

Avaliação do efeito das condições experimentais sobre a capacidade redutora total de extratos de alface através de um desenho experimental

T. Delgado^{1,2}, A. Ferreira¹, J.A. Pereira¹, P. Baptista¹, S. Casal² e E. Ramalhosa¹

¹ Mountain Research Centre (CIMO), School of Agriculture – Polytechnic Institute of Bragança, Campus Sta Apolónia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança, Portugal, e-mail: elsa@ipb.pt

² REQUIMTE/Laboratório de Bromatologia e Hidrologia, Departamento de Ciências Químicas, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Rua de Jorge Viterbo Ferreira, n°228, 4050-313 Porto, Portugal

Resumo

No presente trabalho aplicou-se um desenho fatorial a 2 níveis para determinar o efeito de algumas condições operacionais a usar na extração de compostos com atividade antioxidante da alface, sua importância e possíveis interações. De entre os fatores a analisar estudaram-se a temperatura de extração (30 e 60 °C), o tipo de solvente (metanol e água), o tempo de extração (10 e 30 minutos), o tipo de amostra (desidratada ou fresca) e a relação de amostra versus solvente (1:1 e 1:4, m/v). Avaliou-se a capacidade redutora total (CRT) através do método colorimétrico de Folin-Ciocalteu.

Tendo em conta os gráficos de Pareto e da Probabilidade Normal dos Efeitos Standardizados obtidos verificou-se que entre os fatores e as interações estudadas, o único significativo ($p < 0.05$) foi o tipo de amostra. Verificou-se que o modelo desenvolvido permitiu prever valores de CRT semelhantes aos experimentais, obtendo-se uma relação linear, com um coeficiente de correlação igual a 0.916 e intervalos de confiança para o declive e ordenada na origem entre 0.628 a 1.05 e -0.0199 a 0.110, respetivamente, incluindo os valores um e zero, tal como desejado. Para melhor avaliar o efeito do tipo de amostra sobre a CRT, analisou-se o gráfico dos efeitos principais do qual se verificou que as amostras desidratadas apresentaram uma CRT superior à das amostras frescas. Uma vez que não se observou um decréscimo da CRT de extratos preparados a partir de amostras secas de alface, os resultados do presente estudo forneceram um dado importante a ter em conta em trabalhos futuros, indicando que nas determinações da atividade antioxidante poder-se-á utilizar amostras desidratadas.

Palavras chave: Desenho experimental; Condições de extração; Capacidade Redutora Total; Alface.

Abstract

The main aim of the present work was to use a 2-level factorial design to determine the effect of certain operating conditions in the extraction of compounds with antioxidant activity of lettuce, its importance and possible interactions. The factors studied were the extraction temperature (30 and 60 °C), solvent type (methanol and water), extraction time (10 and 30 minutes), sample type (dried or fresh) and the ratio of sample vs. solvent (1:1 and 1:4, w/v). The total reducing capacity (TRC) was determined by the colorimetric method using the Folin-Ciocalteu reagent.

Taking into account the Pareto and Normal Probability of Standardized Effects charts it was found that among the factors and interactions studied, the only significant ($p < 0.05$) was the sample type. The model developed allowed to predict TRC values similar to the experimental ones, resulting in a linear relationship with a correlation coefficient (r) equal to 0.916 and confidence intervals for the slope and origin ordinate between 0.628 and 1.05, and -0.0199 to 0.110, respectively, including the one and zero values, as desired. To further evaluate the effect of the sample type on the TRC, the main effects graph showed that the dehydrated samples showed a higher TRC than the fresh ones. The absence of TRC decrease in the extracts prepared from dried lettuce samples, provides also an important fact to be taken into account in future studies, indicating that dried samples may be used in antioxidant capacity determinations.

Keywords: Experimental design; Extraction conditions; Total Reducing Capacity; Lettuce.

Introdução e Objetivos

É do conhecimento geral que o consumo elevado de frutas e vegetais diminui o risco de desenvolver doenças, nomeadamente doenças cardíacas e cancerígenas. Estas propriedades estão relacionadas com o facto das frutas e vegetais possuírem compostos com atividade biológica, tais como antioxidantes. A alface (*Lactuca sativa*) é um dos vegetais mais consumidos no mundo, atingindo a produção mundial de 21 milhões de toneladas, segundo dados da FAO. Atualmente a procura por produtos prontos a consumir faz com que saladas preparadas de alface tenham grande procura. Contudo, os industriais que preparam este género de produtos enfrentam o problema dos resíduos, tais como, folhas danificadas, caules, etc. Nesse sentido de forma a encontrar soluções para este problema é de extrema importância desenvolver formas de valorizar estes subprodutos. A produção de extratos com propriedades bioativas interessantes, tais como características antioxidantes, pode ser uma alternativa.

