

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

CAROLINE DE ALMEIDA SOARES

**VALIDAÇÃO DO MÉTODO FAST BLUE BB PARA QUANTIFICAÇÃO DE
COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS EM ALIMENTOS**

Porto Alegre, 2015.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

CAROLINE DE ALMEIDA SOARES

**VALIDAÇÃO DO MÉTODO FAST BLUE BB PARA QUANTIFICAÇÃO DE
COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS EM ALIMENTOS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado junto à atividade de ensino “Projeto Tecnológico” do Curso de Química Industrial, como requisito parcial para a obtenção do grau de Química Industrial.

Profa. Dra. Ligia Damasceno Ferreira Marczak
Orientadora

Pesquisadora Dra. Naira Poerner Rodrigues
Coorientadora

Porto Alegre, 2015

RESUMO

A determinação de compostos fenólicos em alimentos é de grande interesse em pesquisas devido às propriedades antioxidantes destes compostos. O método comumente usado na determinação desses compostos é o método espectrofotométrico utilizando o reagente Folin-Ciocalteu (FC). O mecanismo básico do método é uma interação de oxidação/redução e, com isso, existe a possibilidade de interferentes não fenólicos, tais como ácido ascórbico, proteínas e açúcares, serem também quantificados. O método espectrofotométrico utilizando o reagente Fast Blue BB surgiu na literatura como uma alternativa rápida e simples na determinação de fenólicos, eliminando ou diminuindo os possíveis interferentes. Neste trabalho, para melhor comparação, foram testadas as duas metodologias que envolveram, desde a construção da curva analítica, até testes com padrões de compostos fenólicos e não fenólicos, e com amostras de polpas de frutas. As curvas foram construídas com padrão de ácido gálico para os dois métodos e os dados foram tratados com análise de regressão linear. Para a metodologia FBBB, a faixa de concentração linear foi de 10 a 85 mg/L. O coeficiente de determinação foi de 0,983, evidenciando a linearidade nessa faixa de concentração. No teste com padrões foram utilizados padrões de ácido clorogênico, ácido ascórbico, albumina e glicose. Os resultados de ácido clorogênico, em miligramas de equivalente ácido gálico por grama de padrão, foram maiores na metodologia Fast Blue BB do que na metodologia FC, sendo respectivamente de 878 e 678. O ácido ascórbico, por sua vez, provou ser interferente na metodologia FC gerando resultados expressivamente maiores de fenólicos quando presente. A albumina foi detectada minimamente nas duas metodologias. Nos ensaios com as polpas de frutas, observou-se um comportamento semelhante. A polpa de acerola, sabidamente com maior quantidade de ácido ascórbico na sua composição, forneceu resultados expressivamente maiores na metodologia FC sinalizando que o ácido ascórbico presente é, de fato, quantificado como composto fenólico.

Palavras-chave: Compostos fenólicos. Fast Blue BB. Folin-Ciocalteu.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura do ácido clorogênico	9
Figura 2: Interação proposta entre ácido gálico e sal de diazônio (FBBB).....	11
Figura 3:reparo do meio reacional metodologia Folin-Ciocalteu	15
Figura 4: Preparo do meio reacional metodologia FBBB de referência.....	15
Figura 5: Preparo meio reacional FBBB.....	16
Figura 6: Curva de calibração do ácido gálico - metodologia FBBB: perda de linearidade.....	24
Figura 7: Método Fast Blue BB com diferentes meio reacionais	25
Figura 8: Avaliação do sinal de ácido gálico no meio reacional Na ₂ CO ₃ 7% em função do tempo pela metodologia FC.....	27
Figura 9: Curva analítica do ácido gálico via método Folin-Ciocalteu	29
Figura 10: Curva analítica da absorbância versus concentração de ácido gálico - método Fast Blue BB	30
Figura 11: Estabilidade do Fast Blue BB 0,1% armazenado a -180C durante 22 dias.....	31
Figura 12: Comparativo das misturas de padrões nas duas metodologias	33
Figura 13: Comparação resultados em mg EAG/ 100g de polpa para cada metodologia.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Avaliação da linearidade da curva analítica de ácido gálico pela metodologia FBBB em meio reacional NaOH 5% em função do tempo.....	26
Tabela 2: Avaliação da linearidade da curva de calibração de ácido gálico pela metodologia FC em meio reacional NaCO ₃ 7% em função do tempo.....	27
Tabela 3: Dados da Curva Analítica Ácido Gálico - método Folin-Ciocalteu	28
Tabela 4: Recuperação e repetibilidade avaliados em três níveis de ácido gálico pelo método Folin-Ciocalteu.....	29
Tabela 5: Dados da Curva Analítica Ácido Gálico - método Fast Blue BB.....	30
Tabela 6: Recuperação e repetibilidade avaliados em três níveis de ácido gálico pelo método Fast Blue BB.....	31
Tabela 7: Resultados da análise dos padrões pelos métodos Folin-Ciocalteu e Fast Blue BB	32
Tabela 8: Preços dos reagentes utilizados nas duas metodologias	37
Tabela 9: Quantidades usadas de cada reagente e custo consideradas para triplicata de curva analítica e triplicata de uma amostra - Método FC	38
Tabela 10: Quantidades usadas de cada reagente e custo consideradas para triplicata de curva analítica e triplicata de uma amostra - Método FBBB	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA - Ácido ascórbico

BSA - Albumina sérica bovina

CGA - Ácido Clorogênico

EAG - Equivalente ao ácido gálico

FBBB - Fast Blue BB

FC - Folin-Ciocalteu

LD - Limite de detecção

LQ - Limite de quantificação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
1.1 Objetivos	8
1.2 Compostos Fenólicos	8
1.3 Método Folin-Ciocalteu	10
1.4 Método Fast Blue BB	10
1.5 Validação do Método.....	12
2 MATERIAIS E MÉTODOS	14
2.1 Reagentes	14
2.2 Metodologias	14
2.3 Validação dos Métodos Folin-Ciocalteu e Fast Blue BB	16
2.3.1 Estabilidade da absorbância ao longo do tempo.....	16
2.3.2 Linearidade, Recuperação, Repetibilidade, Limite de Detecção e de Quantificação	18
2.3.3 Estabilidade da solução de Fast Blue BB 0,1%.....	19
2.3.4 Análise Estatística	19
2.4 Estudo da Interferência do Ácido Ascórbico, Açúcar e Proteína nos Métodos Fast Blue BB e Folin-Ciocalteu	20
2.5 Determinação do Conteúdo de Compostos Fenólicos em Polpas de Frutas Via Fast Blue BB e Folin Ciocalteu.....	21
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
3.1 Validação dos Métodos Fast Blue BB e Folin Ciocalteu.....	22
3.1.1 Estabilidade da Absorbância ao Longo do Tempo	22
3.1.2 Linearidade, Recuperação, Repetibilidade, Limite de Detecção e de Quantificação	27
3.1.3 Estabilidade da solução de Fast Blue BB 0,1%.....	30
3.2 Estudo da Interferência do Ácido Ascórbico, Açúcares e Proteína nos Métodos Fast Blue BB e Folin Ciocalteu	31
3.3 Determinação do Conteúdo de Compostos Fenólicos em Polpas de Frutas Via Fast Blue BB e Folin Ciocalteu.....	33

4 AVALIAÇÃO ECONÔMICA.....	35
4.1 Custos da Metodologia Folin-Ciocalteu.....	36
4.2 Custos da Metodologia Fast Blue BB.....	37
5 IMPACTO AMBIENTAL.....	39
6 CONCLUSÕES.....	40
REFERÊNCIAS.....	41

1 INTRODUÇÃO

A busca constante por antioxidantes naturais para produtos alimentícios, cosméticos e farmacêuticos vem representando um desafio para a pesquisa na área industrial. Com isso, a determinação de compostos fenólicos em alimentos de origem vegetal tem sido de grande interesse em pesquisas devido as suas propriedades antioxidantes. Esses compostos fenólicos são substâncias distribuídas na natureza e fazem parte de uma variedade de vegetais, frutas e produtos industrializados.

O método mais usado para a determinação de compostos fenólicos é o Método de Folin-Ciocalteu; o mecanismo básico desse método é uma interação de oxidação/redução. Contudo, este método pode levar a resultados inexatos, pois existe a possibilidade de interferentes de outros compostos não fenólicos, tais como o ácido ascórbico, proteínas e açúcares os quais também podem ser detectados, levando a erros positivos na determinação de compostos fenólicos.

Recentemente, a literatura disponibilizou trabalhos utilizando um novo método, chamado Fast Blue BB, o qual interage especificamente com compostos fenólicos, sem quantificar interferentes que são lidos quando se utiliza o método de Folin-Ciocalteu. Dentro deste contexto, o objetivo deste trabalho é validar o método Fast Blue BB, que utiliza sal de diazônio Azul BB (FBBB), onde este grupo diazônio ($-N=N-$), reage com os compostos fenólicos, resultando na formação de complexos tipo “azo”, sob condições alcalinas, esses podem ser medidos em 420 nm.

A validação do método será feita utilizando os seguintes parâmetros: a especificidade/seletividade, a exatidão que compreende os ensaios de recuperação, precisão que compreende os ensaios de repetibilidade a linearidade/sensibilidade, e os limites de detecção e de quantificação.

1.1 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é validar o método espectrofotométrico via reagente Fast Blue BB para a determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais.

