

Estudo de Diferentes Metodologias para Quantificação de Betalaina de Beterraba

Lais Priscila Cavalcante Ferreira¹, Anne Caroline Rocha Xavier¹, Jucenir dos Santos¹, Elma Regina Silva de Andrade Wartha², Alessandra Almeida Castro Pagani²

ARTIGO ORIGINAL | ORIGINAL ARTICLE

RESUMO

Introdução: A beterraba (*Beta vulgaris* L.) é um dos poucos vegetais que contêm um grupo de pigmentos altamente bioativos, as betalainas, que possuem alta capacidade antioxidante e anti-inflamatória, sendo associada a melhora de diversas patologias, como hipertensão, aterosclerose, diabetes 2, demência, doenças do fígado, artrite e até mesmo câncer. **Objetivos:** comparar três diferentes métodos de quantificação de betalaina. **Métodos:** A quantificação das betalainas foi realizada por três métodos, comparando-se os resultados entre eles. **Resultados:** Os métodos 2 e 3 apresentaram resultados semelhantes, já o método 1 apresentou resultados muito inferiores aos esperados, demonstrando-se ineficaz na quantificação de betalainas, pois os valores encontrados (1,60805 mg/100g) estavam muito abaixo da média (40 – 200 mg/100g) usualmente observada em beterrabas. **Discussão:** Diversas metodologias têm sido empregadas para quantificação de betalainas, com diferentes solventes, materiais e métodos, no entanto ainda não há um consenso sobre qual o melhor método. Dessa forma é importante desenvolver estudos que possam elucidar quais métodos são aplicáveis e quais não são. **Conclusão:** No presente estudo foi possível observar que a metodologia 1 não foi eficiente para quantificação de betalainas, o que pode ser um fator limitante para seu uso em estudos onde a quantificação do pigmento é primordial.

Palavras-chaves: beta vulgaris, antioxidantes, betalainas.

ABSTRACT

Introduction: Beetroot (*Beta vulgaris* L.) is one of the few vegetables that contain a group of highly bioactive pigments, such as betalains, which has a high antioxidant and anti-inflammatory capacity and is associated with the improvement of several pathologies, such as hypertension, atherosclerosis Diabetes 2, dementia, liver disease, arthritis and even cancer. **Objectives:** compare three different methods of determining betalain. **Methods:** a quantification of meshes was performed by methods, comparing the results between them. **Results:** Methods 1 and 2 showed results that were much lower than expected, demonstrating that it was ineffective in the quantification of betalains, powder of the systems found (1.60805 mg / 100g) - 200 mg / 100g), usually observed in beets. **Discussion:** Several methodologies have been used to quantify betalains, with different solvents, materials and methods, there is still no consensus on which method is best. In this way it is important the development of studies that allow calculation methods. **Conclusion:** There is no study for quantification of betalains, it is not efficient for quantification of betalains, which may be limiting for its use in studies where a quantification of the pigment is primordial.

Keywords: beta vulgaris, antioxidants, betalains.

Artigo recebido a 05.09.2017; Aceite a 19.09.2017

¹ Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, Brasil

* Autor correspondente: Departamento de Nutrição - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, Marechal Rondon Ave, Sergipe, Brasil, Campus Universitário. CEP: 49000-000. São Cristóvão/SE, Brasil. E-mail: laiscavalcante06@gmail.com

INTRODUÇÃO

Na última década, a beterraba (*Beta vulgaris* L.) tem atraído muita atenção como um alimento funcional, com importante efeito promotor de saúde (CLIFFORD et al., 2016). Seu recente interesse foi impulsionado principalmente pela descoberta de que a beterraba é um dos poucos vegetais que contêm um grupo de pigmentos altamente bioativos conhecidos como betalaínas. As betalaínas derivam da ordem de plantas Caryophyllales e são categorizadas como betacianinas, responsáveis pela cor vermelha/violeta, e betaxantinas, responsáveis pela cor amarela (CLIFFORD et al., 2015).

