

Determinação do potencial antioxidante de vegetais

Adenilson Renato Rudke¹ (COEAL/UTFPR - CM) – adenilsonrudke@hotmail.com

Ailey Ap. C. Tanamati² (COEAL/UTFPR – CM) – aactanamati@utfpr.edu.br

Rafaela Cristina Turola Barbi³ (COEAL/UTFPR - CM) – rafaelaturola@hotmail.com

Renata Hernandez Barros Fuchs⁴ (COEAL/UTFPR - CM) - renata@utfpr.edu.br

Tatiane Viana Dutra⁵ (COEAL/UTFPR - CM) – tati_v.dutra07@hotmail.com

Resumo: Objetivou-se neste trabalho estudar o potencial antioxidante presente em frutas e hortaliças, em decorrências de suas mais variadas cores, visto que evitam a formação de substâncias reativas oxigenadas desencadeadoras de doenças. O método utilizado para a determinação de fenólicos totais foi Folin – Ciocalteu, enquanto que para a determinação de atividade antioxidante foi utilizado o método do DPPH de acordo com El – Massry et al. com modificações. De acordo com os resultados obtidos frutas e hortaliças de cores pronunciadas; como tomate e couve-manteiga, apresentaram maior teor de fenólicos totais o que encaminha-os a uma maior atividade antioxidante. Uma dieta rica em frutas e hortaliças contribui com a defesa antioxidante do organismo.

Palavras – chave: Folin – Ciocalteu; DPPH; Frutas; Hortaliça.

1. Introdução

A busca incessante por alimentos naturais e que fazem bem a saúde dos seres humanos vem de muito tempo atrás. O primeiro registro que se tem sobre o retardamento das reações oxidativas foi feito por Claude Bertholet em 1797 e depois esclarecido por Humphry Davy 20 anos depois (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2009). O que esses cientistas não sabiam na época era a importância que a sua descoberta faria no século XXI. Estudos feitos recentemente levantam a hipótese de que muitas doenças como câncer, aterosclerose, diabetes, artrite, malária, AIDS, doenças do coração estão intimamente ligadas com os danos causados por formas de oxigênio extremamente reativas (MELO *et al*, 2006; DEGASPÁRI & WASZCZYNSKYJ, 2004). Acredita-se que essas doenças podem ser evitadas quando não há a formação das substâncias reativas oxigenadas (DEGASPÁRI & WASZCZYNSKYJ, 2004). A produção destas substâncias pode ser reduzida com o consumo de frutas e hortaliças, pois estes alimentos têm concentração de antioxidantes que evitam que essas substâncias sejam formadas (PIENIZ *et al*, 2009; MELO *et al*, 2006; MELO *et al*, 2008; SILVA & NAVES, 2001). Para a legislação brasileira ANVISA (1997), antioxidante é toda a substância que terá a função de retardar o aparecimento da alteração oxidativa no alimento. Para o órgão internacional FDA os antioxidantes são substâncias que são usadas para preservar os alimentos tendo em vista que estes retardam a deterioração, rancidez e descoloração decorrentes do processo de autooxidação. Já SIES & STAHL (1995) definem antioxidante como sendo toda e qualquer substância que em baixas concentrações atrasam ou inibem a oxidação do substrato de maneira eficaz.

Os compostos fenólicos estão ligados com o potencial antioxidante dos alimentos, pois estes compostos são estruturas químicas que representam hidroxilas e anéis aromáticos, nas

^{1,3,5} Graduando (a) em Engenharia de Alimentos pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

^{2,4} Professora Dra. do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná

formas simples ou de polímeros que conferem a eles a capacidade de serem antioxidantes (ANGELO & JORGE, 2007).

Em alimentos a importância dos antioxidantes ocorre devido às reações de deterioração que neles ocorrem nas etapas de processamento, distribuição, armazenamento e preparo final. Dentre essas reações uma das mais importantes de característica industrial é a oxidação lipídica que afeta as características organolépticas dos alimentos (SOARES, 2002).

