

11º Encontro de Química dos Alimentos

Qualidade dos alimentos: novos desafios

Bragança, 2012
16-19 Setembro

Atas

ISBN
978-972-745-141-8



Análise cromatográfica de ácidos orgânicos em cogumelos silvestres comestíveis do nordeste de Portugal: validação de uma técnica de UFLC-PDA

*Lillian Barros, Carla Pereira, Isabel C.F.R. Ferreira**

Centro de Investigação de Montanha (CIMO), Escola Superior Agrária,
Instituto Politécnico de Bragança
*e-mail: iferreira@ipb.pt

Palavras-chave: Cogumelos; Ácidos orgânicos; Cromatografia; Validação analítica

Resumo: Os cogumelos são uma excelente fonte de compostos antioxidantes nomeadamente tocoferóis, ácido ascórbico, carotenóides, compostos fenólicos e ácidos orgânicos. Estes últimos compostos desempenham um papel importante na manutenção da qualidade e características organolépticas de frutos e vegetais e, por isso, têm sido utilizados no controlo de qualidade dos mesmos. A natureza e a concentração dos ácidos orgânicos são também fatores importantes no sabor dos cogumelos. Mas, alguns deles (p. ex. ácidos tartárico, málico, cítrico ou succínico) podem também desempenhar um papel protetor contra várias doenças crónicas devido às suas propriedades antioxidantes, quelatando metais ou deslocalizando a carga eletrónica de radicais livres.

Neste trabalho, avaliaram-se os perfis em ácidos orgânicos de diferentes espécies de cogumelos comestíveis do Nordeste de Portugal, após extração com ácido metafosfórico e análise por cromatografia líquida ultra rápida e deteção por fotodiodos (UFLC-PDA). A separação cromatográfica dos compostos foi conseguida com uma coluna de C₁₈ em fase reversa SphereClone (Phenomenex) e eluição isocrática com ácido sulfúrico (3,6 mM) a um caudal de 0,8 mL/min. Todos os compostos foram separados em 8 minutos. A validação do método de análise foi feita com uma amostra de *Agaricus bisporus* e provou ser reprodutível e preciso. Os perfis de ácidos orgânicos obtidos foram similares para todas as espécies de cogumelos estudadas: os principais ácidos orgânicos encontrados foram os ácidos oxálico, málico e fumárico; algumas espécies apresentaram também os ácidos quínico e cítrico. *Sarcodon imbricatus* foi a espécie que revelou uma maior concentração de ácidos orgânicos (254,09 mg/g massa seca), enquanto a espécie *Bovista nigrescens* apresentou a concentração mais baixa (1,33 mg/g). O elevado teor de ácidos orgânicos encontrado pode sugerir que estes compostos podem estar relacionadas com a atividade antioxidante destas espécies já descrita na literatura, nomeadamente pelo nosso grupo de investigação.

1. INTRODUÇÃO

As espécies reativas de oxigênio (ROS) e de azoto (RNS), incluindo radicais livres são constantemente produzidas durante o metabolismo normal das células e quando se encontram em excesso podem provocar danos nos lípidos, proteínas e DNA. A proteção das células é assegurada por enzimas antioxidantes e moléculas não-enzimáticas [1]. No entanto, estas defesas são frequentemente insuficientes na prevenção de danos, levando ao aparecimento de doenças e à aceleração do envelhecimento. Produtos naturais com atividade antioxidante podem ajudar o sistema de defesas endógeno, assumindo uma grande importância como possíveis agentes protetores reduzindo danos oxidativos.

Os cogumelos são fontes de compostos antioxidantes nomeadamente tocoferóis, ácido ascórbico, carotenóides, compostos fenólicos e ácidos orgânicos [2].

Os ácidos orgânicos assumem um papel particularmente determinante na manutenção da qualidade e características organolépticas de frutos e vegetais, sendo também utilizados no controlo de qualidade dos mesmos. A natureza e concentração destes compostos são também fatores importantes nas propriedades organolépticas dos cogumelos.

