

# Comunicado Técnico

## 126

ISSN 1679-6535  
Dezembro, 2006  
Fortaleza, CE

— on line

Foto: Maria do Socorro M. Rufino



## Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas no Sistema $\beta$ -caroteno/Ácido Linoléico

Maria do Socorro Moura Rufino<sup>1</sup>  
Ricardo Elesbão Alves<sup>2</sup>  
Edy Sousa de Brito<sup>3</sup>  
Jorge Mancini Filho<sup>4</sup>  
Ana Vlândia Bandeira Moreira<sup>5</sup>

### Introdução

Uma das maiores alterações que ocorrem durante o processamento, distribuição, armazenamento e preparo dos alimentos é a oxidação. E a oxidação lipídica se destaca, pois pode afetar a qualidade nutricional, segurança, cor, sabor, aroma e textura dos alimentos. As reações oxidativas, além de produzirem diminuição no valor nutricional dos alimentos, são também responsáveis pela formação de compostos potencialmente tóxicos e antinutricionais para o organismo humano e animal (Kanazawa et al., 1985; Shahidi & Wanansundara, 1992).

Existem substâncias com propriedades antioxidantes utilizadas no processamento de óleos e gorduras e nos alimentos que, em geral, são capazes de retardar a oxidação lipídica (Moreira & Mancini Filho, 2003). Os antioxidantes podem ser naturais, como ácido ascórbico,  $\alpha$ -tocoferol e compostos fenólicos presentes nos alimentos, ou sintéticos, como 6-hidroxi-

2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico (Trolox), hidroxianisol butilado (BHA) e hidroxitolueno butilado (BHT). Dentre estes, Trolox é o composto sintético mais utilizado, por ser um análogo da vitamina E e ser de natureza hidrossolúvel.

Os antioxidantes sintéticos estão restritos a um máximo de 200 mg/kg pelos códigos bromatológicos de diversos países, e têm sido freqüentemente monitorados devido a possíveis danos que eles podem vir a provocar no organismo (Babich, 1992).

Componentes como o  $\beta$ -caroteno agem inibindo o oxigênio singleto e interagem sinergicamente com a vitamina E, para inibir a peroxidação lipídica. Outros constituintes fenólicos em alimentos, tais como os flavonóides, podem também reduzir os danos causados pelo estresse oxidativo (Schwenke, 1998).

O sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico foi desenvolvido por Marco (1968), modificado por Miller (1971) e

<sup>1</sup> Engenheira Agrônoma, M. Sc., Bolsista da CAPES, Doutoranda, UFRSA, BR 110, Km 47, 59625-900, Mossoró, RN, marisrufino@yahoo.com.br

<sup>2</sup> Engenheiro Agrônomo, D. Sc. em Pós-Colheita, Pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical, R. Dra. Sara Mesquita, 2270, Pici, 60511-110, Fortaleza, CE, elesbao@pesquisador.cnpq.br

<sup>3</sup> Químico Industrial, D. Sc. em Tecnologia de Alimentos, Pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical, edy@cnpq.embrapa.br

<sup>4</sup> Farmacêutico Bioquímico, Ph. D., Professor Titular, USP, Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 14, Butantã, 05508-900, São Paulo, SP, jmancini@usp.br

<sup>5</sup> Nutricionista, D. Sc., Professora Adjunta I, UFRN, Av. Cordeiro de Farias, s/n, Petrópolis, 59100-180 Natal, RN, ana.vladia@terra.com.br

utiliza o ácido linoléico, monopalmitato de polioxietileno sorbitan (Tween 40) e o  $\beta$ -caroteno. Trata-se de um ensaio espectrofotométrico baseado na oxidação (descoloração) do  $\beta$ -caroteno induzida pelos produtos da degradação oxidativa do ácido linoléico (Silva et al., 1999), ou seja, o método avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoléico (Duarte-Almeida et al., 2006).

