

# COMPOSTOS FENÓLICOS DAS PERAS DE S. BARTOLOMEU

Lisete M. Silva<sup>1,2</sup>; Pedro A.C.O. Lopes<sup>1,2</sup>; M. Rosário Domingues<sup>1</sup>; Raquel P.F. Guiné<sup>2</sup>; Manuel A. Coimbra<sup>1</sup>

<sup>1</sup>QOPNA Departamento de Química Universidade de Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal

<sup>2</sup>CI&DETS/ Escola Superior Agrária de Viseu, Instituto Politécnico de Viseu, 3500-606 Viseu, Portugal

## Resumo

*Pyrus communis* L. var. S.Bartolomeu é uma pêra usada para produzir a pêra passa de Viseu, um produto tradicional português produzido por secagem ao sol. O produto final é um fruto pequeno, de cor castanha-avermelhada, com propriedades elásticas. As propriedades organolépticas que influenciam a qualidade do produto final são a cor, o sabor e a textura, tendo os compostos fenólicos uma função importante nestes atributos. As procianidinas são os principais compostos fenólicos da pêra de S. Bartolomeu. Com o processamento a Pêra Passa de Viseu, o conteúdo em compostos fenólicos diminui 64%, verificando-se que as procianidinas aumentam o seu grau de polimerização, com diminuição da sua extractabilidade.

Com o objectivo de desenvolver uma metodologia capaz de substituir a secagem solar tradicional, foram processadas peras utilizando uma estufa solar estufa de convecção forçada e, em alternativa, um túnel de ar quente, a 40 °C, sem exposição solar. Estas peras assim processadas foram comparadas com as obtidas pelo método tradicional e com as peras não processadas. Os compostos fenólicos de cada uma das amostras foram extraídos com soluções de metanol e de acetona/água (6:4, v:v) e a sua identificação e caracterização foi feita por espectrometria de massa (ESI-MS e ESI-MS/MS).

A extractabilidade das procianidinas com grau de polimerização entre 2 e 6 (DP2-DP6) é muito afectada pelo processo de secagem e varia com o processo utilizado. Os polímeros das amostras não processadas e processadas em túnel foram extraídos em maior quantidade pelo metanol do que os das amostras que foram sujeitas à exposição solar, tendo estes compostos sido extraídos em maior quantidade com a solução de acetona/água. Para além das procianidinas, o composto fenólico mais abundante nos extractos foi o ácido clorogénico. Foram também identificados, principalmente nos extractos das amostras expostas à luz solar, isorhamnetina-3-Hex, canferol-3-Hex e quercetina-3-Hex.

## 1. INTRODUÇÃO

A *Pêra Passa de Viseu* é um produto agro-alimentar tradicional português, resultante da secagem da pêra de S. Bartolomeu (*Pyrus communis* L.). É um fruto pequeno, de cor castanho-avermelhada e com características organolépticas únicas (Ferreira *et al.*, 2002). Ao contrário da maioria das peras, que possuem um sabor doce e macio, a pêra de S. Bartolomeu apresenta-se amarga e um pouco adstringente, tornando o seu paladar menos agradável ao seu consumo em fresco. Deste modo, e de maneira a tornar mais apelativo o seu consumo, este fruto passou a ser secado artesanalmente por exposição solar directa. Após a colheita, as peras são descascadas e expostas ao sol por cerca de 5 dias. De seguida são embarreladas por mais 2 dias, o que permite a obtenção de uma maior elasticidade do fruto. Segue-se uma segunda secagem (2-4 dias), após a espalma e o acondicionamento. Dado que este procedimento poderá não ser higienicamente seguro, é necessário o desenvolvimento de uma metodologia capaz de substituir esta secagem tradicional. A valorização deste produto agro-alimentar tradicional passa também por uma melhoria da produção e qualidade do produto final. Neste contexto, torna-se premente adquirir conhecimentos sobre as transformações bioquímicas, químicas e físicas que ocorrem na pêra

