

DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS ANTIOXIDANTES NO MORANGO (FRAGARIA X ANANASSA) POR UHPLC-MS/MS

Bruna Donzelli Bittencourt (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Carina Alexandra Rodrigues,
Antonio Eduardo Nicácio, Jesuí Vergílio Visentainer, Liane Maldaner (Orientador),
e-mail: bruna.sini@hotmail.com

Universidade Estadual de Maringá/ Centro de Ciências Exatas/ Maringá, PR.

Área: Ciências Exatas e da Terra / **Subárea:** Química

Palavras-chave: d-SPE, compostos fenólicos, UHPLC-MS/MS.

Resumo:

Neste trabalho, determinou-se a composição fenólica do morango (*Fragaria x ananassa*) a partir de um procedimento de extração líquido-sólido rápido, seguido de uma etapa de limpeza empregando a extração em fase sólida dispersiva (d-SPE) e análise por cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial (UHPLC-MS/MS). O extrato da amostra obtido sob as condições de extração e limpeza otimizadas foi submetido à análise cromatográfica, e sete compostos fenólicos foram encontrados, sendo que, a catequina ($13421 \mu\text{g kg}^{-1}$), o ácido clorogênico ($12189 \mu\text{g kg}^{-1}$) e o ácido elágico ($3619 \mu\text{g kg}^{-1}$), foram os compostos majoritários. A diversidade e concentração dos compostos fenólicos encontrados no morango resultaram em valores de atividade antioxidante elevados para os métodos de DPPH[•] e ORAC.

Introdução

Estudos epidemiológicos têm indicado que o consumo de quantidades adequadas de frutas e vegetais está associado a uma série de benefícios à saúde humana, como a redução de doenças cardiovasculares, derrames, diabetes, doenças crônicas e degenerativas entre outras (BAZZANO et al., 2002; ROLEIRA et al., 2015). Esses benefícios se devem principalmente aos compostos antioxidantes, os quais possuem a habilidade de proteger as células contra o estresse oxidativo, decorrente do desequilíbrio entre a produção de espécies reativas (radicais livres) e a remoção destas pelos sistemas químicos e enzimáticos de defesa antioxidante. Dentre os compostos antioxidantes presentes em frutas e vegetais, os compostos fenólicos correspondem à classe mais abundante de antioxidantes naturais presentes em plantas, incluindo os flavonoides e ácidos fenólicos (HUANG et al., 2005). As frutas vermelhas, conhecidas como “berries”, englobam as famílias Rosaceae (morango, framboesa, amora) e Ericaceae (mirtilo e cranberry), e constituem uma classe de frutas que possuem quantidades elevadas e uma diversidade de compostos antioxidantes. O morango (*Fragaria x ananassa*) é uma fruta nativa do clima temperado da Europa, porém atualmente é cultivado com sucesso em grande parte do mundo, sendo o Brasil o maior produtor da América do Sul (ANTUNES, 2018). O morango apresenta ótima aceitação *in natura* devido a suas características sensoriais e é largamente utilizado na culinária para produção de sucos, sorvetes, bolos, tortas, doces e geleias. Além disso, apresenta uma rica

combinação de compostos bioativos, que incluem a vitamina C e E, o ácido fólico, os carotenoides e os compostos fenólicos (SZADEK e BOROWSKA, 2008). Visto os efeitos benéficos de uma dieta rica em compostos antioxidantes, a investigação acerca da presença e a quantidade desses compostos nos alimentos vêm sendo alvo constante de pesquisas. Dentro deste contexto, para a determinação desses compostos em matrizes alimentares complexas, é necessário o emprego de técnicas de preparo de amostra eficientes, de modo a garantir a extração seletiva dos analitos bem como, uma etapa de limpeza, para a remoção dos interferentes. Para avaliar o potencial antioxidante dos alimentos, os ensaios de atividade antioxidante avaliam a capacidade de inibição dos radicais livres e são amplamente utilizados devido a sua simplicidade e pela possibilidade de correlação com os dados cromatográficos. Assim, um estudo detalhado foi realizado para a avaliação quanto à presença e quantidade de compostos fenólicos em extratos de morango usando um procedimento de extração líquido-sólido seguido de uma etapa de limpeza utilizando a extração em fase sólida dispersiva (d-SPE) e análise por cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial (UHPLC-MS/MS).