As betalaínas possuem alta capacidade antioxidante e anti-inflamatória, o que despertou o interesse em uma possível utilização da beterraba em patologias clínicas caracterizadas por estresse oxidativo e inflamação crônica, como doenças do fígado, artrite e até mesmo câncer. A ingestão de beterraba tem sido associada a melhora de diversas patologias, como hipertensão, aterosclerose, diabetes tipo 2 e demência (DALLA COSTA, 2015; CLIFFORD et al., 2016). O consumo de beterraba obteve resposta comparável a um quimioterápico amplamente utilizado no tratamento de diversos tipos de cânceres, além de elevado efeito inibitório sobre multiplicação de células cancerígenas, especialmente nas derivadas do câncer de estômago e próstata (BOIVIN et al., 2009; ZOU et al., 2005).

Estudos têm demonstrado que a betalaína, mesmo em baixa concentração, apresenta importante ação antioxidante, inibindo a peroxidação lipídica e promovendo a proteção das células do sangue. Há evidências de que as células vermelhas consigam incorporar as betalaínas, evitando assim a hemólise oxidativa. A betalaína também demonstrou capacidade de se ligar à molécula de LDL, aumentando a resistência à oxidação, além de redução da resposta inflamatória e ação hepato protetora (GENTILE et al., 2004; GEORDIEV et al., 2010; KANNER et al., 2001; TESORIERE et al., 2004). Dentro desse contexto, é importante conhecer técnicas que melhor permitem determinar as concentrações de betalaína de beterrabas, facilitando assim o estudo e a pri-

moramento da sua utilização. O objetivo do presente estudo é comparar três diferentes métodos de quantificação de betalaína.

MÉTODO

As beterrabas foram adquiridas na Central de Abastecimento do Estado de Sergipe (CEASA), na cidade de Aracaju. Eliminando-se as unidades que apresentaram danos mecânicos e microbiológicos, as beterrabas foram devidamente higienizadas através da lavagem em água corrente com leve aplicação de ação física e posterior imersão em uma solução sanitizante (cloro ativo – 1 %) por 15 minutos. Então os bulbos foram retirados e novamente enxaguados para remoção do cloro residual, estando assim, prontos para o processamento.

A quantificação das betalaínas foi realizada através dos três métodos descritos a seguir:

Método 1: as amostras de 2 g de extrato de beterraba foram previamente congeladas e maceradas com 5 mL de água destilada. A solução obtida foi centrifugada a 4°C durante 40 minutos, empregando rotação de 6000rpm. Em tubo de ensaio, homogeneizaram-se 400 µL do sobrenadante e 4 mL de água destilada. Foram realizadas leituras em duplicata das soluções a 476 nm, 538 nm e 600 nm (CAI e colaboradores, 1998).

Método 2: as amostras (2 g) extrato de beterraba foram previamente congeladas e maceradas em 5 ml de solvente (água). A solução foi colocada em tubetes e centrifugada utilizando-se centrífuga refrigerada a 4°C (15.000 rpm) durante 40 minutos. Num tubo de ensaio, foi homogeneizado 1ml do sobrenadante e 24ml de água destilada. Foram realizadas leituras em duplicata das amostras a 476 nm, 538 nm e 600 nm (NILSSON, 1970).

Os cálculos foram realizados pelas seguintes fórmulas: $x = 1,095 (a-c) \rightarrow y = b-z-x/3,1 \rightarrow z = a-x$

Sendo: a = leitura da absorbância a 538 nm; b = leitura a 476 nm; c = leitura a 600 nm; x = absorbância de betacianina; y = absorbância de betaxantina; z = absorbância de impurezas.

Método 3: as amostras (1g) de extrato de beterraba foram homogeneizadas em água e transferidas para um balão volumétrico, onde o

volume foi completado para 100 mL. Em seguida, foram filtradas com papel filtro Whatman nº1. Os filtrados foram então utilizados para as leituras espectrofotométricas realizadas em duplicata. A quantificação das betalaínas foi realizada de acordo com Lei de Beer Lambert-Bouguer, modificada por Tang e Norziah (2007). Os cálculos foram realizados pela seguinte fórmula:

$$Bc = A \times PM \times 1000 / \epsilon \times l$$

Onde: Bc = equivalente em betanina (mg / L); A = λ_{max} a 536 nm; PM = peso molecular da betanina (550 g / mol); ϵ = coeficiente molar de excitação da betanina (60.000 L / mol.cm); l = largura da cubeta (1 cm); 1000 = Fator de diluição

Para análise estatística dos dados foi utilizado o software Assistat (Assistência Estatística), versão 7.7, beta e aplicou-se o teste de Tuckey, a 5% de probabilidade, para detecção de diferenças entre médias.

