

Foto: Leonora M. Mattos



Protocolo de Análise para Determinação da Atividade Antioxidante Total em Hortaliças no Sistema Beta-Caroteno/ Ácido Linoléico

Leonora Mansur Mattos¹

Celso Luiz Moretti²

Lidiane Batista Muniz³

Ester Yoshie Yosino da Silva⁴

Introdução

Antioxidantes são substâncias que retardam as reações de degradação oxidativa, ou seja, reduzem a velocidade da oxidação por um ou mais mecanismos, como inibição de radicais livres e complexação de metais (LÖLIGER, 1991; PIETTA, 2000). Estes podem ser sintéticos ou naturais e, para serem utilizados em alimentos, devem ser seguros para a saúde. Alguns dos antioxidantes sintéticos mais importantes são o hidroxianisol debutila (BHA) e o hidroxitolueno de butila (BHT) e entre os naturais destacam-se o ácido ascórbico, vitamina E e beta-caroteno (RICE-EVANS et al., 1996). O emprego dos compostos sintéticos tem sido alvo de muitos questionamentos quanto à sua inocuidade e, conseqüentemente, a procura por antioxidantes naturais que possam

atuar, tanto isolados quanto sinergicamente, com outros aditivos tem aumentado consideravelmente nos últimos anos (MELO et al., 2003). Compostos antioxidantes, como compostos fenólicos e organossulfurados, estão naturalmente presentes em hortaliças, sendo que algumas apresentam altas concentrações de determinados grupos (HARBONE et al., 2000; ARABBI et al., 2004).

Os compostos fenólicos, constituintes de um amplo e complexo grupo de fitoquímicos, são potentes antioxidantes, podendo agir como redutores de oxigênio singlete, atuando nas reações de oxidação lipídica, assim como na quelação de metais (SATUÉ-GARCIA et al., 1997; HOPIA et al., 1999; MELO et al., 2006). Os compostos organossulfurados são capazes de reduzir o risco de câncer e a incidência de

¹ Pesquisadora, Dra. Embrapa Hortaliças, Brasília, DF, 70351-970. E-mail: leonora@cnph.embrapa.br

² Pesquisador, Dr. Embrapa Hortaliças, Brasília, DF, 70351-970. E-mail: moretti@cnph.embrapa.br

³ Nutricionista, M.Sc em Nutrição Humana

⁴ Doutoranda em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 70910-900. E-mail: esteryy@terra.com.br

doenças coronarianas e, ainda, de controlar hipertensão (ADA, 1999; LAWSON; WANG, 2001). Embora muitos estudos relatem os efeitos químicos preventivos dos organossulfurados, pouco se sabe sobre seu mecanismo tanto na prevenção de doenças cardiovasculares quanto como anticarcinogênicos (KRIS-ETHERTON et al., 2002).

Em muitos estudos tem-se demonstrado que compostos com propriedade antioxidante são antitumorais e têm sido amplamente usados tanto na prevenção quanto no tratamento dessas doenças. A constatação de que as hortaliças possuem substâncias biologicamente ativas que trazem benefícios à saúde ou efeitos fisiológicos desejáveis tem impulsionado estudos sobre a sua propriedade antioxidante (CHIPAULT et al., 1952).

A avaliação da atividade antioxidante pode ser realizada por meio espectrofotométrico baseado na descoloração ou oxidação do β -caroteno induzida pelos produtos de degradação oxidativa de um ácido graxo, como o ácido linoléico usado nesta análise.

Neste protocolo, são relatadas as informações necessárias para a determinação da atividade antioxidante total em hortaliças no sistema aquoso-lipídico de beta-caroteno/ácido linoléico (ANDAEWULAN; SHETTY, 2003; HAMMERCHMIDT; PRATT, 1978; ISMAIL et al., 2004) baseadas em adaptações e modificações realizadas no Laboratório de Pós-Colheita da Embrapa Hortaliças.

