

# 2º simpósio nacional de fruticultura

2010



Associação  
Portuguesa de  
Horticultura



Instituto Politécnico de Castelo Branco  
Escola Superior Agrária

**COTHIN**  
Centro Operativo e Tecnológico  
Hortofrutícola Nacional

**Ficha Técnica:**

**Título:** 2º Simpósio Nacional de Fruticultura

**Colecção:** Actas Portuguesas de Horticultura nº 16

**Editor:** ASSOCIAÇÃO PORTUGUESA DE HORTICULTURA

Rua da Junqueira, 299 - 1300-338 Lisboa

**Autores:** Vários

**Impressão:** Dossier, Comunicação e Imagem, Lda.

**Coordenação:** J. Raúl Rodrigues e Maria Paula Simões

**Tiragem:** 250 exemplares

**ISBN:** 978-972-8936-08-2

**Depósito Legal:** 304884/10

## Avaliação da actividade antioxidante de frutos secos

Teresa Delgado; José Alberto Pereira; Elsa Ramalhosa

CIMO/Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, *Campus* Sta Apolónia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança, Portugal. elsa@ipb.pt

### Resumo

A ingestão de frutos secos pode trazer inúmeros benefícios à saúde humana devido à presença de compostos antioxidantes. Dessa forma, no presente trabalho pretendeu-se avaliar a actividade antioxidante de vários frutos secos, designadamente, avelãs, nozes, amêndoas e pinhões, adquiridos numa grande superfície da região e sujeitos a uma extracção com acetona 80% (v/v) durante 24 horas. Nas diferentes amostras foi avaliado o teor em fenóis totais através do método do Folin-Ciocalteu e a actividade antioxidante através dos métodos do efeito bloqueador dos radicais livres de DPPH e do Poder Redutor.

Em termos gerais, as amêndoas e os pinhões foram os frutos secos que apresentaram os menores teores de fenóis totais,  $7,0 \pm 1,5$  e  $6,9 \pm 1,2$  mg GAE/g<sub>extracto</sub>, respectivamente, ao contrário das nozes, nas quais foi determinado um teor de fenóis totais cerca de 38 vezes superior aos anteriores ( $268 \pm 32$  mg GAE/g<sub>extracto</sub>). Foram também as nozes que apresentaram maior actividade antioxidante, tanto em termos de poder redutor ( $EC_{50} = 0,091 \pm 0,015$  mg<sub>extracto</sub>/mL) como de actividade bloqueadora de radicais livres, designadamente do radical DPPH ( $EC_{50} = 0,060 \pm 0,011$  mg<sub>extracto</sub>/mL). Tendo em consideração os resultados obtidos em ambos os ensaios da actividade antioxidante, os frutos secos podem ser ordenados da seguinte forma: noz > avelã > pinhão > amêndoa.

Com o presente trabalho demonstrou-se que, em termos gerais, os frutos secos são uma fonte natural de compostos bioactivos com potencial para melhorar a saúde humana e reduzir o risco de ocorrência de doenças. Em particular, verificou-se que as nozes são o fruto seco mais promissor de entre os analisados.

**Palavras-chave:** Frutos secos, Fenóis totais, Actividade antioxidante.

### Abstract

Title: Evaluation of antioxidant activity of nuts

Nuts ingestion may bring several benefits to human health due to the presence of antioxidant compounds. Owing to this, the present work pretends to evaluate the antioxidant activities of several nuts, namely, hazelnuts, walnuts, almonds and pine nuts, acquired in a local supermarket and subjected to an aqueous acetic extraction (80% (v/v)), during 24 hours. Total phenolic

contents in the obtained extracts were estimated by Folin-Ciocalteu assay, being the antioxidant activity evaluated by two different methods: Free-radical-scavenging (DPPH) and Reducing power assays.

