

CENTRO DE ESTATÍSTICA APLICADA – CEA – USP
RELATÓRIO DE CONSULTA

TÍTULO: “Potencial antioxidante e características físico-químicas do tomate (Lycopersicon esculentum) orgânico em comparação ao convencional”

PESQUISADORA: Renata Galhardo Borguini

ÁREA E INSTITUIÇÃO: Faculdade de Saúde Pública – FSP-USP

FINALIDADE DO PROJETO: Doutorado

PARTICIPANTES DA ENTREVISTA: Augusto César G. Andrade
Carlos Alberto de Bragança Pereira
Cristiane Karcher
Eduardo Serivano Neto
Elizabeth A. Ferraz da Silva Torres
Júlio da Motta Singer
Kim Samejima Mascarenhas Lopes
Larissa Teruko Kaneko
Renata Galhardo Borguini
Renata Omori

DATA : 17/08/2004

FINALIDADE DA ENTREVISTA: Sugestão para planejamento do experimento e cálculo do tamanho amostral

RELATÓRIO ELABORADO POR: Kim Samejima Mascarenhas Lopes
Larissa Teruko Kaneko

1. Introdução:

A busca por alimentos orgânicos, cultivados sem o uso de agrotóxicos, e por alimentos que possuem alto teor de agentes antioxidantes, cuja função é promover uma maior longevidade das células, tem aumentado nos últimos tempos. Dentre esses alimentos, o tomate é a hortaliça frutosa mais consumida na cidade de São Paulo, representando 49% do consumo total.

Neste contexto, será realizado um estudo com o objetivo de analisar a característica antioxidante de tomates orgânicos e convencionais preparados de cinco maneiras distintas. Para essa avaliação utilizar-se-ão três solventes diferentes: etéreo, aquoso e alcoólico. Para cada um deles, serão aplicados três métodos distintos de medida da atividade antioxidante: *tiocianato férrico*, *teste do DPPH* e *sistema β -caroteno*.

Também há interesse em identificar o elemento responsável pela atividade antioxidante (compostos fenólicos, ácidos ascórbicos ou carotenóides) e em identificar a presença de resíduos pesticidas nos tomates.

O objetivo deste relatório é descrever o experimento proposto, sugerir um tamanho de amostra, além de propor uma forma de armazenamento dos dados e de análise estatística.

2. Descrição do estudo

Serão coletados tomates cultivados de forma convencional – com uso de agrotóxicos, adubos ou agentes químicos que podem influenciar o processo de desenvolvimento e crescimento do fruto – e de forma orgânica na qual não há uso de adubos ou defensivos químicos sintéticos que possam causar desequilíbrios ecológicos ou que sejam agressivos ao organismo humano e ao meio ambiente (ver Penteado, 2000). A amostra na qual será medida a atividade antioxidante será obtida a partir de lotes de 20 kg de tomate. Como não existem informações sobre os lotes, serão consideradas homogêneas as características não inerentes ao tipo de cultivo – como região de produção, época de plantio, grau de maturação, condições de transporte, embalagens adotadas, exposição à umidade,

calor, luz etc. Os tomates de cada lote serão divididos a fim de que sejam preparados 5 produtos derivados da fruta: tomate *in natura* com pele, tomate *in natura* sem pele obtido com descascamento manual, tomate *in natura* sem pele obtido com aquecimento da superfície do fruto em chama de fogão, molho de tomate e extrato de tomate.

Após o preparo, cada um dos produtos terá algumas características físico-químicas medidas para a sua caracterização, a saber: *pH*, *teor de sólidos solúveis*, *umidade*, *atividade da água*, *firmeza polpa (textura)*, *cor*, *viscosidade*, *vitamina C*, *minerais* e *resíduos de pesticidas*.

A fim de se obter a medida de atividade antioxidante, submete-se cada um dos 5 produtos descritos acima a um processo de liofilização (desidratação a vácuo). Tritura-se o material obtido à temperatura ambiente e armazenam-se porções de 3g (chamadas de *farinha da amostra*) em frascos de âmbar com 60mL de éter etílico em atmosfera de nitrogênio a -18°C, obtendo-se extratos, que são agitados no homogeneizador por uma hora à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

Os extratos são então dissolvidos em três solventes distintos - etéreo, aquoso e alcoólico – e, submetidos a três métodos para obtenção da resposta (para cada um dos solventes): *tiocianato férrico*, *teste do DPPH* e *sistema β -caroteno*. Dos solventes alcoólico e aquoso é obtida, também, a resposta de *teor de fenólicos totais* e do etéreo o *teor de carotenóides totais* (β -caroteno e licopeno). Os métodos DPPH e *β -caroteno* são aplicados em duas concentrações distintas do extrato, denominadas *alta* e *baixa*. Para todas as respostas, obtém-se medidas em triplicata. Essas triplicatas são portanto, as unidades amostrais do estudo.