Para se atingir este objetivo geral, os seguintes objetivos específicos serão buscados:

i) validar o método Fast Blue BB em padrões de compostos fenólicos avaliando o método na presença de possíveis interferentes (ácido ascórbico, proteína e glicose);

ii) comparar os resultados de padrões com e sem estes interferentes utilizando os métodos de Folin- Ciocalteu e Fast Blue BB;

iii) comparar através dos dois métodos polpas de frutas que possuam ou não os interferentes na sua composição;

iv) comparar resultados, metodologias e custos das análises pelos dois métodos.

1.2 COMPOSTOS FENÓLICOS

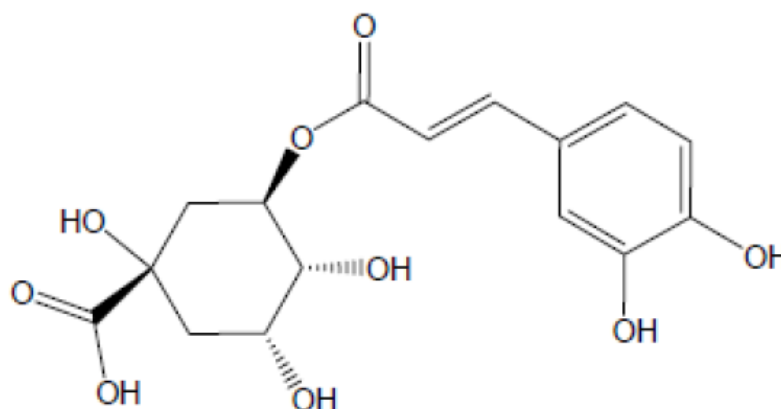
Quimicamente, os compostos fenólicos são um grupo de compostos com características estruturais fenólicas, definidos como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. Entre esses compostos destacam-se os flavonóides, ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos, ligninas tocoferóis, entre outros. Este grande grupo é dividido em classes de acordo com o número de anéis fenólicos e das estruturas que ligam estes anéis entre si (Neveu et al., 2010).

Numerosos efeitos biológicos estão descritos para estes compostos, como o combate a radicais livres, a modificação da atividade de algumas enzimas bem como o seu potencial como agente antibiótico, anti-alérgico e anti-inflamatório. De uma forma geral, esses compostos podem

proteger os constituintes celulares da sua oxidação e, assim, limitar o risco de várias doenças associadas à degeneração por oxidação. (D'Archivio, et al., 2007).

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos é determinada pela sua habilidade de desativar radicais livres, doar átomos de hidrogênio ou elétrons, ou complexar cátions metálicos. As principais fontes de compostos fenólicos são bebidas como chá verde, vinho tinto e café. Já em alimentos, são encontrados principalmente em frutas e vegetais como beterraba, ameixa, cereja, açaí, uva, maçã entre outras. A figura 1 mostra um exemplo de compostos fenólicos e sua estrutura. O ácido clorogênico, encontrado por Payen, em 1846, nos grãos de café (CARVALHO, GOSMANN e SHENKEL, 2001).

Figura 1: Estrutura do ácido clorogênico



Fonte: TOSS, 2010

A importância de determinar compostos fenólicos em alimentos está diretamente relacionada ao potencial antioxidante destes compostos e aos benefícios relacionados à ingestão de alimentos ricos nesses compostos. Entre as metodologias existentes para quantificação de compostos fenólicos em alimentos e bebidas destaca-se como a mais utilizada a determinação por espectrofotometria utilizando o reagente Folin-Ciocalteu. Mais recentemente, o método espectrofotométrico utilizando o reagente Fast Blue BB também sido

empregado. Como esses dois métodos serão os utilizados no presente trabalho, eles serão discutidos com maiores detalhes a seguir.

1.3 MÉTODO FOLIN-CIOCALTEU

O conteúdo de compostos fenólicos é usualmente determinado utilizando o método colorimétrico Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965) que envolve a redução do reagente pelos compostos fenólicos das amostras em concomitante formação de um complexo de coloração azul, cuja intensidade aumenta linearmente no comprimento de onda a 765 nm.

A colorimetria do método de Folin-Ciocalteu é baseada na redução química do reagente, composto por uma mistura de ácidos de tungstênio e molibdênio. Os produtos da reação são óxidos de tungstênio e molibdênio de coloração azul e apresentam alta absorção de luz, tendo sua absorbância máxima no comprimento de onda de 765 nm, sendo que a intensidade da absorção de luz neste comprimento de onda é proporcional à concentração de compostos fenólicos (WATERHOUSE 2002).

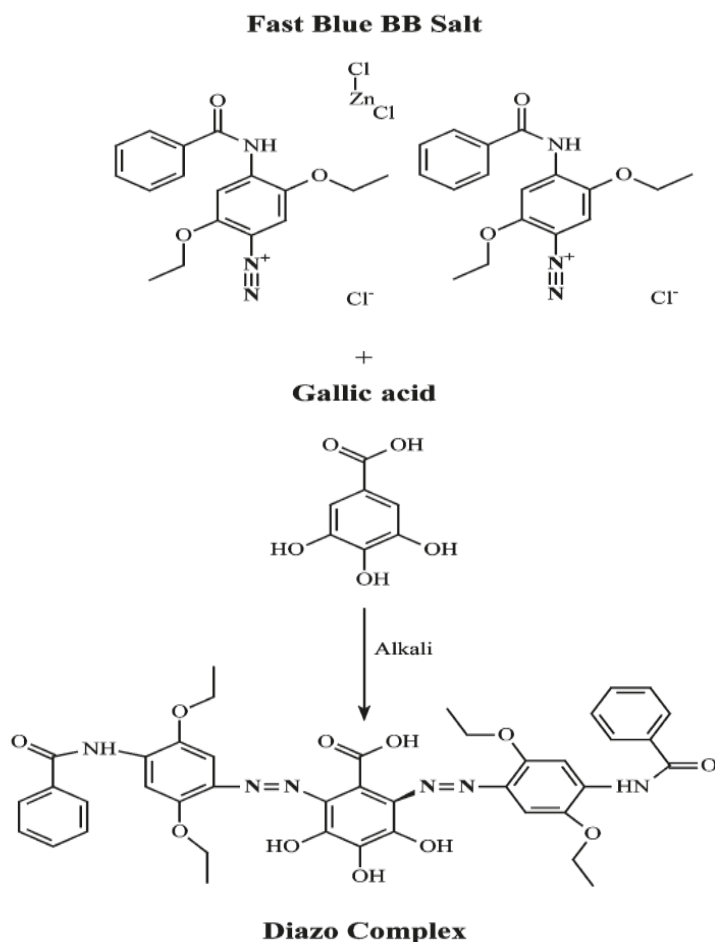
Como a metodologia é baseada na redução do próprio reagente Folin-Ciocalteu por compostos fenólicos e na composição de alimentos existem outras substâncias redutoras, essa metodologia pode "superestimar" o teor de compostos fenólicos em alimentos.

1.4 MÉTODO FAST BLUE BB

A técnica conhecida como Fast Blue BB (FBBB) é um método baseado na reação do sal de diazônio e os compostos fenólicos, a qual ocorre em meio alcalino, resultando na formação de complexos tipo "azo" (Figura 2), quantificados por espectrofotometria em 420 nm. A principal vantagem da

técnica consiste na eliminação de possíveis interferentes não fenólicos, atuantes na metodologia de Folin-Ciocalteu já que utiliza mecanismo de reação diferente (MEDINA, 2011a).

Figura 2: Interação proposta entre ácido gálico e sal de diazônio (FBBB)



Fonte: Medina, 2011a.

O complexo diazo é obtido através de uma reação de acoplamento azo, uma substituição eletrofílica aromática. Os reagentes são um sal de diazônio aromático, o FBBB, que contém o cátion arenodiazônio representando o eletrófilo (E⁺) e um composto aromático ativado, rico em elétrons, devido à presença de grupamentos - OH na estrutura, o composto fenólico como o ácido gálico. O meio reacional é alcalino para aumentar a densidade eletrônica do composto fenólico, facilitando o acoplamento azo.

O método FBBB surge como alternativa para determinação de compostos fenólicos reduzindo possíveis interferentes presentes no método Folin-Ciocalteu. Os interferentes, substâncias antioxidantes não fenólicas e substâncias redutoras tais como ácido ascórbico, glicose, entre outras, são aditivos alimentares comuns ou estão presentes naturalmente em sucos, frutas e vegetais; outros possíveis interferentes são aminoácidos (tirosina e triptofano) e proteínas contendo estes aminoácidos que também formam coloração azul com reagente de Folin-Ciocalteu (PETERSON, 1979,1983).

Como a metodologia FBBB utiliza mecanismo de reação que se restringe às reações entre o sal diazônio e compostos aromáticos reativos, como compostos fenólicos, a interferência que se tinha na metodologia FC não estará presente nesse método.

1.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODO

Validação do método analítico é a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos (NBR ISO/IEC 17025, 2001).

A validação do método analítico permite demonstrar que o método é "adequado ao uso" pretendido e que seus resultados são confiáveis. Os parâmetros de validação devem estar claramente declarados e podem ser: especificidade e seletividade, linearidade, faixa de trabalho e faixa linear de trabalho, sensibilidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e tendência, precisão, robustez e incerteza de medição (INMETRO, 2007).

Vários artigos e revisões têm sido publicados a respeito de validação de métodos analíticos, os quais descrevem definições, procedimentos, parâmetros e estratégias de validação. Dentro desse âmbito geral de validação de métodos, é possível distinguir dois tipos: o primeiro, chamado de validação no laboratório ("in house validation"), consiste das etapas de validação dentro de um único laboratório, seja para validar um método novo que tenha sido desenvolvido localmente, ou para verificar que um

método adotado de outras fontes está bem aplicado. A validação no laboratório é utilizada nas etapas preliminares do desenvolvimento de uma metodologia e na publicação de artigos para revistas científicas, em que são avaliadas todas as características de desempenho da validação da metodologia, porém sem verificar a reprodutibilidade.