In general terms, almonds and pine nuts were the ones that gave the lowest total phenol contents,  $7,0 \pm 1,5$  and  $6,9 \pm 1,2$  mg GAE/g<sub>extract</sub>, respectively, unlike walnuts that presented the highest total phenol content, being almost 38 times higher than the formers ( $268 \pm 32$  mg GAE/g<sub>extract</sub>). It was also with walnuts that the highest antioxidant activity was obtained, either in terms of reducing power ( $EC_{50} = 0,091 \pm 0,015$  mg<sub>extract</sub>/mL) as free-radical-scavenging ability, namely of DPPH radical ( $EC_{50} = 0,060 \pm 0,011$  mg<sub>extract</sub>/mL). Taking into account the results obtained for both assays, the ranking of antioxidant capacity of nut kernels is the following: walnut > hazelnut > pine nut > almond.

The present work demonstrates that in general nuts are a natural source of bioactive compounds with potential to human health promotion and disease risk reduction, being walnuts the nut most promising among the fruit analyzed.

**Keywords:** Nuts, Total phenols, Antioxidant activity.

### Introdução

Uma dieta rica em frutos e vegetais está correlacionada com um menor risco de aparecimento de doenças degenerativas crónicas (Blomhoff *et al.*, 2006), associadas ao stress oxidativo, o qual pode contribuir significativamente para a ocorrência de todas as doenças inflamatórias, isquémia, cancro, SIDA, doenças neurológicas, entre outras.

Os frutos secos fazem parte da dieta Mediterrânica, tendo-se já constatado que o seu consumo pode exercer inúmeros efeitos cardioprotectores, provavelmente resultado da componente lipídica que inclui ácidos gordos insaturados, fitoesteróis e tocóis (Hu and Stampfer, 1999). Alguns trabalhos realizados até ao momento (Durak *et al.*, 1999; Orem *et al.*, 2008) têm fornecido resultados muito positivos em relação ao uso de uma dieta rica em avelãs, por exemplo, tendo sido verificado um aumento significativo na razão do HDL/LDL, critério importante para avaliar o risco de aterosclerose. Além disso, Durak *et al.* (1999) verificaram que após recurso a um suplemento de avelãs, os níveis de malondialdeído (MDA) no plasma baixaram, ao contrário dos valores do potencial antioxidante que aumentaram. Este facto pode indicar que as reacções de peroxidação são em grande parte prevenidas por compostos antioxidantes presentes neste fruto seco.

Tendo em conta estes dados, no presente trabalho pretendeu-se avaliar o teor em fenóis totais e a actividade antioxidante de vários frutos secos, designadamente, avelãs (*Corylus avellana* L.), nozes (*Juglans regia* L.), amêndoas (*Prunus dulcis* L.) e pinhões (*Pinus pinea* L.), os quais são ingeridos com frequência pela população portuguesa, de forma a constatar qual é o que apresenta maior teor em compostos fenólicos e potencial antioxidante e, por

fim, determinar o mais promissor para evitar a ocorrência do stress oxidativo e de futuras doenças.

## Material e métodos

**Amostras:** Os frutos secos, designadamente, avelãs, nozes, amêndoas e pinhões analisados no presente trabalho, foram adquiridos num mercado local. Às amêndoas e pinhões retiraram-se a casca e a película e às nozes e avelãs somente a casca exterior foi removida. Todos os frutos foram triturados, num moinho, imediatamente antes de serem usados na preparação dos extractos.

**Preparação dos extractos:** Extraíram-se 6 g de cada um dos frutos secos com 60 mL de acetona a 80% (v/v), tal como descrito por Contini *et al.* (2008), durante 24 horas. Os sobrenadantes foram congelados e liofilizados. Todos os extractos foram redissolvidos nesse mesmo solvente de forma a obter uma concentração de 50 mg/mL.