Na indústria de alimentos esse processo é evitado pela ação de antioxidantes que atuam sequestrando os radicais livres. Porém o uso de aditivos sintéticos como butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), tercio-butil-hidroquinona (TBHQ), tri-hidroxi-butilfenona (THBP) e propil-galato (PG) ainda são muito utilizados, apesar de estudos indicarem que estes compostos tem efeito tóxico no nosso organismo (Würtzen, 1990).

Sendo assim há uma grande importância em se estudar alimentos naturais com alto poder antioxidante, pois são importantes na indústria de alimentos; evitando a oxidação lipídica, na nossa dieta; por nos ajudarem em processos bioquímicos necessários para a nossa vida e em substituição aos antioxidantes sintéticos; tendo em vista que, estudos demonstram que estes podem ser prejudiciais a nossa saúde.

Logo, o objetivo deste experimento foi verificar a quantidade de antioxidantes e de compostos fenólicos em vegetais de diferentes cores, verificar se a cor do vegetal tem alguma influência nesta quantidade. Sendo o estudo realizado nos seguintes vegetais pimentão (verde, vermelho e amarelo), tomate, couve-manteiga, cenoura, abóbora, mandioquinha salsa, repolho e couve-flor.

2. Matérias e métodos

2.1 Amostragem

O material vegetal utilizado no presente trabalho foi adquirido em estabelecimento comercial da cidade Campo Mourão – PR, em Março de 2014. As amostras foram secas em estufa de circulação de ar forçada da marca CIENLAB a uma temperatura de 40°C por 24 horas e, posteriormente submetidos a extração etanólica dos antioxidantes. Os extratos foram utilizados para a determinação em triplicata dos compostos fenólicos totais e da atividade antioxidante, expressos como a média aritmética e desvio padrão. Para a realização do trabalho foram escolhidos diferentes variedades de vegetais conforme as cores: branco, laranja, verde, vermelho, amarelo, que se descreve na Tabela 1.

Tabela 1. Material vegetal utilizado no estudo.

Nome vulgar	Nome científico	Origem
Repolho	<i>Brassica oleracea</i>	Ásia
Couve – Flor	<i>Brassica oleracea</i>	Ásia
Cenoura	<i>Daucus carot</i>	Ásia
Abóbora	<i>Cucúrbita moschata</i>	Peru
Pimentão Verde	<i>Capsicum annuum L</i>	Portugal
Couve- Manteiga	<i>Brassica olearacea</i>	Ásia
Pimentão Vermelho	<i>Capsicum annuum L</i>	Portugal
Tomate	<i>Lycopersion esculentum</i>	Equador
Pimentão Amarelo	<i>Capsicum annuum L</i>	Portugal
Mandioquinha Salsa	<i>Arracacia xanthorrhiza</i>	Colômbia

2.2 Extratos

Foram pesados num tubo Falcon, separadamente, 2 g de cada vegetal e adicionados 40 mL do solvente etanol 70%. Deixou-se a mistura sob agitação, num homogeneizador de

sangue phoenix por 24 horas. Decorrido esse período, os extratos foram centrifugados, na centrífuga refrigerada nt 825 nova tecnica a 6000 rpm por 20 minutos, temperatura 25°C. O sobrenadante foi armazenado em vidro âmbar sob-refrigeração, a 4°C até a posterior análise.

2.3 Fenólicos Totais

Para a determinação de compostos fenólicos foi utilizado o método de Folin – Ciocalteu conforme Singleton e Rossi citado por Vieira e Santos (2010). Transferiu-se para um balão volumétrico de 10 mL separadamente, 0,15 mL dos extratos e completou-se o volume com água destilada. Foram pipetadas para os tubos 0,1 mL da solução diluída da amostra, 3 mL da água destilada, 0,25 mL do reagente Folin – Ciocalteu, após 3 minutos foram adicionados 2,0 mL de carbonato de sódio 7,5%. Passados 30 minutos em banho maria regulado a 37°C, fez-se a leitura num espectrofotômetro UV/VIS T80+, a 765 nm contra um branco. Para a quantificação realizou-se uma curva padrão com ácido gálico, os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico.