O segundo tipo, a validação completa, envolve todas as características de desempenho e um estudo interlaboratorial que é utilizado para verificar como a metodologia se comporta com uma determinada matriz em vários laboratórios, estabelecendo a reprodutibilidade da metodologia e a incerteza expandida associada à metodologia como um todo. Só assim a metodologia pode ser aceita como uma nova metodologia oficial para uma determinada aplicação (RIBANI; BOTTOLI; MELO, 2004).

Um dos parâmetros avaliados numa validação é a linearidade, que corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação. A exatidão de um método representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. Para avaliação da exatidão, normalmente se utiliza ensaio de recuperação. Recuperação é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada.

A precisão de um método representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. A precisão da metodologia aplicada é avaliada por repetitividade. A repetitividade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Para que a comparação entre os dois métodos fosse realizada, as amostras (padrões de compostos fenólicos, misturas de padrões e polpas de frutas) foram tratadas pelos dois métodos: Folin-Ciocalteu e Fast Blue BB, bem como foi realizada validação dos dois métodos separadamente.

2.1 REAGENTES

Os padrões ácido gálico, ácido 5-cafeoilquínico (ácido clorogênico -CGA), ácido ascórbico, albumina sérica bovina (BSA) e os reagentes de Folin-Ciocalteu 2N e Fast Blue BB [sal cloreto heme(cloreto de zinco) 4-benzoilamino-2,5-dietoxibenzenodiazônio] foram adquiridos da Sigma Aldrich. Além destes, foram utilizados os seguintes reagentes: hidróxido de sódio, carbonato de sódio, glicose anidra e a água ultrapura foi coletada do sistema de filtração com membranas (Marca Millipore, modelo DirectQ3). As polpas de abacaxi, acerola e açaí (marca Mais Fruta) foram adquiridas no comércio local.

2.2 METODOLOGIAS

As duas metodologias consistem em uma série de adições de reagentes em um meio reacional que após tempo de reação é analisada no espectrofotômetro. A metodologia FC consiste em preparar um meio reacional conforme esquema abaixo (figura 3). A metodologia FBBB utilizada como referência neste trabalho está esquematizada na figura 4. Entretanto, para tornar o trabalho em laboratório mais prático e trabalharmos com mesmo volume final de meio reacional nas duas metodologias, o método FBBB foi modificado e está esquematizado na figura 5. Vale ressaltar que a modificação

não alterou as concentrações de cada reagente no meio reacional, apenas além de alterar volume final do meio reacional, o tempo de leitura estabelecido após os testes de estabilidade ao longo do tempo feito com as duas metodologias foi alterado.

Figura 3:reparo do meio reacional metodologia Folin-Ciocalteu

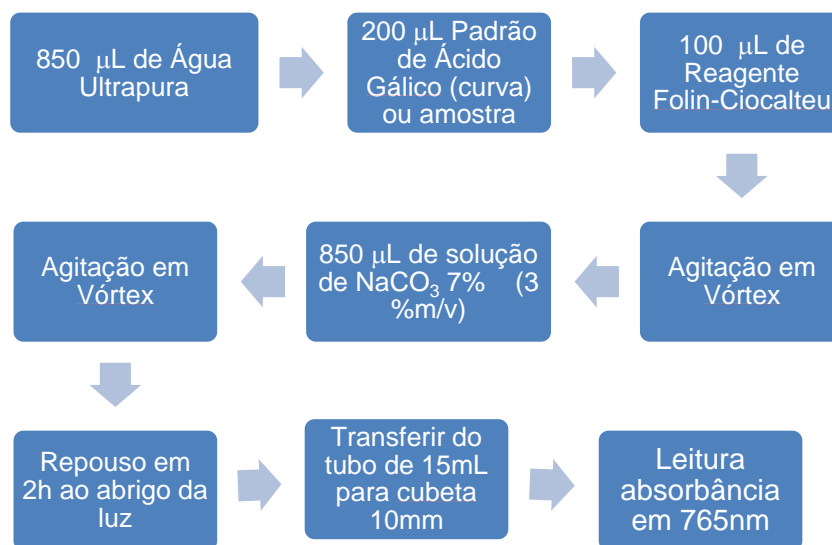


Figura 4: Preparo do meio reacional metodologia FBBB de referência

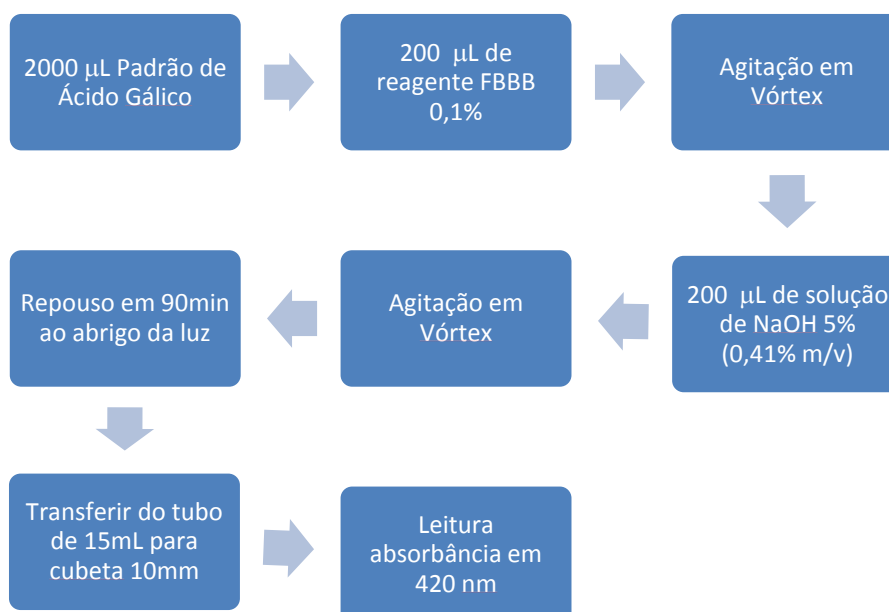
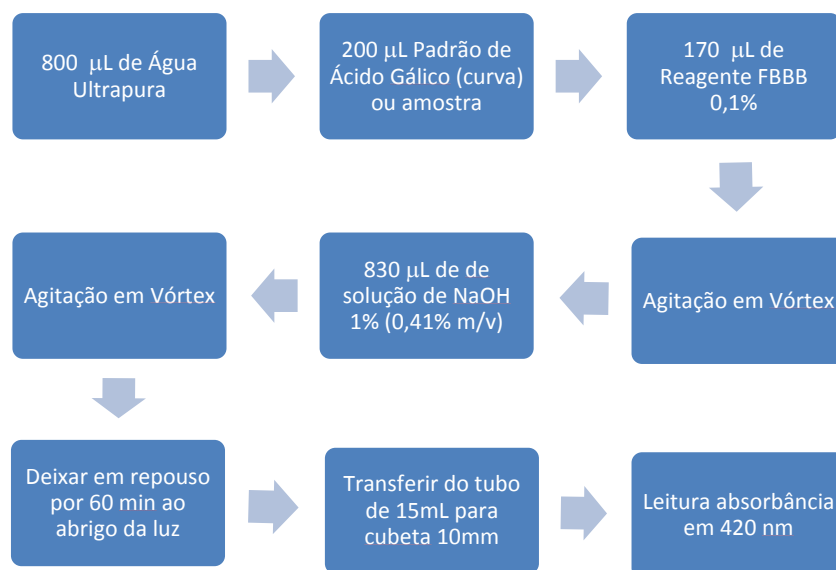


Figura 5: Preparo meio reacional FBBB



2.3 VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS FOLIN-CIOCALTEU E FAST BLUE BB

2.3.1 Estabilidade da absorbância ao longo do tempo

O método de determinação de compostos fenólicos via Fast Blue BB, utilizado como referência nesse trabalho, utiliza uma solução de hidróxido de sódio 5% para manter o meio reacional alcalino (Medina, 2011b). Como as curvas analíticas preparadas inicialmente apresentaram um comportamento não linear em concentrações acima de 85 mg/L de ácido gálico, consideramos importante avaliar o comportamento da absorbância ao longo do tempo utilizando diferentes pHs. Foram avaliadas as soluções de hidróxido de sódio 5% (pH do meio reacional = $13,01 \pm 0,07$), hidróxido de sódio 0,1% (pH do meio reacional = $11,25 \pm 0,03$) e o carbonato de sódio 7% (pH do meio reacional = $11,71 \pm 0,04$).

A mistura reacional via Fast Blue BB foi preparada em tubo de centrífuga de 15 mL contendo os seguintes reagentes (volume final de 2400 µL): 2000 µL do padrão de ácido gálico preparado e diluído em água ultrapura

(7 concentrações, entre 10 e 150 mg/L), 200 μ L do reagente Fast Blue BB 0,1% e 200 μ L da solução de hidróxido de sódio 5% ou hidróxido de sódio 0,1% ou carbonato de sódio 7%. Logo após o preparo, o meio reacional foi transferido para cubeta de policarbonato de 10 mm e o sinal de absorbância a 420 nm foi lido a cada 5 minutos, em um período total de 2 horas, utilizando o espectrofotômetro PG Instruments (Modelo T80). Os ensaios de estabilidade foram correspondem a um experimento.

