



Tomate Salada: Uma Alternativa como Fonte de Antioxidante para Uso Tópico

Letícia C. CEFALI ^{1*}, Daniel RINALDO ², Vanessa de F. BARBOSA ³, Hérica R.N. SALGADO ¹,
Wagner VILEGAS ², Olga M.M. de F. OLIVEIRA ³ & Vera L.B. ISAAC ¹

¹ Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Departamento de Fármacos e Medicamentos,
Rodovia Araraquara-Jaú, Km 1,
Caixa Postal 502, CEP 14801-902, Araraquara – São Paulo – Brasil

² Instituto de Química – UNESP – Departamento de Química Orgânica – Araraquara – São Paulo – Brasil

³ Instituto de Química – UNESP – Departamento de Bioquímica,
Rua Francisco Degni, s/n, Bairro Quitandinha, CEP 14800-900, Araraquara – São Paulo – Brasil

RESUMO. O tomate é a principal fonte de licopeno que é um carotenóide com alta atividade antioxidante, podendo assim ser utilizado topicamente na forma de um fitocosmético no combate ao envelhecimento cutâneo. O objetivo deste estudo foi obter um extrato rico em licopeno através da polpa do tomate tipo salada. O extrato foi analisado utilizando os métodos de espectroscopia no ultravioleta/visível, cromatografia de camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência. A atividade antioxidante do extrato foi avaliada utilizando o método do radical livre DPPH. Foi identificada a presença de licopeno na polpa do tomate salada e o extrato apresentou uma fração apolar rica em carotenóides referente a 96,70% de licopeno. Na avaliação da atividade antioxidante usando o radical DPPH, o extrato apresentou atividade (IC₅₀ de 0,311 mg/mL). Nós concluímos que o tomate salada é uma fonte rica em licopeno e pode ser utilizado futuramente como antioxidante para uso tópico.

SUMMARY. “Tomato Salad: An Alternative as Antioxidant Source for Topic Use”. Tomato is the principal source of lycopene, a carotenoid with high antioxidant activity which can be used topically as a phytocosmetic to combat skin aging. The aim of this study was to get a lycopene-rich extract from salad tomato pulp. The extract was analyzed using UV/vis spectroscopy, thin layer chromatography and high performance liquid chromatography. Oxidant activity was analyzed using the free radical DPPH method. The presence of lycopene in the salad tomato was confirmed. It was present in the apolar fraction rich in carotenoids, which was 96.70% lycopene. In the evaluation of the antioxidant activity, using the radical DPPH, the extract showed activity (IC₅₀ = 0,311 mg/mL). We conclude that the salad tomato can be used as a source of antioxidants for topic use.

INTRODUÇÃO

O tomate é certamente um importante fruto comumente usado no mundo todo. No Brasil, ele é um dos frutos mais largamente consumido, fresco ou processado, e é uma das principais fontes de carotenóides pela maioria da população ^{1,2}. Estudos epidemiológicos têm mostrado que o aumento do consumo de tomate e produtos a base de tomate podem reduzir o risco de certos tipos de câncer, como o de próstata, pulmão e estômago ^{3,4}.

Os frutos de tomate podem ser identificados, primeiramente, pelo formato, o qual pode estar relacionado a sua finalidade de uso. Nos últimos anos, tem aumentado em muito a diversidade dos produtos oferecidos, sendo ainda mais comuns os formatos oblongo e redondo. O tomate

salada ou chamado tomate Santa Cruz tem formato oblongo, cor vermelha, tem longa durabilidade e é tradicionalmente utilizado na culinária para uso em saladas e molhos ^{5,6}.

Os carotenóides são pigmentos naturais lipofílicos, amplamente distribuídos na natureza, que apresentam diversas funções biológicas e benefícios à saúde, funcionando como antioxidantes, precursores hormonais, colorantes e essenciais componentes para a fotossíntese. São responsáveis pela coloração vermelha, amarela e alaranjada de frutas, vegetais, raízes, flores, peixes, invertebrados e pássaros ^{7,8}.

Já foram identificados mais de 600 carotenóides e isso se deve às modificações da sua estrutura básica através da hidrogenação, desidrogenação, ciclização, migração de ligação dupla,

PALAVRAS CHAVE: Fitocosmético, Licopeno, Tomate.