Alguns estudos descrevem ácidos orgânicos em cogumelos, nomeadamente em corpos frutíferos e micélios de diferentes espécies [3,4]. No entanto, existe ainda falta de informação sobre o perfil de ácidos orgânicos em várias espécies de cogumelos silvestres comestíveis. No presente trabalho, foi aplicada uma nova metodologia de extração de ácidos orgânicos a partir de 58 espécies diferentes, tendo-se validado um método de análise usando cromatografia líquida ultra rápida e deteção por fotódiodos (UFLC-PDA).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Extração e análise de ácidos orgânicos

As amostras (~2 g) foram extraídas com 25 mL de ácido metafosfórico (25°C a 150 rpm) durante 45 min e posteriormente filtradas. Antes da análise por UFLC-PDA as amostras foram novamente filtradas em filtros de nylon 0,2 µm. A análise foi feita usando um sistema UFLC Shimadzu 20A e a separação foi conseguida numa coluna de C₁₈ em fase reversa (SphereClone, Phenomenex) a 35°C usando ácido sulfúrico 3,6 mM como eluente num fluxo de 0,8 mL/min. Os ácidos orgânicos, identificados a 215 nm, foram quantificados com base em curvas de calibração obtidas a partir de padrões comerciais. Os resultados foram expressos em mg por g de massa seca.

2.2. Validação do método de análise

Avaliou-se a linearidade e sensibilidade da análise UFLC e validou-se o método através da repetibilidade instrumental, precisão e exatidão, usando uma amostra de *Agaricus bisporus*.

A repetibilidade foi avaliada analisando a amostra sete vezes no mesmo dia; a precisão foi determinada após três extrações da mesma amostra tendo sido cada uma delas analisada três

vezes no mesmo dia. A exatidão do método foi avaliada pelo método de adição de padrão (percentagem de recuperação), com três níveis de adição (25, 50 e 100% da concentração do pico/área), cada um deles em triplicado. A mistura de padrões (ácidos oxálico, quínico, málico, cítrico e fumárico) foi adicionada à amostra e foi realizado o procedimento de extração.

2.3. Análise estatística

A extração dos ácidos orgânicos foi feita em duplicado e cada uma das amostras foi injetada três vezes em UFLC-PAD. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. As diferenças entre as espécies de cogumelos foram analisadas por ANOVA seguida de teste de Tukey com $\alpha = 0.05$. Esta análise foi conseguida usando o programa SPSS v. 18.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As características analíticas do método foram avaliadas pela linearidade e determinação dos limites de detecção e quantificação (Tabela 1).

Tabela 1. Características analíticas do método de análise dos ácidos orgânicos.

| | R_t | (tempo | de | Coefficiente | de | Linearidade | Limites | |
|----------------|-----------|--------|--------|-----------------------------|---------|-------------|---------|---------|
| | retenção) | min | CV, | correlação (r^2) | (mg/mL) | | LOD | LOQ |
| | | (n=13) | % | | | | (mg/mL) | (mg/mL) |
| Ácido Oxálico | 3,0 | 0,31 | 0,9990 | $9,8 \times 10^{-5} - 2,5$ | 0,18 | 0,60 | | |
| Ácido Quínico | 3,3 | 0,14 | 1,000 | $7,8 \times 10^{-4} - 20$ | 0,080 | 0,26 | | |
| Ácido Málico | 3,8 | 0,76 | 0,9998 | $7,8 \times 10^{-4} - 20$ | 0,27 | 0,89 | | |
| Ácido Cítrico | 6,0 | 0,75 | 1,000 | $2,0 \times 10^{-3} - 10$ | 0,060 | 0,20 | | |
| Ácido Fumárico | 6,9 | 0,51 | 0,9996 | $1,6 \times 10^{-5} - 0,40$ | 0,0077 | 0,026 | | |

CV- Coeficiente de validação; LOD- limite de detecção; LOQ- limite de quantificação.