No presente trabalho pretendeu-se utilizar um desenho fatorial a 2 níveis para determinar o efeito de algumas condições de extração (fatores), sua importância e possíveis interações sobre a CRT de extratos de alface.

Material e Métodos

1. Desenho Experimental

A alface utilizada no presente estudo foi uma variedade comercial de folha lisa, adquirida numa superfície comercial. Utilizou-se um desenho fatorial a 2 níveis (-1 e 1) para cada um dos fatores analisados, tendo sido realizadas 16 experiências no total, tal como indicado na tabela 1. Os fatores e os níveis estudados foram: (A) Temperatura de extração (30 e 60 °C); (B) Tempo de extração (10 e 60 minutos); (C) Solvente de extração (metanol e água); (D) Tipo de amostra (fresca e seca) e (E) Relação de amostra em termos de matéria fresca versus solvente (1:1 e 1:4; m/v). Adicionalmente, ainda foram avaliadas as seguintes interações entre os factores: AB, AC, BC, BE, CE e DE. O software utilizado foi o MiniTab®.

Tabela 1. Condições experimentais estudadas, expressas em termos de variáveis não codificadas.

Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Solvente	Tipo de amostra	Relação de amostra em termos de matéria fresca versus solvente
1	30	10	Água	Seca	1:1
2	60	10	Água	Seca	1:4
3	30	60	Água	Seca	1:4
4	60	60	Água	Seca	1:1
5	30	10	Metanol	Seca	1:4
6	60	10	Metanol	Seca	1:1
7	30	60	Metanol	Seca	1:1
8	60	60	Metanol	Seca	1:4
9	30	10	Água	Fresca	1:4
10	60	10	Água	Fresca	1:1
11	30	60	Água	Fresca	1:1
12	60	60	Água	Fresca	1:4
13	30	10	Metanol	Fresca	1:1
14	60	10	Metanol	Fresca	1:4
15	30	60	Metanol	Fresca	1:4
16	60	10	Metanol	Fresca	1:1

As amostras desidratadas foram obtidas após secagem de alfaces frescas, em estufa com convecção forçada, a uma temperatura de 60 °C, até se obter peso constante.

2. Condições de Extração

De forma a avaliar a atividade antioxidante, foram preparados extratos de alface segundo a metodologia de Ballard et al. (2009), com algumas modificações. Em pormenor, pesaram-se 25 gramas de amostra fresca ou 1 grama de amostra desidratada e adicionaram-se 25 mL de solvente (água ou metanol) de forma a obter-se a proporção de 1:1, ou 6 gramas de amostra fresca ou 0.25 gramas de amostra desidratada e adicionaram-se 25 mL de solvente de forma a obter-se a proporção de 1:4, respectivamente. De seguida, a extração decorreu a 30 ou a 60 °C num banho termostatizado, sob agitação, durante 10 ou 60 minutos, tal como indicado pelo desenho experimental (Tabela 1). Após arrefecimento, as soluções foram filtradas para tubos de Falcon e congeladas a -18 °C até análise. Todas as extracções foram realizadas em triplicado.

3. Capacidade Redutora Total

A Capacidade Redutora Total (CRT) dos extratos de alface foi determinada pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, descrito por Singleton and Rossi (1965). Em mais pormenor, a um 1 mL de solução de extracto foi adicionado 1 mL de reagente de Folin Ciocalteu. Após três minutos, foi adicionado 1 mL de solução saturada de Na₂CO₃ e 7 mL de água destilada. A reação foi mantida no escuro por 90 minutos, sendo depois a absorvância lida a 725 nm (UV-Vis espectrofotómetro Thermo Electron Corporation Genesys 10). Simultaneamente, foram preparadas várias soluções padrão de ácido gálico (0.01 a 0.4 mmol/L) de forma a obter a curva de calibração. Os resultados foram expressos em mg equivalentes de ácido gálico / g alface fresca.

Resultados e Discussão

Tendo em conta os gráficos de Pareto e da Probabilidade Normal dos Efeitos Standardizados obtidos (Figura 1) para a CRT, verificou-se que de entre os fatores - A, B, C, D e E - e as interações - AB, AC, BC, BE, CE e DE - estudados, o único significativo ($p < 0.05$) foi o tipo de amostra (D).

