

Protocolos para Avaliação das Características Físicas e Físico-Químicas, dos Compostos Bioativos e Atividade Antioxidante do Pedúnculo do Caju



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Agroindústria Tropical
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

DOCUMENTOS 182

Protocolos para Avaliação das Características Físicas e Físico-Químicas, dos Compostos Bioativos e Atividade Antioxidante do Pedúnculo do Caju

Márcia Régia Souza da Silveira
Andreia Hanser Oster
Carlos Farley Herbster Moura
Ebenézer de Oliveira Silva
Lorena Mara Alexandre e Silva
Aline Ellen Duarte de Sousa

Embrapa Agroindústria Tropical
Fortaleza, CE
2018

Unidade responsável pelo conteúdo e edição:

Embrapa Agroindústria Tropical
Rua Dra. Sara Mesquita 2270, Pici
CEP 60511-110 Fortaleza, CE
Fone: (85) 3391-7100
Fax: (85) 3391-7109
www.embrapa.br/agroindustria-tropical
www.embrapa.br/fale-conosco

Comitê Local de Publicações
da Embrapa Agroindústria Tropical

Presidente
Gustavo Adolfo Saavedra Pinto

Secretária-executiva
Celli Rodrigues Muniz

Secretária-administrativa
Eveline de Castro Menezes

Membros
*Janice Ribeiro Lima, Marlos Alves Bezerra,
Luiz Augusto Lopes Serrano, Marlon Vagner
Valentim Martins, Kirley Marques Canuto,
Rita de Cassia Costa Cid, Eliana Sousa
Ximendes*

Supervisão editorial
Ana Elisa Galvão Sidrim

Revisão de texto
José Cesamildo Cruz Magalhães

Normalização bibliográfica
Rita de Cassia Costa Cid

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Ariilo Nobre de Oliveira

Foto da capa
Márcia Régia Souza da Silveira

1ª edição
On-line (2018)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Agroindústria Tropical

Protocolos para avaliação das características físicas e físico-químicas, dos
compostos bioativos e atividade antioxidante do pedúnculo do caju / Márcia
Régia Souza da Silveira et al. – Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical,
2018.

43 p. : il. ; 16 cm x 22 cm. – (Documentos / Embrapa Agroindústria Tropical,
ISSN 2179-8184; 182).

Publicação disponibilizada on-line no formato PDF.

1. Pedúnculo do caju. 2. Compostos bioativos. 3. Atividade antioxidante. 4. Pós-
colheita - Avaliação. I. Silveira, Márcia Régia Souza da. II. Oster, Andreia Hanser.
III. Moura, Carlos Farley Herbster. IV. Silva, Ebenezer de Oliveira. V. Silva, Lorena
Mara Alexandre e. VI. Sousa, Aline Ellen Duarte de. VII. Série.

CDD 631.56

© Embrapa, 2018

Autores

Márcia Régia Souza da Silveira

Farmacêutica-bioquímica, mestre em Tecnologia de Alimentos, analista da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE

Andreia Hansen Oster,

Agrônoma, doutora em Horticultura, pesquisadora da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE

Carlos Farley Herbster Moura,

Agrônomo, doutor em Fitotecnia, pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE

Ebenézer de Oliveira Silva

Engenheiro-agrônomo, doutor em Fisiologia Vegetal, pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE

Lorena Mara Alexandre e Silva,

Química, doutora em Química Orgânica, analista da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE

Aline Ellen Duarte de Sousa,

Engenheira-agrônoma, doutora em Fisiologia Vegetal, professora da Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM

Apresentação

A cultura do cajueiro no Nordeste brasileiro é de grande relevância na geração de emprego e renda, desde a produção no campo até a industrialização e comercialização da castanha e do pedúnculo.

O aproveitamento do pedúnculo pode ser para consumo in natura ou processado como matéria-prima para sucos, doces, refrigerantes, cajuína, entre outros. Porém, visando ao aspecto qualidade do produto, para obtenção de valor mais alto de mercado, é importante estudar a caracterização química, física e físico-química do pedúnculo do cajueiro, seus compostos bioativos e atividade antioxidante, para garantir o conhecimento dos teores de açúcar na polpa, da acidez, da adstringência, da coloração externa, do formato, do peso e da firmeza e dos seus componentes nutricionais e funcionais.

Apesar das técnicas laboratoriais para avaliação da qualidade pós-colheita serem rotineiras nos laboratórios de pesquisa, observa-se que há necessidade de protocolos detalhados e de fácil disponibilidade para aqueles que trabalham nesta área do conhecimento.

A Embrapa Agroindústria Tropical, que, por meio de seu Laboratório de Pós-colheita, tem desenvolvido trabalhos de pesquisa que envolvem avaliações da qualidade pós-colheita de flores, frutos e hortaliças, vem apresentar o presente documento com o objetivo de descrever as metodologias das análises físicas e físico-químicas, compostos bioativos e atividade antioxidante já estabelecidas e adotadas para pedúnculos de cajueiro.

Lucas Antonio de Sousa Leite

Chefe-Geral da Embrapa Agroindústria Tropical

Sumário

Introdução.....	6
Colheita dos pedúnculos	7
Avaliações físicas	8
Avaliações físico-químicas	12
Sólidos solúveis.....	13
pH e Acidez titulável.....	14
Relação Sólidos Solúveis/Acidez Titulável.....	18
Açúcares Totais	18
Avaliação de compostos bioativos	22
Vitamina C.....	22
Flavonóides Amarelos e Antocianinas	28
Carotenóides totais	30
Compostos fenólicos	32
Determinação da Atividade Antioxidante Total (AAT) pelo Método do ABTS	37
Resíduos das análises	41
Referências	41

Introdução

O Brasil é o maior produtor mundial do pedúnculo de cajueiro, seguido de Mali e Madagascar (FAO, 2012). O aproveitamento do pedúnculo para o consumo in natura, como produto principal de comercialização, oferece uma gama diversificada de produtos derivados, como sucos, doces, geleia, cristalizados, bebidas (cajuína, refrigerante gaseificado), glacê, dentre outros (Moura, 2004).

Os aspectos de qualidade são, naturalmente, os mais importantes para determinar a aceitabilidade comercial das frutas (Duch, 2001). A qualidade “ótima” de um produto hortícola pode ser considerada como aquela atingida num determinado grau de desenvolvimento e amadurecimento em que a combinação de atributos físicos e componentes químicos tem o máximo de aceitação pelo consumidor (Chitarra; Chitarra, 2005).

Para o pedúnculo destinado ao consumo in natura, a qualidade relaciona-se, principalmente, aos seguintes aspectos: teor de açúcar na polpa, adstringência, coloração externa, formato e firmeza, sendo este último bastante importante para um maior período de conservação do produto. Já para a industrialização, a qualidade do pedúnculo relaciona-se, principalmente, aos aspectos sensoriais (cor, “flavor”), à firmeza e ao seu valor nutricional (Lopes, 2011).

A importância de estudar a caracterização física e físico-química, compostos bioativos e atividade antioxidante do pedúnculo do caju decorre da grande participação deste produto no processo de desenvolvimento da agricultura de frutos tropicais no Nordeste brasileiro e do crescente mercado, não só para o consumo in natura, como também para a agroindústria de transformação, obtendo diversos produtos derivados de elevada importância econômica, nutricional e até funcional.

A avaliação da qualidade pós-colheita de frutos é uma prática rotineira em diversos laboratórios no Brasil e no mundo. Porém, apesar de rotineiro, não é incomum observar-se que, muitas vezes, os protocolos para avaliação da qualidade pós-colheita de uma determinada fruta ou hortaliça não estão detalhados e prontamente disponíveis, requerendo trabalho extra dos técnicos e estudantes envolvidos no processo para o levantamento das diferentes metodologias disponíveis para avaliação da qualidade do produto em questão (Moretti, 2006).

O presente trabalho tem como objetivo apresentar as metodologias empregadas no Laboratório de Pós-colheita da Embrapa Agroindústria Tropical para avaliação das características físicas e físico-químicas, dos compostos bioativos e da atividade antioxidante do pedúnculo do caju.

Colheita dos pedúnculos

Os pedúnculos do caju devem ser colhidos manualmente pela manhã, no estágio ideal de colheita (estádio 7 ou maduro) (Figura 1) (Tabela 1), segundo Lopes et al. (2011). O coletor deve estar com as mãos limpas ou usar uma luva para coleta, visando não danificar os pedúnculos.



Figura 1. Pedúnculos de caju anão precoce clone CCP 76 provenientes da Estação Experimental de Pacajus, CE. Da esquerda para direita, estágio de maturação 1 a 7.

Tabela 1. Escala subjetiva de avaliação da coloração externa dos cajus (pedúnculo e castanha) utilizada para indicar o estágio de maturação comercial de clones de cajueiro-anão⁽¹⁾.

Estádio de maturação	Clones alaranjados: CCP 76/CCP 09	Clones avermelhados: BRS 265/BRS 189
1	Pedúnculo verde/castanha verde	Pedúnculo verde/castanha verde
2	Pedúnculo verde/castanha madura e seca	Pedúnculo verde/castanha madura e seca
3	Pedúnculo verde claro/castanha madura e seca	Pedúnculo verde claro/castanha madura e seca
4	Pedúnculo com início de coloração amarela/castanha madura e seca	Pedúnculo com início de coloração laranja avermelhada/castanha madura e seca
5	Pedúnculo amarelo com início de cor laranja/castanha madura e seca	Pedúnculo laranja avermelhado com início de cor vermelha/castanha madura e seca
6	Pedúnculo laranja claro/castanha madura e seca	Pedúnculo vermelho claro/castanha madura e seca
7	Pedúnculo laranja escuro/castanha madura e seca	Pedúnculo vermelho escuro/castanha madura e seca

⁽¹⁾Fonte: Lopes (2011).

Realizar o transporte em caixas plásticas, com apenas uma camada de pedúnculos, forradas com espuma de 1 cm de espessura para proteção contra injúrias mecânicas (Figura 2).