A mistura reacional via Folin-Ciocalteu foi preparada em tubo de centrífuga de 15 mL contendo os seguintes reagentes (volume final de 2000 μ L): 850 μ L de água ultrapura, 200 μ L do padrão de ácido gálico preparado e diluído em água ultrapura (7 concentrações, entre 1 e 9 mg/L), 100 μ L do reagente de Folin-Ciocalteu e 850 μ L da solução de carbonato de sódio 7% (3%, m/v). Logo após esse preparo, o meio reacional foi transferido para cubeta de policarbonato de 10 mm e o sinal de absorbância a 765 nm foi lido a cada 5 minutos, em um período total de 150 minutos. Os ensaios de estabilidade foram correspondem a um experimento.

Para todos os outros ensaios realizados o meio reacional do método Folin-Ciocalteu foi mantido como descrito acima. No entanto, para o método Fast Blue BB o volume de cada reagente foi modificado, tomando o cuidado de manter a mesma concentração de cada reagente. Essa modificação foi realizada com o objetivo de tornar mais prático o preparo do meio reacional. O meio reacional é o seguinte (volume final de 2000 μ L): 800 μ L de água ultrapura com baixa condutividade, 200 μ L da amostra, 170 μ L do reagente de Fast Blue BB 0,1% e 830 μ L da solução de hidróxido de sódio 1% (0,41%, m/v). Os ensaios de estabilidade foram correspondem a um experimento.

2.3.2 Linearidade, Recuperação, Repetibilidade, Limite de Detecção e de Quantificação

A construção da curva analítica do FC foi feita utilizando padrão de ácido gálico, obtendo-se o sinal de resposta (absorbância) como função da concentração conhecida do analito (em mg/L). Primeiramente, uma solução estoque de 5000 mg/L de ácido gálico em água ultrapura foi preparada. A partir de diluições da solução estoque, foram preparadas as seguintes concentrações: 1, 2, 3, 5, 7, 8 e 9 mg/L. Através de análise de regressão linear foram analisados os parâmetros "a" (coeficiente angular), "b" (coeficiente linear) e o coeficiente de determinação (r^2).

A repetibilidade e a recuperação foram analisadas em três concentrações de ácido gálico (1,5; 6 e 7,5 mg/L) determinadas em triplicata. Ao longo de todos os ensaios, uma solução de 5 mg/L, ponto médio da curva analítica, foi analisada para se ter um controle de qualidade do método. A exatidão desta metodologia foi avaliada mediante ensaios de recuperação nas concentrações de ácido gálico próximas ao limite inferior da curva, ao ponto médio e ao limite superior da curva analítica. Os limites de detecção e quantificação foram obtidos utilizando os parâmetros da curva analítica. O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram calculados através das seguintes equações, respectivamente:

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{S}$$

$$LQ = 10 \times \frac{s}{S}$$

Onde "s" é o erro padrão e "S" o coeficiente angular (inclinação da curva).

No método FBBB, a construção da curva analítica foi feita de maneira idêntica ao do FC, com concentrações de 10, 25, 35, 40, 65, 75 e 85 mg/L de padrão de ácido gálico em água ultrapura. Da mesma maneira, a linearidade, recuperação e repetibilidade foram determinadas. A exatidão do método foi avaliada por ensaios de recuperação de concentrações de 15, 50 e

80 mg/L de ácido gálico. Na avaliação de precisão do método, foi avaliada a repetibilidade de uma amostra controle de concentração de 55 mg/L. O valor p foi utilizado para verificar se a equação de regressão é estatisticamente significativa.

2.3.3 Estabilidade da solução de Fast Blue BB 0,1%

A massa de 0,1 g de sal de Fast Blue BB foi pesada diretamente em balão volumétrico de 100 mL e solubilizada em água ultrapura no ultrassom (Banho de ultrassom, marca Unique, modelo USC-1600A). Frações de 250 μ L foram transferidas para microtubos, armazenados em freezer a -18^oC por 22 dias. A estabilidade do reagente Fast Blue BB 0,1% foi monitorada semanalmente através da reação com a solução padrão de ácido gálico na concentração de 55 mg/L. Durante todo o estudo de estabilidade, a solução foi mantida ao abrigo da luz.

2.3.4 Análise Estatística

Os resultados das análises das misturas de padrões e das polpas de frutas foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância utilizando o software Statistica® 8.

2.4 ESTUDO DA INTERFERÊNCIA DO ÁCIDO ASCÓRBICO, AÇÚCAR E PROTEÍNA NOS MÉTODOS FAST BLUE BB E FOLIN CIOCALTEU

Foram preparadas soluções de ácido 5-cafeiolquínico (CGA), ácido ascórbico (AA), glicose, albumina, todas em água ultrapura, e analisadas no método FC e FBBB. Para o padrão de ácido clorogênico (CGA), na metodologia FBBB, as amostras foram analisadas em concentrações entre 30 e 80 mg/L e na metodologia FC foram analisadas concentrações entre 3,6 e 10 mg/L. A albumina foi testada a fim de saber se as proteínas interferem na determinação de compostos fenólicos totais nestas metodologias. As concentrações analisadas de albumina para o FC foram entre 70 a 250 mg/L e para FBBB entre 530 mg/L a 3.500 mg/L. O padrão de glicose também foi solubilizado em água ultrapura e, para as duas metodologias, a concentração testada foi de 1.030 mg/L. Com o padrão de ácido ascórbico (AA), a concentração de 500 mg/L foi testada no método FBBB. No método FC, AA foi analisado numa faixa de concentração de 2,5 a 10 mg/L. As soluções de partida dos padrões foram preparadas em duplicata e os ensaios de reação correspondem a dois experimentos independentes, realizados em triplicata. Nas duas metodologias, os resultados finais foram expressos em mg EAG.g⁻¹ de padrão.

Num segundo teste, foram avaliadas misturas de padrões com concentração fixa de ácido clorogênico para avaliar comportamento dos interferentes. Em ambas as misturas, CGA mais albumina e CGA mais ácido ascórbico, e no padrão de CGA a concentração de ácido clorogênico foi de 3,7 mg/L para o método Folin-Ciocalteu e de 30,7 mg/L na metodologia Fast Blue BB.

2.5. DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM POLPAS DE FRUTAS VIA FAST BLUE BB E FOLIN CIOCALTEU

As polpas escolhidas foram polpas de frutas comerciais da marca "Mais Fruta", embalagem de 400 g contendo 4 pacotes de 100 g cada. As frutas escolhidas foram abacaxi, acerola e açaí. A escolha de cada fruta foi baseada na composição das mesmas em relação a estes interferentes. Abacaxi não apresenta quantidades significativas de proteína nem ácido ascórbico. A acerola é rica em vitamina C devido a ter grande concentração de ácido ascórbico na sua composição e o açaí apresenta quantidades significativas de proteína na sua composição. As amostras eram todas armazenadas em freezer a -18°C , conforme recomendação da embalagem. Na hora da análise, foram descongeladas, homogeneizadas sob agitação e centrifugadas (Centrífuga Cientec, modelo C6000R). O preparo das polpas recomendado na embalagem foi seguido para polpa de acerola e açaí, pesando 10 g de polpa e adicionando 20 mL de água ultrapura. A polpa de abacaxi não foi solubilizada em água e sim utilizada "in natura", já que nos primeiros testes, quando solubilizada com 20 mL de água ultrapura, não apresentou sinal de absorvância. As amostras foram centrifugadas por 5 minutos, a uma velocidade de 3306G e a 10°C . O sobrenadante foi coletado e filtrado em membrana PVDF de $0,45\ \mu\text{m}$ de poro.

Na metodologia Fast Blue BB, a polpa de abacaxi foi analisada na concentração de 100.000 mg/L e a polpa de acerola foi analisada na faixa de concentração de 10.050 a 16.750 mg/L. Para o açaí, a faixa de concentração analisada foi de 3.360mg/L a 16.800mg/L. Para as três polpas de frutas utilizadas foram realizados ensaios sem a adição do reagente Fast Blue BB no meio reacional e avaliada a absorvância. Para as polpas de acerola e açaí os resultados dessa absorvância sem o reagente FBBB foram descontados do sinal de absorvância com o reagente. Já na metodologia Folin-Ciocalteu, a polpa de abacaxi foi analisada na faixa de concentração de 3.340mg/L a 12.500mg/L. A polpa de acerola no FC foi analisada na faixa de concentração

de 3.465mg/L a 6.700mg/L, a polpa de de açaí na faixa de concentração de 7.470mg/L a 21.000mg/L.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

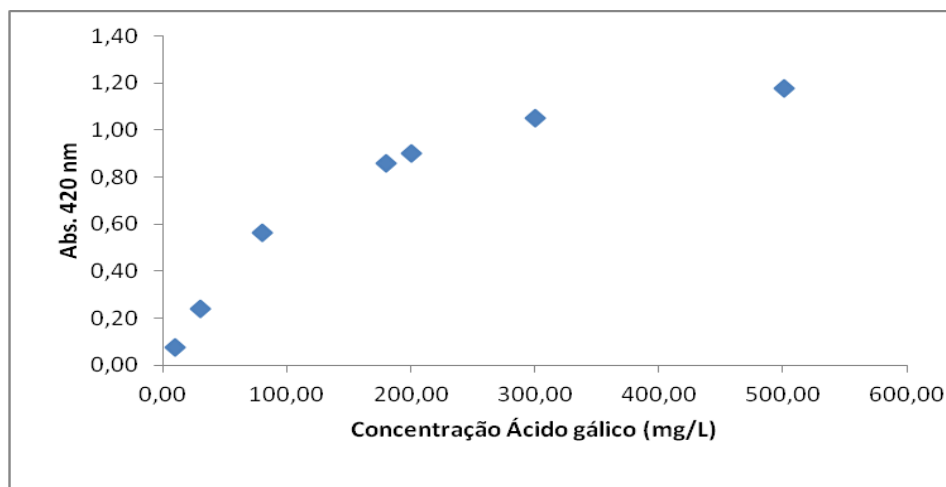
Os ensaios deste trabalho tiveram a seguinte sequência: validação, testes com padrões de compostos fenólicos utilizando a curva de ácido gálico e ensaios com as amostras de polpas de frutas. Essa sequência foi simultaneamente realizada para os dois métodos em estudo, pois o objetivo era a comparação dos resultados com e sem a presença dos interferentes.

