

AVALIAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA DETERMINAÇÃO DE TANINOS NO SUCO DE CAJU

TÂNIA DA SILVEIRA AGOSTINI-COSTA *
DEBORAH DOS SANTOS GARRUTI *
LARA LIMA **
SERGIMARA FREIRE **
FERNANDO ANTÔNIO PINTO ABREU *
TEREZINHA FEITOSA *

O objetivo deste trabalho foi avaliar as principais metodologias disponíveis para determinação de compostos fenólicos no suco de caju. Os métodos de Fólin-Denis, Fólin-Ciocalteau e Azul da Prússia (oxirredutométricos) apresentaram interferência da vitamina "C". Os métodos da vanilina e da precipitação protéica, embora menos sensíveis, mostraram-se específicos para determinação de taninos no suco, sendo que o primeiro somou, como vantagem, a simplicidade.

1 INTRODUÇÃO

O pedúnculo do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) é consumido, não só pelas qualidades gustativas, mas também pelo seu alto valor nutritivo, relacionado, principalmente, com o elevado teor de vitamina "C" (21). Inúmeros produtos podem ser obtidos a partir do beneficiamento do pedúnculo, dentre os quais destacam-se o suco concentrado, o refrigerante gaseificado, a cajuína, as bebidas fermentadas e diversos tipos de doces. Entretanto, apenas no Brasil se verifica o hábito de consumir o pedúnculo e seus subprodutos, tornando a busca de novos mercados em desafio (19). Um dos maiores obstáculos contra a expansão do mercado é, sem dúvida, a sua adstringência, devido ao alto teor de taninos (21).

Os taninos são constituídos por compostos fenólicos com peso molecular relativamente elevado, solúveis em água, que formam complexos razoavelmente fortes com proteínas e outros polímeros (10, 15). Os taninos condensados estão mais largamente distribuídos nas plantas

* Pesquisadores da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE.

** Estagiários da EMBRAPA, Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE.

superiores, sendo formados por polímeros de catequina e leucoantocianidinas, não sendo susceptíveis à hidrólise. Os taninos hidrolisáveis são constituídos por um esqueleto de glicose, ou outro álcool poliídrico, esterificado com ácido gálico, ou hexaidroxidifênico, sendo prontamente hidrolisados por ácidos, bases e certas enzimas (6).

Como as quantidades de compostos fenólicos individuais presentes nas frutas são, geralmente, baixas, estas têm sido referidas, inespecificamente, como fenólicos totais. Entretanto, há uma série de dificuldades associadas com tais medidas, decorrentes, principalmente, da grande diversidade dos compostos fenólicos, da presença de compostos interferentes e de métodos inespecíficos ou pouco sensíveis.

A determinação dos compostos fenólicos totais, quando baseada no potencial oxirredutométrico, pode ser feita mediante análises pelos métodos de Folin-Denis (8), Folin-Ciocalteu (9), os mais empregados para frutas, Azul da Prússia (11,18) e Redução do Cloreto Férrico (16). Entretanto, alguns trabalhos indicam falta de especificidade destes métodos, que são susceptíveis a interferência de outros compostos ativos, como o ácido ascórbico e os tióis (6). Outros métodos disponíveis para determinação de compostos fenólicos são os de Precipitação Protéica (14,17), Gravimetria (14) e Difusão Radial (12), que são baseados na capacidade de interação dos taninos hidrolisáveis e condensados com a polivinilpirrolidona e com proteínas, tais como gelatina e albumina bovina. O método da Vanilina baseia-se na reação desta com compostos fenólicos derivados do resorcinol e floroglucinol (2, 5).

Considerando-se a alta concentração de vitamina "C" presente no suco de caju, este trabalho teve por objetivo a avaliação e seleção de método analítico favorável ao monitoramento dos seus compostos fenólicos adstringentes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

Os testes com padrões foram desenvolvidos com ácido tânico (marca Merck), catequina (marca Sigma) e ácido ascórbico (marca Vetek). Foram empregados pedúnculos de caju do clone CCP 76, provenientes da Estação Experimental de Pacajus (CE), colhidos durante os meses de setembro e dezembro de 1997. Amostras, em triplicata, provenientes de 100 L de suco de caju integral e clarificado com gelatina (marca Leiner, aproximadamente 180 g/hL) e bentonita foram empregadas para as análises subseqüentes.