Neste comunicado, são relatadas todas as informações necessárias para a determinação da atividade antioxidante total em frutas no sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico, baseadas em adaptações/modificações feitas nos laboratórios da Embrapa Agroindústria Tropical.

## 2. Materiais Necessários

### Reagentes

- $\beta$ -Caroteno - *Merck*, código 01111324, ou equivalente.
- Acetona P.A.
- Ácido linoléico - *Acros organics*, código 01111322, ou equivalente.
- Água destilada
- Álcool etílico P.A.
- Álcool metílico P.A.
- Clorofórmio
- Trolox (PM = 250,29) – *Sigma*, código 218940050, ou equivalente.
- Tween 40

### Equipamentos e Vidrarias

- Agitador de tubos de ensaio
- Balança analítica
- Balão volumétrico 100 mL e 1.000 mL
- Banho-maria
- Becker 25 mL e 100 mL
- Cronômetro digital
- Cubetas de vidro (4 x 1 cm)
- Erlenmeyer 250 mL
- Espectrofotômetro
- Oxigenador
- Pipeta automática (10 – 1.000  $\mu$ L)

- Proveta de 50 mL
- Tubos de 2 mL
- Tubos de ensaio com tampa rosqueada (18 mL)

## Preparo de Soluções

### Solução de Álcool Metílico a 50%

Em balão volumétrico de 1 L, adicionar 500 mL de álcool metílico; completar o volume para 1.000 mL com água destilada, homogeneizar e transferir para um frasco de vidro devidamente etiquetado. Armazenar em temperatura ambiente por tempo indeterminado.

### Solução de Acetona a 70%

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

### Solução Controle de Trolox 200 mg/L

Dissolver 2 mg de Trolox em aproximadamente 5 mL de álcool etílico e completar o volume para 10 mL em um balão volumétrico com álcool etílico, homogeneizar e transferir para um frasco de vidro âmbar devidamente etiquetado. Preparar e usar apenas no dia da análise. Nos testes realizados em laboratório, foi constatado que a concentração de 200 mg/L de Trolox é a que proporciona a maior proteção ao sistema, quando comparada a outras (Fig. 1), sugerindo-se, portanto, o seu uso.

### Tratamento da Água Destilada

Submeter aproximadamente 500 mL de água destilada a borbulhamento com oxigênio (oxigenador) por 30 minutos.

### Solução $\beta$ -Caroteno 20 mg/mL

Pesar 20 mg de  $\beta$ -caroteno em um tubo de 2 mL, protegido da luz com papel alumínio, adicionar 1 mL de clorofórmio, agitar e utilizar imediatamente.

### Solução Sistema $\beta$ -caroteno/Ácido Linoléico

Em um erlenmeyer, adicionar 40  $\mu$ L de ácido linoléico, 530  $\mu$ L de Tween 40, 50  $\mu$ L da solução  $\beta$ -caroteno e, para solubilizar, adicionar 1 mL de clorofórmio, homogeneizar e, posteriormente, evaporar o clorofórmio com o auxílio do oxigenador. Em seguida, adicionar a água tratada com oxigênio até obter uma

