EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DAS SEMENTES E DO FRUTO FRESCO DA AMORA, AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E DETERMINAÇÃO DO EC_{50}.

Taynee Moyse Semkiw Fagundes Nofre (PIBIC/CNPq), Neiva Deliberali Rosso (Orientador), e-mail: ndrosso@uepg.br.

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Química.

Ciências Exatas e da Terra e Química.

Palavras-chave: Amora-preta, compostos fenólicos, atividade antioxidante.

Resumo

O processamento da amora preta *Rubus sp*. gera subprodutos de sementes que são descartados como resíduo. Esses, apresentam compostos bioativos que contribuem para a saúde e formulação de novos produtos. O objetivo do presente trabalho foi extrair e quantificar os compostos fenólicos e a atividade antioxidante na semente e na polpa da amora preta. Os compostos fenólicos da semente foram extraídos por meio da metodologia de superfície de resposta e as antocianinas foram extraídas e quantificadas em dois estágios de maturação da polpa. Os teores dos compostos fenólicos nas sementes foram elevados, 1228,87 mg equivalentes de ácido gálico (EAG) 100 g^{-1}, flavonoides de 72,40 mg equivalentes de quercetina (EQ) 100 g^{-1} e a atividade antioxidante de 1355,07 mg equivalentes de ácido ascórbico (EAA) 100 g^{-1}. As variáveis independentes, tempo e temperatura, foram estatisticamente significativos no planejamento. A condição otimizada foi de 31,87 min e 44,2 °C, com EC_{50} de 0,153. O teor de antocianinas na polpa foi de 21,98 mg de cianidina-3-glicosídeo (C3G) 100 g^{-1} para o menor estágio de maturação e 60 mg C3G 100 g^{-1} para a amora madura.

Introdução

A amora preta (*Rubus sp*.) pertencente à família Rosaceae, gênero Rubus, é uma fruta agregada de origem Asiática que apresenta em sua composição 85% de água, 10% de carboidratos e alto teor de minerais, como potássio, magnésio, ferro e cálcio (POLING, 1997; ZANCO et al., 2017).

A amora pode ser consumida *in natura*, e também podem ser elaborados diversos produtos alimentícios. Entretanto, o processamento industrial da fruta acaba gerando um volume considerado de resíduos, de aproximadamente 20%. Este resíduo normalmente é descartado embora ainda apresente quantidades significativas de compostos bioativos, como vitaminas, carboidratos e compostos fenólicos, que juntos podem representar um impacto significativo na dieta humana (REATEGUI et al., 2014).

Os compostos fenólicos presentes nas frutas e verduras, alimentos em geral, são responsáveis pela atividade antioxidante, pela conservação de alimentos e pelo combate e prevenção de certas patologias, como infecções e doenças crônicas (ANGELO; JORGE, 2007). Na semente de amora, Ayoub et al. (2016) identificaram a presença de quatro ácidos fenólicos: protocatecuico, p-cumárico, gálico e cafeico. Assim, o objetivo do presente trabalho foi extrair e quantificar o teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante na semente e na polpa da amora preta.

ISSN 1676-0093

Material e Métodos

2.1. Materiais

Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura (Millipore) e os reagentes utilizados foram de grau analítico. Ácido gálico, reagente de Folin-Ciocalteu, 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), 2,4,6-tripiridriltriazina (TPTZ), HCl e KCl (Sigma). Carbonato de sódio, cloreto de alumínio hexahidratado, cloreto férrico e acetona (Synth). Ácido acético (Vetec).

2.2. Métodos

2.2.1 Preparação das sementes de amora e extração dos compostos fenólicos

As sementes de amora foram doadas por uma empresa de Curitiba/PR, descongeladas, secas a 40 ºC, em estufa com circulação de ar, e processadas em um moinho analítico (Quimis-628A21). Em seguida, foram peneiradas a 60 mesh e armazenadas em frascos de polietileno, a ±2 °C, até a realização das análises. Os compostos fenólicos foram extraídos segundo um planejamento composto central rotacional 2^2 nas temperaturas de 15.9, 20, 30, 40 e 44.1 ºC, e tempos de 5.86, 10, 20, 30 e 34.14 min. Amostras de 0,500 g das sementes foram misturadas com 15 mL da solução extratora na proporção de 2:3 acetona:água, em uma cela termostatizada, sob agitação constante.

2.2.2 Determinação do teor de compostos fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante; analise estística e EC_{50} do extrato otimizado.