2.4 Atividade antioxidante pelo método DPPH (2,2 – Difenil – 1 – picrilhidrazil)

A determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH, foi realizada de acordo com El – Massry *et al.*(2002) com modificações, onde o meio reacional (extrato + solução de DPPH + etanol 70%) foi igual a 3,5 mL. As concentrações dos extratos utilizados foram de 5,0; 10,0; 15,0; 20,0 e 25,0 mg EAG/mL. Foram realizados os testes em branco e controle. Para o controle a concentração de DPPH foi 6 mg/50 ml com etanol 99%. No espectrofotômetro UV/VIS T80+, comprimento de onda 515 nm, foi realizada a leitura das análises após 45 minutos de encubação. Através da equação 1 foi determinada a capacidade antioxidante.

$$AA\% = \frac{[(Ac - Aa)] \times 100}{Ac} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

Aa = absorvância da amostra

Ac = absorvância do controle

Os resultados também foram expressos em concentração de extrato necessária para inibir 50% do radical DPPH, denominada concentração efetiva, CE50, conforme Equação 2.

$$\% \text{ inibição} = \frac{(\text{Abs.DPPH} - \text{Abs.do DPPH remanescente}) \times 100}{(\text{Abs.DPPH})} \quad (\text{Equação 2})$$

2.5 Análise Estatística

Os dados obtidos foram tratados estatisticamente utilizando o teste de variância ANOVA e Teste de Tuckey, em nível de confiança de 99% ($p > 0,05$).

3. Resultados e discussões

Os valores médios de polifenóis totais obtidos nos vegetais analisados estão descritos na Tabela 2.

A curva de calibração foi realizada, sendo o ácido gálico o padrão originando a equação: $y = 0,0025x + 0,0061$ ($R^2 = 0,999$), utilizada na quantificação de fenólicos totais.

As maiores concentrações dos fenólicos totais foram encontradas nos extratos etanoicos da cenoura e couve-manteiga, 178,1 mg EAG.L-1 para ambos vegetais. Valores intermediários foram determinados entre 89,2 e 51,7 mg EAG.L-1, sem diferença significativa ($p > 0,05$) mg EAG.L-1, para os extratos da abóbora e mandioquinha respectivamente. Também não

houve diferença significativa para os teores nos extratos do pimentão vermelho, tomate, pimentão amarelo, mandioquinha e abóbora. O menor valor encontrado foi para couve-flor (19,4 mg EAG.L-1), sendo semelhante 19,7 mg EAG.L-1 ao do repolho.

Tabela 2: Concentração dos fenólicos totais nos extratos dos vegetais

Vegetais	Fenólicos totais(mg EAG.L⁻¹)
Repolho	19,7 ± 1,3 ^d
Couve- Flor	19,4 ± 7,4 ^d
Cenoura	178,1 ± 11,0 ^a
Abobora	89,2 ± 11,5 ^{bc}
Pimentão verde	115,0 ± 11,0 ^b
Couve-manteiga	178,1 ± 17,5 ^a
Pimentão vermelho	53,8 ± 1,7 ^{cd}
Tomate	53,7 ± 0,6 ^{cd}
Pimentão amarelo	52,9 ± 3,0 ^{cd}
Mandioquinha	51,7 ± 0,6 ^{cd}

Resultados expressos como média ± desvio padrão (triplicata)

Média seguida da mesma letra não difere estatisticamente pelo teste de Tuckey(p>0,05)

De acordo com Melo e Faria (2014) as concentrações de fenólicos totais no repolho e couve-flor 5,27 e 5,01 mg EAG/g extrato seco, respectivamente.

Existem estudos demonstrando a influência do meio extrator destes compostos (CAETANO, *et al.*, 2009; MELO, *et al.*, 2003).

Os compostos que possuem ação antioxidante podem variar em função da espécie do pimento, das condições de cultivo da mesma e da forma de extração, afetando diretamente a atividade inibitória do extrato (Deans *et al.*, 1987).

Conforti *et al.* (2007), constataram que os frutos mais imaturos apresentaram melhor atividade antioxidante, devido a uma composição mais rica em compostos fenólicos.

