 11 polpas de frutas: amora, uva, açaí, goiaba, morango, acerola, abacaxi, manga, graviola, cupuaçu e maracujá. Todas apresentaram potencias antioxidantes relevantes, mas a acerola foi a que obteve maior resultado, seguida pela manga e pelo açaí. Jiménez-Escrig e colaboradores (2000) adaptaram a metodologia por DPPH[•] para avaliar o potencial antioxidante de carotenóides. Entre os compostos analisados, o licopeno foi aquele que teve melhor resultados. Kulkarni e Aradhya (2005) verificaram o perfil da capacidade antioxidante da fruta romã conforme sua maturação. A maior atividade foi observada quando a fruta apresentou 20 dias de idade. Em 60 dias, 13% da capacidade havia se perdido, resultado associado à degradação de

compostos fenólicos e Vitamina C. Um aumento de 10,6% foi observado na fase final (100 dias), fato associado ao acúmulo de antocianinas na fruta. Iacopini e colaboradores (2008) utilizaram esta técnica para verificar a capacidade antioxidante de uvas e também de compostos isolados. A uva Merlot foi aquela que apresentou maior capacidade. Entre os compostos analisados, a (-)-epicatequina foi aquela que apresentou melhores resultados.

5. Geléia de Fruta, um alimento a ser explorado

Como dito anteriormente, antioxidantes naturais, como flavonóides e ácido ascórbico, são amplamente encontrados nas frutas e vegetais. Porém, muitas frutas não estão disponíveis todo o ano, apresentando caráter sazonal, como é o caso dos morangos no Brasil: sua plantação se inicia entre Março e Maio e a colheita acontece entre Junho e Novembro. Para possibilitar a venda do morango fora de sua época, na maioria dos casos, é empregada a conservação por baixa temperatura, resultando em perda de qualidade e aumento de preço (Henrique e Cereda, 1999). O uso de processos tecnológicos também é uma alternativa para facilitar o acesso das propriedades funcionais do morango e de outras frutas durante todo o ano, como é o caso da produção de geléias (Baker et al., 2005).

Segundo a Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (1978), por definição, geléia de fruta é o produto obtido pela cocção de frutas inteiras ou em pedaços, polpa ou suco de frutas, com açúcar e água, sendo essa mistura concentrada até atingir textura gelatinosa. No Brasil, geralmente emprega-se a fruta “in natura” e, com menor frequência, frutas conservadas em pedaços na água ou calda rala, polpas e sucos (Lopes, 2007).

As geléias podem ser classificadas como simples, quando são preparadas por uma única espécie de fruta, ou mistas, quando preparadas com mais de uma espécie de frutas. Como ingredientes obrigatórios tem-se: (a) partes comestíveis de frutas frescas, congeladas, desidratadas ou preservadas por outros meios, (b) sacarose, frutose, glucose, xaropes e açúcar invertido, isoladamente ou em misturas adequadas. Podem conter vinagre, suco de limão, mel de abelhas, bebidas alcoólicas (máximo de 1,9% do produto final), condimentos e especiarias. Alguns coadjuvantes tecnológicos também podem ser adicionados, como: (a)pectina, (b) ácidos cítrico, tartárico, málico, láctico e seus sais, (c) carbonatos e bicarbonatos de potássio e de sódio, (d) mono e diglicerídeos (ANVISA, 1978).

O processamento da geléia exige poucos equipamentos e possibilita o aproveitamento de frutas impróprias para compotas, o que as transforma em um produto de melhor qualidade e mais sofisticado que os doces em massa (Lopes, 2007). Na Figura I-5 pode ser observado um fluxograma do processamento de geléias. Algumas das etapas apresentadas são passíveis de grande degradação de flavonóides e ácido ascórbico, como o corte, a desintegração, o despolpamento, a concentração em tacho, o aquecimento a 85°C e também o armazenamento por longo período.

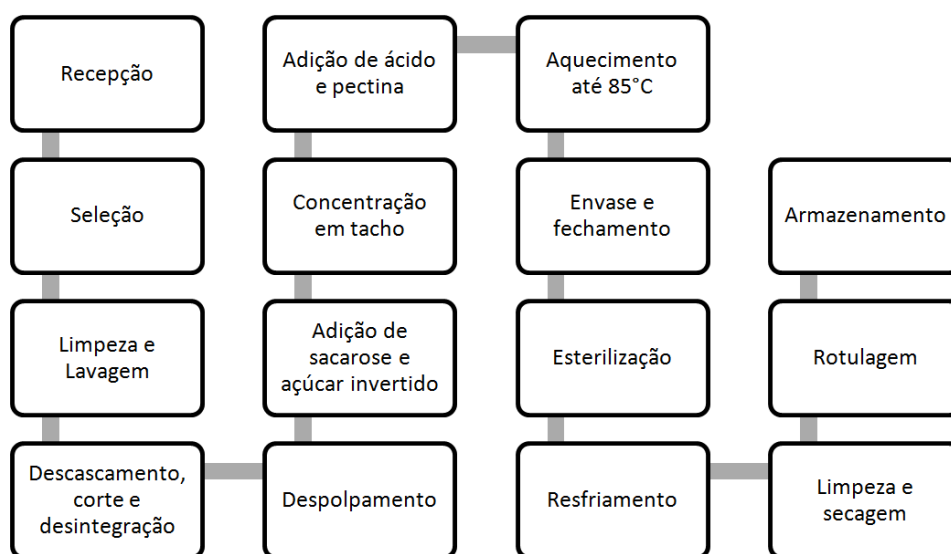


Figura I-5 Fluxograma do processamento de geléias. Fonte: Lopes, 2007.

Em vista do processamento relativamente simples, da presença de frutas ricas em compostos antioxidantes, aliado à fácil distribuição e disponibilidade no mercado, geléias de frutas tornam-se alvos importantes de estudos. Em pesquisa bibliográfica recente, constatou-se que são raros os trabalhos que utilizam este tipo de alimento como base, ainda mais raros são aqueles que envolvem análises de compostos antioxidantes, como flavonóides e ácido ascórbico.

6. Referências

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA (1978). Normas técnicas especiais. *Resolução – CNNPA n°12*, de 30 de março.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA (2005). Regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais. *Resolução RDC n° 269*, de 22 de setembro.
- AGOSTINI, T.S. & GODOY, H.T. (1997). Simultaneous determination of nicotinic acid, nicotinamide, riboflavin, thiamin and pyridoxine in enriched Brazilian foods, by HPLC. *Journal High resolution Chromatography*, 20, 3081-3086.
- ALMARES-ABARCA, N.; CAMPOS, M.G.; ÁVILA-REYES, J.A.; NAJARO-JIMÉNEZ, N.; CORRAL, J.H. & GONZÁLE-VALDEZ, L.S. (2007). Antioxidant activity of polyphenolic extract of monofloral honeybee collected pollen from mesquite (*Prosopis juliflora*, Leguminosae). *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 119-124.
- ALONSO, D.P.; SALUCCI, M.; LÁZARO, R.; MAIANI, G. & FERRO-LUZZI. (1999). Capacidad antioxidante y potencial de sinergismo entre los principales constituyentes antioxidantes de algunos alimentos. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*, 13, 104-111.
- ALTRIA, K.D. (1999). Overview of capillary electrophoresis and capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography A*, 856, 443-463.
- ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.; ROBARDS, K. & RYAN, D. (2000). Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *Analyst*, 125, 989-1009.
- AOAC, Association of Official Analytical Chemists (1997), Foehington D. C., 2, 16-17.
- ARAÚJO, P.G.L.; FIGUEIREDO, R.W.; ALVES, R.E.; MAIA, G.A. & PAIVA, J.R. (2007). β -caroteno, ácido ascórbico e antocianinas totais em polpa de frutos de aceroleira conservada por congelamento durante 12 meses. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27, 104-107.
- ARRIGONI, O. & TULLIO, M. (2002). Ascorbic acid: much more than an antioxidant. *Biochemical et Biophysical Acta*, 1569, 1-9.
- AUCAMP, J.P.; HARA, Y. & APOSTOLIDES, Z. (2000). Simultaneous analysis of tea catechins, caffeine, gallic acid, theanine and ascorbic acid by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of chromatography A*, 876, 235-242.
- BABY, A.R.; MIGLIATO, K.F.; MACIEL, C.P.M.; ZAGUE, V.; PINTO, C.A.S.O.; SALGADO, H.R.N.; KANEKO, T.M. & VELASCO, M.V.R. (2007). Accelerated chemical stability data of O/W fluid emulsion contain the extract of *Trichilia catigua* Adr. Juss (e) *Ptychopetalum olacoides* Benthann. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 43, 405-412.
- BARATA-SOARES, A.D.; GOMEZ, M.L.P.A.; MESQUITA, C.H. & LAJOLO, F.M. (2004). Ascorbic acid biosynthesis: a precursor study on plants. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 16, 147-154.

- BOYCE, M.C. (1999). Simultaneous determination of antioxidants, preservatives and sweeteners permitted as additives in food by mixed micellar eletrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A*, 847, 369-375.
- BRAMATI, L.; MINOGGIO, M.; GARDANA, C.; SIMONETTI, P.; MAURI P. & PIETTA, P. (2002) Quantitative Characterization of Flavonoid Compounds in Rooibos Tea (*Aspalathus linearis*) by LC-UV/DAD. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5513-5519.
- BRAVO, M.N.; SILVA, S.; COELHO, A.V.; VILAS BOAS, L. & BRONZE, M.R. (2006) Analysis of phenolic compounds in Muscatel wines produced in Portugal. *Analytica Chimica Acta*, 563, 84-92.
- BRONZE, M.R. & BOAS, L.FV. (1998) Characterisation of brandies and wood extracts by capillary electrophoresis. *Analysis*, 126, 40-47.
- BRONZE, M.R.; VILAS BOAS, L.F. & BELCHIOR A.P. (1997). Analysis of old brandy and oak extracts by capillary electrophoresis. *Journal Chromatography A*, 768, 143-152.
- CAO, Y.; CHU, Q.; FANG, Y. & YE, J. (2002). Analysis of flavonoids in Ginkgo bilobal. And its phytopharmaceuticals by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 374, 294-299.
- CARERI, M.; CORRADINI, C.; ELVIRI, L.; NICOLETTI, I. & ZAGNONI, I. (2003) Direct HPLC Analysis of Quercetin and trans-Resveratrol in Red Wine, Grape, and Winemaking Byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 5226-5231.
- CARMONA, M.; SANCHEZ, A.M.; FERRERES, F. & ZALACAIN, A. (2007). Identification of the flavonoid fraction in saffron spice by LC/DAD/MS/MS: Comparative study of samples from different geographical origins. *Food Chemistry*, 100, 445-450.
- CASTELARRI, M.E.S.; FABIANI, A. & ARFELLI, G. (2002) Analysis of wine phenolics by high-performance liquid chromatography using a monolithic type column. *Journal of Chromatography A*, 973, 221-227.
- CHOI, O.K. & JO, J.S. (1997). Determination of L-ascorbic acid in foods by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 781, 435-443.
- CHU, Q.C.; QU, W.Q.; PENG, Y.Y.; CAO, Q.H. & YE, J.N. (2003). Determination of Flavonoids in Hippophae rhamnoides L. and its Phytopharmaceuticals by Capillary Electrophoresis with Electrochemical Detection. *Chromatographia*, 58, 67-71.
- CORDENUNSI, B. R.; NASCIMENTO, J. R. O.; GENOVESE, M. I. & LAJOLO, F. M. (2002) Influence of Cultivar on Quality Parameters and Chemical Composition of Strawberry Fruits Grown in Brazil. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 50, 2581-2586.
- DAVEY, M.W.; MONTAGU, M.V.; INZE, D.; SANMARTIN, M.; KANELIS, A.; SMIRNOFF, N.; BENZIE, I.J.J.; STRAIN, J.J.; FAVELL, D. & FLETCHER, J. (2000). Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 825-860.

- EMADI-KONJIN, P.; VERJEE, Z.; LEVIN, A.V. & ADELI, K. (2005) Measurement of intracellular vitamin C levels in human lymphocytes by reverse phase high performance liquid chromatography (HPLC). *Clinical Biochemistry*, 38, 450-456.
- ESCARPA, A. & GONZALEZ, M.C. (1998). High-performance liquid chromatography with diode-array detection for the determination of phenolic compounds in peel and pulp from different apple varieties. *Journal of Chromatography A*, 823, 331-337.
- ESTEVE, M.J.; FARRÉ, R.; FRIGOLA, A. & GARCIA-CANTABELLA, J.M. (1997). Determination of ascorbic and dehydroascorbic acids in blood plasma and serum by liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 688, 345-349.
- FANG, F.; LI, J.M.; PAN, Q.H. & HUANG, W.D. (2007). Determination of red wine flavonoids by HPLC and effect of aging. *Food Chemistry*, 101, 428-433.
- FIRUSI, O.; LACANNA, A.; PETRUCCI, R.; MARROSU, G. & SASO, L. (2005). Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by ferric reducing antioxidant power assay and cyclic voltammetry. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1721, 174-184.
- FONTANNAZ, P.; KILINÇ, T.; HEUDI, O. (2006). HPLC-UV determination of total vitamin C in a wide range of fortified food products. *Food Chemistry*, 94, 626-631.
- FU, S.H.; YANG, M.H.; WEN, H.M. & CHERN, J.C. (2005). Analysis of Flavonoids in Propolis by Capillary Electrophoresis. *Journal of Food and Drug Analysis*, 13, 43-50.
- GALIANA-BALAGUER, L.; ROSELLO, S.; HERRERO-MARTINÉZ, J. M.; MAQUIEIRA, A.; NUEZ, F. (2001). Determination of L-Ascorbic Acid in Lycopersicon Fruits by Capillary Zone Electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 296, 218-224.
- GARDINER, P.T.; WHITE, T.A.C.; MCPHAIL, D.B. & DUTHIE, G.G. (2000). The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. *Food Chemistry*, 68, 471-474.
- GIBBONS, E.; ALLWOOD, M.C.; NEAL, T.; HARDY, G. (2001). Degradation of dehydroascorbic acid in parenteral nutrition Mixtures. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 25, 605-611.
- GONG, W.J.; ZHANG, Y.P.; CHOI, S.H.; ZHANG, Y.J.; LEE, K.P. (2007). Application of response surface methodologies in capillary electrophoresis. *Microchim Acta*, 156, 327-335.
- GU, X.; CHU, Q.; O'DWYER, M.; ZEECE, M. (2000). Analysis of resveratrol in wine by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 881, 471-481.
- GÜRBÜZ, O.; GÖÇMEN, D.; DAG'DELEN, F.; GÜRSOY, M.; AYDIN, S.; SAHIN, I.; BÜYÜKUYSAL, L.; USTA, M. (2007). Determination of flavan-3-ols and trans-resveratrol in grapes and wine using HPLC with fluorescence detection. *Food Chemistry*, 100, 518-525.
- HASSIMOTTO, N.M.A.; GENOVESE, M.I. & LAJOLO, F.M. (2005). Antioxidant Activity of Dietary Fruits, Vegetables, and Commercial Frozen Fruit Pulps. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2928-2935.
- HERRERO, M.; IBANEZ, E. & CIFUENTES, A. (2005). Analysis of natural antioxidants by capillary electromigration methods. *Journal of Separation Science*, 28, 883-897

- HUDSON, B.J.F. (1990). *Food antioxidants*. Elsevier Science Publishers LTD. Estados Unidos da América, 1990.
- IACOPINI, P.; BALDI, M.; STORCHI, P. & SEBASTIANI, L. (2008). Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions. *Journal of Food Composition Analysis*, 21, 589-598.
- JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; JIMÉNEZ-JIMÉNEZ, I. ; SÁNCHEZ-MORENO, C. & SAURA-CALIXTO, F. (2000). Evaluation of free radical scavenging of dietary carotenoids by the stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1686-1890.
- JIN, W. & JIANG, L. (2002). Measurement of ascorbic acid in single human neutrophils by capillary zone electrophoresis with electrochemical detection. *Electrophoresis*, 23, 2471-2476.
- JUNG, C.H.; SEO, H.M.; CHOI, I.W.; PARK, M.W. & CHO, H.Y. (2006). Antioxidant properties of various solvent extracts from wild ginseng leaves. *Lebensmittel Wissenschaft und Technology*, 39, 266-274.
- KATALINIC, V.; MILOS, M.; MODUN, D. & BOBAN, M. (2004). Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+) – catechin. *Food Chemistry*, 86, 596-600.
- KOSAR, M.; KAFKAS, E.; PAYDAS, S. & BASER, K.H.C. (2004). Phenolic Composition of Strawberry Genotypes at Different Maturation Stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1586-1589.
- KULKARNI, A.P. & ARADHYA, S.M. (2005). Chemical changes and antioxidant activity in pomegranate arils during fruit development. *Food Chemistry*, 93, 319-324.
- KULKARNI, A.P.; ARADHYA, S.M. & DIVAKAR, S. (2004). Isolation and identification of a radical scavenging antioxidant – punicalagin from pith and carpellary membrane of pomegranate fruit. *Food Chemistry*, 87, 551-557
- KUSKOSKI, E.A.; ASUERO, A.G.; TRONCOSO, A.M. MANCINI-FILHO, J. & FETT, R. (2005). Aplicação de diversos métodos químicos para determinar atividade antioxidante em pulpa de frutos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25, 726-732.
- LIAO, T.; JIANG, C.M.; WU, M.C.; HWANG, J.Y. & CHANG, H.M. (2001). Quantification of L-ascorbic acid and total ascorbic acid in fruits and spinach by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis*, 22, 1484-488.
- LIAO, T.; WU, J.S.B.; WU, M.C. & CHANG, H.M. (2000). Epimeric Separation of L-Ascorbic Acid and D-Isoascorbic Acid by Capillary Zone Electrophoresis. *Journal of Food Chemistry*, 48, 37-41.
- LOPES, R.L.T. (2007). Dossiê Técnico: Fabricação de Geléias. *Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais – CETEC*, maio.
- LÓPEZ M.; MARTÍNEZ F.; DEL VALLE C.; ORTE C. & MIRO M. (2001). Analysis of phenolic constituents of biological interest in red wines by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 922, 359-363.
- MCERLAIN, L.; MARSON, H.; AINSWORTH, P. & BURNETT, S.A. Ascorbic acid loss in vegetables: adequacy of a hospital cook–chill system. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 52, 205-211.

- MALOVANÁ, S.; GARCIA MONTELONGO, F.J.; PÉREZ, J.P. & RODRIGUEZ-DELGADO, M.A. (2001). Optimization of sample preparation for the determination of *trans*-resveratrol and other polyphenolic compounds in wines by high performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 428, 245-253.
- MARGOLIS, S.A. & SCHAPIRA, R.M. (1997). Liquid chromatographic measurement of L-ascorbic acid and Dascorbic acid in biological samples. *Journal of Chromatography B*, 690, 25-33.
- MATILLA, P.; ASTOLA, J.; KUMPULAINEN, J. (2000). Determination of Flavonoids in Plant Material by HPLC with Diode-Array and Electro-Array Detections. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5834-5841.
- MATSUBARA, S. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. (2006). Teores de catequinas e teaflavinas em chás comercializados no Brasil. *Ciências e Tecnologia de Alimentos*, 26, 401-407.
- MIRA, L.; FERNANDEZ, M.T.; SANTOS, M.; ROCHA, R.; FLORENCIO, M.L. & JENNINGS, K. (2002). Interactions of Flavonoids with Iron and Copper Ions: A Mechanism for their Antioxidant Activity. *Free Radical Research*, 36, 1199-1208.
- MOLNÁR-PERL, I.; FÜZFAI, Z. (2005). Chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrochromatographic techniques in the analysis of flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 1073, 201-227.
- PENG, Y.; LIU, F.; YE, J. (2006). Quantitative and qualitative analysis of flavonoid markers in *Fucus aurantii* of different geographical origin by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Journal of Chromatography B*, 830, 224-230.
- PIETTA, P.G.; MAURI, P.L.; RAVA, A. (1991). Application of micellar electrokinetic capillary chromatography to the determination of flavonoid drugs. *Journal of Chromatography*, 549, 367-341.
- PRADO, M.; BOAS, L.V. e GODOY, H. (2002). Controle analítico de corantes artificiais em bebidas alcoólicas por Eletroforese Capilar. *Analytica*, 1, 52-56.
- PRADO, M.A. & GODOY, H.T. (1998). Determinação dos corantes artificiais em pó para gelatina por CLAE. *Anais do XVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Rio de Janeiro, RJ, BR.
- SÁDECKÁ, J. & POLONSKÝ, J. (2001). Determination of ascorbic and isoascorbic acid in beverages and additives to meat products by capillary isotachopheresis. *European Food Research Technology*, 212, 511-517.
- SÁNCHEZ-MATA, M.C.; CÁMARA-HURTADO, M.; DÍEZ-MARQUÉS, C. & TORIJA-ISASA, M.E. (2000). Comparison of high-performance liquid chromatography and spectrofluorimetry for vitamin C analysis of green beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *European Food Research Technology*, 210, 220-225.
- SAUCIER, C.T. & WATERHOUSE, A.L. (1999). Synergetic Activity of Catechin and Other Antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4649-4652.
- SIKORA, E.; CIESLIK, E. & LESZCZYŃSKA, T. (2008). The antioxidant activity of selected cruciferous vegetables subjected to aquathermal processing. *Food Chemistry*, 107, 55-59.
- SILVA, J.A.F. (2003). Detecção eletroquímica em eletroforese. *Química Nova*, 26, 56-64.

- SILVA, J.A.F.; COLTRO, W.K.T.; CARRILHO, E. & TAVARES, M.F.M. (2007). Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares. *Química Nova*, 30, 740-744.
- TANG, Y. & WU, M. (2005). A quick method for the simultaneous determination of ascorbic acid and sorbic acid in fruit juices by capillary zone electrophoresis. *Talanta*, 65, 794-798.
- TAVARES, M.F.M., JAGER, A.V. & SILVA, C.L. (2003). Applications of capillary electrophoresis to the analysis of compounds of clinical, forensic, cosmetological, environmental, nutritional and pharmaceutical importance. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 14, 281-290
- TRIPOLI, E.; LA GUARDIA, M.; GIAMMANCO, S.; DI MAJO, D. & GIMMANCO, M. (2007) *Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. Food Chemistry*, 104, 466-479.
- VERSARI, A.; MATTIOLI, A.; PARPINELLO, G.P. & GALASSI, S. (2004). Rapid analysis of ascorbic and isoascorbic acids in fruit juice by capillary electrophoresis. *Food Control*, 15, 355-358.
- VOLPI, N. (2005). Separation of flavonoids and phenolic acids from propolis by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis*, 25, 1872-1878.
- WANG, C.C. & WU, S.M. (2006). Simultaneous determination of l-ascorbic acid, ascorbic acid-2-phosphate magnesium salt, and ascorbic acid-6-palmitate in commercial cosmetics by micellar electrokinetic capillary electrophoresis. *Analytica Chimica Acta*, 576, 124-129.
- WANG, S.P. & HUANG, K.J. (2004). Determination of flavonoids by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 1032, 273-279.
- WATANABE, T.; YAMAMOTO, A.; NAGAI, S. & TERABE, S. (1998). Micellar electrokinetic chromatography as an alternative to high-performance liquid chromatography for separation and determination of phenolic compounds in Japanese spirituous liquor. *Journal of Chromatography A*, 793, 409-413.
- WOLKOFF, D.B. (2004). Estudo da estabilidade de repositores hidroeletrólitos formulados à base de sucos clarificados de acerola e caju. Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, BR.
- XU, X.; YE, H.; WANG, W.; YU, L. & CHEN, G. (2006). Determination of flavonoids in *Houttuynia cordata* Thunb. and *Saururus chinensis* (Lour.) Bail. by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Talanta*, 68, 759-764.
- YANEZ, J.A.; ANDREWS, P.K. & DAVIES, N.M. (2007). Methods of analysis and separation of chiral flavonoids. *Journal of Chromatography B*, 848, 159-181.
- ZINELLU, A.; CARRU, C.; SOTGIA, S. & DEIANA, L. (2004). Optimization of ascorbic and uric acid separation in human plasma by free zone capillary electrophoresis ultraviolet detection. *Analytical Biochemistry*, 330, 298-305.

CAPÍTULO II.

OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA COLORIMÉTRICA PARA A DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO PRESENTE EM GELÉIAS DE FRUTAS.

Resumo

A metodologia indicada pela AOAC (1997) para a determinação de Vitamina C em sucos e preparados emprega uma titulação com o indicador 2,6-diclorofenol-indofenol. Esta técnica apresenta dificuldades quando são analisadas amostras com intensa coloração. Tendo em vista a necessidade de uma metodologia mais adequada para estas amostras, modificações ao método tradicional foram feitas e a eficácia das mesmas foi comprovada. Testes comparativos foram realizados entre a metodologia original, a modificada e um método cromatográfico. Dez diferentes geléias de frutas foram analisadas e as modificações propostas foram satisfatórias, ao passo que os resultados foram mais semelhantes aos obtidos pelo método cromatográfico. O sistema apresentou-se linear, repetitivo (desvio padrão relativo de 2,50%), com alta recuperação (102,10%), e uma economia de 92,88% de reagentes em relação à metodologia inicial. Foram encontradas concentrações entre zero e 608 mg de ácido ascórbico por 100 g de amostra.

Palavras chaves: ácido ascórbico, 2,6-diclorofenol-indofenol, geléias.

OPTIMIZATION OF A COLORIMETRIC METHOD TO DETERMINE OF ASCORBIC ACIDS IN FRUIT JELLIES.

Abstract

The AOAC (1997) standard methodology for determination of Vitamin C in juices and preparations employs a titration with the indicator 2,6-dichloro-indophenol. This technique presents difficulties when the analyzed samples have intense coloration. Considering the need for a more adequate methodology to deal with these samples, adaptations on the traditional method were performed and their efficacy was verified. Comparative tests were performed between the standard methodology, the modified methodology and the Chromatography method. Ten different jelly fruits were analyzed and the proposed modifications were considered satisfactory, because these results were similar to the chromatographic results. The system proved to be linear, repeatable (standard relative derivation of 2.50%), with high recovery (102.10%) and an economy of 92.88% of reagents in relation of the initial method. The concentrations were between 0 to 608 mg of ascorbic acid per 100 g of sample.

Keywords: Ascorbic Acids, 2,6-dichlorophenol-indophenol, jellies.

1. Introdução

Em 1937, Albert Von Szent Györgyi, ganhou o premio Nobel pela descoberta de um composto capaz de curar o escorbuto, uma enfermidade comum na época. Essa substância é hoje conhecida por ácido ascórbico (AA) ou Vitamina C. Apresenta características nutricionais importantes ligadas ao metabolismo humano, porém, atualmente, o maior interesse por esse ácido está voltado à sua capacidade antioxidante (Barata-Soares et al., 2004; Neves et al., 2008). No organismo, atua capturando radicais livres tóxicos e outras espécies reativas de oxigênio, impedindo reações associadas a diversos danos e doenças, como as cardiovasculares, certas complicações pré-natais, tumores malignos, inflamações, catarata, Mal de Parkinson e Alzheimer, bem como aceleração do processo de envelhecimento celular (Sikora, Cieslik e Leszczynska, 2008). Casos de toxicidade envolvendo a ingestão de Vitamina C são poucos, uma vez que se trata de uma vitamina hidrossolúvel e é regularmente excretada pelo corpo, no entanto, doses excessivas podem estar relacionadas a cálculos renais e, em casos mais raros, à anemia, causada pela interferência na absorção de vitamina B₁₂ (Wolkoff, 2004).

Grande parte do suprimento de AA da dieta humana é proveniente de frutas e vegetais (Barata-Soares et al., 2004; Lopez et al., 2005). O teor desta vitamina nos alimentos pode variar bastante de acordo com o plantio, incidência solar, estágio de maturação, manuseio pós-colheita, entre outros (Arrigoni e Tullio, 2002; Cordenunsi et al., 2002; Lopez et al., 2005). Kulkarni e Aradhya (2005), em suas pesquisas, analisaram tal variação na fruta romã (*Punica granatum*) durante os estágios de maturação e verificaram uma diminuição no teor deste ácido e de fenólicos em contraposição a um aumento de açúcares totais e antocianinas.

Yamashita e colaboradores (2003) analisaram a estabilidade do AA presente em acerola (*Malpighia glabra*) frente a processos industriais e verificaram que a degradação foi proporcional à temperatura empregada, isto é, quanto maior a temperatura, maior a perda de AA. A incidência de luz, a presença de oxigênio e de compostos metálicos e a atividade de água alta também podem acelerar reações de degradação por oxidação (Gabas, Telis-Romero e Menegalli, 2003). Além da perda nutricional, essa degradação é muitas vezes responsável por alterações durante a estocagem de alimentos, limitando sua vida de

prateleira, por meio da formação de compostos intermediários, como o furfural. Processamentos de alimentos, para manterem a quantidade de AA, devem então ser realizados de modo a evitar tais degradações (Al-Zubaidy e Khalil, 2007).

Há muitos métodos que permitem a identificação e a quantificação de AA. Os biológicos foram os primeiros a serem desenvolvidos e inicialmente se destinavam a determinar a quantidade necessária desta vitamina para se prevenir o escorbuto. Como são métodos demorados, de alto custo e pouco repetitivos, perderam campo e são pouco utilizados na atualidade. Hoje os métodos químicos são os mais empregados (Aldrigue, 1998; Emadi-Konjin et al., 2005).

Tillmans (1927), citado por Aldrigue (1998), foi o responsável por desenvolver uma metodologia colorimétrica muito empregada pela comunidade científica. Trata-se de uma titulação utilizando o indicador 2,6-diclorofenol-indofenol (DCFI). Neste procedimento, o AA reduz o DCFI a uma solução incolor e, no ponto final da titulação, o excesso do indicador não reduzido confere coloração rosa à solução ácida, o que indica o ponto final da reação a olho nu, mas este também pode ser verificado eletrometricamente ou fotometricamente. A técnica é de fácil aplicação e baixo custo, principalmente quando comparada a técnicas cromatográficas, por exemplo.

O uso do DCFI é freqüente, tanto para a análise de produtos alimentícios quanto para produtos farmacêuticos e cosméticos, além de ser empregado como base de comparação para novas metodologias. Esta técnica é ainda aquela indicada pela AOAC (1997) para a determinação da Vitamina C em preparados e sucos de frutas.

Aldrigue (1998), em seu estudo, avaliou diversos meios para se quantificar Vitamina C em polpa de acerola: a) método espectrofotométrico; b) método volumétrico usando Iodato de Potássio; c) método de Tillmans, e; d) Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Quando comparou em porcentagem a recuperação do AA, o autor verificou que o método de Tillmans foi aquele que mais se aproximou dos dados obtidos para CLAE, considerando-o então, o mais adequado entre os convencionais para a determinação de AA nestas amostras.

Apesar da eficiência e do grande uso, o método de Tillmans apresenta dificuldades quando são analisadas amostras de intensa coloração, como no caso de frutas, geléias, sucos e outros. A coloração natural da amostra interfere na visualização do ponto final (Aldrigue,

1998; Jain, Ghaurasia e Verma, 1995). O presente trabalho visou desenvolver e quantificar a Vitamina C presente em algumas geléias de frutas com intensa coloração. Modificações ao método original foram propostas e os resultados foram comparados entre si e também com os resultados obtidos por CLAE.

2. Experimento

2.1. Reagentes

Foi utilizado ácido L-ascórbico da marca Synth e brometo de hexadecil-trimetil amônio (citrimida) da Sigma. O radical livre 2,6-diclorofenol-indofenol (DCFI) foi obtido junto à Fluka, enquanto o fosfato de sódio anidro dibásico, acetato de sódio cristalino, bicarbonato de sódio, ácido meta-fosfórico e ácido orto-fosfórico foram obtidos da Merck. O etileno diamino tetraacético sódico (EDTA) foi da marca Reagen.

2.2. Extração das amostras

Foram utilizadas amostras de 10 geléias diferentes, cedidas pelo fornecedor Klaus J. G. Bouillon ME, Indaiatuba - São Paulo: geléias de acerola com morango (A1), laranja (A2), rosela (A3), acerola com goiaba (A4), acerola com flor de groselha (rosela) (A5), acerola com maná (A6), acerola com maracujá (A7), acerola (A8), acerola com banana (A9) e goiaba com rosela (A10). Logo após o recebimento, as amostras foram armazenadas sob refrigeração em frascos de coloração âmbar. As extrações foram realizadas individualmente e imediatamente antes das titulações, de modo a minimizar a exposição a agentes degradantes. A metodologia original foi realizada segundo o indicado pela AOAC (967.21, 1997) com modificações: 0,5 g de amostras foram homogeneizadas em 50 mL de ácido meta-fosfórico 1% por 3 minutos (extrato 1). Para a análise pelo método 2, esta solução foi centrifugada por 5 minutos a 3000 g (extrato 2). Para a análise por CLAE, a solução resultante foi filtrada em poros de 45 µm.

2.3. Quantificação por titulação direta (método I)

A solução extraída foi titulada com DCFI (50 mg de DCFI e 20 mg de bicarbonato de sódio em 100 mL de água destilada). O indicador DCFI foi padronizado com 10 mL de uma solução padrão de $100\mu\text{g mL}^{-1}$ de ácido L-ascórbico. O ponto final da titulação foi definido no momento em que a solução titulada apresentou coloração rosa, reservando-se um período de 15 segundos para a confirmação do ponto de viragem. Para o cálculo da quantidade de AA presente na amostra foi aplicada a seguinte equação:

$$C = \frac{V \times f \times 100}{m}$$

Equação II-1

Sendo que,

$$f = \frac{10 \times c}{p}$$

Equação II-2

Onde “C” é a quantidade de AA (mg) presente em 100 g de amostra; “c” é a concentração da solução de AA (mg mL^{-1}) usada na padronização do DCFI; “p” é o volume (mL) de indicador - DCFI utilizado na padronização, reagindo com 10 mL de solução padrão de AA; “V” é o volume (mL) de indicador - DCFI utilizado na titulação do extrato de amostra, e; “m” é a quantidade de amostra (A) utilizada na extração.

2.4. Quantificação por titulação inversa (método II)

O extrato centrifugado da amostra (extrato 2) foi usado para titular uma solução de 2 mL de indicador DCFI e 18 mL de água destilada. O ponto final da titulação foi definido no momento em que a solução titulada apresentou coloração idêntica à solução titulante (amostra diluída em ácido meta-fosfórico e centrifugada), reservando-se um período de 15

segundos para a confirmação do ponto de viragem. Para o cálculo da quantidade de AA presente na amostra foi aplicada a seguinte equação:

$$C = \left(\frac{p \times c \times 50}{V \times m} \right) \times 100$$

Equação II-3

Onde “C” é a quantidade de AA (mg) presente em 100 g de amostra; ‘c’ é a concentração de AA (mg mL⁻¹) usada na padronização do DCFI; “p” é o volume (mL) de solução de AA usado na padronização do DCFI; “V” é o volume (mL) de extrato de amostra utilizado durante a titulação, e; “m” é a quantidade de amostra utilizada na extração.

2.5. Equipamento e condições Cromatográficas (método III)

A determinação por CLAE utilizou o equipamento da Hewlett-Packard série 1050 com detector de arranjo de diodos a 265 nm, com coluna Waters Spherisorb ODS-2 (250 mm x 4,6 mm). A fase móvel apresentou 2,3 mmol L⁻¹ de citrimida, 2,5 mmol L⁻¹ de EDTA sódico, 80 mmol L⁻¹ de fosfato de sódio anidro dibásico e 20 mmol L⁻¹ de acetato de sódio, ajustado para pH 4,5 com ácido orto-fosfórico, e vazão de 0,8 mL min.⁻¹. Este método foi desenvolvido e validado no Capítulo III.

2.6. Validação da metodologia desenvolvida

Foram realizados ensaios de linearidade, repetibilidade e recuperação para o método desenvolvido visando verificar a eficiência do mesmo. A linearidade foi avaliada construindo-se duas curvas analíticas: uma variando a quantidade de DCFI empregada (de 1 a 10 mL) e outra variando a concentração da solução padrão de ácido ascórbico analisada (1 a 10 mg mL⁻¹). A repetibilidade foi feita para duas concentrações de ácido ascórbico e também para uma amostra. As análises foram realizadas por decuplicatas. A recuperação (REC) foi verificada em dois níveis de concentração (1 e 10 mg) e calculada de acordo com

a Equação II-4, na qual, “C_i” é a concentração já existente do composto na matriz e “C_f” é a quantidade analisada após a fortificação e “C_a” é a concentração de ácido ascórbico adicionada (Equação II-4).

$$REC = \frac{C_f - C_i}{C_a} \times 100$$

Equação II-4

3. Resultados e discussão

O estudo, inicialmente, buscava apenas verificar a quantidade de AA presente nas amostras de geléias de frutas por meio da metodologia indicada pela AOAC (1997), porém, durante o decorrer das análises, houve dificuldade em se aplicar tal procedimento para amostras de intensa coloração. Outro problema foi quanto à necessidade de extração das amostras, uma vez que são sólidas e a metodologia inicial foi desenvolvida para alíquotas líquidas (sucos e preparado).

Como a Vitamina C é um composto de grande instabilidade frente à temperatura, luz e também ao oxigênio, para resultados precisos, foi necessário que os agentes degradantes tivessem sua ação minimizada. Sendo assim, as amostras foram armazenadas sob refrigeração (aproximadamente 4°C), em frascos-âmbar bem vedados e com ausência de luz. A extração foi realizada imediatamente antes da titulação e as análises se procederam em ambiente com pouca luz.

A metodologia indicada pela AOAC (1997) prevê o uso de ácido oxálico como solução extratora, porém Aldrigue (1998), em seu estudo, verificou que esta etapa é mais eficiente quando se utiliza o ácido meta-fosfórico em substituição ao ácido oxálico ou apenas água. O ácido meta-fosfórico apresenta ainda a capacidade de precipitar proteínas e inativar enzimas do grupo oxidase. Deste modo, no presente estudo foi empregada a extração utilizando solução de ácido meta-fosfórico 1%. Este autor também verificou que quanto maior o tempo no qual a solução extratora entra em contato com a amostra, menor é a quantidade de AA detectada, este fato pode ser explicado pela alta instabilidade que a

Vitamina apresenta. Alto tempo de agitação pode favorecer a extração da matriz, porém favorece também sua degradação.

Em um primeiro ensaio foi adicionando o ácido meta-fosfórico 1% a 0,5 g de amostra e essa solução foi agitada manualmente, porém a amostra não se solubilizou totalmente, o que impede a eficiência do processo. A extração empregando um sonicador se mostrou mais adequada. Para evitar maiores degradações, um curto período foi proposto (3 minutos). Logo após este processo a titulação foi realizada.

Aydogmus e Cetin (2002) observaram que, apesar da determinação de AA por DCFI ser um método frequentemente utilizado e obter resultados rápidos, o reagente tem baixa estabilidade, podendo gerar resultados errôneos após longo período de preparo. Deste fato, surgiu a necessidade de se realizar uma padronização do DCFI antes de seu uso. A cada dia de trabalho uma nova padronização foi realizada, evitando erros devido a tais degradações. O valor obtido na padronização variou significativamente de um dia para outro, chegando a 20% de diferença, o que evidencia a necessidade do procedimento.

Como previsto, as determinações de AA segundo a metodologia I apresentaram dificuldade de visualização do ponto final da reação, principalmente para as geléias de intensa coloração rosa. A mudança da cor natural da amostra para uma coloração rosada foi por muitas vezes sutil, sendo que, conforme a cor natural é mais intensa, maior também é a dificuldade na análise. Um excesso de indicador DCFI foi necessário para que o ponto de viragem pudesse ser detectado visualmente, o que gera uma titulação com final mascarado. Ainda em relação ao ponto de viragem, a metodologia indica que a cor rosada deve permanecer por 15 segundos devido ao tempo de reação do DCFI com o AA. Em várias amostras a coloração permanecia durante estes 15 segundos, mas, após mais alguns segundos, desaparecia, gerando dúvidas sobre o ponto final da reação.

Outro problema na análise utilizando a metodologia I diz respeito a amostras com pequenas quantidades de AA. Estas utilizam um baixo volume de DCFI, chegando até a 0,3 mL, muito pouco para uma titulação em bureta. Esta observação implica que, para um volume maior de DCFI, é necessário utilizar maiores quantidades de amostras.

Tendo em vista que a mudança de uma coloração rosa para uma coloração incolor poderia facilitar a visualização do processo, inverteu-se a titulação, desenvolvendo-se a metodologia II. Neste caso, a amostra foi colocada na bureta utilizada para a titulação e o

reagente DCFI foi adicionado em um erlenmeyer, juntamente com água. A única alteração referente à preparação da amostra em relação ao procedimento anterior foi a inclusão da centrifugação, após a etapa de extração no sonificador, com a finalidade de se retirar maiores sedimentos que pudessem provocar entupimento da bureta.

Neste método, o ponto final da reação teve sua visualização significativamente facilitada: a coloração da solução titulada (DCFI + água) apresentou-se roxa, e, após algumas gotas de amostra (solução titulante), a coloração passou a ter um tom rosa intenso e foi clareando à medida que se adicionava amostra. O AA contido no extrato de geléia reduz o DCFI tornando-o incolor. No momento em que a coloração da solução titulada apresentar a mesma coloração da amostra titulante, não há mais DCFI para ser reduzido, ou seja, foi atingido o ponto final da análise. Esta nova forma de visualizar o ponto final é vantajosa, uma vez que a cor final da solução titulada é a mesma da titulante presente na bureta.

Amostras com colorações iniciais rosa intenso continuaram apresentando dificuldades de visualização do ponto final da reação ao olho nu, mesmo após estas modificações, como é o caso da amostra A3, mas também sua visualização do ponto final no método I foi impraticável.

Após a verificação da eficiência do método em facilitar a visualização do ponto final da titulação, a linearidade do mesmo foi avaliada frente à variação da quantidade de DCFI depositada no erlenmeyer, considerando uma solução de ácido ascórbico de concentração fixa. Na Figura II-1 é possível observar que o sistema apresentou uma linearidade indiscutível, ao ponto que o coeficiente de correlação (R^2) tem valor maior que 0,999 (Aquino et al., 2004).