3.1 VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS FAST BLUE BB E FOLIN CIOCALTEAU

3.1.1 Estabilidade da absorvância ao longo do tempo

O método de determinação de compostos fenólicos via Fast Blue BB foi inicialmente reproduzido de acordo com o trabalho de Medina (2011b), através do preparo da curva analítica com ácido gálico. As curvas analíticas apresentaram um comportamento não linear em concentrações acima de 85 mg/L (Figura 6). Esse tipo de comportamento fica evidenciado com valor de r^2 de 0,813 ao considerar toda faixa de concentração do gráfico da figura 3. Na faixa de concentração de 10 a 85 mg/L o valor de r^2 é de 0,997, comprovando que nessa faixa a curva é linear. No método Fast Blue BB, os íons diazônio aromáticos acoplam-se aos compostos fenólicos em solução levemente alcalina, pois nessas condições os compostos fenólicos são convertidos a íon fenóxido (ArO^-) que é mais reativo (Medina, 2011a). Foram feitos testes avaliando meios reacionais diferentes para metodologia FBBB para avaliar se ao modificar o pH do meio reacional a reação se mostra mais favorável.

Figura 6: Curva de calibração do ácido gálico - metodologia FBBB: perda de linearidade



Na figura 7 estão representados os diferentes meios reacionais testados para o método Fast Blue BB. Nota-se na figura 7b, que a reação é mais lenta utilizando meio reacional NaOH 0,1% (pH 11,25), sendo que o sinal de absorvância surgiu somente após 80 minutos de reação (a absorvância lida anteriormente foi negativa). Na figura 7c, meio reacional NaOH 5% (pH 13,01), a solução de ácido gálico de 150 mg/L alcançou valor de 0,5 unidades de absorvância em cerca de 20 minutos enquanto que no meio reacional com NaOH 0,1% (pH 11,25) demorou cerca de 180 minutos. No meio reacional em Na₂CO₃ 7%, figura 7a, o sinal demorou um tempo maior para estabilizar quando comparado ao meio com NaOH 5%. Observou-se que o ácido gálico de concentração de 50 mg/L leva cerca de 120 minutos para estabilizar quando em Na₂CO₃ 7%, enquanto que em meio reacional com NaOH 5% estabiliza em cerca de 60 minutos.

No teste do meio reacional de hidróxido de sódio 5%, as absorvâncias de concentrações de 10 a 150 mg/L foram observadas por duas horas a cada 5 minutos. Observa-se que a curva perde linearidade a partir de concentrações acima de 85 mg/L de ácido gálico e acima de 0,8 unidades de absorvância, avaliando a reação em 60 minutos. Para o teste utilizando o meio reacional com Na₂CO₃ 7%, observa-se um comportamento linear em

concentrações de até 50 mg/L de ácido gálico após 80 minutos de reação (Figura 7a). No teste utilizando meio reacional de NaOH 0,1%, não apresenta linearidade em nenhum tempo de reação e concentração testados (Figura 7b).

Figura 7: Método Fast Blue BB com diferentes meio reacionais

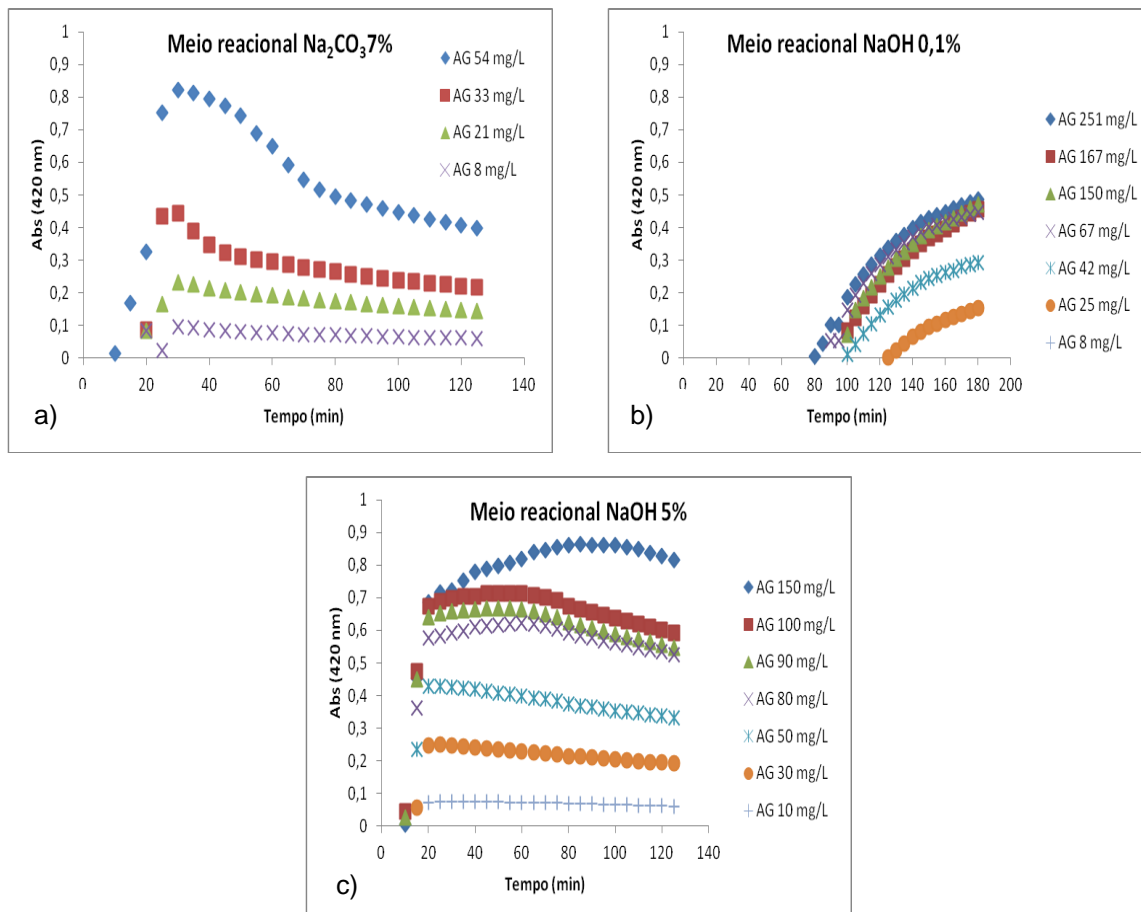


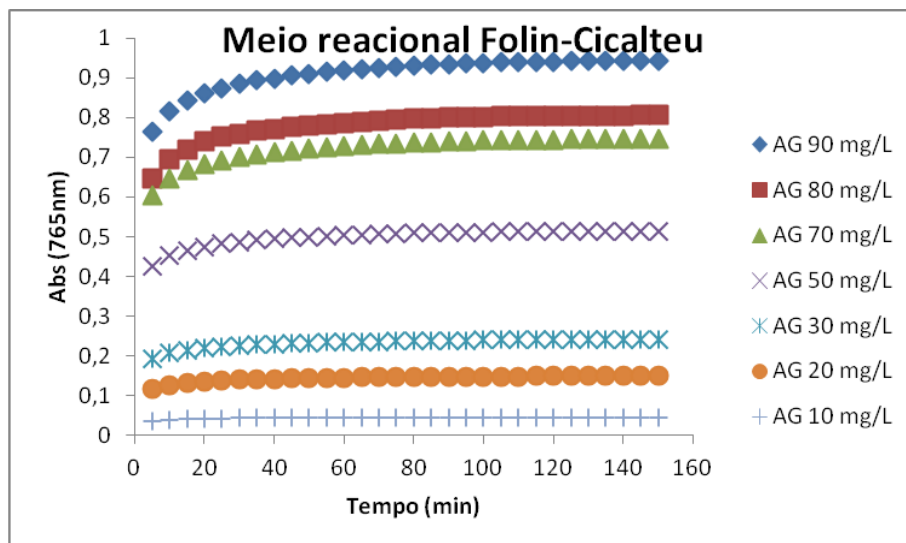
Tabela 1: Avaliação da linearidade da curva analítica de ácido gálico pela metodologia FBBB em meio reacional NaOH 5% em função do tempo

Tempo (minutos)	a (coef.angular)	b (coef.linear)	r ² (coef. de determinação)
30	0,0069	0,036	0,988
60	0,0072	0,015	0,994
90	0,0066	0,013	0,993
120	0,0061	0,014	0,991

De acordo com o método Fast Blue BB utilizado como referência (Medina, 2011b) o tempo de reação utilizando NaOH 5% é de 90 minutos. Ao avaliar o comportamento da absorbância ao longo do tempo (Figura 7c) percebe-se que no tempo de 60 minutos a absorbância do ácido gálico em concentrações inferiores a 100 mg/L é máxima; devido a isso, a sensibilidade do método provavelmente será maior em 60 minutos de reação. Isso pode ser confirmado pelo maior valor de coeficiente angular (Tabela 1). Portanto, o tempo de reação utilizado no método Fast Blue foi de 60 minutos, sendo que o tempo de leitura estabelecido será de, no máximo, 10 minutos, para manter a repetibilidade entre as leituras.