Foto: Márcia Régia Souza da Silveira



Figura 2. Caixa para transporte de pedúnculos de caju.

Avaliações físicas

As avaliações físicas são realizadas no pedúnculo do caju in natura, no dia da colheita, assim que as amostras chegam ao laboratório. É feita uma seleção retirando-se os pedúnculos com batidas/injúrias/ferimentos, não sendo necessário lavá-los. As análises devem ser determinadas em amostras compostas por, pelo menos, 21 pedúnculos in natura, por planta, que devem ser avaliados individualmente. Os resultados das medições para cada amostra são submetidos ao cálculo da média e desvio padrão. Os parâmetros avaliados são: massa total, massa da castanha e massa do pedúnculo, diâmetro basal e apical, comprimento do pedúnculo, cor da película e firmeza da polpa. Após as análises físicas, os pedúnculos devem ser congelados o mais rápido possível, para serem utilizados, posteriormente, nas análises físico-químicas.

Massa total (castanha + pedúnculo) – Determinada por meio de balança semianalítica, com os resultados expressos em gramas (g).

Massa da castanha – A determinação da massa da castanha é a última análise física a ser realizada, por ser uma avaliação parcialmente destrutiva. O descastanhamento é realizado após o congelamento (-14 °C) total do pedúnculo do cajueiro. Esse procedimento evita que ocorra a perda de líquidos pelo ponto de interseção entre a castanha e o pedúnculo (hilo). Em seguida, a castanha é pesada com auxílio de uma balança semianalítica, e a sua massa é expressa em gramas (g).

Massa do pedúnculo – É obtida por diferença entre a massa total e a massa da castanha, expressa em gramas (g).

Diâmetro basal (próximo à castanha) (Figura 3A) e **apical** (lado oposto à castanha) e o **comprimento do pedúnculo** (Figura 3B) – Realizado com o auxílio de um paquímetro, sendo os resultados expressos em milímetros (mm).

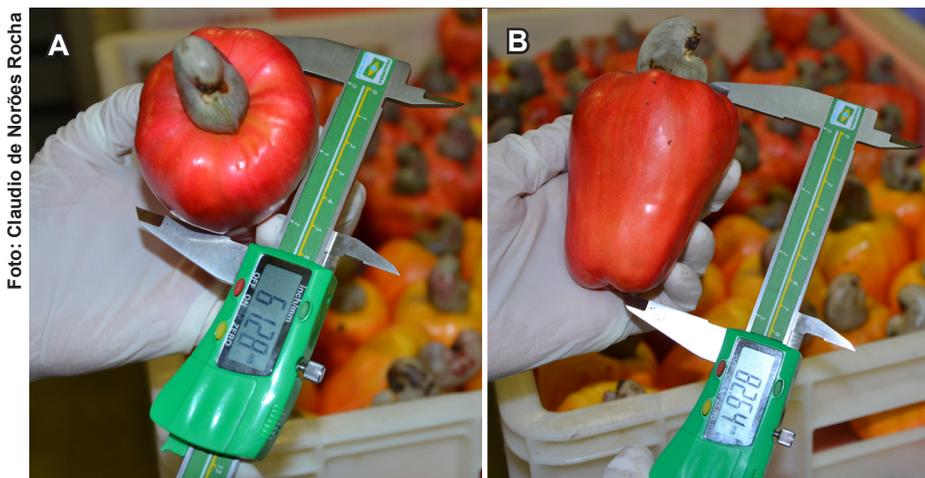


Figura 3. Medição do diâmetro basal (A) e do comprimento (B) do pedúnculo do caju com paquímetro digital.

Cor da película – A medida da cor da película é realizada por meio de um colorímetro digital (Colorímetro Minolta CR 400 ou CR410). Primeiramente, o aparelho é calibrado com uma placa de calibração branca (Figura 4A), fazendo-se a leitura dos parâmetros e valores indicados pelo fabricante

(para CR 410, $Y = 87,70$, $x = 0,3158$, $y = 0,3232$). Após a calibração, faz-se a mudança para os parâmetros adotados para leitura, que, no caso do pedúnculo do cajueiro, são luminosidade (L^*), cromaticidade (C^*) e ângulo Hue (h), que definem a cor, de acordo com a CIE (Commission Internationale de L'Eclairage), conforme metodologia descrita por McGuire (1992). Efetuam-se duas leituras na porção basal do pedúnculo, em pontos aproximadamente equidistantes, conforme a Figura 4B. A Figura 4C apresenta os valores da medição desses parâmetros para um pedúnculo de cajueiro. Após as leituras, limpa-se a placa de calibração branca e a lente do leitor do colorímetro com algodão ou papel macio embebido em álcool isopropílico p.a.

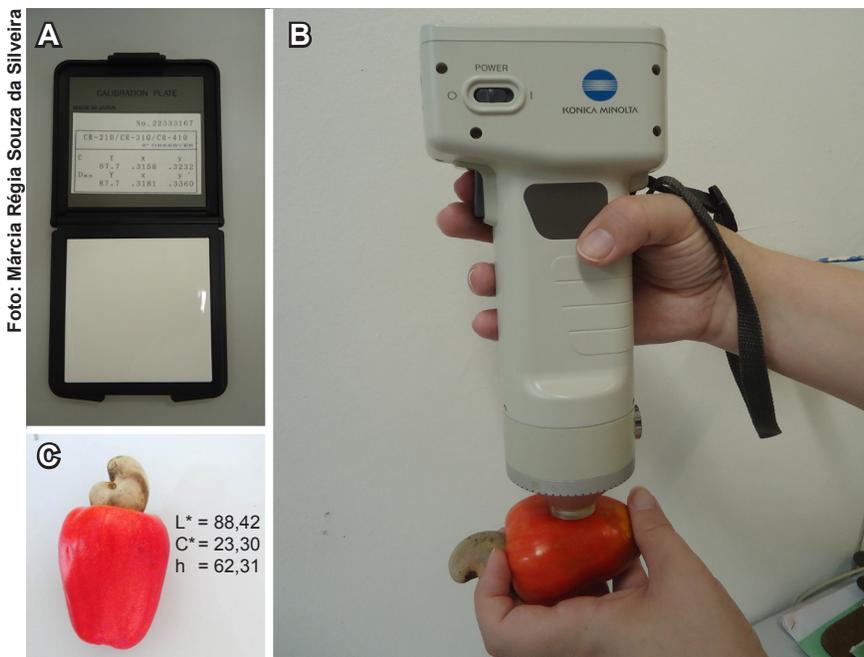


Figura 4. Placa de calibração branca (A). Leitura da cor da película (B) e valores dos parâmetros L^* , C^* , h para pedúnculo do caju.

Os valores para L^* (brilho, claridade ou reflectância) variam do preto, igual a 0, para o branco, igual a 100. Os valores para C^* (saturação ou intensidade da cor) variam de 0 a 60. Os valores para h (ângulo de tonalidade) variam de 0° correspondente à cor vermelha, 90° cor amarela, 180° cor verde, 270° cor azul, e passa de vermelho a negro em 360° (Figura 5).

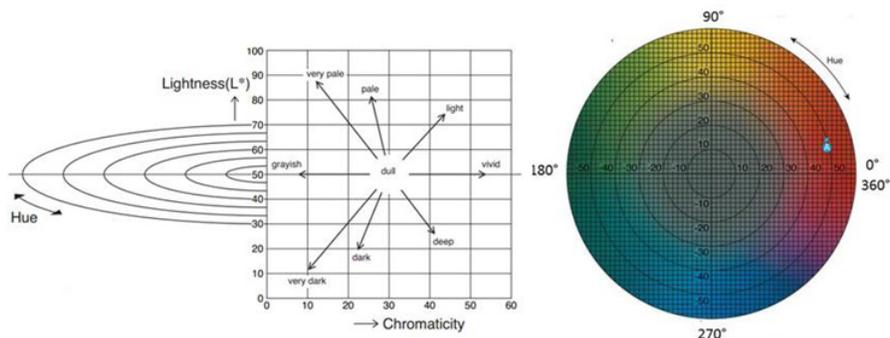


Figura 5. Representação do diagrama da Luminosidade vs Cromaticidade e da variação do ângulo Hue.

Fonte: Konica Minolta, 2016.

Firmeza da polpa – É determinada em pedúnculos íntegros, usando-se um penetrômetro manual (modelo FT 011, com ponteira plana, de 8 mm de diâmetro) (Figura 6). São feitas duas leituras por pedúnculo, em lados opostos, na porção basal. A ponteira do equipamento é inserida totalmente no pedúnculo e o valor indicado no registro, em quilogramas (kg) ou libras (lb), deve ser anotado e transformado em Newton (N), conforme Figura 7. A análise deve ser feita pelo mesmo operador para que não haja diferença na força exercida durante a penetração da ponteira no pedúnculo. Após o uso, a ponteira é retirada e limpa com água e detergente neutro.



Foto: Claudio de Norões Rocha

Figura 6. Medição da firmeza do pedúnculo do caju com penetrômetro manual.

1 libra-força (lbf) = 4,45 N

1 quilograma força (kgf) = 9,8 N

Figura 7. Cálculo de transformação de unidades de força.

Fonte: <http://www.conversaodeunidades.com/>

Avaliações físico-químicas

Para a realização das análises físico-químicas, cada amostra deve ser composta de, no mínimo, 21 pedúnculos, dividida em, pelo menos, sete repetições de 3 pedúnculos cada. Os resultados das medições para cada amostra são submetidos ao cálculo da média e desvio padrão. Os parâmetros avaliados são: Sólidos Solúveis (SS), pH, Acidez Titulável e Açúcares Totais.

Preparo das amostras

São utilizados pedúnculos in natura ou podem ser utilizados os pedúnculos congelados vindos das análises físicas. O descongelamento deve ser conduzido em temperatura ambiente (26 °C), no dia do processamento para obtenção da polpa. Os pedúnculos não devem ser descongelados sob refrigeração, em virtude do aumento de tempo de trabalho e da perda da qualidade do pedúnculo, que fica murcho e libera muito líquido. O descongelamento, para início do processamento, se dá em aproximadamente 120 min., após a retirada das amostras do *freezer*, devendo-se evitar retirar uma grande quantidade de amostra para o processamento, assim como evitar que o produto fique exposto por muito tempo na bancada, o que pode ocasionar fermentação.