Materiais e métodos

As amostras de morango foram adquiridas no mercado local de Maringá – Paraná. Nesta etapa, as frutas foram lavadas com água corrente, trituradas até obter-se uma pasta, embaladas a vácuo e armazenadas em freezer a temperatura de -18°C até sua utilização. Para a extração dos compostos fenólicos foram adicionadas 5,0 g de amostra e 5,0 mL de acetonitrila em tubos de centrífuga. Os tubos foram agitados em vórtex durante 1 min e centrifugados durante 10 min a 5000 rpm. Em seguida, 1,0 mL do sobrenadante foi transferido para um tubo de centrífuga contendo diferentes quantidades dos sorventes. Otimizou-se a etapa de limpeza empregando-se a técnica de d-SPE, onde foram avaliados os seguintes sorventes: amina primária secundária (PSA), terra diatomácea (DE) e carbono grafitizado (GCB), nas seguintes proporções e combinações: PSA 25 mg, DE 50 mg, PSA 25 mg + GCB 5 mg e PSA 50 mg + GCB 2,5 mg. Para todos os testes de limpeza avaliados, a mistura foi agitada em vórtex durante 1 min, centrifugada durante 10 min a 5000 rpm e filtrada antes da análise por UHPLC-MS/MS. Para análise cromatográfica foi desenvolvido um método com vinte e quatro compostos fenólicos, sendo eles, os ácidos gálico, protocatecuico, clorogênico, 4-hidroxibenzóico, vanílico, cafeico, siríngico, *p*-cumárico, ferúlico, sinápico, elágico e *trans*-cinâmico, catequina, rutina, resveratrol, miricetina, quercetina, luteolina, naringenina, galato de epicatequina, kaempferol, apigenina, epicatequina e crisina. O extrato obtido com a condição otimizada foi também analisado quanto à atividade antioxidante pelos métodos DPPH* e ORAC.

Resultados e Discussão

As frutas e vegetais são parte de um grupo de matrizes de plantas extremamente diversificado, que contém quantidades significativas de pigmentos, açúcares, lipídios, proteínas, e outras substâncias que podem interferir na análise cromatográfica. Neste sentido, a adição de uma etapa de limpeza para o procedimento de extração é fundamental para minimizar erros e obter resultados quantitativos confiáveis e, além disso, para reduzir a necessidade de manutenção do

sistema cromatográfico. Assim, o primeiro estudo consistiu em avaliar a extração dos compostos fenólicos da amostra associado a uma etapa de limpeza para a remoção dos interferentes, especialmente pigmentos e açúcares. Na Figura 1, estão apresentados os compostos fenólicos extraídos do extrato do morango com as respectivas quantidades (em termos de média de área de pico) utilizando-se os diferentes sorventes de limpeza d-SPE.

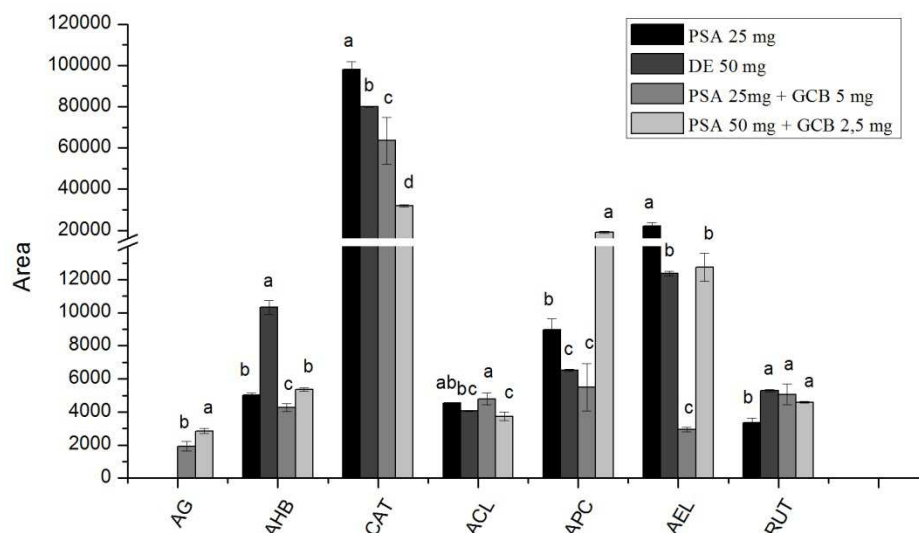


Figura 1. Avaliação de diferentes sorventes usados individualmente ou em combinação na etapa de limpeza (d-SPE) do extrato do morango. AG: ácido gálico, AHB: ácido 4-hidroxibenzóico, CAT: catequina, ACL: ácido clorogênico, APC: ácido *p*-cumárico, AEL: ácido elágico e RUT: rutina.