As análises foram realizadas em triplicatas. O teor de compostos fenólicos foi determinado de acordo com Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventos (1999) com uma curva padrão de ácido gálico (y=-0,01816x-0,01015; R^2=0,9982). Os flavonoides segundo Chang et al. (2002), com uma curva padrão de quercetina (y= 20967,90494x-0,0646 R^2=0,9929). E a atividade antioxidante foi determinada por DPPH, segundo Brand-Williams et al. (1995) com curva padrão de ácido ascórbico (y= 13697,91667x+0,80472 R^2=0,99957). A análise estatística foi feita com o software STATISTICA ® 12,6 e no extrato otimizado determinou-se o EC_{50}.

2.2.3 Extração e determinação das antocianinas, compostos fenólicos totais, flavonóides e atividade antioxidante

Os frutos frescos da amora, adquiridos no comercio local de Ponta Grossa, foram higienizados com água destilada e armazenados em frascos de polietileno, sob refrigeração a 4 ºC. A extração foi realizada em triplicata em dois estágios de maturação, com uma massa de 4,5 g e 75 mL de solução de ácido acético a 0,545 $molL^{-1}$, pH= 2,5, por 13,6 minutos á 88,2 °C. A análise dos compostos fenólicos e atividade antioxidante foram realizadas como descrito anteriormente. A atividade antioxidante também foi determinada pelo método de FRAP (BRENZIE e STRAIN, 1996) com uma curva padrão de Fe (II) (y=0,39394x–0,0312, R^2=0,9997). Os teores de antocianinas e flavonóides foram determinados segundo Pedro et al. (2016).

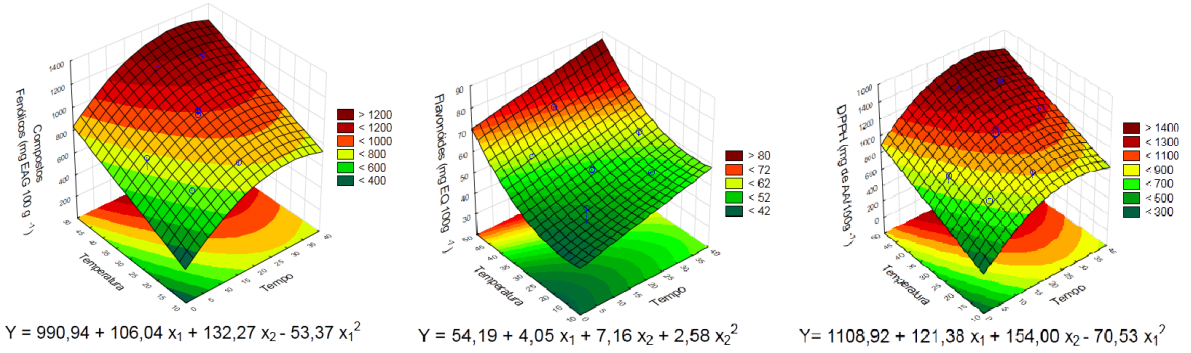
Resultados e Discussão

O conteúdo de compostos fenólicos variou estatisticamente ($p<0,0001$) de 650,1±2,5 a 1228,9±2,5 mg EAG 100 g^{-1} de semente de amora, com o maior teor observado em 30 min à 40 °C e o menor em 10 min à 20 °C. No ensaio realizado com a temperatura mais elevada do planejamento, 44,2 °C observou-se que ocorreu um decréscimo no teor de compostos fenólicos. Isso indicou que o aumento da temperatura proporcionou a degradação desses compostos.

O teor de flavonoides variou estatisticamente ($p<0,0001$) de 43,8±0,2 a 72,4±0,2 mg EQ 100 g^{-1} de semente. O maior conteúdo foi observado em 20 min à 44,2 °C e o menor em 20 min à 15,9 °C. A atividade antioxidante variou estatisticamente ($p<0,0001$) de 709,0±1,8 a 1355,1±1,1 mg EAA 100 g^{-1} de semente de amora. O maior teor ocorreu em 30 min à 40 °C e o menor em 10 min à 20 °C.

A partir das análises estatísticas avaliou-se a influência do tempo e da temperatura nas variáveis de resposta. O teste de ANOVA, com nível de confiança de 95%, mostrou inicialmente que não houve falta de ajuste para compostos fenólicos ($p_{Lack\ of\ Fit}=0,0654$), flavonóides ($p_{Lack\ of\ Fit}=0,0754$) e atividade antioxidante ($p_{Lack\ of\ Fit}=0,1667$). As curvas de superfície de resposta e o modelo matématico, Figura 1, indicaram que a temperatura linear, o tempo linear e o tempo quadrático foram estatisticamente significativos para a extração de compostos fenólicos ($R_{adj}=0,8294$) e para atividade antioxidante ($R_{adj}=0,7571$). Enquanto a temperatura linear, a temperatura quadrática e o tempo linear foram estaticamente significativos para flavonóides ($R_{adj}=0,8768$).