Processamento dos pedúnculos

Os pedúnculos do caju, in natura ou descongelados, são pré-cortados e a polpa obtida por meio de uma centrífuga doméstica limpa (Figura 8). As polpas obtidas são acondicionadas em potes plásticos escuros e mantidas sob congelamento (aproximadamente -14 °C), para posterior avaliação das características físico-químicas. No dia das análises, um pote contendo a polpa deve ser descongelado, na posição vertical, em recipiente com água.

Após a retirada da quantidade de amostra necessária para as análises, o pote com amostra pode ser congelado novamente.

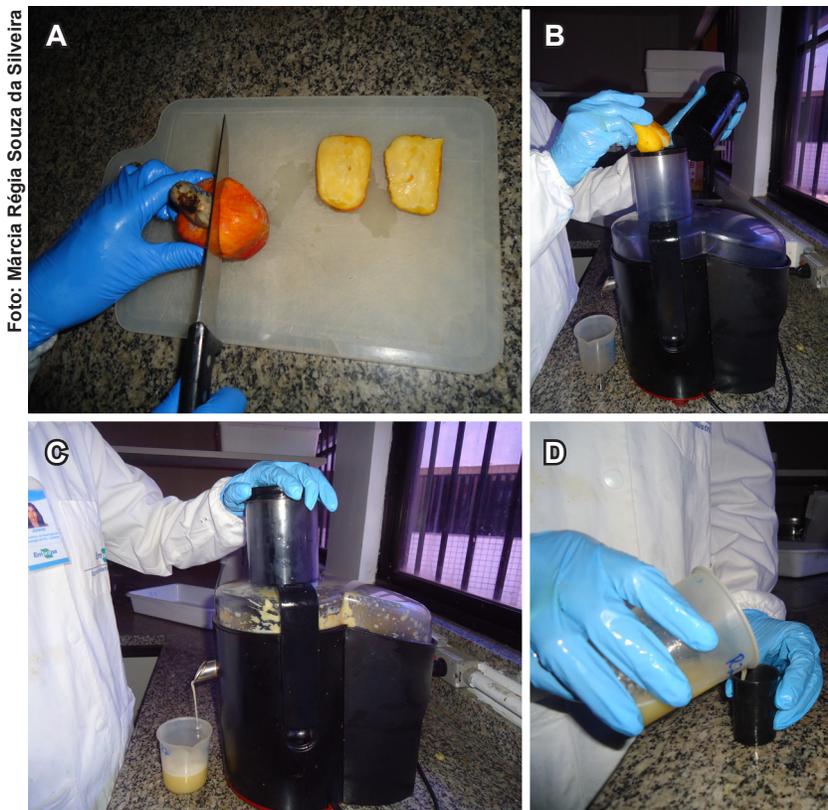


Figura 8. Etapas do processamento do pedúnculo do caju: Corte (A), Centrifugação e Obtenção da polpa (B e C) e Armazenamento da polpa (D).

Sólidos Solúveis (SS)

O teor de sólidos solúveis (SS) é medido por meio de um refratômetro. O resultado, expressos em °Brix, é utilizado como medida indireta do conteúdo de açúcares (85-90%), mas incluem também outras substâncias que se encontram dissolvidas no conteúdo celular, como vitaminas, fenólicos, pectinas e ácidos orgânicos (Alves, 2002; Chitarra; Chitarra, 2005). A metodologia é a recomendada pela AOAC (2005).

Procedimento de leitura

Inicialmente, o refratômetro deve ser calibrado, limpando-se com lenço de papel macio descartável a superfície do prisma do refratômetro, em seguida gotejando-se uma quantidade de água destilada suficiente para cobrir a superfície. Calibrar ou zerar o aparelho, conforme a indicação de cada aparelho. Após a calibração, a leitura da água deve ser de valor 0°Brix. Uma pequena quantidade de polpa é filtrada em papel de filtro qualitativo e gotejada sobre o prisma do refratômetro, em quantidade suficiente para cobrir a superfície (Figura 9). Sempre limpar o prisma com água destilada e secar com papel macio após a leitura de cada amostra. A polpa deve estar em temperatura ambiente (26 °C), caso o refratômetro não tenha compensação de temperatura. A leitura direta do resultado é expressa em °Brix.



Figura 9. Leitura do teor de sólidos solúveis em refratômetro digital de bancada.

Foto: Márcia Régia Souza da Silveira

pH e Acidez Titulável (AT)

O pH e a acidez titulável (AT) são os principais métodos usados para medir a acidez dos frutos. A acidez expressa o teor de ácidos orgânicos (ácido cítrico, ácido málico, ácido tartárico, etc.) presentes na amostra. Quando a concentração dos ácidos orgânicos totais declina, o pH da amostra aumenta (Chitarra; Chitarra, 2005). As análises seguem metodologia recomendada pela AOAC (2005).

Procedimento de leitura do pH

O pH é determinado diretamente na polpa, utilizando-se um potenciômetro com eletrodo com membrana de vidro (Figura 10). O equipamento deve ser calibrado uma vez a cada dia antes da análise, de acordo com as recomendações técnicas de cada aparelho. Para calibração são utilizadas soluções tampões com variação de pH, que podem ser de pH 4,00 e pH 7,00. Após cada leitura, lavar o eletrodo com água destilada e depois enxugar delicadamente com lenço de papel macio. Ao final do uso, o eletrodo deve ficar em repouso mergulhado em solução KCl 3 M.



Foto: Márcia Régia Souza da Silveira

Figura 10. Leitura do pH da polpa do pedúnculo do caju.

Preparo de soluções KCL 3 M (Cloreto de potássio p.a., CAS 7447-40-7)

Pesar 22,36 g de KCl, em balança analítica, e dissolver em 80 mL de água destilada, sob agitação. Transferir para balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com água destilada. Guardar em frasco plástico etiquetado, em temperatura ambiente (26 °C).

Preparo de soluções para análise de Acidez Titulável (AT)

O preparo das soluções deve ser feito em capela de exaustão. É necessário a utilização de EPIs, como óculos de proteção, luvas nitrílicas, sapato de segurança, respiradores faciais e jaleco.

Preparo de solução de NaOH 0,1 M (Hidróxido de sódio p.a., CAS 1310-73-2)

Pesar 4,0 g de NaOH, em balança analítica, e dissolver em 800 mL de água destilada, sob agitação. Transferir para balão volumétrico de 1.000 mL e completar o volume com água destilada. Guardar em temperatura ambiente (26 °C) por 1 mês, em frasco plástico etiquetado, e após refazer o cálculo do fator de correção. Para descartar a solução, armazenar em recipiente devidamente etiquetado e enviar ao GERELAB.

Preparo de solução de ácido oxálico 0,05 M (Ácido oxálico dihidratado p.a., $(\text{COOH})_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, CAS 6153-56-6)

Pesar 0,6303 g de ácido oxálico dihidratado e dissolver em 80 mL de água destilada, sob agitação. Transferir para balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com água destilada. Essa solução deve ser preparada no dia do uso, e após descartar em recipiente devidamente etiquetado e enviar ao GERELAB.

Preparo de solução de fenolftaleína 1% (Fenolftaleína p.a., $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{O}_4$, CAS 77-09-8)

Pesar 1,0 g de fenolftaleína e dissolver em 30 mL de álcool etílico 95% ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, CAS 64-17-5). Transferir para balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com álcool etílico 95%. Guardar em frasco conta-gotas etiquetado.

Determinação do fator de correção da solução de NaOH 0,1 M

Pipetar 5 mL da solução de ácido oxálico 0,05 M para Erlenmeyer de 125 mL, em triplicata, e adicionar 45 mL de água destilada, com auxílio de uma proveta de 50 mL. Adicionar 3 gotas de solução de

fenoltaleína 1% em cada Erlenmeyer e homogeneizar manualmente. Colocar a solução de NaOH 0,1 M em uma bureta de 10 mL, divisão 1/20, e ir gotejando cuidadosamente sobre a solução de ácido oxálico 0,1 N dentro do Erlenmeyer, sob agitação, até mudança da coloração de incolor para róseo-claro permanente. Anotar os valores dos volumes de NaOH 0,1 M gastos e calcular o fator por meio da fórmula abaixo. O cálculo do fator também deve ser feito mensalmente e pode variar de 0,90 a 1,0. O resíduo dessa análise pode ser descartado direto na pia.

Cálculo do fator de correção do NaOH

$$\text{Fator} = \frac{\text{Conc. sol. ác. oxálico} \times \text{vol. gasto sol. ác. oxálico}}{\text{Conc. sol. NaOH} \times \text{vol. gasto sol. NaOH}}$$

Preparo da amostra para análise de Acidez Titulável (AT)

Pesar 1 g da polpa de pedúnculo do cajueiro em Erlenmeyer de 125 mL, em duplicata, e adicionar 50 mL de água destilada, com auxílio de uma proveta. Adicionar 3 gotas de solução de fenoltaleína 1% em cada Erlenmeyer e homogeneizar manualmente. Colocar a solução de NaOH 0,1 M em uma bureta de 10 mL, divisão 1/20, e ir gotejando, cuidadosamente, dentro do Erlenmeyer contendo a polpa e a água, até mudança da coloração de incolor para róseo-claro permanente. Anotar o volume gasto em cada titulação e proceder aos cálculos. Os resultados são expressos em porcentagem de ácido málico, segundo (AOAC, 2005) (Figura 11). O resíduo dessa análise pode ser descartado direto na pia.



Foto: Márcia Régia Souza da Silveira

Figura 11. Análise de acidez titulável de pedúnculo do cajueiro por titulação manual.