KEY WORDS: Lycopene, Phytocosmetic, Tomato.

* Autor a quem correspondência deve ser enviada. E-mail: letisc82@yahoo.com.br

encurtamento ou extensão da cadeia, rearranjo, isomerização, introdução de substituintes ou combinação desses processos ⁸.

O licopeno é um carotenóide natural, sem atividade pró-vitamina A e um potente antioxidante. Não é sintetizado pelo organismo, mas pode ser obtido através da dieta alimentar 4 a 35 mg/dia. Encontra-se principalmente no tomate (*Solanum lycopersicum* L.) tanto na forma crua, como em suco, purê, pasta, extrato, “catchup”, mas também pode ser encontrado no mamão, na goiaba vermelha, na pitanga e na melancia. Possui estrutura simétrica e acíclica, formada por carbono e hidrogênio e fórmula molecular C₄₀H₅₆. É lipossolúvel e apresenta onze duplas ligações conjugadas e duas não conjugadas (Fig. 1) ⁹.

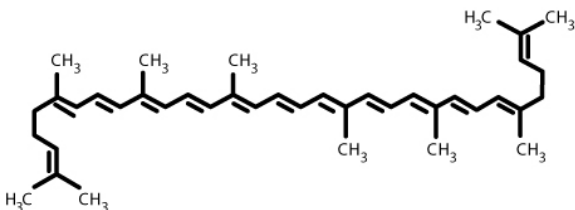


Figura 1. Fórmula estrutural do licopeno.

Possui duas formas isoméricas, a *trans* e a *cis*. O licopeno predominantemente ocorre na configuração *all-trans*, que é a forma termodinamicamente mais estável. O isômero *cis* é formado da conseqüência do processamento de alimentos, ou seja, quando o tomate é cozido, uma vez que o calor é responsável pela modificação da forma isomérica de *trans* para *cis*. Na forma isomérica *cis* a absorção do licopeno é maior e mais rápida que na forma *all-trans*-licopeno ¹⁰.

O fitoquímico encontrado em produtos de tomate que possui maior função anti-carcinogênica é o licopeno. Devido a sua longa cadeia carbônica com duplas ligações conjugadas, o licopeno tem sido considerado como ativo antioxidante, com atividade superior à da luteína e β-caroteno ³.

O licopeno exerce função antioxidante em fases lipídicas, bloqueando radicais livres que danificam as membranas protéicas ¹¹. Diminui o estresse oxidativo prevenindo o aparecimento de vários tipos de cânceres, principalmente o de próstata, a Hiperplasia Prostática Benigna (HPB), assim como previne problemas no sistema cardiovascular, olhos e pele; é benéfico no combate à incidência de doenças como a osteoporose em mulheres na pós-menopausa e diabetes, e atua também na prevenção ao envelhecimento celular e acelera a regeneração epitelial ^{12,13}.

O envelhecimento da pele é provocado por fatores intrínsecos e extrínsecos. Dentre os fatores extrínsecos, o envelhecimento pode ocorrer pela ação de radicais livres na pele. Cerca de 80% dos sinais visíveis causados no envelhecimento são provocados pelos raios UV e os principais causadores são os radicais livres, proporcionando a aceleração do envelhecimento cutâneo, aumento de rugas, espessamento da epiderme, perda da firmeza e diminuição da elasticidade da pele, modificando sua permeabilidade e funcionamento normal. A destruição de lipídeos da pele por peroxidação contribui para uma pele seca e áspera. Além das reações provocadas pelos radicais livres, o envelhecimento também é causado pela ineficiência crescente de nossas defesas naturais antioxidantes. Com o passar da idade, aumenta também a concentração de radicais livres que deveriam ser neutralizados por substâncias antioxidantes ¹⁴⁻¹⁶.

O licopeno pode ser usado para obtenção de fitocosmético a ser usado no combate ao envelhecimento cutâneo, devido sua máxima intensidade na habilidade de neutralizar espécies de oxigênio reativos e radicais livres, principalmente o oxigênio singlete (¹O₂) proveniente dos raios UV, inibindo ou diminuindo os efeitos do estresse oxidativo, provocados pelos raios UV, especialmente na epiderme ¹⁷.