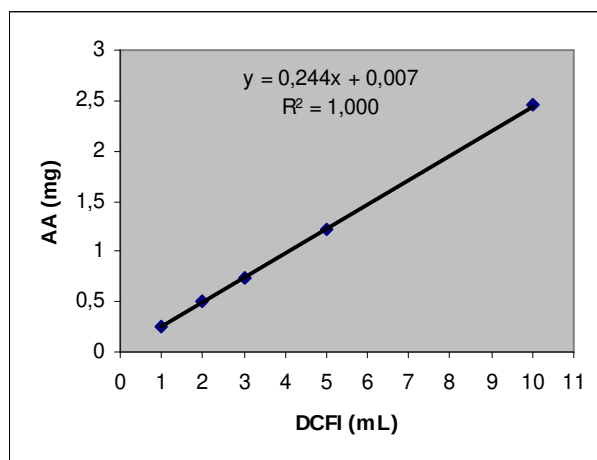


Figura II-1. Curva de linearidade obtida a partir da variação na quantidade de ácido ascórbico titulada com DCFI

A quantidade de solução de AA necessária para a titulação aumentou proporcionalmente ao aumento do volume de DCFI. Esta proporção está intimamente ligada à quantidade de ácido ascórbico que 1 mL de DCFI é capaz de titular. O coeficiente angular da curva analítica obtida no teste de linearidade é justamente essa razão entre AA e DCFI. Como consequência, extingue-se a necessidade da construção de uma curva analítica para a quantificação de AA dentro da faixa testada (0,07 a 2,5 mg), sendo necessária apenas a padronização da solução de DCFI com uma solução conhecida de AA. Este cálculo pode ser simplificado pela Equação II-3. O resultado deste tratamento de dados também permite que a quantidade de DCFI utilizada na análise possa ser variada com segurança, o que confere maior versatilidade ao sistema.

É importante observar também que a Equação II-3 trás como incógnita o volume de amostra utilizado na titulação e essa incógnita está situada no denominador da equação. Assim, quando a curva analítica de volume titulado versus concentração de AA na amostra é construída, obtém-se uma equação da ordem de $y = a/x$. Para essa equação, novamente uma boa linearidade é obtida, tendo-se, como coeficiente de correlação, o valor de 0,99 (Figura II-2).

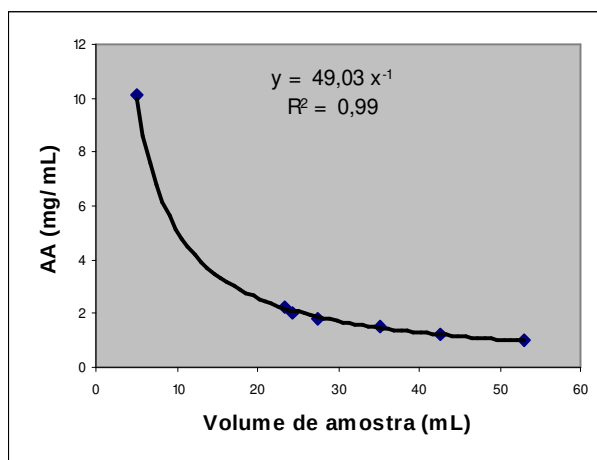


Figura II-2. Variação do volume de amostra titulado pelo método II versus concentração presente de AA na mesma amostra.

Durante o desenvolvimento da metodologia II, verificou-se que a solução a ser titulada deve apresentar um volume constante para que o método apresente repetibilidade aceitável. Ao variarmos a quantidade de DCFI, mantendo-se a quantidade de água fixa (por exemplo, 2 mL de DCFI com 18 mL de água e 5 mL de DCFI com os mesmos 18 mL de água), foi obtido um desvio padrão relativo de até 9% entre as replicatas de uma mesma amostra. Quando o mesmo estudo foi realizado mantendo-se um volume fixo de solução titulada (2 mL de DCFI + 18 mL de água e 5 mL de DCFI + 15 mL de água), as replicatas de uma mesma amostra tiveram erros mais baixos.

Em análises preliminares, amostras com baixa concentração de AA necessitaram de maior quantidade de solução titulante (amostra extraída), dificultando em parte a visualização do ponto final da reação, uma vez que a cor rosada apresentada quando ainda há DCFI não reduzido na solução ficou extremamente diluída. Este problema pode ser facilmente resolvido aumentando-se a concentração de amostra ou diminuindo-se a quantidade de DCFI. Esta última opção é a mais fácil de ser realizada ao passo que a amostra já foi extraída e a concentração após a extração pode ocasionar perdas significativas na quantidade de AA. Esta alteração na quantidade de DCFI usada na análise pode ser facilmente realizada no método II, diminuindo-se apenas os 2 mL empregados no erlenmeyer. Já para o método I, seria necessário realizar uma diluição do DCFI, alterando sua concentração, o que necessitaria de uma nova padronização.

Como exemplo desta situação, a “A1” demonstrou ter maior quantidade de AA que a amostra “A9”, e, para titular 2 mL de DCFI, foi necessário um volume de 6,9 mL de extrato. A amostra “A9”, no entanto, necessitou de grande volume de extrato (17,8 mL) (Tabela II-1). Para as amostras em questão a quantidade de DCFI não precisou ser alterada, uma vez que foi preparado um extrato de 50 mL de cada.

Tabela II-1: Concentrações e desvios padrões relativos (DPR) de AA, segundo as metodologias empregadas, presentes em 100 g de amostras. Índices A^{a, b, c} relativos ao teste estatístico “t de student”.

Amostra	Padrão		Adaptado		CLAE	
	Média (mg/100g)	DPR (%)	Média (mg/100g)	DPR (%)	Média (mg/100g)	DPR (%)
A1	192 ^a	4	204 ^a	4	334 ^b	2
A2	3 ^a	30	70 ^b	7	146 ^c	2
A3	288 ^a	3	1 ^b	8	0 ^c	-
A4	203 ^a	1	200 ^a	2	297 ^b	3
A5	159 ^a	2	193 ^b	2	320 ^c	1
A6	186 ^a	1	172 ^a	4	274 ^b	2
A7	291 ^a	2	315 ^b	2	381 ^c	1
A8	192 ^a	2	449 ^b	1	608 ^c	3
A9	77 ^a	5	101 ^b	1	123 ^c	1
A10	32 ^a	3	33 ^b	1	161 ^c	1

Foi verificada também a resposta da metodologia frente à variação na quantidade de AA. Neste caso, fixou-se a quantidade de 2 mL de DCFI e 18 mL de água e variou-se a quantidade de AA em solução. Como a quantidade de DCFI é constante, a quantidade de AA titulada é a mesma, variando então apenas o volume utilizado para cada diluição. Os resultados apresentaram um desvio padrão relativo de 3,3%, confirmando a eficiência do método em determinar várias quantidades de AA em amostras, não importando a concentração das mesmas, dentro da gama de ensaios realizados (de 0,07 a 2,5 mg de AA).

O teste de repetibilidade do método foi realizado titulando-se 10 soluções de 3 mg mL⁻¹ de AA e outras 10 de concentração 10 mg mL⁻¹ de AA. Os resultados apresentaram erros de apenas 1,14% e 1,50%, respectivamente. A repetibilidade foi também avaliada

repetindo-se por 10 vezes a extração e a análise da amostra “A5”. Um desvio padrão relativo de 2,51 % foi encontrado. A taxa de recuperação do sistema retornou valores entre 99 e 101%, sendo considerada adequada.

Diante dos bons resultados obtidos, as análises das amostras de geléias de frutas foram realizadas em triplicatas, aplicando-se os três métodos. A média dos resultados obtidos e o desvio padrão relativo correspondente para cada amostra podem ser visualizados na Tabela II-1.

Para verificar estatisticamente qual a melhor metodologia a ser empregada para as amostras em questão, foi realizado o Teste t de Student. Além de serem comparados entre si, os métodos I e II foram comparados ao método III. Por se tratar de uma técnica instrumental validada, as análises por CLAE podem ser consideradas mais precisas que as realizadas por métodos de bancada que estão sujeitos a maiores erros do operador e instrumentação, além de maior susceptibilidade a agentes degradantes, uma vez que ocorrem em um sistema aberto, com presença de luz. Os resultados deste teste podem ser observados na Tabela II-1.

Todos os métodos de determinação de Vitamina C indicaram a presença deste composto na amostra “A1”. O teste t verificou que os resultados obtidos no método I foram iguais ao método II, porém, ambos os métodos se diferem do método III. Este mesmo comportamento pode ser observado para as amostras “A4” e “A6”.

A amostra “A2” apresentou uma quantidade muito baixa de Vitamina C, tanto para o método I como para o II, porém em quantidades diferentes entre si e também em comparação com o método III. Entre os métodos que empregam o reagente DCFI, o segundo foi aquele que mais se aproximou dos resultados obtidos pelo método cromatográfico.

No caso da amostra “A3”, pode-se verificar como a coloração rosa de uma amostra interfere significativamente na eficácia do método I. O ponto final da titulação foi mascarado pela coloração, uma vez que foi necessário grande excesso de DCFI para ser verificado o ponto de viragem. Este fato foi minimizado no método II. O teste estatístico indicou que todas as respostas são diferentes entre si, porém o método III retornou valores não detectáveis para a quantidade de AA encontrada e também para a variância. Observando os valores, fica claro que o método II se aproxima mais do método III do que o

método I. Com isso, para esta amostra, o método II também foi mais eficiente que o método I.

As amostras “A5”, “A7”, “A8”, “A9” e “A10” apresentaram comportamentos parecidos com o da amostra “C”, uma vez que as quantidades de ácido ascórbico diferiram entre si, porém os valores indicados no método II foram mais próximos dos resultados do método III do que os do método I.

Em resumo, a partir das observações feitas para cada teste estatístico, pode-se inferir que o método II trás vantagens para a maioria das amostras com intensa coloração verificadas, quando comparado com o método I, uma vez que as respostas se aproximam mais do método utilizado como padrão de comparação (método III). Mas também se pode verificar que ambos os métodos ainda não apresentaram resultados equivalentes ao método III.

Outra vantagem do método II é a menor utilização do reagente DCFI, ou seja, houve uma menor geração de resíduos em relação ao método I. Se compararmos a quantidade utilizada para a determinação de Vitamina C em todas as amostras do presente estudo, foi necessário em torno de 281 mL de solução de DCFI para o método I, enquanto o método II usou apenas 20 mL, ou seja, uma economia de aproximadamente 93% de solução de DCFI.

Quanto ao resíduo gerado pelos testes, os extratos de amostras não utilizados são apenas soluções ácidas que podem ser descartadas após neutralização, assim, o resíduo a ser tratado com maior ênfase consiste nas soluções que apresentam DCFI. Para o método II este volume é, em média, 25 ml por replicata, já no método I, este resíduo fica em torno de 55 ml. A menor produção de resíduos também consiste em uma vantagem do método II.

4. Conclusão

O método desenvolvido no presente estudo demonstrou ser confiável e apresentou vantagens em relação ao método original indicado pela AOAC (1997), quando ambos são comparados ao método cromatográfico. A quantidade de reagentes utilizados no método desenvolvido diminuiu consideravelmente em relação ao anterior, diminuindo também a quantidade de resíduo gerado. A avaliação da eficiência da metodologia foi realizada de modo que sua repetibilidade foi satisfatória tanto para a amostra e quanto para soluções de padrões individuais. A quantidade de Vitamina C encontrada nas geléias variou de “não detectado” a 608 mg de ácido ascórbico por 100 g de amostra. De acordo com o apresentado, pode-se afirmar que o objetivo do presente trabalho foi concluído, de modo que a determinação empregando o indicador DCFI foi facilitada, permitindo que amostras de intensa coloração fossem analisadas com maior precisão, porém ainda há problemas quando se analisam amostras de coloração rosa intenso.

5. Referências

- ALDRIGUE, M.L. (1998) *Desenvolvimento e validação de metodologia analítica, utilizando a CLAE, para determinação de Vitamina C em frutas e seus principais produtos*. Tese (Doutor em Ciência de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, BR.
- AL-ZUBAIDY, M. M. I. & KHALIL, R. A. (2007) Kinetic and prediction studies of ascorbic acid degradation in normal and concentrate local lemon juice during storage. *Food Chemistry*, 101, 254-259.
- AOAC, *Association of Official Analytical Chemists* (1997), Foehnington D. C., 2, 16-17.
- AQUINO, F.W.B.; AMORIM, A.G.; PRATA, L.F. & NASCIMENTO, R.F. (2004). Determinação de aditivos, aldeídos furânicos, açúcares e cafeína em bebidas por cromatografia líquida de alta eficiência: validação de metodologias. *Ciência e tecnologia de alimentos*, 24, 32-38
- ARRIGONI, O. & TULLIO, M. (2002). Ascorbic acid: much more than an antioxidant. *Biochemical et Biophysical Acta*, 1569, 1-9.
- AYDOGMUS, Z. & CETIN, S.M. (2002) Determination of Ascorbic Acid in Vegetables by Derivative Spectrophotometry. *Turkish Journal of Chemistry*, 26, 697-704.
- BARATA-SOARES, A.D.; GOMEZ, M.L.P.A.; MESQUITA, C.H. & LAJOLO, F.M. (2004). Ascorbic acid biosynthesis: a precursor study on plants. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 16, 147-154.
- CORDENUNSI, B. R.; NASCIMENTO, J. R. O.; GENOVESE, M. I. & LAJOLO, F. M. (2002) Influence of Cultivar on Quality Parameters and Chemical Composition of Strawberry Fruits Grown in Brazil. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 50, 2581-2586.
- EMADI-KONJIN, P.; VERJEE, Z.; LEVIN, A.V. & ADELI, K. (2005) Measurement of intracellular vitamin C levels in human lymphocytes by reverse phase high performance liquid chromatography (HPLC). *Clinical Biochemistry*, 38, 450-456.
- GABAS, A.L.; TELIS-ROMERO, J.; MENEGALLI, F.C. (2003). Cinética de degradação do ácido ascórbico em ameixas liofilizadas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 23, 66-70.
- JAIN, A.; GHOURASIA, A. & VERMA, K.K. (1995). Determination of Ascorbic acid in Soft Drinks, Preserved fruit juices and pharmaceuticals by flow injection spectrophotometry: matrix absorbance correction by treatment with sodium hydroxide. *Talanta*, 42, 779-787.
- KULKARNI, A.P. & ARADHYA, S.M. (2005). Chemical changes and antioxidant activity in pomegranate arils during fruit development. *Food Chemistry*, 93, 319-324.
- LOPEZ, A.; MONTAÑO, A.; GARCIA, P. & GARRIDO, A. (2005). Quantification of Ascorbic Acid and Dehydroascorbic Acid in Fresh Olives and in Commercial Presentations of Table Olives. *Food Science and Technology International*, 11, 199-204.
- NEVES, L. C.; BENEDETTE, R. M.; SILVA, V. X.; VIEITES, R. L. & ROBERTO, S. R. (2008). Dano de frio em limas-cidas tahiti, colhidas em diferentes pocas e submetidas a tratamentos trmicos e bioquimicos. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 30, 377-384.

- SIKORA, E.; CIESLIK, E. & LESZCZYNSKA, T. (2008). The antioxidant activity of selected cruciferous vegetables subjected to aquathermal processing. *Food Chemistry*, 107, 55-59.
- WOLKOFF, D.B. (2004). Estudo da estabilidade de repositores hidroeletrolítico formulado à base de sucos *clarificados de acerola e caju*. Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, BR.
- YAMASHITA, F.; BENASSI, M.T.; TONZAR, A.C.; MORIYA, S. & FERNANDES, J.G. (2003). Produtos de acerola: Estudo da estabilidade de Vitamina C. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 23, 92-94.

CAPÍTULO III.

IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO L-ASCÓRBICO E ÁCIDO D-ISOASCÓRBICO EM GELÉIAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.

Resumo:

A Vitamina C, também conhecida como ácido ascórbico, apresenta elevado potencial antioxidante e importantes funções nutricionais. Atua auxiliando na captura de radicais livres tóxicos e outras espécies reativas de oxigênio, o que pode prevenir diversos danos e doenças em tecidos e processos de envelhecimento. Pode ser encontrado em diversas formas isoméricas, cada uma com diferentes potenciais antioxidantes e diferentes atividades pró-vitamínicas C. O presente estudo desenvolveu uma metodologia por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para identificar e quantificar dois diferentes isômeros do ácido ascórbico: ácido L-ascórbico (LAA) e ácido D-isoascórbico (DIAA). O DIAA apresenta apenas 5% da atividade pró-vitamínica C que o LAA. O método apresentado separou eficientemente esses dois isômeros, com boa seletividade e linearidade (r^2 acima de 0,99). O teste de repetibilidade resultou em um desvio padrão relativo abaixo de 2%. A recuperação ficou entre 87 e 105%. Os limites de detecção e quantificação foram 7 e 21 mg L⁻¹ para o LAA. Estes mesmos limites foram 5 e 14 mg L⁻¹ para o DIAA. Alguns parâmetros foram estabelecidos neste estudo com a intenção de prevenir a degradação destes compostos nas amostras. DIAA não foi encontrado nas amostras analisadas, já LAA foi encontrado em quase todas as amostras, chegando a uma concentração de 608 mg em 100 g de geléia de acerola.

Palavras-chave: ácido L – ascórbico, ácido D-isoascórbico, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, geléia de frutas.

IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION OF L-ASCORBIC ACID AND D-ISOASCORBIC ACID IN JELLIES BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY.

Abstract:

The Vitamin C, also called ascorbic acid, has high potential anti-oxidative and important nutritional functions. It may assist in the capture of free radicals toxic and others species reactive of oxygen, that can prevent diverse damage and diseases in the tissues and the process of oldness. It should be emphasized that this compound can be found in different isomeric forms in nature, with different potential antioxidant and with different activity pro-vitamin C. This work developed a methodology by High Performance Liquid Chromatography to detect and quantify two isomers of ascorbic acid: L-ascorbic acid (LAA) and D-isoascorbic acid (DIAA). The DIAA has 5% of activity pro-vitamin C of the LAA. This method showed a good selectivity and linearity (r^2 above 0,99). The test of repeatability showed relative standard deviation below 2%. The recovery rate was between 87 and 105%. The limits of detection and quantification were 7 and 21 mg/L, respectively, for LAA. These limits were 5 and 14 mg L⁻¹, for DIAA, respectively. Some parameters were established in this study to avoid the degradation of these compounds in the samples. DIAA was not found in the analyzed samples. LAA was found in almost samples, with concentrate up to 608 mg of LAA in 100 g of acerola jelly.

Keywords: L – ascorbic acid, D-isoascorbic acid, High Performance Liquid Chromatography, jellies fruits.

1. Introdução:

O ácido ascórbico ficou conhecido pela sua capacidade de prevenir o escorbuto (Barata-Soares et al., 2004). Atualmente, a ciência tem demonstrado maior interesse em sua capacidade antioxidante, a qual lhe torna capaz de ajudar na captura de radicais livres tóxicos e também de algumas espécies reativas de oxigênio (Arrigoni e Tullio, 2002). Atua prevenindo danos e doenças, como as cardiovasculares, certas complicações pré-natais, tumores malignos, inflamações, catarata, mal de Parkinson e Alzheimer, bem como aceleração do processo de envelhecimento celular (Sikora, Cieslik e Leszczynska, 2008). A Vitamina C pode ainda atuar na formação de tecidos conjuntivos e também no transporte de íons (Barata-Soares et al., 2004). Casos de toxicidade envolvendo a ingestão desta vitamina são poucos. Por ser hidrossolúvel, é regularmente excretada pelo corpo, mas doses excessivas já foram relacionadas a pedras no rim e, em casos raros, à anemia, causada pela interferência na absorção da vitamina B₁₂ (Wolkoff, 2004).

O ácido ascórbico apresenta uma estrutura contendo 6 carbonos e algumas formas isoméricas podem ser encontradas: ácido L – ascórbico (LAA), ácido D – ascórbico (DAA), ácido L – isoascórbico (LIAA) e ácido D – isoascórbico (DIAA) (Figura III-1).

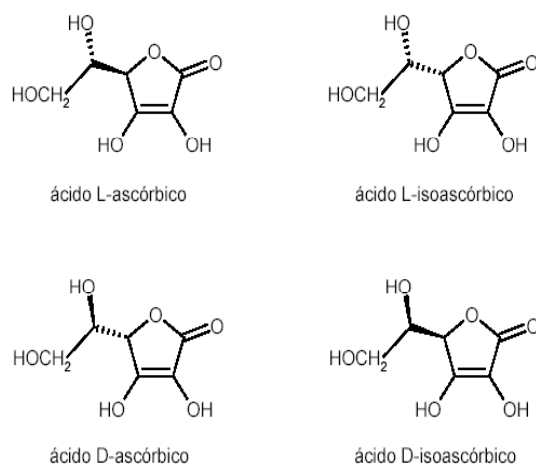


Figura III-1. Estruturas isoméricas do ácido ascórbico

O isômero mais usado pelo organismo humano, e também o mais encontrado naturalmente em frutas, é o LAA, o qual é responsável pelas funções biológicas (Wang et

al., 2000). O DIAA, também conhecido como ácido eritroascórbico ou D-araboascórbico, apresenta propriedades antioxidantes similares ao LAA, mas mostra apenas 5% da capacidade pró-vitâmica do mesmo (Hidiroglou, Madere e L'Abbe, 1997; Fidler et al., 2004; Fontannaz, Kiliç e Heudi, 2006). Este isômero não é normalmente encontrado em alimentos naturais, mas tem grande importância para a tecnologia alimentícia, uma vez que pode ser utilizado como antioxidante em bebidas, vinhos e produtos cárneos, substituindo o LAA, gerando redução de custos e mantendo as mesmas qualidades antioxidativas (Sádeká e Polonský, 2001).

Mais de 90% do ácido ascórbico presente na dieta humana é proveniente de frutas e vegetais (Lopez et al., 2005). A quantidade encontrada em cada um deles pode variar dependendo do plantio, incidência solar, etapas de maturação, tratamentos pós-colheita, entre outros (Nachtigall, Granada e Zambiasi, 2002).

Em ambientes secos, o ácido ascórbico apresenta-se estável, mas pode perder gradualmente sua função quando exposto à luz (Aldrigue, 1998). Em solução, este composto é facilmente degradado, principalmente na presença de cobre, ferro e álcali (Davey et al., 2000). Esta instabilidade impõe que os métodos de extração, identificação e quantificação sejam realizados de acordo com algumas condições ambientais controladas, como temperatura, pH, ausência de oxigênio, ausência de metais e presença de agentes estabilizantes. (Nachtigall, Granada e Zambiasi, 2002; Davey, Bauw e Montagu, 1996; Gabas, Telis-Romero e Menegalli, 2003).

Vários métodos já foram desenvolvidos para determinar a quantidade de ácido ascórbico presente em amostras alimentícias, biológicas, farmacêuticas e cosméticas. Os métodos biológicos foram os primeiros a serem empregados e são focados na determinação da quantidade necessária de ácido ascórbico para se prevenir o escorbuto, utilizando experimento com cobaias. Atualmente não são frequentemente usados, pois são demorados, necessitam de alto custo e oferecem baixa repetibilidade (Aldrigue, 1998).

Tillmans (1927), citado por Aldrigue (1998), foi o responsável por desenvolver o procedimento colorimétrico mais utilizado na atualidade. Após aperfeiçoamentos, este método foi considerado o padrão para a determinação de ácido ascórbico em preparados e sucos, de acordo com a "Association of Official Analytical Chemists" (AOAC, 1997). Ele utiliza uma titulação com o indicador 2,6-diclorofenol-indofenol (DCFI). O ácido ascórbico

reduz este reagente fazendo com que perca sua coloração inicial azul, se tornando levemente rosada (Aldrigue, 1998). Esta é uma técnica de fácil aplicação e baixo custo, principalmente quando comparada com uma técnica cromatográfica, por exemplo.

A maioria dos métodos que determinam a quantidade de ácido ascórbico presente em alimentos não é capaz de discriminar o LAA do DIAA. Este fato pode criar resultados imprecisos quando se quer avaliar a quantidade de Vitamina C em alimentos (Aldrigue, 1998; Fontannaz, Kiliç e Heudi, 2006). Entre esses métodos, é de grande destaque aquele indicado pela AOAC (1997), citado anteriormente. Hughes e Hurley (1999) verificaram que o DCFI atua de maneira igual para os dois isômeros.

Entre os métodos cromatográficos, as Cromatografias em Papel e em Camada Delgada apresentam bons resultados na separação desses isômeros, porém não são técnicas muito utilizadas. A Cromatografia Gasosa mostra boa linearidade e alta sensibilidade, mas envolve derivatização do ácido ascórbico a trimetilsilil éter. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é o método mais usado atualmente. Ela ser realizadas empregando colunas de fase-reversa associadas à troca iônica, colunas amino-ligadas, colunas revestidas com aminoácidos poliméricos, ou, mais freqüentemente, colunas C₁₈. A detecção pode ser realizada por detectores eletroquímicos, fluorescentes ou por detector de arranjo de diodos (DAD). A CLAE vem apresentando bons resultados para amostras biológicas, farmacêuticas e alimentícias. É um método de alta sensibilidade, específico e simples (Sánchez-Mata et al., 2000; Margolis e Schapira, 1997).

Pappa-Louisi e Pascalidou (1998) separaram LAA, DIAA, ácido dehidroascórbico (DHA) e ácido úrico (UA) por CLAE. Eles utilizaram DAD a 323 nm, fase móvel contendo ditiotreitol, tampão fosfato, Na₂EDTA, e cetiltrimetil bromato de amônio. Fontannaz, Kiliç e Heudi (2006) avaliaram a quantidade de DIAA e LAA em produtos fortificados. A fase móvel apresentou dodecilamina, acetonitrila e acetato de sódio. O pH foi ajustado para 5,4, a detecção foi realizada em DAD (265 nm) e a coluna utilizada foi C₁₈.

O presente trabalho teve como objetivo validar um método de identificação e quantificação de LAA e DIAA em geléia de frutas. A repetibilidade, linearidade, seletividade e a recuperação do método foram testadas.

2. Experimento

2.1. Reagentes

Bromato de hexadecil trimetil amônio foi adquirido da Sigma; fosfato de sódio anidro, acetato de sódio, ácido meta-fosfórico (MPA) e ácido orto-fosfórico foram obtidos da Merck; Na₂EDTA foi adquirido da Reagen. Os padrões LAA e DIAA foram adquiridos da Synth. A água desionizada foi obtida pelo Milli-Q, Millipore.

2.2. Extração da amostra.

Este trabalho avaliou a presença de LAA e DIAA em 10 geléias diferentes: (A1) acerola com morango, (A2) laranja, (A3) rosela, (A4) acerola com goiaba, (A5) acerola com rosela, (A6) acerola com maná, (A7) acerola com maracujá, (A8) acerola, (A9) acerola com banana e (A10) goiaba com rosela. As geléias foram adquiridas do produtor Klaus J. G. Bouillon ME, Indaiatuba - São Paulo, foram divididas em pequenas porções e estocadas sobre refrigeração em frasco âmbar imediatamente antes das análises para evitar a degradação. A metodologia extrativa foi realizada segundo o indicado pela AOAC (967.21, 1997) com modificações: 0,5 g de amostras foram homogeneizadas em 50 mL de ácido meta-fosfórico 1% por 3 minutos. Esta solução foi centrifugada por 5 minutos a 3000 g e filtrada em poros de 45 µm.

2.3. Equipamento e condições Cromatográficas.

O sistema de CLAE consistiu em um HP serie 1050 com DAD. O tratamento dos dados foi realizado no ChromQuest. A coluna usada foi Waters Spherisorb ODS com 25 µm de diâmetro (250 x 4,6 mm). A fase móvel consistiu em 2,3 mmol L⁻¹ de bromato de hexadecil trimetil amônio, 2,5 mmol L⁻¹ de Na₂EDTA, 80 mmol L⁻¹ de fosfato de sódio anidro e 20 mmol L⁻¹ de acetato de sódio, ajustado para pH 4,5 com ácido orto-fosfórico. É um método isocrático com eluição a 0,8 mL min.⁻¹. A detecção foi realizada a 265 nm.

2.4. Metodologia de validação.

A seletividade do método foi avaliada usando o DAD. Foi realizada uma comparação entre a resposta da amostra extraída com a resposta de uma solução padrão. Os parâmetros de comparação foram os tempos de eluição, os espectros de absorbância e fortificação de amostras. A linearidade do sistema foi verificada utilizando concentrações entre 10 e 200 mg L⁻¹. A repetibilidade foi avaliada submetendo-se ao sistema 10 diferentes soluções padrão de ácido ascórbico em igual concentração, procedimento realizado para duas concentrações diferentes (30 e 100 mg L⁻¹). O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram obtidos por meio da divisão do desvio padrão calculado no ensaio de repetibilidade (s) e do coeficiente angular obtido na curva analítica (S), R= s/S. Limite de detecção foi calculado multiplicando este coeficiente (R) por 3,3 e o limite de quantificação foi calculado multiplicando o R por 10 (Ribani et al., 2004).

2.5. Recuperação

Com o objetivo de verificar o método de extração, foi realizado o ensaio de recuperação. Quantidades conhecidas (Ca) de ácido LAA e de DIAA foram adicionadas a uma amostra e procedeu-se a extração conforme descrita anteriormente. A recuperação (REC) foi calculada pela diferença entre a concentração já existente do composto na matriz (Ci) e a quantidade analisada após a fortificação (Cf) (Equação III-1). Este procedimento também foi realizado para duas concentrações de ácido ascórbico diferentes: 30 e 100 mg L⁻¹.

$$REC = \frac{C_f - C_i}{C_a} \times 100$$

Equação III-1

3. Resultados e discussão.

Alguns artigos já identificaram e quantificaram ácido ascórbico em frutas, sucos e outros produtos, mas poucos estudaram esse composto em geléias. O ácido ascórbico, por ser muito instável, pode apresentar grande degradação durante a fabricação desses produtos. A produção de geléia envolve maceração, homogeneização e concentração a um nível alto de sólidos solúveis, ou até completar o tratamento térmico (pasteurização) (Baker et al., 2005).

A exposição à luz, a presença de oxigênio e alta temperatura durante a análise qualitativa e quantitativa desse composto, já com níveis altos de degradação em comparação com a fruta in natura, foi evitada tomando-se alguns cuidados: as amostras foram mantidas a baixas temperaturas até o momento da extração, em frascos âmbar, bem vedados; a extração foi realizada rapidamente para diminuir o efeito dos agentes degradantes; a extração da amostra foi realizada imediatamente antes de ser aplicada na CLAE; a análise por CLAE foi feita de modo a ter tempo curto de análise.

O método de extração foi desenvolvido com base no indicado pela AOAC (1997), mas com algumas modificações. A primeira modificação foi a substituição do solvente ácido oxálico por MPA. Aldrigue (1998), em seu estudo, verificou que o MPA apresenta uma extração mais eficiente que o ácido oxálico e também que somente água. O MPA possui a capacidade de precipitar proteínas e inativar algumas enzimas. Em vista dessas observações, o presente estudo utilizou MPA numa concentração de 1%.

A homogeneização da solução de geléia com solvente foi realizada primeiramente de forma manual, mas, verificou-se que esse procedimento não foi suficiente para dissolver toda a geléia. Para resolver esse impasse, a amostra foi submetida a um sonicador por 3 minutos. Após esta etapa, a solução foi centrifugada e aplicada à CLAE.

A fase móvel empregada foi definida de acordo com a revisão bibliográfica indicada na (Tabela III-1). Por esta tabela, percebe-se que as fases móveis utilizadas pelos autores citados são constituídas de uma solução tampão adicionadas de um par iônico. Algumas análises utilizaram ainda o antioxidante EDTA para evitar a oxidação da vitamina durante os testes. A fase estacionária mais utilizada foi uma coluna de C₁₈. Seguindo esses preceitos, a solução tamponante escolhida pelo presente estudo foi fosfato de sódio anidro

em conjunto com acetato de sódio, adicionados do par iônico bromato de hexadecil trimetil amônio. A esse sistema, empregou-se também o antioxidante EDTA.

Tabela III-1. Métodos de separação de LAA e DIAA por CLAE. Uma revisão

Analitos	Amostras	Extração	FE	FM	Detector	Referências
LAA e IAA	Amostras biológicas	MPA 5%	NH ₂	Fosfato, água, acetonitrila, ácido fosfórico	Eletro-químico	Margolis e Schapira, 1997
LAA, IAA, DHA	Frutas e vegetais	MPA 1% Ácido oxálico 0,5%, pH 2,0	C ₁₈	DTCA, Na ₂ EDTA, fosfato, acetato, pH 4,5	UV 247 nm	Kall e Andersen, 1999
LAA, DAA, DHA e UA	Amostras biológicas	MPA 10% 2 mmol L ⁻¹ de EDTA	C ₁₈	Fosfato, acetato, DTCA, TCAB, Metanol pH 5,4	Colori-métrico	Lykkesfeldt, 2000
LAA e IAA	Sucos Naturais e concentrados	Água	C ₁₈	Ácido acético, pH 2,5	DAD	Furusawa, 2001
LAA e IAA	Morango	MPA 1%	C ₁₈	Tampão acetato de sódio pH 4,2	DAD	Cordenunsi et al., 2002
LAA e IAA	Produtos fortificados	Tris [2-carboxietil] fosfato	C ₁₈	Decilamina, acetonitrila, acetato, pH 5,4	DAD	Fontannaz, Kiliç e Heudi, 2006

FE: fase estacionária; FM: fase móvel; MPA: ácido meta-fosfórico; DTAC: cloreto de n-dodeciltrimetil amônio; TCAB: Brometo de tetraoctil amônio. DAD: detector de arranjo de diodos.

Testes foram realizados até se obter a concentração de cada composto necessária para a separação dos dois isômeros acontecerem de forma satisfatória. Após este desenvolvimento, foi realizada a validação do método para que os dados qualitativos e

quantitativos pudessem ter sua confiança comprovada. Nesta etapa, a geléia de acerola com morango foi utilizada como base de estudos.

A seletividade foi o primeiro parâmetro verificado. Para essa avaliação, foi necessária a comparação entre o cromatograma obtido na análise dos compostos isolados em solução e a amostra extraída. Foram observados o tempo de eluição e o espectro de absorbância. Neste estudo foram analisados dois isômeros do ácido ascórbico e estes apresentam espectros de absorbância idênticos, assim, apenas o tempo de eluição pôde ser usado para distinguir a presença de cada um dos isômeros na amostra. O espectro pôde ser aplicado apenas para diferir os isômeros dos outros compostos presentes no extrato. Uma amostra fortificada também foi comparada aos cromatogramas obtidos anteriormente. Nesta última análise, apenas o aumento do sinal dos dois compostos em questão foi observado, quando comparados com a matriz sem fortificação, evidenciando e confirmando a capacidade de separação e identificação do método. Em vista desses resultados, o sistema pôde ser considerado seletivo: capaz de verificar a presença destes compostos na amostra em questão, sem que haja interferentes.

A repetibilidade do método foi avaliada em dois níveis de concentração: 30 e 100 mg L⁻¹. Cada concentração foi preparada 10 vezes e aplicada ao método de identificação. Durante os testes, uma queda progressiva do sinal emitido pelo detector foi observada, sinal que é diretamente proporcional à quantidade de analito presente em solução, indicando uma degradação com o tempo. Todas as 20 alíquotas deste teste foram preparadas ao mesmo tempo e aplicadas ao Cromatógrafo Líquido no momento conveniente. Uma diferença de 56% foi encontrada entre a primeira e a última aplicação de mesma concentração, sendo soluções diferentes, porém preparadas no mesmo tempo. Este fato comprova a necessidade de grandes cuidados no preparo de soluções e amostras e a importância de se preparar estas soluções imediatamente antes da aplicação ao método ou armazená-las de forma mais adequada. As soluções-mãe foram então armazenadas em pequenas alíquotas, à baixa temperatura, com ausência de luz e por curto período. A cada análise, uma nova pequena alíquota foi levada à temperatura ambiente e em seguida, utilizada.

Após estas precauções, o desvio padrão relativo do sinal do detector ficou abaixo de 2%. A separação dos picos pode ser observada Figura III-2. Os picos se encontram bem separados e com uma simetria satisfatória. O tempo de eluição do LAA foi de $10,58 \pm 0,06$

minutos, enquanto o tempo do DIAA foi de $12,32 \pm 0,07$ minutos. Estes tempos de eluição pode ser considerados adequados, pois não são próximos a zero e não são longos, o que levaria a grandes períodos de análise. O ensaio de repetibilidade também foi aplicado em uma amostra de geléia e retornou uma taxa de desvio padrão relativo do sinal do detector de 5,9%, valor que pode ser considerado satisfatório, segundo Ribani e colaboradores (2004).

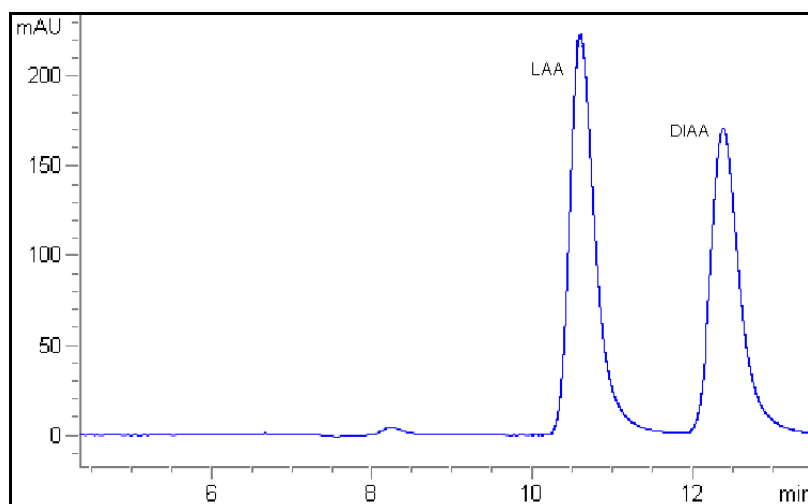


Figura III-2. Perfil cromatográfico obtido através da análise de LAA e DIAA. As condições de análise estão descritas no item 2.3 do presente capítulo.

A avaliação da linearidade do sistema foi realizada utilizando uma variação de 10 a 200 mg L⁻¹ na concentração dos analitos. Os dois isômeros apresentaram alta linearidade para a faixa mencionada, com coeficientes de correlação de 0,996 para o LAA e 0,991 para o IAA (Aquino et al., 2004). Duas outras curvas analíticas foram construídas em dois dias diferentes, utilizando novos padrões diluídos e nova fase móvel. O coeficiente de correlação para todas as curvas foi considerado satisfatório ao passo que ficaram acima de 0,99. Agrupando os dados das três curvas em uma única, os resultados de linearidade se repetiram. Os coeficientes angulares do LAA e do IAA foram 30,01 e 33,21, respectivamente.

Os limites de detecção e quantificação foram calculados de acordo com o item 2.4. O LAA retornou valor de 7,09 mg L⁻¹ para o LD e 21,49 mg L⁻¹ para o LQ. O DIAA apresentou 4,35 mg L⁻¹ para o LD e 13,18 mg L⁻¹ para o LQ.

O final da avaliação da metodologia mostrou um método seletivo e linear para os dois isômeros. Os limites de detecção e quantificação foram aceitáveis para a geléia observada.

A taxa de recuperação do sistema também foi avaliada. Os isômeros foram adicionados em concentrações de 30 e 100 mg L⁻¹. O estudo mostrou valores entre 87 e 105% de recuperação para ambos os isômeros. Ribani e colaboradores (2004) descrevem que são aceitáveis valores inscritos no intervalo de 70 a 120%. Aquino e colaboradores (2004) indicam um intervalo mais restrito, de 80 a 110%. O resultado apresentando pelo método está de acordo com os dois autores.

A quantidade de isômeros nas geléias foi finalmente verificada. O DIAA não foi encontrado em nenhuma amostra, já o LAA, foi encontrado em quase todas as amostras verificadas. A Tabela III-2 apresenta os resultados desta quantificação para cada uma das amostras, bem como o desvio padrão obtido. A amostra “A6” foi aquela que apresentou maior desvio padrão relativo (3,3%) e a amostra “A5” foi aquela que apresentou o desvio padrão relativo (0,3%). Assim sendo, todas as amostras demonstraram desvios padrões relativos aceitáveis, uma vez que estão abaixo dos 20% enunciados por Ribani e colaboradores (2004).

Tabela III-2. Concentração de ácido ascórbico encontrada nas amostras de geléia analisadas

Amostras	Vitamina C (mg/100g)	Vitamina C (mg/25 g)	Vitamina C (% IDR)
A1	334 ± 6	83,5	185
A2	146 ± 3	36,5	81
A3	0	0	0
A4	297± 2	74,3	165
A5	320 ± 1	80,0	178
A6	274 ± 9	68,5	152
A7	381 ± 4	95,3	212
A8	608 ± 9	152,0	338
A9	123 ± 1	30,75	68
A10	161 ± 3	40,25	89

A amostra "A8" foi aquela que apresentou maior quantidade de Vitamina C. O LAA não detectado na amostra "A3". Uma comparação com quantidades encontradas na literatura para este tipo de produto não é possível, uma vez que dados sobre a presença destes compostos em geléias de frutas não são encontrados. Um paralelo foi realizado utilizando frutas, sucos e polpas.

Araújo e colaboradores (2007) encontraram valores entre 1068 e 1836 mg de LAA em 100 g de polpa de acerola congelada. Maia e colaboradores (2007) encontraram de 573 a 594 mg de Vitamina C em 100 mL de suco de acerola. A amostra "A6" é uma geléia que contém apenas acerola e apresenta menor quantidade de ácido ascórbico que a polpa de Araújo e colaboradores e que o suco de Maia e colaboradores. Gokmen e colaboradores (2000) verificaram esse mesmo ácido em algumas frutas, incluindo laranja, que apresentou concentrações de aproximadamente 43 mg em 100 g dessa fruta, já na geléia de laranja ("A2"), foi encontrado 146 mg em 100g de produto. A produção de geléia requer a execução de procedimentos altamente degradantes, como cocção, por exemplo, e mesmo assim essa vitamina foi encontrada.

A quantidade do composto de interesse não pode ser comparada com dados da literatura para as outras amostras, pois são produtos originados da mistura de frutas, e a proporção de cada fruta não é conhecida.

A ingestão diária recomendada (IDR) para a Vitamina C no Brasil é de 45 mg para um adulto (ANVISA, 2005). Uma porção de geléia, segundo o fabricante das mesmas, corresponde a 25 g (uma colher), assim, seis das geléias mostraram quantidades acima da IDR estabelecida. Um pouco mais de uma porção é necessária para que as geléias "A3", "A9" e "A10" também atinjam a IDR, mas menos que duas porções de cada já são suficientes.

