

DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS EM CASCA DE MANGA (*Mangifera indica* L.) POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA – CLAE

Jamile da Cruz Caldas^{1*}; Walter Nei Lopes dos Santos²

1. Estudante de IC do Departamento de Ciências Exatas e da Terra da UNEB
2. Pesquisador do Departamento de Ciências Exatas e da Terra da UNEB / Orientador

Resumo:

Neste trabalho foram propostos procedimentos para determinação de substâncias antioxidantes, a nível traço, em cascas de manga (*Mangifera indica* L.). As substâncias a serem investigadas, conteúdo total e formas específicas, foram as de interesse essenciais, como os polifenóis (ácidos fenólicos e flavonóides), visando avaliar diferentes tipos de manga comercializadas em Salvador-Ba. Para isso, foi empregada a técnica analítica cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Para o preparo das amostras foi realizada a sequência de etapas: liofilização, extração por solvente com agitação, filtração e secagem por rotaevaporador. A metodologia desenvolvida foi aplicada nas determinações do teor de polifenóis. Ácidos fenólicos como ácido gálico, ferúlico, transcinâmico, vanílico, p-cumárico, clorogênico, cafeico, siríngico, elágico e flavonoides como catequina, quercetina e rutina.

Palavras-chave: Polifenóis; Ácidos fenólicos; Frutas.

Apoio financeiro: Universidade do Estado da Bahia (UNEB) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição: UNEB.

Introdução:

Os frutos contêm, além dos nutrientes essenciais e de micronutrientes como minerais, fibras e vitaminas, diversos compostos secundários de natureza fenólica, denominados polifenóis. Inúmeros estudos realizados com compostos fenólicos, especialmente os flavonóides, demonstram a capacidade de captar radicais livres (atividade antioxidante) e seus efeitos na prevenção de enfermidades cardiovasculares, circulatórias, cancerígenas, no diabetes e no mal de Alzheimer.¹

Os alimentos contêm compostos oxidantes, os quais podem ocorrer naturalmente ou ser introduzidos durante o processamento para o consumo. Por outro lado, os alimentos, principalmente as frutas, verduras e legumes também contêm agentes antioxidantes, tais como as vitaminas C, E e A, a clorofilina, os flavonoides, carotenóides, curcumina e outros que são capazes de restringir a propagação das reações em cadeia e as lesões induzidas pelos radicais livres.²

A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos levou ao desenvolvimento de muitos mecanismos de defesa antioxidante para limitar os níveis intracelulares e impedir a indução de danos. Os antioxidantes são agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células.²

Considerando a relevância e a diversidade das substâncias fenólicas, uma grande variedade de métodos de análise podem ser utilizados para determiná-las, mas necessita-se de técnicas separativas com alto poder de resolução devido à complexidade dos extratos de frutas e a quantidade de formas em que o analito pode estar presente na matriz.³

A determinação de fenólicos em frutas e extratos de plantas e derivados tem sido realizada de forma predominante por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).^{4,5}

O presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento e validação de métodos analíticos visando à determinação de substâncias fenólicas (ácidos fenólicos e flavonoides) em amostras de manga (casca e polpa), comercializadas na cidade de Salvador- Ba, empregando-se a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Metodologia:

Foram adquiridas 42 amostras de manga (6 de cada ponto de coleta) de diferentes variedades (Thomy, rosa e espada), pontos de coleta e formas de cultivo (orgânico e tradicional). As mesmas foram adquiridas em diferentes estados de maturação. As amostras foram obtidas em diversos pontos comerciais de Salvador, Bahia, incluindo feiras, supermercados e duas plantações orgânicas.

As amostras *in natura* foram higienizadas com água corrente, solução de hipoclorito de sódio 100 ppm (5 minutos) e água ultra pura. Depois foram secas a temperatura ambiente, sendo então fracionadas e submetidas ao congelamento e liofilização. Posteriormente as amostras foram moídas em liquidificador para redução do tamanho e então peneiradas. A estabilidade das espécies nas amostras tem que ser cuidadosamente considerada para evitar sua alteração durante manipulação e estocagem por longo tempo. A amostragem padrão foi realizada empregando recipientes plásticos de polietileno devidamente descontaminados por solução de ácido nítrico e água desionizada. As amostras liofilizadas foram preservadas em dessecador.

