

Área: Ciência de Alimentos

AValiação DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE MIRTILO DA CULTIVAR CLÍMAX PELOS MÉTODOS DPPH E ABTS EM DIFERENTES SOLVENTES

Isabela Da Costa Luchiari*, Débora Oliveira da Silva, Maurício Seifert, Renata Silva Moura, Júlia Borin Fioravante, Leandro da Rosa Maciel, Leonardo Nora

Laboratório de Fisiologia Pós-Colheita de Frutas e Hortaliças - Metabolismo Secundário, Curso de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

**E-mail: Isabela_luch@hotmail.com*

RESUMO – Devido ao destaque que os alimentos funcionais tem recebido em relação a desenvolvimento de pesquisas, o mercado consumidor está beneficiando cada vez mais o surgimento de novos produtos que além de nutrir promova a saúde, como por exemplo, a capacidade e o potencial que esses alimentos teriam em combater câncer e doenças cardiovasculares, que está diretamente relacionado a presença dos fenóis na composição. É por este motivo que o mirtilo, encontrado em regiões características de seu desenvolvimento em clima temperado vem sendo estudado cuidadosamente, já que tem auto valor agregado e elevado potencial produtivo e atualmente além de ser consumido in natura há outros diversos tipos de alimentos em que seu sabor está sendo adaptado para o processamento.

Palavras-chave: mirtilo, DPPH, ABTS

1. INTRODUÇÃO

Atualmente o desenvolvimento de pesquisas com alimentos funcionais é conhecido e desempenha papel de destaque em pesquisas, sendo este definido de acordo com a legislação brasileira como todo alimento que além de nutrir, é capaz de produzir também efeitos benéficos à saúde. (ANVISA, 1979). O desenvolvimento de novos produtos com essas características deve levar em consideração estudos prévio na matéria prima que avaliem esse potencial para adição em alimentos. A crescente preocupação por uma alimentação saudável que, além de nutrir, promova a saúde, coloca alguns alimentos e ingredientes funcionais na lista de preferência de um número cada vez maior de consumidores. Os alimentos funcionais são uma parte importante do bem-estar, no qual também se incluem uma dieta equilibrada e atividade física (STRINGHETA; et al., 2000).

O mirtilo, pertencente à família Ericaceae do gênero *Vaccinium*, é encontrado em regiões de clima temperado tem como característica ser arbustiva com hábito ereto ou rasteiro. Seus frutos são classificados como do tipo baga, achatados e tem coloração azul-escura, contém uma grande quantidade de sementes que se encontram envolvidas em uma polpa de coloração esbranquiçada de sabor doce-ácido. Os frutos possuem, em

geral, em torno de 1cm de diâmetro e 1,5g de peso, podendo ser destinados tanto para o consumo in natura quanto para o processamento (KLUGE et al., 1994). Apesar de ser pouco conhecido no Brasil, o mirtilo tem um alto valor agregado e elevado potencial produtivo, tendo como destaque a região do RS, devido ao clima temperado ideal para o seu desenvolvimento, seguido dos estados de MG e SP (RASEIRA; ANTUNES, 2004).

Evidências mostram que o consumo de frutas e verduras diminui a possibilidade de doenças cardiovasculares, alguns tipos de câncer e combatem o envelhecimento, possivelmente devido a presença de antioxidantes que está associado à atuação ou inibição enzimática que atuam no desencadeamento de eventos oxidativos, no qual, dentre eles, destaca-se os compostos fenólicos, encontrados em pequenas frutas, inclusive o mirtilo (GOODWIN e BRODWICK, 1995; SEERAM, 2008; WU et al., 2004).

Os compostos fenólicos são constituídos por um anel benzênico, um grupamento carboxílico e grupamentos hidroxila, na qual, dependendo do número e posição do mesmo irá determinar sua atividade antioxidante, (NATELLA et al., 1999) sendo que outros vários fatores também tem influência sobre a composição e o conteúdo de compostos fenólicos, como espécie, cultivar, condições e climáticas ambientais, como tipo de solo e localização geográfica (MOYER et al., 2002).