4. Conclusão

O método proposto e avaliado no presente trabalho foi capaz de identificar e quantificar o ácido L-ascórbico e o ácido D-isoascórbico presente em amostras de geléias de frutas. O método apresentou boa seletividade, linearidade e repetibilidade. O coeficiente de correlação foi acima de 0,99 para os dois isômeros. A repetibilidade demonstrou um desvio padrão relativo de no máximo 2%. Finalizando, o método foi usado para identificar e quantificar os compostos em questão nas geléias. DIAA não foi encontrado em nenhuma das amostras. O LAA foi encontrado em quase todas as amostras, chegando a uma concentração máxima para a geléia de acerola, com valor de 608 mg em 100 g de produto.

5. Referências

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA (2005). O “Regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais. *Resolução RDC nº 269*, de 22 de setembro.
- ALDRIGUE, M.L. (1998) *Desenvolvimento e validação de metodologia analítica, utilizando a CLAE, para determinação de Vitamina C em frutas e seus principais produtos*. Tese (Doutor em Ciência de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, BR.
- AOAC, *Association of Official Analytical Chemists* (1997), Fotherington D. C., 2, 16-17.
- AQUINO, F.W.B.; AMORIM, A.G.; PRATA, L.F. & NASCIMENTO, R.F. (2004). Determinação de aditivos, aldeídos furânicos, açúcares e cafeína em bebidas por cromatografia líquida de alta eficiência: validação de metodologias. *Ciência e tecnologia de alimentos*, 24, 32-38.
- ARAÚJO, P.G.L.; FIGUEIREDO, R.W.; ALVES, R.E.; MAIA, G.A. & PAIVA, J.R. (2007). β -caroteno, ácido ascórbico e antocianinas totais em polpa de frutos de aceroleira conservada por congelamento durante 12 meses. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27, 104-107.
- ARRIGONI, O. & TULLIO, M. (2002). Ascorbic acid: much more than an antioxidant. *Biochemical et Biophysical Acta*, 1569, 1-9.
- BAKER, R.A.; BERRY, N.; HUI, Y. H. & BARRET, D.M. (2005). Fruit preserves and Jams. IN: *Processing Fruit: Science and Technology*, Second Edition, Cap 6.
- BARATA-SOARES, A.D.; GOMEZ, M.L.P.A.; MESQUITA, C.H. & LAJOLO, F.M. (2004). Ascorbic acid biosynthesis: a precursor study on plants. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 16, 147-154.
- CORDENUNSI, B. R.; NASCIMENTO, J. R. O.; GENOVESE, M. I. & LAJOLO, F. M. (2002) Influence of Cultivar on Quality Parameters and Chemical Composition of Strawberry Fruits Grown in Brazil. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 50, 2581-2586.
- DAVEY, M.W.; BAUW, G. & MONTAGU, M.V. (1996). Analysis of ascorbate in plant tissues by High Performance Capillary Zone Electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 239, 8-19.
- DAVEY, M.W.; MONTAGU, M.V.; INZE, D.; SANMARTIN, M.; KANELIS, A.; SMIRNOFF, N.; BENZIE, I.J.J.; STRAIN, J.J.; FAVELL, D. & FLETCHER, J. (2000). Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 825-860.
- FIDLER, M.C.; DAVIDSSON, L.; ZEDER, C. & HURRELL, R.F. (2004). Erythorbic acid is a potent enhancer of nonheme-iron absorption. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 99-102.
- FONTANNAZ, P.; KILINÇ, T.; HEUDI, O. (2006). HPLC-UV determination of total vitamin C in a wide range of fortified food products. *Food Chemistry*, 94, 626-631.
- FURUSAWA, N. (2001). Rapid high-performance liquid chromatographic identification/ quantification of total vitamin C in fruit drinks. *Food Control*, 12, 27-29.

- GABAS, A.L.; TELIS-ROMERO, J.; MENEGALLI, F.C. (2003). Cinética de degradação do ácido ascórbico em ameixas liofilizadas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 23, 66-70.
- GOKMEN, V.; KAHRAMAN, N.; DEMIR, N. & ACAR, J. (2000). Enzymatically validated liquid chromatographic method for the determination of ascorbic and dehydroascorbic acids in fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 881, 309-316.
- HIDIROGLOU, N.; MADERE, R.; L'ABBÉ, M.R. (1997). Influence of oral dosing with D-isoascorbic acid on L-ascorbic acid content in guinea pig tissues. *Nutritional Biochemistry*, 8, 13-18.
- HUGHES, R.E. & HURLEY, R.J. (1999). The uptake of D-araboascorbic acid (D-isoascorbic acid) by guinea-pig tissues. *British Journal of Nutrition*, 23, 211-216.
- KALL, M.A.; ANDERSEN, C. (1999). Improved method for simultaneous determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid, isoascorbic acid and dehydroisoascorbic acid in food and biological sample. *Journal of chromatography B Biomedical Sciences Application*, 730, 101-111.
- LOPEZ, A.; MONTAÑO, A.; GARCIA, P. & GARRIDO, A. (2005). Quantification of Ascorbic Acid and Dehydroascorbic Acid in Fresh Olives and in Commercial Presentations of Table Olives. *Food Science and Technology International*, 11, 199-204.
- LYKKESFELDT, J. (2000). Determination of Ascorbic Acid and Dehydroascorbic Acid in Biological Samples by High-Performance Liquid Chromatography Using Subtraction Methods: Reliable Reduction with Tris[2-carboxyethyl]phosphine Hydrochloride. *Analytical Biochemistry*, 282, 89-93.
- MAIA, G.A., SOUSA, P.H.M.; SANTOS, G.M.; SILVA, D.S.; FERNANDES, A.G. & PRADO, G.M. (2007). Efeito do processamento sobre componentes do suco de acerola. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27, 130-134.
- MARGOLIS, S.A. & SCHAPIRA, R.M. (1997). Liquid chromatographic measurement of L-ascorbic acid and Dascorbic acid in biological samples. *Journal of Chromatography B*, 690, 25-33.
- NACHTIGALL, A.M.; GRANADA, G.G. & ZAMBIAZI, R.C. (2002). Utilização de Hibiscus para a elaboração de licores light. XVIII- Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos.
- PAPPA-LOUISI, A. & PASCALIDOU, S. (1998). Optimal Conditions for the Simultaneous Ion-Pairing HPLC Determination of -Ascorbic, Dehydro- -Ascorbic, -Ascorbic, and Uric Acids with On-Line Ultraviolet Absorbance and Electrochemical Detection. *Analytical Biochemistry*, 263, 176-182.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. & MELO, L. F. C. (2004). Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. *Química Nova*, 27, 771-780.
- SÁDECKÁ, J. & POLONSKÝ, J. (2001). Determination of ascorbic and isoascorbic acid in beverages and additives to meat products by capillary isotachopheresis. *European Food Research Technology*, 212, 511-517.
- SÁNCHEZ-MATA, M.C.; CÁMARA-HURTADO, M.; DÍEZ-MARQUÉS, C. & TORIJA-ISASA, M.E. (2000). Comparison of high-performance liquid chromatography and spectrofluorimetry for vitamin C analysis of green beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *European Food Research Technology*, 210, 220-225.

- SIKORA, E.; CIESLIK, E. & LESZCZYNSKA, T. (2008). The antioxidant activity of selected cruciferous vegetables subjected to aquathermal processing. *Food Chemistry*, 107, 55-59.
- WANG, Y.; MACKENZIE, B.; TSUKAGUCHI, H.; WEREMOWICZ, S.; MORTON, C.C. & HEDIGER, M.A. (2000). Human Vitamin C (L-Ascorbic Acid) Transporter SVCT1. *Biochemical and Biophysical Communications*, 267, 488-494.
- WOLKOFF, D.B. (2004). Estudo da estabilidade de repositores hidroeletrolíticos formulados à base de sucos clarificados de acerola e caju. Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, BR.

CAPÍTULO IV.

QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO L – ASCÓRBICO EM GELÉIAS DE FRUTAS POR ELETROFORESE CAPILAR E COMPARAÇÃO COM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Resumo

O ácido ascórbico é um composto fenólico com relevante potencial antioxidante, característica que lhe confere a capacidade de prevenir algumas doenças, tais como as cardiovasculares, certas complicações pré-natais, tumores malignos, inflamações, catarata, Mal de Parkinson e Alzheimer, além de retardar o processo de envelhecimento celular. A metodologia desenvolvida no estudo que se segue identificou e quantificou o ácido L-ascórbico em seis geléias de frutas utilizando a Eletroforese Capilar, com auxílio de padronização interna usando o ácido D-isoascórbico. A validação do método mostrou que este apresenta boa seletividade e linearidade. O teste de repetibilidade resultou em um desvio padrão relativo abaixo de 4% para as amostras. A taxa de recuperação ficou entre 96 e 104%. Os limites de detecção e quantificação foram 7,1 e 21,5 mg L⁻¹ para o LAA. O ácido foi encontrado em todas as amostras analisadas, chegando a uma concentração de 525 mg em 100 g de amostra. A metodologia desenvolvida foi ainda comparada a análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. As principais diferenças entre as duas técnicas foram quanto ao tempo de análise, uso de reagentes e produção de resíduos, sendo que a Eletroforese Capilar apresentou os menores valores. Todos os outros parâmetros se mostraram iguais, como, por exemplo, os limites de detecção e quantificação.

Palavras-chave: ácido ascórbico, geléia, Eletroforese Capilar.

QUANTIFICATION OF L-ASCORBIC ACID IN JELLY FRUIT BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS AND A COMPARISON WITH HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY.

Abstract

The ascorbic acid is a phenolic compound with significant antioxidant potential, a characteristic that gives it the ability to prevent some diseases, such as cardiovascular, some prenatal complications, malignant tumors, inflammations, cataracts, Parkinson and Alzheimer, and retard the process of cellular aging. The methodology developed in this study identified and quantified L-ascorbic acid in six fruit jellies by Capillary Electrophoresis with internal standardization using the D-isoascorbic acid. The method validation showed that this method has good selectivity and linearity. The repeatability test resulted in a relative standard deviation below 4% to the samples. The recovery rate was between 96 and 104%. The limits of detection and quantification were, respectively, 7,1 and 21,5 mg L⁻¹. The acid was found in all samples, reaching a concentration of 525 mg per 100 g of sample. The methodology was also compared to analysis by High Performance Liquid Chromatography. The main differences between the two techniques were about the time of analysis, use of reagents and waste production. The Electrophoresis Capillary had the lowest values. All the other parameters showed similar values, such as the limits of detection and quantification.

Keywords: Ascorbic Acid, Jelly, Electrophoresis Capillary.

1. Introdução

O ácido ascórbico, também conhecido como Vitamina C, está presente tanto na fauna quanto na flora. Os vegetais e alguns animais são capazes de sintetizar este composto, mas os humanos, algumas espécies de primatas e alguns pássaros não se encontram entre eles (Arrigoni e Tullio, 2002). A quantidade sintetizada está ligada a alguns fatores, como diferentes genótipos, condições climáticas antes da colheita e tratamentos após a colheita (Cordenunsi et al., 2002).

Estudos demonstram que o ácido ascórbico pode prevenir doenças cardiovasculares, certas complicações pré-natais, tumores malignos, inflamações, catarata, mal de Parkinson e Alzheimer, além de retardar o processo de envelhecimento celular (Sikora, Cieslik e Leszczynska, 2008). Pode atuar ainda junto à formação de tecido conjuntivo e transporte de íons (Barata-Soares et al., 2004).

Existem métodos convencionais capazes de analisar ácido ascórbico em alimentos, como, por exemplo, o método titulométrico que emprega o agente redutor 2,6-diclorofenol-indofenol. Este método é simples e de baixo custo, mas apresenta dificuldades quando amostras com intensa coloração são alvo de estudo. Para esses casos, a detecção eletrométrica pode ser recomendada, mas não para alimentos, pois são amostras complexas que apresentam outros compostos redutores. Existem também metodologias enzimáticas, que são muito específicas para o ácido ascórbico, porém apresentam elevado custo, o que é um problema quando se quer analisar muitas amostras (Galiana-Balaguer et al., 2001). Uma grande desvantagem de todos esses métodos convencionais citados é o longo tempo de execução. A Vitamina C tem alta sensibilidade à luz, calor, sal, pH, íons metálicos, oxigênio, enzimas e outros. Estes fatores resultam em rápida degradação, dificultando a quantificação precisa do ácido em questão (Liao et al., 2001).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é um método instrumental capaz de detectar e quantificar o ácido ascórbico em amostras complexas, mas apresenta certos inconvenientes, como longo tempo de condicionamento da coluna cromatográfica, necessidade de grande quantidade de solvente e alto custo de fase estacionária, quando comparada à Eletroforese Capilar (EC) (Galiana-Balaguer et al., 2001). Esta última técnica é relativamente nova e teve uma considerável expansão nos últimos anos (Cancalon, 2003).

Vários estudos já foram realizados com o intuito de identificar e quantificar o ácido ascórbico em amostras alimentícias, biológicas e farmacêuticas por EC (Fukushi et al., 1997; Galiana-Balaguer et al., 2001; Versari et al., 2004; Zinellu et al., 2004; Jin e Jiang, 2002; Kim et al., 2002).

A EC apresenta alta eficiência de separação, permite o uso de baixa quantidade de amostras e reagentes, simples extrações, baixo custo e uma rápida análise (Silva et al., 2007; Cancalon, 2003; Kim et al., 2002; Riaz e Chung, 2006).

Capilares de sílica fundida não revestidos são os mais utilizados para separar pequenas moléculas como o ácido ascórbico. Os capilares revestidos são apenas indicados para proteger da absorção de compostos indesejáveis ou quando há necessidade de um maior controle do fluxo eletroosmótico (Silva et al., 2007).

Uma das grandes vantagens da EC é sua versatilidade, uma vez que muitos métodos de separação podem ser realizados com o mesmo equipamento. Entre as técnicas possíveis de serem executadas, a Eletroforese Capilar de Zona (CZE) e a Cromatografia Capilar eletrocínética (MEKC) são muito utilizadas para analisar o ácido ascórbico em alimentos. A CZE é baseada na diferente mobilidade eletrocínética resultante da variação entre as cargas dos íons e o tamanho das partículas mergulhadas em eletrólitos sobre aplicação de voltagem (Liao et al., 2001).

Em EC, o tempo de migração é usado como parâmetro de comparação entre o analito presente na amostra e uma solução padrão, sendo os dois analisados sobre as mesmas condições. Alguns parâmetros podem interferir no tempo de migração, como a temperatura, força iônica do tampão, pH da amostra e do tampão, matriz da amostra, e condições e histórico do interior do capilar utilizado. Assim, é comum verificar baixa precisão entre corridas realizadas no mesmo dia, dias consecutivos, e em laboratórios diferentes. O uso da padronização interna pode diminuir esses problemas (Riaz e Chung, 2006).

De acordo com pesquisa bibliográfica realizada e apresentada parcialmente na Tabela IV-1, a CZE é a técnica mais empregada, portanto, essa foi a técnica usada neste estudo.

Tabela IV-1. Metodologias de análise de ácido ascórbico por EC: uma revisão.

Analitos	Método	Tampão	pH	T (°C)	Det.	Amostra	Ref.
LAA e outros	CZE	35 mmol L ⁻¹ de borato, 5% Acetonitrila, 21 kV	9,3	23	DAD	Sucos de frutas	Cancelon, 2003
LAA e ascorbato	CZE	200 mmol L ⁻¹ de borato, 25 kV	9,0	25	DAD	Vegetais	Davey, Bauw e Montagu, 1996
LAA	CZE	20 mmol L ⁻¹ de tetraborato, 20 kV	9,2	35	DAD	Vegetais	Fukushi et al., 1997
LAA	CZE	400 mmol L ⁻¹ de borato, 15 kV	8,1	25	DAD	Tomate	Galiana-Balaguer et al., 2001
LAA e DIAA	CZE	50 mmol L ⁻¹ de tris (hidroximetol) amino-metano, 25 kV	8,5	30	DAD	Soluções puras	Gong et al., 2007
LAA	CZE	18 mmol L ⁻¹ de ác. fosfórico, 120 mmol L ⁻¹ de fosfato, 100 mmol L ⁻¹ de EDTA, 25 kV	8,0	--	ED	Neutrófilos humanos	Jin e Jiang, 2002
LAA	CZE	200 mmol L ⁻¹ de borato, 25 kV	9,0	25	DAD	Espinafre	Liao et al., 2001
LAA e ácido sórbico	CZE	80 mmol L ⁻¹ de ácido bórico, 5 mmol L ⁻¹ de tetraborato, 20 kV	8,0	20	DAD	Sucos de frutas	Tang e Wu, 2005
LAA e IAA	MEKC	50 mmol L ⁻¹ de tricina, 11 kV	8,8	30	DAD	Damasco	Versari et al., 2004
LAA e sais do AA	MEKC	10 mmol L ⁻¹ de borato, 50 mmol L ⁻¹ de SDS, 20 kV	9,5	25	DAD	Cosméticos	Wang e Wu, 2006
LAA e fenólicos	CZE	60 mmol L ⁻¹ de borato, 12 kV	9,0	--	ED	Grapefruit	Wu, Guan e Ye, 2007
LAA e ácido úrico	CZE	100 mmol L ⁻¹ de borato, 30 kV	8,0	25	DAD	Plasma	Zinellu et al., 2004

O tampão borato, com pH entre 8,0 e 9,5, é o mais empregado, mas também são encontrados vários trabalho que utilizam o tampão fosfato. Entre os detectores, o de mais comum uso é o Detector de Arranjo de Diodos (DAD), mas Detector Eletroquímico também pode ser usado. Quanto à temperatura de análise, esta variou entre 20 e 35°C, com predominância de 25°C. Os resultados obtidos no presente estudo foram comparados a aqueles apresentados no capítulo III. Amostras de geléias foram submetidas a testes utilizando a CLAE e a EC.

2. Experimento

2.1. Reagentes

O borato de sódio foi obtido da Ecibra. Ácido orto-fosfórico foi obtido da Panreac. Bromato de hexadecil trimetil amônio foi usado da Sigma; Fosfato de sódio anidro, acetato de sódio e ácido meta-fosfórico (MPA) foram obtidos da Merck; O Na₂EDTA usado foi da marca Reagen. O ácido L-ascórbico (LAA) o ácido D-isoascórbico (DIAA) foram obtidos junto à Synth. A água deionizada foi produzida pelo Milli-Q, da Millipore.

2.2. Extração das amostras

Neste estudo foi avaliada a presença do ácido ascórbico em 6 diferentes geléias: (J1) acerola e morango, (J2) acerola e laranja, (J3) acerola e rosela, (J4) acerola e goiaba, (J5) acerola e maracujá, e (J6) acerola e abacaxi. As amostras foram obtidas de Klaus J. G. Bouillon ME, Indaiatuba - São Paulo. Os potes foram divididos em pequenas porções e estocados sob refrigeração em um frasco âmbar. Na extração, 0,5 g de geléia foram diluídas e homogeneizadas em 50 mL de MPA (1%) por 3 minutos. Esta solução foi centrifugada por 5 minutos a 3000 g, filtrada a 0,45 µm e aplicada à EC e à CLAE logo em seguida.

2.3. Equipamentos e condições Eletroforéticas.

O experimento foi realizado em um instrumento Agilent G1600AX (Agilent Technology, Germany) equipado com detector de arranjo de diodos (DAD). O capilar sem revestimento de sílica fundida foi obtido da Agilent Technology (Alemanha) e teve as dimensões que seguem: 32 cm de comprimento total, diâmetro interno de 50 µm. A injeção foi hidrodinâmica no lado do ânodo a 50 mbar por 5 s. Os parâmetros operacionais do EC foram: detecção a 265 nm, capilar a 25°C e voltagem aplicada de 15 kV. O tampão empregado foi 200 mmol L⁻¹ de borato de sódio, pH 9,0. O DIAA foi utilizado como

padrão interno. A análise e o tratamento dos dados foram realizados em um sistema HP Chemstation acoplado à Eletroforese Capilar.

O capilar novo foi ativado e condicionado, no primeiro dia de uso, por lavagem com pressão de 1000 mbar com solução de NaOH 1 mol L⁻¹ durante 30 minutos, seguido de 10 minutos de água. No início de cada dia de trabalho, o capilar foi condicionado por 5 minutos de NaOH 1 mol.L⁻¹, seguido de 5 minutos de água e 10 minutos de eletrólito. No final do dia foi realizada uma limpeza no capilar com lavagem por 5 minutos com NaOH 1 mol.L⁻¹ e 5 minutos de água. O capilar foi armazenado em água durante a noite. Entre as corridas foi feita a lavagem do capilar com água por 0,5 min., seguido de lavagem por 1 min. com o eletrólito de análise, ambos à pressão de 1000 mbar.

2.4. Equipamentos e condições Cromatográficas

O sistema de CLAE consistiu em um HP serie 1050, com DAD. O tratamento dos dados foi realizado por meio do ChromQuest. As análises cromatográficas foram feitas em uma coluna Waters Spherisorb ODS 25 µm (250 mm x 4,6 mm). Foram injetados 20 µl do extrato. A Fase móvel empregada foi constituída por 2,3 mmol L⁻¹ de bromato de hexadecil trimetil amônio, 2,5 mmol L⁻¹ de Na₂EDTA, 80 mmol L⁻¹ de fosfato de sódio anidro e 20 mmol L⁻¹ de acetato de sódio, ajustado a pH 4,5 com ácido orto-fosfórico. O sistema usado foi isocrático com eluição a uma taxa de 0,8 mL min.⁻¹. A absorbância foi monitorada a 265 nm.

2.5. Validação da metodologia Eletroforética.

A seletividade do método foi avaliada utilizando o DAD. Uma comparação entre a resposta do extrato da amostra e a resposta de uma solução padrão foi realizada. Os parâmetros de comparação foram: tempo de migração, espectro de absorbância e fortificação de amostra. A linearidade do sistema foi verificada pela construção de uma curva analítica utilizando padronização interna. Dez diferentes concentrações, entre 8 e 100 mg L⁻¹ foram aplicadas ao sistema de EC. O parâmetro de avaliação foi o coeficiente de correlação. Este coeficiente deve ser maior que 0,99. A repetibilidade foi avaliada

aplicando-se ao sistema 10 soluções diferentes, mas de concentrações iguais. O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram calculados de acordo com a curva analítica. Os limites foram calculados por meio da divisão entre o desvio padrão obtido no teste de repetibilidade (s) e o coeficiente angular do teste de linearidade (S) ($R = s/S$). LD foi calculado multiplicando esse resultado (R) por 3,3 e, o LQ foi calculado multiplicando o R por 10 (Ribani et al., 2004).

2.6. Recuperação

Para avaliar a metodologia extrativa, foi determinada a taxa de recuperação do sistema. A recuperação (REC) foi calculada através da adição de uma concentração conhecida da substância de interesse (C_a) na matriz, livre ou não, do composto. A taxa é calculada pela diferença entre a concentração deste composto encontrado na matriz fortificada (C_f) e na matriz sem fortificação (C_i).

$$REC = \frac{C_f - C_i}{C_a} \times 100$$

Equação IV-1

3. Resultados e discussão

O método do presente estudo foi desenvolvido a partir dos dados observados da Tabela IV-1. De acordo com a observação de que o borato é o constituinte mais utilizado neste tipo de análise, a composição do tampão de corrida foi estabelecida. Após alguns ensaios, chegou-se a uma concentração adequada de 200 mmol L^{-1} de borato com pH ajustado a 5,0. Liao e colaboradores (2001) também utilizaram a mesma concentração de borato e o mesmo pH, porém, em um capilar maior. A voltagem de trabalho também foi diferente, uma vez que foram utilizados 15 kV, quando Liao e colaboradores usaram 30 kV. Para a detecção do ácido ascórbico, foi utilizado o DAD com comprimento de onda a 265 nm.

Após a verificação de que a metodologia era capaz de identificar e quantificar a Vitamina C nas amostras, o processo de validação foi iniciado. O ensaio de repetibilidade do sistema não apresentou resultados aceitáveis, com isso, foi necessário utilizar o recurso da padronização interna.

O ácido D-isoascórbico (DIAA), também conhecido como ácido eritrórbico ou ácido D – araboascórbico, é um isômero do ácido L – Ascórbico, com igual potencial antioxidante, mas apenas 5% da atividade vitamínica C (Versari et al., 2004). A estrutura do DIAA é muito similar à do LAA, sendo assim, suas características físicas são similares. Como consequência, o DIAA é um potencial composto para ser utilizado como padrão interno na análise do LAA, com a ressalva que ele não pode estar naturalmente presente nas matrizes do estudo (Liao et al., 2002).

O procedimento eletroforético foi aplicado a uma solução contendo os dois isômeros de ácido ascórbico e verificou-se que os dois compostos apresentam tempos de migração diferentes nas condições em questão.

A amostra “J6” foi extraída e aplicada ao método para a avaliação da seletividade. O tempo de migração e o espectro de absorbância do pico suspeito de ser o LAA foram comparados com os dados obtidos para uma solução padrão do analito em questão. A amostra foi também fortificada e analisada. Para ambos os testes, a seletividade do método foi confirmada. O DIAA não foi encontrado e nenhum interferente analítico esteve presente em seu tempo de eluição, confirmando seu uso como padrão interno. Na Figura IV-1 pode ser verificado o eletroferograma da amostra “J6” adicionada de padrão interno. Verifica-se a total separação dos picos e a boa simetria de ambos.

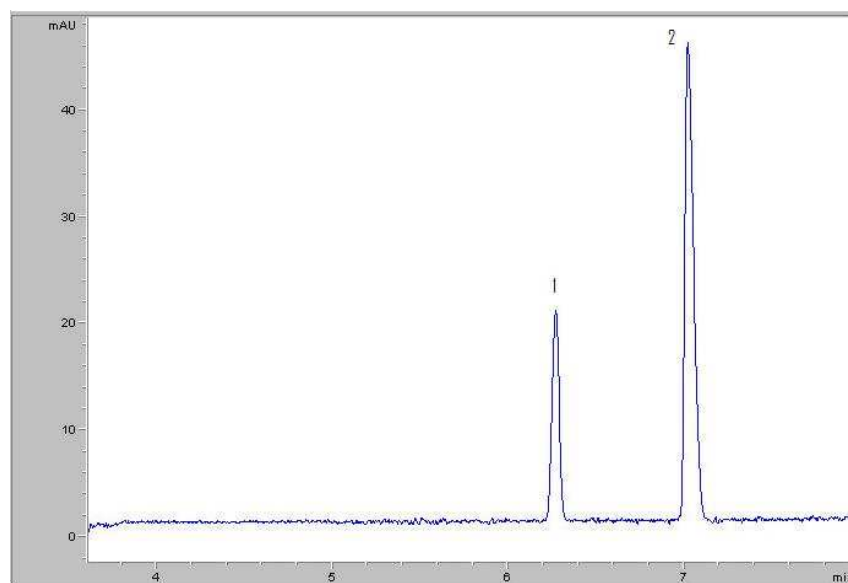


Figura IV-1. Eletroferograma da amostra J6 adicionada de padrão interno. Estão identificados os sinais do LAA (1) e do DIAA (2). Condições: o tampão empregado foi 200 mmol L⁻¹ de tampão borato a pH 9,0; a detecção foi feita a 265 nm, a temperatura do capilar foi mantida a 25°C, e voltagem foi selecionada a 15 kV.

Com a padronização interna, o ensaio de repetibilidade foi novamente realizado e os resultados se mostraram satisfatórios. O procedimento se deu por meio da análise consecutiva de 10 soluções de concentração 8 mg L⁻¹ e também outras 10 de concentração de 100 mg L⁻¹. As soluções foram estocadas em baixa temperatura, na ausência de luz e por um curto período de tempo até o momento da análise. O tempo de eluição do LAA foi de $6,34 \pm 0,02$ minutos.; o DIAA eluiu após $7,17 \pm 0,02$ minutos. Estes tempos são baixos e adequados para uma efetiva separação, uma vez que não são próximos a zero e também não são extremamente longos. O desvio padrão relativo ficou abaixo de 0,3% para o tempo de migração e 2,6% para a razão de concentração DIAA/LAA. Uma amostra também foi submetida ao teste de repetibilidade e retornou um desvio padrão relativo de 3,42%, valor que pode ser considerado satisfatório. Segundo Ribani e colaboradores (2004): para ser satisfatório, o desvio padrão relativo da amostra não deve ultrapassar a taxa de 20% para amostras complexas, como alimentos.

A linearidade foi testada usando concentrações entre 8 e 100 mg L⁻¹. À curva analítica obtida, foi ajustada uma equação de primeiro grau, cujo coeficiente de correlação foi de 0,998, conferindo ao sistema a característica de “linear”. Com a finalidade de avaliar

se o sistema é reprodutivo em dias consecutivos, foi feito o ensaio de precisão intermediária.

Duas outras curvas analíticas foram construídas em dois dias diferentes, utilizando novos padrões diluídos e nova fase móvel. O coeficiente de correlação para todas as curvas foi considerado satisfatório ao passo que ficaram acima de 0,99. Agrupando os dados em uma única curva, os resultados de linearidade se repetiram. O coeficiente angular e o linear do LAA foram 0,0097 e - 0,027, respectivamente.

Os limites de detecção e quantificação foram calculados utilizando como base a curva analítica obtida pelo estudo de precisão intermediária, ou seja, usando o valor do coeficiente angular apresentado no parágrafo anterior. Este coeficiente é o mais significativo quando comparado ao coeficiente obtido em uma única curva analítica, pois está exposto a maior quantidade de variáveis. Variações que podem ser resultantes de erros no preparo de soluções de padrões, amostras e tampões; variações no sistema de voltagem; variações no estado de equilíbrio e saturação do capilar, e, variações no sistema de injeção.

O Limite de detecção (LD) foi calculado da divisão entre o desvio padrão obtido no teste de repetibilidade e o coeficiente angular obtido na curva de calibração; essa razão foi multiplicada por 3,3. O limite de quantificação (LQ) foi calculado pela multiplicação da mesma razão por 10. Sendo assim, tem-se: 7,1 mg L⁻¹ para o LD e 21,5 mg L⁻¹ para o LQ.

A recuperação do método extrativo também foi avaliada e retornou valores entre 96 e 104%, porcentagens que podem ser consideradas satisfatórias, de acordo com Ribani e colaboradores (2004), uma vez que estão dentro do intervalo de 70-120%. Aquino e colaboradores (2004) indicam um intervalo de porcentagens mais restrito, entre 80 e 110%, e, também para este intervalo, a metodologia empregada pôde ser considerada adequada.

O fim da metodologia de validação mostrou um sistema seletivo, linear e repetitivo. Os limites de detecção e quantificação foram aceitáveis para as amostras analisadas; uma boa capacidade de analisar as geléias foi observada ao passo que seis amostras foram aplicadas ao método e a quantificação pôde ser realizada. A amostra J5 foi aquela que apresentou a maior quantidade de ácido ascórbico, já a amostra J2 foi aquela que mostrou a menor quantidade (Tabela IV-2). As amostras também foram analisadas por outra metodologia, usando CLAE. Este procedimento foi realizado para comparar os dois métodos.

Tabela IV-2. Acido ascórbico presente nas amostras, quantificações realizadas por EC e CLAE e comparadas entre linhas pelo teste estatístico t de Student.

Amostras	Concentração (mg/100g)	
	EC	CLAE
J1	235 ± 04 ^a	281 ± 22 ^b
J2	180 ± 11 ^a	112 ± 08 ^b
J3	274 ± 04 ^a	246 ± 16 ^a
J4	250 ± 07 ^a	268 ± 03 ^a
J5	525 ± 35 ^a	464 ± 12 ^a
J6	456 ± 08 ^a	426 ± 37 ^a

Em estudo prévio (Capítulo III), o método por CLAE foi validado e retornou os parâmetros encontrados na Tabela IV-3. Nesta tabela, estão também presentes os parâmetros da EC obtidos no estudo a que se refere este capítulo.

Tabela IV-3. Parâmetros de validação obtidos para as metodologias eletroforética e cromatográfica

Parâmetros	EC	CLAE
Coefficiente Angular	0,01	28,5
Linearidade	0,997	0,996
Repetibilidade do tempo do pico	0,02%	0,06%
Repetibilidade do sinal do detector	3%	2%
Limite de detecção	7,08 mg L ⁻¹	7,09 mg L ⁻¹
Limite de quantificação	21,49 mg L ⁻¹	21,48 mg L ⁻¹
Duração do método	7 min	13 min

Os dois métodos apresentaram coeficientes de correlação maiores que 0,99, o que indica que ambos apresentam boa qualidade de curva analítica. A repetibilidade do tempo do pico foi melhor para o EC, mas ambos os valores foram menores que 3%, sendo considerados aceitáveis por Ribani e colaboradores (2004). A repetibilidade do sinal do detector demonstrou resultado contrário ao mostrado para o tempo, pois neste caso a CLAE apresentou um menor valor que o EC, porém, novamente, os dois valores se encontram em níveis aceitáveis. Os limites de quantificação e detecção mostraram valores muito próximos e podem ser considerados iguais. O último parâmetro mostrou uma larga vantagem do EC,

uma vez que a duração da análise do ácido ascórbico é muito maior na CLAE do que na EC.

Na prática, outras vantagens do EC podem ser observadas. Na CLAE, a coluna cromatográfica necessita ser estabilizada antes do procedimento. A fase móvel deve ser eluída por aproximadamente dois dias para que a repetibilidade do método seja satisfatória. Este método usa íons pareantes, e assim, é necessário que a estabilidade seja alcançada. O capilar de sílica fundida sem recobrimento necessita de, no máximo, 30 minutos.

O uso de reagentes também é menor na EC do que para a CLAE. O método eletroforético usou apenas tampão borato, o que pode ser facilmente descartado, após neutralização. O resíduo da CLAE contém bromo em sua composição, e o programa de tratamento de resíduos da Universidade Estadual de Campinas (2001) preconiza que este resíduo deve ser segregado e tratado com procedimento específico antes de ser descartado.

O resíduo gerado pela CLAE foi estimado de acordo com as etapas realizadas: 48h para estabilização da coluna a fluxo baixo de $0,2 \text{ mL min}^{-1}$ (576 mL); construção da curva de linearidade empregando dez pontos, considerando cada ponto aplicado duas vezes (240 mL); teste de teste de repetibilidade, tendo 20 análises, sendo 10 de cada concentração (240 mL); O que resulta em 1056 mL. Para as mesmas etapas, A EC gerou apenas 200 mL de resíduo facilmente descartado.

O teste estatístico “T de Student” foi aplicado para comparar os resultados obtidos em cada método. Esta análise mostrou que para quase todas as geléias, os dois métodos apresentaram resultados similares. Apenas as amostras J1 e J2 mostraram resultados diferentes. A amostra J5 foi aquela que apresentou maior quantidade de ácido ascórbico e a amostra J2 foi a que apresentou a menor quantidade.

Em relação à quantidade de Vitamina C presente nestas geléias, não é possível comparar os valores encontrados com dados da literatura, uma vez que dados sobre geléias são raros, ainda mais geléias compostas por duas frutas. Um paralelo foi realizado utilizando frutas, sucos e polpas. Araújo e colaboradores (2007) encontraram valores entre 1068 e 1836 mg de LAA em 100 g de polpa de acerola congelada. Maia e colaboradores (2007) encontraram de 573 a 594 mg de Vitamina C em 100 mL de suco de acerola. Todas as geléias analisadas constituem uma composição de acerola com alguma outra fruta, então era esperado que todas as amostras indicassem a presença dessa vitamina.

De acordo com a Tabela IV-4, depois da acerola, a fruta que contém maior quantidade de ácido ascórbico é a goiaba, presente na geléia J4, porém, em escala, ela é apenas a quarta em quantidade desse ácido considerando as geléias analisadas. Como não se sabe a concentração de cada fruta, não é possível inferir muito sobre esses valores em relação às frutas da composição.

Tabela IV-4. Presença de ácido ascórbico em alimentos.

Fonte	Ácido ascórbico (mg em 100 g)
Acerola	1300
Goiaba	230 – 300
Morango	60
Laranja	50
Maracujá	25
Abacaxi	12 - 25

Fonte: Adaptado de Davey e colaboradores, 2000.

A ingestão diária recomendada (IDR) para a Vitamina C no Brasil é de 45 mg para um adulto (ANVISA, 2005). Uma porção de geléia, segundo o fabricante das mesmas, corresponde a 25 g (uma colher). De acordo com a Tabela IV-5, todas as geléias mostraram quantidades acima da IDR estabelecida, sendo que as amostras J5 e J6 demonstraram quantidades acima de 250% dessa necessidade diária.

Tabela IV-5. Porcentagem da IDR de Vitamina C apresentada pelas geléias analisadas.

Amostras	Vitamina C (mg/100g)	Vitamina C (mg/25g)	% IDR
J1	235	59	131
J2	180	45	100
J3	274	69	152
J4	250	63	139
J5	525	131	292
J6	456	114	253

4. Conclusão

O método proposto e avaliado no presente trabalho foi capaz de identificar e quantificar o ácido L-ascórbico em amostras de geléias de frutas. O método apresentou boa seletividade, linearidade, repetibilidade e recuperação. O coeficiente de correlação foi acima de 0,99 e a repetibilidade demonstrou um desvio padrão relativo de no máximo 3%. Quando os parâmetros de validação da EC foram comparados com os parâmetros obtidos por um método cromatográfico anteriormente desenvolvido no capítulo III, a EC apresentou resultados semelhantes para linearidade, repetibilidade, limite de detecção e de quantificação, porém, utiliza tempo bem menor para as análises, sendo duas vezes menor. Essa vantagem possibilita que a EC seja preferida em análises dessa vitamina em larga escala. Outra grande vantagem da EC é o menor uso de reagentes e a menor produção de resíduos em relação à CLAE.

O LAA foi encontrado em todas as amostras analisadas, numa gama de concentração de 180 a 525 mg em 100 g de geléia. Todos os produtos apresentaram valores acima da IDR indicada para a Vitamina C.

5. Referências

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA (2005). O “Regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais. *Resolução RDC nº 269*, de 22 de setembro.
- AQUINO, F.W.B.; AMORIM, A.G.; PRATA, L.F. & NASCIMENTO, R.F. (2004). Determinação de aditivos, aldeídos furânicos, açúcares e cafeína em bebidas por cromatografia líquida de alta eficiência: validação de metodologias. *Ciência e tecnologia de alimentos*, 24, 32-38.
- ARAÚJO, P.G.L.; FIGUEIREDO, R.W.; ALVES, R.E.; MAIA, G.A. & PAIVA, J.R. (2007). β -caroteno, ácido ascórbico e antocianinas totais em polpa de frutos de aceroleira conservada por congelamento durante 12 meses. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27, 104-107.
- ARRIGONI, O. & TULLIO, M. (2002). Ascorbic acid: much more than an antioxidant. *Biochemical et Biophysical Acta*, 1569, 1-9.
- BARATA-SOARES, A.D.; GOMEZ, M.L.P.A.; MESQUITA, C.H. & LAJOLO, F.M. (2004). Ascorbic acid biosynthesis: a precursor study on plants. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 16, 147-154.
- CANCALON, P.F. (2003). Vitamin Analysis by Capillary Electrophoresis. *CE Currents*, march,
- CORDENUNSI, B. R.; NASCIMENTO, J. R. O.; GENOVESE, M. I. & LAJOLO, F. M. (2002) Influence of Cultivar on Quality Parameters and Chemical Composition of Strawberry Fruits Grown in Brazil. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 50, 2581-2586.
- DAVEY, M.W.; BAUW, G. & MONTAGU, M.V. (1996). Analysis of ascorbate in plant tissues by High Performance Capillary Zone Electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 239, 8-19.
- FUKUSHI, K.; TAKEDA, S.; WAKIDA, S.I.; YAMANE, M.; HIGASHI, K. & HIIRO, K. (1997). Determination of ascorbic acid in vegetables by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 772, 313-320.
- GALIANA-BALAGUER, L.; ROSELLO, S.; HERRERO-MARTINÉZ, J. M.; MAQUIEIRA, A.; NUEZ, F. (2001) Determination of L-Ascorbic Acid in Lycopersicon Fruits by Capillary Zone Electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 296, 218-224.
- GONG, W.J.; ZHANG, Y.P.; CHOI, S.H.; ZHANG, Y.J.; LEE, K.P. (2007). Application of response surface methodologies in capillary electrophoresis. *Microchim Acta*, 156, 327-335.
- JIN, W. & JIANG, L. (2002). Measurement of ascorbic acid in single human neutrophils by capillary zone electrophoresis with electrochemical detection. *Electrophoresis*, 23, 2471-2476.
- KIM, W.S.K.; DAHLGREN, R.L.; MOROZ, L.L. & SWEEDLER, J.V. (2002). Ascorbic Acid Assays of Individual Neurons and Neuronal Tissues Using Capillary Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence Detection. *Analalitical Chemistry*, 74, 5614-5620.
- LIAO, T.; JIANG, C.M.; WU, M.C.; HWANG, J.Y. & CHANG, H.M. (2001) Quantification of L-ascorbic acid and total ascorbic acid in fruits and spinach by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis*, 22, 1484-488.

- LIAO, T.; WU, J.S.B.; WU, M.C.; CHANG, H.M. (2002). Epimeric Separation of L-Ascorbic Acid and D-Isoascorbic Acid by Capillary Zone Electrophoresis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 37-41.
- MAIA, G.A., SOUSA, P.H.M.; SANTOS, G.M.; SILVA, D.S.; FERNANDES, A.G. & PRADO, G.M. (2007). Efeito do processamento sobre componentes do suco de acerola. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27, 130-134.
- RIAZ, A. & CHUNG, D.S. (2006). Calibration of migration times of variable salinity samples with internal standards in capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 27, 553-562.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. & MELO, L. F. C. (2004). Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. *Química Nova*, 27, 771-780.
- SIKORA, E.; CIESLIK, E. & LESZCZYNSKA, T. (2008). The antioxidant activity of selected cruciferous vegetables subjected to aquathermal processing. *Food Chemistry*, 107, 55-59.
- SILVA, J.A.F.; COLTRO, W.K.T.; CARRILHO, E. & TAVARES, M.F.M. (2007). Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares. *Química Nova*, 30, 740-744.
- TANG, Y. & WU, M. (2005). A quick method for the simultaneous determination of ascorbic acid and sorbic acid in fruit juices by capillary zone electrophoresis. *Talanta*, 65, 794-798.
- UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS. (2001). *Grupo de Trabalho de Resíduos Biológicos Químicos, e Radioativos: Programa de Gerenciamento de Resíduos*. 82 p.
- VERSARI, A.; MATTIOLI, A.; PARPINELLO, G.P. & GALASSI, S. (2004). Rapid analysis of ascorbic and isoascorbic acids in fruit juice by capillary electrophoresis. *Food Control*, 15, 355-358.
- WANG, C.C. & WU, S.M. (2006). Simultaneous determination of l-ascorbic acid, ascorbic acid-2-phosphate magnesium salt, and ascorbic acid-6-palmitate in commercial cosmetics by micellar electrokinetic capillary electrophoresis. *Analytica Chimica Acta*, 576, 124-129.
- WU, T.; GUAN, Y. & YE, J. (2007). Determination of flavonoids and ascorbic acid in grapefruit peel and juice by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Food Chemistry*, 100, 1573-1579.
- ZINELLU, A.; CARRU, C.; SOTGIA, S. & DEIANA, L. (2004). Optimization of ascorbic and uric acid separation in human plasma by free zone capillary electrophoresis ultraviolet detection. *Analytical Biochemistry*, 330, 298-305.