O método cromatográfico provou ser preciso (CV% entre 0,040 e 1.4%, Tabela 2).

Tabela 2. Validação dos parâmetros do método usando *Agaricus bisporus*.

| | Precisão | Repetibilidade | Precisão |
|----------------|-------------|----------------|------------------|
| | CV, % (n=6) | CV, % (n=6) | (Recuperação, %) |
| Ácido Oxálico | 1,4 | 1,1 | 99 |
| Ácido Quínico | 0,77 | 0,36 | 95 |
| Ácido Málico | 0,53 | 0,71 | 91 |
| Ácido Cítrico | 0,59 | 1,7 | 92 |
| Ácido Fumárico | 0,040 | 0,50 | 93 |

CV- Coeficiente de variação.

Todas as amostras de cogumelos apresentaram ácido oxálico, málico e fumárico, tendo algumas amostras revelado ainda a presença de ácido quínico e cítrico.

O principal ácido orgânico encontrado em todas as espécies foi o ácido málico. A espécie *Sarcodon imbricatus* apresentou os valores mais elevados deste ácido em particular (240,65 mg/g), mas também de ácidos orgânicos totais (254,09 mg/g massa seca). Por outro lado, *Bovista nigrescens*, *Bovista aestivales* e *Hygrophorus chrysodon* apresentaram a menor concentração de ácido málico (0,51, vestígios e 0,68 mg/g, respetivamente).

O ácido fumárico foi também encontrado em todas as espécies estudadas tendo *Cortinarius praestans* apresentado a concentração mais elevada (12,31 mg/g), enquanto *Bovista nigrescens* e *Bovista aestivales* apresentaram as mais baixas concentrações (vestígios e 0,07 mg/g, respetivamente). *Bovista nigrescens* apresentou também o mais baixo teor total de ácidos orgânicos (1,33 mg/g).

Os ácidos quínico e cítrico foram encontrados em algumas das espécies em estudo; *Clitocybe odora* revelou o teor mais elevado de ácido quínico (198,17 mg/g), o que contribuiu para o elevado teor total de ácidos orgânicos obtido nesta espécie (217,69 mg/g). *Lactarius volemus* apresentou o menor teor de ácido quínico (1,17 mg/g). O principal ácido orgânico encontrado em *Lentinus edodes* foi o ácido cítrico. No entanto, *Cortinarius violaceus* apresentou a mais baixa concentração deste ácido (5,33 mg/g).

Em suma, obtiveram-se os perfis de ácidos orgânicos de 58 espécies de cogumelos, por UFLC-PDA, usando uma metodologia otimizada que provou ser reprodutível e precisa permitindo a separação dos compostos em 8 min. Foram identificados e quantificados os ácidos oxálico, málico, fumárico, quínico e cítrico. *Sarcondon imbricatus* foi a espécie que revelou o teor mais elevado de ácidos orgânicos enquanto *Bovista nigrescens* apresentou a menor concentração. Os cogumelos estudados possuem propriedades antioxidantes e os ácidos orgânicos podem estar relacionados com essas propriedades.

Agradecimentos: FCT e COMPETE/QREN/EU- projeto PTDC/AGR-ALI/110062/2009, projeto estratégico do CIMO (PEst-OE/AGR/UI0690/2011) e bolsa BPD/4609/2008 de L. Barros.

Referências

- [1] M Valko, D Leibfritz, J Moncol, MT Cronin, M Mazur, J Telser, Int J Biochem Cell Biol, 2007, 39, 44-84.
- [2] ICFR Ferreira, L Barros, RMV Abreu, Curr Med Chem, 2009, 16, 1543-1560.
- [3] B Ribeiro, J Rangel, P Valentão, P Baptista, RM Seabra, PB Andrade, J Agric Food Chem, 2006, 54, 8530-8537.
- [4] N Rotzoll, A Dunkel, T Hofmann, J Agric Food Chem, 2006, 54, 2705-2711.