secada e que conferem ao fruto secado as suas características organolépticas singulares. São vários os estudos referentes, por um lado, à caracterização bioquímica e química da pêra em fresco (Hulme, 1958; Wrolstad *et al.*, 1991) e, por outro lado, aos processos tecnológicos de secagem de frutos (Broomfield, 1995; McBean *et al.*, 1971). No entanto, são ainda escassos os estudos realizados acerca das alterações bioquímicas, químicas e físicas provocadas pela secagem da pêra. A cor, o sabor e a textura são propriedades organolépticas que influenciam a qualidade do produto final e, deste modo, o seu valor comercial. As alterações da cor e do sabor dos frutos que ocorrem durante o seu processamento estão associados à presença de compostos fenólicos, em particular do ácido cafeoilquínico, (+)-catequina, (-)-epicatequina e proantocianidinas, também designados por taninos condensados (Macheix *et al.*, 1990; Wrolstad *et al.*, 1991). No caso da pêra de S. Bartolomeu, as proantocianidinas são essencialmente procianidinas (96%), compostas maioritariamente por unidades de (-)-epicatequina (Spanos & Wrolstad, 1992; Pascual-Teresa *et al.*, 2000). No entanto, derivados do ácido hidroxicinâmico (2%) representados, essencialmente pelo ácido clorogénico, a arbutina (0,8%) e catequinas (0,7%) estão também presentes. Com o processamento a Pêra Passa de Viseu, o conteúdo em compostos fenólicos diminui 64%, verificando-se que as procianidinas aumentam o seu grau de polimerização, com a diminuição da sua extractabilidade (Ferreira *et al.*, 2002). Os compostos fenólicos estão também envolvidos em interações (Renard *et al.*, 2001) e em ligações químicas cruzadas (Ng *et al.*, 1997) com polissacarídeos pécticos, modulando as propriedades celulares e, conseqüentemente, a textura das plantas (Faulds & Williamson, 1999).

## 2. EXPERIMENTAL

Na tabela 1 encontram-se descritas as características das diferentes amostras de pêra utilizadas, assim como os respectivos métodos de secagem.

Tabela 1. Caracterização das amostras

Amostra	Condições de secagem	Propriedades organolépticas
Fresca	-	Pêra branca e bastante adstringente
Coimbra	Túnel de ar quente, 40°C, sem exposição solar	Pêra branca com zonas acastanhadas, pouco elástica, não brilhante e com alguma adstringência
Viseu	Estufa solar de convecção forçada	Pêra castanha-avermelhada, elástica, brilhante e com alguma adstringência
Tradicional	Método de secagem tradicional, com exposição solar directa	Pêra castanha-avermelhada, elástica, brilhante e com alguma adstringência

## 2.1. Extração e purificação dos compostos fenólicos

O material exterior vermelho da pêra secada foi separado e imerso em azoto líquido, tendo sido posteriormente liofilizado. A amostra foi lavada com 200 mL de *n*-hexano (95%) à temperatura ambiente sob agitação magnética, durante 20 minutos para a remoção de lípidos. O material insolúvel foi extraído com 3 x 200 mL de metanol à temperatura ambiente, sob agitação magnética durante mais 20 minutos, extraíndo, deste modo, os polifenóis de baixo peso molecular, e dissolvendo os açúcares e ácidos orgânicos. Os extractos de metanol foram filtrados, concentrados (Ferreira *et al.*, 2002) e extraídos com 3 x 200 mL de uma solução acetona/água (6:4, v/v) à temperatura ambiente, para a extração dos compostos fenólicos polimerizados. As soluções foram centrifugadas e os sobrenadantes concentrados (extractos de acetona). O material insolúvel foi congelado e liofilizado (resíduo da extração). À excepção do tratamento com *n*-hexano, todas as extrações foram realizadas sob condições ácidas (2% ácido acético v/v), evitando assim a oxidação dos compostos fenólicos. Os açúcares existentes nos extractos de metanol e de acetona foram removidos por extração em fase sólida, com uma coluna C18 (SPE, Supelco-Discovery 10 g), pré-condicionada com 20 mL de metanol, seguido de 20 mL de água. Os extractos (metanol e acetona) foram eluídos pela coluna C18 e lavados com 2% de ácido acético para remover os açúcares (a presença de açúcares foi seguida pelo teste de Dubois, por reacção com ácido sulfúrico concentrado na presença de fenol, a quente). Os compostos fenólicos foram recuperados com metanol, concentrados e liofilizados (extractos de metanol e acetona livres de açúcares), (Passos *et al.*, 2007).