O processo para extração foi otimizado, sendo que o procedimento para a execução da mesma consiste em: agitação, filtração e secagem do solvente em rotaevaporador. A uma massa de 0,5 g de polpa de manga liofilizada por 96 horas (até secura total), foram adicionados 30 mL do solvente (metanol) e uma micro gota de ácido clorídrico concentrado. A amostra foi submetida à agitação por 30 minutos. O solvente foi evaporado em rotaevaporador (60°C) e o material resultante ressuspensão em 1,5 mL de metanol, filtrado e diluído antes das determinações. Os procedimentos foram realizados em triplicata para todas as etapas.

As substâncias fenólicas foram avaliadas por fase reversa (RP) utilizando-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência CLAE (modelo LC-(modelo LC- 20AD Prominence, Shimadzu Scientific Instruments, Japão), equipado com quatro bombas de alta pressão (modelo LC-20AD, Shimadzu, Japão), detectores de arranjo de diodos (DAD, modelo SPD-20A, Shimadzu, Japão) dispostos em série. As separações foram realizadas com uma coluna "Lichorspher" RP C18 100 (250mm x 4,6 mm, 5,0 µm de diâmetro da partícula). As variáveis instrumentais otimizadas foram: vazão: 1mL.min⁻¹; temperatura: 40°C; volume de injeção: 20µL. A fase móvel constituiu-se de A: ácido acético (1% v/v) e B: metanol. O gradiente empregado foi: 0-10 min: 100%A; 10-20 min: 70% A; 20-30 min: 10% A; 30-40 min: 100%A.

Os analitos avaliados e seus respectivos comprimentos de onda (nm) foram: ácido gálico (280); (+) catequina (280); ácido clorogênico (330); ácido cafeico(330); ácido p-cumárico (310); ácido siríngico (272); ácido vanílico (260); ácido ferúlico (280); rutina (360); ácido elágico (260); quercetina (360); ácido transcinâmico(280); kaempferol(360). Identificações e análises qualitativas foram realizadas por comparação com os tempos de retenções e espectros dos padrões.

Resultados e Discussão:

Os resultados alcançados para a determinação de substâncias fenólicas por CLAE estão mostrados na Tabela 1:

Amostra	AG	ACL	AC	ATC	APC	AS	AF	AE
1CEC	25,72±0,23	19,49±0,03	3,52±3,75	<LD	13,51±0,12	51,20±0,78	<LD	238,14±23,25
2CEF	59,92±4,31	33,13±1,94	2,67±0,33	1,14±0,03	101,54±0,66	27,49±0,11	14,99±19,24	9,96±0,55
3CRJ	16,01±0,55	25,31±0,36	1,31±0,16	<LD	75,44±0,21	88,42±1,11	<LD	9,75±0,19
4CRU	15,23±0,90	39,72±2,97	1,80±0,12	1,28±0,09	38,48±6,60	48,01±4,93	1,80±0,06	27,54±4,14
5CRS	18,77±0,63	58,85±5,96	0,54±0,05	3,40±0,04	8,55±0,48	306,43±9,58	13,33±0,77	260,59±19,67
6CTV	1,38±0,15	<LD	3,30±0,23	3,58±0,83	4,36±0,07	152,6±2,32	<LD	265,59±12,61
7CTM	10,53±0,30	62,85±3,43	0,053±0,06	2,92±0,82	6,54±4,29	115,55±15,81	<LD	19,59±3,18
1MEC	20,43±0,31	2,18±1,00	0,05±0,007	---	1,33±0,05	0,48±0,04	<LD	4,80±0,85
2MEF	12,34±1,67	19,35±0,75	0,15±0,05	0,85±0,0	0,44±0,04	0,65±0,03	0,99±0,15	4,67±0,03
3MRJ	21,17±3,88	18,99±0,94	0,46±0,38	---	0,38±0,02	9,06±1,43	2,51±0,32	4,21±0,55
4MRU	12,77±0,67	32,02±0,27	1,41±0,04	---	0,38±0,06	<LD	3,34±0,34	2,72±1,39
5MRS	1,79±0,60	27,29±0,86	0,05±0,01	<LD	0,50±0,00	<LD	1,98±0,35	4,75±0,90
6MTV	18,49±15,39	<LD	0,09±0,01	<LD	<LD	<LD	<LD	2,10±0,16
7MTM	4,13±1,22	12,87±0,14	0,04±0,01	0,37±0,03	0,36±0,00	1,33±0,07	<LD	0,71±0,00

: Ac.gálico; ACL: Ac.clorogênico; AC: Ac.caféico; ATC: Ac.transcinâmico; AV: Ac.vanílico; APC: Ac.pCumárico; ASI:Ac.siríngico; AF: Ac.ferúlico; AE: Ac.elágico C: Casca de Manga; M: Manga; E: Espada R: Rosa T: Thomy massa seca (DW). Médias± DP (desvio padrão) Médias de cada analito.