Cálculo de Acidez Titulável (AT)

$$\% \text{ de ác. málico} = \frac{\text{Vol. gasto de NaOH } 0,1\text{M (mL)} \times \text{Fator de correção NaOH } 0,1\text{M} \times \text{Fator do ác. málico (0,06705)} \times 10}{\text{Peso da amostra (g)}}$$

Relação Sólidos Solúveis / Acidez titulável (SS/AT)

A relação SS/AT indica o grau de doçura de um fruto ou de seu produto, evidenciando qual o sabor predominante, o doce ou o ácido, ou ainda se há equilíbrio entre eles (Lopes, 2011). O valor da relação é obtido pela divisão entre essas duas variáveis.

Açúcares totais

A determinação dos açúcares totais segue o método da antrona, segundo Yemn e Willis (1954). É um método específico para hexoses e consiste na hidrólise pelo ácido sulfúrico concentrado, que quando aquecido com hexoses sofre uma reação de condensação, formando um produto de coloração verde e lida no espectrofotômetro a 620 nm.

Preparo de soluções para análise de Açúcares totais

Todos os procedimentos realizados com a antrona, como o preparo da solução, a realização da análise e a neutralização da solução, devem ser feitos em capela de exaustão. É necessária a utilização de EPIS, como óculos de proteção, luva nitrílica, sapato de segurança, respirador com filtro para gases ácidos e jaleco de mangas compridas.

Preparo da solução padrão de glicose (C₆H₁₂O₆ p.a., CAS 492-62-6)

Pesar 100 mg de glicose em balança analítica e dissolver em 100 mL de água destilada, sob agitação. Transferir para balão volumétrico de 1.000 mL e completar o volume com água. A solução deve ser preparada no dia do uso e após pode ser descartada em pia.

Preparo da solução do reagente Antrona p.a. (reagente ACS, C₁₄H₁₀O p.a., CAS 90-44-8)

Pesar 200 mg de antrona em um béquer de 250 mL e ir dissolvendo com ácido sulfúrico (H₂SO₄) p.a., 95 a 98% (CAS 7664-93-9). Transferir para balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com H₂SO₄.

Obs.: manter a solução em frasco âmbar com dispensador de 1-10 mL, ao abrigo da luz e sob refrigeração (aproximadamente 4 °C). A solução permanece estável por 3 semanas. Após, repetir a curva e avaliar a estabilidade. O descarte deve ser feito após neutralização com solução de carbonato de sódio anidro, na proporção de 200 g/L para cada 100 mL de ácido.

Procedimento para realização da curva padrão de glicose

Retirar alíquotas de 100, 200, 300 e 400 µL da solução padrão de glicose e transferir para tubo de ensaio com tampa, em duplicata, e completar com água destilada para 1 mL, conforme Tabela 2, abaixo. Colocar 2 mL do reagente de antrona nos tubos de ensaio, em banho de gelo, agitar cada tubo em agitador de tubos, e após colocá-los em banho-maria fervente por 8 minutos. Após, esfriar em banho de gelo, retirar e deixar ficarem em temperatura ambiente, colocar em cubetas (poliestireno, vidro ou quartzo) e ler a absorbância em espectrofotômetro a 620 nm. Zerar o espectrofotômetro com o branco (1 mL de água destilada + 2 mL de antrona).

Tabela 2. Quadro demonstrativo para análise de açúcares totais pelo método da antrona.

Tubos	Massa de glicose (µg)	Volume da solução padrão (µL)	Volume de água (µL)	Volume da solução de antrona (mL)
P1 (Branco)	0	0	1.000	2
P2	10	100	900	2
P3	20	200	800	2
P4	30	300	700	2
P5	40	400	600	2

Nos equipamentos de espectrofotômetro que só podem ser feitas leituras simples de absorvância, fazer a leitura, plotar os valores de absorvância no eixo y e os valores de massa de glicose no eixo x, fazer o gráfico, adicionar a linha de tendência e obter a equação da reta. O coeficiente R^2 deve ser superior a 0,98. Essa equação será usada para se obter os valores de açúcares totais em % ($\mu\text{g}/100 \mu\text{g}$) (Figura 12). Nos equipamentos que trazem um software com leitura de concentração, os dados obtidos são salvos como curva padrão de glicose para as leituras posteriores das amostras.

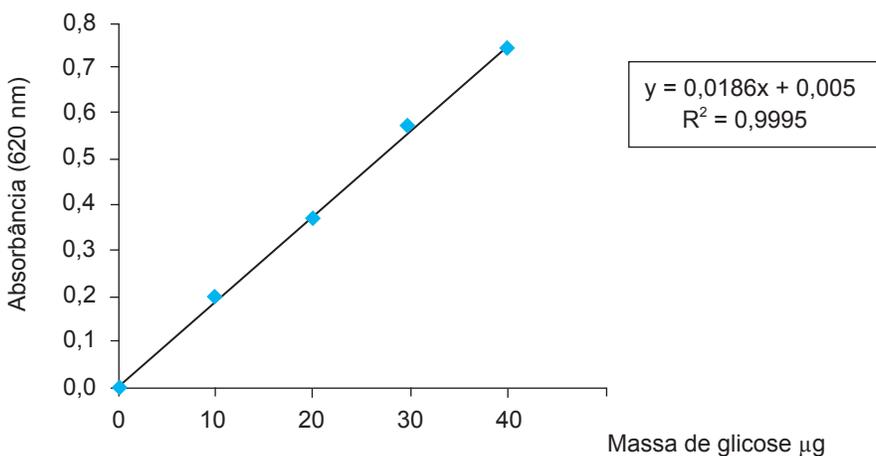


Figura 12. Gráfico demonstrativo da curva padrão de glicose.

Preparo do extrato da amostra para realização da análise

Pesar 2 g da amostra em um béquer de 50 mL, adicionar água destilada para dissolver a amostra. Transferir para um balão volumétrico de 100 mL e aferir para o volume final com água destilada. Filtrar a solução em papel de filtro e armazenar em um pote plástico. Esse extrato da amostra pode ser guardado sob congelamento (aproximadamente $-14 \text{ }^\circ\text{C}$) por até 1 mês.

Procedimento de leitura do extrato da amostra

Em tubo de ensaio com tampa, em duplicata, pipetar com micropipeta $100 \mu\text{L}$ do extrato e adicionar $900 \mu\text{L}$ de água destilada. Proceder como no preparo

e leitura da curva padrão de glicose (Figura 13). É preciso observar que a diferença dos valores de absorbância entre as duplicatas não deverá ser maior que 0,020.

Observação: Primeiramente, deve-se fazer um teste com a amostra para definir a concentração (peso da polpa e volume do balão) e a alíquota do extrato a ser utilizada, para ajustar os valores de massa da amostra aos valores correspondentes a aproximadamente 20 μg de glicose, na curva padrão.

Foto: Márcia Régia Souza da Silveira

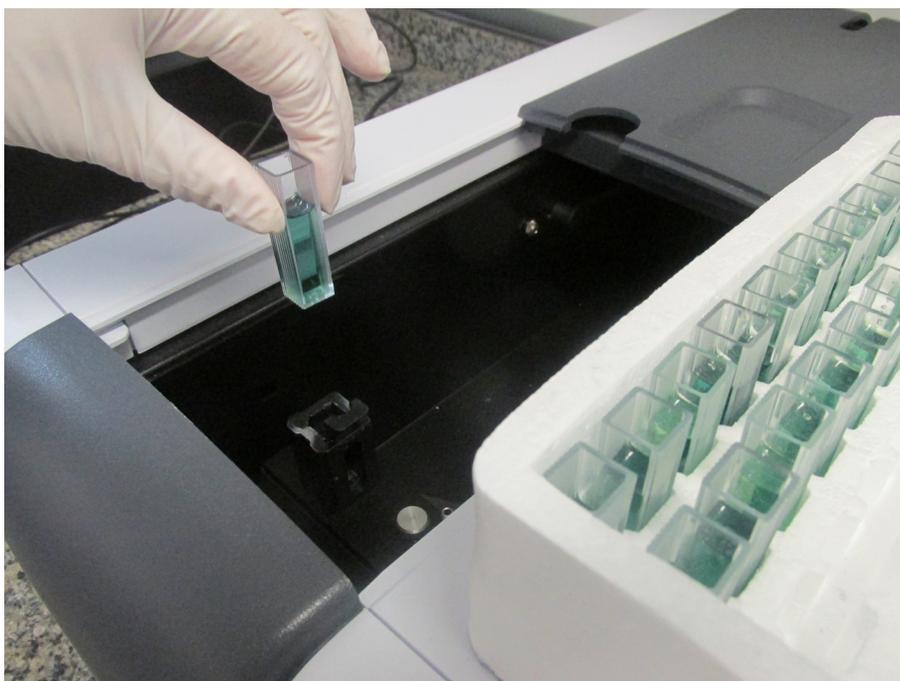


Figura 13. Leitura da análise de açúcares totais em espectrofotômetro.

Cálculos para obtenção do resultado final de açúcares totais em % ($\mu\text{g}/100 \mu\text{g}$)

Os cálculos manuais com a equação da reta da curva padrão só são utilizados nos equipamentos que não trazem software com leitura de concentração.

$$y = ax + b \text{ (equação da reta)}$$

Onde:

Y = absorvância

X = massa da amostra (μg)

Cálculo

Peso da amostra (g) – Volume do balão (100 mL)

P (g) – Alíquota do extrato (0,100 mL)

Resultado = P g da amostra

$$= P \text{ g} \times 10^6 = P \mu\text{g de amostra}$$

P μg amostra _____ x (valor da massa obtida pela curva padrão)

100 μg amostra _____ R (resultado em % de açúcares totais na amostra)

Análises de Compostos Bioativos

Vitamina C (ácido ascórbico e vitamina C total)

O ácido ascórbico e a vitamina C total (ácido ascórbico + ácido dehidroascórbico) são determinados por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC). O procedimento empregado para determinação da Vitamina C total é a redução do ácido dehidroascórbico a ácido ascórbico, usando-se DL-ditiotreitol como agente redutor, de acordo com modificações no procedimento de Sánchez-Mata et al. (2000).