A cromatografia líquida de alta eficiência é um dos métodos mais usados na análise de carotenóides devido à eficiência, rapidez, permitir boa separação em menor tempo, e o seu uso é relativamente simples. A extração dos carotenóides pode ser feita com solventes apolares ^{18,19}.

Existem alguns parâmetros úteis para identificação dos carotenóides como afinidade de absorção na coluna e na camada delgada, espectros de absorção na região do visível, entre outros. Os carotenóides acíclicos geralmente apresentam tempos de retenção maiores do que os cíclicos que contém o mesmo grupo funcional e os carotenóides com maior grau de saturação são retidos mais fortemente ^{20,21}.

Várias empresas comercializam alguns padrões de carotenóides para fins analíticos. Entretanto, estes padrões possuem um alto custo e vida-útil reduzida, uma vez que após a abertura da embalagem ocorre formação de isômeros e produtos de oxidação devido ao longo sistema de ligações duplas conjugadas presente nos carotenóides ²².

O objetivo deste estudo foi obter extrato rico em licopeno a partir da polpa de tomate salada.

MATERIAL E MÉTODOS

Tomate tipo salada cru, álcool etílico PA, acetato de etila (grau HPLC), hexano (grau HPLC), acetonitrila (grau HPLC), metanol (grau HPLC), agente complexante (anissaldeído, ácido acético, metanol e ácido sulfúrico), radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH), vitamina C (padrão analítico). Acessórios: béckeres, frascos erlenmeyer, espátula, termômetro, fonte de aquecimento, microfiltro de nylon (Millipore) de 0,45 µm, coluna cromatográfica C₁₈ (PHENOMENEX LUNA(2) – 250 x 4,60 mm, 5 µm), placa comercial de sílica gel 60 (SIGMA ALDRICH). Equipamentos: balança analítica (GEHAKA, BG 2000), estufa de secagem (QUIMIS), agitador magnético (MARCONI, MA85), espectrofotômetro no ultravioleta/visível (UV/VIS) (HITACHI, mod U 2001), cromatógrafo líquido de alta eficiência (JASCO, bomba PU-2089 plus, injetor automático AS-2055 plus, detector MD 2010 plus), rotaevaporador (ROTAVAPOR-RE, BÜCHI).

Obtenção da amostra

Foi utilizado tomate tipo salada na forma crua adquirido no mercado Jaú Serve da cidade de Araraquara, estado de São Paulo, no mês de janeiro de 2008.

Obtenção da polpa de tomate

Foram utilizados 700 g de tomate tipo salada inteiros e na forma crua. Os tomates foram lavados com água e sabão. Logo após, foram picados em cubos e colocados com casca e semente em uma panela sobre uma fonte de aquecimento. A obtenção da polpa de tomate foi realizada durante 45 min a 95 °C 23.

Obtenção de carotenóides

Foram pesados 15 g da polpa de tomate, como obtido anteriormente e colocados em um frasco erlenmeyer para a realização da extração de carotenóides. Para a obtenção do licopeno, foi realizada primeiramente a retirada de água presente no tomate. Este processo foi realizado 4 vezes utilizando em cada etapa 30 mL de álcool etílico. O frasco erlenmeyer contendo polpa de tomate e álcool etílico ficou sob agitação em agitador magnético. Os sobrenadantes foram descartados e logo após foram realizadas 4 extrações com acetato de etila (1:0,7 massa/volume) durante 120 min cada extração, sob agitação em agitador magnético, obtendo assim 4 extratos: 1, 2, 3 e 4 24.

Identificação de carotenóides através do espectrofotômetro no UV/VIS

Imediatamente após as extrações com acetato

de etila os 4 extratos obtidos separadamente foram analisados através da espectroscopia no visível a 472 nm, utilizando acetato de etila como branco, para detectar a presença de licopeno. O extrato foi levado para um rotaevaporador até secagem 24,25.

Identificação de carotenóides através da cromatografia em camada delgada (CCD)

Os carotenóides foram identificados por CCD, utilizando placas comerciais de sílica gel 60 sem indicador de fluorescência, de tamanho 20 x 20 cm e 0,2 mm de espessura de adsorvente. A fase móvel utilizada foi hexano / acetato de etila (9:1, v/v). A placa foi pulverizada com o agente complexante anissaldeído/ácido sulfúrico e posteriormente levada à estufa a 100 °C 26.