3. Descrição das variáveis

Variável resposta principal

Percentual de Atividade antioxidante (%);

Variáveis explicativas: Variáveis físico-químicas

pH;

Teor de sólidos solúveis (°Brix);

Umidade: % de água na amostra;

Atividade de água : razão entre a pressão do vapor da água do alimento e a pressão de vapor de água pura, ou seja, é a água do alimento disponível para as reações;

Firmeza da polpa (N): textura – resistência do tomate à compressão - dos frutos;

Cor: parâmetro físico que avalia a qualidade do produto e que é decomposta em duas variáveis: cromaticidade (croma) e tonalidade (°h);

Teor de vitamina C (mg/100g do produto)

Teor de minerais (mg/100g do produto)

Teor de resíduos de pesticida (mg/100g do produto).

4. Situação do Estudo

Os dados de uma amostra piloto estão sendo coletados a fim de obter uma estimativa da variabilidade da atividade antioxidante para os diferentes produtos analisados sob os diferentes métodos. Além disso, pretende-se verificar as dificuldades na condução do experimento (realização das medições, coleta de dados, manuseio dos aparelhos, etc.).

5. Sugestões do CEA

A partir de cada lote são preparados os cinco produtos em questão e cada um deles é diluído nos solventes aquoso, etéreo e etanólico (ou alcoólico) para a coleta das informações sobre a atividade antioxidante. Ao menos dois lotes de cada tipo de cultivo (convencional e orgânico), devem ser analisados, visto que com um número menor não haveria variabilidade suficiente para realizarmos as comparações desejadas.

Deseja-se avaliar os efeitos dos seguintes fatores na atividade antioxidante:

1. Tipo de cultivo (orgânico e convencional);
2. Produtos: tomate *in natura* com pele, tomate *in natura* sem pele com descascamento manual, tomate *in natura* sem pele com aquecimento da casca, molho de tomate e extrato de tomate;
3. Tipos de solventes: etéreo, aquoso e alcoólico;
4. Concentrações sob métodos DPPH e β -caroteno: baixa e alta;

Como não há interesse em comparar os métodos entre si, para cada um deles pode-se escrever um modelo separado. Nestes modelos, lote será considerado como bloco. Por exemplo, para o método *tiocianato férrico*, teremos o seguinte modelo:

$$Y_{ijklm} = \mu + \rho_i + \alpha_j + \beta_k + \gamma_l + (\alpha\beta)_{jk} + (\alpha\gamma)_{jl} + (\beta\gamma)_{kl} + (\alpha\beta\gamma)_{jkl} + \varepsilon_{ijklm}, \text{ com}$$

$$\sum_{j=1}^2 \alpha_j = \sum_{k=1}^5 \beta_k = \sum_{l=1}^3 \gamma_l = \sum_{j=1}^2 \sum_{k=1}^5 (\alpha\beta)_{jk} = \sum_{j=1}^2 \sum_{l=1}^3 (\alpha\gamma)_{jl} = \sum_{k=1}^5 \sum_{l=1}^3 (\beta\gamma)_{kl} = \sum_{j=1}^2 \sum_{k=1}^5 \sum_{l=1}^3 (\alpha\beta\gamma)_{jkl} = 0$$

$$\text{em que } \varepsilon_{ijklm} \sim \text{Normal}(0, \sigma_e^2) \text{ e } \rho_h \sim \text{Normal}(0, \sigma_r^2)$$

em que:

Y_{ijklm} = atividade antioxidante para o i -ésimo lote ($i=1$ ou 2), j -ésimo tipo de cultivo ($j=1$ ou 2), k -ésimo produto ($k=1, \dots, 5$), submetido ao l -ésimo tipo de solvente ($l=1, 2$ ou 3) na m -ésima unidade amostral.