CAPÍTULO V.

OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA PARA A EXTRAÇÃO DE FLAVONÓIDES EM GELÉIAS DE FRUTAS

Resumo

Flavonóides são compostos antioxidantes naturais encontrados em larga quantidade em frutas e derivados. Diversos estudos utilizam solventes orgânicos para extrair estes compostos em produtos alimentícios, mas nada é encontrado para geléias. Este estudo buscou aperfeiçoar esta extração usando diferentes técnicas e solventes. Metanol 50% foi considerado o melhor solvente quando comparado à acetona 25% e etanol 80%. O tempo de homogeneização foi testado entre 20 e 120 minutos, e a melhor extração ocorreu em 80 minutos. Extração em fase sólida também foi realizada para concentrar a amostra e eliminar compostos indesejáveis. O teste de recuperação para a (+)-catequina, (-)-epicatequina, rutina, quercetina e kaempferol mostrou valores entre 68 e 83%. Amostra de morango com acerola analisada apresentou valores de $7,6 \pm 0,3$ mg de (+)-catequina, $5,3 \pm 0,2$ mg de (-)-epicatequina, $4,1 \pm 0,2$ mg de rutina e $6,6 \pm 0,3$ mg de quercetina para 1 kg de amostra.

Palavras-chave: flavonóides, extração, geléia de frutas.

OPTIMIZATION OF A METHODOLOGY TO EXTRACT FLAVONOIDS IN FRUIT JELLIES

Abstract:

Flavonoids are natural antioxidant compounds found in a large quantity of fruits and its products. Some studies were found about application of organic solvents to extract these compounds in food, but nothing was found for jams. This study optimized the extraction techniques using different solvent. Methanol 50% was considered the best solvent when compared to 25% acetone and ethanol 80%. The time of homogenization was tested between 20 and 120 min, and the best extraction occurred at 80 minutes. Solid phase extraction was also performed to concentrate the sample and eliminate undesirable compounds. The test for recovery of (+)-catechin, (-)-epicatechin, rutin, quercetin and kaempferol showed values between 68 and 83%. Sample of strawberry with cherry analyzed showed values of 7.6 ± 0.3 mg (+)-catechin, 5.3 ± 0.2 mg (-)-epicatechin, 4.1 ± 0.2 mg of rutin and 6.6 ± 0.3 mg of quercetin per 1 kg of sample.

Keywords: flavonoids, extraction, fruit jelly.

1. Introdução:

Estudos epidemiológicos apontam uma relação inversa entre a ingestão de vários alimentos naturais e a expressão de algumas doenças. Este fato pode estar associado à atuação de algumas substâncias fenólicas encontradas em frutas e vegetais (Gil et al., 2000), como, por exemplo, os flavonóides (Di Carlo et al., 1999). A estes compostos já foram associadas atividades bioquímicas, fisiológicas e farmacêuticas, incluindo atividades antioxidantes, ações vasodilatadoras, antiinflamatórias, antibactericidas, imunoestimulantes, e efeitos antialérgicos e antivirais (Baby et al., 2007; Hassimotto, Genovese e Lajolo, 2005).

Devido a essa gama de características funcionais, algumas pesquisas já foram realizadas com o intuito de verificar a presença de flavonóides em frutas e vegetais. É de significativa importância que sejam desenvolvidos métodos capazes de determinar, simultaneamente, uma grande gama destes compostos, com rapidez, custos relativamente baixos e com resultados de qualidade (Agostini e Godoy, 1997). Para um estudo preciso, é necessário também que se tenha um eficiente sistema extrativo, com seletividade, baixa manipulação de amostra, baixa quantidade de compostos indesejáveis e alta concentração do analito de interesse (Antolovich et al., 2000).

A preparação de amostras é uma etapa crítica na análise de compostos fenólicos, principalmente quando são empregadas amostras alimentícias onde existem componentes bioativos na matriz e analitos com diversos espectros e numerosos compostos, muitos ainda não identificados. Com todos esses problemas, aliados à alta instabilidade dos flavonóides frente à luz, calor e oxigênio, quando produtos de origem natural são os alvos do estudo, baixas taxas de recuperação podem ser encontradas. Então, extremos cuidados devem ser tomados para garantir a correta extração, desprovida de modificação química, como oxidação e isomerização, durante o processo extrativo (Antolovich et al., 2000).

Pesquisa bibliográfica foi realizada para verificar quais eram as técnicas mais empregadas na extração dos flavonóides em alimentos naturais e os trabalhos encontrados estão parcialmente descritos na Tabela V-1. Como dito anteriormente, nada é encontrado para geléia de frutas, sendo assim, somente extração em frutas e sucos estão descritos nesta tabela.

Tabela V-1. Metodologias de extração de flavonóides, uma revisão

Solvente	Extração	Etapas do procedimento	Amostras	Referência
Metanol	25°C	Maceração, concentração (40°C), SPE.	Morango	Breitfellner, Solar e Sontag, 2002.
Metanol, água, ácido acético (100:50:50)	0°C 2h	Homogeneização, filtração, concentração (40°C), SPE.	Morango	Cordenunsi et al., 2002.
Metanol: água (60:40), ácido ascórbico e HCl	90°C 2h	Refluxo, hidrólise, neutralização, SPE.	Plantas	Dadáková, Procházková e Krizek, 2001
Metanol 50%	85°C 2h	Homogeneização.	Frutas vermelhas	Hakkinen, 2000.
Metanol, dimetilsulfoxido (50:50)	Ambiente	Homogeneização, filtração	Frutas cítricas	Kawaii et al., 2001.
Acetona, água (25:75) e 0,1ml de TFAC	Ambiente 1h	Homogeneização em ultra-som, filtração.	Morango	Kosar et al., 2004.
Borato, acetonitrila	Ambiente 30 minutos.	Homogeneização em ultra-som, hidrólise, filtração.	Ervas	Liu, Li e Wang, 2006.
Metanol: água (62,5:37,5), BHA e HCl	90°C 2h	Homogeneização, hidrólise, concentração (40°C), filtração.	Plantas	Matilla, Astola e Kumpulainen, 2000.
Etanol 80%	Ambiente 2h	Homogeneização em ultra-som, filtração.	Laranja	Peng, Liu e Ye, 2006.
Metanol, água, ácido acético (100:50:50)	0°C 2h	Homogeneização, filtração, concentração (45°C), SPE.	Maçã (fruta, suco e doce)	Price et al., 1999.
Éter etílico	Ambiente	Homogeneização em ultra-som, centrifugação, filtração, concentração (40°C).	Acerola	Vendramini e Trugo, 2004.
Etanol 100%	Ambiente 30 minutos.	Homogeneização, concentração	Plantas medicinais	Xu et al., 2006.

Pelo que se pode observar, a extração é normalmente realizada com a presença de um solvente orgânico, sendo que o metanol é o mais encontrado. Alguns trabalhos também aplicam a acetona e o etanol. Diversas técnicas podem ser empregadas, entre elas, a extração por solvente (SE), seguida ou não por extração em fase sólida (SPE), e, a menos empregada, extração por Soxhlet. Amostras líquidas são geralmente centrifugadas e filtradas antes do método analítico.

Flavonóides podem ser encontrados como agliconas e glicosídeos, por esse motivo vários autores sugerem uma hidrólise durante a extração com o intuito de quebrar os glicosídeos, passando-os para agliconas. A hidrólise pode ser realizada por álcali, ácido ou

enzimas. Esta etapa é, obviamente, omitida quando se deseja analisar todas as formas de flavonóides (Hakkinen, 2000).

Na análise de amostras líquidas, etapas envolvendo extração líquido-líquido ou SPE estão geralmente presentes. Quando as amostras são sólidas, ou semi-sólidas, é necessário grande período de extração, e para estes casos, é recomendado que medidas contra a degradação sejam tomadas (Antolovich et al., 2000). Há estudos que minimizam essas degradações adicionando antioxidantes ausentes nas amostras, como, por exemplo, ácido acético (Rice-Evans, Miller e Papanga, 1997; Cordenunsi et al., 2002), ácido ascórbico (Dadáková, Procházková e Krizek, 2001) e terc-butil hidroxianisol (BHA) (Matilla, Astola e Kumpulainen, 2000). Outros estudos usam ainda baixas temperaturas durante a etapa de homogeneização (Cordenunsi et al., 2002; Price et al., 1999).

Quanto à metodologia de análise, a Espectro-fotometria, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Eletroforese Capilar (EC) são normalmente usadas. O método espectrofotométrico mostra dificuldades quando existem muitos interferentes na amostra, como outros compostos fenólicos. A análise por CLAE e EC são as duas técnicas mais empregadas quando são analisadas amostras complexas, como alimentos (Cordenunsi et al., 2002).

Neste trabalho, a extração de sete flavonóides ((+)-catequina, (-)-epicatequina, rutina, narirutina, miricetina, quercetina e kaempferol) foi aperfeiçoada. Num primeiro momento, três solventes foram comparados. O solvente capaz de extrair a maior quantidade destes flavonóides, com baixo desvio padrão relativo, foi escolhido. A duração da homogeneização também foi verificada. Para um último teste, um procedimento para limpeza e concentração da amostra foi feito usando SPE. Todas as quantidades dos sete flavonóides foram verificadas por CLAE.

2. Experimento

2.1. Reagentes

Acetonitrila em grau CLAE foi obtida da LabScan. O ácido orto-fosfórico usado foi da Panreac. Metanol, etanol, acetona e dimetilsulfoxido (DMSO), todos em grau CLAE, foram obtidos da Fisher Scientific. A água deionizada foi obtida do deionizador Milli-Q, da Millipore. (+)-catequina, (-)-epicatequina, rutina, narirutina, miricetina e kaempferol foram adquiridos da Extrasintese. Kaempferol foi dissolvido em etanol e a miricetina foi dissolvida em DMSO. Os outros flavonóides foram dissolvidos em metanol. Soluções de 1 g L⁻¹ de cada flavonóide foram preparadas e estocadas a - 10°C, em frasco âmbar.

2.2. Extração da amostra.

A geléia de acerola com morango foi obtida do fabricante, separada em pequenos frascos âmbar e estocados a 4°C até o momento das análises. Cinco métodos extrativos foram testados. Todos os testes utilizaram alíquotas de 5 g de geléia.

(I) 25 ml de metanol 50% foram adicionados à amostra e esta solução foi homogeneizada por duas horas a 3 g. Após esta etapa, foi realizada uma centrifugação a 3000 g por 10 minutos. Isto foi concentrado em rotoevaporador a 40°C até perfazer 5 ml. No final da extração, a alíquota foi filtrada a 0,45 µm e aplicada ao método cromatográfico.

(II) Este método é igual ao “I”, com exceção da etapa de centrifugação, que foi substituída por filtração em funil de Buchner. Três lavagens de 5 ml de solvente foram feitas no funil, e após esta etapa, a solução foi concentrada no rotoevaporador.

(III) Este método é igual ao “II”, mas foi substituído o solvente (metanol 50%) por acetona 25%.

(IV) Este método é igual ao “II”, mas foi substituído o solvente (metanol 50%) por etanol 80%.

(V) Este método é igual ao “II”, porém foi incluída a extração em fase sólida (SPE) antes da filtragem a 0,45 µm. A concentração em rotoevaporador foi feita até 15 ml e o

concentrado foi aplicado ao cartucho de SPE contendo recheio de C₁₈. Após a ativação do cartucho, o sistema foi lavado com água deionizada e a amostra foi aplicada. Então, o cartucho foi eluído com metanol 100%. Esta última solução foi concentrada no rotoevaporador a 40°C até 2 ml e o resultante foi filtrado a 0,45 µm e aplicado à análise cromatográfica. Todas as análises foram feitas em triplicata.

2.3. Equipamentos e condições Cromatográficas.

O sistema cromatográfico utilizou um instrumento ThermoFinnigan Surveyor, com injeção automática (loop de 20 µL), bomba quaternária e detector de arranjo de diodos (DAD). O tratamento de dados foi realizado pelo ChromQuest. A coluna utilizada foi RP-18 Lichrocart (250 mm x 4,5 mm) da Merck e a pré-coluna RP-18 Lichrosper. O método cromatográfico foi baseado no estudo desenvolvido por Matilla, Astola e Kumpulainen (2000) com modificações. A fase móvel consistiu em 1% de ácido orto-fosfórico (A) e acetonitrila pura (B). O gradiente iniciou em 95% de “A”, num fluxo de 0,7 ml min⁻¹. Este gradiente foi mantido até 5 minutos. Entre 5 e 55 minutos a eluição passou para 50% de “A” e esta concentração foi mantida por 10 minutos. Entre 65 e 67 minutos, a concentração retornou a 95% de “A”. A corrida terminou aos 77 minutos. A detecção foi realizada a 260 nm (rutina, miricetina e kaempferol), 280 nm ((+)-catequina, (-)-epicatequina e narirutina), e 400 nm (quercetina).

2.4. Recuperação

Para avaliar a metodologia extrativa, foi determinada a taxa de recuperação do sistema. A recuperação (REC) foi calculada por meio da adição de uma concentração conhecida da substância de interesse (Ca) na matriz, livre ou não, do composto. A taxa é calculada pela diferença entre a concentração deste composto encontrado na matriz fortificada (Cf) e na matriz sem fortificação (Equação V-1).

$$REC = \frac{C_f - C_i}{C_a} \times 100$$

Equação V-1

3. Resultados e discussão

Dando início ao trabalho de otimização da metodologia extrativa, o primeiro método de extração (I) foi definido de acordo com os artigos mostrados na (Tabela V-1). Um dos principais pontos que influenciam na extração dos compostos é a eficiência do solvente utilizado. Nesta tabela é possível verificar a predominância de três solventes em mistura com água: acetona (Kosar et al., 2004), etanol (Peng, Liu e Ye, 2006; Xu et al., 2006) e metanol (Hakkinen, 2000; Matilla, Astola e Kumpulainen, 2000; Cordenunsi et al., 2002; Dadáková, Procházková e Krizek, 2001; Price et al., 1999; Kawaii et al., 2001; Breitfellner, Solar e Sontag, 2002). Entre estes, o metanol 50% foi o que apresentou predominância, estimulando seu uso nos testes iniciais da otimização da metodologia extrativa em questão.

Os estudos observados mostram uma variação no tempo e temperatura de homogeneização. Maiores temperaturas foram empregadas apenas quando houve hidrólise entre as etapas extrativas. Neste estudo a hidrólise não foi focada, assim, a temperatura ambiente foi a escolhida para o trabalho. Na mesma tabela, o tempo de homogeneização variou entre meia hora e duas horas. Com o intuito de obter a maior extração possível na análise dos flavonóides, o maior tempo foi fixado na metodologia inicial, e foi posteriormente otimizado.

Para evitar degradações durante a etapa extrativa, além do solvente, alguns autores adicionam antioxidantes na etapa de homogeneização. Neste estudo, a amostra contém acerola em sua composição, fruta rica em ácido ascórbico; este ácido apresenta elevado potencial antioxidante, e então, a adição de outro composto foi desnecessária.

É importante observar também na Tabela V-1 que a maioria dos artigos emprega uma etapa de concentração antes do método de análise. Este é um passo necessário, uma vez que os flavonóides, na maioria dos casos, estão presentes em baixas concentrações. O rotoevaporador é o equipamento normalmente utilizado para realizar tal etapa. A

temperatura de 40°C foi a predominante na Tabela V-1, mas 30°C e 45° C também foram utilizados. No presente estudo, a temperatura foi então mantida a 40°C.

A relação entre a quantidade de amostra *versus* a quantidade de solvente empregada também foi observada nos estudos contemplados nesta tabela, porém não relatados. A relação mais freqüente foi de 5 g de amostra por 25 ml de solvente.

Com todos esses dados, o método “I” foi estruturado e modificações já começaram a ser realizadas antes mesmo dos flavonóides serem quantificadas. A primeira modificação ao método inicial (I) foi feita devido a uma dificuldade encontrada na prática: após a homogeneização com metanol 50%, foi observada a presença de grande quantidade de sedimentos em suspensão e uma etapa de limpeza se fez necessária. Este procedimento foi feito inicialmente por centrifugação, mas as condições aplicadas (3000 g por 10 minutos) não foram suficientes para remover todos os sedimentos, o que tornava a etapa de filtração em poros de 0,45 µm impraticável. Outras condições com maior tempo e maior rotação foram testadas, mas sem sucesso. Como alternativa, foi realizada uma filtração em funil de Buchner, o que constituiu o método “II”. Esta modificação retirou maior quantidade de sedimentos e a filtração final foi possível.

Para escolher o melhor solvente extrativo, os métodos “III” e “IV” foram aplicados à amostra. Estas extrações foram submetidas à análise cromatográfica e os flavonóides em questão foram identificados e quantificados no seu segundo máximo de absorbância. O primeiro máximo destes compostos geralmente ocorre perto de 200 nm, mas como para muitos outros compostos este máximo também está presente, a análise fica impraticável. O uso do segundo máximo representa uma forma de selecionar os picos a serem verificados, auxiliando na identificação dos mesmos. Na geléia em questão, foram encontrados quatro dos flavonóides de interesse: (+)-catequina, (-)-epicatequina, rutina e quercetina. Para verificar qual o melhor solvente, não foi considerado apropriado adicionar padrões de flavonóides a esta amostra, uma vez que o objetivo foi avaliar a extração dos compostos ligados à matriz da amostra. Esta adição foi realizada posteriormente, quando a taxa de recuperação foi calculada.

A quantidade dos flavonóides encontrados na extração pelos três métodos (II, III e IV) foram mensuradas e comparadas na Figura V-1. Todos os dados foram submetidos ao teste de “T de Student” para verificar a diferença entre os valores encontrados. Na análise

de quantificação da (+)-catequina, (-)-epicatequina e rutina, todos os solventes mostraram diferentes resultados segundo este teste, e o extrato metanólico mostrou-se o mais eficiente. A extração da quercetina com metanol 50% apresentou a mesma eficiência extrativa que a acetona 20%. O extrato etanólico mostrou menores resultados em todas as extrações. O desvio padrão relativo também indica que o metanol foi o mais apropriado dos solventes (1,60%), e o etanol (5,43%) foi aquele que apresentou novamente os piores resultados.

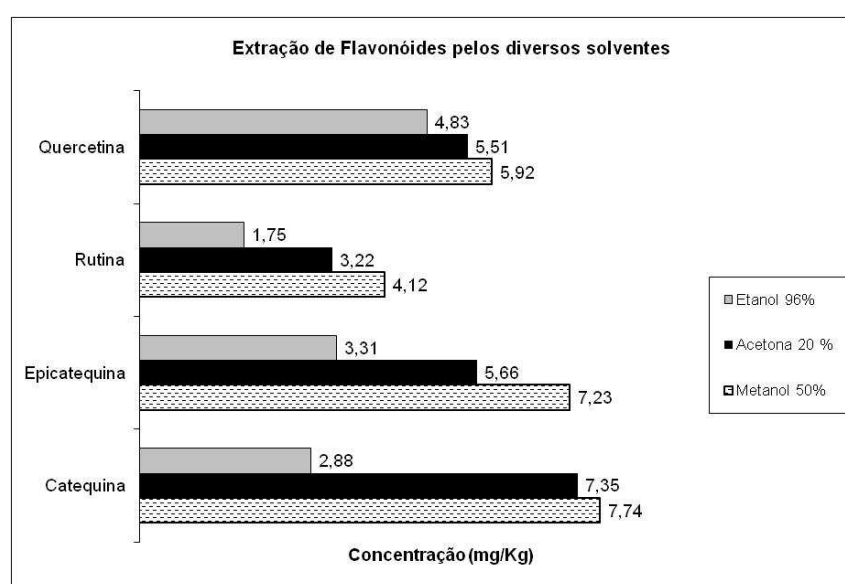


Figura V-1. Comparação entre os solventes usados na extração de flavonóides presentes na geléia de morango e acerola. Metanol 50%, acetona 25% e etanol 80% foram testados.

Em vista do exposto, o metanol 50% foi considerado o melhor solvente, assim, ele foi usado como base nas outras etapas de aperfeiçoamento do método. O próximo teste foi realizado para verificar o melhor tempo de homogeneização. Testes foram feitos entre 20 e 120 minutos, com intervalos separados de 20 minutos (Figura V-2).

Esta variação no tempo demonstrou que não são necessários os 120 minutos aplicados inicialmente. Em 80 minutos foi verificada uma quantidade máxima de flavonóides extraídos. Em 120 minutos foi observada ainda uma queda na concentração de (-)-epicatequina, o que pode ser resultado de sua degradação.

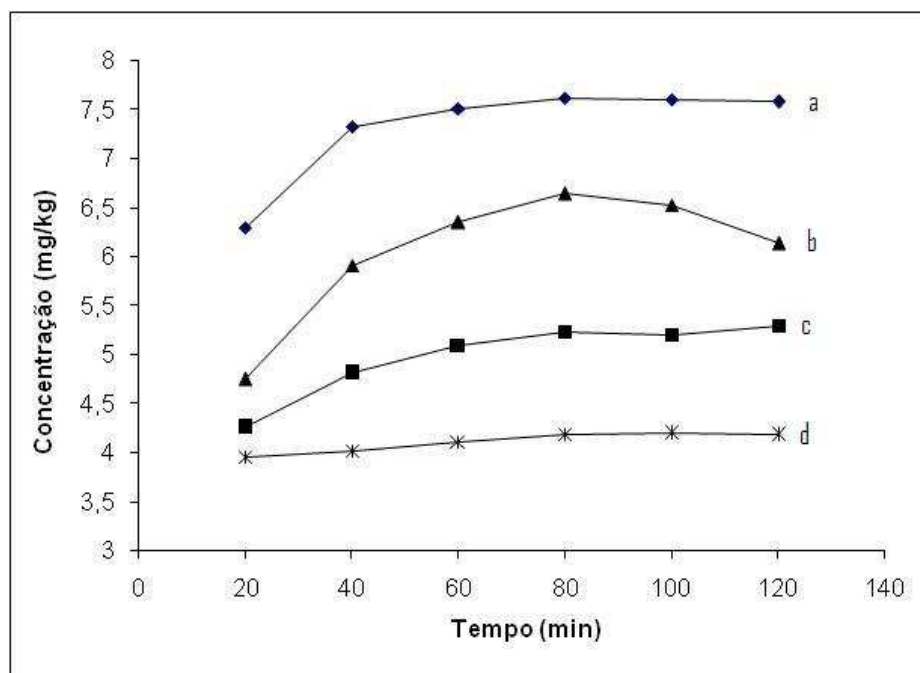


Figura V-2. Comparação entre os tempos de homogeneização aplicados à geléia de morango e acerola. Metanol 50% foi utilizado como solvente. (a) (+)-catequina, (b) (-)-epicatequina, (c) quercetina e (d) rutina foram os flavonóides encontrados na amostra.

O próximo passo foi realizado para minimizar a atuação de compostos interferentes na metodologia quantitativa, como açúcares, por exemplo. Com esse objetivo, uma extração em fase sólida foi realizada e consistiu o método “V”. Durante as pesquisas bibliográficas, vários autores utilizaram a SPE após a etapa de homogeneização e limpeza (Rice-Evans, Miller e Papanga, 1997; Cordenunsi et al., 2002; Dadáková, Procházková e Krizek, 2001; Breittfellner, Solar e Sontag, 2002). Após a filtração em funil de buchner, a solução extratora foi submetida à evaporação para retirar todo o metanol presente. O extrato tinha 45 ml no início da evaporação, sendo 25 ml da solução homogeneizada, 10 ml da lavagem do funil de buchner e mais 10 ml de transferência para o balão de evaporação. Como o solvente é constituído de 50% de metanol, 22,5 ml de água estão presentes. Na técnica de SPE a solução a ser analisada deve estar livre de metanol. Como este solvente tem ponto de ebulição menor que o da água, então, a solução sendo concentrada até 15 ml, ficou livre de metanol, ou com baixa concentração do mesmo. Esta etapa foi realizada a 40°C em rotoevaporador.

Após a evaporação do metanol, a solução resultante foi aplicada ao cartucho de SPE, o qual foi lavado por três vezes com água deionizada, para certificar a retirada de compostos com grande afinidade pela água, como açúcares e outros compostos hidrofílicos. Os flavonóides apresentam maior afinidade pelo recheio do cartucho do que pela água, assim, o próximo passo foi passar 100% de metanol, o que eluir os flavonóides absorvidos no cartucho. O extrato metanólico foi então aplicado a análise cromatográfica e a eficiência na concentração dos flavonóides presentes nos extratos foi avaliada.

Comparando os perfis cromatográficos apresentados na Figura V-3 e na Figura V-4, é possível verificar que a maioria dos compostos do início do perfil cromatográfico da extração sem o uso do SPE não estão presentes quando o extrato metanólico da SPE é analisado, mas podem ser encontrados no extrato aquoso. Pode ser verificado também que no extrato aquoso não há os flavonóides de interesse, estes ficam no extrato metanólico, como previsto. Em adição á função de limpeza, a técnica de SPE também pode ser usada para concentrar os flavonóides. Este fato ajuda nas amostras que possuem baixa quantidade destes compostos.

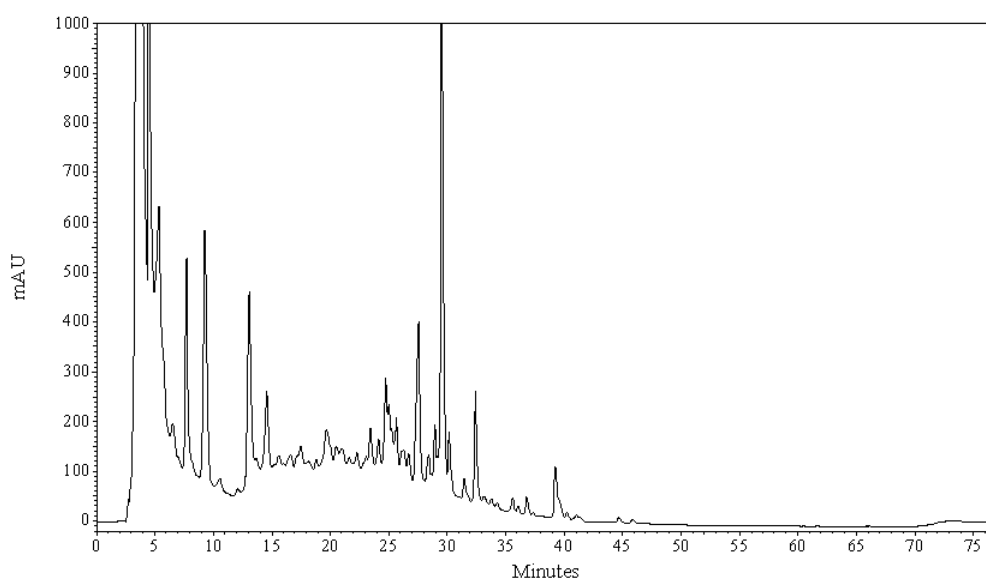


Figura V-3. Perfil cromatográfico obtido na extração da geléia de morango com acerola sem o uso da SPE.

Condições cromatográficas descritas no item 2.3 do presente capítulo.

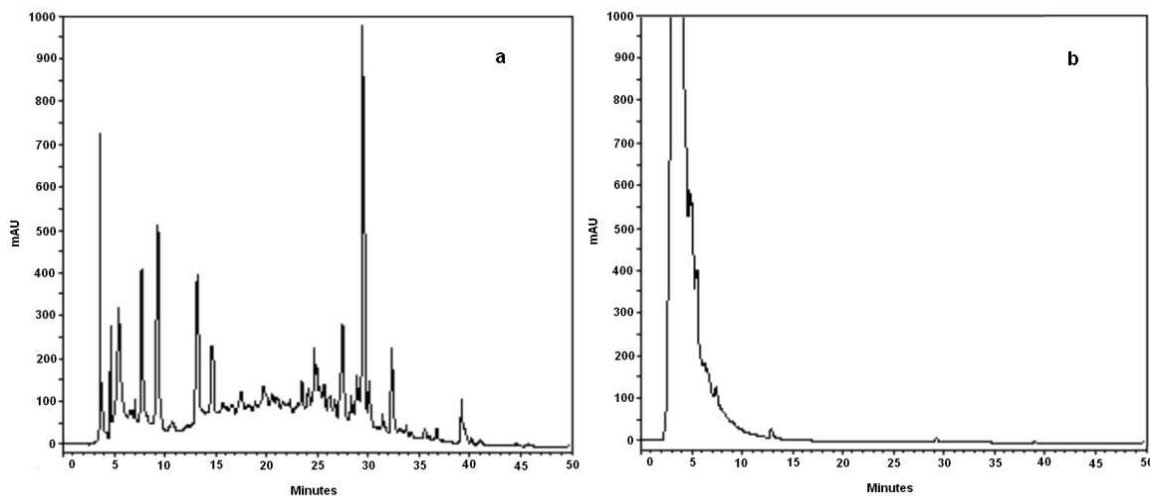


Figura V-4. Comparação dos perfis cromatográficos do extrato metanólico (A) e do extrato aquoso (B) obtidos através da SPE. Condições cromatográficas descritas no item 2.3 do presente capítulo.

Após a definição do método de extração (V), a eficiência do mesmo foi avaliada através de testes de repetibilidade e recuperação. A repetibilidade do método foi verificada em dois níveis de concentração de flavonóides (3 e 10 mg L⁻¹), além de ser realizado também para a amostra em questão. Este teste resultou parâmetros variando entre 3,51% ((-)-epicatequina) e 5,07% (quercetina).

O parâmetro de recuperação do sistema foi avaliado adicionando-se uma quantidade conhecida de flavonóides na amostra antes da extração a ser realizada. Esta etapa também foi realizada para dois níveis de concentração. Em adição aos flavonóides encontrados previamente nesta amostra, outros foram também analisados: narirutina e kaempferol. Cada flavonóide foi adicionado numa concentração de 3 e 10 mg L⁻¹.

A Tabela V-2 mostra que a taxa de recuperação calculada para cada antioxidante estudado variou entre 68% e 83%. Ribani e colaboradores (2004) apontam que valores aceitáveis de recuperação estão entre 70 e 120%, sendo que, dependendo da complexidade da matriz, as taxas de recuperação podem se encontrar entre 50 e 120%. A maioria dos flavonóides mostrou uma taxa de recuperação inserida no primeiro intervalo enunciado acima, sendo que apenas o Kaempferol se encaixou no segundo intervalo.

Tabela V-2. Taxa de recuperação dos flavonóides no método de extração V.

Flavonóide	Recuperação (%)
(+)-catequina	70,51
(-)-epicatequina	83,46
Rutina	78,46
Narirutina	73,08
Kaempferol	68,60
Quercetina	82,38

Conforme previsto pela introdução do presente estudo, a taxa de recuperação dos flavonóides não está muito próxima a 100%. O fato pode ser explicado pela alta degradação deste tipo de composto, uma vez que a extração envolve filtração, concentração e limpeza por SPE. Todo o procedimento foi realizado à temperatura ambiente, exceto a concentração realizada a 40°C, e foi impossível retirar toda a luz do local onde as análises decorreram. Erros analíticos e instrumentais também podem ser considerados.

O Merck Index mostra que o kaempferol apresenta baixa solubilidade em água, boa solubilidade em álcool quente, éter e álcali (The Merck Index, 1983). O método de extração desenvolvido demonstrou que, dentre os solventes usados, o metanol foi aquele que apresentou melhor eficiência. Metanol é um álcool, porém foi usado à temperatura ambiente. É um álcool tóxico, volátil e rapidamente absorvido por inalação (Kuteifan et al., 1998), assim, a extração usando álcool quente, por um longo tempo, não é adequado. Fatores analíticos também são desfavoráveis a esse aquecimento, além de alterar a composição da solução extratora, diminui a porcentagem de metanol e também acelera a degradação dos flavonóides.

Por fim, a amostra teve seus flavonóides quantificados, apresentando $7,6 \pm 0,3$ mg de (+)-catequina, $5,3 \pm 0,2$ mg de (-)-epicatequina, $4,1 \pm 0,2$ mg de rutina e $6,6 \pm 0,3$ mg de quercetina para 1 Kg de amostra.

4. Conclusão

O presente trabalho visou aperfeiçoar e avaliar um método de extração para os flavonóides (+)-catequina, (-)-epicatequina, rutina, narirutina, quercetina e kaempferol em geléias de frutas. Entre os solventes testados, o metanol 50% foi considerado o melhor para o que foi proposto. Este solvente foi capaz de extrair maior quantidade dos flavonóides em questão com menor desvio padrão relativo, considerando a mesma razão solvente/amostra. O melhor tempo de homogeneização ocorreu a 80 minutos. A taxa de recuperação foi verificada e retornou valores entre 68 e 83%.

5. Referências

- AGOSTINI, T.S. & GODOY, H.T. (1997). Simultaneous determination of nicotinic acid, nicotinamide, riboflavin, thiamin and pyridoxine in enriched Brazilian foods, by HPLC. *Journal High resolution Chromatography*, 20, 3081-3086.
- ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.; ROBARDS, K. & RYAN, D. (2000). Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *Analyst*, 125, 989-1009.
- BABY, A.R.; MIGLIATO, K.F.; MACIEL, C.P.M.; ZAGUE, V.; PINTO, C.A.S.O.; SALGADO, H.R.N.; KANEKO, T.M. & VELASCO, M.V.R. (2007). Accelerated chemical stability data of O/W fluid emulsion contain the extract of *Trichilia catigua* Adr. Juss (e) *Ptychopetalum olacoides* Benth. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 43, 405-412.
- BREITFELLNER, F.; SOLAR, S. & SONTAG, G. (2002). Effect of gamma irradiation on flavonoids in strawberries. *European Food Research Technology*, 215, 28-31.
- CORDENUNSI, B. R.; NASCIMENTO, J. R. O.; GENOVESE, M. I. & LAJOLO, F. M. (2002) Influence of Cultivar on Quality Parameters and Chemical Composition of Strawberry Fruits Grown in Brazil. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 50, 2581-2586.
- DADÁKOVÁ, EVA.; PROCHÁZKOVÁ, EVA. & KRIZEK, M. (2001). Application of micellar electrokinetic capillary chromatography for quantitative analysis of quercetin in plant materials *Electrophoresis*, 22, 1573-1578.
- DI CARLO, G., MASCOLO, N., IZZO, A.A. & CAPASSO, F. (1999). Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences*, 65, 337-353.
- GIL, M.A.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; HESS-PIERCE, B.; HOLCROFT, D.M. & KADER, A.A. (2000). Antioxidant Activity of Pomegranate Juice and Its Relationship with Phenolic Composition and Processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4581-4589.
- HAKKINEN, S. (2000). *Flavonols and Phenolic Acids in Berries and Berry Products*. These (Doctor in Clinical Nutrition), Faculty of Medicine of Kuopio University, Kuopio, Finland.
- HASSIMOTTO, N.M.A.; GENOVESE, M.I. & LAJOLO, F.M. (2005). Antioxidant Activity of Dietary Fruits, Vegetables, and Commercial Frozen Fruit Pulps. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2928-2935.
- KAWAIL, S.; TOMONO, Y.; KATESE, E. & OGAWA, K. (2001). Quantitative Study of Fruit Flavonoids in Citrus Hybrids of King (*C. nobilis*) and Mukaku Kishu (*C. kinokuni*). *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 49, 3982-3986.
- KOSAR, M.; KAFKAS, E.; PAYDAS, S. & BASER, K.H.C. (2004). Phenolic Composition of Strawberry Genotypes at Different Maturation Stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1586-1589.
- KUTEIFAN, K.; OESTERLE, H.; TAJAHMADY, T.; GUTBUB, A.M. & LAPLATTE, G. (1998). Necrosis and haemorrhage of the putamen in methanol poisoning shown on MRI. *Neuroradiology*, 40, 158-160.

- LIU, J.J.; LI, S.P. & WANG, Y.T. (2006). Optimization for quantitative determination of four flavonoids in Epimedium by capillary zone electrophoresis coupled with diode array detection using central composite design. *Journal of Chromatography A*, 103, 344-349.
- MATILLA, P.; ASTOLA, J.; KUMPULAINEN, J. (2000). Determination of Flavonoids in Plant Material by HPLC with Diode-Array and Electro-Array Detections. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5834-5841.
- PENG, Y.; LIU, F.; YE, J. (2006). Quantitative and qualitative analysis of flavonoid markers in *Fucus aurantii* of different geographical origin by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Journal of Chromatography B*, 830, 224-230.
- PRICE, K. R.; PROSSER, T.; RICHENTIN, A.M.F. & RHODES, M. J.C. (1999). A comparison of the favonol content and composition in dessert, cooking and cider-making apples; distribution within the fruit and effect of juicing. *Food Chemistry*, 66, 489-494.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. & MELO, L. F. C. (2004). Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. *Química Nova*, 27, 771-780.
- RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N. J. & PAGANGA, G.E. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2, 152-159.
- THE MERCK INDEX. (1983). The Tenth Edition. Merck & CO.
- VENDRAMINI, A.L. & TRUGO, L.C. (2004). Phenolic Compounds in Acerola Fruit (*Malpighia puniceifolia*, L.). *Journal of Brazilian Chemycal Society*, 15, 664-668.
- XU, X.; YE, H.; WANG, W.; YU, L. & CHEN, G. (2006). Determination of flavonoids in *Houttuynia cordata* Thunb. And *Saururus chinensis* (Lour.) Bail. by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Talanta*, 68, 759-764.

CAPÍTULO VI.

QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE SEIS FLAVONÓIDES PRESENTES EM GELÉIAS DE FRUTAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Resumo

Flavonóides são antioxidantes naturais que podem ser associados à prevenção de várias doenças, como as cardiovasculares e o câncer. Estes compostos estão presentes em um grande número de frutas, porém certas frutas não estão disponíveis durante todo o ano. Uma alternativa para que os benefícios dessas frutas possam estar disponíveis por um período de tempo mais longo é a industrialização, como por exemplo, a produção de geléias. No estudo que se segue, um método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência foi desenvolvido e validado com a finalidade de identificar e quantificar flavonóides em geléia de morango com acerola. Sete compostos foram analisados: (+)-catequina, (-)-epicatequina, rutina, narirutina, miricetina, quercetina e kaempferol. A etapa de validação retornou limites de detecção entre 0,49 e 1,34 mg L⁻¹, e os limites da quantificação ficaram entre 1,50 e 4,05 mg L⁻¹. O ensaio de repetibilidade apresentou um desvio padrão relativo de 3%. As amostras analisadas apresentaram 7,10 ± 0,3 mg de (+)-catequina, 5,3 ± 0,2 mg de (-)-epicatequina, 4,1 ± 0,2 mg de rutina e 6,6 ± 0,3 mg de quercetina por 1kg da geléia de fruta.

Palavras-chave: flavonóides; geléia de frutas; Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

SIMULTANEOUS QUANTIFICATION OF SIX FLAVONOIDS CONTAINED IN FRUIT JELLIES BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY.

Abstract

Flavonoids are natural antioxidants that can be associated to prevention of some diseases, such as cardiovascular and cancer. These compounds are present in a large number of fruits, but some fruits are not available throughout all the year. An alternative to the benefices of this fruit may be available for longer period of time is the industrialization, such as production of jellies. A High Performance Liquid Chromatography was developed and validated in order to identify and quantify flavonoids in strawberry and acerola jelly. Seven flavonoids were analyzed: (+)-catechin, (-)-epicatechin, rutin, narirutin, myricetin, quercetin and kaempferol. The validation step showed limits of detection between 0.49 and 1.34 mg L⁻¹, and the limits of quantification were between 1.50 and 4.05 mgL⁻¹. The repeatability test showed a relative standard deviation of 3%. Samples analyzed presented 7,1 ± 0.3 mg of catechin, 5,3 ± 0.2 mg of epicatechin, 4,1 ± 0.2 mg of rutin and 6,6 ± 0,3 mg of quercetin per 1 kg of fruit jelly.

Keywords: flavonoids; fruit jelly; High Performance Liquid Chromatography.

1. Introdução:

Vários estudos já publicados apontam para os benefícios que alguns alimentos podem desempenhar na saúde humana. Compostos antioxidantes, como flavonóides, têm sido responsabilizados por tais efeitos (Di Carlo et al., 1999), como a prevenção de doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer (González-Barrio et al., 2004; Katalinic et al., 2004; Rice-Evans, Miller e Papanga, 1996).

Elevado número de flavonóides podem ser encontrados em plantas, principalmente nas formas *o*-glicosídicas de glicose, galactose, rhamnose, arabinose, xilose e rutnose. Não há muita informação disponível sobre a absorção, distribuição, metabolismo e excreção de flavonóides em humanos. Por algum tempo foi aceito que apenas agliconas estavam aptas a passar através do trato gastrointestinal (Justesen, Knuthsen e Leth, 1998), mas estudos de Hollman e colaboradores (1995) mostraram que glicosídeos e agliconas de quercetina são absorvidos em relevantes quantidades por humanos. Papanga e Rice-Evans (1997) também argumentam que flavonóides podem ser absorvidos na forma glicosilada, ao passo que encontraram glicosídeos no plasma humano.

Inseridos no grupo dos compostos fenólicos, em geral apresentam dois anéis aromáticos ligados por uma estrutura de carbonos (Figura VI-1) (Di Carlo et al., 1999; Peterson et al., 2006). De acordo com os substituintes desses anéis, os flavonóides podem ser classificados como: flavanóis, flavanonas, flavanonóis, flavonas, flavonolóis, isoflavonas e antocianinas (Tabela VI-1).

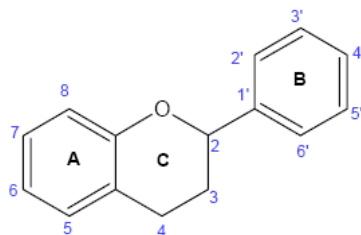


Figura VI-1. Estrutura básica dos flavonóides.