RESULTADOS

Dentre as metodologias estudadas, os métodos 2 e 3 apresentaram resultados semelhantes apesar das diferentes abordagens metodológicas, já o método 1 apresentou resultados muito inferiores aos esperados (Tabela 1).

Na tabela 2 são apresentadas as médias de resultados dos diferentes métodos analisados através do Software Assistat, onde demonstrou-se estatisticamente as diferenças observadas entre as metodologias.

O método 1 diferiu estatisticamente ($p < 0,001$) dos métodos 2 e 3 quanto a subclasse betacianina, e conseqüentemente betanina. Já em relação a subclasse betaxantina, os métodos 1 e 2 diferiram estatisticamente ($p 0,0012$), assim como para a quantificação de impurezas, onde o método 2 apresentou resultados significativamente maiores.

Tabela 1

Comparação entre três diferentes métodos de quantificação de betalaína.

mg/100g	MET 1		MET 2		MET 3	
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 1	Amostra 2
Betacianina	1,592	1,625	93,167	91,095	88,084*	88,084*
Betaxantina	1,386	1,223	5,304	5,0445	–	–
Impurezas	0,440	0,382	9,627	9,425	–	–

*Valores correspondentes à betanina, subclasse da betacianina e principal fração da betalaína

Tabela 2

Médias e p-valor dos diferentes métodos de quantificação de betalaína.

mg/100g	MET 1	MET 2	MET 3	p-valor
Betacianina	1,6085 ^a	92,1290 ^b	88,0840 ^b	<0,0001
Betaxantina	1,3045 ^a	5,1740 ^b	–	0,0012
Impurezas	0,0318 ^a	9,5260 ^b	–	<0,0001

DISCUSSÃO

Dentre as metodologias estudadas as metodologias 2 e 3 apresentaram melhores resultados, sendo bastante semelhantes (Tabela 1). No entanto, enquanto o método 2 é capaz de diferenciar as duas principais classes do pigmento, o método 3 demonstra apenas a principal fração da betalaína, a betanina – um subgrupo da betacianina, o que pode ser um fator limitante para seu uso, pois desconsidera um importante antioxidante natural (STINTZING & CARLE, 2008; KLUGE & PRECZENHAK, 2016). Apesar da limitação, ambos os métodos têm sua importância, pois a betacianina e consequentemente a betanina é a parte mais expressiva do pigmento. Sendo ambas informações de grande utilidade científica, visto que, como supracitado, a betalaína e suas frações têm se destacado como potente antioxidante e importante promotor de saúde (CLIFFORD et al., 2016; BOIVIN et al., 2009; GEORDIEV et al., 2010; KANNER et al., 2001; TESORIERE et al., 2004).

O método 1 se mostrou pouco eficaz na quantificação de betalaínas, como observado na Tabela 2, onde os valores encontrados estavam muito abaixo da média (40 – 200 mg/100g) usualmente observada em beterrabas (STINTZING & CARLE, 2008). É possível observar a diferença significativa entre o primeiro método e os demais, onde os resultados demonstram claramente a discrepância de valores. No entanto, o método 1 apresentou resultados inferiores de impurezas, em relação ao método 2, o que seria uma vantagem na quantificação do pigmento. Acredita-se esse elevado resultado de impurezas do método 2 deva-se a sensibilidade do método, que apresentou valores significativamente maiores em todas as classes estudadas, sendo mais sensível para quantificar as diferentes classes, incluindo as impurezas.

Diversas metodologias têm sido empregadas para quantificação de betalaínas, com diferentes solventes, materiais e métodos, no entanto ainda não há um consenso sobre qual o melhor método. Dessa forma é importante desenvolver estudos que possam elucidar quais métodos são aplicáveis e quais não são. No presente estudo foi possível observar que a

metodologia 1 não foi eficiente para quantificação de betalaínas, o que pode ser um fator limitante para seu uso em estudos onde a quantificação do pigmento é primordial.

CONCLUSÕES

A realização de estudos de que verifiquem a aplicabilidade de diferentes metodologias é de suma importância no ambiente científico, pois em meio a inúmeros métodos disponíveis se torna muitas vezes difícil escolher o que melhor se aplica ao estudo em questão. Dessa forma, através do presente estudo é possível observar as diferentes metodologias, suas logísticas, custo benefícios e aplicabilidades.