Preparo de soluções para análise de vitamina C

Todos os procedimentos realizados, como o preparo das soluções e o preparo das amostras, devem ser feitos em capela de exaustão. É necessária a utilização de EPIs como: óculos de proteção, luva nitrílica, sapato de segurança, respirador com filtro para gases ácidos e jaleco de mangas compridas.

Preparo da solução extratora de ácido acético p.a. (8% v/v) e ácido metafosfórico p.a. (3% m/v) (Ácido acético p.a. $C_2H_4O_2$, CAS 64-19-7; Ácido metafosfórico, HO_3P , CAS 37267-86-0)

Medir 40 mL de ácido acético p.a. ($D = 1,05 \text{ g/cm}^3$; pureza = 99%) em uma proveta de 50 mL e reservar. Pesar 15 g de ácido metafosfórico (pureza = 33,5 a 36,5%) e dissolver em 100 mL de água destilada em um béquer. Transferir o ácido acético p.a. reservado e a solução de ácido metafosfórico para um balão volumétrico de 500 mL e completar com água destilada. Para descartar a solução, armazenar em recipiente devidamente etiquetado e enviar ao Laboratório de Gerenciamento de Resíduos (GERELAB).

Preparo de ácido sulfúrico p.a. (0,01% v/v) (H_2SO_4 , CAS 7664-93-9) para fase móvel do HPLC

Transferir 0,1 mL de H_2SO_4 p.a. ($D = 1,84 \text{ g/cm}^3$; pureza = 95 a 98%), com auxílio de uma pipeta graduada, para um balão volumétrico contendo uma quantidade de água destilada e completar para 1.000 mL com água destilada. Para descartar a solução, armazenar em recipiente devidamente etiquetado e enviar ao Laboratório de Gerenciamento de Resíduos (GERELAB).

Preparo da solução redutora de DL 1,4-ditiotreitrol (20 mg/mL) (DTT, $C_4H_{10}O_2S_2$, CAS 3483-12-3)

Pesar em um béquer 660 mg de ditiotreitrol p.a. e a este adicionar 33 mL de água destilada e homogeneizar com um bastão de vidro. Transferir esta solução para um frasco Erlenmeyer âmbar ou envolvido em papel alumínio. Reservar.

Preparo de amostras para determinação de ácido ascórbico e vitamina C total

Nessa etapa, todos os tubos Falcon, os frascos de Eppendorf e os *vials* devem ser de cor âmbar ou estarem recobertos de papel alumínio, para obter ambiente com redução da luminosidade, evitando a oxidação do ácido ascórbico.

Preparo da amostra para determinação de ácido ascórbico

Pesar, em tubo de Falcon de 50 mL, 5 g da polpa de caju. Com o auxílio de uma proveta, adicionar a estes tubos 20 mL da solução extratora de ácido acético p.a. (8% v/v) e ácido metafosfórico p.a. (3% m/v) e homogeneizar. Ajustar o volume do tubo para 50 mL com água destilada e homogeneizar novamente. Deixar em repouso por 5 minutos para que a extração ocorra e para que o sólido em suspensão precipite. Após, retirar, com auxílio de uma pipeta ou seringa plástica, uma alíquota de 3 mL do tubo e transferir para um vial de 2 mL, filtrando em membrana de Nylon de 0,45 μm . Levar o vial para ser injetado no HPLC. Os resultados são obtidos por comparação do tempo de retenção e a área do pico de absorção a 245 nm com os valores de uma curva padrão de ácido ascórbico. Os valores são expressos em mg de ácido ascórbico por 100 g de polpa de fruta fresca.

Preparo da amostra para determinação de vitamina C total

Adicionar a frascos de Eppendorf de 2 mL, 0,25 mL da mistura preparada na etapa anterior para extração de ácido ascórbico (suco de caju adicionado da solução extratora) e 1,5 mL da solução redutora de ditiotreitrol (20 mg/mL). Homogeneizar. Colocar os tubos em uma bandeja coberta com papel alumínio e deixar em descanso por 2 horas para que a reação de redução aconteça. Após 2 h, transferir o conteúdo do tubos, com auxílio de uma seringa de 5 mL, filtrando em membrana de Nylon de 0,45 μm , para *inserts* (200 μL) redutores de volumes, os quais serão inseridos em *vials*. Entre as filtragens das diferentes amostras, o filtro pode ser reutilizado, lavando-se em água destilada pura (pelo menos 3 vezes) e depois drenando toda água residual para que sua amostra não seja diluída por qualquer água que fique embebida no filtro. Além disso, a seringa deve ser seca com o auxílio de papel adsorvente entre as filtragens, também para evitar a diluição das amostras. Esta etapa é muito importante e deve ser realizada com cuidado, pois o volume a ser filtrado é pequeno. Após, levar os *vials* para serem injetados no HPLC. Os resultados são obtidos por comparação do tempo de retenção e a área do pico de absorção a 245 nm com os valores da curva padrão de ácido ascórbico. Os valores são expressos em mg de vitamina C total por 100 g de polpa de fruta fresca.

Preparo da curva de calibração

Preparo da solução de padrão de ácido ascórbico 500 ppm (C₆H₈O₆, CA 50-81-7)

Pesar 25 mg de ácido ascórbico p.a. e dissolver em pequena quantidade de água destilada. Transferir analiticamente para balão volumétrico de 50 mL e completar o volume com água destilada. Homogeneizar bem a solução para a completa dissolução do padrão analítico. Em seguida, faça sucessivas diluições de acordo com a Tabela 3, abaixo, para cada ponto da curva. Transferir cada ponto para vials e levar para injeção no HPLC. A partir da área de cada ponto da curva, construir a curva de calibração com o auxílio de planilha eletrônica Excel, calculando-se a equação da reta (Figura 14).

$$y = ax + b \text{ (equação da reta)}$$

Tabela 3. Quadro demonstrativo para preparo da curva padrão de ácido ascórbico.

Concentração final ácido ascórbico mg/L	Volume da solução padrão (mL)	Volume de água destilada (mL)
450	9	1
400	8	2
350	7	3
300	6	4
200	4	6
100	2	8
75	1,5	8,5
50	1	9

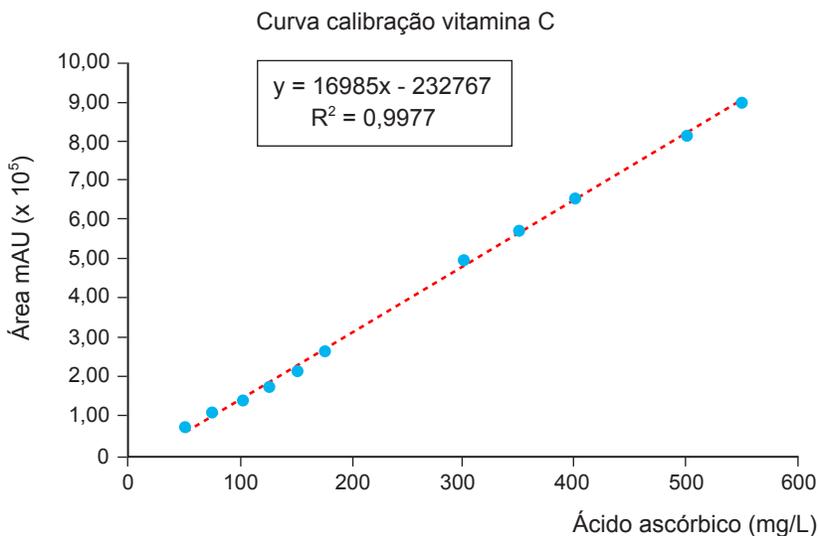


Figura 14. Gráfico demonstrativo da curva padrão de ácido ascórbico e da equação da reta.

Procedimento cromatográfico

As amostras preparadas são submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com coluna tipo C18 (C18 Hypersil ODS stainless) de 25 cm, 4,6 mm de diâmetro interno e 5 μm de tamanho de partículas, com detecção no comprimento de onda de 190 a 400 nm, empregando um volume de 10 μL com uma taxa de fluxo de 1 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ e forno a 30 $^{\circ}\text{C}$. A eluição é realizada no modo isocrático com o solvente A (água com ácido sulfúrico 0,01%) como fase móvel, que é impelido pela coluna durante 10 minutos. Em seguida, é realizada uma limpeza da coluna com o solvente B (Metanol grau HPLC) durante 5 minutos e o equilíbrio da coluna, durante outros 5 minutos. O tempo de corrida de cada amostra é de 17 minutos. Utilizando-se a equação da reta da curva padrão, onde Y é a área encontrada e X é a concentração em mg/L, calcular a concentração de ácido ascórbico e vitamina C total em mg por 100 g de polpa.

Cálculos para obtenção do resultado final de ácido ascórbico (AA) (mg. 100 g⁻¹) e vitamina C total (mg. 100 g⁻¹)

$$y = ax + b \text{ (equação da reta)}$$

Onde:

Y = Área

X = concentração da amostra (mg/L)

Cálculo do ácido ascórbico (AA)

X (concentração em mg/L) — 1.000 mL

_____ (mg) — 50 mL

Resultado = _____ mg de ácido ascórbico

_____ mg — 5 g (peso da polpa)

AA — 100 g

Resultado AA = _____ mg . 100 g⁻¹ de polpa

Cálculo da Vitamina C total

X (concentração em mg/L) — 1.000 mL

_____ (mg) — 50 mL

Resultado = _____ mg

_____ mg — 5 g (peso da polpa)

V — 100 g

V = 88 mg . 100 g⁻¹ de polpa

Vitamina C total = V * 7 = _____ mg . 100 g⁻¹ de polpa

Flavonoides Amarelos e Antocianinas

As antocianinas são extraídas segundo metodologia descrita por Francis (1982), que utiliza como solvente extrator uma solução etanol-HCl. Como as antocianinas têm caráter polar, solventes polares como etanol e metanol podem ser utilizados; porém, etanol tem sido preferido pela baixa toxicidade, apesar de apresentar uma menor capacidade de extração. Com o intuito de aumentar a eficiência, adiciona-se ácido em baixa concentração (HCl <1%) à solução extratora, aumentando a capacidade de destruir as membranas celulares e facilitando a extração dos compostos do interior da célula (Castañeda-Ovando et al., 2009; Kajdzanoska; Petreska; Stefova, 2011; Kong, 2003).

