

## AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS FOLHAS DE ACEROLA, GUABIROBA E ORA-PRO-NOBIS

Denise Alves Vieira<sup>1</sup>; Pauline Sambugaro Santos<sup>1</sup>; Charles Windson Isidoro Haminiuk<sup>2</sup>; Manuel Salvador Vicente Plata-Oviedo<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>UTFPR – Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Campus Campo Mourão, PR.

<sup>2</sup>PPGTA – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, UTFPR - Campus Campo Mourão, PR.

**Resumo-** O objetivo deste trabalho foi quantificar o teor de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante pelo método do radical livre DPPH, dos extratos etanólicos das folhas acerola, guabiroba e ora-pro-nobis visando encontrar fontes vegetais com potencial para possíveis usos como antioxidantes alimentícios. Na extração dos compostos fenólicos das folhas o solvente metanol-80% acidulado mostrou-se superior ao etanol 80%. Foi encontrado a quantidade de 1656,66, 5196,66 e 1693,33 mg de equivalente de ácido gálico (GAE) por 100 gramas, respectivamente das folhas de acerola, guabiroba e ora-pro-nobis. Os extratos etanólicos das folhas de guabiroba e ora-pro-nobis na concentração de 8,57µg GAE/mL apresentaram elevada atividade antioxidante, respectivamente, 92,6 e 92,76%, que foram superiores ao do BHT (10,13%), ácido ascórbico (19,25%) e similares as do trolox (92,79%). O extrato das folhas de ora-pro-nobis apresentou o menor IC<sub>50</sub> (3,22µg GAE/mL) mostrando boa capacidade de captura do radical DPPH.

**Palavras-chaves:** Extratos de folhas. Compostos fenólicos. Atividade antioxidante. Radical DPPH.

**Evaluation of the antioxidant activity of the leaves of acerola, guabiroba and ora-pro-nobis.** The objective of this work was to quantify the total content of phenolic compounds and the antioxidant activity of ethanolic extracts of acerola, guabiroba and ora-pro-nobis leaves. The analysis was performed by the DPPH free-radical method, aiming to find plants with potential use as natural antioxidants in foodstuff. In the extraction of phenolic compounds from leaves, acidified methanol 80% showed superior performance when compared to ethanol 80%. It was found the amounts of 1656.66, 5196.66 and 1693.33 mg GAE (gallic acid equivalent)/100 g for acerola, guabiroba and ora-pro-nobis leaves, respectively. Ethanolic extracts of guabiroba and ora-pro-nobis leaves (8.57 µg GAE/mL) presented higher antioxidant activity (92.6 and 92.76%, respectively) than BHT (10.13%), ascorbic acid (19.25%) and similar to trolox (92.79%). The extract of ora-pro-nobis presented the lowest IC<sub>50</sub> (3.22 µg GAE/mL) showing a good ability to capture the DPPH radical.

**Keywords:** Extracts from leaves. Phenolic compounds. Antioxidant activity. DPPH radical.

### 1 Introdução

Os antioxidantes são um conjunto heterogêneo de substâncias formadas por compostos fenólicos, vitaminas, pigmentos naturais e enzimas, que bloqueiam o efeito danoso dos radicais livres (PACKER, 1999). Eles podem ser sintéticos ou naturais e, para serem utilizados em alimentos, devem ser seguros para a saúde. Alguns dos antioxidantes sintéticos mais importantes são hidroxianisol de butila

(BHA), o hidroxitolueno de butila (BHT) e terc butil hidroquinona (TBHQ) e entre os naturais destacam-se ácido ascórbico, tocoferóis, -caroteno, ácidos fenólicos e extratos de plantas (DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006; RAMALHO; JORGE, 2006). Estudos têm demonstrado que alguns dos antioxidantes sintéticos normalmente usados na indústria de alimentos para inibição das reações de oxidação lipídica tem mostrado potencial carcinogênico em experimentos com animais (BOTTERWECK *et al.*, 2000) e podem causar malefícios à saúde como o aumento do peso do fígado e significativa proliferação do retículo endoplasmático

\* E-mail: mapaov@utfpr.edu.br

(MELO; GUERRA, 2002; DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004).