## 2.2. Quantificação dos compostos fenólicos totais

O método usado na quantificação da concentração total dos compostos fenólicos nas várias amostras de pêra foi o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu. A 0,5 mL de cada solução de extracto purificado (1 mg/mL em ácido acético 2% v/v), foram adicionados 250 µL de reagente de Folin-Ciocalteu (Sigma). A mistura foi homogeneizada, tendo sido adicionados, de seguida, 1 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (200 g/L) e 3,25 mL de água destilada, prefazendo um volume total de 5,0 mL. A reacção decorreu durante 2 h no escuro. Ao fim deste tempo, leram-se as absorvâncias a 700 nm num espectrofotómetro de UV/Vis (Ferreira *et al.*, 2002; Guyot *et al.*, 1998).

## 2.3. Análise por ESI-MS e ESI-MS/MS

Os compostos fenólicos presentes nos vários extractos foram analisados e identificados por espectrometria de massa com fonte de ionização por electrospray (ESI-MS e ESI-MS/MS). A análise foi efectuada em modo negativo. Os espectros de ESI-MS/MS foram adquiridos usando um instrumento “Linear Ion Trap”.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na figura 1 observa-se a quantidade total de compostos fenólicos existente nos extractos de metanol e de acetona das várias amostras, por massa seca de amostra. Nas peras não processadas, a quantidade de compostos fenólicos no extracto de metanol é maior do que a quantidade de compostos fenólicos no extracto de acetona:água. No entanto, nas amostras secadas, a quantidade de compostos fenólicos no extracto de metanol é menor e é maior nos extractos de acetona:água. Este efeito é maior na secagem tradicional do que nas secagens feitas em túnel (Coimbra) e em estufa (Viseu). Verifica-se assim que a quantidade de compostos fenólicos extraída nestes dois extractos é bastante afectada pelo processo de secagem e varia com o processo utilizado. Estas alterações na extractabilidade podem dever-se a vários factores, nomeadamente, à alteração na matriz celular da pêra, associação de compostos fenólicos com outros compostos ou reacções de polimerização.

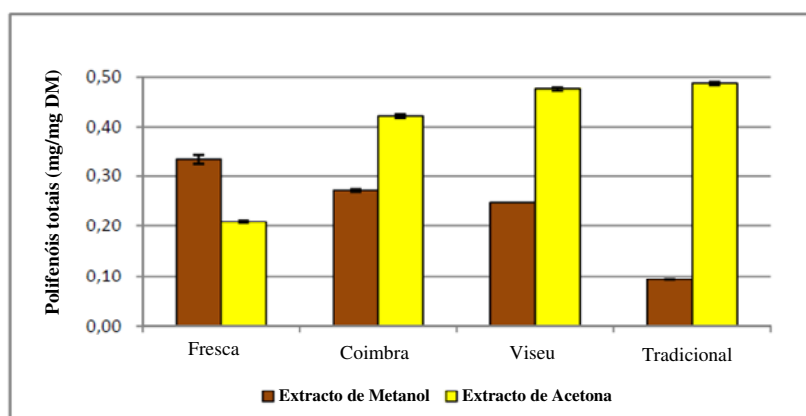


Figura 1. Compostos fenólicos totais presentes nos extractos de metanol e acetona das amostras

Com o objectivo de identificar o tipo de compostos presentes nestes extractos, procedeu-se à análise por ESI-MS e ESI-MS/MS. As figuras 2 e 3 mostram dois exemplos de espectros de massa do extracto de acetona da amostra de peras secadas tradicionalmente.

Na figura 2 podemos observar a presença de dímeros (P2), trímeros (P3), tetrâmeros (P4) e pentâmeros (P5) de procianidinas e na figura 3, podem observar-se as várias vias de fragmentação do ião  $m/z$  865 (trímero).