Identificação de carotenóides através da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Foi utilizado um cromatógrafo líquido (JASCO), modelo PU - 2089, injetor automático modelo AS - 2055 PLUS e detector por arranjo de fotodiodos MD 2010 PLUS. O software utilizado foi o EZICROM ELITE versão 3.1.7. A amostra foi diluída em metanol e posteriormente filtrada em microfiltro de nylon de 0,45 µm e injetada no cromatógrafo. Para as análises, foi utilizada uma coluna de fase reversa (C₁₈) PHENOMENEX LUNA (4,6 x 250 mm; 5 µm), utilizando como fase móvel à mistura acetonitrila/metanol/acetato de etila 48:26:26 (v/v) em modo isocrático de eluição com vazão de 1,0 ml/min. A faixa de monitoramento da análise programada no DAD foi de 300 nm a 600 nm 24.

Estudo da atividade antioxidante in vitro

O potencial antioxidante do extrato foi determinado baseado na avaliação da atividade sequestrante de radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH). O DPPH é um radical estável muito utilizado nos estudos com antioxidantes, que apresenta máximo de absorção em 531 nm, sendo este o comprimento de onda utilizado para avaliar a ação das amostras. Em tubos de ensaio, a amostra foi pipetada (extrato licopeno em diferentes concentrações, seguida por DPPH). O ensaio também foi realizado para a vitamina C como padrão antioxidante, em diferentes concentrações. As absorvâncias foram medidas utilizando etanol e extrato como branco a 531 nm 27. Na presença de scavengers deste radical, a intensidade da absorvância em 531 nm diminui e a porcentagem de inibição (%INIBIÇÃO) é calculada como [Eq. 1] 28:

$$\% \text{ descoloração DPPH} = \frac{A_{\text{Max}} - A_{\text{Teste}}}{A_{\text{Max}}} \times 100 \quad [1]$$

sendo que: A Max é a absorvância do DPPH em 531 nm na ausência de amostra e A Teste é a absorvância do DPPH em 531 nm na presença de amostra.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o método extrativo da polpa do tomate salada foi obtido um extrato contendo carotenóides que apresentou uma coloração vermelha intensa, característica desses compostos, já que são os responsáveis pela cor avermelhada de frutos, vegetais, entre outros, como descrito anteriormente.

Depois de seco, foi obtida uma massa de 54,5 mg de extrato rico em carotenóides. Este extrato foi analisado primeiramente em espectrofotômetro no visível para a identificação da presença de licopeno. O comprimento de onda utilizado foi de 472 nm, característico desse composto ²⁵.

Outro método de identificação utilizado foi a CCD. Após a análise, foi possível observar uma única mancha na placa de sílica. Após a pulverização com o agente complexante e permanência em estufa a 100 °C, a única mancha que apresentava uma coloração amarelada, tornou-se roxa, caracterizando a existência de apenas carotenóides no extrato.

Com a análise em CLAE, foi identificado um único pico de espectro no UV/VIS com máximos em 447, 472, e 503 nm (Fig. 2) característico do licopeno com tempo de retenção de 11,347 min. A porcentagem referente à área do pico majoritário demonstrado na Figura 3 foi de 96,70.

O extrato rico em licopeno foi avaliado

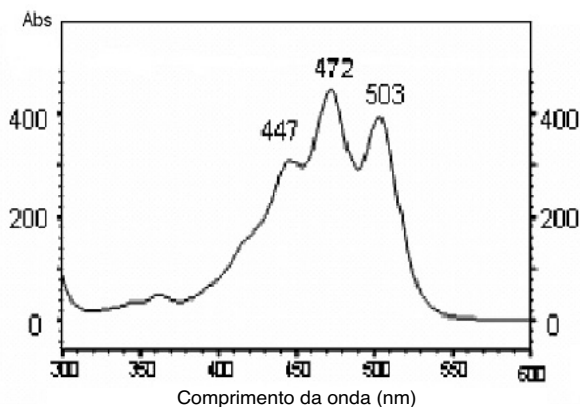


Figura 2. Espectro no UV/VIS do all-trans-licopeno presente no extrato obtido por CLAE.