De acordo com os resultados obtidos e a literatura consultada, houve discrepância no teor de fenóis totais observado, que podem ser devido aos diferentes aspectos, tais como sejam as práticas culturais a que os vegetais estiveram sujeitos, a variedade, as condições ambientais, a idade da planta, o armazenamento, entre outros fatores (BRAT, *et al.*, 2006).

A Tabela 3 apresenta os resultados da atividade antioxidante determinada pelo método de sequestro dos radicais livres – DPPH. O ensaio de redução do radical livre DPPH constitui um método químico frequentemente utilizado para a investigação do potencial antioxidante de extratos de vegetais (GUO *et al.*, 2001; SANDOVAL *et al.*, 2002; LLORACH *et al.*, 2003) e possibilita variação no modo de apresentação dos resultados concernentes à atividade antioxidante investigada.

Tabela 3. Porcentagem de sequestro de radicais livres DPPH nos extratos etanoicos

Vegetais	Concentração (mg EAG/mL)				
	5	10	15	20	25
	(%) Atividade Antioxidante				
Repolho	82,3 ^a ± 2,1	63,3 ^b ± 2,1	62,3 ^c ± 1,1	51,0 ^c ± 1,0	50,3 ^b ± 0,6
Couve – Flor	80,0 ^a ± 6,1	59,7 ^b ± 5,7	74,0 ^{ab} ± 1,0	76,0 ^a ± 2,6	72,7 ^a ± 2,5
Tomate	86,0 ^a ± 0,0	82,7 ^a ± 0,6	82,0 ^a ± 1,0	75,0 ^{ab} ± 1,0	72,3 ^a ± 1,5
Pimentão Vermelho	68,3 ^b ± 0,6	44,7 ^c ± 6,6	32,2 ^d ± 3,0	26,7 ^d ± 4,0	13,0 ^d ± 3,6
Pimentão Verde	12,0 ^e ± 1,0	37,0 ^{cd} ± 7,0	36,3 ^d ± 11,5	66,0 ^b ± 6,1	70,3 ^a ± 3,8
Couve Manteiga	85,3 ^a ± 0,6	82,7 ^a ± 0,6	81,0 ^a ± 2,0	74,7 ^{ab} ± 1,5	72,3 ^a ± 1,5
Cenoura	20,6 ^d ± 0,6	21,0 ^e ± 0,0	68,3 ^{bc} ± 0,6	71,0 ^{ab} ± 3,5	76,0 ^a ± 0,0
Abobora	29,0 ^c ± 0,0	29,0 ^{de} ± 0,0	35,0 ^d ± 0,0	29,7 ^d ± 1,1	14,0 ^d ± 1,7
Pimentão Amarelo	73,3 ^b ± 1,5	74,3 ^a ± 1,1	71,7 ^{abc} ± 3,2	69,0 ^{ab} ± 5,2	74,3 ^a ± 1,5
Mandioquinha	3,0 ^f ± 0,0	8,3 ^f ± 2,3	16,3 ^e ± 0,6	20,7 ^d ± 3,8	24,7 ^c ± 1,5

Resultados expressos como média ± desvio padrão (triplicata)

Média seguida da mesma letra não difere estatisticamente pelo teste de Tuckey (p>0,05).

A maior concentração do extrato empregada no estudo foi 25 mg EAG/mL, onde os extratos de pimentão vermelho e abóbora apresentaram a menor atividade antioxidante, 13,0 e 14,0%, respectivamente. Enquanto que o maior percentual foi no extrato de cenoura 76,0% e sem diferença significativa para pimentão amarelo, couve-flor, tomate, pimentão verde, couve-manteiga,

De acordo com Choi *et al*(2002), os compostos polifenólicos são os principais responsáveis pela atividade antioxidante.

A Tabela 4 apresenta os valores de CE50 obtidos para os diferentes vegetais estudados. Os extratos que apresentaram as menores concentrações necessárias para inibição de 50% de radical DPPH foram os obtidos da abóbora 8,1 mg.mL⁻¹ e pimentão vermelho 11,0 mg.mL⁻¹, enquanto que o maior valor foi para o pimentão amarelo 132 mg.mL⁻¹.