Preparo de soluções e preparo da amostra

Todos os procedimentos realizados com o ácido clorídrico p.a., como o preparo das soluções, a realização da análise e a neutralização das soluções, devem ser feitos em capela de exaustão. É necessária a utilização de EPIs, como óculos de proteção, luva nitrílica, sapato de segurança, respirador com filtro para gases ácidos e jaleco de mangas compridas.

Preparo da solução de HCl 1,5 M (ácido clorídrico p.a., CA 7647-01-0)

Medir 62,10 mL de HCl p.a. (D = 1,19 kg/L; pureza = 37%) em uma proveta, transferir para balão volumétrico de 500 mL, contendo uma quantidade de água, e aferir o volume com água destilada. Para descartar a solução, armazenar em recipiente devidamente etiquetado e enviar ao Laboratório de Gerenciamento de Resíduos (GERELAB).

Preparo da solução de etanol-HCl 1,5 M (Etanol p.a., CA 64-17-5)

Em um balão volumétrico de 1000 mL, colocar 500 mL de etanol p.a. ($\geq 95\%$). Em seguida, adicionar 15 mL da solução HCl 1,5 M. Aferir o volume com etanol p.a. ($\geq 95\%$). Para descartar a solução, armazenar em recipiente

devidamente etiquetado e enviar ao Laboratório de Gerenciamento de Resíduos (GERELAB).

Procedimento para realização da análise

Para antocianinas, pesar 1 g de película do pedúnculo do caju ou da polpa do caju. Para flavonoides amarelos, pesar 1 g da polpa. Em seguida, adicionar aproximadamente 30 mL da solução de etanol-HCL (1,5 M) e homogeneizar em um agitador mecânico de tecidos (tipo Turrax) por 2 min na rotação aproximada de 7.000 rpm. Depois, transferir o conteúdo para um balão volumétrico de 50 mL (sem filtrar) envolto em papel de alumínio, completando-se para o volume final com a solução etanol-HCL (1,5 M). Deixar descansando por uma noite na geladeira. Filtrar o material para um béquer, sempre envolto com papel alumínio. Proceder, logo em seguida, à leitura da absorbância no espectrofotômetro em um comprimento de onda de 535 nm para antocianinas e 374 nm para flavonoides amarelos. O branco é composto da solução de etanol-HCL (1,5 M). Todo o procedimento é feito em ambiente com redução da luminosidade (Figura 15).

Foto: Márcia Régia Souza da Silveira

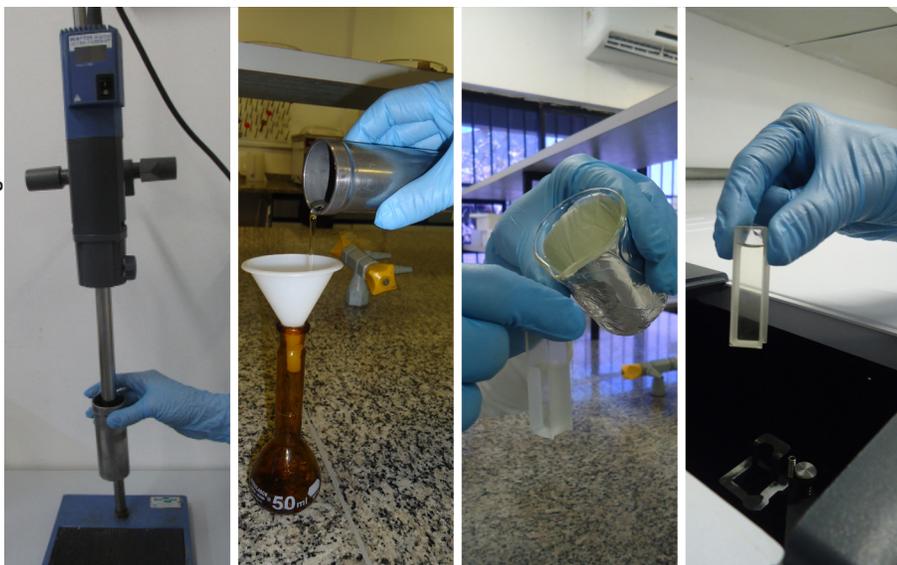


Figura 15. Etapas da análise de antocianinas e flavonoides amarelos.

Cálculos para obtenção do resultado final de antocianinas e flavonoides amarelos (mg/100 g)

Antocianinas = (Valor da Absorbância 535 nm x fator de diluição) / 98,2

Flavonoides amarelos = (Valor da Absorbância 374 nm x fator de diluição) / 76,6

Cálculo do Fator de diluição

Peso da amostra: 1,00 g

Volume do balão: 50 mL

1,00 g — 50 mL

100 g — Fator de diluição

Fator de Diluição = 5.000

Carotenoides totais

De acordo com o método recomendado por Higby (1962), determina-se a quantidade de carotenoides totais utilizando-se uma mistura de solventes: álcool isopropílico-hexano, em que os carotenoides totais são extraídos pela camada de hexano e o álcool isopropílico é adicionado para obtenção da fase única. A leitura da absorbância é feita em espectrofotômetro a 450 nm.

Realização da análise

Todo o procedimento é feito em ambiente com baixa luminosidade em capela de exaustão. É necessária a utilização de EPIs, como óculos de proteção, luva nitrílica, sapato de segurança, respirador com filtro para vapores orgânicos e jaleco de mangas compridas.

Procedimento para realização da análise

Pesar 4 g de polpa do pedúnculo de cajueiro, adicionar 30 mL de álcool isopropílico p.a. ((CH₃)₂CHOH, CAS 67-63-0), mais 10 mL de hexano p.a.

($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$, CAS 110-54-3) e em seguida agitar esse material por 1 min em agitador mecânico (tipo turrax) na rotação aproximada de 7.000 rpm. Transferir o conteúdo para um funil de separação de 125 mL âmbar ou transparente envolto em papel alumínio, completar o conteúdo com água destilada e deixar descansar por 30 min. Após esse período, fazer a lavagem do material, abrindo a torneira do funil e eliminando a parte aquosa do conteúdo. Completar novamente o conteúdo do funil com água destilada e deixar descansar por mais 30 minutos. Após três descansos de 30 min cada, filtrar o conteúdo em um balão volumétrico de 50 mL envolto em papel alumínio. Adicionar ao balão, 5 mL de acetona p.a. (CH_3COCH_3 , CAS 67-64-1) e completar para o volume final com hexano p.a. O branco é composto de 5 mL de acetona p.a. e 45 mL de hexano p.a. e a leitura é feita em espectrofotômetro em comprimento de onda de 450 nm (Figura 16).

Foto: Márcia Régia Souza da Silveira



Figura 16. Etapas da análise de carotenoides totais.

Cálculos do resultado da análise de carotenoides totais (mg .100⁻¹g)

$$\text{Carotenoides totais} = \frac{A_{450} \times 100}{250 \times L \times W}$$

Essa equação baseia-se na Lei de Lambert Beer

Onde:

A_{450} = absorvância medida em 450 nm

L = largura da cubeta em cm

W = quociente entre a massa da amostra (g) e volume final da diluição (mL).

Compostos fenólicos

O método espectrofotométrico que utiliza o reagente Folin-Ciocalteu foi inicialmente desenvolvido por Folin (1927) para determinação de tirosina. O reagente consiste de uma mistura de ácido fosfomolibdico, tungstato de sódio e outros reagentes como ácido ortofosfórico e ácido clorídrico. O método é baseado em uma reação de oxidação-redução em condições alcalinas, em que o íon fenolato é oxidado, enquanto o reagente de Folin é reduzido. Após a reação com fenóis, uma cor azul é produzida, com absorção em 700 nm (Everette et al., 2010). O preparo do extrato é feito segundo Larrauri, Ruperez e Saura-Calixto (1997), e a leitura dos compostos fenólicos segue o método apresentado por Obanda e Owuor (1997).

Realização da análise

Todo o procedimento é feito em ambiente com baixa luminosidade em capela de exaustão. É necessária a utilização de EPIs, como óculos de proteção, luva nitrílica, sapato de segurança, respirador com filtro para vapores orgânicos e gases ácidos e jaleco de mangas compridas.

Preparo de solução de metanol p.a. 50% (CH₃OH, CAS 67-56-1)

Medir, em uma proveta, 500 mL de álcool metílico p.a. e diluir para 1.000 mL com água destilada, em um balão volumétrico. Homogeneizar e transferir para frasco de vidro devidamente etiquetado e fechado. Armazenar em temperatura ambiente (26 °C). Validade de 1 mês. Para descartar a solução, armazenar em recipiente devidamente etiquetado e enviar ao Laboratório de Gerenciamento de Resíduos (GERELAB).

Preparo de solução de acetona p.a. 70% (CH₃COCH₃, CAS 67-64-1)

Medir, em uma proveta, 700 mL de acetona p.a. e diluir para 1000 mL com água destilada, em um balão volumétrico. Homogeneizar e transferir para frasco de vidro devidamente etiquetado e fechado. Armazenar em temperatura ambiente (26 °C). Validade de 1 mês. Para descartar a solução, armazenar em recipiente devidamente etiquetado e enviar ao Laboratório de Gerenciamento de Resíduos (GERELAB).

Preparo de solução de Reativo Fenol Folin Ciocalteu (1:3)

Medir, em uma proveta, 12,5 mL do reativo Fenol Folin Ciocalteu e transferir para um balão volumétrico de 50 mL, completando-se o volume final com água destilada. Homogeneizar e transferir para frasco âmbar ou coberto com papel alumínio, devidamente etiquetado e fechado. Armazenar em temperatura ambiente (26 °C) por até 1 mês.

Obs. 1: o Reativo Fenol Folin Ciocalteu pode ser usado puro ou diluído, dependendo da marca do reagente. Fazer primeiro um teste para verificar se precisa de diluição.