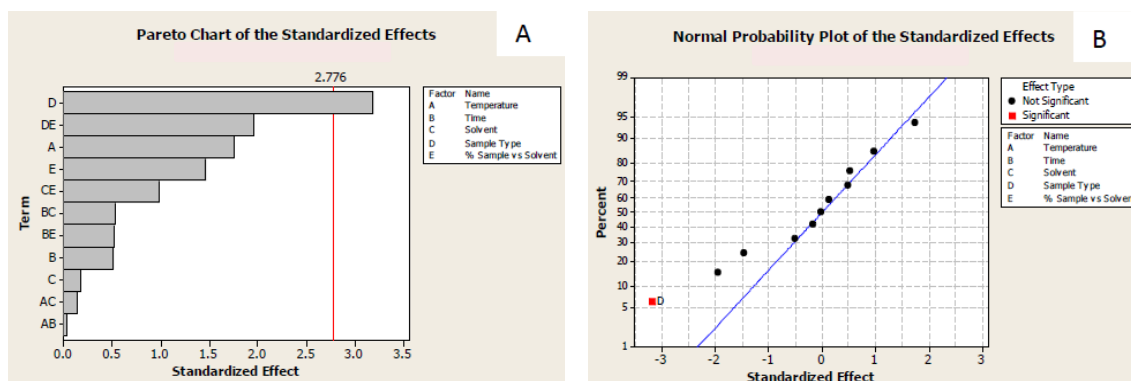


Figura 1. Gráficos de Pareto (A) e da Probabilidade Normal dos Efeitos Standardizados (B) para o efeito da CRT.

Observando a Figura 1, verificou-se que os restantes fatores se situaram sobre a linha traçada e grande parte deles se centrou em torno do valor zero, tal como seria esperado para efeitos não importantes. Refira-se que não foi observada qualquer interação significativa, indicando que as diferenças nos fatores não dependem do nível dos restantes.

O modelo desenvolvido para a CRT apresentou a seguinte equação:

$$CRT = 0,28062 + 0,04536 \times A + 0,01299 \times B - 0,00418 \times C - 0,08278 \times D - 0,03782 \times E - 0,00041 \times A \times B + 0,00338 \times A \times C + 0,01374 \times B \times C - 0,01326 \times B \times E + 0,02526 \times C \times E - 0,05063 \times D \times E$$

, a qual foi utilizada para determinar os valores previstos. Observou-se existir uma relação linear entre os valores previstos e os experimentais (Figura 2), obtendo-se um coeficiente de correlação linear (r) igual a 0.916. Os intervalos de confiança ($P=95\%$) do declive (0.839) e da ordenada na origem (0.0452) variaram entre 0,628 a 1,05 e -0,0199 a 0,110, respetivamente, os quais incluíram os valores um e zero, tal como desejado. Dessa forma os resultados indicaram que o modelo desenvolvido permite prever de forma adequada os resultados experimentais.

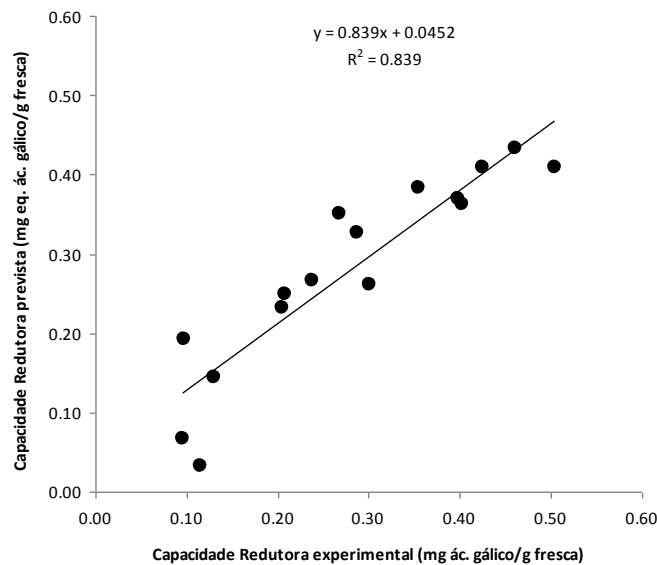


Figura 1 - Relação linear encontrada entre a CRT prevista pelo modelo desenvolvido e os valores obtidos experimentalmente.

Para melhor avaliar o efeito do tipo de amostra sobre a CRT, analisou-se o gráfico dos efeitos principais (Figura 3), o qual permitiu verificar que as amostras desidratadas apresentaram uma CRT superior à das amostras frescas.