**Determinação dos Fenóis totais:** Misturou-se 1mL de cada uma das soluções de extracto com 1 mL de Reagente de Folin-Ciocalteu, tendo sido adicionado 1mL de solução de carbonato de sódio saturada após 3 minutos e o volume ajustado a 10 mL com água destilada. A reacção decorreu no escuro durante 90 minutos, período após o qual se mediu a absorvência a 725 nm. Em simultâneo, preparou-se um branco, sem qualquer extracto. O teor em fenóis totais em cada extracto foi determinado a partir de curvas padrão preparadas diariamente com ácido gálico. Os resultados foram expressos em miligramas equivalentes de ácido gálico (GAE) /g<sub>extracto</sub>.

### Actividade antioxidante:

**Efeito bloqueador dos radicais livres de DPPH:** Prepararam-se diferentes concentrações de extracto (0,3 mL) e misturaram-se com 2,7 mL da solução metanólica com radicais DPPH ( $6 \times 10^{-5}$  mol/L). Agitou-se vigorosamente a mistura e deixou-se repousar no escuro até se obterem valores de absorvência a 517 nm constantes. O efeito bloqueador dos radicais DPPH foi calculado usando a equação: % Efeito bloqueador =  $[(A_{DPPH} - A_S)/A_{DPPH}] \times 100$ , onde  $A_S$  é a absorvência da solução quando o extracto foi adicionado e  $A_{DPPH}$  a absorvência da solução de DPPH. A concentração de extracto que originou uma inibição de 50% (EC<sub>50</sub>) foi calculada a partir do gráfico da percentagem do efeito bloqueador *versus* concentração de extracto;

II) **Poder Redutor:** O poder redutor nos extractos foi determinado de acordo com o procedimento descrito por Berker *et al.* (2007) com ligeiras alterações. Várias concentrações de extracto (1 mL) foram misturadas com 2,5 mL de Tampão Fosfato 0,2 M (pH 6,6) e 2,5 mL de K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> a 1% (m/v). A mistura foi incubada a 50°C num banho de água durante 20 minutos. Deixou-se arrefecer a mistura à temperatura ambiente e adicionaram-se 2,5 mL de solução de TCA a 10% (m/v). Após homogeneização da solução, uma alíquota de 2,5 mL foi retirada, tendo sido adicionados 0,5 mL de solução de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O a 0,1% (m/v). Após 2 minutos a absorvência da solução foi medida a 700 nm (A<sub>700</sub>) contra um branco de reagente. A concentração de extracto que originou

uma absorvência de 0.5 foi designada por EC<sub>50</sub>, tendo sido calculada a partir do gráfico da A<sub>700</sub> versus concentração de extracto.

## Resultados e discussão

Após realização das extracções com acetona a 80% (v/v) verificou-se que em relação aos rendimentos de extracção (Figura 1A), o maior valor foi obtido para os extractos de avelã (16,9±2,6 %), não sendo detectadas diferenças significativas (p>0,05) entre os rendimentos de extracção para os restantes frutos secos. Já em termos do teor de fenóis totais (Figura 1B), os extractos de nozes foram os que apresentaram as maiores concentrações, 268±32 mg GAE/g<sub>extracto</sub>, seguidos dos da avelã (25,8±14,4 mg GAE/g<sub>extracto</sub>). Em relação aos valores obtidos para os extractos acetónicos das avelãs e nozes, 25,8 e 268 mg GAE/g<sub>extracto</sub>, respectivamente, equivalentes a 421 e 1659 mg GAE/100g<sub>fruto</sub>, verificou-se que são semelhantes aos descritos por Kornsteiner *et al.* (2006) para extractos acetónicos de avelãs e nozes, designadamente, 101-433 e 1020-2052 mg GAE/100g<sub>fruto</sub>. Relativamente aos pinhões, o resultado obtido de 6,9 mg GAE/g<sub>extracto</sub> ou 37 mg GAE/100g<sub>fruto</sub>, foi novamente idêntico ao descrito por Kornsteiner *et al.* (2006) (32 mg GAE/100g<sub>fruto</sub>).