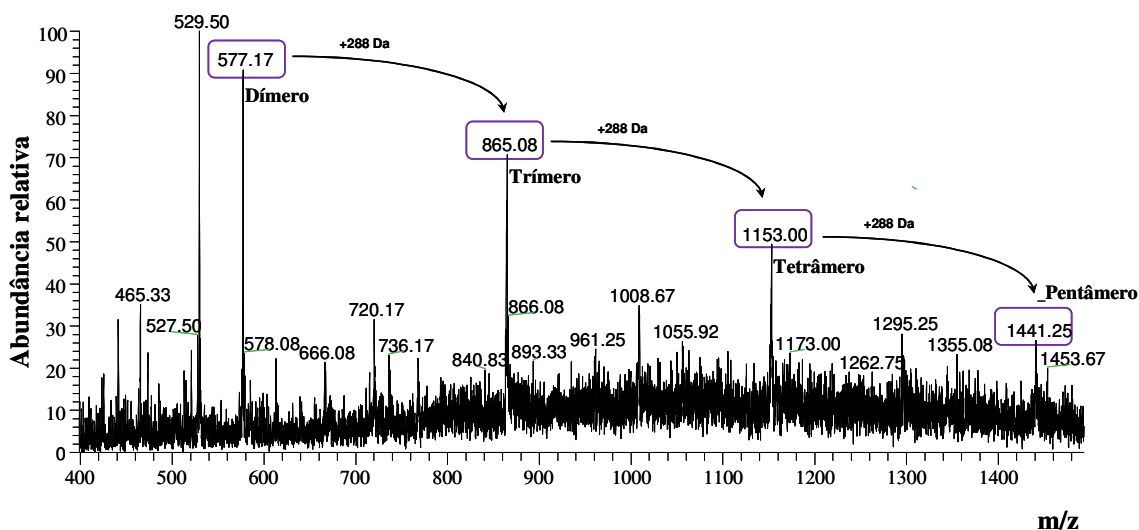


Figura 2. Espectro de ESI-MS do extracto de acetona purificado proveniente das pêsas secadas pelo método tradicional. Procianidinas do tipo B P2 ( $m/z$  577), P3 ( $m/z$  865), P4 ( $m/z$  1153), P5 ( $m/z$  1441).

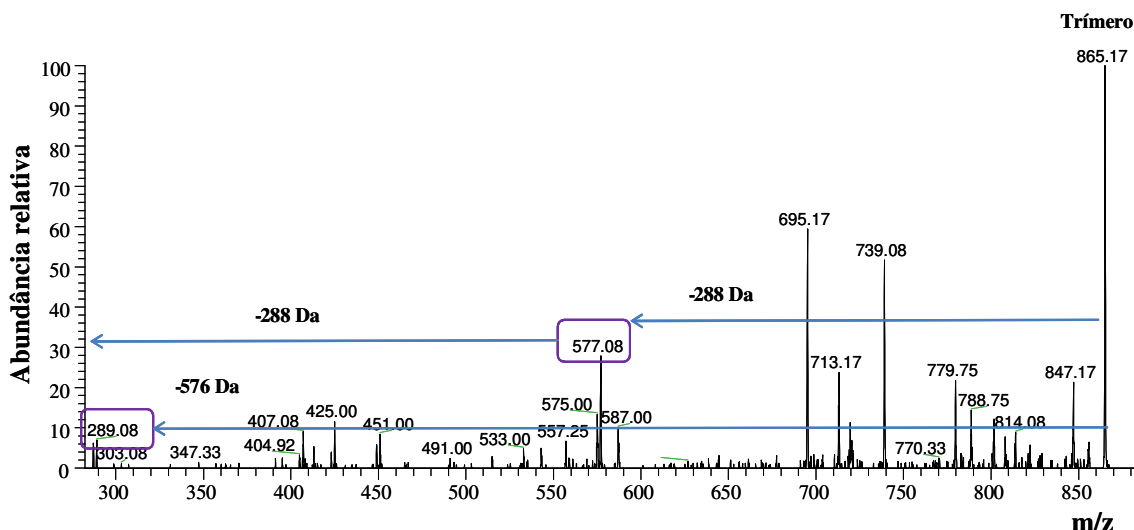


Figura 3. Espectro de ESI-MS/MS de um trímero de uma procianidina do tipo B.