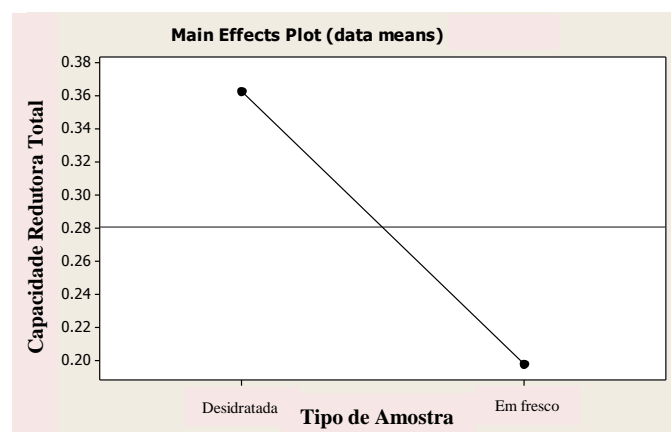


Figura 3 - Efeito do tipo de amostra sobre a CRT.

Estes resultados são semelhantes aos referidos por Capecka et al. (2005) para orégãos e hortelã-pimenta, os quais observaram um aumento significativo do teor de fenóis totais em amostras secas em relação às frescas. Adicionalmente, estes autores verificaram que o efeito bloqueador do radical livre

DPPH foi elevado (> 84%) tanto para amostras secas como frescas. Hossain et al. (2010) também referem que ao analisar alecrim, manjerona e manjeriço, o teor de fenóis totais e a atividade antioxidante avaliada pelo ensaio FRAP (poder redutor do ião férrico) aumentava quando as amostras frescas eram secas por liofilização, secagem sob vácuo ou ao ar. Estes mesmos autores indicam que a secagem pode tornar os tecidos vegetais mais quebradiços, o que faz com que haja uma rápida rutura das paredes celulares durante as etapas de trituração e homogeneização do procedimento de extração. A rutura destas células pode causar a libertação de mais compostos fenólicos para a solução de extração. Por outro lado, as amostras frescas podem perder compostos antioxidantes devido à degradação enzimática, uma vez que as enzimas ainda se encontram ativas nas amostras frescas, causando uma diminuição da atividade antioxidante nestas amostras.

Uma vez que não se observou um decréscimo da CRT de extratos preparados a partir de amostras secas de alface, os resultados do presente estudo fornecem um dado importante a ter em conta em trabalhos futuros, indicando que nas determinações da atividade antioxidante poder-se-á utilizar amostras secas. O uso deste tipo de amostras permite o seu armazenamento durante períodos mais longos e de forma mais cómoda em relação ao uso de amostras frescas, devido a ocuparem um menor espaço e de não haver necessidade de se recorrer à refrigeração para sua conservação. Deste modo, sugere-se que em trabalhos posteriores onde se pretenda determinar a atividade antioxidante em alface, se utilizem amostras desidratadas. De facto num processo de secagem lento as plantas que ainda apresentam atividade metabólica vão perdendo a água lentamente, o que pode funcionar como um stress para a planta. As plantas, em geral, produzem compostos fenólicos como resposta a stresses (mecanismo de defesa) (Hossain et al., 2010), compostos estes que podem ter atividade antioxidante.

Outro ponto importante do presente trabalho é o facto de se ter verificado que a forma em que a amostra se encontra pode alterar os resultados obtidos em termos de atividade antioxidante. Este ponto deve ser tido em conta na comparação futura de resultados, pois consoante o estado em que a amostra é utilizada, os resultados poderão ser distintos.

Conclusões

De entre os fatores analisados no presente trabalho, relativos às condições de extração a aplicar na determinação da CRT de extratos de alface, designadamente a temperatura de extração, o tipo de solvente, o tempo de extração, o tipo de amostra e a relação de amostra *versus* solvente, verificou-se que único fator significativo foi o tipo de amostra. Tendo em conta os efeitos principais, constatou-se que os extratos preparados a partir de amostras desidratadas apresentaram uma CRT superior à dos preparados com amostras frescas.

Agradecimentos

Os autores agradecem à FCT o financiamento do projeto PTDC/AGR-AAM/102447/2008.

Bibliografia

- Ballard, T. S., Mallikarjunan, P., Zhou, K., and O'Keefe, S.F. (2009). Optimizing the extraction of phenolic antioxidants from peanut skins using response surface methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**, 3064-3072.
- Capecka, E., Mareczek, A., and Leja, M. (2005). Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some *Lamiaceae* species. *Food Chemistry* **93**, 223-226.
- Hossain, M. B., Barry-Ryan, C., Martin-Diana, A. B., and Brunton N. P. (2010). Effect of drying method on the antioxidant capacity of six *Lamiaceae* herbs. *Food Chemistry* **123**, 85-91.
- Singleton, V. L., and Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* **16**, 144-158.