Flavanonas são encontradas nas maiorias das frutas cítricas; flavonas, em frutas cítricas, ervas aromáticas e cereais; isoflavonas, em leguminosas e oleaginosas como soja; antocianinas e suas formas glicosiladas, as antocianidinas, são pigmentos naturais

encontrados em uvas; flavanóis como (+)-catequina e (-)-epicatequina podem ser encontrados em frutas e chás; e os flavonóis podem ser encontrados em qualquer fruta e vegetais (Di Carlo et al., 1999; Peterson et al., 2006; Carrão-Panizzi et al., 1999). Nos alimentos, os flavonóides podem ser responsáveis pela coloração natural (vermelha, laranja e azul) (Di Carlo et al., 1999; Bobbio e Bobbio, 1989).

Tabela VI-1. Classificação dos flavonóides segundo a estrutura molecular

Classificação	C ₃	C ₄	Ligação dupla
Flavanol	- OH	- H	
Flavanona	- O	= O	
Flavanonol	- OH	= O	
Flavona	- H	= O	2 = 3
Flavonol	- OH	= O	2 = 3
Isoflavona	- B	= O	2 = 3
Antocianina	- OH	- H	O = 2; 3 = 4

Quanto à metodologia analítica, diferentes técnicas estão disponíveis, como, por exemplo, as técnicas espectrofotométricas e as separativas. Entre as separativas, merecem destaque a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e a Eletroforese Capilar. O método espectrofotométrico é usado para quantificar o volume total de flavonóides, mas outros compostos podem influenciar no resultado final. A CLAE e a CE estão aptas para separar, detectar e quantificar diferentes flavonóides separadamente em matrizes complexas (Cordenunsi et al., 2002). A Cromatografia Líquida de Fase Reversa (RP-LC) é normalmente a modalidade empregada para a determinação destes compostos, usando uma coluna de C₁₈. A fase móvel normalmente é eluída na coluna por gradiente e em geral é constituída de (A) uma fase aquosa com tampão acetato ou fosfato e (B) uma fase orgânica, onde está presente metanol ou acetonitrila (Di Carlo et al., 1999; Rice-Evans, Miller e Papanga, 1996).

Detector de arranjo de diodos (DAD) é o mais usado na análise desse tipo de compostos por RP-LC. Como dito anteriormente, todos os flavonóides apresentam um anel aromático, e por essa razão, possuem alta absorção da região do UV - visível. O primeiro

máximo de absorção ocorre entre 185 e 240 nm. Este fator é devido à presença do anel “A” (Figura VI-1). O segundo máximo de absorção ocorre entre 300 e 550 nm, que é devido aos grupamentos no anel “C”. A presença de grupamentos metila, metoxi e hidroxila não dissociados geralmente causam pequenas mudanças nos valores do comprimento de onda máximo (Rijke et al., 2006).

A extração destes compostos é geralmente realizada empregando um solvente orgânico, como o metanol (Hakkinen, 2000; Price et al., 1999; Matilla, Astola e Kumpulainen, 2000), acetona (Kosar et al., 2004) ou etanol em conjunto com água (Peng, Liu e Ye, 2006; Xu et al., 2006). Amostras líquidas são filtradas ou centrifugadas antes de serem submetidas às metodologias analíticas (Di Carlo et al., 1999). Algumas vezes é utilizada a hidrólise alcalina, ácida ou enzimática (Hakkinen, 2000), sendo que esta hidrólise é feita quando se deseja quebrar a ligação de flavonóides com glicosídeos ou ésteres. Com a intenção de preservar os flavonóides durante o processo extrativo, antioxidantes como ácido acético (Cordenunsi et al., 2002; Price et al., 1999), ácido ascórbico (Dadáková, Procházková e Krizek, 2001) e 2,3-tert-butil-4-hidroxianisol (BHA) (Matilla, Astola e Kumpulainen, 2000) podem ser aderidos à solução extratora.

A plantação de morangos no Brasil inicia entre Março e Maio e a colheita acontece entre Junho e Novembro. O morango fora de sua época, na maioria dos casos, é mantido à baixa temperatura, o que resulta em perda de qualidade e aumento de preço (Henrique e Cereda, 1999). Processos tecnológicos são uma alternativa para tornar o morango e outras frutas disponíveis por todo o ano, mesmo fora da época sazonal, e a produção de geléias é uma boa alternativa (Baker et al., 2005). A geléia empregada no presente trabalho foi preparada com duas frutas: acerola e morango. Há poucos estudos que se referem à identificação e quantificação de flavonóides em acerola. Já para o morango, vários artigos foram encontrados (Tabela VI-2).

Tabela VI-2. Flavonóides encontrados em acerola e morango de acordo com a literatura

Fruta	Composto	Quantidade (mg por kg)	Referência
Acerola	Quercetina	Identificado	Vendramini e Trugo, 2004
	Kaempferol	Identificado	
Morango	Quercetina	5 – 53,2	Cordenunsi et al., 2002; Hakkinen, 2000; Breitfellner, Solar e Sontag, 2002; Kosar et al., 2004.
	Kaempferol	4,7 – 34	
	(+)-catequina	44 – 49	Breitfellner, Solar e Sontag, 2002
	(-)-epicatequina Miricetina	2,4 – 2,9 3,1 – 36	Breitfellner, Solar e Sontag, 2002; Kosar et al., 2004

Vendramini e Trugo (2004) identificaram quercetina e kaempferol em acerola, mas não quantificaram. Breitfellner, Solar e Sontag (2002) encontraram (+)-catequina (44 a 49 mg em 1 kg) e (-)-epicatequina (2,4 a 2,9 mg em 1 kg) em morango. Kaempferol e quercetina foram verificados em concentrações entre 4,7-34 mg e 5-53,2 mg em 1 kg de morango, respectivamente (Cordenunsi et al., 2002; Hakkinen, 2000, Breitfellner, Solar e Sontag, 2002; Kosar et al., 2004). Kosar e colaboradores (2004) encontraram miricetina em morango.

O presente trabalho visou identificar e quantificar flavonóides ((+)-catequina, (-)-epicatequina, rutina, narirutina, miricetina, quercetina, kaempferol) em geléia de acerola com morango. Dois outros compostos também foram estudados: rutina (flavonol) e narirutina (flavanona). Esta é a primeira vez que uma geléia de morango e acerola tem seus flavonóides analisados.

2. Experimento

2.1. Reagentes

Acetonitrila em grau CLAE foi obtida da LabScan. O ácido orto-fosfórico usado foi da Panreac. Metanol, etanol, acetona e dimetilsulfoxido (DMSO), todos em grau CLAE, foram obtidos da Fisher Scientific. A água deionizada foi obtida do deionizador Milli-Q, da Millipore. (+)-catequina, (-)-epicatequina, rutina, narirutina, miricetina e kaempferol foram adquiridos da Extrasintese. Kaempferol foi dissolvido em etanol e a miricetina foi

dissolvida em DMSO. Os outros flavonóides foram dissolvidos em metanol. Soluções de 1 g L⁻¹ de cada flavonóide foram preparadas e estocadas a - 10°C, em frasco âmbar.

2.2. Extração da amostra.

As geléias de morango e acerola foram obtidas direto do fabricante. Pequenas porções foram separadas e mantidas em pequenos frascos âmbar, a 4°C, até o momento da análise. 25 mL de metanol 50% foram adicionados a 5 g de amostra e essa solução foi homogeneizada por 80 minutos a 3 g e filtrada em funil de buchner. A solução límpida foi concentrada em rotoevaporador (40°C) até um volume de 12 mL volume. O concentrado foi aplicado a um cartucho de SPE C₁₈ previamente ativado com metanol e lavado com água. Após a eluição da amostra através do cartucho, foi realizada a lavagem com água deionizada para eliminar açúcares e outros compostos hidrossolúveis presentes. Após, o cartucho foi eluído com metanol 100%. A solução obtida foi concentrada em rotoevaporador (40°C) até 2 mL. O extrato final foi filtrado a 0,45 µm e analisado pela CLAE. Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

2.3. Equipamentos e condições Cromatográficas.

O sistema cromatográfico utilizou um instrumento ThermoFinnigan Surveyor, com injeção automática (loop de 20µL), bomba quaternária e detector de arranjo de diodos (DAD). O tratamento de dados foi realizado pelo ChromQuest. A coluna utilizada foi RP-18 Lichrocart (250 mm x 4,5 mm) da Merck e a pré-coluna RP-18 Lichrosper. O método cromatográfico foi baseado no método desenvolvido por Matilla, Astola e Kumpulainen (2000) com modificações. A fase móvel consistiu em 1% de ácido orto-fosfórico (A) e acetonitrila (B). O gradiente de eluição iniciou em 95% de “A”, num fluxo de 0,7 ml min.⁻¹. Este gradiente foi mantido até 5 minutos. Entre 5 e 55 minutos a eluição passou para 50% de “A” e esta concentração foi mantida por 10 minutos. Entre 65 e 67 minutos, a concentração retornou a 95% de “A”. A corrida terminou aos 77 minutos. A detecção foi

realizada a 260 nm (rutina, miricetina e kaempferol), 280 nm ((+)-catequina, (-)-epicatequina e narirutina), e 400 nm (quercetina).

2.4. Metodologia de validação.

A seletividade do método foi avaliada usando o DAD. A amostra foi também fortificada com os compostos em questão e analisada. A comparação entre o perfil cromatográfico obtido para o extrato da amostra, extrato da amostra fortificada e soluções com apenas padrões foi realizada. Foram observados os espectros de absorbância de cada composto e o tempo de eluição dos mesmos. A linearidade do sistema foi confirmada usando soluções de padrões entre 0,5 e 10 mg L⁻¹. As análises foram realizadas de acordo com as condições experimentais descritas anteriormente. A repetibilidade do método foi avaliada em dois níveis de concentração (2 e 10 mg L⁻¹), analisando 10 soluções de cada nível e também 10 extratos da mesma amostra usando a metodologia de CLAE descrita. A precisão intermediária foi avaliada comparando curvas analíticas feitas em três dias diferentes. O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram calculados dividindo-se o desvio padrão obtido no teste de repetibilidade e o coeficiente angular da curva analítica. Esta razão foi multiplicada por 3,3 para o LD e por 10 para o LQ (Ribani et al., 2004).

3. Resultados e discussão

Um método analítico foi otimizado com a finalidade de determinar (+)-catequina, (-)-epicatequina, rutina, narirutina, miricetina, quercetina e kaempferol presentes em geléias de frutas, usando CLAE acoplada ao DAD. A identificação dos compostos foi confirmada comparando-se o espectro UV-visível obtido para os picos detectados na amostra, os picos correspondentes em soluções padrão com mesmo tempo de eluição e em amostra fortificada. A máxima sensibilidade do método é obtida quando os compostos são analisados no seu comprimento de onda de máxima absorção. Cada grupo de flavonóides tem características estruturais próprias, então, cada grupo tem sua alta sensibilidade situada em diferente comprimento de onda. (+)-catequina e (-)-epicatequina são flavanóis e

possuem um grupamento OH no carbono 3 (Figura VI-1), apresentando um máximo de absorvância a 280 nm. Flavonóis, como rutina, quercetina, miricetina e kaempferol, apresentam absorção máxima a 260 nm e sua estrutura mostra um grupamento OH no carbono 3 e uma dupla ligação entre os carbonos 2 e 3 (Figura VI-1). Narirutina é uma flavanona e apresenta máximo de absorção a 280 nm, igual aos flavanóis.

De acordo com o mencionado acima, as amostras foram verificadas em dois comprimentos de onda distintos: 260 e 280 nm. Durante a análise das geléias, foi necessário empregar outro comprimento de onda devido a um composto desconhecido com igual tempo de eluição da quercetina. Este flavonol apresenta outro máximo de absorvância a 400 nm e o composto desconhecido não absorve nesta área. Com isso, este comprimento de onda (400 nm) foi também usado nas análises que se seguem. A Figura VI-2 mostra o perfil cromatográfico obtido a 260 nm quando uma mistura dos padrões (+)-catequina (1), (-)-epicatequina (2), rutina (3), narirutina (4), miricetina (5), quercetina (6) e kaempferol (7) foi analisada. O método separou adequadamente estes flavonóides, sem coeluição de picos.

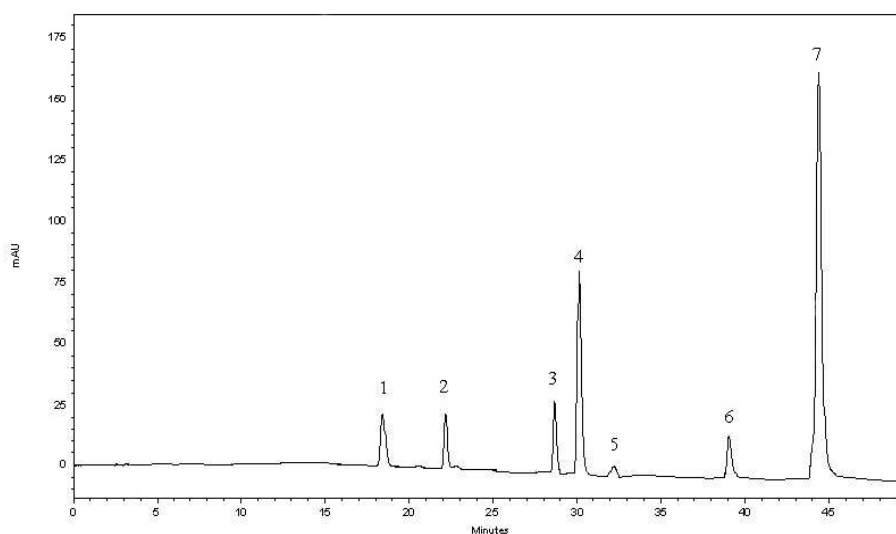


Figura VI-2. Perfil cromatográfico obtido da mistura dos padrões (+)-catequina (1), (-)-epicatequina (2), rutina (3), narirutina (4), miricetina (5), quercetina (6) e kaempferol (7). As condições de análise estão descritas no item 2.3. Comprimento de onda apresentado é 260 nm.

No perfil cromatográfico obtido por meio da análise do extrato da geléia de morango com acerola (Figura VI-3) os flavonóides (+)-catequina, (-)-epicatequina, rutina,

quercetina e kaempferol foram detectados. Narirutina e miricetina não foram encontrados nessa amostra.

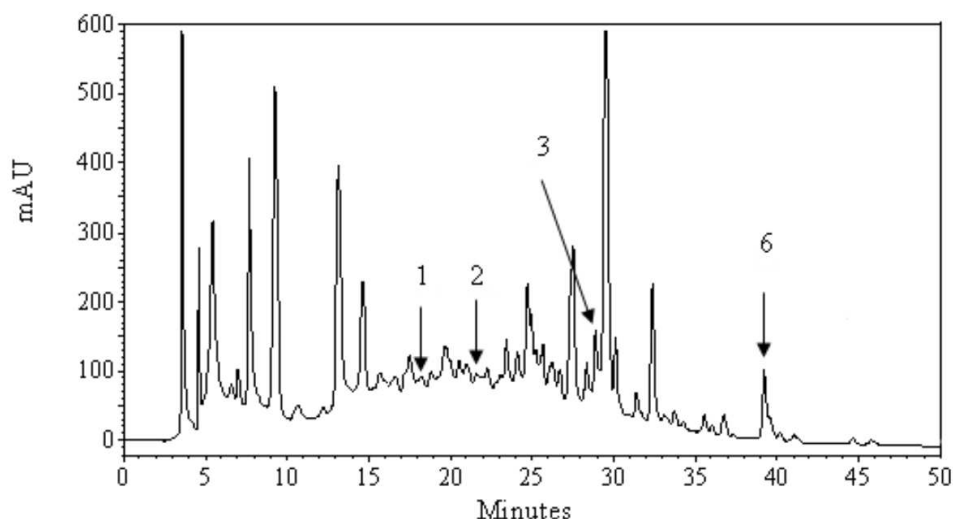


Figura VI-3. Perfil cromatográfico obtido na análise do extrato de geléia de acerola com morango. As condições de análise estão descritas no item 2.3. Comprimento de onda apresentado é 260 nm.

A seletividade do método foi confirmada comparando-se o espectro de absorção dos compostos isolados com os compostos presentes na amostra, considerando o mesmo tempo de eluição para ambos os perfis cromatográficos. A amostra também foi adicionada de padrões e um aumento no sinal do detector foi observado nos picos em análise, confirmando a presença destes compostos na amostra. Considerando os resultados obtidos, o método pode ser dito seletivo: é capaz de identificar todos os compostos em questão, sem interferentes.

A linearidade do método também foi testada. A maioria dos flavonóides apresentou um coeficiente de correlação acima de 0,99 (Tabela VI-3). Para a miricetina, no entanto, resultados não foram satisfatórios. Diferentes soluções padrões foram analisadas, utilizando dois lotes diferentes do mesmo padrão. Dificuldades envolvendo a quantificação da miricetina por CLAE já foram relatadas pela literatura e este fato está ligado à sua alta instabilidade e a presença de outros compostos eluindo ao mesmo tempo (Justesen, Knuthsen e Leth, 1998). Neste trabalho, somente a instabilidade foi verificada, não houve

compostos coeluinto com a miricetina. Por esta razão, a miricetina não foi considerada no processo de validação. A detecção é possível, mas a quantificação, não.

Tabela VI-3. Parâmetros dos modelos ajustados às curvas analíticas ($y = A + Bx$), coeficientes de correlação e limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para cada flavonóide.

Flavonóides	A	B	R ²	LD (mg L ⁻¹)	LQ (mg L ⁻¹)
(+)-catequina	-7598,34	56976,7	0,99	0,89	2,70
(-)-epicatequina	16259,65	69175,19	0,99	1,34	4,05
Rutina	-11749,4	182862,9	0,99	0,56	1,70
Narirutina	175957,4	816570,2	0,99	0,49	1,50
Kaempferol	-76326,2	336270,4	0,99	0,95	2,89
Quercetina	-93041,7	183177,4	0,99	0,88	2,68

A repetibilidade do método foi avaliada em dois níveis de concentração (3 e 10 mg L⁻¹), aplicando-se ao sistema 10 soluções de igual composição, contendo uma mistura de todas as substâncias em questão, também foram analisados 10 extratos da mesma amostra.

O maior desvio padrão relativo encontrado foi de 0,10% para o tempo de eluição e 2,70% para o sinal do detector (Tabela VI-4). Para a amostra, o desvio padrão relativo do sinal do detector foi de 4,94% para a quercetina. O tempo de eluição teve desvio padrão relativo máximo de 0,10%, também para a quercetina (Tabela VI-5). A repetibilidade na amostra foi avaliada segundo sua concentração e não pelo sinal do detector, uma vez que a pesagem da mesma não é tão repetitiva quanto o preparo de soluções de padrões isolados.

Tabela VI-4. Repetibilidade do método para os flavonóides em solução.

Flavonóide	Tempo		Área	
	Medida (s)	Desvio (%)	Medida (mAu)	Desvio (%)
(+)-catequina	18,77	0,09	443093,30	2,70
(-)-epicatequina	22,43	0,10	671859,80	1,59
Rutina	28,86	0,05	1871052,30	1,36
Narirutina	30,37	0,01	7868088,00	0,22
Quercetina	39,21	0,03	1572098,50	2,29
Kaempferol	44,61	0,03	3203616,30	0,67

Tabela VI-5. Repetibilidade do método e desvio padrão relativo (DPR) para os flavonóides presentes na amostra de geléia de morango com acerola

Flavonóide	Tempo		Concentração	
	Media (s)	DPR (%)	Media (mg/100ml)	DPR (%)
(+)-catequina	18,78	0,06	7,15	4,89
(-)-epicatequina	22,43	0,10	5,26	3,94
Rutina	28,86	0,05	4,11	4,67
Quercetina	39,21	0,03	6,65	4,94

Para verificar a precisão intermediária, soluções de padrões foram preparadas e analisadas em três dias diferentes. Nova fase móvel também foi preparada em cada dia. Os coeficientes de correlação (r^2) obtidos para as curvas analíticas foram sempre próximos a 0,99. Assumindo todos os pontos obtidos nos 3 dias que se seguiram, modelos também foram ajustados às curvas analíticas e os coeficientes resultantes estão descritos na Tabela VI-3. Considerando cada dia como um modelo diferente, os parâmetros obtidos foram comparados e um desvio padrão relativo de no máximo 4,37% foi encontrado, indicando uma satisfatória precisão intermediária.

Os limites de detecção e quantificação foram obtidos por meio da curva analítica construída no estudo de precisão intermediária e o desvio padrão calculado no ensaio de repetibilidade. A narirutina apresentou o menor LD e o menor LQ. Os maiores valores foram encontrados para a (-)-epicatequina (Tabela VI-3).

A exatidão do método foi avaliada por meio do teste de recuperação. Quantidades de 3 e 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de cada flavonóide foram adicionadas à matriz antes da extração. Uma comparação entre a matriz fortificada e a sem fortificação também foi feita. Os resultados podem ser observados na Tabela VI-6.

Tabela VI-6. Ensaio de recuperação dos flavonóides

Flavonóide	Recuperação (%)
(+)-catequina	70,51
(-)-epicatequina	83,46
Rutina	78,46
Narirutina	73,08
Kaempferol	68,60
Quercetina	82,38

Valores entre 69% e 83% podem ser verificados. Ribani e colaboradores (2004) postulam que são aceitáveis valores entre 70 e 120%, mas, conforme a complexidade da matriz, a recuperação pode se encontrar entre 50 e 120%. A maioria dos flavonóides englobados no presente estudo mostrou uma recuperação dentro do primeiro intervalo citado pelos autores. O kaempferol foi o único que não se encontrou no primeiro intervalo, mas está englobado pelo segundo.

O método usado para analisar os flavonóides na geléia de fruta provou ser seletivo, linear, preciso e apresentou limites de detecção e quantificação aceitáveis para o trabalho proposto. A recuperação também pode ser considerada satisfatória.

Durante a produção de geléias de frutas, diferentes operações, como trituração, homogeneização, concentração até o nível de sólidos solúveis aceitáveis e tratamentos de calor, como pasteurização, são realizados (Baker et al., 2005). Degradações de compostos, como flavonóides, podem ocorrer nestas etapas. O calor, a maceração, a longa exposição ao oxigênio e reações enzimáticas causam perdas nutricionais.

As concentrações de flavonóides presentes na geléia de morango com acerola foram: $7,15 \pm 0,3$ mg de (+)-catequina, $5,26 \pm 0,2$ mg de (-)-epicatequina, $4,11 \pm 0,2$ mg de rutina e $6,65 \pm 0,3$ mg de quercetina em 1 kg de amostra. O kaempferol, apesar de detectado visualmente, apresentou valores abaixo dos limites de detecção e quantificação calculados. Os resultados deste trabalho demonstraram que, apesar das condições de processamento necessárias para a fabricação de geléia, flavonóides ainda podem ser encontrados no produto final. As concentrações de (+)-catequina, (-)-epicatequina e quercetina nas geléias são menores do que as relatadas na literatura para o morango. De acordo com a Tabela VI-2, alguns autores relataram também a presença de kaempferol e

miricetina no morango, mas estes compostos não foram detectados. A diferença pode ser resultado de variações entre espécies, condições climáticas, localizações geográficas, uso de pesticidas, maturação das frutas e degradação durante o processo de fabricação e estocagem das geléias (Mezadri et al., 2008).

Os resultados mostram que flavonóides presentes em frutas podem estar disponíveis ao consumidor fora do período de sazonalidade por meio de processos industriais, como ocorrem no preparo de geléias de frutas.

4. Conclusão

O método proposto neste trabalho pode ser usado para quantificar (+)-catequina, (-)-epicatequina, rutina, narirutina, quercetina e kaempferol em geléias de frutas. O método foi seletivo, linear e preciso. Os coeficientes de correlação obtidos para concentrações entre 0,5 e 10 mg L⁻¹ foram acima de 0,99 para a maioria dos flavonóides, com exceção da miricetina. A repetibilidade do método, expressa em desvio padrão relativo, foi de 3% quando soluções padrões foram analisadas, já para as amostras, esse desvio máximo foi de 4,9%. Os resultados obtidos para cada flavonóide na geléia estudada mostrou que este é um tipo de alimento que pode ser usado para obter os flavonóides presentes em frutas fora do seu período sazonal. O método analítico não foi eficiente para quantificar a miricetina presente em geléias de frutas.

5. Referências

- BAKER, R.A.; BERRY, N.; HUI, Y. H. & BARRET, D.M. (2005). Fruit preserves and Jams. IN: *Processing Fruit: Science and Technology*, Second Edition, Cap 6.
- BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.O. (1989). *Introdução à química de alimentos*. Varela, São Paulo, SP.
- BREITFELLNER, F.; SOLAR, S. & SONTAG, G. (2002). Effect of gamma irradiation on flavonoids in strawberries. *European Food Research Technology*, 215, 28-31.
- CARRÃO-PANIZZI, M.C.; BELÉIA, A.D.P.; KITAMURA, K.; OLIVEIRA, C.N. (1999). *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 34, 1787-1795.
- CORDENUNSI, B. R.; NASCIMENTO, J. R. O.; GENOVESE, M. I. & LAJOLO, F. M. (2002) Influence of Cultivar on Quality Parameters and Chemical Composition of Strawberry Fruits Grown in Brazil. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 50, 2581-2586.
- DADÁKOVÁ, EVA.; PROCHÁZKOVÁ, EVA. & KRIZEK, M. (2001). Application of micellar electrokinetic capillary chromatography for quantitative analysis of quercetin in plant materials *Electrophoresis*, 22, 1573-1578.
- DI CARLO, G., MASCOLO, N., IZZO, A.A. & CAPASSO, F. (1999). Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences*, 65, 337-353.
- GONZÁLEZ-BARRIO, R., TRINDADE, L.M., MANZANARES, P., GRAAFF, L. H., TOMÁS-BARBERÁN, F.A. & ESPÍN, J.C. (2004). Production of Bioavailable Flavonoid Glucosides in Fruit Juices and Green Tea by Use of Fungal α -l-Rhamnosidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6136-6142.
- HAKKINEN, S. (2000). *Flavonols and Phenolic Acids in Berries and Berry Products*. These (Doctor in Clinical Nutrition), Faculty of Medicine of Kuopio University, Kuopio, Finland.
- HENRIQUE, C.M. & CEREDA, M.P. (1999). Utilização de biofilmes na conservação pós-colheita de morango (*Fragaria Ananassa Duch*) cv IAC Campinas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 19, 231-233.
- HOLLMAN, P.C.H.; VRIES, J.H.M.; LEEUWEN, S.D.; MENGELERS, M.J.B. & KATAN, M.B. (1995). Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *The American journal of Clinical Nutrition*, 62, 1276-1282.
- JUSTESEN, U.; KNUTHSEN, P. & LETH, T. (1998). Quantitative analysis of flavonols, 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*, 799, 101-110.
- KATALINIC, V.; MILOS, M.; MODUN, D. & BOBAN, M. (2004). Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+) – catechin. *Food Chemistry*, 86, 596-600.
- KOSAR, M.; KAFKAS, E.; PAYDAS, S. & BASER, K.H.C. (2004). Phenolic Composition of Strawberry Genotypes at Different Maturation Stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1586-1589.

- MATILLA, P.; ASTOLA, J.; KUMPULAINEN, J. (2000). Determination of Flavonoids in Plant Material by HPLC with Diode-Array and Electro-Array Detections. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5834-5841.
- MEZADRI, T.; VILLANO, D.; FERNANDEZ-PACHON, M.S.; GARCIA-PARRILA, M.C. & TRONCOSO, A.M. (2008). Antioxidant compounds and antioxidant activity in acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruits and derivatives. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 282-290.
- PAPANGA, G. & RICE-EVANS, C.A. (1997). The identification of flavonoids as glycosides in human plasma. *FEBS Letters*, 401, 78-82.
- PENG, Y.; LIU, F.; YE, J. (2006). Quantitative and qualitative analysis of flavonoid markers in *Fragaria aurantiifolia* of different geographical origin by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Journal of Chromatography B*, 830, 224-230.
- PETERSON, J.J.; DWYER, J.T.; BEECHER, G.R.; BHAGWAT, S.A.; GEBHARDT, S.E.; HAYTOWITZ, D.B. & HOLDEN, J.M. (2006). Flavanones in oranges, tangerines (mandarins), tangors, and tangelos: a compilation and review of the data from the analytical literature. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, S66-S73.
- PRICE, K. R.; PROSSER, T.; RICHENTIN, A.M.F. & RHODES, M. J.C. (1999). 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*, 66, 489-494.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. & MELO, L. F. C. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. *Química Nova*, 27, 771-780.
- RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J. & PAPANGA, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, 20, 933-956.
- RIJKE, E.; OUT, P.; NIESSEN, W.M.A.; ARIESE, F.; GOOIJER, C. & BRINKMAN, U.A.T. (2006). Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 1112, 31-63.
- VENDRAMINI, A.L. & TRUGO, L.C. (2004). Phenolic Compounds in Acerola Fruit (*Malpighia puniceifolia*, L.). *Journal of Brazilian Chemical Society*, 15, 664-668.
- XU, X.; YE, H.; WANG, W.; YU, L. & CHEN, G. (2006). Determination of flavonoids in *Houttuynia cordata* Thunb. and *Saururus chinensis* (Lour.) Bail. by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Talanta*, 68, 759-764.
- XU, X.; YE, H.; WANG, W.; YU, L. & CHEN, G. (2006). Determination of flavonoids in *Houttuynia cordata* Thunb. and *Saururus chinensis* (Lour.) Bail. by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Talanta*, 68, 759-764.

CAPÍTULO VII.

OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA PARA A SEPARAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM ALIMENTOS E BEBIDAS POR ELETROFORESE CAPILAR

Resumo

O presente estudo desenvolveu um método de identificação e quantificação de 16 compostos simultaneamente em geléias de frutas e vinhos utilizando a Eletroforese Capilar. Os compostos separados foram os flavonóides narirutina, (-)-epicatequina, (+)-catequina, rutina, kaempferol, miricetina, quercetina e morina, além dos fenólicos não flavonóides *trans*-resveratrol, ácido cinâmico, ácido ferrúlico, ácido *p*-coumárico, ácido vanílico, ácido caféico, ácido gálico e ácido 3,4-dihidroxibenzóico. As etapas de otimização envolveram a escolha da concentração do tampão (entre 50, 100, 150, 175 e 200 mmol L⁻¹), da voltagem aplicada (10, 20 e 30 kV), do tamanho do capilar (50 µm de diâmetro por 37, 48 e 68 cm de comprimento total), do pH (entre 8,8 e 9,6) e do tempo de injeção. Foi também verificado o efeito do solvente da matriz no sistema, sendo testadas as misturas de metanol/água e etanol/ água. A melhor separação ocorreu com 175 mmol L⁻¹ de ácido bórico, 68 cm de tamanho de capilar, 30 kV de voltagem, pH 9,0, injeção hidrodinâmica de 50 mbar por 30 s seguida de inversão da voltagem para -20 kV por 5 s. Quanto ao solvente, as misturas de metanol:água (30:70) e etanol:água (10:90) apresentaram perfis semelhantes, boa estabilidade, repetibilidade e precisão.

Palavras-chave: Compostos fenólicos, Eletroforese Capilar, otimização, geléia de frutas, vinhos.

OPTIMIZATION METHODOLOGY FOR THE SEPARATION OF PHENOLIC COMPOUNDS IN FOODS AND BEVERAGES BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Abstract

This study developed a method to identify and quantify 16 compounds simultaneously in fruit jellies and wines using Capillary Electrophoresis. The compounds separated were the flavonoids narirutin, (-)-epicatechin, (+)-catechin, rutin, kaempferol, myricetin, quercetin and morin, besides the phenolic non-flavonoids trans-resveratrol, cinnamic acid, ferulic acid, p-coumaric acid, vanillic acid, caffeic acid, gallic acid and 3,4-dihydroxybenzoic acid. The steps of optimizing involved the choice of buffer concentration (between 50, 100, 150, 175 and 200 mmol L⁻¹), the applied voltage (10, 20 and 30 kV), the size of the capillary (50 µm diameter by 37, 48 and 68 cm total length), pH (between 8.8 and 9.6) and the injection time. The effect of the solvent in the matrix system was also verified by testing mixtures of methanol/water and ethanol/water. The best separation occurred with 175 mmol L⁻¹ of boric acid, capillary with 68 cm, 30 kV, pH 9.0, hydrodynamic injection at 50 mbar for 30 s and then reversing voltage to -20 kV for 5 s. The solvent mixtures of methanol: water (30:70) and ethanol: water (10:90) showed similar profiles, with good stability, repeatability and accuracy.

Keywords: Phenolic compound, Capillary Electrophoresis, optimization, fruit jelly, wine.

1. Introdução

Nos últimos anos, o interesse pelo consumo de produtos naturais vem crescendo. Este fato está relacionado com indícios dos efeitos benéficos na saúde humana que tais alimentos podem resultar, como, por exemplo, a prevenção de doenças coronárias (Bravo et al., 2006; Frazier, 2001), alguns tipos de câncer e processos inflamatórios (Jac, Polasek e Pospisilova, 2006). Estes efeitos podem estar associados a compostos fenólicos, facilmente encontrados em frutas, vegetais e alguns produtos derivados, como vinhos, chás e geléias. Do ponto de vista tecnológico, estes compostos contribuem para a qualidade sensorial do alimento e possuem efeito em sua cor, amargura, adstringência e sabor (Kanitsar et al., 2001; Minussi et al., 2003).

A distribuição e a quantidade de fenólicos encontradas em cada alimento estão suscetíveis a diferenças entre espécies, cultivares, grau de amadurecimento, condições ambientais de crescimento, colheita e estocagem, além de possíveis processamentos (Kanitsar et al., 2001; Minussi et al., 2003).

Quanto às características estruturais, as substâncias fenólicas podem ser classificadas em dois grandes grupos: flavonóides e não flavonóides (Fang et al., 2007; Facco, 2006). O primeiro grupo é o mais encontrado em alimentos e normalmente apresenta maior potencial antioxidante entre os compostos fenólicos. Quercetina, kaempferol, miricetina, (+)-catequina e (-)-epicatequina são exemplos de flavonóides. Ácido gálico, ácido caféico, ácido p-coumárico e *trans*-resveratrol são exemplos do grupo “não flavonóides” (Facco, 2006).

Muitos métodos já foram desenvolvidos para caracterizar estes compostos em alimentos, fármacos e cosméticos, como, por exemplo, a Cromatografia em Papel, a Cromatografia em Camada Delgada e a Cromatografia em Coluna Aberta. Técnicas que despendem grande tempo e não são particularmente vantajosas para quantificação de grande número de amostras. A Cromatografia Gasosa é uma técnica rápida, eficiente e precisa, mas geralmente requer uma etapa de derivatização. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e a Eletroforese Capilar (EC) estão aptas para realizar esse tipo de análise com alta sensibilidade e com curto tempo de preparação de amostras (Kanitsar et al., 2001).

A EC é uma técnica de separação de compostos que demonstra grande versatilidade e pode ser implementada para analisar compostos catiônicos e aniônicos, assim como compostos neutros e moléculas com seletividade hidrofóbica (Fonseca et al., 2001). Os recentes avanços em EC proporcionaram um método de separação rápido, econômico e com elevada eficiência de separação que pode resolver problemas com interferentes presentes na matriz comumente encontrados na análise por CLAE (Frazier, 2001; Fung e Tung, 2001). Por outro lado, esta técnica apresenta alguns problemas como baixa sensibilidade e reprodutibilidade, quando comparada com CLAE (Jac, Polasek e Pospisilova, 2006).

A Eletroforese Capilar de Zona (CZE) e a Cromatografia Eletrocinética Micelar (MEKC) são as mais utilizadas para identificar e quantificar fenólicos em diversas matrizes (Jac, Polasek e Pospisilova, 2006). Estudos realizados por Pasourek e colaboradores (2000), empregaram a CZE para separar 10 compostos fenólicos em vinho. Kanitsar e colaboradores (2001) utilizaram o mesmo recurso para separar 15 compostos fenólicos em frutas cítricas. Já Fonseca e colaboradores (2001) aplicaram a MEKC para separar 9 compostos fenólicos em ervas.

O presente estudo desenvolveu e avaliou uma metodologia de separação de 16 compostos fenólicos empregando a técnica de CZE. Para verificar a versatilidade da técnica frente a diferentes matrizes, foram analisadas amostras de geléia, vinho branco, tinto e rose.

Nenhum estudo foi encontrado sobre fenólicos em geléias de frutas, apenas dados sobre fenólicos em frutas e sucos são encontrados. Em morangos, são encontrados quercetina, kaempferol, (+)-catequina e (-)-epicatequina (Cordenunsi et al., 2002; Breitfellner, Solar e Sontag, 2002). Em acerola, estudos indicam a presença de quercetina e kaempferol apenas (Vendramini e Trugo, 2004). Alguns estudos quantificaram ácido gálico, ácido caféico, ácido *p*-coumárico, (+)-catequina, (-)-epicatequina, *trans*-resveratrol, quercetina e kaempferol em vinhos tintos Italianos e Brasileiros (Facco, 2006; Pazourek et al., 2000). Miricetina, quercetina e kaempferol foram encontrados em vinhos chineses (Fang et al., 2007).

2. Experimento

2.1. Reagentes

O padrão de narirutina foi obtido da Extrasynthese, enquanto que os padrões de *trans*-resveratrol, (-)-epicatequina, (+)-catequina, rutina, ácido cinâmico, ácido ferrúlico, kaempferol, ácido *p*-coumárico, ácido vanílico, miricetina, quercetina, morina, ácido caféico, ácido gálico e ácido 3,4-dihidroxibenzóico foram obtidos da Sigma-Aldrich. Também foram utilizados metanol e etanol grau CLAE da J. T. Baker, dimetilsulfóxido da Amresco, ácido bórico da Ecibra e NaOH da Nuclear. A água empregada nos experimentos foi purificada usando sistema Milli-Q (Millipore Corporation). Todas as soluções foram filtradas em filtros de 0,45 µm e sonicadas por 5 minutos antes da injeção.

As soluções estoque dos padrões foram preparadas em metanol e etanol, com exceção da miricetina, solubilizada em dimetilsulfóxido. Estas soluções foram armazenadas a -18°C e protegidas da luz. As soluções trabalho foram preparadas em metanol:água (30:70) e etanol:água (10:90), em concentrações que variaram de 0,05 a 20 mg L⁻¹.

2.2. Extração das amostras

O método proposto foi aplicado em cinco amostras diferentes, incluindo geléia de frutas, vinhos tinto, rosè e branco. Cada tipo de amostra necessitou de diferente extração. A amostra de geléia de acerola com laranja foi extraída com metanol: água (1:1) por 80 minutos. Este extrato levado ao rotoevaporador até chegar à concentração de 12 ml e depois foi submetido a uma limpeza em coluna C₁₈ de extração em fase sólida (SPE). O extrato orgânico final foi evaporado e ressuspendido em metanol:água (30:70), filtrado, sonicado e injetado na Eletroforese Capilar.

As amostras de vinho tinto foram diluídas 1:1 em etanol:água (10:90), filtradas em filtros de 0,45 µm, sonicadas por 5 minutos para remoção de bolhas de ar e injetadas no equipamento de Eletroforese Capilar. Os vinhos rosè e branco foram analisados sem

diluição. Para facilitar a identificação e confirmação dos analitos, uma alíquota de cada amostra foi fortificada com padrão de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ contendo os 16 analitos.

2.3. Equipamento e condições Eletroforéticas.

Foi utilizado um equipamento Agilent G1600AX (Agilent Technologies, Germany), série DE016032210, equipado com detector de arranjo de diodos (UV-Visível), injetor automático e sistema de controle de temperatura ajustado em 25°C . Os capilares testados foram de sílica fundida com $75 \text{ }\mu\text{m}$ de diâmetro por 72 cm de comprimento total e $50 \text{ }\mu\text{m}$ por 37, 48 e 68 cm de comprimento total (Agilent Technologies). A detecção foi realizada a 217 nm. A análise e o tratamento dos dados foram realizados em um sistema HP Chemstation acoplado à Eletroforese Capilar.

Os capilares novos foram ativados e condicionados, no primeiro dia de uso, por lavagem com pressão de 1 000 mbar com solução de NaOH 1 mol L^{-1} durante 30 minutos, seguido de 10 minutos de água. No início de cada dia de trabalho, o capilar foi condicionado com 5 minutos de NaOH 1 mol.L^{-1} , seguido de 5 minutos de água e 10 minutos de eletrólito. No final do dia foi realizada uma limpeza no capilar com lavagem por 5 minutos com NaOH 1 mol.L^{-1} e 5 minutos de água. O capilar foi armazenado em água durante a noite.

Na otimização da metodologia, foram utilizadas soluções de ácido bórico variando de 50 a 200 mmol L^{-1} , baseando-se nos estudos realizados por Kanitsar e colaboradores (2001). O pH de todos os eletrólitos foi ajustado inicialmente em 9,0, com auxílio de uma solução de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. As voltagens aplicadas variaram de 10 a 30 kV. Inicialmente, foi utilizado um capilar de 68 cm de comprimento total, em temperatura constante de 25°C e injeção hidrodinâmica de 50 mbar por 5 s. Os padrões foram solubilizados em metanol:água (50:50 e 30:70) e etanol:água (10:90). Após estas etapas de otimização, foi verificado o melhor pH de análise, variando o mesmo de 8,8 a 9,6. Diferentes comprimentos de capilar também foram testados (de 37 a 68 cm), mantendo-se o mesmo diâmetro ($50 \text{ }\mu\text{m}$). Os ensaios de injeção englobaram as modalidades hidrodinâmica e eletrocinética. No modo hidrodinâmico, as amostras foram injetadas a 50 mbar por 5, 10, 20 e 30 segundos. Na injeção eletrocinética, avaliou-se a aplicação de voltagem nos níveis

de 10, 20 e 30 kV, por 5 e 10 segundos. Foram testados ainda alguns sistemas de condicionamento do capilar e limpeza entre as corridas. O parâmetro avaliado foi o coeficiente de variação dos tempos de migração entre 15 corridas consecutivas. As condições estudadas envolveram limpeza utilizando eletrólito de corrida, água purificada e NaOH 1 mol L⁻¹.

2.4. Metodologia de Validação

A seletividade do método foi avaliada usando um detector de arranjo de diodos. A amostra foi também fortificada com os compostos em questão e analisada. A comparação entre o perfil cromatográfico obtido para o extrato da amostra, extrato da amostra fortificada e soluções com apenas padrões foi realizada. Foram observados os espectros de absorvância de cada composto e o tempo de eluição dos mesmos. A linearidade do sistema foi confirmada usando soluções de padrões entre 0,30 e 15 mg L⁻¹. A repetibilidade do método foi avaliada em dois níveis de concentração, analisando 10 soluções de cada nível e também 10 extratos da mesma amostra usando a metodologia de CLAE descrita. A precisão intermediária foi avaliada comparando curvas analíticas feitas em três dias diferentes. O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram calculados dividindo-se o desvio padrão obtido no teste de repetibilidade e o coeficiente angular da curva analítica. Esta razão foi multiplicada por 3,3 para o LD e por 10 para o LQ (Ribani et al., 2004).