O método de radicais livres baseia-se no descolorimento de uma solução constituída de radicais estáveis DPPH de cor violeta quando da adição de substâncias que podem ceder um átomo de hidrogênio (HUANG, D et al, 2005), tendo como base a transferência de elétrons de um composto antioxidante para um composto oxidante. Esta metodologia utiliza quantidade significativa de reagente, padrões e amostras e apresenta limitações em relação ao número de análises simultâneas, sendo que uma das possíveis determinações de compostos antioxidantes emprega-se a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Sendo assim, o objetivo do trabalho foi avaliar a atividade antioxidante através dos métodos ABTS e DPPH em diferentes extratos de polpa de mirtilo cultivar *Climax*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas, RS. Os mirtilos cv. Clímax, são oriundos do município de Pelotas-RS da safra 2012/2013, Elaborou-se a polpa com frutos da cv. Clímax, provenientes do município de Pelotas, RS, Brasil, os frutos foram adicionados de 25% de água, 0,1% de xantana e 0,08% de ácido cítrico, sendo estes previamente desintegrados e tratados termicamente em tacho aberto até atingir-se a temperatura de 95°C. Após, os frutos foram despulpados em despulpadora de estágio simples (malha 0,1mm) por 2,5 minutos, após a mesma foi armazenada a uma temperatura de -20°C até o momento das análises (KUCK, 2012).

Para a quantificação da atividade antioxidante da polpa de mirtilo foram utilizados dois solventes e duas combinações de solventes (metanol, etanol, metanol + acetona (2:2) e acetona 80%), os compostos foram extraídos por 24 horas sob refrigeração (aproximadamente 4°C). A medida da atividade sequestrante do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazida) foi realizada de acordo com metodologia descrita por BRAND-WILLIAMS

et al. (1995). A atividade antioxidante do radical ABTS (2,2-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) determinada através do método descrito por RE, et al, 1999.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 1. Determinação da atividade antioxidante de mirtilo cv. Climax utilizando dois métodos de captura de radicais (DPPH e ABTS expressos em mg trolox.g⁻¹ de fruta) em quatro diferentes extratos (acetona, etanol, metanol, metanol +acetona) FAEM/UFPeI, Capão do Leão-RS, 2012.

Solventes	DPPH		ABTS	
Acetona	61,08	ab*	38,95	a ^{1/}
Etanol	58,12	b	22,92	a
Metanol	61,60	a	22,77	a
Metanol / Acetona	61,43	ab	26,29	a

^{1/} Médias acompanhadas por letra diferente na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) comparando os diferentes solventes. * na linha refere-se a diferença significativa no teste t ($p \leq 0,05$) comparando os métodos de determinação da atividade antioxidante.

Observando a tabela 1 podemos ver que o método de captura do radical DPPH, obteve melhores resultados para metanol, mas sem diferença significativa para metanol/acetona e somente acetona, tendo diferença significativa apenas para etanol. O método ABTS não teve diferença significativa entre os solventes, mas quando olhamos individualmente cada solvente nos diferentes métodos todos eles obtiveram diferença significativa pelo teste t.

Rodrigues, (2009), com o objetivo de avaliar atividade antioxidante de diversas cultivares de mirtilo empregando os métodos de ABTS e DPPH observou-se que houve uma boa correlação entre ambos os métodos ($R=0,92$) portanto, os métodos analíticos empregados apresentam resposta muito similar podendo ser usados sem distinção para quantificar a atividade antioxidante desta fruta, considerando que a extração foi feita em metanol, encontrou-se valor mínimo de $1238,50 \pm 48,45$ e valor máximo de $2445,96 \pm 227,75$ com destaque para a cultivar Climax, com concentração de $1419,66 \pm 27,70$, que se aproxima do valor encontrado pelo presente trabalho. Já correlacionando os dois métodos e as concentrações de compostos fenólicos totais e antocianinas monoméricas totais nas cultivares estudada encontra-se uma correlação moderada ($p < 005$), que pode ser resultado de compostos não fenólicos que apresentam atividade antioxidante ou apenas a existência da diferença da capacidade antioxidante dos compostos.

Reque, (2012), também utilizou os métodos de DPPH e ABTS para determinar a atividade antioxidante em mirtilo *Rabbiteye*, típico da cultivar cultivada no estado RS, foi obtido na cidade de Camaquã, onde encontraram um elevado teor de atividade antioxidante em comparação a outras cultivares, sendo que pelo método de ABTS encontrou-se $35,39 \pm 0,84$ e para o método DPPH, $2938,05 \pm 14,38$. Isso se justifica devido à elevada concentração da antocianina delphinidina-3-glicosídeo, tendo presente 484mg/100g DW.