O teste de estabilidade no FC e os dados obtidos para este teste estão mostrados na Figura 5. Através da observação destes dados, foi decidido utilizar para o método Folin-Ciocalteu o tempo de 60 minutos de reação. No método original do Folin-Ciocalteu, a absorbância é lida em 120 minutos, entretanto o teste de estabilidade mostrou que o sinal de absorbância está estável em 60 minutos para todas as concentrações de ácido gálico. Os ensaios de estabilidade no método Folin-Ciocalteu mostraram que o método é linear até absorbância de 1.

Figura 8: Avaliação do sinal de ácido gálico no meio reacional Na_2CO_3 7% em função do tempo pela metodologia FC



Ao avaliar o comportamento da absorbância ao longo do tempo (Figura 8) observou-se concentrações estáveis já em 60 minutos de reação e isso pode ser confirmado pelos valores de coeficiente angular (Tabela 2). O tempo de leitura estabelecido será de, no máximo, 10 minutos, para manter a repetibilidade entre as leituras.

Tabela 2: Avaliação da linearidade da curva de calibração de ácido gálico pela metodologia FC em meio reacional Na_2CO_3 7% em função do tempo

Tempo (minutos)	a	b	r^2
30	0,1061	-0,069	0,996
60	0,1102	-0,073	0,996
90	0,1120	-0,074	0,997
120	0,1127	-0,075	0,997
150	0,1130	-0,075	0,997

3.1.2 Linearidade, Recuperação, Repetibilidade, Limite de Detecção e de Quantificação

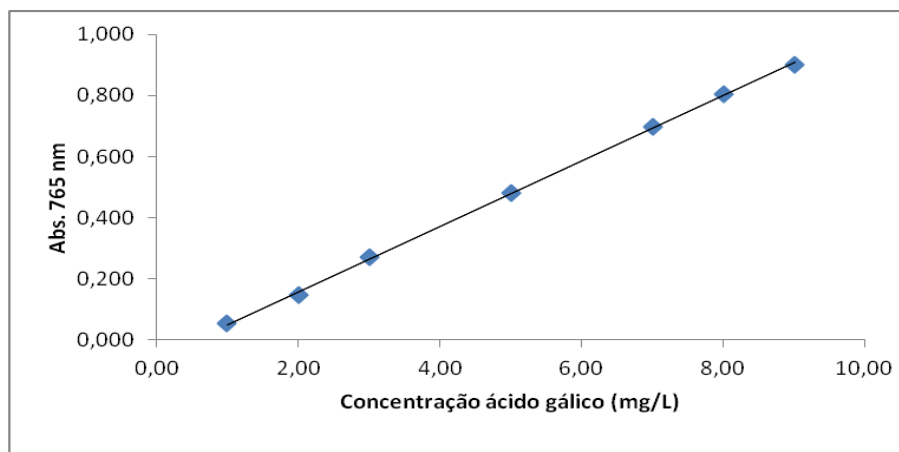
Para o método FC foi feita a análise de regressão linear e obteve-se uma reta com $r^2 = 0,999$ (Figura 9). A tabela 3 apresenta os dados de cada replicata da curva e os dados da análise de regressão linear. Os valores de erro padrão e valor p foram, respectivamente de 0,005 e $8,15 \times 10^{-20}$, obtidos através de análise de regressão linear. O limite de detecção (LD), valor que representa a menor concentração de ácido gálico que pode ser detectada pela análise foi de 0,16 mg/L e o limite de quantificação (LQ), que é a menor concentração que pode ser quantificada pelo método, foi de 0,48 mg/L. LD e LQ foram calculados utilizando método da curva analítica.

Ao longo de todas as análises por esse método, desde o preparo da curva, no teste com padrões e amostras, foi analisada uma amostra de "controle de qualidade" de concentração de 5 mg/L, que apresentou variação máxima na resposta de 5,20%.

Tabela 3: Dados da Curva Analítica Ácido Gálico - método Folin-Ciocalteu

	a (coeficiente angular)	b (coeficiente Linear)	r^2 (Coeficiente de determinação)
Curva Analítica Folin 1	0,108	-0,063	0,999
Curva Analítica Folin 2	0,106	-0,052	0,999
Média curva analítica (Regressão Linear)	0,107	-0,058	0,999

Figura 9: Curva analítica do ácido gálico via método Folin-Ciocalteu



Os resultados de recuperação das três concentrações de ácido gálico (1,5; 6 e 7,5 mg/L) analisadas no método Folin-Ciocalteu estão representadas na tabela 4. Os resultados estão próximos de 100% e os intervalos aceitáveis de recuperação para análise estão na faixa de 70 a 120% com precisão de até 20%.

Tabela 4: Recuperação e repetibilidade avaliados em três níveis de ácido gálico pelo método Folin-Ciocalteu

Ácido gálico (mg/L)	Recuperação (%)	Repetibilidade (%)
1,5	109 ± 6	5,6
6	107 ± 2	2,1
7,5	104 ± 2	1,7

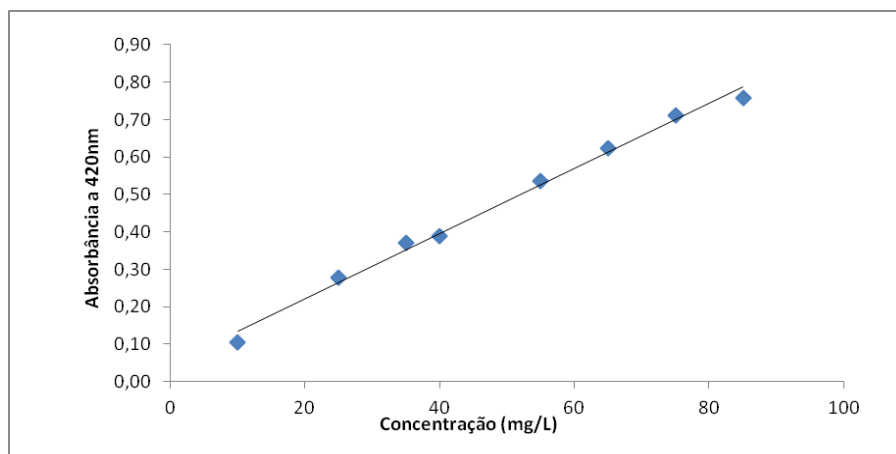
Para o método FBBB, a análise de regressão linear dos dados das triplicatas da curva forneceu um valor de r^2 de 0,983, que está representada na Figura 10. A tabela 5 apresenta os dados de cada replicata da curva e os dados da análise de regressão linear. Os valores de erro padrão e valor p foram, respectivamente de 0,013 e $5,36 \times 10^{-21}$, obtidos através de análise de

regressão linear. O limite de detecção pela análise foi de 5 mg/L e o limite de quantificação foi de 15 mg/L. Ao longo de todas análises por esse método, desde o preparo da curva, no teste com padrões e amostras foi analisada uma amostra de "controle de qualidade" de concentração de 55 mg/L, que apresentou variação máxima na resposta de 4,13%.

Tabela 5: Dados da Curva Analítica Ácido Gálico - método Fast Blue BB

	a (coeficiente angular)	b (Coeficiente Linear)	r² (Coeficiente de Correlação)
Curva Analítica Fast Blue BB 1	0,0087	0,0480	0,996
Curva Analítica Fast Blue BB 2	0,0085	0,0728	0,979
Curva Analítica Fast Blue BB 3	0,0084	0,0410	0,990
Média curva analítica (Regressão Linear)	0,0085	0,0539	0,983

Figura 10: Curva analítica da absorbância versus concentração de ácido gálico - método Fast Blue BB



Os resultados de recuperação das três concentrações de ácido gálico (15; 50 e 80 mg/L) analisadas no método Fast Blue BB estão representadas na tabela 6. Os resultados estão dentro da faixa aceitável de recuperação de 70 a 120%, com precisão de até $\pm 20\%$.

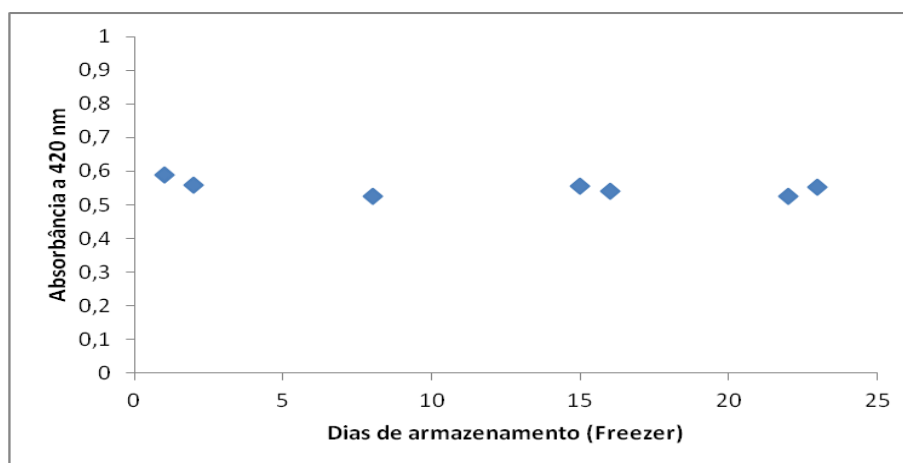
Tabela 6: Recuperação e repetibilidade avaliados em três níveis de ácido gálico pelo método Fast Blue BB

Ácido gálico (mg/L)	Recuperação (%)	Repetibilidade (%)
15	84 ± 8	9,5
50	101 ± 6	5,5
80	98 ± 2	2,2

3.1.3 Estabilidade da solução de Fast Blue BB 0,1%

A solução de Fast Blue BB 0,1% manteve-se estável ao longo dos 22 dias de armazenamento a -18°C (Figura 11), sendo a variação máxima na resposta de 4,2%.