A presença de 3 resíduos de (-)-epicatequina é confirmada pela presença dos iões a  $m/z$  577 e 289, que correspondem a uma perda de -288 Da, originando um dímero ( $m/z$  577), seguido da perda de outro resíduo, originando uma monómero de (-)-epicatequina ( $m/z$  289).

Na tabela 2 encontram-se identificados os compostos fenólicos presentes nos extractos de metanol e acetona de todas as amostras analisadas. Na coluna “( $m/z$ )”, os valores apresentados referem-se à fragmentação dos iões provenientes do ião precursor. Os compostos que não foram caracterizados, não possuem valores para a fragmentação nessa coluna.

Tabela 2. Compostos fenólicos identificados nos extractos por ESI-MS.

Composto			Abundância relativa (%)								
			Amostra		Fresca		Coimbra		Viseu		Tradicional
Mr	(m/z) <sup>+</sup> Ms <sup>2</sup>	MeOH	Acetona	MeOH	Acetona	MeOH	Acetona	MeOH	Acetona	MeOH	Acetona
Ácido clorogénico	354	135, 179, 191	100	100	100	100	100	100	100	50	100
Ácido caftárico	312	-	-	-	38	-	-	-	-	100	-
Ácido cafeico	180	121, 135	-	-	-	-	26	-	-	-	-
Ácido <i>p</i> -comaroilquínico	338	-	-	-	-	-	21	-	-	-	55
Ácido ferrúlico	194	-	-	-	25	-	26	-	-	-	-
Epicatequina	290	-	5	7	-	39	8	26	-	-	-
Epigallocatequina	306	-	-	-	-	-	13	-	-	-	-
Dímero de Procianidina	578	289, 407, 425	17	-	29	55	13	57	-	-	91
Trímero de Procianidina	866	289, 451, 577, 713	14	-	19	45	-	48	-	-	76
Tetrâmero de Procianidina	1154	289, 577, 865, 1027	10	-	10	28	-	27	-	-	41
Pentâmero de Procianidina	1442	577, 701, 1186	-	-	6	14	-	20	-	-	23
Hexâmero de Procianidina	1730	711, 1441	-	-	4	5,5	-	13	-	-	8
Arbutina	271	-	-	4	-	-	6	13	-	-	-
Quercetina	302	-	-	-	-	-	6	-	-	-	-
Quercetina-3-rutinosídeo	610	-	-	-	-	-	9	-	-	-	-
Quercetina-3-Hex	464	301, 343, 373	-	-	50	-	28	-	-	-	-
Quercetina-3-HexAc	506	301, 343, 385	-	-	41	-	20	-	-	-	-
Quercetina-3-xilosídeo	433	301	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Isorhamnetina	316	151, 271	-	-	-	-	27	-	-	-	-
Isorhamnetina-3-Hex	478	315, 357, 387	-	-	34	11	19	-	-	-	-
Isorhamnetina-3-Pent	448	315, 429	-	-	58	-	13	-	-	-	-
Canferol-3-Hex	448	285, 327, 357, 387	-	-	58	-	13	-	-	-	-

Os compostos fenólicos identificados nos extractos por ESI-MS e ESI-MS/MS, mostram que a exposição solar afecta a capacidade de extracção de alguns compostos. Assim, os

polímeros das amostras sujeitas à exposição solar foram mais bem extraídos com soluções de acetona/água, enquanto aqueles que não contactaram directamente com a luz solar, conseguiram uma melhor extracção com metanol. Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos para o conteúdo fenólico total dos extractos de metanol e acetona, para as diferentes amostras.

As procianidinas foram identificadas com um grau de polimerização de 2 a 6 (DP2-DP6), estando estas presentes em maior abundância nos extractos de acetona das amostras processadas. O composto fenólico mais abundante nos extractos analisados foi o ácido clorogénico. No entanto, compostos derivados do canferol, como o canferol-3-Hex e da isorhamnetina, como a isorhamnetina-3-Hex e isorhamnetina-3-Pent foram também identificados nas peras expostas à luz solar, sobretudo nos extractos de acetona das amostras de Coimbra e Viseu. A arbutina e alguns ácidos fenólicos foram, igualmente, identificados, ainda que em quantidades reduzidas. Os flavonóis quercetina e seus derivados, como a quercetina-3-Hex, estão também presentes nos extractos das amostras expostas à luz solar.