Agradecimentos:

Nada a declarar

Conflito de Interesses:

Nada a declarar.

Financiamento:

Não informado.

REFERÊNCIAS

- Azeredo, H. Betalains: Properties, Sources, Applications, And Stability—A Review. *International Journal Of Food Science & Technology*, V. 44, N. 12, P. 2365-2376, 2009.
- Boivin, D.; Lamy, S.; Lord-Dufour, S.; Jackson, J.; Beaulieu, E.; Côté, M., Moghrabi, A.; Barrette, S.; Gingras, D.; Béliveau, R. Antiproliferative And Antioxidant Activities Of Common Vegetables: A Comparative Study. *Food Chemistry*, V. 112, N. 2, P. 374-380, 2009.
- Cai, Y., Sun, M., And Corke, H., 1998, *J. Agric. & Food Chem.*, 46(11), 4491–4495.
- Clifford, T.; Constantinou, C. M.; Keane, K. M.; West, D. J.; Howatson, G.; Stevenson, E. J. (2016). The Plasma Bioavailability Of Nitrate And Betanin From Beta Vulgaris Rubra In Humans. *European Journal Of Nutrition*, P.1-10, 2016.

- Clifford, T.; Howatson, G.; West, D. J.; Stevenson, E. J. The Potential Benefits Of Red Beetroot Supplementation In Health And Disease. *Nutrients*, V. 7, N. 4, P. 2801-2822, 2015.
- Dalla Costa, A. P. Aproveitamento De Resíduos De Cenoura E Beterraba Da Indústria De Minimamente Processados Para Elaboração De Ingredientes Funcionais. 2015. 97 F. Disponível Em: <<https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/119753>> Acessado Em: 16/04/2017
- Gentile, C., Tesoriere, L., Allegra, M., Livrea, M. A., & D'aleccio, P. Antioxidant Betalains From Cactus Pear (*Opuntia Ficus-Indica*) Inhibit Endothelial Icam-1 Expression. *Annals Of The New York Academy Of Sciences*, V. 1028, N. 1, P. 481-486, 2004.
- Georgiev, V.G.; Weber, J.; Kneschke, E.M.; Denev, P.N.; Bley, T.; Pavlov, A.I. Antioxidant Activity And Phenolic Content Of Betalain Extracts From Intact Plants And Hairy Root Cultures Of The Red Beetroot *Beta Vulgaris* Cv. Detroit Dark Red. *Plant Foods Hum. Nutr.*, 65, 105–111, 2010.
- Kanner, J.; Harel, S.; Granit, R. Betalains A New Class Of Dietary Cationized Antioxidants. *J. Agric. Food. Chem.*, V. 49, N. 11, P. 5178–5185, 2001.
- Kluge, R. A.; Preczenhak, A. P. Betalaínas Em Beterraba Minimamente Processada: Perdas E Formas De Preservação. *Revista Iberoamericana De Tecnología Post-cosecha*, V. 17, N. 2, 2016.
- Nilsson, T. Studies Into The Pigments In Beetroot (*Beta Vulgaris* L. Ssp. *Vulgaris* Var. *Rubra* L.). *Lantbrukshogskolans Annaler*, V. 36, P. 179-219, 1970.
- Stintzing, F.C., Carle, R. Betalains In Food: Occurrence, Stability, And Postharvest Modifications. Em C. Socaciu (Ed.), *Food Colorants: Chemical And Functional Properties*, P. 277-299, Crc Press: Boca Raton, 2008.
- Tang, C. S.; Norziah, M. H. Stability Of Betacyanin Pigments From Red Purple Pitaya Fruit (*Hylocereus Polyrhizus*): Influence Of Ph, Temperature, Metal Ions And Ascorbic Acid. *Indonesian Journal Of Chemistry*, V. 7, N. 3, P. 327-331, 2007.
- Tesoriere, L.; Allegra, M.; Butera, D.; Livrea, M.A. Absorption, Excretion, And Distribution Of Dietary Antioxidant Betalains In Ldls: Potential Health Effects Of Betalains In Humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, 80, P.941-945, 2004.
15. Zou, D. M.; Brewer, M.; Garcia, F.; Feugang, J. M.; Wang, J.; Zang, R.; Liu, H.; Zou, C. Cactus Pear: A Natural Product In Cancer Chemoprevention. *Nutrition Journal*, V. 4, N. 1, P. 25, 2005.
-