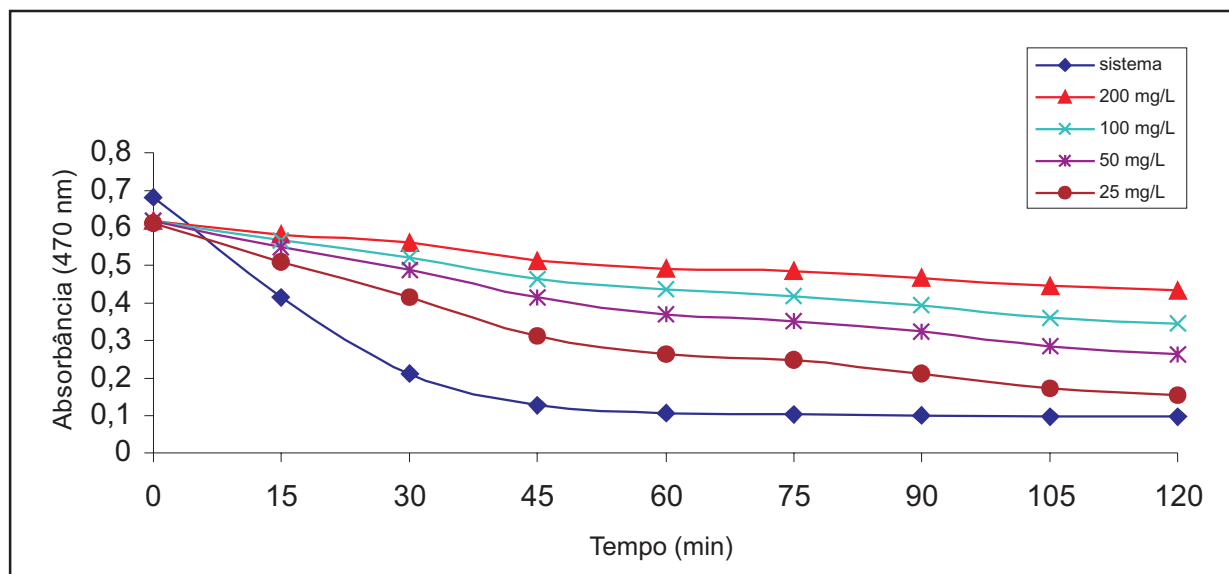


Fig. 1. Atividade antioxidante de diferentes concentrações de Trolox no sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico.

absorbância entre 0,6 nm e 0,7 nm a 470 nm. A solução sistema apresenta uma coloração amarelo-alaranjada (Fig. 2); deve ser sempre protegida da luz e prontamente utilizada.

Foto: Maria do Socorro M. Rufino



Fig. 2. Solução  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico.

## Protocolo do Método $\beta$ -caroteno/Ácido Linoléico

### Obtenção dos Extratos da Fruta

Este procedimento foi adaptado de Larrauri et al. (1997). Como a concentração de compostos antioxidantes varia de fruta para fruta, fazem-se necessários testes prévios. Em análises realizadas no Laboratório de Fisiologia e Tecnologia Pós-Colheita, da

Embrapa Agroindústria Tropical, com diferentes frutas, têm-se utilizado de 1 g a 25 g de amostra, de acordo com a fruta. Pesar a amostra em um béquer de 100 mL, adicionar 40 mL de metanol 50%, homogeneizar e deixar em repouso por 60 minutos à temperatura ambiente. Centrifugar a 25.406,55 g (15.000 rpm) durante 15 minutos, transferir o sobrenadante para um balão volumétrico de 100 mL. A partir do resíduo da primeira extração, adicionar 40 mL de acetona 70%, homogeneizar e deixar em repouso por 60 minutos à temperatura ambiente. Centrifugar novamente a 25.406,55 g (15.000 rpm) durante 15 minutos, transferir o sobrenadante para o balão volumétrico contendo o primeiro sobrenadante e completar o volume para 100 mL com água destilada.

### Determinação da Atividade Antioxidante Total (AAT)

A partir do extrato obtido no item anterior, preparar em tubos de ensaio, no mínimo três diluições diferentes, em triplicata. Misturar 0,4 mL de cada diluição do extrato com 5 mL da solução sistema (item solução sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico). Utilizar como controle 0,4 mL da solução de Trolox (item solução controle de Trolox 200 mg/L) com 5 mL da solução sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico, homogeneizar os tubos de ensaio em agitador e manter em banho-maria a 40 °C. Realizar a primeira leitura (470 nm) após 2 minutos de efetuada a mistura e depois em intervalos de quinze minutos até 120 minutos. O espectrofotômetro deve ser calibrado com água.