Pode-se observar que dentre os vinte e quatro compostos avaliados, sete deles foram extraídos e que as quantidades dos mesmos variaram de acordo com os sorventes utilizados na etapa de limpeza. A rutina e o ácido clorogênico apresentaram poucas variações entre as quantidades extraídas para todos os sorventes de limpeza utilizados. Por outro lado, quando foram empregados individualmente 25 mg de PSA e 50 mg de DE o ácido *p*-cumárico apresentou retenção significativa e o ácido gálico ficou completamente retido. Além disso, quando foi empregado 25 mg de PSA combinado com 5 mg de GCB, tanto o ácido *p*-cumárico quanto o ácido elágico apresentaram retenção significativa. Com base nestes dados, a condição definida para a etapa de limpeza d-SPE para o extrato do morango foi: 50 mg de PSA combinado com 2,5 mg de GCB, que foi a condição que removeu os interferentes sem reter significativamente os compostos fenólicos. Em seguida, o extrato da amostra obtido sob as condições de extração e limpeza otimizadas foi submetido à análise cromatográfica e a análise de atividade antioxidante. Na Figura 2 estão apresentados os compostos fenólicos que foram encontrados no morango, sendo que os compostos majoritários foram a catequina ($13421 \mu\text{g kg}^{-1}$), o ácido clorogênico ($12189 \mu\text{g kg}^{-1}$) e o ácido elágico ($3619 \mu\text{g kg}^{-1}$). As quantidades elevadas de compostos fenólicos encontrados no morango refletiram também em valores de atividade antioxidante elevados, tanto para o método de DPPH* ($221 \pm 0,30 \mu\text{mol TE } 100 \text{ g}^{-1}$) quanto para o método de ORAC ($153 \pm 13,2 \mu\text{mol TE } 100 \text{ g}^{-1}$).

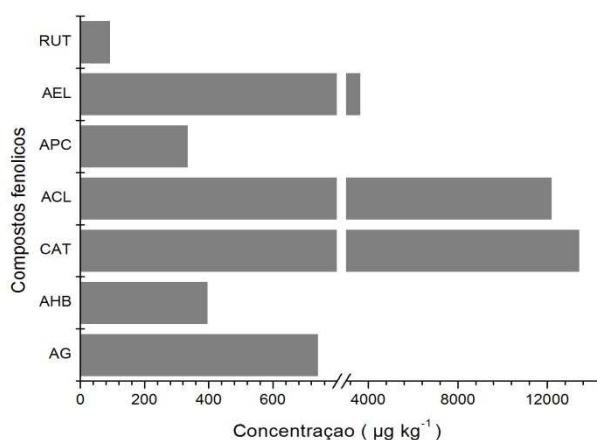


Figura 2 - Composição fenólica do morango. AG: ácido gálico, AHB: ácido 4-hidroxibenzóico, CAT: catequina, ACL: ácido clorogênico, APC: ácido *p*-cumárico, AEL: ácido elágico e RUT: rutina.

Conclusões

A partir desse estudo foi possível determinar a composição fenólica do morango empregando um método de extração líquido-sólido simples e rápido. A etapa de extração foi seguida de uma etapa de limpeza (d-SPE), com a qual, na condição otimizada (50 mg de PSA combinado com 2,5 mg de GCB) foi possível remover os interferentes sem remoção significativa dos compostos fenólicos. Dentre os vinte e quatro compostos fenólicos avaliados, sete deles foram encontrados na amostra sendo a catequina, o ácido clorogênico e elágico os majoritários. O extrato também foi avaliado quanto à atividade antioxidante (DPPH[•] e ORAC), e os resultados corroboraram com os dados cromatográficos indicando que o morango tem potencial antioxidante elevado.

Agradecimentos

UEM, CAPES, CNPq, Fundação Araucária, APLE-A e DQI-UEM.

Referências

- ANTUNES, L. E. C. Brasil é o maior produtor de morango da América do Sul. **Campo&Negócio-Hortifruti**, n. 7, p. 92-94, 2018.
- BAZZANO, L. A.; HE, J.; OGDEN, L. G.; LORIA, C. M.; VUPPUTURI, S.; MYERS, L.; WHELTON, P. K. Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease in US adults: the first national health and nutrition examination survey epidemiologic follow-up study. **American Journal of Clinic Nutrition**, v.76, p.93-99, 2002.
- HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.1841-1856, 2005.
- ROLEIRA, F. M. F.; TAVARES-DA-SILVA, E. J.; VARELA, C. L.; COSTA, S. C.; SILVA, T.; GARRIDO, J.; BORGES, F. Plant derived and dietary phenolic antioxidants: Anticancer properties. **Food Chemistry**, v.183, p.235-258, 2015.
- SZADEK, A.; BOROWSKA, E. J. Bioactive compounds and health-promoting properties of berry fruits: Review. **Plants Foods for Human Nutrition**, v.63, p.147-156, 2008.