2.2 MÉTODOS

A avaliação de interferência nos métodos de oxirredução foi feita por meio de curvas de calibração de ácido tânico e ácido ascórbico, em concentrações que variaram entre 0,5 e 6 ppm. Foram feitas, também, curvas de ácido tânico em presença de ácido ascórbico e vice versa. Os sucos foram hidrolisados em metanol p.a. e em metanol, contendo 1% de HCl, por 8h a temperatura ambiente (4) e, posteriormente, analisados quanto aos teores de taninos e vitamina "C", conforme as metodologias apresentadas a seguir.

- **Fólin-Denis/Fólin-Ciocalteu**

Para o método de Fólin-Denis, o reagente fosfotúngstico-fosfomolibdico foi preparado de acordo com REICHER *et al.* (20) e, para o método de Folin-Ciocalteu, adquiriu-se reagente da Merck. Amostras e padrões (ácido tânico), previamente diluídos, foram adicionados de 3 mL do reagente fosfotúngstico, 5 mL de carbonato de sódio 25% e diluídos para 50 mL. Após 30 minutos de repouso, as soluções foram filtradas e as absorvâncias lidas em 760 nm.

- **Azul da Prússia**

As análises foram desenvolvidas de acordo com GRAHAM (11), utilizando-se ácido tânico como padrão.

- **Precipitação Protéica**

O método foi executado conforme recomendações de HAGERMAN e BUTLER (14), utilizando-se, como padrão, ácido tânico, sendo que o repouso para precipitação dos brancos e do complexo proteína-tanino foi feito em banho-maria a 80 °C, por 10 minutos.

- **Vanilina**

As reações foram desenvolvidas com 1 mL de padrão (catequina diluída em metanol 80%) ou de suco de caju (20% em metanol, contendo 1% de HCl), adicionados de 5 mL de solução reagente de vanilina recém preparada (vanilina-HCl- metanol 4:10:86). A leitura da absorvância foi feita em 490 nm, após repouso por 15 min. Brancos de reagentes e de amostras foram desenvolvidos, simultaneamente (2, 5).

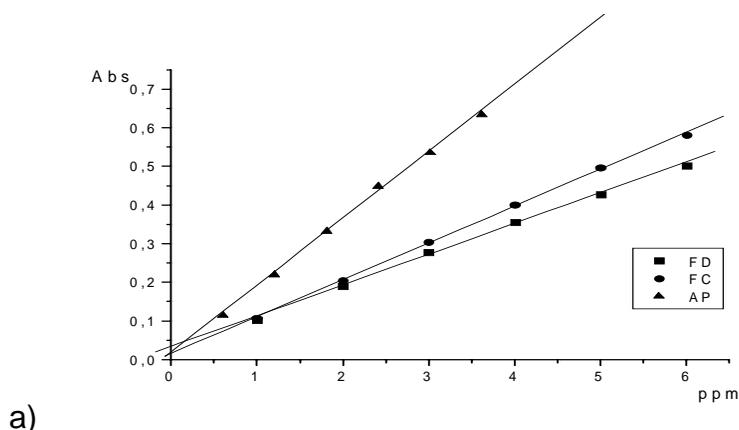
- **Vitamina C**

A vitamina C foi quantificada espectrofotometricamente, após reação com diclorofenolindofenol, conforme método descrito por EGBERG *et al.* (7).

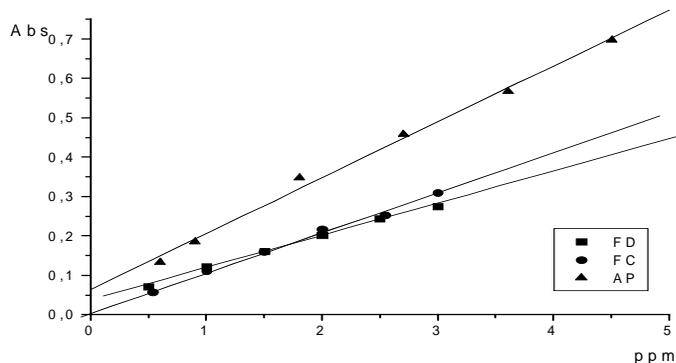
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A forte influência do ácido ascórbico, nos métodos de determinação de compostos fenólicos, baseados na oxirredução (Fólin-Denis, Fólin-Ciocalteau e Azul da Prússia), pode ser observada na Figura 1. Estes métodos apresentaram maior sensibilidade, entretanto suas respostas para ambos os ácidos, tânico e ascórbico, foram sempre semelhantes. A mistura dos dois ácidos resultou em respostas, proporcionalmente, aditivas (coeficientes lineares) (Tabela 1).

