

Área: Ciência de alimentos

AVALIAÇÃO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE CASCAS DE FRUTAS CÍTRICAS

Leandro da Rosa Maciel*; Renata Silva Moura; Maurício Seifert; Débora Oliveira da Silva; Ricardo Paraginski; Roberto Pedroso de Oliveira; Cesar Valmor Rombaldi

Laboratório de Frutas e Hortaliças, Curso de Agronomia, Departamento de Ciências e Tecnologias Agroindustriais, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS

**E-mail: leandro1097@hotmail.com*

RESUMO – As frutas cítricas destacam-se por serem alimentos ricos em compostos fitoquímicos, como vitamina C, compostos fenólicos e carotenóides, e isso ocorre tanto na polpa quanto na casca. Muitos desses compostos são conhecidos por possuírem alta capacidade antioxidante, ou seja, capacidade de prevenir ou retardar reações de oxidação pela ação de radicais livres. Mas, para avaliar o potencial antioxidante, há que se testarem e otimizarem métodos de análise. Nesse contexto, mensurou-se a atividade antioxidante (AA) de cascas de quatro cultivares de citros de mesa, das cultivares Satsuma Okitsu (*C. unshiu* Marcovitch) colhida na cidade de Pelotas, Cara Cara (*C. sinensis* L. Osbeck), na safra de 2012. A atividade antioxidante foi avaliada através de dois métodos, sendo que um utiliza como molécula de captura dos radicais livres o radical DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) e outro utiliza, como radical, o ABTS (2,2-azino-bis(ethylbenzo-thiazoline- 6-sulfonic acid). Dessa avaliação, verificou-se que os métodos apresentam variabilidade em função do genótipo, tendo-se obtido, pelo radical DPPH e ABTS respectivamente, para as cultivares Cara Cara, valores de 13.686 e 3.718; Satsuma Okitsu, valores de 7.735 e 16.632; Rainha, valores de 18.353 e 17.476 e, por fim, para Ortanique, valores de 18.676 e 15.375. Como conclusão, verifica-se que o método utilizado interfere na estimativa da AA. Por exemplo, a cultivar com menor AA pelo método DPPH foi a Okitsu e pelo método ABTS foi a Cara Cara.

Palavras-chave: radicais-livres, cultivares, compostos fitoquímicos.

1. INTRODUÇÃO

O complexo agroindustrial de citros no Brasil se destaca como um setor altamente organizado e competitivo, responsável por 60% da produção mundial de laranja, colocando o País no patamar de grande produtor e campeão mundial em exportações do produto. Anualmente no País são colhidas, mais de 18 milhões de toneladas de laranja o que compreende cerca de 30% da safra mundial da fruta (MAPA). Mesmo com a expansão da cultura da cana-de-açúcar, a produção de citros se destaca na pauta agrícola brasileira. Porém, o Brasil não se apresenta como País produtor de citros de mesa. Pelo contrário, ainda é um País importador dessa fruta.

Nesse contexto, instituições públicas e empresas privadas vêm atuando na introdução, adaptação e melhoramento de cultivares para mesa ou dupla finalidade. Nesse segundo caso, buscam-se genótipos que produzam frutas que, além da boa aparência, tenham boas propriedades sensoriais, nutricionais e funcionais, e que essas propriedades estejam em todas as partes da fruta (suco, bagaço, casca) (CHITARRA & CHITARRA; 2005).

Citros são ricas fontes de vitamina C, fibras e minerais, bem como muitos fitoquímicos, incluindo flavonóides, aminoácidos, triterpenos, ácidos fenólicos e carotenóides (ROUSSOUS, 2011). A maioria desses compostos possui uma propriedade denominada como ação antioxidante, ou seja, têm a capacidade de reagir com as ROS (reactive oxygen species). Um antioxidante pode ser definido como uma substância que em baixas concentrações, retarda ou previne a oxidação de um substrato pela ação de radicais livres, que podem levar à disfunção das células, os quais estão diretamente ligados com o aumento do envelhecimento além de serem capazes de causar diversas doenças como o câncer, problemas cardíacos e diabetes (Halliwell B et. al1995)

Diferentes métodos para avaliação de atividade antioxidante são propostos na literatura (referência, usar referencias dos diferentes métodos DPPH, ABTS, FRAP, ORAC, etc), sendo que cada método deve ser testado e adaptado de acordo com a natureza da amostra. De modo geral, as diferenças abordadas por estes métodos são os mecanismos de ação contra os radicais livres. portanto, preconiza-se a utilização de duas ou mais técnicas, visto que, o uso de um ensaio isoladamente para determinar a capacidade antioxidante não irá refletir exatamente a “capacidade antioxidante total” de uma amostra (PRIOR, CAO; 1999).