Em relação à actividade antioxidante, o poder redutor e o efeito bloqueador dos radicais DPPH aumentaram com o aumento da concentração. Considerando os resultados obtidos em ambos os ensaios (Figuras 1C e 1D), os frutos secos passam a ser ordenados da seguinte forma face à actividade antioxidante: noz > avelã > pinhão > amêndoa. Com a amêndoa não foi possível atingir o valor de absorvência de 0,5 no poder redutor, não sendo possível a determinação do valor EC<sub>50</sub>. Estes resultados indicam que os compostos extraídos das amêndoas com acetona a 80% (v/v) não apresentam poder redutor considerável, provavelmente resultado da falta de capacidade de actuar como um doador de electrões e, portanto, não serem capazes de inibir a ocorrência de reacções em cadeia que envolvam radicais por conversão dos radicais livres em produtos mais estáveis. Adicionalmente, verificou-se que no ensaio do efeito bloqueador dos radicais livres de DPPH, o maior valor de EC<sub>50</sub> foi obtido para este fruto seco, indicando novamente a sua baixa actividade antioxidante. Deve ser referido que as amêndoas analisadas no presente trabalho se encontravam peladas sem o revestimento da película. Esta película pode ser uma fonte importante de compostos fenólicos, uma vez que Siriwardhana e Shahidi (2002) verificaram que o maior teor de compostos fenólicos totais foi obtido em extractos da película castanha das amêndoas (87,8 mg equivalentes de catequina/g<sub>extracto</sub>) quando analisadas em simultâneo com o miolo e a casca verde (8,1 e 71,1 mg equivalentes de catequina/g<sub>extracto</sub>, respectivamente).

De forma a constatar qual é o fruto seco que apresenta o maior teor em compostos fenólicos e/ou potencial antioxidante e, portanto, mais promissor para evitar a ocorrência do stress oxidativo e de futuras doenças, calcularam-se e compararam-se os teores fenólicos totais de uma amostra (42 g) dos frutos

secos analisados. Esta porção foi já utilizada por Arcan e Yemenicioglu (2009) num estudo comparativo de frutos secos e chás. Como as nozes foram os frutos secos que apresentaram o maior teor fenólico total no presente trabalho (cerca de 696 mg GAE/1-porção), estes resultados indicam que 1-porção de nozes seria equivalente a 4-porções de avelãs, 43-porções de amêndoas e 45-porções de pinhões, demonstrando-se que as nozes, seguidas das avelãs, são as que mais poderão contribuir para a dieta humana. No entanto, deve ser referido novamente que as amêndoas e pinhões analisados no presente trabalho não apresentavam a película, tendo sido esta previamente removida. De facto, Kornsteiner *et al.* (2006), Arcan e Yemenicioglu (2009) e Alasalvar *et al.* (2009) demonstraram que a película dos frutos secos pode ter grande importância na actividade antioxidante.