Devido a estes inconvenientes causados pelos antioxidantes sintéticos nos últimos anos tem havido a preocupação de se obter substâncias naturais que tenham as mesmas, ou melhores, função e eficiência dos antioxidantes sintéticos a fim de substituí-los ou fazer associações entre eles, diminuindo desta forma sua quantidade nos alimentos (RAMALHO; JORGE, 2006; BATISTA *et al.*, 2007).

Diversos extratos de ervas como alecrim, coentro, sálvia, tomilho e manjeriço têm sido estudados devido ao poder antioxidante, que pode ser atribuído ao seu conteúdo de compostos fenólicos (ANGELO; JORGE, 2007). Entre as folhas uma das mais estudadas é erva mate apresentando altos teores de compostos fenólicos totais (14,5%) e elevada atividade antioxidante quando avalia pelo método do DPPH ou pela oxidação acoplada do  $\beta$ -caroteno e ácido linoléico (SALDANHA, 2005; ASOLINI, *et al.*, 2006).

Na busca de materiais vegetais que potencialmente possam ser utilizados com fontes alternativas de antioxidantes naturais para aplicações alimentícias, este trabalho tem por objetivo quantificar o teor de compostos fenólicos e avaliar pelo método do radical DPPH a atividade antioxidante das folhas de acerola, guabiroba e ora-pro-nobis.

## 2 Materiais e Métodos

### 2.1 Material

Foram utilizadas folhas de acerola, guabiroba e ora-pro-nobis, de cultivares não definidos, adquiridas em sítios de Campo Mourão. As folhas foram lavadas com água potável e secas (80°C por 18 h) em estufa com circulação de ar. A seguir as folhas foram moídas finamente, acondicionadas e armazenadas em geladeira a temperatura de 5 a 8 °C. As folhas secas de acerola, guabiroba e ora-pro-nobis apresentaram teores de umidades (AACC 44-15A, 1990), respectivamente de  $2,18 \pm 0,05$ ,  $2,53 \pm 0,10$  e  $2,30 \pm 0,09\%$

### 2.2 Obtenção dos extratos etanólicos dos materiais vegetais

Para a obtenção dos extratos, amostras de 1,5 g das folhas foram deixadas em maceração com 15 mL de etanol 80 %, por um período de 12 horas sob constante agitação à temperatura ambiente em um agitador rotativo. Após esse período, os sobrenadantes foram separados por centrifugação (1000 rpm x 20 minutos). As operações de maceração com 15 mL de etanol 80 % por 12 horas e centrifugação foram repetidas por mais duas vezes. Os sobrenadantes de cada amostra de folhas foram misturados e usados para a quantificação,

através de técnica espectrofotométrica dos compostos fenólicos totais e para a avaliação da atividade antioxidante pelo método do DPPH.

### 2.3 Obtenção dos extratos metanólicos dos materiais vegetais

Amostras de aproximadamente 0,6 g de folhas foram submetidas à extração por tempo de 19 horas, sob constante agitação mecânica, com 20 mL de metanol 80% contendo 1 % (v/v) de ácido clorídrico segundo o método de Velioglou *et al.* (1998). O sobrenadante foi separado por centrifugação (1000 rpm x 20 minutos). O resíduo foi novamente disperso com 10 mL de metanol 80% acidulado e após uma hora de agitação, novamente o sobrenadante foi separado por centrifugação. Os sobrenadantes de cada amostra de folhas foram misturados e usados para a quantificação, através de técnica espectrofotométrica dos compostos fenólicos totais.

### 2.4 Determinação do teor de compostos fenólicos totais nos extratos etanólicos e metanólicos das folhas secas

Essa determinação foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu segundo metodologia de Singleton e Rossi citado por Amerine e Ough (1976). Para o desenvolvimento da reação foram pipetados 5 mL de água destilada e 100  $\mu$ L do extrato dentro de balão volumétrico de 10,0 mL. A seguir o balão recebeu 0,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu. Após 3 minutos de repouso foram adicionados 2,0 mL de solução de carbonato de sódio a 15%. Completou-se o volume a 10 mL com água destilada e finalmente a mostra foi homogeneizada e guardada em lugar escuro. Após duas horas determinou-se a absorbância a 765 nm, usando cubetas de quartzo de 10 mm, em um espectrofotômetro previamente calibrado contra o branco.