Os resultados são expressos em percentagem de inibição da oxidação. A redução da absorbância do sistema sem antioxidante (Eq. 1) é considerada como 100% de oxidação.

$$\text{Redução da absorbância} = \text{Abs}_{\text{inicial}} - \text{Abs}_{\text{final}} \quad (\text{Eq. 1})$$

O decréscimo da leitura da absorbância das amostras é correlacionado com o sistema e estabelece a percentagem de oxidação (Eq. 2), subtraindo-se a percentagem de oxidação de cada amostra de 100 (Eq. 3). Verifica-se a ação antioxidante da amostra (fruta), comparando-a com a atividade do antioxidante sintético (trolox).

$$\% \text{ Oxidação} = \frac{[(\text{Redução Abs})_{\text{amostra}} \times 100]}{(\text{Redução Abs})_{\text{sistema}}} \quad (\text{Eq. 2})$$

$$\% \text{ Proteção} = 100 - (\% \text{ Oxidação}) \quad (\text{Eq. 3})$$

## Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à União Européia pelo apoio financeiro - Projetos "Atividade antioxidante de frutas do Nordeste brasileiro como fator de Proteção da Saúde" - CNPq Edital CT-Saúde/MCT/MS 030/2004 - Processo 506.633/2004-7 e "Producing added value from under-utilised tropical fruit crops with high commercial potential" - Sixth Framework Programme - Contrato 0015279, respectivamente.

## Referências

- BABICH, H. Butylated hydroxytoluene (BHT): a review. *Environmental Research*, v.29, p.1-29, 1992.
- DUARTE-ALMEIDA, J.M.; SANTOS, R.J.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema b-caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.26, n.2, p.446-452, 2006.
- KANAZAWA, K.; KANAZAWA, A.E.; NATAKE, M. Uptake of secondary autoxidation products of linoleic and by the rat. *Lipids*, v.20, n.7, p.412-419, 1985.
- LARRAURI, J.A.; RUPÉREZ, P.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.45, p.1390-1393, 1997.
- MARCO, G. A rapid method for evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v.45, p.594-598, 1968.
- MILLER, H.E. A simplified method for the evaluation of antioxidant. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v.48, p.91, 1971.
- MOREIRA, A.V.B.; MANCINI FILHO, J. Atividade antioxidante das especiarias mostarda, canela e erva-doce em sistemas aquoso e lipídico. *Nutrire*, v.25, p.31-46, 2003.
- SCHWENKE, D.C. Antioxidants and atherogenesis. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v.9, p.424-445, 1998.
- SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, P.K.J.D. Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.32, p.67, 1992.
- SILVA, F.A.M.; BORGES, M.F.M.; FERREIRA, M.A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. *Química Nova*, v.22, n.1, p.95-103, 1999.

### Comunicado Técnico, 126

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:  
**Embrapa Agroindústria Tropical**  
 Endereço: Rua Dra. Sara Mesquita 2270, Pici,  
 CEP 60511-110 Fortaleza, CE  
 Fone: (0xx85) 3299-1800  
 Fax: (0xx85) 3299-1803 / 3299-1833  
 E-mail: negocios@cnpat.embrapa.br

1ª edição *on line*: dezembro de 2006

### Comitê de Publicações

**Presidente:** Francisco Marto Pinto Viana  
**Secretário-Executivo:** Marco Aurélio da Rocha Melo  
**Membros:** Janice Ribeiro Lima, Andréa Hansen Oster, Antonio Teixeira Cavalcanti Júnior, José Jaime Vasconcelos Cavalcanti, Afrânio Arley Teles Montenegro, Ebenézer de Oliveira Silva.

### Expediente

**Supervisor editorial:** Marco Aurélio da Rocha Melo  
**Revisão de texto:** José Ubiraci Alves  
**Editoração eletrônica:** Arilo Nobre de Oliveira  
**Normalização bibliográfica:** Ana Fátima Costa Pinto.