Tabela 4. Valores de CE50 obtidos dos diferentes vegetais

Vegetais	Concentração inibitória (CE50) mg.mL ⁻¹
Repolho	23,2
Couve – Flor	72,2
Tomate	64,0
Pimentão vermelho	11,0
Pimentão verde	15,0
Couve manteiga	64,0
Cenoura	14,2
Abobora	8,1
Pimentão amarelo	132,5
Mandioquinha	43,0

4. Conclusão

Logo tomate e couve-manteiga se destacam por apresentarem maior teor de fenólicos, o que os coloca no grupo de alimentos de alto poder antioxidante, já que compostos polifenólicos são de extrema importância na atividade antioxidante. Em contrapartida, a partir dos resultados obtidos houve controvérsias em relação ao teor de fenóis totais; para obtenção de dados mais conclusivos aconselha-se em trabalhos posteriores a repetição a partir de outros solventes indicados em literatura.

Referências

- ANGELO, Priscila Milene; JORGE, Neuza. *Compostos fenólicos em alimentos - uma breve revisão*. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 66(1): 1-9, 2007.
- ANVISA. Regulamento Técnico: *Aditivos Alimentares - definições, classificação e emprego*. Portaria nº 540 - svs/ms, de 27 de outubro de 1997. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 28 de outubro de 1997.
- CHOI, C.W.; KIM, S.C.; HWANG, S.S.; CHOI, B.K.; AHN, H.J.; LEE, M.Y.; PARK, S.H.; KIM, S.K.. *Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison*. Plant Sci 163:1161-1168, 2002.
- DEGÁSPARI, Cláudia Helena; WASZCZYNSKYJ, Nina. *Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos*. Visão Acadêmica, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 33-40, Jan.- Jun./2004.
- FOOD INGREDIENTS BRASIL. *Dossiê sobre antioxidantes*. Revista Food Ingredients. n. 6, p. 16-30, 2009.
- GUO, J. T.; LEE, H.L.; CHIANG, S. H.; LIN, F.; CHANG, C.Y.. *Antioxidant properties of the extracts from different parts of broccoli in Taiwan*. Journal of Food Drug Analysis, v. 9, n. 2, p. 96-101, 2001.
- HASSIMOTO, N. M. A.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. *Antioxidant Activity of Dietary Fruits, Vegetables, and Commercial Frozen Fruit Pulps*. J. Agric. Food Chem., 53 (8), p. 2928–2935, 2005.
- MELO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, V. L. A. G.; LEAL, F. L. L.; CAETANO, A. C. S.; NASCIMENTO, R. J.. *Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas*. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 26(3): 639-644, jul.-set. 2006.
- MELO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, V. L. A. G.; NASCIMENTO, R. J.. *Capacidade antioxidante de frutas*. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences vol. 44, n. 2, abr./jun., 2008.
- MELO, C. M. T.; FARIA, J. V. F. *composição centesimal, compostos fenólicos e atividade antioxidante em partes comestíveis não convencionais de seis olerícolas*. Biosci. J., Uberlândia, v. 30, n. 1, p. 93-100, Jan./Feb. 2014.
- PIENIZ, S.; COLPO, E.; OLIVEIRA, V. R.; ESTEFANEL, V.; ANDREAZZA, R. *Avaliação in vitro do*

potencial antioxidante de frutas e hortaliças. Ciênc. agrotec., Lavras, v. 33, n. 2, p. 552-559, mar./abr., 2009.

SILVA, Cyntia Rosa de Melo; NAVES, Maria Margareth Veloso. *Suplementação de vitaminas na prevenção de câncer. Rev. Nutr. vol.14 no.2 Campinas May/Aug. 2001.*

SIES, H., STAHL, W. *Vitamins E and C, b-carotene, and other carotenoids as antioxidants. American Journal of Clinical Nutrition, Bethesda, v.62, n.6, p.1315-1321, 1995.*

SOARES, SERGIO EDUARDO. *Ácidos fenólicos como antioxidantes. Rev. Nutr., Campinas, 15(1):71-81, jan./abr., 2002.*

WÜRTZEN, G. *Shortcomings of current strategy for toxicity testing of food chemicals: antioxidants. Food Chemistry and Toxicology, Oxford, v.28, n.11, p.743-745, 1990.*