Obs. 2: uma nova curva deverá ser feita quando for preparada uma nova solução de Folin Ciocalteu. Para descartar a solução, armazenar em recipiente devidamente etiquetado e enviar ao Laboratório de Gerenciamento de Resíduos (GERELAB).

Preparo da solução de carbonato de sódio anidro p.a. 20% (Na₂CO₃, CAS 497-19-8)

Aquecer em um béquer aproximadamente 800 mL de água destilada até 70-80 °C. Pesar 200 g de Carbonato de sódio anidro p.a. e dissolver na

água destilada previamente aquecida. Deixar descansar durante 12 horas e transferir filtrando para um balão volumétrico de 1.000 mL. Completar o volume com água destilada, homogeneizar e transferir para frasco plástico devidamente etiquetado em temperatura ambiente (26 °C). Validade de 1 mês.

Obs.: Uma solução de ácido cítrico 0,4 % ($\text{HOC}(\text{COOH})(\text{CH}_2\text{COOH})_2$, CAS 77-92-9) deve ser utilizada para lavar previamente todo o material que entrou em contato com carbonato de sódio, assim como para neutralização dos resíduos produzidos.

Preparo de solução padrão de ácido gálico p.a. (HO)₃ $\text{C}_6\text{H}_2\text{CO}_2\text{H.H}_2\text{O}$, CAS 5995-86-8)

Pesar 5 mg de ácido gálico monohidratado p.a. e dissolver em pequena quantidade de água destilada. Transferir analiticamente para balão volumétrico âmbar de 100 mL e completar o volume com água destilada. Homogeneizar.

Obs. 1: verificar se o ácido gálico é monohidratado; se não for, fazer as alterações no valor pesado para o preparo da solução padrão.

Obs. 2: a solução de ácido gálico deve ser preparado no dia da análise e descartada após essa análise. O resíduo gerado deve ser transferido para frasco devidamente identificado e encaminhado ao Gerelab (Laboratório de Gestão de Resíduos) para descarte adequado.

Procedimento para preparo da curva padrão de ácido gálico

Conforme Tabela 4 abaixo, transferir, com auxílio de micropipeta, alíquotas de 0, 200, 400, 600, 800 e 1.000 μL da solução padrão de ácido gálico, em duplicata, para tubo de ensaio. Completar para 1.000 μL com água destilada (1.000 μL , 800 μL , 600 μL , 400 μL , 200 μL , 0 μL , respectivamente). Adicionar a cada tubo, na seguinte sequência, 1 mL de reativo de Reativo Fenol Folin Ciocalteu, 2 mL de solução de carbonato de sódio anidro 20% e 2 mL de água destilada. Homogeneizar bem cada tubo em agitador de tubos e deixar em repouso por 30 minutos, em temperatura ambiente (26 °C) e ambiente com redução da luminosidade (Figura 17).

Tabela 4. Quadro demonstrativo para preparo da curva padrão de ácido gálico.

Massa de ácido gálico (µg)	Volume do padrão de ácido gálico (µL)	Volume de água destilada (µL)	Volume da solução de Follin Ciocalteu (mL)	Volume da solução de carbonato de sódio anidro 20% (mL)	Volume da água destilada (mL)
0	0	1.000	1	2	2
10	200	800	1	2	2
20	400	600	1	2	2
30	600	400	1	2	2
40	800	200	1	2	2
50	1.000	0	1	2	2

Foto: Márcia Régia Souza da Silveira

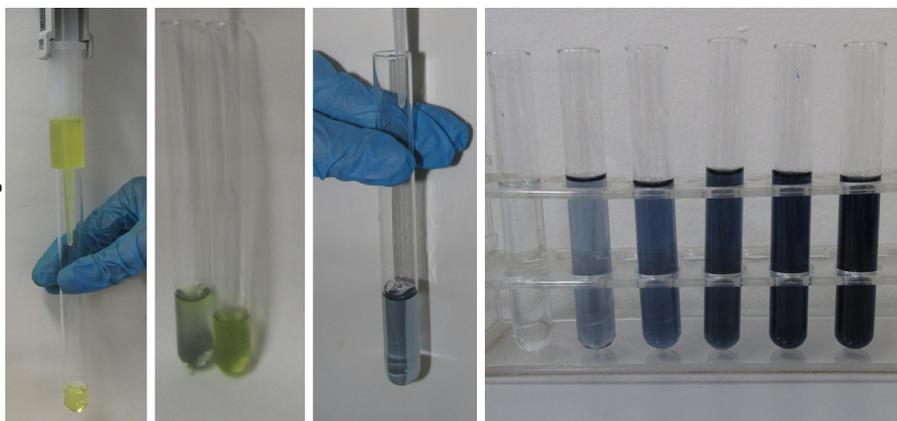


Figura 17. Etapas da análise de compostos fenólicos e curva de ácido gálico.

Procedimento para leitura da curva padrão de ácido gálico

Em ambiente de baixa luminosidade, transferir as amostras dos tubos de ensaio para cubetas de poliestireno com capacidade de 3-4 mL. As leituras devem ser feitas em espectrofotômetro a 700 nm, sendo utilizado como branco do aparelho, a solução do tubo 1 da curva padrão (0 ug de ácido gálico). Nos equipamentos de espectrofotômetro que só podem ser feitas leituras simples

de absorvância, em uma planilha eletrônica, fazer a leitura das absorvâncias e plotar esses valores no eixo Y e os valores de massa de ácido gálico (ug) no eixo X. Fazer o gráfico, adicionar a linha de tendência e obter a equação da reta. O coeficiente R^2 deve ser superior a 0,98. Essa equação será usada para se obter os valores de compostos fenólicos em $\text{mg} \cdot 100 \text{g}^{-1}$. Nos equipamentos que trazem um *software* com leitura de concentração, os dados da equação da reta obtidos são salvos como curva padrão de ácido gálico para as leituras posteriores das amostras.

Preparo do extrato da amostra para realização da análise

Pesar 1 g da polpa de pedúnculo de cajueiro em um Becker ou tubo de centrífuga e adicionar 4 mL de metanol p.a. 50%. Homogeneizar com um bastão de vidro e deixar em repouso por 60 minutos no escuro e em temperatura ambiente (26 °C). Após, centrifugar a 15.000 rpm durante 15 minutos. Recolher o sobrenadante e filtrá-lo em um balão volumétrico de 10 mL (filtrado da 1ª extração). Adicionar ao resíduo da centrifugação 4 mL de acetona p.a. 70%, homogeneizar com um bastão de vidro e deixar em repouso por 60 minutos no escuro e em temperatura ambiente. Após, realizar uma nova centrifugação a 15.000 rpm durante 15 minutos. Recolher o novo sobrenadante e filtrá-lo no mesmo balão volumétrico de 10 mL que continha o filtrado da 1ª extração. Completar o volume do balão com água destilada, homogeneizar e transferir para um frasco plástico escuro. Armazenar em *freezer* (aproximadamente -14 °C) por até 1 mês.

Procedimento para leitura do extrato

Em tubo de ensaio com tampa, em triplicata, pipetar com micropipeta 150 μL do extrato e adicionar 850 μL de água destilada. Proceder como no preparo da curva padrão. Anotar os valores das concentrações. Observar a diferença dos valores das absorvâncias entre as triplicatas, que não deve ser maior que 0,020.

Observação: Deve-se, primeiramente, fazer um teste para definir a concentração da amostra (peso da polpa e volume do balão) e a alíquota do extrato a ser utilizada para escolher qual o resultado se aproxima dos valores de massa de ácido gálico correspondentes ao meio da curva padrão.

Cálculos para obtenção do resultado final de fenólicos totais (mg equivalentes de ácido gálico. 100 g⁻¹ de amostra)

$$y = ax + b \text{ (equação da reta)}$$

y = absorvância

x = massa equivalente de ácido gálico

Cálculo

Peso da amostra (g) — Volume do balão (100 mL)

_____ (g) — Alíquota do extrato (0,150 mL)

Resultado = _____ g x 10³ = _____ mg de amostra

_____ mg amostra _____ X (µg equivalentes de ácido gálico obtidos na curva padrão)

100 mg amostra _____ µg

Resultado de fenólicos totais na amostra = µg .100 mg⁻¹ ou mg .100 g⁻¹

Determinação da Atividade Antioxidante Total (AAT) pelo Método do ABTS

Todos os procedimentos relacionados a essa metodologia estão publicados no Comunicado Técnico nº 128 da Embrapa Agroindústria Tropical (Rufino et al., 2006). Abaixo, traremos somente das informações sobre o preparo do extrato, das diluições e o detalhamento dos cálculos para amostras de pedúnculo de cajueiro.

Preparo do extrato da amostra para realização da análise

Esse extrato é o mesmo utilizado para a leitura dos compostos fenólicos.

Procedimento para determinação da determinação da atividade antioxidante total

A partir do extrato obtido, preparar no mínimo três diluições diferentes, que variam de acordo com os genótipos avaliados. Em geral, para polpa de pedúnculo de

caju, cujo extrato foi preparado com 1 g de polpa/10 mL, as concentrações variam de 100.000 a 25.000 ppm, conforme tabela 5 abaixo. Em ambiente de baixa luminosidade, transferir as alíquotas de água e extrato, totalizando 30 μ L, para tubos de ensaio, em triplicata. Adicionar 3,0 mL do radical ABTS, cronometrando o tempo, e homogeneizar em agitador de tubos. Realizar a leitura (734 nm), de cada tubo, exatamente 6 minutos após a adição do radical. Utilizar álcool etílico como branco para calibrar o espectrofotômetro. A partir das absorvâncias obtidas para cada diluição dos extratos, plotar os dados, a absorvância no eixo Y e a concentração no eixo X. Em seguida, determinar a equação da reta.

Tabela 5. Quadro demonstrativo do preparo das concentrações do extrato de pedúnculo de caju.