Neste contexto, este trabalho tem como objetivo caracterizar cascas de frutas cítricas produzidas no Rio Grande do Sul quanto à capacidade antioxidante, através de dois métodos já popularizados em outros alimentos (DPPH e ABTS).

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados frutos das cultivares SatsumaOkitsu (*C. unshiu* Marcovitch) colhida na cidade de Pelotas, Cara Cara (*C. sinensis* L. Osbeck) colhidos em Rosário do Sul, Rainha e Ortanique colhidas na região do Vale do Café. A colheita foi realizada quando os frutos estavam maduros. As cascas foram retiradas dos frutos, congeladas em nitrogênio líquido e maceradas utilizando moimho de bola (Marconi MA 350) e armazenados a -20°C até o momento das análises.

A extração dos componentes antioxidantes das amostras foi realizada segundo método adaptado de BRAND-WILLIAMS (1995). Pesou-se 5g de amostra e adicionou-se 20mL de metanol, agitou-se por 2 minutos em vórtex, e em seguida o extrato ficou em repouso por a 4°C por 24 horas. O extrato foi então centrifugado a 7800g por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi então recolhido e armazenado à -80°C até o momento da realização das reações para quantificação dos antioxidantes pelas metodologias de DPPH e ABTS.

A determinação da atividade antioxidante utilizando o radical DPPH(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) foi realizada segundo método adaptado de BRAND-WILLIAMS (1995) com algumas adaptações. Preparou-se uma solução de DPPH (24mg de DPPH em 100mL de metanol), chamada solução estoque. A solução de uso foi preparada de uma alíquota de 10mL da solução descrita anteriormente, a qual foi diluída em 45mL de metanol (absorbância entre 1,08-1,12). Para a reação adicionaram-se 100µL do extrato e 3,9mL da solução de uso, e para o branco utilizaram-se 100µL de metanol mais 3,9mL de solução de uso de DPPH. Após 24 horas, foi realizada a leitura a 517nm, sendo importante ressaltar que o espectrofotômetro foi ser zerado com metanol.

A quantificação da capacidade antioxidante com o radical ABTS (2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) foi realizada segundo método adaptado de Re et al. (1999). A solução de uso de ABTS e Persulfato de Potássio consiste em dissolver 88µL de persulfato de potássio e completar com solução padrão ABTS até atingir o volume de 5mL. A mistura foi mantida no escuro à temperatura ambiente por um período de 16 horas. Após esse período, diluiu-se 1mL da mistura em álcool etílico (90mL) até se obter uma absorbância de $0,700 \pm 0,05$ nm a 734nm. Da mesma maneira que o procedimento anterior, a reação consistiu em adicionar 0,1mL de extrato e 3,9 da solução diluída de ABTS; em seguida agitou-se em vórtex e aguardaram-se 6 minutos, após os quais realizou-se a leitura a 734nm, utilizando álcool metílico como prova em branco da leitura. As concentrações e tempos utilizados foram otimizados em ensaios preliminares.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade antioxidante (AA), mensurada pelos métodos dos radicais DPPH e ABTS, apresentou variação significativa entre os genótipos e entre os métodos. Assim, pelo método do DPPH a maior AA foi da Ortanique (18.676 mg Trolox/g), seguida pelas Rainha (18.353 mg Trolox/g), Cara Cara (13.686 mg Trolox/g) e Okitsu (7.735 mg Trolox/g). Quando a AA foi mensurada pelo método de ABTS, os maiores valores foram observados para Rainha (17.476 mg Trolox/g), e o menor para Cara Cara (3.718 mg Trolox/g). Embora os princípios básicos dos dois métodos seja o mesmo (reação de oxi-redução), é sabido que a reatividade dos radicais desses métodos é distinta (Prior, 1999). Desse modo, como deve haver composição distinta entre as cascas, é razoável que haja diferença de respostas frente aos radicais DPPH e ABTS.