FIGURA 1 - CURVAS DE CALIBRAÇÃO DOS ÁCIDOS TÂNICO (A) E ASCÓRBICO (B)



a)



b)

FD = Fólin-Denis; FC = Fólin-Ciocalteau; AP = Azul da Prússia; Abs = absorbância; ppm = parte por milhão.

O reagente de Fólin-Denis tem sido empregado para determinação de taninos em grande variedade de alimentos, incluindo vinho, *whisky* e vários produtos derivados de frutas. Embora seja considerado um dos reagentes

mais convenientes para análise de fenólicos totais em frutas, o mesmo não apresenta reação estequiométrica para os compostos fenólicos, sendo que os taninos poliméricos fornecem, aproximadamente, a mesma intensidade de cor que os compostos monoméricos (6). O reagente de Fólín-Denis é, freqüentemente, substituído pelo reagente de Fólín-Ciocalteau, cuja sensibilidade é incrementada pelo aumento da concentração de molibdato e pela adição de sulfato de lítio para prevenir a precipitação de sais complexos de sódio. Entretanto, um dos principais fatores limitantes da utilização dos reagentes de oxirredução está relacionado com a interferência de agentes redutores naturalmente presentes nos produtos vegetais, tais como ácido ascórbico e bissulfito, e outros constituintes como aminoácidos, proteínas e xantinas (4, 6, 13). HAGERMAN e BUTLER (13) recomendam o método Azul da Prússia, para determinação de compostos fenólicos totais, por ser menos susceptível à interferência de proteínas do que os reagentes Fólín.

TABELA 1 - REGRESSÕES LINEARES DAS LEITURAS DE ABSORBÂNCIAS VERSUS CONCENTRAÇÃO PARA OS MÉTODOS DE FÓLIN-DENIS, FÓLIN-CIOCALTEAU, AZUL DA PRÚSSIA, VANILINA E PRECIPITAÇÃO PROTÉICA

MÉTODO	PADRÃO	A	DP	B	DP	R
Fólín-Denis	ácido tânico	0,030	0,007	0,080	0,002	0,99889
	ácido ascórbico	0,035	0,005	0,082	0,002	0,99821
	ácido tânico/ácido ascórbico	0,30	0,01	0,100	0,006	0,99326
Fólín-Ciocalteau	ácido tânico	0,015	0,005	0,096	0,001	0,99964
	ácido ascórbico	0,007	0,003	0,102	0,002	0,99939
	ácido tânico/ácido ascórbico	0,215	0,007	0,118	0,003	0,99921
Azul da Prússia	ácido tânico	0,015	0,009	0,173	0,004	0,99901
	ácido ascórbico	0,06	0,02	0,144	0,008	0,99531
	ácido tânico/ácido ascórbico	0,34	0,008	0,152	0,003	0,9991
	ácido ascórbico/ácido tânico	0,33	0,01	0,169	0,006	0,99749
Precipitação protéica	ácido tânico	0,03	0,02	0,0038	0,0002	0,99565
Vanilina	catequina	0,01	0,01	0,0037	0,0001	0,99852

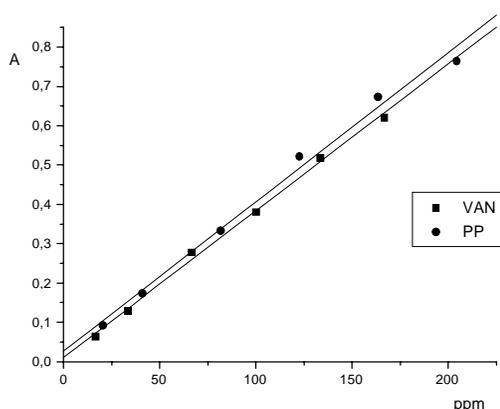
A = coeficiente linear; B = coeficiente angular; DP = desvio padrão; R = índice de correlação.

Os métodos de Precipitação Protéica e de Vanilina apresentaram baixa sensibilidade (Figura 2), quando comparados com os oxirredutométricos, todavia mostraram-se específicos para os compostos fenólicos com propriedades tânicas, presentes no suco de caju.