#### 4. CONCLUSÃO

A extractabilidade das procianidinas com grau de polimerização entre 2 e 6 (DP2-DP6) é muito afectada pelo processo de secagem e varia com o processo utilizado. Os polímeros das amostras não processadas e processadas em túnel foram extraídos em maior quantidade pelo metanol do que os das amostras que foram sujeitas à exposição solar, tendo estes compostos sido extraídos em maior quantidade com a solução de acetona/água. Para além das procianidinas, o composto fenólico mais abundante nos extractos foi o ácido clorogénico. Foram também identificados, principalmente nos extractos das amostras expostas à luz solar, isorhamnetina-3-Hex, canferol-3-Hex e quercetina-3-Hex.

**Agradecimentos:** Agradecemos à FCT pelo apoio financeiro através do projecto PTDC/AGR-ALI/74587/2006 e à Unidade de Investigação 62/94 QOPNA.

#### Referências

- Broomfield, R. W. (1995). "The manufacture of preserves, flavouring and dried fruits". Em *Fruit Processing*; Arthey, D., Ashurst, P.R., Eds.; Blackie Academic & Professional, 165-195.
- Faulds, C. B., Williamson, G. (1999). "The role of hydroxycinnamates in the plant cell wall". *J. Sci. Food Agric.*, 79, 393-395.
- Ferreira, D., Guyot, S., Marnet, N., Delgadillo, I., Renard, C.M.G.C., Coimbra, M.A. (2002). "The composition of phenolic compounds in a portuguese pear (*Pyrus communis* L. var. S. Bartolomeu) and changes after sun-drying". *J. Agric. Food Chem.*, 50, 4537-4544.
- Guyot, S., Marnet, N., Laraba, D., Sannoner, P., Drilleau, J-F. (1998). "Reversed-phase HPLC following thiolysis for quantitative estimation and characterization of the four main classes of

- phenolic compounds in different tissues zones of a French cider apple variety (*Malus domestica* var. Kermerrien)". *J. Agric. Food Chem.*, 46, 1698-1705.
- Hulme, A.C. (1958). "Some aspects of the biochemistry of apple and pear fruits". Em *Advances in Food Research* ; Edss. Mark, E. M.; Stewart, G. F.; Academic Press, Inc., New York, 7, 297-395.
- Macheix, J-J; Fleuriet, A., Billot, J. (1990). " The main phenolics of fruit". Em *Fruit Phenolics*; CRC Press, Inc.:Boca Raton, Florida, 17-41.
- McBean, D. M. G., Joslyn, M. A., Nury, F. S. (1971). "Dehydrated fruit". Em *The Biochemistry of Fruits and their Products*; Hulme, A. C. Ed.; Academic Press: Londres, 623-652.
- Ng, A., Greenshields, R. N., Waldron, K. W. (1997). "Oxidative cross-linking of corn bran hemicellulose: formation of ferrulic acid dehydrodimers". *Carbohydr. Res.*, 303, 459-462.
- Pascual-Teresa, S., Santos-Buelga, C., Rivas-Gonzalo, J. C. (2000). "Quantitative analysis of flavan-3-ols in Spanish foodstuffs and beverages". *J. Agric. Food Chem.* 48, 5331-5337.
- Passos, C., Cardoso, S. M., Domingues, M. R., Domingues, P., Silva, C. M., Coimbra, M. A. (2007). " Evidence for galloylated type A procyanidins in grape seeds". *Food Chem.*, 105, 1457-1467.
- Renard, C. M. G. C., Baron, A., Guyot, S., Drilleau, J-F. (2001). "Interactions between apple cell walls and native polyphenols: quantification and some consequences". *Int. J. Biol. Macromol.*, 29, 115-125.
- Spanos, G. A., Wrolstad, R. E. (1992). "Phenolics of apple, pear and white grape juices and their changes with processing and storage" – A review. *J. Agric. Food Chem.*, 40, 1478-1487.
- Wrolstad, R. E., Lombard, P. B., Richardson, D. G. (1991). "The pear". Em *Quality and Preservation of Fruits*; Ed. Eskin, N.A.; CRC Press: Boca Raton, 67-95.