Preparo de soluções

1. Solução de Álcool Etilico a 70%

Em balão volumétrico de 1 L, adicionar 700 mL de álcool etílico e completar o volume para 1.000 mL com água destilada. Após homogeneização, transferir para um frasco de vidro devidamente etiquetado. Armazenar em temperatura ambiente por tempo indeterminado.

2. Solução de Beta-caroteno

Pesar 5 mg de beta-caroteno e transferir para um balão volumétrico de 5 mL. Adicionar clorofórmio aos poucos até que todo o beta-caroteno seja dissolvido. Em seguida,

completar o volume para 5 mL com clorofórmio.

Obs.: todo o procedimento deve ser realizado sem expor a solução à luz.

3. Preparo da emulsão contendo beta-caroteno/ácido linoléico

Em um balão de fundo redondo (protegido da luz com papel alumínio), adicionar 50 mg de ácido linoléico, 200 mg de Tween 40 (ou 0,2 mL de Tween 20) e 1 mL de solução de beta-caroteno. Levar a um evaporador rotatório (rotavapor), à temperatura de 50 °C, por aproximadamente 10 min para evaporar todo o clorofórmio. Após a remoção do clorofórmio, o resíduo deve ser dissolvido com a adição de 50 mL de água deionizada e oxigenada, sob vigorosa agitação, para a formação de uma emulsão límpida (a adição da água deve ser feita aos poucos). O ideal é que esta emulsão esteja com uma absorvância entre 0,6 e 0,7 nm, quando medida em espectrofotômetro a 470 nm.

Preparo da emulsão para o branco

Em um balão de fundo redondo (protegido da luz com papel alumínio), adicionar 50 mg de ácido linoléico e 200 mg de Tween 40 (ou 0,2 mL de Tween 20). Adicionar 50,0 mL de água deionizada e oxigenada, sob vigorosa agitação, para a formação de uma emulsão límpida (a adição da água deve ser feita aos poucos).

Alíquotas de 5,0 mL desta emulsão devem ser transferidas para tubos de ensaio contendo 0,5 mL dos extratos. Esta mistura será utilizada como branco. Para cada amostra utiliza-se um tubo com a mistura como branco.

Preparo da amostra

Pesar 3 g de amostra de matéria fresca (essa massa pode variar de acordo com a hortaliça) e adicionar a 20 mL de etanol a 70%. Em seguida, agitar a amostra por 1 hora em um *shaker*, deixar por 20 min em banho de ultrassom e filtrar em papel de filtro quantitativo. O sobrenadante deve ser armazenado em balão volumétrico de 50 mL. Repetir o procedimento de extração para o resíduo que ficar retido ao filtro e levar seu sobrenadante ao balão contendo o outro sobrenadante. Lavar o resíduo com 10 mL de etanol a

70%, transferir o etanol da lavagem para o balão volumétrico em que estão os sobrenadantes das extrações e completar o volume para 50 mL com etanol a 70%.

Determinação da Atividade Antioxidante Total (AAT)

Alíquotas de 5,0 mL da emulsão (Figura 1) devem ser transferidas para tubos de ensaio contendo 0,5 mL dos extratos (item 3) e a absorvância deve ser medida imediatamente em espectrofotômetro a 470 nm. Após a primeira leitura os tubos devem ser incubados em banho-maria a 50 °C para que ocorra a reação de oxidação e em intervalos de quinze minutos até completar 120 minutos a leitura, a 470 nm, deve ser repetida. Utilizar o branco, preparado conforme item 2.3, de cada amostra para a respectiva leitura.