μ = média geral da atividade antioxidante;

ρ_i = variação na atividade antioxidante devida ao bloco i ($i=1$ ou 2);

α_j = variação na atividade antioxidante devida ao tipo de cultivo j ($j=1$ ou 2);

β_k = variação na atividade antioxidante devida ao produto k (k=1,2,...,5);

γ_l = variação na atividade antioxidante devida ao solvente l (l=1, 2 ou 3);

$\alpha\beta_{jk}$ = efeito de interação entre o j-ésimo tipo de cultivo e o nível k do produto;

$\alpha\gamma_{jl}$ = variação na atividade antioxidante devida ao ao l-ésimo solvente do j-ésimo tipo de cultivo;

$\beta\gamma_{kl}$ = variação na atividade antioxidante devida ao l-ésimo solvente do k-ésimo produto;

$\alpha\beta\gamma_{jkl}$ = variação na atividade antioxidante devida ao l-ésimo tipo de solvente, produto k e j-ésimo tipo de cultivo;

ε_{ijklm} = efeito aleatório.

Para os métodos DPPH e *β -caroteno*, um outro fator, concentração, é incluído. Logo:

$$Y_{ijklmn} = \mu + \rho_i + \alpha_j + \beta_k + \gamma_l + \theta_m + (\alpha\beta)_{jk} + (\alpha\gamma)_{jl} + (\beta\gamma)_{kl} + (\alpha\theta)_{jm} + (\beta\theta)_{km} + (\gamma\theta)_{lm} + (\alpha\beta\gamma)_{jkl} + (\alpha\beta\theta)_{jkm} + (\alpha\gamma\theta)_{jlm} + (\beta\gamma\theta)_{klm} + (\alpha\beta\gamma\theta)_{jklm} + \varepsilon_{ijklmn}, \text{ com:}$$

$$\sum_{i=1}^2 \theta_i = \sum_{j,m} (\alpha\theta)_{jm} = \sum_{k=1}^5 \sum_{m=1}^2 (\beta\theta)_{km} = \sum_{l=1}^3 \sum_{m=1}^2 (\gamma\theta)_{lm} = 0.$$

$$\sum_{j=1}^2 \sum_{k=1}^5 \sum_{m=1}^2 (\alpha\beta\theta)_{jkm} = \sum_{j=1}^2 \sum_{l=1}^3 \sum_{m=1}^2 (\alpha\gamma\theta)_{jlm} = \sum_{k=1}^5 \sum_{l=1}^3 \sum_{m=1}^2 (\beta\gamma\theta)_{klm} = \sum_{j=1}^2 \sum_{k=1}^5 \sum_{l=1}^3 \sum_{m=1}^2 (\alpha\beta\gamma\theta)_{jklm} = 0.$$

e $\varepsilon_{ijklmn} \sim \text{Normal}(0, \sigma^2)$. São feitas, ainda, as mesmas suposições do modelo anterior.

Para esse modelo, Y_{ijklmn} , μ , ρ_i , α_j , β_k , γ_l , $\alpha\beta_{jk}$, $\alpha\gamma_{jl}$, $\beta\gamma_{kl}$, $\alpha\beta\gamma_{jkl}$, ε_{ijklmn} têm as mesmas definições do modelo anterior. O parâmetro θ_m representa a variação na atividade antioxidante devida à m-ésima concentração (m=1 ou 2) e os parâmetros $(\alpha\theta)$, $(\beta\theta)$, $(\gamma\theta)$, $(\alpha\beta\theta)$, $(\alpha\gamma\theta)$, $(\beta\gamma\theta)$ e $(\alpha\beta\gamma\theta)$ representam as interações de segunda, terceira e quarta ordem.

5.1. Cálculo do tamanho amostral

Há interesse em obter o número de lotes necessários para que se consiga detectar – com um nível de significância α e um poder $1-\beta$ – uma diferença de

$\Delta = 10$ (% - unidade de medida da atividade antioxidante) entre as atividades antioxidantes médias do mesmo produto obtido de tomates do mesmo tipo de cultivo e submetidos a solventes diferentes. Para tal, utilizaremos a seguinte relação (ver Bussab e Morettin, 2002):

$$n = \frac{2 * \sigma^2 * (Z_{1-\alpha} - Z_{\beta})^2}{\Delta^2}$$

em que σ^2 é a variabilidade do mesmo produto, obtido de tomates do mesmo tipo de cultivo, submetidos a solventes diferentes e $Z_{1-\alpha}$ e Z_{β} são, respectivamente, os valores dos percentis de ordem $1-\alpha$ e β da distribuição normal padrão.