O método da Vanilina é específico para flavanóis e pode ser usado, seletivamente, para determinação de taninos condensados, na presença

de taninos hidrolisáveis e outros compostos fenólicos. Como o ácido tânico (tanino hidrolisável) não fornece reação positiva para a vanilina, este composto não pode ser utilizado como padrão de referência para este método. Flavanóis, tais como catequina, são os padrões de escolha, contudo, quando presentes na amostra, podem comprometer a determinação dos compostos tânicos, a menos que sejam feitas determinações de confirmação independentes (13). Entretanto, tanino condensado e ácidos anacárdicos (lipídios fenólicos) foram os únicos compostos fenólicos detectados no suco de caju, mediante cromatografia em papel (1). Outro problema, relacionado ao método da Vanilina, é o desenvolvimento de falsos positivos, resultantes de reações entre antocianidinas presentes na amostra e o HCl da solução reagente. Este problema pode ser eliminado pela execução de brancos apropriados da amostra (5, 22). No caso dos sucos de caju analisados neste trabalho, os brancos não acusaram nenhuma interferência de fundo.

FIGURA 2 -CURVAS DE CALIBRAÇÃO DA CATEQUINA E DO ÁCIDO TÂNICO, DESENVOLVIDAS, RESPECTIVAMENTE, PELOS MÉTODOS DE VANILINA (VAN) E PRECIPITAÇÃO PROTÉICA (PP)



A = absorbância; ppm = parte por milhão.

Os métodos baseados na precipitação protéica podem ser empregados para determinação do teor de taninos em amostras ou para determinação da atividade biológica de um tanino. Estes métodos fornecem excelentes resultados para taninos condensados ou hidrolisáveis. Entretanto, se a proteína é adicionada em excesso, podem ser formados complexos tanino proteínas solúveis, que podem comprometer os resultados (13).

A extração dos compostos fenólicos presentes no suco de caju, empregando-se metanol p.a., não apresentou eficiência durante a determinação por precipitação protéica (Tabela 2), sendo que os

compostos fenólicos, em geral, apresentaram teores mais elevados, quando extraídos em metanol, contendo 1% de HCl. O tratamento com HCl pode estar favorecendo a exposição estérica dos grupos reativos. CARMONA *et al.* (3) também obtiveram recuperações, praticamente, dobradas de compostos fenólicos em feijões, quando extraídos em metanol contendo HCl, em relação ao metanol puro.

O teor de vitamina “C”, no suco de caju, permaneceu, aproximadamente, constante durante o processo de clarificação (Tabela 2). Os métodos da Vanilina e da Precipitação Protéica não acusaram presença de taninos no suco de caju clarificado com gelatina, enquanto que os oxirredutométricos apresentaram valores elevados, associados, assim, com interferência da vitamina “C”. Neste caso a propriedade de precipitação protéica, encontrada na definição de taninos, é outro forte argumento favorável aos métodos não oxirredutométricos.

TABELA 2 - COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (mg/100 g) PRESENTES NO SUCO DE CAJU INTEGRAL E CLARIFICADO

Suco	Hidrólise	Vitamina C		Fólin-Denis		Azul da Prússia		Precipitação Protéica		Vanilina	
		mg/100 g	DP	mg/100 g	DP	mg/100 g	DP	mg/100 g	DP	mg/100 g	DP
I	HCl/MeOH	208	2	416	5	431	8	389	2	436	10
II	HCl/MeOH	203	1	251	8	258	1	nd	-	nd	-
I	MeOH	230	3	369	9	243	4	nd	-	179	8
II	MeOH	217	2	241	8	177	2	nd	-	nd	-

1 = Resultados são médias de determinações em triplicata;
I = suco integral; II = suco clarificado; DP = desvio padrão; nd = não detectado.

Em função do menor custo dos reagentes e da simplicidade do método da Vanilina, em relação ao da Precipitação Protéica, recomenda-se o primeiro.

4 CONCLUSÃO

Embora o método de Fólin-Denis venha sendo recomendado e utilizado, com freqüência, para determinação de compostos fenólicos em frutas foi verificado que, em função do alto teor de vitamina “C” presente no pedúnculo de caju e nos seus subprodutos, o método da Vanilina é mais apropriado para quantificação destes compostos.