Os resultados são expressos em percentagem da atividade antioxidante (Eq. 1):

$$\%AA = \left[\frac{1 - (\text{Absc}_{\text{inicial}} - \text{Absc}_{\text{final}})}{\text{Absam}_{\text{inicial}} - \text{Absam}_{\text{final}}} \right] \times 100$$

em que,

%AA = Percentagem da atividade antioxidante

Absc_{inicial} = Absorvância inicial do controle

Absc_{final} = Absorvância final do controle

Absam_{inicial} = Absorvância inicial da amostra

Absam_{final} = Absorvância final da amostra



Foto: Leonora M. Mattos

Fig. 1. Solução beta-caroteno/ácido linoléico.

Referências

- American Dietetic Association. Position of the American Dietetic Association: functional foods. **Journal of the American Dietetic Association**, Chicago, v. 10, p. 1278-1285, Oct. 1999.
- ANDARWULAN, N.; SHETTY, K. Antioxidant activity associated with lipid and phenolic mobilization during seed germination of *Pangium edule* Reinw. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, p. 5671-5676, 2003.
- ARABBI, P. R.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the Brazilian population. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n. 7, p. 1124-1131, 2004.
- CHIPAULT, J. R.; MIZUN, G. K.; HAWKINS, J. M.; LUNDBERG, W. O. The antioxidant properties of natural spices. **Food Research**, Chicago, v. 17, p. 46-55, 1952.
- HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, New York, v. 55, n. 6, p. 481-504. 2000.

HAMMERCHMIDT, P. A.; PRATT, D. E. Phenolic antioxidant of dried soybeans. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 43, n. 2, p. 556-559, 1978.

HOPIA, A; HEINONEM, M. Antioxidant activity of flavonol aglycones and their glycosides in methyl linoleate. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Chicago, v. 76, p. 139-144, 1999.

ISMAIL, A.; FARDIAZ, D.; WATTIMENA, G. A.; SHETTY, K. Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. **Food Chemistry**, London, v. 87, p. 581-586, 2004.

KRIS-ETHERTON, P. M.; HECKER, K. D.; BONANOME, A.; COVAL, S. M.; BINKOSKI, A. E.; HILPERT, K. F.; GRIEL, A. E.; ETHERTON, T. D. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and câncer. **The American Journal of Medicine**, New York, v. 113, n. 30, p. 71-88, 2002.

LAWSON, L. D.; WANG, Z. J. Low allicin release from garlic supplements: a major problem due to the sensitivities of alliinase activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, p. 2592-2599, 2001.

LÖLIGER, J. The use of antioxidants in food. In: Aruoma, O. I.; Halliwell, B.; (Ed.). **Free radicals and food additives**. London: Taylor and Francis, 1991. p. 129-150.

MELO, E. de A.; MANCINI-FILHO, J.; GUERRA, N. B.; MACIEL, G. R. Atividade antioxidante de extratos de coentro (*Coriandrum sativum* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, p. 195-199, 2003. Suplemento.

MELO, E. de A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, V. L. A. G.; LEAL, F. L. L.; CAETANO, A. C. da S., NASCIMENTO, R. J. Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 3, p. 639-644, 2006.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

SATUÉ-GARCIA, M. T.; HEINONEN, M.; FRANKEL, E. N. Anthocyanins as antioxidants on human low-density lipoprotein and lecithin-liposome systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 45, n. 9, p. 3362-3367, 1997.

**Comunicado
Técnico, 68**

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Hortaliças

Endereço: BR 060 km 9 Rod. Brasília-Anápolis
C. Postal 218, 70.531-970 Brasília-DF

Fone: (61) 3385-9115

Fax: (61) 3385-9042

E-mail: sac@cnph.embrapa.br

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



1ª edição

1ª impressão (2009): 2.000 exemplares

Comitê de Publicações **Presidente:** Warley Marcos Nascimento
Editor Técnico: Mirtes Freitas Lima

Membros: Jadir Borges Pinheiro
Miguel Michereff Filho
Milza Moreira Lana
Ronessa Bartolomeu de Souza

Expediente **Normalização Bibliográfica:** Rosane M. Parmagnani

Editoração eletrônica: Rafael Miranda Lobo