3. Resultados e discussão

O estudo que se segue teve início na metodologia utilizada por Kanitsar e colaboradores (2001). Estes autores empregaram a Eletroforese Capilar para avaliar compostos fenólicos em frutas cítricas utilizando tampão borato a 100 mmol L⁻¹, com pH 9,5 e injeção hidrodinâmica. Foram separados pelo método: hesperidina, naringenina, *trans*-resveratrol, (-)-epicatequina, (+)-catequina, vanilina, hidroxibenzaldeído, ácido sinápico, ácido ferrúlico, ácido *p*-coumárico, ácido vanílico, ácido caféico, entre outros. As condições propostas por Kanitsar e colaboradores (2001) foram aplicadas aos analitos de

interesse do presente estudo, mas não resultaram em uma separação satisfatória. Em vista desse fato, variações no método foram propostas.

A primeira modificação foi a alteração da concentração do eletrólito de análise. Foram testadas inicialmente concentrações de 50, 100 e 200 mmol L⁻¹, com voltagens de 10, 20 e 30 kV e pH fixo em 9,0. O capilar utilizado nesses ensaios iniciais teve comprimento de 65 mm e diâmetro de 50 µm. O eletrólito de 50 mmol L⁻¹ não foi suficiente para separar por completo a (-)-epicatequina (3) da (+)-catequina (4) e a miricetina (11) da quercetina (12). Houve ainda a coluição total do ácido ferrúlico (7) com o kaempferol (8). A concentração de 100 mmol L⁻¹ foi capaz de separar a miricetina da quercetina, mas as outras coeluições da concentração anterior continuaram a ocorrer, sendo que houve melhora na separação entre o ferrúlico e o Kaempferol. Aumentando a força do eletrólito para 200 mmol L⁻¹, verificou-se a separação total de quase todos os fenólicos, com exceção da (-)-epicatequina e da (+)-catequina, e uma corrida de 22 minutos foi obtida. Uma concentração intermediária foi testada (175 mmol L⁻¹) e um menor tempo de análise foi observado (19 minutos) com igual potencial de separação. Além do menor tempo, podem-se observar picos mais finos e mais definidos que para a concentração de 200 mmol L⁻¹ (

Figura VII-1).

A separação da (+)-catequina e da (-)-epicatequina é uma etapa difícil de ser realizada. Vários trabalhos que analisam estes dois compostos relatam sua coeluição parcial, assim como aconteceu no presente estudo, mas mesmo com a coeluição, as quantidades destes flavonóides foram determinadas nas amostras (Cao et al., 2002; Chu et al., 2003; Kanitsar et al., 2001).

Após a definição da concentração do eletrólito, variou-se o pH da solução. Foram testados valores de 8,0 a 9,2 (Figura VII-2). No pH 8,0 a narirutina e o *trans*-resveratrol apresentaram coeluição total de seus picos e o mesmo aconteceu para a quercetina e a morina. Aumentando-se o pH para 8,4, o kaempferol alterou sua posição, ficando com um tempo de migração maior que o da rutina. Observa-se também que neste pH o ácido cinâmico se apresentou em coeluição com o ácido *p*-coumárico, porém, a quercetina e a morina encontram-se separadas.

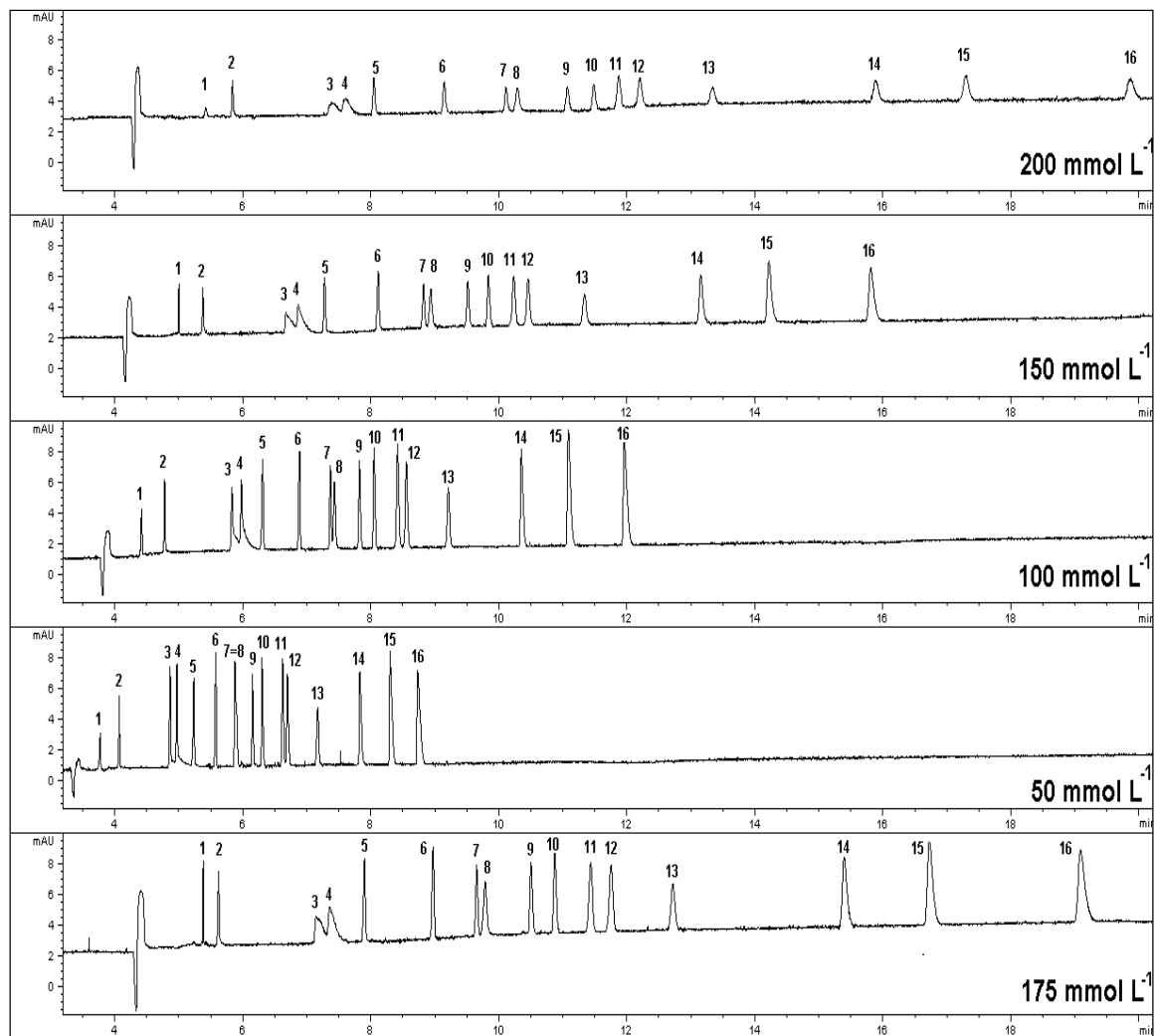


Figura VII-1. Separação de 16 compostos fenólicos em diferentes concentrações de ácido bórico, em pH 9,0, capilar de 50 μm x 68 cm, 25°C, 30 kV e detecção a 217 nm. Foram analisados seguintes fenólicos: narirutina (1), *trans*-resveratrol (2), (-)-epicatequina (3), (+)-catequina (4), rutina (5), ácido cinâmico (6), ácido ferrúlico (7), kaempferol (8), ácido *p*-coumárico (9), ácido vanílico (10), miricetina (11), quercetina (12), morina (13), ácido caféico (14), ácido gálico (15) e ácido 3,4-dihidroxibenzóico (16). Todos os compostos estavam em concentração de 20 mg L⁻¹.

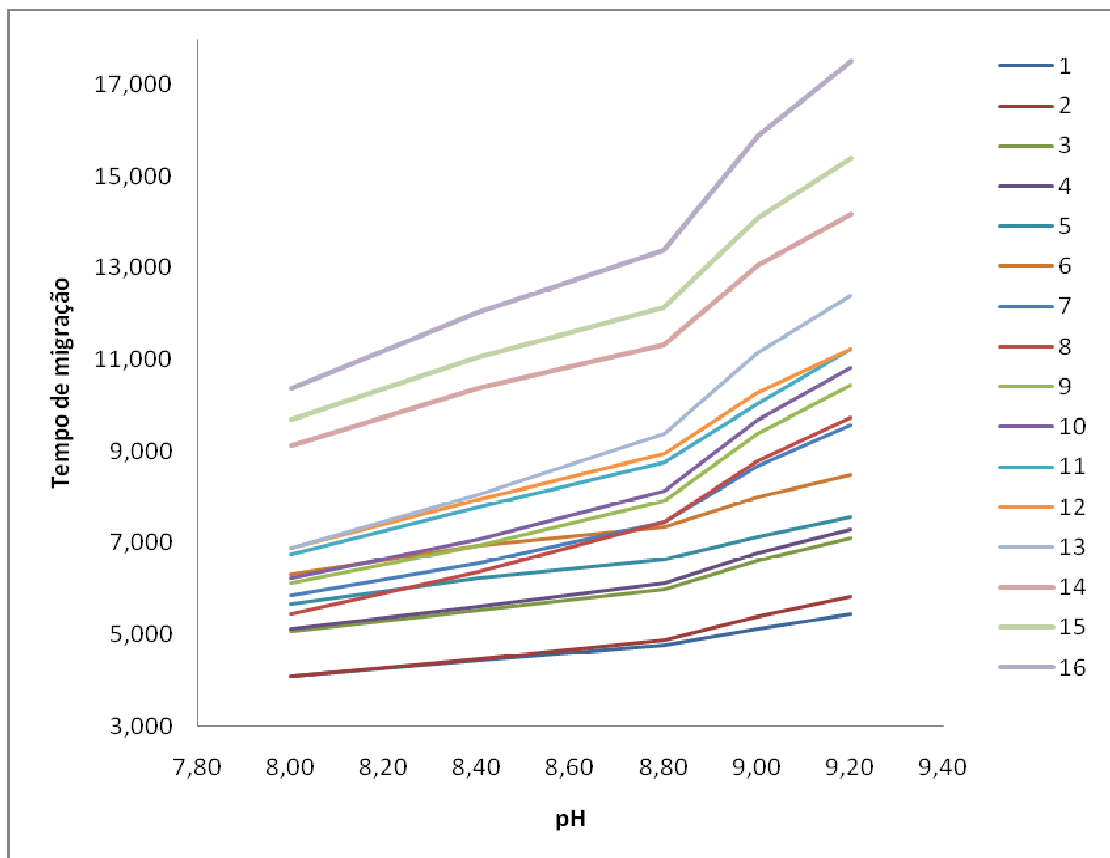


Figura VII-2. Comportamento dos fenólicos em estudo de acordo com a variação de pH entre 8,0 e 9,2. Foram analisados seguintes fenólicos: narirutina (1), *trans*-resveratrol (2), (-)-epicatequina (3), (+)-catequina (4), rutina (5), ácido cinâmico (6), ácido ferrúlico (7), kaempferol (8), ácido *p*-coumárico (9), ácido vanílico (10), miricetina (11), quercetina (12), morina (13), ácido caféico (14), ácido gálico (15) e ácido 3,4-dihidroxibenzóico (16).

No pH 8,8, o kaempferol ficou com tempo maior de migração que o ácido cinâmico e teve seu tempo de migração idêntico ao ácido ferrúlico. Essa junção foi resolvida alterando o pH do eletrólito para 9,0. Neste pH, todos os compostos podem ser identificados e quantificados isoladamente. Os testes se prosseguiram até o pH 9,2, no qual ocorre a junção entre os picos da quercetina e da miricetina. Conforme os resultados, o pH 9,0 foi o escolhido para os ensaios subseqüentes. Na Figura VII-2, estão ilustrados os comportamentos de todos os fenólicos frente às mudanças de pH. Observado essa mesma

figura, verifica-se também um aumento do tempo de análise, resultante da adição de NaOH ao sistema.

A condição de 175 mmol L^{-1} , $\text{pH} = 9,0$, 30 kV e 25°C foi então testada em capilares de diferentes comprimentos (37 e 48 cm) e igual diâmetro ($50,0 \text{ }\mu\text{m}$). Para todos eles, não foi observada melhora na separação dos 16 analitos em questão, embora o tempo de corrida fosse menor, assim, as etapas subseqüentes, mantiveram o comprimento de 68 cm.

Para maior diversificação do método desenvolvido no presente trabalho, foram testados alguns solventes para a solubilização de padrões e amostras. O uso de metanol:água se iniciou com concentração de 50:50, porém a análise eletroforética apresentou grandes instabilidades, gerando quedas de corrente e baixa repetibilidade. Na concentração de 30:70 a análise foi possível, com boa estabilidade do sistema e boa repetibilidade. Também foi testada a mistura etanol:água a 10:90. Esta concentração foi definida para avaliar a possibilidade da análise de vinhos utilizando as mesmas condições de análise. Os perfis de separação foram semelhantes, a única diferença entre ambos foi o tempo de corrida, que resultou em 1 minuto maior quando foi empregada a mistura de metanol:água.

Com a finalidade de se melhorar a detectabilidade da metodologia, alguns testes foram realizados. Inicialmente o capilar de $50 \text{ }\mu\text{m} \times 68 \text{ cm}$ foi substituído por um de $75 \text{ }\mu\text{m} \times 72 \text{ cm}$, aumentando o caminho óptico e, conseqüentemente, a intensidade do sinal analítico. Houve uma melhora no sinal, porém a eficiência da separação ficou prejudicada. O passo seguinte foi o estudo do aumento da quantidade de injeção no capilar de $50 \text{ }\mu\text{m}$.

A injeção eletrocínética apresentou melhor resolução para os flavonóides, mas não foi muito eficiente para os ácidos fenólicos. A injeção hidrodinâmica de 50 mbar por 5 s (Figura VII-3 A) foi substituída por uma injeção de mesma pressão, porém com um tempo de 30 s (Figura VII-3 B). Nesta condição, o sinal do detector foi maximizado e os espectros de absorção dos compostos puderam ser melhor visualizados, facilitando a identificação e a quantificação dos compostos. Porém, a desvantagem de um tempo longo de injeção foi o alargamento de banda, o que resultou na coeluição do ácido ferrúlico com o kaempferol. Com a finalidade de diminuir essa interferência, foi aplicada uma voltagem inversa no sistema (-20 kV durante 5 s) antes de se proceder a voltagem da corrida ($+30 \text{ kV}$). Esse procedimento concentrou os compostos na entrada do capilar e foi suficiente para reduzir o

alargamento de banda e solucionar a separação dos dois picos (Figura VII-3 C). O uso de voltagem negativa foi testado de 5 a 30 s, sendo que o melhor tempo foi 5 s. Para a confirmação dos resultados, uma solução contendo apenas 1 mg L⁻¹ foi aplicada à metodologia e, mesmo nesta baixa concentração, os compostos puderam ser identificados (Figura VII-3 D). Os testes de injeção de volume maior de amostra foram realizados nos dois solventes (metanol:água e etanol:água). Em ambos os casos foram observados resultados semelhantes.

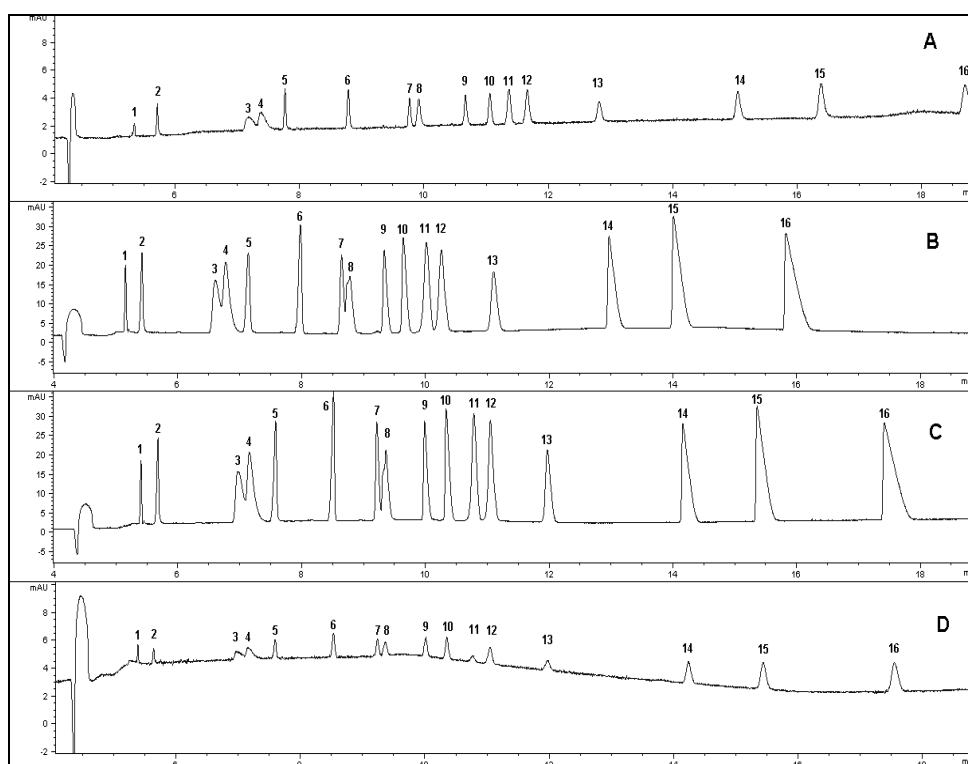


Figura VII-3. Ensaios de injeção realizados: (A) solução com 20 mg L⁻¹ de cada fenólico, injetada a 50 mbar por 5 s; (B) solução com 20 mg L⁻¹ de cada fenólico, injetada a 50 mbar por 30 s; (C) solução com 20 mg L⁻¹ de cada fenólico, injetada a 50 mbar por 30 s seguida de voltagem inversa a -20 kV por 5 s; (D) solução com 1 mg L⁻¹ de cada fenólico, injetada a 50 mbar por 30 s seguida de voltagem inversa a -20 kV por 5 s. Condições de análise: tampão borato a 175 mmol L⁻¹, pH 9,0, 30kV, 25°C, capilar de 50 µm x 68 cm, detecção a 217 nm.

Após a definição do sistema, foi verificada uma baixa repetibilidade e, para solucionar esse impasse, foram realizados testes para aprimorar a limpeza e

condicionamento do capilar entre as corridas. Quando as amostras eram injetadas por 5 s a 50 mbar, bons resultados foram obtidos para o seguinte procedimento: (a) no início do dia, lavagem por 5 minutos de NaOH 1 mol L⁻¹, 5 minutos de água e 10 minutos de eletrólito, todas com pressão de 1 000 mbar; (b) entre as corridas, lavagem de 0,5 minutos de eletrólito. Sob esse condicionamento, os tempos de migração exibiram coeficientes de variação entre 0,2 e 0,9% (n = 15). Após as 15 corridas, este coeficiente de variação se tornou insatisfatório e foi realizada a troca dos frascos de eletrólito. Com a troca, os tempos de migração voltaram a ter valores próximos aos do início dos testes, o que infere que a alteração dos coeficientes de variação está relacionada às modificações no eletrólito durante o procedimento. Com isso, foi estabelecido um máximo de 15 corridas para cada frasco de tampão.

Quando o tempo de injeção foi aumentado para 30 s, o condicionamento anterior se tornou insatisfatório, fato que pode estar relacionado com a injeção de maior volume de amostra. Esse maior volume pode interferir na estabilidade de cargas da camada de íons ligados à periferia do capilar. Para solucionar esse problema, foi eliminado o condicionamento no início do dia e foi aumentado o condicionamento entre corridas. Testes consecutivos variando a composição e o tempo de lavagem foram realizados e chegou-se a uma condição ótima: lavagem por 1 minutos com NaOH 1 mol L⁻¹, 0,5 minutos de espera, seguido de 1 minutos de água purificada, 1 minutos de eletrólito, 0,5 minutos de espera e novamente 1 minutos de eletrólito. Esta etapa resultou em um condicionamento de 5 minutos entre cada corrida. Apesar do tempo de condicionamento demasiadamente longo, coeficientes de 0,15 a 1,3% nos tempos de migração (n = 15) foram encontrados. Após as 15 corridas foi realizada a troca dos eletrólitos observando-se novamente o mesmo resultado do início dos testes.

Com as modificações realizadas, a repetibilidade do sistema foi avaliada. Foram realizados testes em duas concentrações diferentes (3 e 10 mg L⁻¹). Os maiores valores de repetibilidade ocorreram para a maior concentração e estão descritos na Tabela VII-1. Em relação ao tempo de migração, o ácido 3,4 dihidroxibenzóico foi aquele que apresentou menor desvio padrão relativo e o ácido vanílico foi o que apresentou o maior valor para o mesmo parâmetro. Quanto ao desvio padrão relativo da área, a narirutina apresentou o menor desvio padrão relativo e o maior desvio ficou novamente com o ácido vanílico.

Tabela VII-1. Média e desvio padrão relativo (DPR) para os fenólicos em metanol:água (30:50)

Fenólico	Tempo		Área	
	Media (s)	DPR (%)	Media (mAu)	DPR (%)
Narirutina (1)	5,33	0,77	12,93	0,95
<i>Trans</i> -resveratrol (2)	5,52	1,46	17,71	2,76
(-)-epicatequina (3)	6,88	0,89	44,4	2,95
(+)-catequina (4)	7,05	0,94	60,34	2,14
Rutina (5)	7,54	0,44	40,83	1,58
Ác. Cinâmico (6)	8,51	0,48	53,04	2,43
Ác. Ferrúlico (7)	9,02	1,63	41,9	1,22
Kaempferol (8)	9,15	1,76	46,14	2,54
Ác. <i>p</i> -coumárico (9)	9,78	1,74	48,88	1,16
Ác. Vanílico (10)	10,1	1,86	56,87	3,33
Miricetina (11)	10,66	1,05	65,31	1,84
Quercetina (12)	10,95	1,04	65,8	2,75
Morina (13)	11,77	1,69	50,88	2,54
Ác. caféico (14)	14,24	0,6	95,95	2,14
Ác. gálico (15)	15,4	0,34	141,44	2,39
Ác. 3,4-dihidroxibenzóico (16)	17,53	0,28	156,63	2,88

A curva analítica foi construída utilizando soluções com concentrações entre 0,30 e 15 mg L⁻¹. Todas apresentaram linearidade aceitável, ao passo que os coeficientes de correlação ficaram acima de 0,99. (Tabela VII-2). Os limites de detecção calculados ficaram entre 0,26 e 1,51 mg L⁻¹. Os limites de quantificação variaram entre 0,78 e 3,71 mg L⁻¹. A precisão intermediária foi verificada construindo-se a curva analítica por mais duas vezes, em dias diferentes.

Para todas essas curvas, o coeficiente de correlação também ficou acima de 0,99. Ao se reunir os dados dos 3 dias consecutivos em uma única curva analítica, novamente obteve-se valores acima de 0,99 e os parâmetros obtidos estão descritos na Tabela VII-2. Os parâmetros apresentados por essa curva que reúne todos os dados da precisão intermediária foi a usada para o cálculo dos limites de detecção de quantificação, uma vez que representa em maior escala os erros referentes à instabilidade do sistema como um todo. As faixas de linearidade foram obtidas de acordo com a curva analítica construída,

não levando em conta os limites de detecção e quantificação estipulados, uma vez que não é fruto da observação dos picos, e sim, de cálculos provenientes do coeficiente angular da curva e dos desvios padrões do teste de repetibilidade.

Tabela VII-2. Parâmetros dos modelos ajustados às curvas analíticas ($y = A + Bx$), coeficientes de correlação e limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para cada fenólico.

Fenólicos	Faixa de linearidade	A	B	R ²	LD	LQ
Narirutina (1)	0,3-15,0	0,14	1,57	0,993	0,26	0,78
<i>Trans</i> -resveratrol (2)	0,3-15,0	-0,50	2,39	0,991	0,67	2,05
(-)-epicatequina (3)	0,5-15,0	0,45	2,86	0,990	1,51	4,58
(+)-catequina (4)	0,5-15,0	0,73	3,52	0,993	1,21	3,67
Rutina (5)	0,3-15,0	0,61	2,03	0,998	1,05	3,18
Ác. Cinâmico (6)	0,3-15,0	0,50	5,65	0,995	0,75	2,28
Ác. Ferrúlico (7)	0,3-15,0	0,08	3,67	0,995	0,46	1,39
Kaempferol (8)	0,3-15,0	0,45	5,10	0,993	0,76	2,30
Ác. <i>p</i> -coumárico (9)	0,3-15,0	-0,28	4,99	0,991	0,37	1,14
Ác. Vanílico (10)	0,3-15,0	0,02	5,11	0,994	1,22	3,71
Miricetina (11)	0,3-15,0	-2,91	6,65	0,991	0,60	1,81
Quercetina (12)	0,3-15,0	0,05	6,21	0,994	0,96	2,91
Morina (13)	0,3-15,0	0,23	4,94	0,996	0,86	2,62
Ác. caféico (14)	0,3-15,0	-0,25	9,86	0,995	0,69	2,08
Ác. gálico (15)	0,3-15,0	0,79	13,03	0,995	0,86	2,59
Ác. 3,4-dihidroxibenzóico (16)	0,3-15,0	1,89	15,16	0,996	0,98	2,98

Toda a etapa de validação também foi realizada utilizando os padrões em etanol:água (10:90) com a intenção de diversificar o método e permitir o uso em mais tipos de amostras. Os menores limites foram obtidos para a miricetina, com 0,44 para o LD e 1,34 para o LQ, já *trans*-resveratrol foi o composto que obteve os maiores limites, sendo 1,23 para o LD e 3,74 para o LQ. O ensaio de linearidade retornou coeficientes de correlação (R²) entre 0,993 para a morina e 0,999 para o ácido gálico. Quanto ao ensaio de repetibilidade, o desvio padrão relativo não excedeu 6,90%.

Por fim, a seletividade do método foi confirmada comparando-se o espectro de absorção dos compostos isolados com os compostos presentes nas amostras de geléia e

vinho. As amostras também foram adicionadas de padrões e um aumento no sinal do detector foi observado nos picos em análise, confirmando a presença destes compostos na amostra. O método pode ser dito, então, seletivo: é capaz de identificar todos os compostos em questão, sem interferentes, nas amostras propostas.

A recuperação dos analitos frente à extração da geléia também foi verificada (Tabela VII-3). Ribani e colaboradores (2004) descrevem que são aceitáveis taxas entre 70 e 120%, mas, conforme a complexidade da matriz, a recuperação pode se encontrar entre 50 e 120%. A maioria dos fenólicos ficou inserida dentro do primeiro intervalo citado pelos autores. O kaempferol não se encontra no primeiro intervalo, mas está englobado pelo segundo.

Tabela VII-3. Recuperação dos fenólicos em geléia de fruta

<i>Fenólicos</i>	<i>Recuperação</i>	<i>Fenólicos</i>	<i>Recuperação</i>
Narirutina (1)	81,19	Ác. <i>p</i> -coumárico (9)	84,72
<i>Trans</i> -resveratrol (2)	83,94	Ác. Vanílico (10)	107,2
(-)-epicatequina (3)	98,24	Miricetina (11)	88,93
(+)-catequina (4)	80,41	Quercetina (12)	101,91
Rutina (5)	98,09	Morina (13)	80,12
Ác. Cinâmico (6)	79,84	Ác. caféico (14)	85,65
Ác. Ferrúlico (7)	102,4	Ác. gálico (15)	--
Kaempferol (8)	64,39	Ác. 3,4-dihidroxibenzóico (16)	80,4

O ácido gálico, não teve recuperação alguma por esta extração. Por ser um composto altamente polar, este ácido não foi adsorvido pelo recheio de C₁₈ da SPE. Estudos de Chen, Zuo e Deng (2001) e de Amakura e colaboradores (2000) também obtiveram baixos valores de recuperação para o gálico quando utilizaram técnica semelhante.

O eletroferograma da amostra de geléia de acerola com morango está na Figura VII-4. Esta geléia apresentou (+)-catequina (7,1 ± 0,3 mg/kg), (-)-epicatequina (5,3 ± 0,2 mg/kg), quercetina (6,8 ± 0,1 mg/kg), rutina (4,1 ± 0,2 mg/kg), ácido cinâmico (4,4 ± 0,2 mg/kg), ácido ferrúlico (2,5 ± 0,1 mg/kg), ácido *p*-coumárico (9,7 ± 0,1 mg/kg) e ácido caféico (3,9 ± 0,1 mg/kg). Estão presentes também o kaempferol, a miricetina e o ácido 3,4-dihidroxido, porém em quantidades abaixo do limite de quantificação.

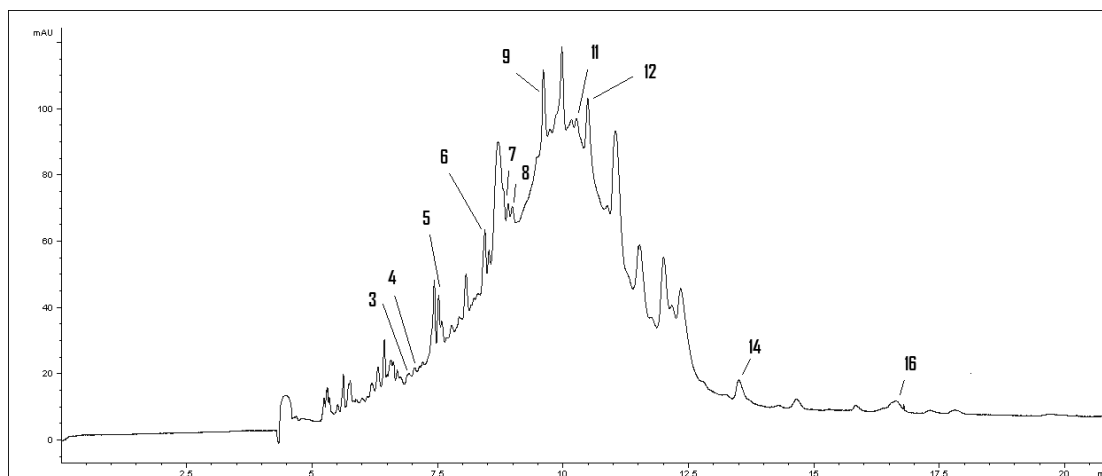


Figura VII-4. Eletroferograma da análise de amostra de geléia de acerola com morango. Condições de análise idênticas à Figura VII-3 “C”.

Na Figura VII-5 estão discriminados os perfis eletroforéticos das amostras de vinho tinto, branco e rosê. Percebe-se que existe um maior número de compostos na amostra de vinho tinto do que na de vinho branco ou rosê.

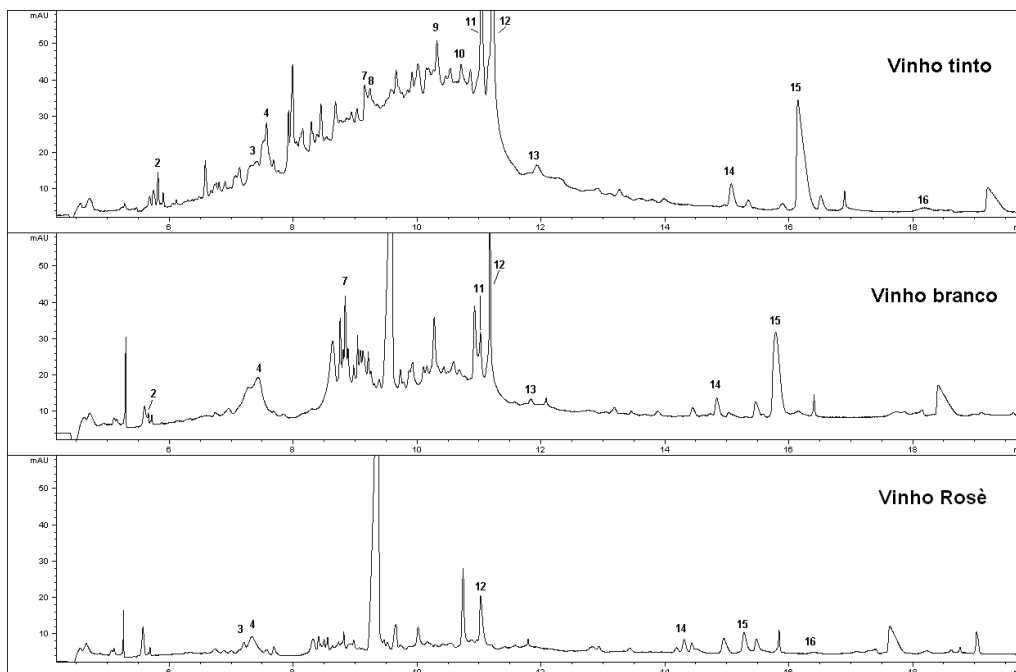


Figura VII-5. Eletroferograma da análise de amostras de vinho tinto, rosê e branco. Condições de análise idênticas à Figura VII-3 “C”.

4. Conclusões

O método eletroforético otimizado no presente estudo foi capaz de separar 16 compostos fenólicos em amostras de geléia e vinho. Os compostos separados foram os flavonóides narirutina, (-)-epicatequina, (+)-catequina, rutina, kaempferol, miricetina, quercetina e morina; e os fenólicos não flavonóides *trans*-resveratrol, ácido cinâmico, ácido ferrúlico, ácido *p*-coumárico, ácido vanílico, ácido caféico, ácido gálico e ácido 3,4-dihidroxibenzóico. A condição ótima de separação foi de 175 mmol L⁻¹ de ácido bórico em pH 9,0, temperatura de 25°C, capilar de 50 µm x 68 cm, injeção hidrodinâmica de 50 mbar por 30 s, seguida de inversão da voltagem para -20 kV durante 5 s antes da corrida eletroforética com +30 kV. A separação dos compostos ocorreu em 19 minutos.

A validação da metodologia permitiu classificar o sistema como seletivo, linear e repetitivo para todos os compostos, utilizando tanto o metanol/água 30:70 quanto o etanol/água 10:90 como solvente. Os limites de detecção e quantificação ficaram dentro de valores aceitáveis para as amostras analisadas. Foram aplicadas à Eletroforese Capilar amostras de geléia e vinhos, sendo que a recuperação foi satisfatória para 15 dos 16 flavonóides verificados, apenas o ácido gálico não teve qualquer recuperação para a geléia de fruta extraída. Nas outras metodologias extrativas, houve boa recuperação para todos os compostos.

5. Referências

- AMAKURA, Y.; OKADA, M.; TSUJI, S. & TONOGAI, Y. (2000). Determination of phenolic acids in fruit juices by isocratic column liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 891, 183-188.
- BRAVO, L.; GOYA, L. & LECUMBERRI, E. (2007). LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. *Food Research International*, 40, 393-405.
- BRAVO, M.N.; SILVA, S.; COELHO, A.V.; VILAS BOAS, L. & BRONZE, M.R. (2006) Analysis of phenolic compounds in Muscatel wines produced in Portugal. *Analytica Chimica Acta*, 563, 84-92.
- BREITFELLNER, F.; SOLAR, S. & SONTAG, G. (2002). Effect of gamma irradiation on flavonoids in strawberries. *European Food Research Technology*, 215, 28-31.
- CAO, Y.; CHU, q.; FANG, Y. & YE, J. (2002). Analysis of flavonoids in Ginkgo bilobal. And its phytopharmaceuticals by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 374, 294-299.
- CORDENUNSI, B. R.; NASCIMENTO, J. R. O.; GENOVESE, M. I. & LAJOLO, F. M. (2002) Influence of Cultivar on Quality Parameters and Chemical Composition of Strawberry Fruits Grown in Brazil. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 50, 2581-2586.
- CHEN, H.; ZUO, Y. & DENG, Y. (2001). Separation and determination of flavonoids and other phenolic compounds in cranberry juice by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 913, 387-395.
- CHU, Q.C.; QU, W.Q.; PENG, Y.Y.; CAO, Q.H. & YE, J.N. (2003). Determination of Flavonoids in Hippophae rhamnoides L. and its Phytopharmaceuticals by Capillary Electrophoresis with Electrochemical Detection. *Chromatographia*, 58, 67-71.
- FACCO, E M P. (2006). *Compostos funcionais no processamento de vinhos*. Tese (Doutor em Ciência de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, BR.
- FANG, F.; LI, J.M.; PAN, Q.H. & HUANG, W.D. (2007). Determination of red wine flavonoids by HPLC and effect of aging. *Food Chemistry*, 101, 428-433.
- FONSECA, F.N.; KATO, M.J.; OLIVEIRA JR, L.; NETO, N.P.; TAVARES, M. F. N. (2001). Critical Assessment of Electrolyte Systems for the Capillary Electrophoresis Analysis of Phenolic Compounds in Herbal Extracts. *Journal of Microcolumn Separations*, 13, 227-235.
- FRAZIER, R.A. (2001). Recent advances in capillary electrophoresis methods for food analysis. *Electrophoresis*, 22, 4197-4206.
- FUNG, Y.S. & TUNG, H.S. (2001) Application of capillary electrophoresis for organic acid analysis in herbal studies. *Electrophoresis*, 22, 2242-2250.
- JAC, P; POLASEK, M & POSPISILOVA, M. (2006). Recent trends in the determination of polyphenols by electromigration methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 40, 805-814.

- KANITSAR, K.; ARCE, L.; RÍOS, A. & VALCÁRCEL, M. (2001). Determination of phenolic constituents in citrus samples by on-line coupling of a flow system with capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 22, 1553-1565.
- MINUSSI, R C; ROSSI, M; BOLOGNA, L; CORDI, L; ROTILIO, D; PASTORE, G. M. & DURAN, N. (2003). Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines e pastore. *Food Chemistry*, 82, 409-416.
- PAZOUREK, J.; GONZALEZ, G.; REVILLA, A.L. & HAVEL, J. (2000). Separation of polyphenols in Canary Islands wine by capillary zone q electrophoresis without preconcentration. *Journal of Chromatography A*, 874, 111-119.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. & MELO, L. F. C. (2004). Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. *Química Nova*, 27, 771-780.
- VENDRAMINI, A.L. & TRUGO, L.C. (2004). Phenolic Compounds in Acerola Fruit (*Malpighia punicifolia*, L.). *Journal of Brazilian Chemycal Society*, 15, 664-668.

CAPÍTULO VIII.

QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONÓIDES EM GELÉIAS DE FRUTAS, UMA COMPARAÇÃO ENTRE ELETROFORESE CAPILAR E CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.

Resumo

Flavonóides são compostos fenólicos com elevada capacidade antioxidante e presentes abundantemente em produtos de origem vegetal. Apresentam inúmeras atividades bioquímicas, fisiológicas e farmacêuticas, tais como ações vasodilatadoras, antiinflamatórias, antibactericidas, imuno-estimulantes, e ainda efeitos antialérgicos e antivirais. O ensaio que se segue buscou comparar a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e a Eletroforese Capilar (EC) quanto à eficiência na separação e quantificação de sete flavonóides presentes em geléias de frutas: (+)-catequina, (-)-epicatequina, kaempferol, miricetina, narirutina, quercetina e rutina. Os dois métodos foram submetidos a procedimentos de validação e ambos se mostraram aptos para quantificar seis dos sete flavonóides propostos, sendo que apenas a EC foi capaz de quantificar a miricetina. As duas técnicas apresentam seletividade, linearidade, repetibilidade e taxas de recuperação aceitáveis. Os menores limites de detecção e quantificação foram encontrados para a CLAE, porém a EC foi mais rápida e teve menor consumo de reagentes e geração de resíduos. Quanto à análise de amostras, as duas técnicas apresentaram resultados equivalentes.

Palavras-chave: Flavonóides, Eletroforese Capilar, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, geléias de frutas

QUANTIFICATION OF FLAVONOIDS IN JELLIES FRUIT, A COMPARISON OF CAPILLARY ELECTROPHORESIS AND HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY.

Abstract

Flavonoids are phenolic compounds with high antioxidant capacity and abundantly present in natural products. They have numerous bioquimical, physiological and pharmaceutical activities, such as vasodilatatory, anti-inflammatory, antibacterial, immune-stimulating actions, and also the anti-allergic and the antiviral effects. This study aimed to compare the High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Capillary Electrophoresis (CE) on the efficiency of separation and quantification of seven flavonoids presents in fruit jellies: (+)-catechin, (-)-epicatechin, kaempferol, myricetin, narirutin, quercetin and rutin. The two methods were subjected to a validation procedure and both are able to quantify six of seven flavonoids proposed. Only the CE was able to quantify the myricetin. The two techniques showed acceptable selectivity, linearity, repeatability and recovery rates. The lower limits of detection and quantification were found in HPLC, but the EC was faster, it had lower reagent consumption and less waste. About the samples analysis, the two techniques showed similar results.

Keywords: Flavonoids, Capillary Electrophoresis, High Performance Liquid Chromatography, fruit jellies.

1. Introdução

Em 1936, o Professor Szent-Gyorgyi reportou o isolamento de uma substância com elevado potencial antioxidante agindo como cofator na reação entre a enzima peroxidase e o ácido ascórbico. Essa substância foi chamada de Vitamina P e posteriormente foi renomeada como Rutina (Yanez, Andrews e Davies, 2007). A partir de então, mais de 5000 compostos já foram descritos (Herrero, Ibanez e Cifuentes, 2005). São compostos presentes abundantemente no reino vegetal e pesquisas indicam que podem ser absorvidos pelo corpo humano, uma vez que já foram encontrados no plasma (Kosar et al., 2004). Em relação aos benefícios ao organismo, um grande número de atividades bioquímicas, fisiológicas e farmacêuticas, incluindo, além das atividades antioxidantes, já foram reportadas, entre estas, as ações vasodilatadoras, antiinflamatórias, antibactericidas, imuno-estimulantes, e efeitos antialérgicos e antivirais (Baby et al., 2007; Hassimotto, Genovese e Lajolo, 2005).

Para a indústria alimentícia, são de fundamental importância na conservação dos alimentos, uma vez que são capazes de preservar produtos perecíveis contra degradações oxidativas. Os processos tecnológicos empregados nesse tipo de indústria podem resultar em perdas na cor, sabor e composição nutricional. Para barrar tal dano, se os antioxidantes naturalmente presentes não são suficientes, outros antioxidantes podem ser adicionados em conjunto com a utilização de determinados tipos de embalagens, com vácuo, atmosfera inerte e ausência de luz (Herrero, Ibanez e Cifuentes, 2005).