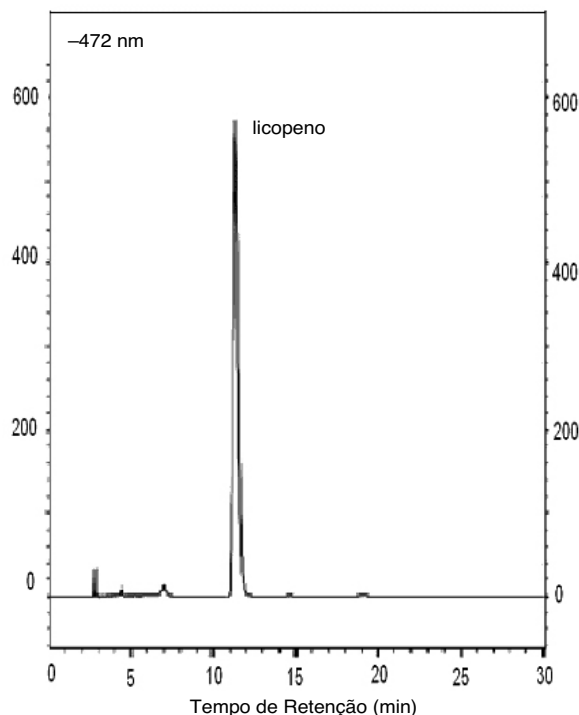


Figura 3. Cromatograma do extrato de polpa de tomate salada. Coluna Phenomenex Luna(2), 250 x 4,60 mm; modo isocrático de eluição; Solvente: ACN/MeOH/AcOEt (48:26:26, v/v), Vazão = 1,0 mL/min, DAD λ = 472 nm).

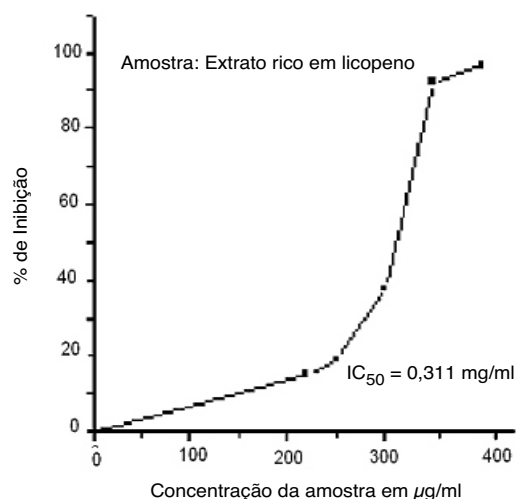


Figura 4. Atividade sequestrante de radical DPPH de extrato rico em licopeno com valor de IC₅₀ de 0,311 mg/mL.

quanto à atividade *in vitro* utilizando o radical DPPH e apresentou um valor considerável de IC₅₀ de 0,311 mg/mL do extrato (Fig. 4). O mesmo teste foi realizado com a vitamina C como padrão (1 mg/ml) e apresentou valor de IC₅₀ de 0,014 mg/ml (Fig. 5). Através destes resultados foi observado que o extrato não foi tão eficiente

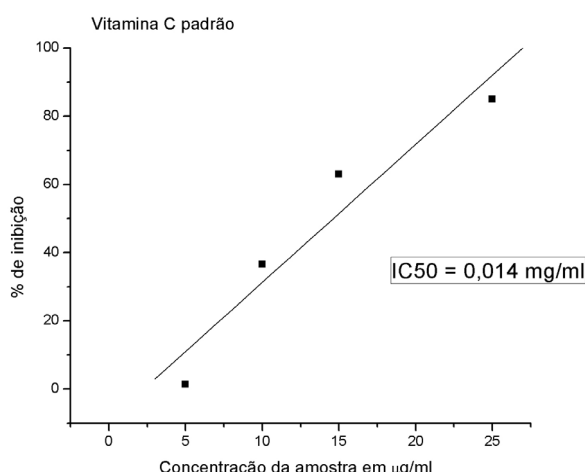


Figura 5. Atividade sequestrante de radical DPPH de padrões (IC₅₀ cisteína = 20 mM e IC₅₀ vitamina C = 28 mM).

quanto a vitamina C. No entanto, a ação pode ser considerada satisfatória, pois na concentração de 350 µg/mL o extrato conseguiu inibir 92,6% dos radicais DPPH presentes.

CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos é possível concluir que o tomate salada é rico em carotenóides, em especial licopeno e pode ser utilizado como fonte de matéria-prima antioxidante para uso tópico no combate ao envelhecimento cutâneo.