Tabela 1: Atividade Antioxidante de cascas de Cara Cara, Okitsu, Rainha e Ortanique

Cultivar	Radical	
	DPPH (mgTrolox/g)	ABTS (mgTrolox/g)
Cara Cara	13.686 b *	3.718 b
Okitsu	7.735 c	16.632 a
Rainha	18.353 ab	17.476 a
Ortanique	18.676 a	15.375 a

Médias acompanhadas por letra minúscula diferente na coluna, comparando cada parte entre as cultivares, diferem entre si pelo teste tukey($p \leq 0,05$), respectivamente. Médias acompanhadas por * na mesma linha, significativo pelo teste t ($p \leq 0,05$), comparando cada método dentro de cada cultivar.

Devido à complexidade dos compostos que possuem capacidade antioxidante, assim como seus mecanismos de ação, diversos estudos (Rufino, 2008; Rufino et. al 2010) encontram diferentes valores para atividade antioxidante. Estes fatos, somados aos resultados encontrados neste trabalho, evidencia que métodos utilizados para determinação de atividade antioxidante, quando utilizados isoladamente, podem não fornecer resultados seguros.

É importante ressaltar também que, compostos como carotenoides, compostos fenólicos e vitamina C colaboram para a ação antioxidante (XU et al., 2008). Portanto, é importante ressaltar que este estudo deve se complementar com estudos quantificação e caracterização dos mesmos, assim como, um estudo da correlação entre estes a atividade antioxidante.

4. CONCLUSÃO

As cultivares que apresentaram maiores variações entre os métodos estudados foram as cultivares Cara Cara e Okitsu.. Conclui-se com isso, que se fazem necessários a utilização de mais de um método para quantificar a capacidade antioxidante das frutas, devido seu grande número de compostos, assim como diferentes mecanismos de ação.

5. REFERÊNCIAS

- CHITARRA, M. I. F; CHITARRA, A. B. Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio. 2° ed., Editora: UFLA, 785p., 2005.
- BRAND-WILLIAMS, W.;CUVELIER, M. E.; BERTSET, C. Use of a radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm-Wiss Technol*, v.28, p.25-30,1995.
- Halliwel B, Aeschbach R, Loliger J, Arouma OI. **The characterization of antioxidants**. *Food Chem Toxicol* 1995;33(7):601-17.
- LEONG.L.P;SHUI , G. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets .*Food Chem*,.V. 76,p.69-75,2002.

Ministério do Abastecimento Pecuária e Agricultura (MAPA), <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/citrus>, acessado em 23/07/2013 as 19:52.

Prior RL, Cao G. antioxidant capacity and polyphenolic components of teas: implications for altering in vivo antioxidant status. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999; 220:255-261.

Prior RL, Cao G. **In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods.** *Free Radic Biol Med* 1999; 27(11/12):1173-81.

Pereira et al. De 2006 JA Pereira, APG Pereira, ICFR Ferreira, P. Valentão, PB Andrade, R. Seabra, L. Estevinho, A. Bento **Azeitonas de mesa de Portugal: compostos fenólicos, a atividade potencial antioxidante e antimicrobiana**

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.

SHEN, Y.; JIN, L.; XIAO, P.; LU, Y.; BAO, J.; Total phenolics, flavonoids, antioxidant capacity in rice grain and their relations to grain color, size and weight. **Journal of Cereal Science** 49(2009)106-111.

ROUSSOS, P. A. Phytochemicals and antioxidant capacity of orange *Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Salustiana) juice produced under organic and integrated farming system in Greece. **Scientia Horticulturae**. 129, 2011, 253-258p.

RUFINO MSM, ALVES RE, BRITO ES, PÉREZ-JIMÉNEZ J, SAURA-CALIXTO F, MANCINI-FILHO J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry** 2010; 121:996-1002p.

RUFINO MSM. Propriedades funcionais de frutas tropicais brasileiras não tradicionais. Tese [Doutorado em Fitotecnia] - Universidade Federal Rural do Semi-Árido; 2008.