Vários métodos separativos já foram desenvolvidos para caracterizar estes compostos em alimentos, fármacos e cosméticos, como, por exemplo, a Cromatografia em Papel, a Cromatografia em Camada Delgada e a Cromatografia em Coluna Aberta, mas estes procedimentos despendem grande tempo e não são particularmente vantajosos para quantificação de grande número de amostras. A Cromatografia Gasosa é uma técnica rápida, eficiente e precisa, mas geralmente requer uma etapa de derivatização. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e a Eletroforese Capilar (EC) são as mais aptas para realizar esse tipo de análise com alta sensibilidade e com curto tempo de preparação de amostras (Kanitsar et al., 2001).

As características físico-químicas apresentadas pelos flavonóides permitem que possam ser analisados amplamente pela CLAE equipada com colunas de fase reversa, em

geral empacotadas com partículas esféricas de sílica ligadas à cadeia de octadecil (C₁₈) (Castellari, Fabiani e Arfelli., 2002; Molnár-Perl e Füzfa, 2005). Em relação à fase móvel, pesquisas bibliográficas demonstraram, majoritariamente, o uso de eluições em gradiente de duas composições: uma aquosa acidificada e outra orgânica. Na fase aquosa, soluções de ácido acético são bastante usadas (Bramati et al., 2002; Carmona et al., 2007; Gürbüz et al., 2007). Também foram encontradas soluções ácidas de ácido fórmico (Careri et al., 2003; Matsubara e Rodriguez-Amaya, 2006) e de ácido fosfórico (Wang e Huang, 2004; Matilla, Astola e Kumpulainen, 2000). Para a fase orgânica, a acetonitrila é a mais usada (Bramati et al., 2002; Careri et al., 2003; Gürbüz et al., 2007; Matilla, Astola e Kumpulainen, 2000; Wang e Huang, 2004; Fang et al., 2007).

Os métodos desenvolvidos por CLAE para a determinação dos compostos fenólicos podem ser aplicados desde uma ação quantitativa até a verificação de adulterações e confirmação de autenticidade. López e colaboradores (2001) utilizaram a CLAE para quantificar fenólicos biologicamente ativos presentes em vinhos, entre eles o ácido gálico, *trans*-resveratrol, quercetina e rutina. Escarpa e Gonzales (1998) aplicaram a CLAE para verificar diferenças significativas na concentração de fenólicos da casca de quatro variedades de maçãs, sendo encontrados em grande quantidade principalmente a (+)-catequina e a rutina. Seus resultados podem ser empregados na identificação de variedades de maçãs.

A Eletroforese Capilar (EC) representa, em geral, métodos rápidos, econômicos e com elevada eficiência de separação para os flavonóides, o que pode resolver problemas com interferentes presentes na matriz comumente encontrados nas análises por CLAE (Frazier, 2001; Fung e Tung, 2001). Por outro lado, esta técnica apresenta algumas desvantagens como baixa sensibilidade e reprodutibilidade, quando comparada com CLAE (Jac, Polasek e Pospisilova, 2006). A Eletroforese Capilar de Zona (CZE) e a Cromatografia Eletrocinética Micelar (MEKC) são as variantes mais utilizadas quando flavonóides são verificados (Jac, Polasek e Pospisilova, 2006).

Estudos empregando a análise de flavonóides por EC em alimentos já foram usados para quantificar rutina e quercetina em folhas de amora coletadas em diferentes épocas (Yan, Wang e Lu, 2004), em plantas medicinais (Xu et al., 2006), em cascas e sucos de grapefruit (Wu, Guan e Ye, 2007), em uvas (Wang e Huang, 2004), em própolis (Volpi,

2004) e outras matrizes. Peng, Liu e Ye (2006) utilizaram a EC para verificar diferenças existentes entre *Frucus aurantii*, uma planta medicinal chinesa, plantadas em diversas regiões daquele país e os resultados puderam ser usados como forma de identificação geográfica (Peng, Liu e Ye, 2006). Além destas aplicações quantitativas, outras mensurações podem ser feitas com a EC, a exemplo disso pode ser citado o trabalho de Herrero-Martinez e colaboradores (2005) que utilizaram a técnica para calcular a constante de dissociação de flavonóides.

Em se tratando de sistema de detecção, o detector de arranjo de diodos é o mais simples e o mais usado em laboratórios de análises de alimentos e de matéria biológica, tanto para CLAE quanto para a EC. Baseado no espectro característico de cada composto fornecido por este tipo de detector é possível identificar e quantificar compostos com alto grau de certeza (Molnár-Perl e Füzfai, 2005).

Em relação às amostras, flavonóides estão amplamente presentes no reino vegetal, porém nenhum trabalho foi encontrado sobre a quantificação em geléias de frutas, apenas existem dados em frutas e sucos foram localizados.

O presente trabalho teve como objetivo comparar duas metodologias anteriormente desenvolvidas para a análise de sete flavonóides em geléias de frutas. Foram comparados os parâmetros de linearidade, seletividade, repetibilidade no dia e entre dias, os limites de detecção e quantificação, e também a quantificação de seis amostras de geléias de frutas. Os flavonóides estudados foram: (+)-catequina, (-)-epicatequina, kaempferol, miricetina, narirutina, quercetina e rutina.

2. Experimento

2.1. Reagentes

A narirutina foi obtida da Extrasynthese, enquanto que (-)-epicatequina, (+)-catequina, rutina, kaempferol, miricetina e quercetina, foram obtidos da Sigma-Aldrich e da Extrasynthese. Também foram utilizados metanol e etanol grau CLAE da J. T. Baker e da Fisher Scientific, dimetilsulfóxido da Amresco, ácido bórico da Ecibra e NaOH da Nuclear. A acetonitrila foi obtida junto à LabScan e o ácido orto-fosfórico foi usado da Panreac. A

água empregada nos experimentos foi purificada usando sistema Milli-Q (Millipore Corporation). As soluções estoque dos padrões foram preparadas em metanol, com exceção da miricetina, solubilizada em dimetilsulfóxido e do kaempferol, solubilizado em etanol. Estas soluções foram armazenadas a -10°C e protegidas da luz.

2.2. Extração das amostras

O método proposto foi aplicado em seis amostras diferentes: (J1) acerola e morango, (J2) acerola e laranja, (J3) acerola e rosela, (J4) acerola e goiaba, (J5) acerola e maracujá, e (J6) acerola e abacaxi. As geléias foram extraídas com metanol: água (1:1) por 80 minutos em agitador mecânico. Este extrato foi filtrado e levado ao rotoevaporador até chegar à concentração de 12 ml e depois foi submetido a uma limpeza em coluna C_{18} de extração em fase sólida (SPE). O extrato orgânico final foi evaporado e ressuspendido em metanol:água e filtrado em poros de $0,45\mu\text{m}$. Para injeção na CLAE, a relação metanol: água no extrato final foi de 50:50, já na EC, essa relação foi de 30:70.

2.3. Equipamento e condições Eletroforéticas.

Foi utilizado um equipamento Agilent G1600AX (Agilent Technologies, Germany), série DE016032210, equipado com detector de arranjo de diodos (UV-Visível), injetor automático e sistema de controle de temperatura ajustado em 25°C . O capilar de sílica fundida teve $50\mu\text{m}$ de diâmetro e 68 cm de comprimento total (Agilent Technologies). A detecção foi realizada a 217 nm. A análise e o tratamento dos dados foram realizados em um sistema HP Chemstation acoplado à Eletroforese. O capilar foi condicionado entre as corridas com fluxo de 1 minutos $\text{NaOH } 1\text{ mol L}^{-1}$, seguido de 0,5 minutos espera, 1 minutos de água purificada, 1 minutos de eletrólito, mais 0,5 minutos de espera e novamente 1 minutos de eletrólito. O eletrólito de análise apresentou 175 mmol L^{-1} de borato de sódio, ajustado a pH 9,0 com auxílio de uma solução de $\text{NaOH } 0,1\text{ mol L}^{-1}$. Foi aplicada ao sistema uma voltagem de 30 kV e 25°C . A injeção hidrodinâmica foi realizada com 50 mbar por 5 s., seguida por voltagem inversa de -20kV por 5 s.

2.4. Equipamento e condições Cromatográficas.

O sistema cromatográfico utilizou um instrumento ThermoFinnigan Surveyor, com injeção automática (loop de 20µL), bomba quaternária e detector de arranjo de diodos (DAD). O tratamento de dados foi realizado pelo ChromQuest. A coluna utilizada foi RP-18 Lichrocart (250 mm x 4,5 mm) da Merck e a pré-coluna RP-18 Lichrosper. O método cromatográfico foi baseado no método desenvolvido por Matilla, Astola e Kumpulainen (2000) com modificações. A fase móvel consistiu em 1% de ácido orto-fosfórico (A) e acetonitrila (B). O gradiente de eluição iniciou em 95% de “A”, num fluxo de 0,7 ml min.⁻¹. Este gradiente foi mantido até 5 minutos. Entre 5 e 55 minutos a eluição passou para 50% de “A” e esta concentração foi mantida por 10 minutos. Entre 65 e 67 minutos, a concentração retornou a 95% de “A”. A corrida terminou aos 77 minutos. A detecção foi realizada a 260 nm (rutina, miricetina e kaempferol), 280 nm ((+)-catequina, (-)-epicatequina e narirutina), e 400 nm (quercetina).

2.5. Metodologia de Validação

As seletividades dos métodos foram avaliadas usando o DAD. A amostra foi também fortificada com os compostos em questão e analisada. Comparações entre o perfil cromatográfico e eletroforético obtidos para os extratos das amostras, extratos das amostras fortificadas e soluções com apenas padrões foram realizadas. Foram observados os espectros de absorbância de cada composto e o tempo de eluição e de migração dos mesmos. As linearidades dos sistemas foram confirmadas usando soluções de padrões entre 0,30 e 15 mg L⁻¹. A repetibilidade dos métodos foi avaliada em dois níveis de concentração (10 e 3 mg L⁻¹), analisando 10 soluções de cada nível e também 10 extratos de amostra. A precisão intermediária foi avaliada comparando curvas analíticas feitas em três dias diferentes. O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram calculados dividindo-se o desvio padrão obtido no teste de repetibilidade e o coeficiente angular da curva analítica. Esta razão foi multiplicada por 3,3 para o LD e por 10 para o LQ (Ribani et al., 2004).

3. Resultados e discussão

No início do trabalho, foi realizada uma pesquisa bibliográfica para verificar os flavonóides já encontrados em amostras semelhantes àquelas englobadas no presente estudo. Dados sobre geléias de frutas são raros, e, mais raros ainda para geléias que apresentam mais de uma fruta em sua composição. Com isso, foram pesquisados os compostos presentes em cada uma das frutas presentes nas seis geléias. Dados sobre flavonóides em goiaba e rosela não foram encontrados. A quercetina e o kaempferol são aqueles que estão presentes em 3 das 4 frutas pesquisadas. A rutina é um composto facilmente encontrado em plantas diversas, sendo muito usado como pigmento natural, antioxidante, estabilizante e preservante, em indústrias de alimentação animal e humana, de cosméticos e de produtos farmacêuticos (Baby et al., 2007). (+)-catequina, (-)-epicatequina, miricetina e narirutina também foram indicadas na Tabela VIII-1. Estes sete flavonóides foram então utilizados como base no desenvolvimento das metodologias separativas empregadas: CLAE e EC.

Tabela VIII-1. Flavonóides presentes em frutas, uma revisão.

Fruta	Composto	Quantidade (mg/100g)	Referências
Morango	Quercetina	0,27 - 5,32	[1] [2] [3]
	Kaempferol	0,23 – 2,18	[1] [2] [3] [4]
	(+)-Catequina	4,4 – 4,9	[3]
	(-)-Epicatequina	24 – 29	[3]
	Miricetina	0,31 – 3,60	[4]
Acerola	Quercetina	identificado	[5]
	Kaempferol	identificado	[5]
Laranja	Narirutina	7,1 – 4,8	[6]
	Hesperidina	0,25 – 7,6	[6] [7]
	Naringenina	0 – 1,73	[7]
Maracujá	Rutina	Identificado	[8]

[1] Cordenunsi et al., 2002; [2] Hakkinen et al., 1999; [3] Breitfellner, Solar e Sontag, 2002; [4] Kosar et al., 2004; [5] Vendramini e Trugo, 2004; [6] Klimczak et al., 2007; [7] Peterson et al., 2006. [8] Moraes, Vilegas e Lanças, 1997.

Na fase inicial do estudo de comparação proposto, os métodos foram submetidos aos procedimentos de validação. Cabe ressaltar que houve diferença no preparo dos analitos e das amostras devido a necessidades dos sistemas separativos, sendo que a principal delas está na dissolução dos analitos. Na CLAE os compostos e as amostras foram dissolvidos numa solução contendo metanol/água 50:50 antes da injeção. Esta concentração foi impraticável na Eletroforese Capilar, ao passo que tamanha quantidade de metanol desestabiliza o sistema, gerando erros na repetibilidade e problemas operacionais. Na EC essa relação foi, então, de 30:70.

A primeira etapa da validação foi verificar a seletividade dos métodos. Para ambos, os resultados foram satisfatórios. Os espectros de absorção puderam ser visualizados usando padrões isolados e também amostras livres e fortificadas. Os espectros obtidos pela CLAE são mais definidos do que os obtidos pela EC. Esse fato é explicado pela quantidade de amostra injetada: na EC, as amostras são aplicadas no sistema na ordem de nanolitros, ao passo que na CLAE, são na ordem de microlitros. A célula de detecção da CLAE também é maior que a da EC. Este é um problema quando são mensuradas pequenas quantidades.

A linearidade para os dois métodos pôde ser considerada satisfatória, ao passo que as curvas analíticas tiveram coeficiente de correlação acima de 0,99 para intervalos entre 0,5 a 10 mg L⁻¹. Na CLAE os coeficientes variaram de 0,993 a 0,999; na EC, ficaram entre 0,990 e 0,998. Verificando os números com rigorosidade, é indício que a CLAE apresenta melhor linearidade, porém, do ponto de vista prático, ambas as técnicas se adéquam ao requisito descrito acima.

A única exceção ao teste de linearidade foi a miricetina. Na CLAE, este flavonóide apresentou grande instabilidade, com coeficiente de correlação abaixo do requerido, o mesmo não aconteceu na EC, cujo coeficiente de correlação foi de 0,991. Devido a esse resultado, a miricetina foi excluída das demais etapas de comparação, uma vez que sua quantificação só foi possível pela EC, constituindo uma vantagem desta técnica em detrimento da outra.

Quanto à repetibilidade, foram comparadas as taxas calculadas tanto para o tempo de eluição quanto para o sinal do detector. Conforme pode ser visto na Tabela VIII-2, os

desvios padrões relativos do tempo da EC são maiores que os da CLAE, porém são valores aceitáveis, variando de 0,77 a 1,76%. Para CLAE, esses valores ficaram entre 0,03 e 0,1%.

Tabela VIII-2. Comparação entre a repetibilidade dos tempos da CLAE e da EC na análise de seis flavonóides, estão descritos as médias e os desvios padrões relativos (DPR)

Flavonóide	Tempo CLAE		Tempo EC	
	Media (s)	DPR (%)	Media (s)	DPR (%)
(+)-catequina	18,77	0,09	7,05	0,94
(-)-epicatequina	22,43	0,10	6,88	0,89
Kaempferol	44,61	0,03	9,15	1,76
Narirutina	30,37	0,01	5,33	0,77
Quercetina	39,21	0,03	10,95	1,04
Rutina	28,86	0,05	7,54	0,44

Quanto a repetibilidade do sinal do detector, novamente os desvios padrões relativos da CLAE foram menores, mas a diferença, para esse caso, é menos significativa. Os desvios padrões relativos do sinal do detector da CLAE variaram de 0,67% a 2,70%, enquanto para a EC, a variação foi de 0,95% a 2,95% (Tabela VIII-3).

Tabela VIII-3. Comparação entre os desvios padrões relativos (DPR) do sinal do detector da CLAE e da EC.

Flavonóide	Sinal CLAE		Sinal EC	
	Media (s)	DPR (%)	Media (s)	DPR (%)
(+)-catequina	443093,30	2,70	60,34	2,14
(-)-epicatequina	671859,80	1,59	44,40	2,95
Kaempferol	3203616,30	0,67	46,14	2,54
Narirutina	7868088,00	0,22	12,93	0,95
Quercetina	1572098,50	2,29	65,80	2,75
Rutina	1871052,30	1,36	40,83	1,58

Um dos principais problemas apontados para a EC são seus altos limites de detecção e quantificação. Quando comparados à metodologia cromatográfica usada no presente

estudo (Tabela VIII-4), realmente os limites da EC foram maiores para quase todos os flavonóides, com exceção da narirutina e do kaempferol, mas essa superioridade não é exorbitante, sendo mínima para a quercetina, por exemplo.

Tabela VIII-4. Comparação entre os limites de detecção e quantificação da CLAE e da EC.

Flavonóide	CLAE		Tempo EC	
	LD (mg L ⁻¹)	LQ (mg L ⁻¹)	LD (mg L ⁻¹)	LQ (mg L ⁻¹)
(+)-catequina	0,89	2,70	1,21	3,67
(-)-epicatequina	1,34	4,05	1,51	4,58
Kaempferol	0,95	2,89	0,96	2,91
Narirutina	0,49	1,50	0,26	0,78
Quercetina	0,88	2,68	0,76	2,30
Rutina	0,56	1,70	1,05	3,18

A recuperação dos analitos frente à extração da geléia também foi verificada. Para quase todos os analitos, a recuperação foi maior utilizando EC (Tabela VIII-5). Este fato pode estar associado ao menor tempo de análise que a EC despende. Apenas o kaempferol apresentou menor recuperação para EC do que para CLAE. Ribani e colaboradores (2004) descrevem que são aceitáveis taxas de recuperação entre 70 e 120%, mas, conforme a complexidade da matriz, a recuperação pode se encontrar entre 50 e 120%. A maioria dos fenólicos ficou inserida dentro do primeiro intervalo citado pelos autores. O kaempferol não se encontra no primeiro intervalo, mas está englobado pelo segundo.

Tabela VIII-5. Comparação entre a recuperação dos flavonóides entre CLAE e EC

Flavonóide	Recuperação (%)	
	CLAE	EC
(+)-catequina	70,51	80,41
(-)-epicatequina	83,46	98,24
Kaempferol	68,60	64,39
Narirutina	73,08	81,19
Quercetina	82,38	101,91
Rutina	78,46	98,09

Outro parâmetro de comparação entre metodologias é a sensibilidade do sistema. Para a avaliação deste quesito, é necessário verificar o coeficiente angular das curvas analíticas: quanto maior o coeficiente angular, maior a sensibilidade. Olhando para os dados contidos na Tabela VIII-6, não há dúvidas de que a sensibilidade da CLAE é muito maior que a da EC. O coeficiente angular da rutina na CLAE, por exemplo é mais de 900 000 vezes maior do que o coeficiente angular desse composto na EC.

Tabela VIII-6. Comparação entre a sensibilidade da CLAE e da EC na presente análise de flavonóides.

Flavonóide	Coeficiente angular	
	CLAE	EC
(+)-catequina	56976,70	3,52
(-)-epicatequina	69175,19	2,86
Kaempferol	336270,40	5,1
Narirutina	816570,20	1,57
Quercetina	183177,40	6,21
Rutina	182862,9	2,03

Apesar de mais sensível que a EC, a CLAE leva grande desvantagem quando o tempo de análise é comparado. Na metodologia empregada, as análises por CLAE utilizam corridas de 77 minutos, já a EC realiza o mesmo trabalho com corridas de 12 minutos. Em quantificações de larga escala, essa vantagem é muito importante, uma vez que é capaz de diminuir o tempo de análise em 84%.

Outra desvantagem da CLAE de extrema importância é quanto à geração de resíduos. Com um fluxo de 0,7 ml min.⁻¹, a análise em triplicata de uma amostra utiliza 161,7 ml de fase móvel contendo compostos orgânicos, que, quando em resíduo, precisam ser segregados e tratados por técnicas específicas. Já a análise por EC gera menos de 1 ml de resíduos para a triplicata, sendo que este pode ser facilmente neutralizado e descartado.

Seis amostras de geléias de frutas foram submetidas às duas metodologias analíticas, utilizando a mesma extração. As quantidades encontradas para cada flavonóide estão descritas na Tabela VIII-7 e na Tabela VIII-8. Todos os compostos analisados estão presentes em pelo menos uma das amostras. Alguns deles estão em quantidades abaixo do

limite de quantificação, assim, estes puderam apenas ser identificados. Como dito anteriormente, a miricetina não teve linearidade satisfatória quando analisada por CLAE, assim, apenas foi possível sua quantificação por EC.

Para aqueles compostos que puderam ser quantificados, foi realizado o teste estatístico “T de Student” com a finalidade de se verificar possíveis diferenças entre os resultados e todos eles apresentaram-se idênticos, não havendo diferença entre as metodologias empregadas. A amostra de acerola com maracujá (J5) foi aquela que apresentou a menor quantidade total dos flavonóides quantificados, enquanto que a amostra de acerola com rosela (J3) foi a que apresentou a maior quantidade.

Tabela VIII-7. Quantidades de flavonóides e respectivos desvios padrões encontrados nas amostras J1, J2 e J3 analisadas por CLAE e EC. Valores expressos em mg por kg de amostra

Flavonóides	J1		J2		J3	
	CLAE	EC	CLAE	EC	CLAE	EC
(+)-Catequina	7,1±0,2	7,1±0,2	Pres.	Pres.	7,8±0,1	7,9±0,2
(-)-Epicatequina	5,2±0,2	5,3±0,2	Pres.	Pres.	9,3±0,1	9,2±0,3
Kaempferol	Pres.	Pres.	5,8±0,2	5,7±0,1	1,48±0,1	1,52±0,1
Narirutina	Aus.	Aus.	14,1±0,3	14,1±0,3	Aus.	Aus.
Miricetina	Pres.	Pres.	Pres.	Pres.	Pres.	7,42±0,1
Quercetina	6,7±0,3	6,8±0,1	2,5±0,4	2,4±0,3	20,4±0,5	21,3±0,6
Rutina	4,1±0,1	4,1±0,2	3,6±0,2	3,6±0,1	11,9±0,4	12,1±0,3
Total	23,2±0,8	23,3±0,8	26,1±1,0	25,8±0,9	50,85±1,1	59,4±1,6

Tabela VIII-8. Quantidades de flavonóides e respectivos desvios padrões encontrados nas amostras J4, J5 e J6 analisadas por CLAE e EC. Valores expressos em mg por kg de amostra.

Flavonóides	J4		J5		J6	
	CLAE	EC	CLAE	EC	CLAE	EC
(+)-Catequina	1,6±0,1	1,7±0,1	4,4±0,1	4,3±0,1	5,9±0,2	5,8±0,3
(-)-Epicatequina	3,6±0,1	3,6±0,1	Pres.	Pres.	1,5±0,1	1,4±0,1
Kaempferol	Pres.	Pres.	Pres.	Pres.	Pres.	Pres.
Narirutina	Aus.	Aus.	Aus.	Aus.	Aus.	Aus.
Miricetina	Pres.	Pres.	Pres.	Pres.	Pres.	Pres.
Quercetina	4,5±0,3	4,5±0,4	5,1±0,1	5,1±0,1	2,5±0,1	2,6±0,1
Rutina	6,9±0,1	6,9±0,3	4,5±0,1	4,6±0,1	7,6±0,1	7,5±0,1
Total	16,6±0,5	16,7±0,8	14,1±0,4	13,9±0,2	17,6±0,5	17,3±0,5

4. Conclusões

Pelos resultados obtidos, pode-se inferir que ambas as metodologias estão aptas a detectar e quantificar os flavonóides em questão nas geléias de frutas analisadas. Durante a validação das duas técnicas, a CLAE apresentou melhores resultados na seletividade, repetibilidade, limites de detecção e quantificação e sensibilidade do sistema. A EC leva vantagem frente à recuperação, tempo de análise e gastos de reagentes, produção de resíduos e, além disso, apenas a EC foi capaz de quantificar a miricetina. Tanto a EC quanto a CLAE demonstraram linearidade dentro da faixa considerada aceitável. Para amostras com quantidades de flavonóides abaixo dos limites de quantificação da EC e acima dos mesmos limites da CLAE, é de grande valia o uso desta técnica cromatográfica. Porém, para amostras com quantidades acima dos limites de quantificação da EC, esta é a técnica pode ser recomendada. Ainda como vantagem da EC, apenas esta metodologia foi capaz de fornecer segurança na identificação e quantificação da miricetina. Quanto às amostras, foram encontrados flavonóides em concentrações até 21,3 mg por kg de geléia. A amostra de geléia de acerola com maracujá foi aquela que apresentou a menor quantidade total dos flavonóides quantificados, enquanto que a amostra de geléia de acerola com rosela foi a que apresentou a maior quantidade.

5. Referências

- BABY, A.R.; MIGLIATO, K.F.; MACIEL, C.P.M.; ZAGUE, V.; PINTO, C.A.S.O.; SALGADO, H.R.N.; KANEKO, T.M. & VELASCO, M.V.R. (2007). Accelerated chemical stability data of O/W fluid emulsion contain the extract of *Trichilia catigua* Adr. Juss (e) *Ptychopetalum olacoides* Benth. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 43, 405-412.
- BRAMATI, L.; MINOGGIO, M.; GARDANA, C.; SIMONETTI, P.; MAURI P. & PIETTA, P. (2002) Quantitative Characterization of Flavonoid Compounds in Rooibos Tea (*Aspalathus linearis*) by LC-UV/DAD. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5513-5519.
- BREITFELLNER, F.; SOLAR, S. & SONTAG, G. (2002). Effect of gamma irradiation on flavonoids in strawberries. *European Food Research Technology*, 215, 28-31.
- CARERI, M.; CORRADINI, C.; ELVIRI, L.; NICOLETTI, I. & ZAGNONI, I. (2003). Direct HPLC Analysis of Quercetin and trans-Resveratrol in Red Wine, Grape, and Winemaking Byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 5226-5231.
- CARMONA, M.; SANCHEZ, A.M.; FERRERES, F. & ZALACAIN, A.. (2002). Identification of the flavonoid fraction in saffron spice by LC/DAD/MS/MS: Comparative study of samples from different geographical origins. *Food Chemistry*, 100, 445-450.
- CASTELARRI, M.E.S.; FABIANI, A. & ARFELLI, G. (2002) Analysis of wine phenolics by high-performance liquid chromatography using a monolithic type column. *Journal of Chromatography A*, 973, 221-227.
- CORDENUNSI, B. R.; NASCIMENTO, J. R. O.; GENOVESE, M. I. & LAJOLO, F. M. (2002) Influence of Cultivar on Quality Parameters and Chemical Composition of Strawberry Fruits Grown in Brazil. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 50, 2581-2586.
- ESCARPA, A. & GONZALEZ, M.C. (1998). High-performance liquid chromatography with diode-array detection for the determination of phenolic compounds in peel and pulp from different apple varieties. *Journal of Chromatography A*, 823, 331-337.
- FANG, F.; LI, J.M.; PAN, Q.H. & HUANG, W.D. (2007). Determination of red wine flavonoids by HPLC and effect of aging. *Food Chemistry*, 101, 428-433.
- FRAZIER, R.A. (2001). Recent advances in capillary electrophoresis methods for food analysis. *Electrophoresis*, 22, 4197-4206.
- FUNG, Y.S. & TUNG, H.S. (2001) Application of capillary electrophoresis for organic acid analysis in herbal studies. *Electrophoresis*, 22, 2242-2250.
- GÜRBÜZ, O.; GÖÇMEN, D.; DAG'DELEN, F.; GÜRSOY, M.; AYDIN, S.; SAHIN, I.; BÜYÜKUYSAL, L.; USTA, M. (2007). Determination of flavan-3-ols and trans-resveratrol in grapes and wine using HPLC with fluorescence detection. *Food Chemistry*, 100, 518-525.

- HAKKINEN, S.; HEINONEN, M.; KARENLAMPI, S.; MYKKANEN, H.; RUUSKANEN, J. & TORRONEN, R. (1999). Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries. *Food Research International*, 32, 345-353.
- HASSIMOTTO, N.M.A.; GENOVESE, M.I. & LAJOLO, F.M. (2005). Antioxidant Activity of Dietary Fruits, Vegetables, and Commercial Frozen Fruit Pulps. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2928-2935.
- HERRERO, M.; IBANEZ, E. & CIFUENTES, A. (2005). Analysis of natural antioxidants by capillary electromigration methods. *Journal of Separation Science*, 28, 883-897.
- HERRERO-MARTINEZ, J.M.; SANMARTIN, M.; ROSÉS, M.; BOSCH, E. & RÀFOLS, C. (2005). Determination of dissociation constants of flavonoids by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 26, 1886-1895.
- JAC, P; POLASEK, M & POSPISILOVA, M. (2006). Recent trends in the determination of polyphenols by electromigration methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 40, 805-814.
- KANITSAR, K.; ARCE, L.; RÍOS, A. & VALCÁRCEL, M. (2001). Determination of phenolic constituents in citrus samples by on-line coupling of a flow system with capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 22, 1553-1565.
- KLIMCZAK, I.; MALECKA, M.; SZALACHTA, M. & GLISZYNSKA-SWIGLO, A. (2007). Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 313-322.
- KOSAR, M.; KAFKAS, E.; PAYDAS, S. & BASER, K.H.C. (2004). Phenolic Composition of Strawberry Genotypes at Different Maturation Stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1586-1589.
- LÓPEZ M.; MARTÍNEZ F.; DEL VALLE C.; ORTE C. & MIRO M. (2001). Analysis of phenolic constituents of biological interest in red wines by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 922, 359-363.
- MATILLA, P.; ASTOLA, J.; KUMPULAINEN, J. (2000). Determination of Flavonoids in Plant Material by HPLC with Diode-Array and Electro-Array Detections. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5834-5841.
- MATSUBARA, S. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. (2006). Teores de catequinas e teaflavinas em chás comercializados no Brasil. *Ciências e Tecnologia de Alimentos*, 26, 401-407.
- MOLNÁR-PERL, I.; FÜZFAI, Z. (2005). Chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrochromatographic techniques in the analysis of flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 1073, 201-227.
- MORAES, M.L.L.; VILEGAS, J.H.Y. & LANÇAS, F.M. (1997). Supercritical Fluid Extraction of Glycosylated Flavonoids from Passiflora leaves. *Phytochemical Analysis*, 8, 257-260.
- PENG, Y.; LIU, F.; YE, J. (2006). Quantitative and qualitative analysis of flavonoid markers in *Fucus aurantii* of different geographical origin by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Journal of Chromatography B*, 830, 224-230.

- PETERSON, J.J.; DWYER, J.T.; BEECHER, G.R.; BHAGWAT, S.A.; GEBHARDT, S.E.; HAYTOWITZ, D.B. & HOLDEN, J.M. (2006). Flavanones in oranges, tangerines (mandarins), tangors, and tangelos: a compilation and review of the data from the analytical literature. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, S66-S73.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. & MELO, L. F. C. (2004). Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. *Química Nova*, 27, 771-780.
- VENDRAMINI, A.L. & TRUGO, L.C. (2004). Phenolic Compounds in Acerola Fruit (*Malpighia puniceifolia*, L.). *Journal of Brazilian Chemycal Society*, 15, 664-668.
- VOLPI, N. (2004). Separation of flavonoids and phenolic acids from propolis by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis*, 25, 1872-1878.
- WANG, S.P. & HUANG, K.J. (2004). Determination of flavonoids by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 1032, 273-279.
- WU, T.; GUAN, Y. & YE, J. (2007). Determination of flavonoids and ascorbic acid in grapefruit peel and juice by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Food Chemistry*, 100, 1573-1579.
- XU, X.; YE, H.; WANG, W.; YU, L. & CHEN, G. (2006). Determination of flavonoids in *Houttuynia cordata* Thunb. And *Saururus chinensis* (Lour.) Bail. by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Talanta*, 68, 759-764.
- YAN, J.; WANG, M. & LU, J. (2004). Determination of Rutin, Quercetin, and Chlorogenic Acid in Mulberry Leaves by Capillary Zone Electrophoresis. *Analytical Letters*, 37, 3287-3297.
- YANEZ, J.A.; ANDREWS, P.K. & DAVIES, N.M. (2007). Methods of analysis and separation of chiral flavonoids. *Journal of Chromatography B*, 848, 159-181.

CAPÍTULO IX.

INTERAÇÃO ANTIOXIDANTE ENTRE COMPOSTOS FENÓLICOS BASEADO NO SEQÜESTRO DE RADICAIS LIVRES.

Resumo

Compostos fenólicos, naturalmente presentes no reino vegetal, são conhecidos por possuírem elevada capacidade antioxidante, o que lhes confere, quando ingeridos, a habilidade de prevenir doenças degenerativas, como o câncer, por exemplo. Esta capacidade pode ser influenciada por inúmeros fatores, como a estrutura química dos compostos e a presença de outras substâncias no meio. É importante ressaltar que o potencial antioxidante de compostos isolados não necessariamente indica sua real capacidade antioxidante no extrato em que se encontra, uma vez que interações sinérgicas ou antagônicas podem ocorrer entre substâncias. Em vista desta informação, o estudo que se segue verificou a interação resultante da combinação de sete fenólicos, dois a dois, quanto à capacidade de seqüestrar radicais livres, utilizando o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•). Foram estudados os fenólicos: (+)-catequina, (-)-epicatequina, kaempferol, miricetina, quercetina, rutina e Vitamina C. Em um primeiro momento, a capacidade antioxidante foi analisada de forma isolada para cada uma das substâncias e a quercetina foi aquela com maior potencial, já o kaempferol foi o que apresentou o pior resultado. No estudo das combinações dois a dois, apenas a união de (+)-catequina com Vitamina C resultou numa interação sinérgica, com uma elevação de 20% em relação à atividade esperada. A combinação de miricetina e rutina foi aquela que resultou em maior interação antagônica, chegando a 79% da atividade esperada. A quercetina foi a única das substâncias estudadas que não apresentou qualquer interação com os compostos analisados.

Palavras-chave: antioxidantes, interação sinérgica e antagônica, 2,2-difenil-1-picrilhidrazil.

ANTIOXIDANT INTERACTION BETWEEN PHENOLIC COMPOUNDS BASED IN THE CAPACITY OF SCAVENGING FREE RADICAL

Abstract

Phenolic compounds, naturally presents in the plant kingdom, are known to possess high antioxidant capacity, what give them the ability to prevent some degenerative diseases, such as cancer. This capacity can be affected by many factors, such as chemical structure of the compound and the presence of other substances. It is important to know that the antioxidant potential of compounds isolated does not necessarily indicate their real antioxidant capacity in the extract because synergistic or antagonistic interactions occur between substances. In this context, this information, this work examined the interaction of a combination of seven phenolic compounds, two by two, for their ability to scavenging free radicals, using the radical 2,2-diphenil-ptycolhydrazyl (DPPH•). The phenolic studied were: (+)-catechin, (-)-epicatechin, kaempferol, myricetin, quercetin, rutin and Vitamin C. At first, the antioxidant capacity was analyzed in isolation for each substance and quercetin was the one with the greatest potential since the kaempferol presented the worst result. In the combination study two by two, only the union of (+)-catechin with Vitamin resulted in a synergic interaction with a increase of 20% compared to expected activity. The combination of myricetin and rutin was the one that result in the greatest antagonistic interaction, reaching 79% of the expected activity. The quercetin was the one of the studied substances that did not show any interaction with the others compounds analyzed.

Keywords: antioxidants, synergistic and antagonistic interaction, 2,2-diphenil-ptycolhydrazyl.

1. Introdução

Existem evidências de que frutas e vegetais são capazes de ajudar na prevenção de inúmeras doenças causadas por radicais livres devido à presença de substâncias intituladas antioxidantes. Entre essas doenças, destacam-se as degenerativas, as coronárias, as inflamações, artrites, alergias, doenças virais, o declínio do sistema imunológico e o aparecimento de disfunção cerebral e de catarata (Baby et al., 2007; Hassimotto, Genovese e Lajolo, 2005; Butera et al., 2002). Do ponto de vista tecnológico, os antioxidantes são de fundamental importância na conservação dos alimentos, uma vez que são capazes de preservar produtos perecíveis contra degradações oxidativas.

Além dos antioxidantes naturais, existem os antioxidantes sintéticos e o butil-hidroxi-anisol (BHA), o butil-hidroxitolueno (BHT), o propil galato (PG) e o terc-butil-hidroquinona (TBHQ) são os mais utilizados na indústria alimentícia. Entretanto, estudos epidemiológicos têm demonstrado a possibilidade de estes antioxidantes apresentarem efeito carcinogênico em experimento com animais, o que estimula ainda mais o uso dos antioxidantes naturais em detrimento destes. O BHA mostrou induzir hiperplasia gastrointestinal em roedores por um mecanismo desconhecido, mas em humanos, a relevância dessa observação ainda não está clara. O TBHQ promove a diminuição do nível de hemoglobina e causa a hiperplasia de células basais, não sendo permitido seu uso no Canadá e na Comunidade Econômica Européia. No Brasil o uso desses antioxidantes é limitado a um máximo de uso em 200 mg kg^{-1} para o BHA e TBHQ e 100 mg g^{-1} para o BHT (Ramalho e Jorge, 2006).

Os compostos fenólicos e as vitaminas constituem os grupos de antioxidantes naturais com maior incidência em frutas. Os humanos não possuem a capacidade de produzir tais substâncias em seu organismo, assim, o consumo de tais alimentos e seus derivados pode ser decisivo no controle de algumas doenças (Lim, Lim e Tee, 2007).

Dentre os compostos fenólicos, merecem destaque os flavonóides, cuja atividade antioxidante pode estar ligada à habilidade de sequestrar espécies oxidativas, como o ânion peróxido, radicais hidroxilas e radicais peroxilas, além da habilidade de quelar metais. *In vitro*, são capazes de prevenir a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) por meio da extensão da fase lag (Hassimotto, Genovese e Lajolo, 2005).

Das vitaminas que apresentam elevada função benéfica ao organismo, a Vitamina C é uma das mais importantes. Sua ação está relacionada com o aprisionamento de peróxidos tóxicos e com a estabilização de radicais livres, protegendo lipídios, proteínas e outros biocomponentes do dano oxidativo (Zinellu et al., 2004).

Vários métodos já foram propostos para avaliar a capacidade antioxidante em vegetais e compostos puros, como, por exemplo, o FRAP (Poder antioxidante de redução do ferro), o ORAC (Capacidade de absorção do radical oxigênio) e o ABTS (2,2' azinobis (3-etil-benzotiazolino-6-ácido sulfônico) sal diamônio), no entanto, os métodos que aplicam reações com o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH[•]) são as mais freqüentemente empregadas (Jiménez-Escrig et al, 2000; Ozcelik, Lee e Min., 2003; Scherer & Godoy, 2009). A atuação desse radical pode ser simplificada por meio da Figura IX-1.

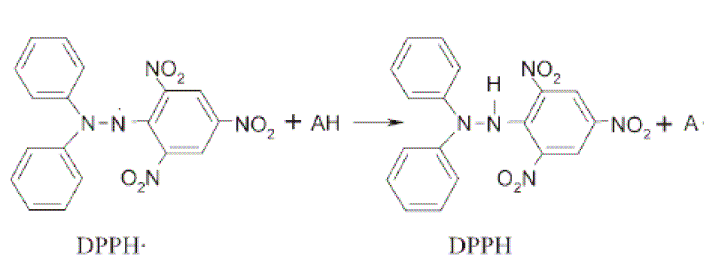


Figura IX-1. Mecanismo de ação do DPPH[•].

Quando um agente antioxidante (AH) é adicionado ao DPPH[•], o elétron livre do radical é pareado com o hidrogênio do antioxidante. No início da reação, o DPPH[•] apresenta uma coloração púrpura e após a complexação, essa tonalidade é perdida, passando para amarela. A diferença de absorbância gerada com a perda de coloração do meio é a base da avaliação do potencial antioxidante por esta técnica (Iacopini et al., 2008). Os compostos antioxidantes podem apresentar mais de um hidrogênio disponível para tal reação, resultando na seguinte proporcionalidade: quanto maior o número de hidrogênios livres no meio, maior é a atividade antioxidante do composto (Iacopini et al., 2008; Pinelo et al. 2004).

É importante ressaltar que o potencial antioxidante de compostos isolados não necessariamente indica a capacidade antioxidante do extrato em que se encontra, uma vez

que interações sinérgicas ou antagônicas podem ocorrer entre diferentes substâncias (Iacopini et al., 2008; Leong e Shi, 2002). Iacopini e colaboradores (2008) avaliaram a atividade antioxidante de extratos de uva utilizando o DPPH e verificaram que ela não depende apenas da quantidade de fenólicos totais presentes na matriz. Os compostos do extrato podem agir em sinergismo, antagonismo ou independentemente, afetando a capacidade antioxidante total do extrato. Segundo os resultados obtidos por estes autores, associações entre (+)-catequina, (-)-epicatequina, quercetina, rutina e *trans*-resveratrol, em qualquer combinação, apresentam relações antagônicas.

O presente trabalho avaliou a capacidade de seqüestro de radicais livres de sete compostos fenólicos: (+)-catequina, (-)-epicatequina, kaempferol, miricetina, quercetina, rutina e Vitamina C. Após esta etapa, estes antioxidantes foram combinados dois a dois e novamente a capacidade foi avaliada, visando verificar a existência de reações sinérgicas ou antagônicas.

2. Experimento

2.1. Reagentes

Foram utilizados padrões de flavonóides (+)-catequina, (-)-epicatequina, rutina, kaempferol, miricetina e quercetina da Sigma-Aldrich. O ácido ascórbico foi obtido da Synth. Os compostos foram diluídos em metanol da J.T. Baker, com exceção do kaempferol, que foi diluído em etanol, também da J.T. Baker. Foram preparadas soluções iniciais de 1 g L⁻¹ e estocadas à -4°C. No momento das análises, os compostos foram diluídos em metanol:água (1:1) até à concentração desejada. O DPPH• usado foi obtido junto à Sigma-Aldrich.