O cromatograma obtido para as substâncias fenólicas determinadas em amostra de manga (CRJV) está representados na Figura 1 e os espectros de alguns dos analitos na Figura 2.

Figura 1. Cromatograma das substâncias fenólicas

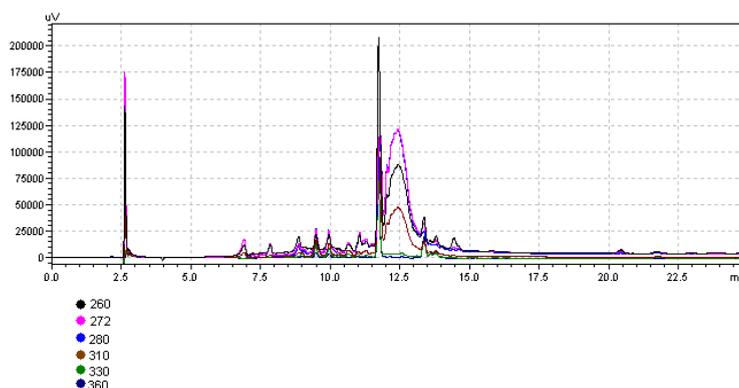
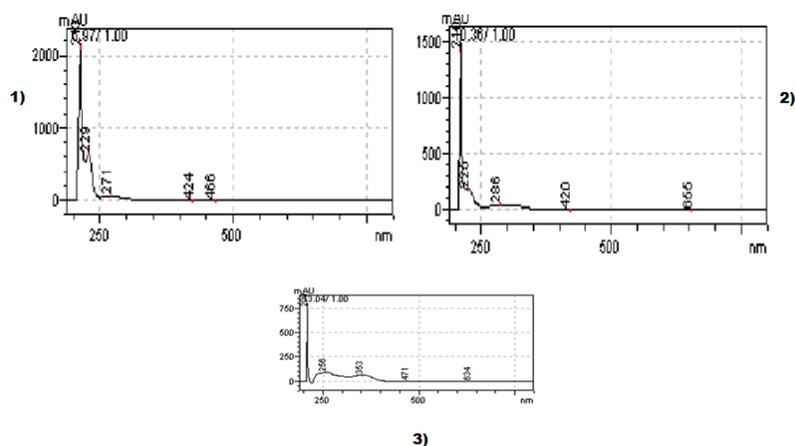


Figura 2. Espectros obtidos para alguns analitos determinados em amostra de manga.

Onde: 1) Ácido gálico - 280 nm: t= 6,97 min 2) Ácido clorogênico - 330 nm: t= 10,43min 3) Rutina - 360 nm: t=13min

Os resultados foram bastante semelhantes entre as frutas verdes e maduras. Os dados obtidos para as cascas foram bem maiores que para as polpas. Os valores para o teor de fenólicos totais estão de acordo com a literatura, embora possa haver bastante variação em função do clima, formas de cultivo, e solo onde foram cultivadas as mangas.

Conclusões:

O método proposto para determinação de ácidos fenólicos obteve precisão e exatidão satisfatórios, sendo os analitos determinados na maioria das amostras em um tempo menor que 20 minutos. Os resultados encontrados sugerem que, a manga, especialmente a casca, é uma boa fonte de substâncias bioativas.

Referências bibliográficas

- 1) Kuskoski, E. M.; Asuero, A. G.; Morales, M. T.; Fett, R. Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Ciência Rural**. v.36, n.4, jul-ago, 2006.
- 2) Bianchi, M. L. P.; Antunes, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev. Nutr.** v.12, n.2, p. 123-130, Campinas, maio/ago, 1999
- 3) Ghafoor, K.; Al-juhaimi, F. Y.; Choi, Y. H. Supercritical Fluid Extraction of Phenolic Compounds and Antioxidants from Grape (*Vitislabrusca B.*) Seeds. **Plant Foods Human Nutr.** Ano 2012
- 4) Dembitsky, V. M.; Poovarodom, S.; Leontowicz, H.; Leontowicz, M.; Vearasilp, S.; Trakhtenberg, S.; Gorinstein, S. The multiple nutrition properties of some exotic fruits: Biological activity and active metabolites. **Food Research International**, v. 44, p. 1671 -1701, 2013
- 5) Malta, L. G.; Tessaro, E. P.; Eberlin, M.; Pastore, G. M.; Liu, R. H. Assessment of antioxidant and antiproliferative activities and the identification of phenolic compounds of exotic Brazilian fruits. **Food Research International**. v. 53, p. 417–425, ano 2013.