Abstract

The objective of this research was the evaluation of principal methodologies available for determination of phenolic compounds in cashew juice. The Folin-Denis, Folin-Ciocalteu, and Prussian blue assays (oxidation-reduction methods) presented vitamin C interference in the analytical results. Although less sensitive, the Vanillin and Protein Precipitation assays showed more specificity for tannin determination in cashew juice. The Vanillin method added as advantage its simplicity.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 AGOSTINI-COSTA, T. S., SANTOS, J. R., FEITOSA, T. Compostos fenólicos presentes em pedúnculos de caju. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 16., Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro : SBCTA, 1998. v. 2, p. 1174-1177.
- 2 BROADHURST, R. B., JONES, W. T. Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. **Journal of Science of Food and Agriculture**, London, v. 29, p. 788-794, 1978.
- 3 CARMONA, A., SEIDL, D.S., JAFFÉ, W.G. Comparison of extraction methods and assay procedures for the determination of the apparent tannin content of common beans. **Journal of Science of Food and Agriculture**, London, v. 56, p. 291-301, 1991.
- 4 DESHPANDE, S. S., CHERYAN, M. Determination of fenolic compounds of dry beans using vanillin, redox, and precipitation assays. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 52, n. 2, p. 332-334, 1987.
- 5 DESHPANDE, S. S., CHERYAN, M. Evaluation of vanillin asssay for tannin analysis of dry beans. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 50, p. 905-910, 1985.
- 6 DESHPANDE, S. S., CHERYAN, M., SALUNKHE, D. K. Tannin analysis of fruit products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 24, n. 4, p. 401-449, 1986.
- 7 EGBERG, D. C., LARSON, P. A., HONOLD, G. R. Automated determination of vitamin C in some fortified foodstuffs. **Journal of Science of Food and Agriculture**, London, v. 24, n.7, p. 789-794, 1973.
- 8 FOLIN, O., DENIS, W. A colorimetric method for the determination of phenols (and phenol derivatives) in urine. **The Journal of Biological Chemistry**, New York, v. 22, n. 2, p. 305-308, 1915.

- 9 FOLIN, O., CIOCALTEAU, V. On tyrosine and tryptophan determinations in proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, New York, v. 73, p. 627, 1927.
- 10 GOLDSTEIN, J. L., SWAIN, T. Changes in tannins in ripening fruits. **Phytochemistry**, Cambridge, v. 2, p. 371-383, 1963.
- 11 GRAHAM, H. D. Stabilization of the prussian blue color in the determination of polyphenols. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Columbus, v. 40, n. 5, p. 801-805, 1992.
- 12 HAGERMAN, A. E. Radial diffusion method for determining tannin in plant extracts. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 13, n. 3, p. 437-449, 1987.
- 13 HAGERMAN, A. E., BUTLER, L. G. Choosing appropriate methods and standards for assaying tannin. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 15, n. 6, p. 1795-1810, 1989.
- 14 HAGERMAN, A. E., BUTLER, L.G. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Columbus, v. 28, n. 4, 1978.
- 15 JOSLYN, GOLDSTEIN. Adstringency of fruits and fruit products in relation to phenolic content. **Advances in Food Research**, New York, v. 13, p. 179-209, 1964.
- 16 LAU, O., LUK S, HUANG, H. Spectrophotometric determination of tannins in tea and beer samples with iron (III) and 1,10-phenanthroline as reagents. **Analytist**, Cambridge, v. 114, p. 631-633, 1989.
- 17 MAKAR, H. P. S., DAWRA, R. K., SINGH, B. Protein precipitation assay for tannins. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 166, p. 435-439, 1987.
- 18 PRICE, M. L., BUTLER, L. G. Rapid visual estimation and spectrofotometric determination of content of sorghum grain. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Columbus, v. 25, n. 6, p. 1268-1273, 1977.
- 19 RAMOS, A. D. **Caju**. Brasília : EMBRAPA/SPI, 1996. 93 p. (Coleção Plantar, 34).
- 20 REICHER, F., SIERAKOWSKI, M. R., CORRÊA, J. B. C. Determinação espectrofotométrica de taninos pelo reativo fosfotungstico-fosfomolibdico. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v. 24, n. 4, p. 407-411, 1981.

- 21 SOARES, J. B. **O caju**: aspectos tecnológicos. Fortaleza : BNB, 1986. 256 p.
- 22 WALTON, M.F., HASKINS, F.A., GORZ, H.J. False positive results in the vanillin-HCl assay of tannins in sorghum forage. **Crop Science**, Madison, v. 23, n. 2, p. 197-200, 1983.