De acordo com o resultado de (Lajolo, F. M, 2006), no qual empregou-se dois métodos para verificar a atividade antioxidante de compostos puros e extrato de frutas de morango, amora, açaí e acerola, sendo o

primeiro o sistema β -caroteno/ácido linoleico, que tem por objetivo verificar atividade pró-oxidante demonstrado pela formação do radical, o qual não pode ser detectado pelo segundo método empregado de DPPH, já que o mesmo baseia-se apenas na transferência de elétrons de um composto antioxidante para o radical livre. No entanto, conclui-se que a acerola apresentou maior capacidade de sequestro dos radicais livres devido ao elevado teor de ácido ascórbico que nela se encontra, ou seja, tal composto possui atividade antioxidante nesse sistema, já o açaí, teve uma atividade antioxidante inferior quando comparado à acerola e amora, e o morango apresentou a menor atividade em ambos os métodos.

4. CONCLUSÃO

Observando o resultado do presente trabalho, conclui-se que no emprego do método DPPH, avaliado pelo teste de Tukey, destaca-se o uso do solvente metanol para a realização da extração por ter obtido melhor resultado. Em relação ao método ABTS, constatou-se que não houve diferença significativa na aplicação dos diferentes solventes, mas olhando os métodos a diferença significativa. Assim deve-se realizar estudos posteriores com outras pequenas frutas para ver se o resultado persiste ou se uma característica do mirtilo devido aos seus constituintes.

5. AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, e a Fundação de Amparo a Pesquisado Estado do Rio Grande do Sul, FAPERGS, pelo apoio financeiro.

Agradeço ao Laboratório de Fisiologia Pós-Colheita de Frutas e Hortaliças - Metabolismo Secundário, ao programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela oportunidade de estagio voluntario nessa área.

Aos doutorandos e mestrandos do programas que me auxiliam em minhas atividades diárias.

6. REFERÊNCIAS

- ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, Resolução CNNPA nº 12, 24 de julho, 1978.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.
- DUFFY, K. B. et al. A blueberry-enriched diet provides cellular protection against oxidative stress and reduces a kainate-induced learning impairment in rats. **Neurobiology of Aging**, v. 29, p. 1680-1689, 2007.
- GOODWIN, J. S.; BRODWICK, M. Diet, aging, and cancer. **Clinical Geriatric Medical**, v.11, p.577-589, 1995.
- HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **J. Agric. Food Chem.**, v.53, n.6, p.1841-1856, 2005.

- KLUGE, R.A.; HOFFMANN, A.; BILHALVA, A.B. Comportamento de frutos de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) cv. Powder Blue em armazenamento refrigerado. **Ciência Rural**, v.24, n.2, p.281-285, 1994.
- KUCK, L. S. Desenvolvimento de polpa de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) e preservação das suas antocianinas para elaboração em alimentos. 2012. 127f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas
- LAJOLO, F. M.; DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β - caroteno/ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH, 2006.
- MOYER, R. A.; HUMMER, K. E.; FINN, C. E.; FREI, B.; WROLSTAD, R. E. Antocyanins, Phenolics, and Antioxidant Capacity in Diverse Small Fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.50, p.519-525, 2002.
- NATELLA, F.; NARDINI, M.; FELICE, M. D.; SCACCINI, C. Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants: structure-activity relation. **Journal of agricultural and Food Chemistry**, v.47, p.1453-1459, 1999.
- RASEIRA, M.C.B.; ANTUNES, L.E.C. **A cultura do mirtilo**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, p67, 2004.
- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C.; Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, Vol. 26, Nos. 9/10, pp. 1231–1237, 1999.
- REQUE, P. M.; Frutos de mirtilo (*Vaccinium* sp.) e produtos derivados: caracterização e estabilidade de suas propriedades bioativas, 2012.
- RODRIGUES, E. Atividade antioxidante in vitro e perfil fenólico de cultivares de mirtilo (*Vaccinium* sp.) produzidas no Brasil, 2009.
- SEERAM, N. P. Berry fruits: Compositional Elements, Biochemical Activities, and the Impact of Their Intake on Human Health, Performance, and Disease. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p.627-629, 2008.
- STRINGHETA, P. C.; BOBBIO, P.A. Copigmentação de antocianinas. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 14, p. 34-37, 2000.
- STRINGHETA, P. C.; OLIVEIRA, T. T.; GOMES, R. C.; AMARAL, M. P. H.; CARVALHO, A. F.; VITELA, M. A. P. Políticas de saúde e alegações de propriedades funcionais e de saúde para alimentos no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 43, n.2, abr./jun. 2007.
- WU, X.; BEECHER, G. R.; HOLDEN, J. M.; HAYTOWITZ, D. B.; GEBHARDT, S. E.; PRIOR, R. L. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the united states. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.4026-4037, 2004.
- ZAMORA, P. P.; GALLICE, W. C.; MESSERSCHMIDT, I. Caracterização espectroscópica multivariada do potencial antioxidante de vinhos, 2001.