Apresentamos na Tabela 1, os resultados correspondentes a diferentes valores de α , β , σ e Δ :

Tabela 1: Número de unidades necessárias para detectar uma diferença Δ entre as atividades antioxidantes médias do mesmo produto obtido de tomates do mesmo tipo de cultivo submetidos a solventes diferentes com um nível de significância α e um poder $1-\beta$.

β	α	σ	Δ	n
0,05	0,1	5%	5%	33
0,05	0,05	5%	5%	39
0,1	0,1	5%	5%	27
0,1	0,05	5%	5%	32
0,05	0,1	10%	5%	9
0,05	0,05	10%	5%	11
0,1	0,1	10%	5%	8
0,1	0,05	10%	5%	9
0,05	0,1	25%	10%	6
0,05	0,05	25%	10%	7
0,1	0,1	25%	10%	5
0,1	0,05	25%	10%	6
0,05	0,1	30%	10%	5
0,05	0,05	30%	10%	6
0,1	0,1	30%	10%	4
0,1	0,05	30%	10%	5

Por exemplo, para detectar uma diferença de $\Delta = 10\%$ entre as médias de atividade antioxidante de um certo produto obtido de tomates cultivados da mesma forma que foram dissolvidos em solventes diferentes, com um nível de significância de 5% e poder de 80% (supondo que o desvio-padrão populacional é de 30%), serão necessários 4 lotes deste tipo de cultivo.

5.2. Sugestão de Banco de Dados

Sugere-se que o banco de dados seja unificado, com uma única planilha armazenando todas as informações sobre o experimento. A planilha deve seguir o modelo da Tabela 2, na qual cada coluna representa uma variável do experimento.

Com relação aos fatores, sugere-se que sejam adotados os seguintes valores para cada uma das categorias dos fatores:

Tipo de tomate

- 1-convencional,
- 2-orgânico;

Produto

- 1 – *in natura*,
- 2 – descascado manual,
- 3 – descascado por aquecimento,
- 4 – extrato de tomate,
- 5 – molho de tomate;

Método

- 1 – Férrico,
- 2 – DPPH,
- 3 – β -caroteno;

Concentração

- 1 – Baixa,
- 2 – Alta.

Tabela 2: Sugestão de inserção de dados em planilha (Valores ilustrativos).

Tipo de Tomate	Lote	Produto	Extrato	Método	Concentração	Réplica	Atividade Antioxidante
1	1	1	1	2	1	1	94
1	1	1	1	2	1	2	44
1	1	1	1	2	1	3	63
1	1	1	1	2	2	1	92
1	1	1	1	2	2	2	57
1	1	1	1	2	2	3	86
1	1	1	2	2	1	1	81
...
1	2	5	3	3	2	3	75
1	1	1	1	1	.	1	63
1	1	1	1	1	.	2	63
1	1	1	1	1	.	3	18
...
1	2	5	3	1	.	3	51
2	1	1	1	2	1	1	94
2	1	1	1	2	1	2	97
2	1	1	1	2	1	3	35
2	1	1	1	2	2	1	72
2	1	1	1	2	2	2	72
2	1	1	1	2	2	3	99
2	1	1	2	2	1	1	32
...
2	2	5	3	3	2	3	57
2	1	1	1	1	.	1	94
2	1	1	1	1	.	2	75
2	1	1	1	1	.	3	86
...
2	2	5	3	1	.	3	97

6. Bibliografia

Bolfarine, H. e Sandoval, M. C. (2001). **Introdução à Inferência Estatística**, 1.ed. Rio de Janeiro: SBM. 125p.

Borguini, R.G. (2004). **Potencial antioxidante e características físico-químicas do tomate (*Lycopersicon esculentum*) orgânico em comparação ao convencional**. São Paulo: (sem publicação). Faculdade de Ciências Farmacêuticas – FCF/USP. 23p.

Bussab, W.O. e Morettin, P.A. (2002). **Estatística Básica**, 5.ed. São Paulo: Ed. Saraiva. 526p.

IBGE(1996). **Pesquisa de Orçamentos Familiares** (Consumo alimentar domiciliar *per capita*), v.2.

Neter, J., Wasserman, W., Nachtsheim, C.J. and Kutner, M. H. (1996). **Applied Linear Statistical Models**, 4.ed. New York: McGraw-Hill. 1408p.

Penteado, S.R. (2000). **Introdução à agricultura orgânica**. Campinas: Ed. Grafimagem. 110p.