Figura 1 - Curvas de superfície de resposta para compostos fenólicos, flavonóides e atividade antioxidante.



$Y = 990,94 + 106,04\ x_1 + 132,27\ x_2 - 53,37\ x_1^2$

$Y = 54,19 + 4,05\ x_1 + 7,16\ x_2 + 2,58\ x_2^2$

$Y = 1108,92 + 121,38\ x_1 + 154,00\ x_2 - 70,53\ x_1^2$

Com a função de desejabilidade, 100 iterações, obteve-se a condição otimizada para a extração dos compostos fenólicos, tempo de 31,87 min e a temperatura de 44,2°C. Nessa condição, realizou-se uma nova extração, onde foi determinado um teor de compostos fenólicos, 1219,1 mg EAG 100 g^{-1}, e atividade antioxidante, 1347,0 mg EAA 100 g^{-1} de semente. O valor foi menor do que o esperado, pois na temperatura maior ocorreu uma leve degradação dos compostos fenólicos, fenômeno que o modelo não tem como prever. O valor de EC_{50} para este extrato foi 0,153.

A Tabela 1 apresenta os teores de antocianinas, flavonoides, compostos fenólicos e atividade antioxidante para amora fresca. Observa-se que o grau de maturação é um padrão que influencia na quantidade de compostos bioativos, e que o conteúdo de antocianinas na fruta, sugere que a mesma poderia ser utilizada como corante natural, substituindo os corantes sintéticos.

Tabela 1 - Conteúdo de antocianinas, compostos fenólicos, flavonóides e atividade antioxidante pelo método de DPPH e FRAP na extração do fruto fresco da amora.

Extrato de amora fresca	Antocianinas (mg C3G 100 g^{-1}) *	Fenólicos (mg EAG 100 g^{-1}) *	Flavonóides (mg EQ 100 g^{-1}) *	DPPH (mg EAA 100 g^{-1}) *	FRAP (mg Fe (II) 100 g^{-1})*
Menor estágio de maturação	21,9 ± 0,2	376,2 ± 4,4	13,4 ± 0,4	353,53 ± 1,0	127,4 ± 5,0
Amora madura	60,2 ± 0,9	524,7 ± 4,2	26,5 ± 0,0	495,47 ± 1,7	203,4 ± 0,5

* Valores expressos como a média das triplicatas ± desvio padrão

Conclusões

Concluiu-se a partir dos resultados que o planejamento Delineamento Composto Central Rotacional 2^2 foi uma boa ferramenta para avaliar as variáveis independentes, tempo e temperatura na extração dos compostos bioativos presentes nas sementes da amora. Os teores de compostos fenólicos indicaram que a semente, considerada um resíduo agroindustrial, é uma fonte rica em compostos bioativos e um potente antioxidante natural. O fruto fresco apresentou expressivos teores de antocianinas que variaram com o grau de maturação, parâmetro que influencia na quantidade desses compostos. Conclui-se que tanto as sementes quanto a polpa da amora preta são fontes de nutrientes.

Agradecimentos

Ao CNPq e a CAPES pelo auxílio financeiro, a UEPG, a professora Neiva Deliberali Rosso e a aluna Isabela Leite Neves pelo auxílio com as extrações e carinho.

Referências

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos-uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 66, n. 1, p. 01-09, 2007.

AYOUB, M; CAMARGO, A.C.; SHAHIDI, F. Antioxidants and bioactivities of free, esterified and insoluble-bound phenolics from berry seed meals. **Food Chemistry**, v.197, p. 221-232, 2016.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) ass a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, v.239, p.70-76, 1996.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free-radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

CHANG, C. C.; YANG, M. H.; WEN, H. M.; CHERN, J. C. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. **Journal of food and drug analysis**, v. 10, n. 3, 2002.

PEDRO, A.; GRANATO, D.; ROSSO, N. D. Extraction of anthocyanins and polyphenols from black rice (Oryza sativa L.) by modeling and assessing their reversibility and stability. **Food Chemistry**, v. 191, p. 12-20, 2016.

POLING, E. B. Blackberries. **Journal of Small Fruit and Viticulture**, v. 14, n. 1/2, p. 33-69, 1997.

REATEGUI, J. L. P.; MACHADO, A. P. F.; BARBERO, G. F., REZENDE, C. A.; MARTINEZ, J. Extraction of antioxidant compounds from blackberry (Rubus sp.) bagasse using supercritical CO_2 assisted by ultrasound. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.94, p. 223-233, 2014.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152–178, 1999.

ZANCO, P.; SOUZA, E.F.; BONACORSI, C. Evaluation of antimicrobial and antioxidant activity of leaf teas blackberry (Morus nigra). **Scientific Electronic Archives**, v.10, n.1, p. 150-157, 2017.