Agradecimentos. Ao apoio financeiro de CNPq, FINEP, FUNDUNESP, PADCF-FCF-UNESP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Tavarez, C.A. & D.B. Rodriguez-Amaya (1994) *Lebensm. Wiss. Technol.* **27**: 219-24.
- Kimura, M. & D.B. Rodriguez-Amaya (2002) *Food Chem.* **78**: 389-98.
- Lin, C.H. & B.H. Chen(2003) *J. Chromatogr.* **1012**: 103-9.
- Raffo, A., G. La Malfa, V. Fogliano, G. Maiani & G. Quaglia (2006) *J. Food Comp. Anal.* **19**: 11-9.
- Feagri. Disponível em: <<http://www.feagri.unicamp.br/tomates/consumidordicas1.htm>>. [Acesso em: 17 de Março de 2008].
- Embrapa. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/>>. [Acesso em: 17 de Março de 2008].
- Howitt C.A. & B.J. Pogson (2006) *Plant Cell Environ.* **29**: 435-45.
- Pinto, J.T. (2006) "Efeito da estocagem da goiabada a diversas temperaturas sobre os teores de carotenóides e de ácido ascórbico" Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, págs. 5-6.
- Sies, H. & W. Stahl(1996) *Biochem. Biophys.* **336**: 1-9.
- Schieber, A. & R. Carle(2005) *Trends Food Sci. Technol.* **16**: 416- 22.
- Shami, N.J.I.E. & E.A.M. Moreira (2004) *Rev. Nutr.* **17**: 227- 36.
- Rao L.G. & A.V. Rao (2007) *Pharmacol. Res.* **55**: 207-16.
- Shao A. & J.N. Hathcock (2006) *Regul. Toxicol. Pharm.* **45**: 289-98.
- Giacomoni, P.U. (2007) *Cosmet. Toiletries* **122**: 36-40.
- Magalhães, J. (2000) "Cosmetologia". Rubio: Rio de Janeiro, págs. 115-18.
- Scotti, L. & M.V.R. Velasco(2003) "Envelhecimento cutâneo à luz da Cosmetologia: estudo do envelhecimento cutâneo e da eficácia das substâncias ativas empregadas na prevenção". Tecnopress: São Paulo, págs. 22-9, 45-55.
- Andreassi, M., E. Stanghellini, A. Ettore, A.Di Stefano & L. Andreassi (2004) *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **18**: 52-5.
- Mercadante, A.Z. & D. Rodriguez-Awaya (2001) *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **21**: 216-22.
- Oliver, J. & A. Palou(2000) *J. Chromatogr. A* **881**: 543-55.
- Britton, G., S. Liaaen-Jensen & H. Pfander (1995) "Carotenoids: Isolation and Analysis". Basel: Birkhauser, pp.13-26.
- Rodriguez-Awaya, D.B. (1999) "A guide to carotenoid analysis in food". ILSI Press: Washington.
- Britton, G. (1995) "UV/visible Spectroscopy". In.: "Carotenoids: Spectroscopy". (G. Britton, S. Liaaen-Jensen & H.Pfander, eds.). Basel: Birkhäuser, pp. 13-62.
- Borguini, R.G. (2006) "Avaliação do potencial antioxidante e de algumas características físico-químicas do tomate orgânico em comparação ao convencional". Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, págs. 69-70.
- Nunes, I.L. & A.Z. Mercadante (2004) *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **24**: 440-7.
- Merck Index (1989) Merck & Co. Inc., 12th ed., Whitehouse Station, New Jersey, p. 961.
- Wagner, H.M., S. Bladt & E.M. Zgainski(1984) *Plant Drug Analysis*. Springer: Berlin.
- Braca, A., G. Fico, I. Morelli, F.D. Simone, F. Tome & N.D. Tommasi (2003) *J. Ethnopharmacol.* **86**: 6367.
- Cuendet, M., K. Hostettmann, O. Potterat & W. Dyatmiko (1997) *Helv. Chim. Acta* **80**: 1144-52.
- Iha, S.M., K.F. Migliato, J.C.R. Velloso, L.V.S. Sacramento & R.C.L.R. Pietro (2007) *Rev. Bras. Farmacogn.* **18**: 387-93.