Volume do extrato (μ L)	Volume de água (μ L)	Diluição ⁽¹⁾ mg/L
7,5	22,5	25.000
15,0	15,0	50.000
22,5	7,5	75.000
30	0	100.000

⁽¹⁾Cálculos obtidos a partir da concentração de 1 g/10 mL da polpa, equivalente a 100.000 mg/L

Cálculo final da Atividade Antioxidante Total (AAT) expressa em μ M Trolox. g^{-1} de polpa de caju

Etapa 1. Para calcular a AAT, deve-se substituir, na equação da reta de cada diluição, o y pelo valor da absorvância obtida na curva padrão, equivalente a 1.000 μ M de trolox. O valor obtido para o termo x corresponde à concentração da amostra (mg/L) equivalente a 1.000 μ M de trolox.

$$y = ax + b \text{ (equação da reta)}$$

onde:

y = absorvância correspondente a 1.000 μ M de trolox

x = concentração da amostra (mg/L) equivalente a 1.000 μ M de Trolox

Etapa 2. Dividir o valor de x por 1.000 para transformar miligramas em gramas.

Etapa 3. Dividir 1.000 por x, para obter o valor $Z = \mu\text{M}$ trolox/g de fruta (porção comestível).

$$x \text{ (g)} = x / 1.000$$

$$Z = 1.000 / x \text{ (g)}$$

Exemplo do cálculo da absorbância da curva padrão de Trolox

Tabela 6. Quadro demonstrativo da leitura das concentrações da curva padrão de Trolox.

Concentração Trolox μM	Absorbância (média da triplicata)
100	0,6995
500	0,5799
1.000	0,4472
1.500	0,2237
2.000	0,0981

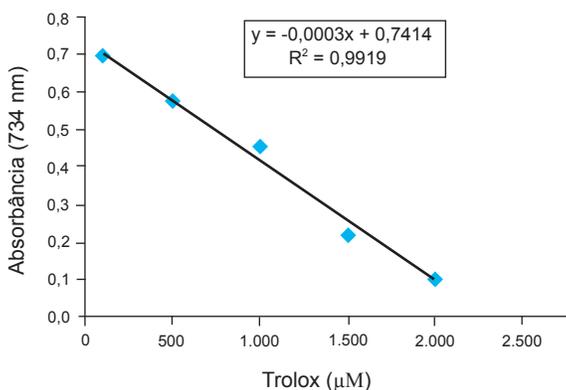


Figura 18. Gráfico demonstrativo da curva padrão de Trolox e da equação da reta.

Cálculo do valor do Y (absorbância da curva padrão)

$$Y = - 0,0003 X + 0,7414$$

$$Y = (- 0,0003 * (1000)) + 0,7414$$

$$Y = 0,4414 \text{ (absorbância da curva padrão)}$$

Exemplo de cálculo das diluições do extrato de pedúnculo de caju (mg/L) equivalente a 1.000 µM de Trolox

Tabela 7. Quadro demonstrativo das concentrações do extrato e equivalente valores das absorbâncias de pedúnculo de caju.

Concentração polpa (mg/L)	Absorbância (média da triplicata)
25.000	0,3147
50.000	0,4339
100.000	0,5817

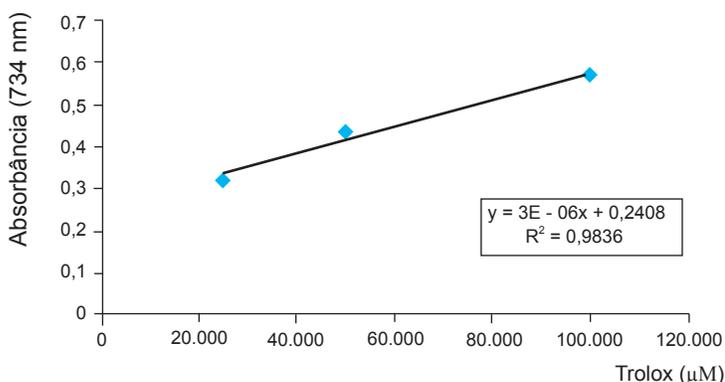


Figura 19. Gráfico exemplificativo referente à Tabela 7.

Y = 0,4414 equivalente a 1.000 µM de Trolox obtido pela curva padrão

$$y = -3E-06 X + 0,2408$$

$$x = (0,4414 - 0,2408) / 0,000003$$

$$x = 66.866,6 \text{ mg/L}$$

$$x = 66.866,6 / 1000$$

$$x = 66,86 \text{ g/L}$$

Cálculo do valor final da Atividade Antioxidante (AAT) em μM Trolox/g polpa

$$\text{AAT} = (1 \cdot 1000) / 66,86$$

$$\text{AAT} = 14,96 \mu\text{M Trolox. g}^{-1} \text{ polpa de pedúnculo de caju}$$

Resíduos das Análises

Os resíduos das análises devem ser armazenados em frascos devidamente etiquetados com o Diagrama de Hommel (Figura 20) e destinados ao local de gerenciamento de resíduos (GERELAB), conforme indicação no Procedimento de Descarte de Resíduos de Laboratório (048.11.01.00.1.001).

RESÍDUO QUÍMICO	
	Produto Principal: <input type="text" value="Ácido oxálico"/>
	Produtos Secundários: <input type="text"/>
	Procedência: <input type="text" value="Laboratório de Pós-Colheita"/>
	Responsável: <input type="text" value="Márcia Silveira"/>
	Data: <input type="text" value="22/07/2015"/>

RESÍDUO QUÍMICO	
	Produto Principal: <input type="text" value="Hidróxido de Sódio"/>
	Produtos Secundários: <input type="text"/>
	Procedência: <input type="text" value="Laboratório de Pós-Colheita"/>
	Responsável: <input type="text" value="Márcia Silveira"/>
	Data: <input type="text" value="22/07/2015"/>

Figura 18. Modelo de Diagrama de Hommel da Embrapa Agroindústria Tropical.

Referências

ALVES, R. E.; FILGUEIRAS, H. A. C. (Ed.). **Caju: pós-colheita**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. 36 p. (Embrapa Informação Tecnológica. Frutas do Brasil, 31).

AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemistry**. 18. ed. Gaithersburg: 2005.

CASTAÑEDA-OVANDO, A.; PACHECO-HERNÁNDEZ, M. D. L.; PÁEZ-HERNÁNDEZ, M. E.; RODRÍGUEZ, J. A.; GALÁN-VIDAL, C. A. Chemical studies of anthocyanins: a review. **Food Chemistry**, v. 113, n. 4, p. 859-871, 2009.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2005. 785 p.

DUCH, E. S. **Frutas exóticas de la península de Yucatán**. Merida: Instituto Tecnológico de Merida/CoSNET, 2001. 109 p.

EVERETTE, J. D.; BRYANT, Q. M.; GREEN, A. M.; ABBEY, Y. A.; WANGILA, G. W.; WALKER, R. B. Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteou reagent. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 8.139-8.144, 2010.

FAO. **FAOSTAT**: food and agricultural commodities production. 2012. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 30 set. 2016.

FOLIN, O. Tyrosine and tryptophan determination in proteins. **Journal of Biological Chemistry**. p. 649-673, 1927.

FRANCIS, F. J. Analysis of anthocyanins. In: MARKAKIS, P. (Ed.). **Anthocyanins as food colors**. New York: Academic Press, 1982. p. 181-207.

HIGBY, W. K. A simplified method for determination of some the carotenoid distribution in natural and carotene-fortified orange juice. **Journal of Food Science**, v. 27, p. 42-49, 1962.

KAJZANOSKA, M.; PETRESKA, J.; STEFOVA, M. Comparison of different extraction solvent mixtures for characterization of phenolic compounds in strawberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 10, p. 5272-8, 2011.

KONICA MINOLTA. **Precise color communication**: color control from perception to instrumentation. 2007. Disponível em: <http://www.konicaminolta.com/instruments/knowledge/color/pdf/color_communication.pdf>. Acesso em: 06 out. 2016.

KONG, J. Analysis and biological activities of anthocyanins. **Phytochemistry**, v. 64, n. 5, p. 923-933, 2003.

LARRAURI, J. A.; RUPÉREZ, P.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. **Journal of the Agricultural and Food Chemistry**. v. 45, p. 1390-1393, 1997

LOPES, M. M. de A. **Qualidade e atividade antioxidante total em pedúnculos de clones de cajueiros anão precoce em diferentes estádios de maturação**. 2011. 101 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

LOPES, M. M. de A.; MOURA, C. F. H. de; ARAGÃO, F. A. S. de; CARDOSO, T. G.; ENÉAS FILHO, J. Caracterização física de pedúnculos de clones de cajueiro anão precoce em diferentes estádios de maturação. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 4, p. 914-920, 2011.

MCGUIRE, R. G. Reporting of objective color measurements. **HortScience**, v. 27, p. 1254-1255, 1992.

MORETTI, C. L. **Protocolos de avaliação da qualidade química e física de tomate**. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2006. 6 p. (Embrapa Hortaliças. Comunicado Técnico, 32). Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/103087/1/cot-32.pdf>>. Acesso em: 12 fev. 2017.

MOURA, C. F. H. **Armazenamento de pedúnculos de cajueiro anão precoce BRS 189, CCP 76, END 183 e END 189 sob diferentes temperaturas e atmosferas**. 2004. Tese (Doutorado em Agronomia/ Fitotecnia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

OBANDA, M.; OWUOR, P. O. Flavonol composition and caffeine content of Green Leaf as quality potential indicators of *Kenyan black* teas. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 74, n. 2, p. 209-215, 1997.

RUFINO, M. S. M. et al. **Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS***. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2006. (Embrapa Agroindústria Tropical, Comunicado Técnico).

SÁNCHEZ-MATA, M., CÁMARA-HURTADO, M., DÍEZ-MARQUÉS, C. I.; TORIJA-ISASA, M. E. Comparison of high-performance liquid chromatography and spectrofluorimetry for vitamin C analysis of green beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **European Food Research and Technology**, v. 210, n. 3, p. 220-225, 2000.

YEMN, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrate in plant extracts by anthrone. **The Biochemical Journal**, v. 57, p. 508-514, 1954.

Embrapa

Agroindústria Tropical

MINISTÉRIO DA
**AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO**