2.2. Avaliação do seqüestro de radicais livres.

O reagente DPPH• foi preparado, conforme descrito por Scherer e Godoy (2009), numa concentração de 0,1x10⁻³ mol L⁻¹ em metanol. 3,9 mL desta solução foi adicionado

de 0,1 mL de cada composto antioxidante em 7 diferentes concentrações e incubado por 90 min. em local ausente de luz. Após este período, a absorbância foi medida a 517 nm. A determinação do potencial de inibição do DPPH• foi obtido por meio da Equação IX-1, na qual "Abso" é a absorbância do branco (0,1 mL de metanol substituindo a amostra) e "Absi" é a absorbância da solução reativa contendo a amostra.

$$I\% = \frac{[Abs_0 - Abs_i]}{Abs_0} \times 100$$

Equação IX-1

Depois de obter a curva de I% versus concentração de amostra dentro do tubo com DPPH, utilizou-se a equação do modelo gerado para encontrar o IC50, ou seja, a concentração necessária de amostra para neutralizar 50% dos radicais livres de DPPH presentes no tubo. Com esse valor calcula-se o AAI (índice de atividade antioxidante), que é o parâmetro utilizado para classificar uma amostra em relação ao seu potencial antioxidante (Equação IX-2). Os ensaios foram realizados em triplicata. (Scherer e Godoy, 2009).

$$AAI = \frac{\text{concentração de DPPH}^{\bullet} \text{ final } (\mu\text{g.mL}^{-1})}{IC_{50} (\mu\text{g.mL}^{-1})}$$

Equação IX-2

2.3. Avaliação das interações entre os antioxidantes perante o seqüestro de radicais livres.

Para tal análise, os compostos foram combinados dois a dois, numa concentração próxima ao IC20 de cada, ou seja, a concentração necessária de amostra para neutralizar 20% dos radicais livres de DPPH presentes no tubo. O I% da combinação foi comparado com a soma do I% de cada composto isolado. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3. Resultados e discussão

Para a avaliação do potencial antioxidante dos compostos em questão, foi necessária a construção de curvas analíticas de inibição do radical livre *versus* a concentração dos antioxidantes. Foram utilizadas concentrações abrangendo potenciais de inibição entre 20 e 80%. Um modelo matemático foi ajustado a cada curva, permitindo-se calcular o IC₅₀ de cada um dos flavonóides alvos do estudo e também da Vitamina C. Como exemplo de estudo, na Figura IX-2 é apresentada a curva analítica ajustada para o potencial de inibição do DPPH[•] pela quercetina.

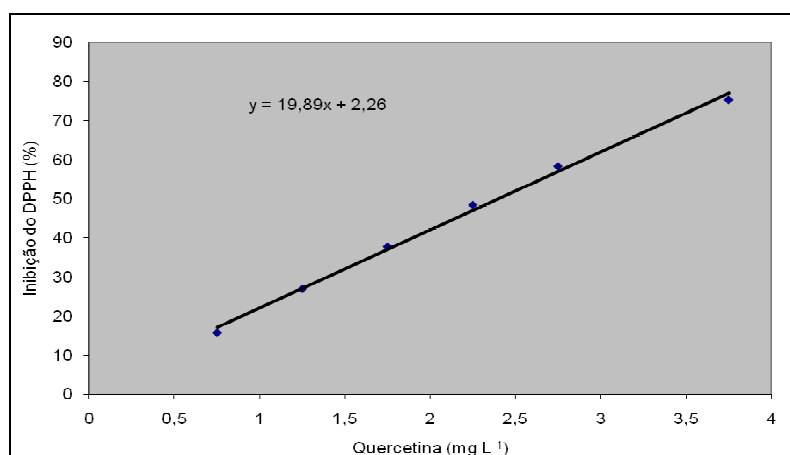


Figura IX-2. Modelo analítico ajustado à porcentagem de inibição do DPPH frente à variação de concentração de quercetina.

Os resultados obtidos podem ser verificados na Tabela IX-1. Nesta tabela, observa-se que todos os modelos apresentaram ajustes lineares aceitáveis, ao passo que os coeficientes de correlação (R^2) ficaram acima de 0,99. Nesta mesma tabela, estão discriminados os índices AAI calculados. De acordo com o proposto por Scherer e Godoy (2009), todos os compostos analisados constituem antioxidantes de elevado potencial, uma vez que apresentam AAI acima de 2,0. Também constam calculados os valores de IC₅₀ e de IC₂₀.

Tabela IX-1. Modelos ajustados à variação de concentração dos compostos frente a inibição do DPPH. Estão discriminados os coeficientes angulares (a), os coeficientes lineares (b), os coeficientes de correlação (r^2) e os índices IC50, IC20 e AAI.

Composto	a	b	r^2	IC50	IC20	AAI
(+)-catequina	15,28	7,63	0,992	2,77	0,80	13,86
(-)-epicatequina	17,70	0,74	0,992	2,78	1,08	13,81
Kaempferol	6,33	4,32	0,992	7,21	2,47	5,32
Miricetina	13,50	1,36	0,992	3,60	1,38	10,66
Quercetina	19,89	2,26	0,996	2,40	0,89	16,01
Rutina	8,76	2,21	0,999	5,45	2,02	7,04
Vitamina C	9,71	-1,81	0,990	5,33	2,24	7,22

O mecanismo de captura de radicais livres pelos compostos fenólicos ainda não foi completamente explicado, mas sabe-se que a estrutura química é muito importante para esse caso, sendo que os grupamentos OH são os centros reativos. Para os flavonóides, os grupos *o*-dihidroxi no anel B, a presença de dupla ligação entre os carbonos 2 e 3 (catecol), em conjunção com a oxidrila na posição 4 do anel C, grupos hidroxila nos carbonos 3 e 5 e a oxidrila no carbono 4 nos anéis A e C, estão associados à ação antioxidante. Para os ácidos fenólicos, a atividade aumenta com o número de hidroxilas e metoxilas (López et al., 2003).

Entre os flavonóides, a quercetina foi aquela que necessitou de menor quantidade em massa para inibir 50% do DPPH[•], com isso, pode ser considerado o composto com maior capacidade antioxidante entre os estudados. Este flavonóide apresenta, em sua estrutura, duas hidroxilas ligadas ao anel B, uma hidroxila ligada ao anel C e uma oxidrila ligada também ao anel C. Após a quercetina, o segundo composto com maior capacidade antioxidante é a (+)-catequina, sendo logo seguida pela (-)-epicatequina. Esses dois flavonóides são isômeros, o que justifica apresentarem capacidades oxidativas bem próximas. Possuem, em sua estrutura, o grupamento catecol (duas hidroxilas ligadas ao anel B) e uma hidroxila no anel C.

Quando a quercetina é comparada com a rutina, cuja diferença estrutural consiste na presença de um glicosídeo no lugar da hidroxila do anel C, percebe-se uma sensível diminuição do potencial antioxidante. O Kaempferol também possui estrutura semelhante à quercetina, apresentando apenas uma hidroxila a menos, no carbono 4 do anel B, o que

desestrutura o grupamento catecol e confere redução na atividade antioxidante. A Miricetina também se assemelha à estrutura da quercetina, tendo três hidroxilas no anel B, porém apresentou menor capacidade antioxidante, ficando com a quarta posição quando é feito um ranqueamento, este fato pode estar associado à sua alta instabilidade. Por fim, a Vitamina C, com quatro hidroxilas e uma oxidrila constitui o composto com o quinto maior potencial de inibição do DPPH[•] entre os estudados.

A avaliação do potencial antioxidante em combinações de compostos dois a dois foi realizada de maneira pontual e os resultados podem ser verificados na Tabela IX-2. Nesta tabela, estão discriminados o potencial de inibição de DPPH[•] observado na combinação (OI%), a soma dos potenciais individuais dos compostos na concentração adicionada na combinação (potencial esperado, EI%) e a análise sobre o tipo de interação resultante. Para verificar se o OI% e o EI% foram estatisticamente diferentes, o teste estatístico “T de Student” foi aplicado.

Tabela IX-2. Comparação entre o I% observado (OI%) e o I% esperado (EI%) na combinação dois a dois dos compostos (+)-catequina (CAT.), (-)-epicatequina (EPI.), kaempferol (KAE.), miricetina (MIR.), quercetina (QUE.), rutina (RUT.) e a Vitamina C (VITC.).

Analito	OI%	EI%	Interação	Analito	OI%	EI%	Interação
CAT. + EPI.	28,55	31,04	-	KAE. + MIR.	31,74	32,58	=
CAT. + KAE.	26,41	27,88	=	KAE.+ QUE.	30,82	30,11	=
CAT. + MIR.	33,56	38,10	-	KAE. + RUT.	29,70	35,22	-
CAT. + QUE.	34,20	35,64	=	KAE. + VITC.	38,58	38,13	=
CAT. + RUT.	36,92	40,75	-	MIR. + QUE.	41,55	40,33	=
CAT. + VITC.	51,48	43,66	+	MIR. + RUT.	35,99	45,44	-
EPI. + KAE.	26,76	25,52	=	MIR. + VITC.	41,55	48,35	-
EPI. + MIR.	34,68	35,73	=	QUE. + RUT.	39,68	42,98	=
EPI. + QUE.	31,84	33,28	=	QUE. + VITC.	45,19	45,89	=
EPI. + RUT.	33,09	38,39	-	RUT. + VITC.	49,47	51,00	=
EPI. + VITC.	36,28	41,29	-				

(-) Interação antagônicas; (=) não houve interação; (+) interação sinérgica

Conforme o estudo aponta, algumas das interações foram antagônicas, como, por exemplo, a associações entre (+)-catequina e a rutina, mas apenas uma interação obteve resultado sinérgico: (+)-catequina com Vitamina C. O sinergismo entre esses dois compostos elevou em 17,91% a capacidade antioxidante dos compostos isolados. O maior antagonismo se deu para o par miricetina e rutina, com um percentual de diferença de 20,80% e o menor antagonismo ocorreu entre (+)-catequina e (-)-epicatequina, com 8,02%. Não ocorreram interações em 12 das 21 combinações estudadas.

Iacopini e colaboradores (2008) também verificaram reação antagônica entre (+)-catequina e quercetina, porém, encontraram reação antagônica entre quercetina e rutina, o que não aconteceu no presente estudo para as concentrações utilizadas.

Os isômeros geométricos (+)-catequina e (-)-epicatequina não apresentaram os mesmos resultados de interação quando associados à miricetina e à Vitamina C. A (+)-catequina reagiu antagonicamente com a miricetina, enquanto que a (-)-epicatequina não teve interação com este composto. Para a Vitamina C, houve reação sinérgica com a (+)-catequina, mas antagônica com a (-)-epicatequina, necessitando de maiores estudos para elucidar a influência da isomeria na capacidade de seqüestro de radicais livres.

A quercetina foi o único composto que não demonstrou interação com nenhum dos outros fenólicos testados, já a rutina, reagiu antagonicamente com quase todos, com exceção da quercetina e da Vitamina C.

4. Conclusões

O presente estudo verificou a habilidade de sete compostos fenólicos em seqüestrarem radicais livres: (+)-catequina, (-)-epicatequina, kaempferol, miricetina, quercetina, rutina e Vitamina C. Dentre estes compostos, a quercetina foi o que apresentou maior habilidade, já o kaempferol foi o que apresentou menor. Foram realizadas também análises de combinações destes compostos dois a dois e o estudo comprovou que a habilidade de seqüestro de radicais não está apenas relacionada com a estrutura química de cada composto isoladamente, uma vez que a presença de outros compostos pode interferir positivamente ou negativamente. Verificou-se ainda que isômeros, como a (+)-catequina e a (-)-epicatequina, podem ter comportamentos diferentes frente ao meio antioxidante, indicando a influência da isomeria geométrica neste quesito. Várias reações antagônicas foram verificadas, mas apenas uma reação sinérgica foi descoberta nas concentrações estudadas, ocorrendo entre a (+)-catequina e o ácido ascórbico.

5. Referências

- BABY, A.R.; MIGLIATO, K.F.; MACIEL, C.P.M.; ZAGUE, V.; PINTO, C.A.S.O.; SALGADO, H.R.N.; KANEKO, T.M. & VELASCO, M.V.R. (2007). Accelerated chemical stability data of O/W fluid emulsion contain the extract of *Trichilia catigua* Adr. Juss (e) *Ptychopetalum olacoides* Benth. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 43, 405-412.
- BUTERA, D.; TESORIERE, L.; DI GAUDIO, F.; BONGIORNO, A.; ALLEGRA, M.; PINTAUDI, A.M.; KOHEN, R. & LIVREA, M.A. (2002). Antioxidant Activities of Sicilian Prickly Pear (*Opuntia ficus indica*) Fruit Extracts and Reducing Properties of Its Betalains: Betanin and Indicaxanthin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6895-6901.
- HASSIMOTTO, N.M.A.; GENOVESE, M.I. & LAJOLO, F.M. (2005). Antioxidant Activity of Dietary Fruits, Vegetables, and Commercial Frozen Fruit Pulps. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2928-2935.
- IACOPINI, P.; BALDI, M.; STORCHI, P. & SEBASTIANI, L. (2008). Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions. *Journal of Food Composition Analysis*, 21, 589-598.
- JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; JIMÉNEZ-JIMÉNEZ, I. ; SÁNCHEZ-MORENO, C. & SAURA-CALIXTO, F. (2000). Evaluation of free radical scavenging of dietary carotenoids by the stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1686-1890.
- LIM, Y.Y.; LIM, T.T. & TEE, J.J. (2007). Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study. *Food Chemistry*, 103, 1003-1008.
- LEONG, L.P. & SHUI, G. (2002). An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chemistry*, 76, 69-75.
- LÓPEZ, M; MARTÍNEZ, F; DEL VALLE, C.; FERRIT, M. & LUQUE, R. (2003). Study of phenolic compounds as natural antioxidants by a fluorescence method. *Talanta*, 60, 609-616.
- PINELO, M.; MANZOCCO, L.; NUNEZ, M.J. & NICOLI, M.C. (2004). Interaction among Phenols in Food Fortification: Negative Synergism on Antioxidant Capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1177-1180.
- OZCELIK, O.; LEE, J. H. & MIN, D. B. (2003). Effects of light, oxygen and pH on the Absorbance of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. *Journal of Food Science*, 68, 487-490.
- RAMALHO, V.C. & JORGE, N. (2006). Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Química Nova*, 29, 755-760.
- SCHERER, R. & GODOY, H.T. (2009). Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*, 112, 654-658.
- ZINELLU, A.; CARRU, C.; SOTGIA, S. & DEIANA, L. (2004). Optimization of ascorbic and uric acid separation in human plasma by free zone capillary electrophoresis ultraviolet detection. *Analytical Biochemistry*, 330, 298-305

CAPÍTULO X.

CAPACIDADE SEQÜESTRANTE DE RADICAIS LIVRES DE SEIS GELÉIAS DE FRUTAS.

Resumo

O aumento do consumo de produtos de origem vegetal está associado a descobertas sobre os efeitos benéficos conferidos por eles ao organismo humano. Os compostos fenólicos são os possíveis responsáveis por tais benefícios, como, por exemplo, prevenção de câncer, doenças coronárias e processos antiinflamatórios. O presente trabalho avaliou a atividade antioxidante de seis geléias de frutas através do estudo da capacidade de seqüestro do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Inicialmente, um teste de repetibilidade foi realizado encontrando-se desvio padrão relativo de 5,9%. A geléia de acerola com abacaxi foi a que apresentou maior capacidade, já a geléia de acerola com laranja foi aquela com capacidade menor. Os fenólicos totais foram quantificados, utilizando o reagente Folin-Ciocalteu. Nesta etapa, a amostra de acerola com abacaxi foi novamente a que apresentou melhores resultados e a geléia de acerola com rosela ficou com o menor valor. Comparando-se os ensaios realizados, não foi encontrada correlação linear entre a capacidade de seqüestro de radicais livres e a quantidade de fenólicos totais.

Palavras-chave: capacidade antioxidante, fenólicos, geléia de frutas

THE FREE RADICAL SCAVENGING CAPACITY OF SIX FRUIT JELLIES.

Abstract

The increased consumption of plants products is associated with the benefics effects conferred by then in the human body. Phenolic compounds are possibly responsible for these effects, such as prevention of cancer, heart diseases and inflammatory process. This work evaluated the antioxidant capacity of six fruit jellies through the study of scavenging capacity of the free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Initially, a repeatability test was performed and was obtained a standard deviation of 5.9%. The jelly of cherry and pineapple showed the high capacity and the jelly of cherry and orange showed the lowest capacity. The total phenolic was quantified using the Folin-Ciocalteau reagent. In this step, the sample of cherry and pineapple showed again the best results and the sample of cherry and roselle showed the lowest value. Comparing the results, a non linear correlation was found between the scavenging capacity and the quantification of total phenolic compounds.

Keywords: antioxidant capacity, phenolic, fruit jellies.

1. Introdução

Vários alimentos de origem vegetal já foram indicados como benfeitores ao organismo humano, em consequência, o interesse pelo seu consumo vem crescendo. Estes efeitos podem estar associados a compostos fenólicos, facilmente encontrados em frutas, vegetais e alguns produtos derivados, como vinhos, chás e geléias. Uma das características mais importantes destes fenólicos é a capacidade antioxidante. Berthollet, citado por Ramalho e Jorge (2006), foi o primeiro a registrar o retardamento das reações oxidativas por certos compostos.

Tais alimentos podem resultar, por exemplo, na prevenção de doenças coronárias (Bravo et al., 2006; Frazier, 2001), alguns tipos de câncer e processos inflamatórios (Jac, Polasek e Pospisilova, 2006). Além dos benefícios para a saúde, estes compostos contribuem para a qualidade sensorial do alimento, atuando na cor, amargor, adstringência e sabor do alimento (Kanitsar et al., 2001; Minussi et al., 2003), além de contribuírem na conservação dos produtos perecíveis. A eficiência dos antioxidantes naturalmente presentes nos alimentos depende de sua estrutura, da concentração e também da presença de outras substâncias. Por sua vez, a distribuição e a quantidade destes fenólicos estão susceptíveis a diferenças entre espécies, cultivares, grau de amadurecimento, condições ambientais de crescimento, colheita e estocagem, além de possíveis processamentos degradativos, como por exemplo aquecimento e maceração, comuns na indústria alimentícia (Kanitsar et al., 2001; Minussi et al., 2003; Oliveira et al, 2009). Para auxiliar a barrar tal degradação outros antioxidantes podem ser adicionados ao produto em conjunto com a utilização de determinados tipos de embalagens, com vácuo, atmosfera inerte e ausência de luz (Herrero, Ibanez e Cifuentes, 2005).

Devido à grande diversidade química, especialmente em compostos fenólicos, vários métodos vêm sendo utilizados para determinar a capacidade antioxidante em compostos puros e amostras. Uns determinam a capacidade de sequestro de espécies reativas, outros focam a capacidade em inibir a peroxidação lipídica, e há ainda outros, como aqueles que medem a capacidade de quelar metais. Como se não bastasse tal diversidade de métodos, não existe um procedimento metodológico universal e a

comparação entre tais métodos não pode ser realizada por valores absolutos (Oliveira et al., 2009). Muitos desses métodos são complexos e longos e os resultados obtidos dependem do substrato usado e da propriedade hidrofílica ou lipofílica dos antioxidantes testados (Bandoniene 2002).

Como exemplo de metodologias de avaliação da capacidade antioxidante tem-se: o FRAP (poder antioxidante de redução do ferro), o ORAC (capacidade de absorção do radical oxigênio) e o ABTS (2,2' azinobis (3-etil-benzotiazolino-6-ácido sulfônico) sal diamônio). Entretanto, os métodos que aplicam reações com o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH[•]) são os mais freqüentemente utilizados. (Jiménez-Escrig et al, 2000; Ozcelik, Lee e Min., 2003; Scherer & Godoy, 2009).

O presente estudo buscou avaliar a capacidade antioxidante baseada na habilidade dos compostos de seqüestrarem radicais livres. Foram analisadas seis amostras de geléias de frutas com acerola em sua composição, fruta rica em compostos fenólicos e Vitamina C. Foi realizada também a quantificação de fenólicos totais nas mesmas.

2. Experimento

2.1. Reagentes

Foi utilizado metanol da J.T. Baker. O 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e o ácido gálico foram obtidos junto à Sigma. O reagente Folin-Ciocalteu foi comprado da QEEL. O DPPH foi preparado numa concentração de $0,1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em metanol.

2.2. Extração das amostras

O método proposto foi aplicado em seis amostras diferentes: (J1) acerola e morango, (J2) acerola e laranja, (J3) acerola e rosela, (J4) acerola e goiaba, (J5) acerola e maracujá, e (J6) acerola e abacaxi. Alíquotas de 2,5 g de cada geléia foram extraídas com

25 ml de metanol: água (1:1) por 80 minutos em agitador mecânico. O extrato foi filtrado e suspenso em 50 mL antes de ser aplicado às metodologias.

2.3. Avaliação do sequestro de radicais livres.

O volume de 3,9 mL da solução de DPPH• foi adicionado de 0,1 mL de cada extrato de amostra em 7 diferentes concentrações e incubado por 90 min. em local ausente de luz. Após este período, a absorbância foi medida a 517 nm. A determinação do potencial de inibição do DPPH• foi obtido através da Equação IX-1, na qual "Abso" é a absorbância do branco (0,1 mL de metanol substituindo a amostra) e "Absi" é a absorbância da solução reativa contendo a amostra.

$$I\% = \frac{[Abs_0 - Abs_i]}{Abs_0} \times 100$$

Equação X-1

Depois de obter a curva de I% versus concentração de amostra dentro do tubo com DPPH, utilizou-se a equação do modelo gerado para encontrar o IC50, ou seja, a concentração necessária de amostra para neutralizar 50% dos radicais livres de DPPH presentes no tubo. Com esse valor calculou-se o AAI (índice de atividade antioxidante), que é o parâmetro utilizado para classificar uma amostra em relação ao seu potencial antioxidante (Equação IX-2). Os ensaios foram realizados em triplicata. (Scherer e Godoy, 2009).

$$AAI = \frac{\text{concentração de DPPH}^{\bullet} \text{ final } (\mu\text{g.mL}^{-1})}{IC_{50} (\mu\text{g.mL}^{-1})}$$

Equação X-2

Para verificar a repetibilidade do método, uma das amostras foi analisada em três dias diferentes, sendo realizados ensaios em triplicata em cada um dos três dias.

2.4. Quantificação de fenólicos totais

Foram adicionados 0,5 ml de extrato da amostra a 2,5 ml de reagente Folin-Ciocalteu à concentração de 10%. Esta mistura foi agitada e depois de cinco minutos foi adicionado 2 ml de uma solução de 7,5% de Na_2CO_3 . Após duas horas, a absorbância foi medida a 740 nm em espectrofotômetro. A quantificação foi realizada por meio da curva de calibração de ácido gálico. O teor de fenólicos totais foi expresso em equivalentes de ácido gálico por grama de amostra (EAG mg g⁻¹).

3. Resultados e discussão

Vários artigos utilizam o DPPH para verificar a capacidade de sequestro de radicais livres em matrizes vegetais, como frutas, sucos e vinhos, porém não foi encontrado na literatura nenhuma análise de geléias de frutas. Para avaliar se o método apresenta resultados repetitivos e com certa confiança para as amostras em questão, foram realizados testes de repetibilidade. Em um primeiro momento, a amostra J1 foi extraída em triplicata e submetida à análise. Após a construção das curvas de calibração, o IC₅₀ foi calculado e um desvio padrão relativo de 3,9% foi encontrado. Seguindo com essa intenção, o procedimento foi repetido por três dias diferentes, obtendo-se nove curvas de calibração, e por consequência, nove valores para o IC₅₀. O desvio padrão relativo encontrado foi de 5,9%.

Após a verificação da equivalência de respostas frente a extração e análise antioxidante, todas as amostras foram submetidas ao ensaio e tiveram seu IC₅₀ calculado.

Observando a Tabela X-1, percebe-se que a amostra com menor IC₅₀ foi a J6, já a amostra J2 foi a que apresentou o maior valor. Pela definição, este parâmetro representa a quantidade de amostra necessária para inibir em 50% a atividade oxidante do DPPH, com isso, a amostra que apresenta menor valor de IC₅₀ é também aquela que necessita de menor massa para inibição, ou seja, é a com maior potencial antioxidante. Em relação ao desvio padrão relativo, o maior valor foi de 3,9% para as amostras J4 e J5.

Tabela X-1. Valores do IC50 (mg L⁻¹), desvio padrão relativo (DPR) (%) e AAI obtidos para as amostras.

Amostra	IC50	DPR (%)	AAI
J1	1109	2,1	0,034
J2	2946	2,1	0,013
J3	1237	1,2	0,031
J4	1065	3,9	0,036
J5	869	3,9	0,044
J6	785	2,5	0,049

Não foi possível fazer uma comparação entre os resultados obtidos para essas geléias com dados da literatura, pois, como dito anteriormente, não se encontram dados relativos a análises antioxidantes e de fenólicos totais em geléias de frutas, ainda mais geléias que contenham mais de uma fruta. Para efeito de comparação, um paralelo foi então realizado entre as amostras em questão e as frutas que apresentam em sua composição.

O índice AAI sugerido por Scherer e Godoy (2009) foi estipulado para compostos puros, mas foi aplicado a essas amostras com a intenção de auxiliar na comparação. Para esses autores, valores abaixo de 0,5% representam compostos de baixa capacidade antioxidante, mas não há definição para amostras alimentícias.

Lim, Lim e Tee (2006) verificaram a capacidade antioxidante de diversas frutas, entre elas, goiaba e laranja. Neste trabalho, os autores forneceram o IC50 e a concentração de DPPH usada, assim, pôde-se calcular o AAI. A goiaba apresentou um AAI de 0,014 e a laranja apresentou 0,004. A amostra J4 contém goiaba em sua composição e a J2 tem laranja. Os AAI de ambas as geléias foram maiores que os das frutas de Lim, Lim e Tee (2006), fato pode estar associado à concentração das frutas no produto e também à presença de acerola, que possui elevada capacidade antioxidante.

A quantidade de fenólicos totais também foi verificada para as amostras (Tabela X-2). A geléia J6 foi aquela que apresentou maior quantidade de fenólicos e a J4 foi a que apresentou a menor quantidade.

Tabela X-2. Quantidade de fenólicos totais (EAG mg g⁻¹) e desvio padrão relativo (DPR) (%) encontrados nas geléias.

Amostra	FEN	DPR
J1	2,84	3,2
J2	1,20	2,8
J3	1,17	5,1
J4	2,4	1,2
J5	3,05	2,1
J6	3,46	2,6

Hassimoto, Genovese e Lajolo (2005) quantificaram os fenólicos totais em diversas frutas e vegetais, entre os quais está a goiaba. A polpa da fruta apresentou 1,24 EAG mg g⁻¹, o que é aproximadamente metade do encontrado para a geléia J4 (acerola com goiaba). Uma polpa de acerola congelada também teve seus fenólicos quantificados por estes autores, resultando em 8,6 EAG mg g⁻¹. Mezdri e colaboradores (2008) também verificaram fenólicos em polpa de acerola e quantificaram valores entre 6,4 e 7,5 EAG mg g⁻¹. Conforme os dados, a acerola contém grande quantidade de fenólicos totais, o que pode justificar os bons resultados das geléias, apesar de todo o processo tecnológico necessário para sua produção.

Os dados obtidos nos ensaios de capacidade de seqüestro de radicais livres e quantificação dos fenólicos totais foram comparados entre si. É importante ressaltar que o valor de IC50 é inversamente proporcional à capacidade antioxidante, ou seja, quanto maior o IC50, menor é a capacidade, assim, a Figura X-1 tem seu sentido invertido.

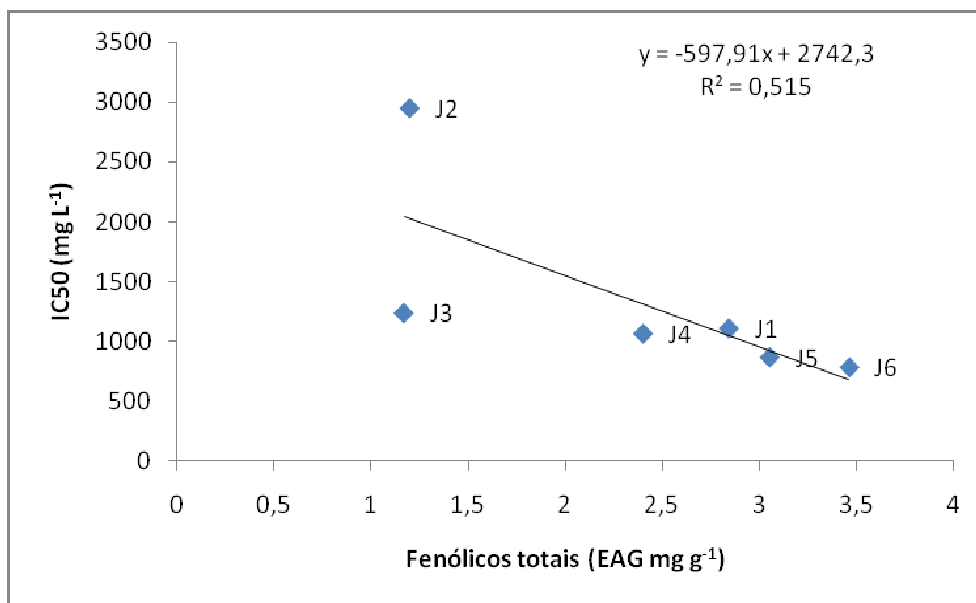


Figura X-1. Comparação entre a quantidade de fenólicos totais e a capacidade de seqüestrar radicais livres.

A amostra J6 é aquela que apresentou maior quantidade de fenólicos e também aquela que apresentou maior capacidade antioxidante. Percebe-se, no entanto, discrepância entre as amostras J2 e J3, o que leva a uma baixa correlação entre as duas características analisadas.

Alguns artigos indicam alta correlação entre a atividade antioxidante e a quantidade de fenólicos presentes, já outros não encontraram qualquer relação entre esses dados (Iacopini et al., 2008). Kuskoski e colaboradores (2006) e Liu e colaboradores (2002) encontraram correlação entre a quantidade de fenólicos totais e a capacidade antioxidante de diferentes frutas, mas Mezaadri e colaboradores (2008), Hassimoto, Genovese e Lajolo (2005) não encontraram qualquer correlação. Isto pode ser explicado pela diferente composição de cada extrato e também pela variação na resposta de cada fenólico ao método do Folin-Ciocalteu. E ainda, o resultado absoluto da capacidade antioxidante varia de acordo com o método utilizado (Hassimoto, Genovese e Lajolo, 2005). Outro motivo para tal falta de correlação entre estes dados é a presença de interações sinérgicas ou antagônicas entre antioxidantes, conforme demonstrado no capítulo XI. Segundo Lim, Lim e Tee (2006), o DPPH pode também

sofrer reações reversíveis com certos compostos, como o eugenol e seus derivados e pode também reagir de maneira mais lenta com algumas moléculas.

4. Conclusão

Entre as geléias, a amostra que contém acerola e abacaxi (J6) em sua composição, foi aquela com maior capacidade antioxidante, enquanto a geléia de laranja com acerola (J2) foi a que apresentou a menor capacidade. Quanto à quantidade de fenólicos totais, novamente a geléia J6 foi aquela com maior valor, enquanto a J3 (acerola com rosela) foi a que menos fenólicos apresentou. Comparando-se os ensaios realizados, não houve correlação linear entre a capacidade de seqüestrar radicais livres e a quantidade de compostos fenólicos presentes nas geléias analisadas.

5. Referências

- BANDONIENĖ, D.; MURKOVIC, M.; PFANNHAUSER, W.; VENSKUTONIS, P.R. & GRUZDIENĖ, D. (2002). Detection and activity evaluation of radical scavenging compounds by using DPPH free radical and on-line HPLC-DPPH methods. *European Food Research Technology*, 214, 143-147.
- BRAVO, M.N.; SILVA, S.; COELHO, A.V.; VILAS BOAS, L. & BRONZE, M.R. (2006) Analysis of phenolic compounds in Muscatel wines produced in Portugal. *Analytica Chimica Acta*, 563, 84-92.
- FRAZIER, R.A. (2001). Recent advances in capillary electrophoresis methods for food analysis. *Electrophoresis*, 22, 4197-4206.
- HASSIMOTTO, N.M.A.; GENOVESE, M.I. & LAJOLO, F.M. (2005). Antioxidant Activity of Dietary Fruits, Vegetables, and Commercial Frozen Fruit Pulps. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2928-2935.
- HERRERO, M.; IBANEZ, E. & CIFUENTES, A. (2005). Analysis of natural antioxidants by capillary electromigration methods. *Journal of Separation Science*, 28, 883-897.
- IACOPINI, P.; BALDI, M.; STORCHI, P. & SEBASTIANI, L. (2008). Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions. *Journal of Food Composition Analysis*, 21, 589-598.
- JAC, P; POLASEK, M & POSPISILOVA, M. (2006). Recent trends in the determination of polyphenols by electromigration methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 40, 805-814.
- JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; JIMÉNEZ-JIMÉNEZ, I. ; SÁNCHEZ-MORENO, C. & SAURA-CALIXTO, F. (2000). Evaluation of free radical scavenging of dietary carotenoids by the stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1686-1890.
- KANITSAR, K.; ARCE, L.; RÍOS, A. & VALCÁRCEL, M. (2001). Determination of phenolic constituents in citrus samples by on-line coupling of a flow system with capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 22, 1553-1565.
- KUSKOSKI, E.A.; ASUERO, A.G.; TRONCOSO, A.M. MANCINI-FILHO, J. & FETT, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante em pulpa de frutos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25, 726-732.
- Lim, Y.Y.; Lim, T.T. & Tee, J.J. (2007). Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study. *Food Chemistry*, 103, 1003-1008.
- LIU, M.; LI, X.Q.; WEBER, C.; LEE, C.Y.; BROWN, J. & LIU, R.H. (2002). Antioxidant and Antiproliferative Activities of Raspberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2926-2930.
- MEZADRI,T.; VILLANO, D.; FERNANDEZ-PACHON, M.S.; GARCIA-PARRILA, M.C. & TRONCOSO, A.M. (2008). Antioxidant compounds and antioxidant activity in acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruits and derivatives. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 282-290.

- MINUSSI, R C; ROSSI, M; BOLOGNA, L; CORDI, L; ROTILIO, D; PASTORE, G. M. & DURAN, N. (2003). Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines e pastore. *Food Chemistry*, 82, 409-416.
- OLIVEIRA, A.C.; VALENTIM, I.B.; GOULART, M.O.F.; SILVA, C.A.; BECHARA, E.J.H. & TREVISAN, M.T.S. (2009). Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Química Nova*, 32, 689-702.
- OZCELIK, O.; LEE, J. H. & MIN, D. B. (2003). Effects of light, oxygen and pH on the Absorbance of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. *Journal of Food Science*, 68, 487–490.
- RAMALHO, V.C. & JORGE, N. (2006). Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Química Nova*, 29, 755-760.
- SCHERER, R. & GODOY, H.T. (2009). Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*, 112, 654-658.

Conclusão geral

O estudo realizado foi capaz de quantificar o ácido ascórbico em geléias de frutas por quatro métodos diferentes. O primeiro método utilizado foi o indicado pela AOAC para a análise de sucos e preparados. Este método sofreu modificações dando origem ao segundo método, mais confiável e vantajoso em relação ao primeiro aplicado. Foi facilitada a visualização do ponto final da reação e houve uma economia significativa no uso de reagentes e produção de resíduos. Dez geléias foram analisadas nesta etapa do trabalho e a quantidade de Vitamina C variou de zero a 608 mg de ácido ascórbico por 100 g de amostra. Devido aos resultados obtidos, o fabricante modificou a formulação das geléias dando origem a seis novos produtos, que tiveram a quantidade de ácido ascórbico analisada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Eletroforese Capilar (EC).

A metodologia de CLAE foi desenvolvida e validada para a análise de ácido L-ascórbico e o ácido D-isoascórbico nas geléias de frutas, porém o DIAA não foi encontrado em nenhuma das amostras. A EC também teve uma metodologia desenvolvida e validada. Neste caso foi identificado e quantificado o ácido L-ascórbico nas amostras com o auxílio de padronização interna usando o ácido D-isoascórbico, já que o estudo anterior mostrou que este não estava presente. O LAA foi encontrado em todas as geléias, numa gama de concentração de 180 a 525 mg por 100 g de geléia. Todos os produtos apresentaram valores acima da Ingestão diária recomendada.

Quando os parâmetros de validação da EC foram comparados aos da CLAE, a EC apresentou resultados semelhantes para linearidade, repetibilidade, limite de detecção e de quantificação, porém, utiliza tempo bem menor para as análises, sendo duas vezes menor. Essa vantagem possibilita que a EC seja preferida em análises dessa vitamina em larga escala. Outra grande vantagem da EC é o menor uso de reagentes e a menor produção de resíduos em relação à CLAE.

Para os flavonóides, também foram desenvolvidos e validados métodos utilizando a CLAE e a EC, mas antes foi necessária uma etapa de otimização extrativa. Os flavonóides (+)-catequina, (-)-epicatequina, rutina, narirutina, quercetina e kaempferol tiveram a melhor extração utilizando o metanol 50% como solvente e homogeneização por 80 minutos. Foi

empregada a técnica de SPE para limpeza e concentração das amostras. As taxas de recuperação ficaram entre 68 e 83%.

Ambas os métodos instrumentais foram capazes de identificar e quantificar (+)-catequina, (-)-epicatequina, rutina, narirutina, quercetina e kaempferol nas amostras, porém apenas a EC foi eficiente na quantificação de miricetina, sendo possível apenas sua identificação na CLAE. Em adição aos flavonóides, a metodologia por EC também estudou os fenólicos *trans*-resveratrol, ácido cinâmico, ácido ferrúlico, ácido *p*-coumárico, ácido vanílico, ácido caféico, ácido gálico e ácido 3,4-dihidroxibenzóico.

Comparando se as duas técnicas de análise dos flavonóides iniciais, a CLAE foi a que apresentou melhores resultados na seletividade, repetibilidade, limites de detecção e quantificação e sensibilidade do sistema. A EC leva vantagem frente à recuperação, tempo de análise e gastos de reagentes, produção de resíduos e, além disso, apenas a EC foi capaz de quantificar a miricetina. Para amostras com quantidades de flavonóides abaixo dos limites de quantificação da EC e acima dos mesmos limites da CLAE, é de grande valia o uso desta técnica cromatográfica. Porém, para amostras com quantidades acima dos limites de quantificação da EC, esta é a técnica recomendada. Quanto às amostras, foram encontrados flavonóides em concentrações de até 21,3 mg por kg de geléia.

A próxima etapa do estudo foi feita para verificar a capacidade dos compostos estudados em seqüestrar de radicais livres. A quercetina foi aquela que apresentou maior habilidade, já o kaempferol foi o que apresentou menor. Foram realizadas também análises de combinações destes compostos dois a dois e o estudo comprovou que a habilidade de seqüestro de radicais não está apenas relacionada com a estrutura química de cada composto isoladamente, uma vez que a presença de outros compostos pode interferir positivamente ou negativamente. Verificou-se ainda que isômeros, como a (+)-catequina e a (-)-epicatequina, podem ter comportamentos diferentes frente ao meio antioxidante, indicando a influência da isomeria geométrica neste quesito. Várias reações antagônicas foram verificadas, mas apenas uma reação sinérgica foi descoberta nas concentrações estudadas, ocorrendo entre a (+)-catequina e o ácido ascórbico.

A análise antioxidante também foi realizada para as geléias de frutas e a que contém acerola e abacaxi (J6) em sua composição foi aquela com maior capacidade antioxidante, enquanto a geléia de laranja com acerola (J2) foi a que apresentou a menor capacidade. Comparou-se os resultados obtidos com a quantidade de fenólicos totais e não houve correlação linear entre a capacidade de sequestrar radicais livres e a quantidade de compostos fenólicos presentes nas geléias analisadas.

Anexo

As Figuras – Anexo I e II demonstram a análise de ácido ascórbico realizada no Capítulo II. É possível verificar a melhora na facilidade de visualização do ponto final da reação obtida pela otimização do método.

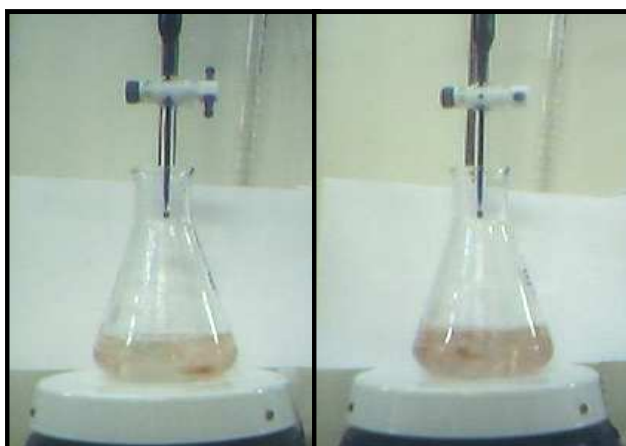


Figura - Anexo 1. Visualização do ponto final da reação quando foi aplicado o método indicado pela AOAC para quantificação de ácido ascórbico.

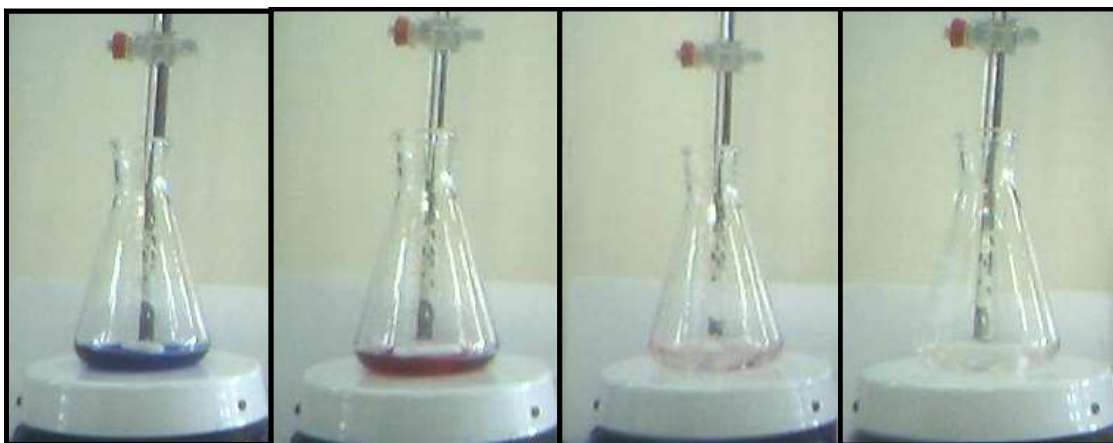


Figura - Anexo 2. Visualização do ponto final da reação quando foi aplicado o método otimizado no estudo.



Figura - Anexo 3. Comparação entre a solução final titulada e a amostra presente na bureta. A coloração é muito próxima, servindo como parâmetro do final da reação.