Figura 11: Estabilidade do Fast Blue BB 0,1% armazenado a -180C durante 22 dias



3.2 ESTUDO DA INTERFERÊNCIA DO ÁCIDO ASCÓRBICO, AÇÚCARES E PROTEÍNA NOS MÉTODOS FAST BLUE BB E FOLIN CIOCALTEU

Os resultados, tanto no FC, quanto no FBBB, foram expressos em miligramas de equivalente ácido gálico por grama de padrão (mg EAG.g⁻¹ padrão) ou mg EAG em 100g de polpa de fruta, no caso das amostras de polpas. As análises foram realizadas em triplicata para os dois métodos.

Na determinação de ácido ascórbico para as duas metodologias, houve a comprovação de que, na determinação de compostos fenólicos pelo método FBBB, não há a interferência do AA, pois não houve reação com concentração máxima avaliada de 503 mg/L. Na determinação por FC, o resultado expresso em mg EAG/g⁻¹ g de ácido ascórbico foi de 806 para a concentração de 2,5 a 10 mg/L. Nos dois métodos não houve reação com padrão de glicose na concentração máxima de 1.030 mg/L e esse padrão não foi quantificado pelas metodologias. Na tabela 7 estão os resultados para os padrões nas duas metodologias

Tabela 7: Resultados da análise dos padrões pelos métodos Folin-Ciocalteu e Fast Blue BB

Padrão	Folin-Ciocalteu (mg EAG/g padrão)	Fast Blue BB (mg EAG/g padrão)
Ácido clorogênico	678 ± 24	878 ± 92
Ácido ascórbico	806 ± 44	NR (503 mg/L)
Albumina	31 ± 2	14,8 ± 0,6
Glicose	NR (5000 mg/L)	NR (1000 mg/L)

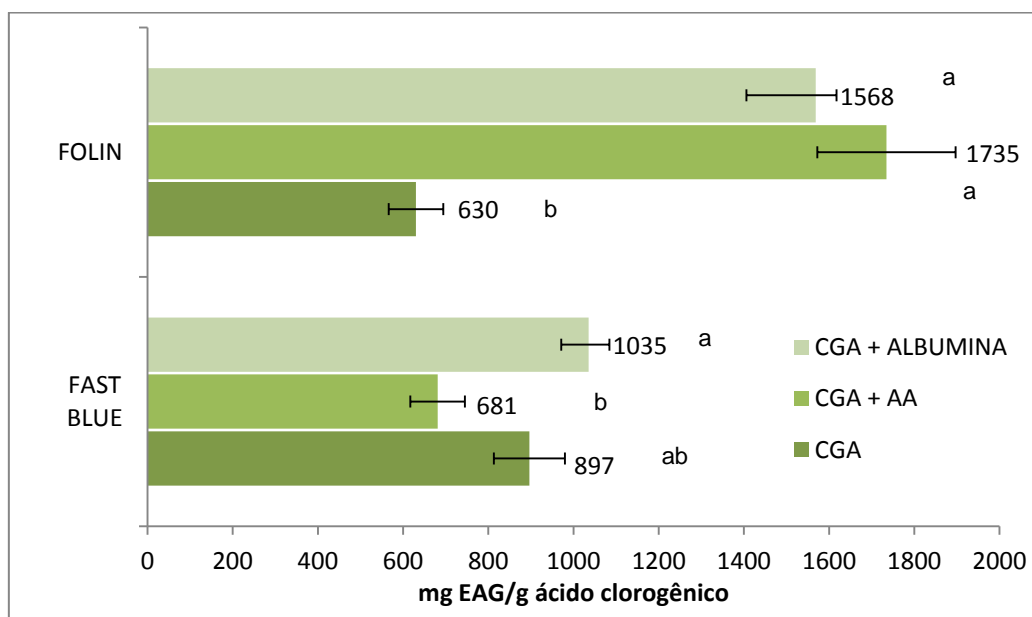
NR: não reagiu na concentração máxima avaliada, entre parênteses.

A figura 12 apresenta os resultados dos padrões, com exceção da glicose que não reagiu nas duas metodologias. Observa-se que os resultados para o ácido clorogênico no FBBB e no FC praticamente foram semelhantes aos obtidos no primeiro ensaio, onde se utilizaram apenas os padrões

separadamente. Entretanto, analisando os valores das misturas de padrões, nota-se que no método FC, a adição de albumina e de ácido ascórbico geraram valores de compostos fenólicos maiores, quando comparadas com o ácido clorogênico puro. Esses resultados comprovam que, tanto o ácido ascórbico quanto a albumina, são quantificados como compostos fenólicos na metodologia do FC.

Avaliando os resultados do FBBB, observa-se que a presença de ácido ascórbico ou de albumina em uma solução com CGA não gerou resultados maiores, sinalizando que o FBBB não sofre interferência na presença de AA e de albumina. Enquanto na metodologia FC, o resultado para a mistura de ácido clorogênico mais ácido ascórbico é cerca de três vezes maior que apenas ácido clorogênico e na mistura de ácido clorogênico e albumina é mais de duas vezes maior.

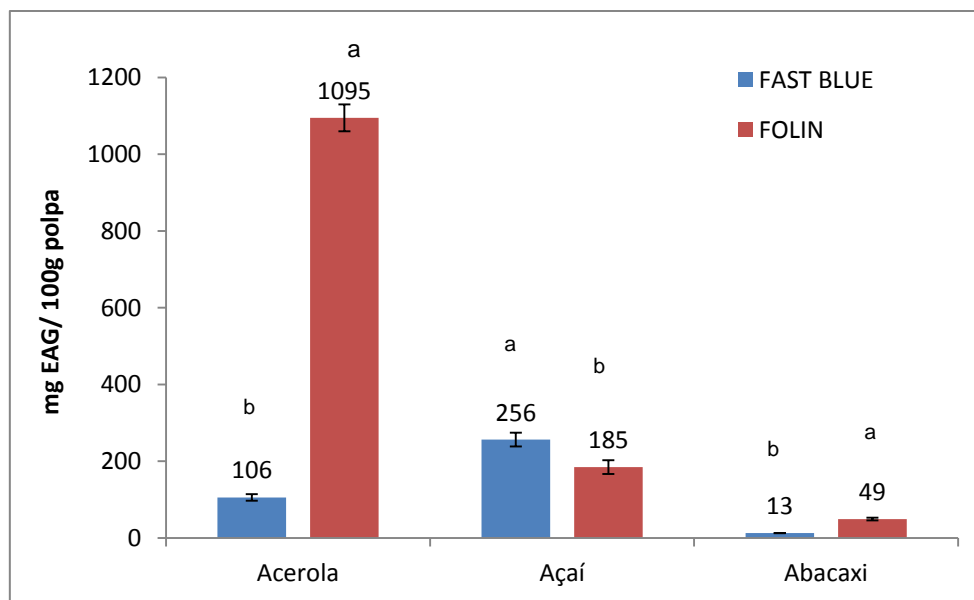
Figura 12: Comparativo das misturas de padrões nas duas metodologias



Os resultados correspondem à média das duplicatas \pm desvio padrão, expressos em mg de equivalente ao ácido gálico/g de ácido clorogênico. As médias com letras diferentes em um mesmo método indicam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

3.3 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM POLPAS DE FRUTAS VIA FAST BLUE BB E FOLIN CIOCALTEU

Figura 13: Comparação resultados em mg EAG/ 100g de polpa para cada metodologia



Os resultados correspondem à média das duplicatas \pm desvio padrão, expressos em mg de equivalente ao ácido gálico/100 g de polpa. As médias com letras diferentes em cada polpa indicam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Os resultados são expressos em mg EAG / 100g de polpa. A polpa de acerola, rica em ácido ascórbico, apresentou 1095mg EAG /100g polpa na metodologia FC, enquanto que para metodologia FBBB apresentou resultado de 106 mg EAG/ 100g polpa, comprovando mais uma vez que a metodologia FC quantifica ácido ascórbico como composto fenólico (Figura 13).

Na literatura que trata sobre a determinação de compostos fenólicos em polpas de frutas via UHPLC-MS/MS, os resultados de teor de compostos fenólicos seguem a seguinte tendência: quantidade de compostos fenólicos em açaí > acerola > abacaxi (BATAGLION, 2011). Os resultados das polpas avaliadas no presente trabalho usando a metodologia FBBB mostra a mesma tendência (Figura 13). Enquanto que na metodologia FC, a polpa de acerola é tida como a maior entre as três frutas estudadas para teor de

compostos fenólicos, mais uma vez evidenciando que pelo método de Folin-Ciocalteu ocorre uma superestimação do teor de compostos fenólicos frutas como a acerola devido ao conteúdo de ácido ascórbico presente.

4 AVALIAÇÃO ECONÔMICA

Avaliar os custos de cada metodologia também é importante na hora de substituição ou escolha entre os dois métodos; foram calculados os custos referentes ao preparo da curva, validação da curva e análise das amostras. Os custos referentes à energia, água ultrapura utilizada como solvente, custo de mão de obra (tempo demandado), tempo de reação (1 hora), vidraria e equipamentos são semelhantes para os dois métodos. Em função disso, o comparativo econômico pode ser feito a partir dos reagentes utilizados em cada metodologia.