## Referências

- Alasalvar, C., Karamac, M., Kosinska, A., Rybarczyk, A., Shahidi, F., Amarowicz, R., 2009. Antioxidant activity of hazelnut skin phenolics. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 4645-4650.
- Arcan, I., Yemenicioglu, A., 2009. Antioxidant activity and phenolic content of fresh and dry nuts with or without the seed coat. *J. Food Compos. Anal.* **22**, 184-188.
- Berker, K.I., Güçlü, K., Tor, I., Apak, R., 2007. Comparative evaluation of Fe(III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. *Talanta* **72**, 1157-1165.
- Blomhoff, R., Carlsen, M.H., Andersen, L.F., Jacobs Jr, D.R., 2006. Health benefits of nuts: potential role of antioxidants. *Br. J. Nutr.* **96**, Suppl. 2, S52-S60.
- Contini, M., Baccelloni, S., Massantini, R., Anelli, G., 2008. Extraction of natural antioxidants from hazelnut (*Corylus avellana* L.) shell and skin wastes by long maceration at room temperature. *Food Chem.* **110**, 659-669.
- Durak, I., Köksal, I., Kaçmaz, M., Büyükkoçak, S., Çimen, B.M.Y., Öztürk, H.S., 1999. Hazelnut supplementation enhances plasma antioxidant potential and lowers plasma cholesterol levels. *Clin. Chim. Acta* **284**, 113-115.
- Hu F.B., Stampfer M.J., 1999. Nut consumption and risk of coronary heart disease: a review of epidemiologic evidence. *Curr. Atheroscler. Rep.*, **3**, 204-209.
- Kornsteiner, M., Wagner, K.H., Elmadfa I., 2006. Tocopherols and total phenolics in 10 different nut types. *Food Chem.* **98**, 381-387.
- Orem, A., Balaban, F., Kural, B.V., Orem, C., Turhan, I., 2008. Hazelnut consumption protect low density lipoprotein (LDL) against oxidation and decrease plasma oxidized LDL level. In: *Proceedings of the 77th Congress of the European Atherosclerosis Society*, Istanbul, Turkey, 215.
- Siriwardhana, S.S.K.W., Shahidi, F., 2002. Antiradical activity of extracts of almond and its by-products, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **79**, 903-908.

## Quadros e figuras

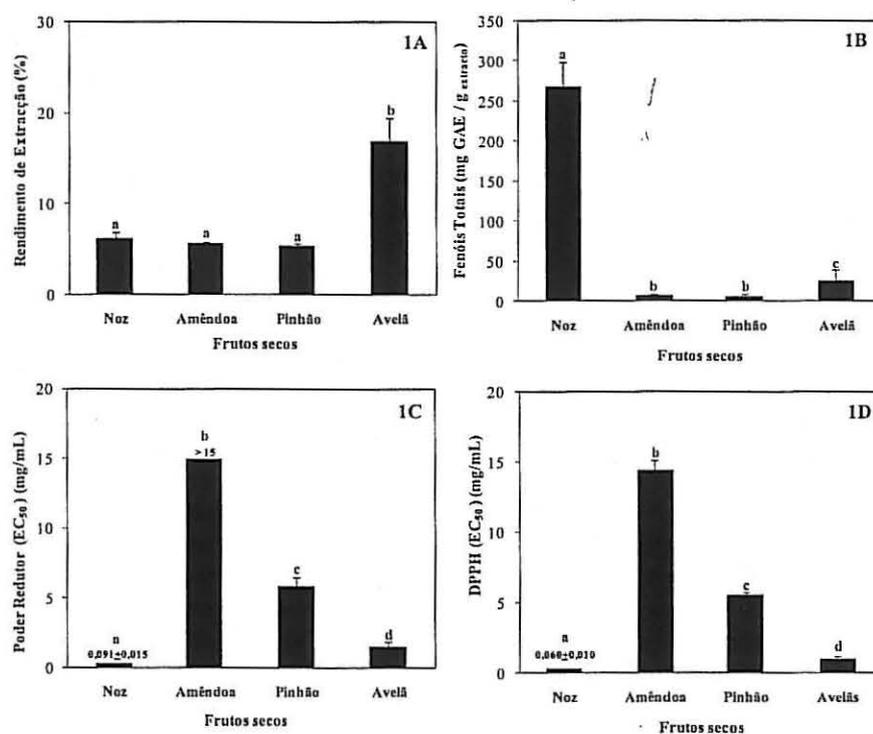


Figura 1 - Rendimentos de Extração (%) (A), Teor em Fenóis Totais (mg GAE/g<sub>extracto</sub>) (B), Poder Redutor (EC<sub>50</sub> expresso em mg<sub>extracto</sub>/mL) (C) e Efeito bloqueador dos radicais livres de DPPH (EC<sub>50</sub> expresso em mg<sub>extracto</sub>/mL) (D) de extractos de frutos secos obtidos após extração com acetona a 80% (v/v) (n=6).