Considerou-se para o cálculo comparativo dos custos a construção da curva analítica em triplicata e análise de uma amostra, por exemplo, uma amostra de polpa, em duplicata para uma determinada concentração. O preparo dos brancos para curva e análise de amostra foi contabilizado. Na metodologia FC, levou-se em conta o preço do reagente Folin-Ciocalteu e carbonato de sódio usado no meio reacional. Já na metodologia FBBB, levou-se em conta o custo do reagente de Fast blue BB e hidróxido de sódio, usado para alcalinizar meio reacional.

O custo do reagente Folin-Ciocalteu da Sigma Aldrich é maior que do reagente Fast Blue BB, também Sigma Aldrich. Além disso, o meio reacional, por utilizar carbonato de sódio, também ocasiona aumento dos custos na metodologia FC. Os preços dos reagentes utilizados nas metodologias estão mostrados na tabela 8.

Tabela 8: Preços dos reagentes utilizados nas duas metodologias

	CAS	Quantidade da embalagem	Preço (R\$)
Reagente Folin	10377-48-7; 7647-01-0; 766438-2; 10102-40-6; 10213-10-2	500 mL	544,00
Acido Gálico	149-91-7	1000 g	2.386,00
NaCO3	497-19-8	1000g	554,00
Corante Fast Blue BB	5486-84-0	1 g	108,00
NaOH	1310-73-2	1000g	690,00

4.1 CUSTOS DA METODOLOGIA FOLIN-CIOCALTEU

No cálculo de custo dessa metodologia, consideramos a construção da curva analítica que engloba preparo da solução estoque de ácido gálico de 5000 mg/L em triplicata, reação utilizando reagente Folin-Ciocalteu em cada ponto da curva preparada e carbonato de sódio 7% necessário em cada meio reacional. Cada replicata desta curva de sete pontos de concentração gera 21 tubos de ensaio com a reação mais os 2 tubos de ensaio de amostra branco; para calcular custo de análise amostra, foi considerada duplicata de uma determinada concentração de amostra, cada uma com triplicata de tubo de ensaio. Os valores respectivos a essas quantidades estão expressos na tabela 9.

Tabela 9: Quantidades usadas de cada reagente e custo consideradas para triplicata de curva analítica e triplicata de uma amostra - Método FC

Método Folin-Ciocalteu	Quantidade	Valor (R\$)	
Curva analítica	Ácido Gálico	0,125 g	0,89
	Carbonato de Sódio	1,4g	2,33
	Folin	2,3 ml	7,51
Amostra	Carbonato de Sódio	0,6g	0,33
	Folin	1,0ml	1,09
Valor Total		12,15	

4.2 CUSTOS DA METODOLOGIA FAST BLUE BB

No cálculo de custo dessa metodologia, consideramos a construção da curva analítica que engloba preparo da solução estoque de ácido gálico de 5000mg/L em triplicata, reação utilizando reagente FBBB em cada ponto da curva preparada e Hidróxido de sódio 1% necessário em cada meio reacional. Cada replicata desta curva de oito pontos de concentração gera 24 tubos de ensaio com a reação mais os 2 tubos de ensaio de amostra branco. Já para calcular custo de análise amostra, foi considerada duplicata de uma determinada concentração de amostra, cada uma com triplicata de tubos de ensaio. Os valores respectivos a essas quantidades estão expressos na tabela 10.

Tabela 10: Quantidades usadas de cada reagente e custo consideradas para triplicata de curva analítica e triplicata de uma amostra - Método FBBB

Método Fast Blue BB		Quantidade	Valor (R\$)
Curva analítica	Ácido Gálico	0,125 g	0,30
	Hidróxido de Sódio	0,22g	0,15
	Fast Blue BB	0,0044g	0,48
Amostra	Hidróxido de Sódio	0,083g	0,06
	Fast Blue BB	0,0017g	0,18
		Valor Total	3,02

Pela análise dos resultados, observa-se que a utilização da metodologia do Fast Blue BB se diferencia em termos de custo, já que nessa comparação o custo é quatro vezes mais baixo que na metodologia Folin-Ciocalteu. Entretanto, é necessária a utilização de amostras mais concentradas que na metodologia FC, sendo um ponto a ser considerado. Em relação aos custos envolvendo tratamento dos resíduos gerados nas duas metodologias, pode-se dizer que são praticamente os mesmos já que os volumes gerados são similares e as concentrações de reagentes são muito baixas.

5 IMPACTO AMBIENTAL

A utilização do método FBBB não provoca um impacto ambiental maior do que o que ocorre com método FC. Os resíduos dos dois métodos devem sofrer o mesmo destino que é incineração.

Deve-se considerar que o reagente de sal de diazônio Fast Blue BB possui carcinogenicidade categoria II (possivelmente cancerígeno para humanos e comprovadamente cancerígeno para animais), conforme sua ficha de informações de segurança de produtos químicos. Porém, a concentração de Fast Blue utilizada é mais de 500 vezes menor que a do reagente Folin-Ciocalteu. Os equipamentos de proteção individual necessários são os mesmos que na utilização do Folin-Ciocalteu, visto que esse reagente também apresenta riscos à saúde humana.

6 CONCLUSÃO

O método de determinação de compostos fenólicos Fast Blue BB com utilização de hidróxido de sódio, absorvância medida a 420 nm depois de transcorridos 60 minutos de reação, se mostrou método rápido, simples e evidenciou a eliminação de interferentes presentes no método Folin-Ciocalteu. O método quantifica compostos fenólicos em alimentos, sucos e polpas de frutas. No presente estudo de comparação, foi observado que o método FC sofre grande interferência na determinação de compostos fenólicos, provavelmente superestimando a concentração de fenólicos em amostras contendo ácido ascórbico, por exemplo. A diferença operacional dos dois métodos é muito pequena, exigem mesmas vidrarias de laboratório, mesmo tempo de reação e em mesmas condições. Apesar de que no método FBBB é necessário usar uma concentração de amostra cerca de oito vezes maior do que no método via FC para obter o mesmo sinal de absorvância. Quanto ao custo por análise, o método FBBB se mostrou mais barato que o do Folin-Ciocalteu. Assim, o método Fast Blue BB se mostrou um método barato e de reagente estável, podendo substituir o método FC para eliminação dos interferentes envolvidos. A validação da metodologia FBBB foi feita na faixa de concentração linear de 10 a 85mg/L de ácido gálico com coeficiente de determinação (r^2) de 0,983. Os dados de recuperação de concentrações próximas ao limite inferior, limite superior e ponto médio das curvas foram dentro da faixa estabelecida pela literatura.

REFERÊNCIAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Acreditação de Laboratórios**: NBR 17025. Rio de Janeiro, 2005. 31p.
- BATAGLION G. A.; SILVA F. M. A.; EBERLIN M. N.; KOOLEN H. H. F. **Determination of the phenolic composition from Brazilian tropical fruits by UHPLC-MS/MS**; Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 59, n. 5, 2011, p. 1565-1571.2015.
- CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G. SCHENKEL, E. P. **Compostos Fenólicos Simples e Heterosídicos**. 2. ed. Porto Alegre/ Florianópolis: da UFSC/ da universidade, 2001, cap. 20.
- D' ARCHIVIO, M.; FILESI; BENEDETTO, R. D.; GIOVANNINI, C.; MASELLA, R. **Polyphenols, dietary sources and bioavailability**. Ann Istituto Superiore di Sanità, 43: 348-361. 2007.
- INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos**: INMETRO. 2007. 24p.
- MEDINA, M. B. **Simple and rapid method for the analysis of phenolic compounds in beverages and grains**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 59, n. 5, 2011a, p. 1565-1571.
- MEDINA, M. B. **Determination of the total phenolics in juices and superfruits by a novel chemical method**. Journal of Functional Foods, v. 3, n. 2, 2011b, p. 79-87.
- MINISTERIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO. **Instrução Normativa nº 01**, Rio de Janeiro, 7 de janeiro de 2000, 18p. 2001.
- NEVEN, V.; PEREZ-JIMENEZ, J.; VOZ, F.; CRESPIY, V.; DU CHAFFAUT, L.; MENNEM, L.; EISNER, R.; CRUZ, J.; WISHART, D.; SCALBERT, A.. **Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods**. Database, 2010, 1-9.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C., **Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos**, *Quim. Nova*, Vol. 27, No. 5, 2004 771-780.
- SARKIS, J.R. **Extração de compostos bioativos de tortas de nozes e sementes e aplicação de tecnologias elétricas no gergelim**, 2014, 228f, Tese de Doutorado em Engenharia Química - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. **Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents.** American Journal of Enology and Viticulture, 16, 144-158. 1965.

TOSS, D. **Extração de compostos fenólicos de butiá capitata utilizando dióxido de carbono supercrítico,** 2010, 90f, Dissertação de Mestrado em Engenharia Química - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

PETERSON, G. L. **Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall.** Analytical Biochemistry, 1979, 100, 201–220.

PETERSON, G. L. **Determination of total protein.** Methods in Enzymology, 91, 95-119, 1983.

VERMERRIS, W.; NICHOLSON, R. **Phenolic compound biochemistry.** Dordrecht, The Netherlands: Springer, 2006.

WATERHOUSE, A. L. **Determination of total phenolics.** In: R.E. Wrolstad (Ed.). Current protocols in food analytical chemistry. New York: John Wiley & Sons, Inc., v. Supplement 6, 2002. p.11.1 - 1.8.