Os teores de compostos fenólicos totais foram determinados por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico (94,08, 282,25, 470,42 e 658,58 mg/L) e expressos em miligramas (mg) de equivalente de ácido gálico (mg EAG) por 100 g da amostra em base seca segundo a Equação 1 derivada da curva de calibração. As análises foram realizadas em triplicata.

$$\frac{\text{mg EAG}}{100\text{g amostra}} = \left( \frac{\text{Abs} - 0,026724}{0,001145} \right) \left( \frac{A}{100} \right) \left( \frac{1}{B \times 100} \right) \quad (1)$$

Onde:

Abs = valor da absorbância da amostra

A= Quantidade de solvente utilizado na extração

B= Massa em gramas das folhas em base seca

EAG= equivalente de ácido gálico

## 2.5 Determinação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante (AA) total foi avaliada através do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) de acordo com o método descrito por Mensor *et al.* (2001) com modificações, onde o meio reacional (extrato + solução de DPPH + etanol absoluto) foi de um volume de 3,5 mL.

Em frascos de 5 mL foram adicionados 2,4 mL de etanol absoluto, 1 mL de solução de DPPH (6 mg/50 mL) e 0,1 mL do extrato. No volume final de 3,5 mL os 0,1 mL dos extratos em concentrações 7, 15, 40, 100, 150, 300 e 450 µg EAG/mL correspondem a concentrações finais, respectivamente de 0,2, 0,43, 1,14, 2,86, 4,28, 8,57 e 12,86 µg EAG/mL. Para cada amostra, foi realizado em paralelo, para a correção de uma possível contribuição da coloração dos extratos, um teste branco consistindo do volume do extrato (0,1 mL) e 3,4 mL de etanol absoluto. O controle foi preparado ao misturar 1,0 mL de solução de DPPH (6 mL/50 mL) com 2,5 mL de etanol absoluto. O mesmo método foi utilizado para avaliar a atividade antioxidante do BHT, do trolox, do galato de propila e do ácido ascórbico nas concentrações acima citadas.

Após um período de 45 minutos de incubação no escuro em temperatura ambiente, as absorvâncias das amostras foram registradas contra um branco em 517 nm. Os testes foram realizados em triplicata e a inibição do radical livre DPPH (em %) foi calculada pela Equação 2:

$$AA\% = 100 - [(Aa - Ab) \times 100] \% Ac \quad (2)$$

Onde:

Aa = absorvância da amostra

Ab = absorvância do branco

Ac = absorvância do controle

A concentração dos extratos em microgramas de equivalente de ácido gálico necessários para inibir em 50 % (IC<sub>50</sub>) ao radical DPPH foi calculada por regressão (linear e polinomial) dos gráficos em que o eixo das abscissas representou a concentração dos extratos e o eixo das ordenadas a atividade antioxidante (%) calculada segundo a equação (2).

## 2.6 Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas utilizando o teste de Tukey (p< 0,05) usando o programa Assistat versão 7.5 beta.

## 3 Resultados e Discussão

### 3.1 Compostos fenólicos totais nas folhas desidratadas

O conteúdo de compostos fenólicos totais dos materiais vegetais, extraídos com dois tipos de solventes, expressos em miligramas de equivalente de ácido gálico (mg EAG) por 100 g de material vegetal são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Teor de compostos fenólicos nas folhas secas de acerola, guabiroba e ora-pro-nobis.

Amostra	Solvente metanol 80 % acidulado	Solvente etanol 80%
	com 1 % (v/v) de HCl 37 % mg EAG/ 100 g (b.s)	mg EAG/ 100 g (b.s)
Acerola	1656,66 ± 55,07 <sup>a</sup>	1410,00 ± 0,00 <sup>e</sup>
Guabiroba	5196,66 ± 49,33 <sup>d</sup>	3316,67 ± 60,27 <sup>a</sup>
Ora-pro-nobis	1693,33 ± 32,15 <sup>a</sup>	940 ± 27,07 <sup>f</sup>

Médias seguidas de letra diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si (p<0,05) pelo teste de Tukey. EAG = equivalente de ácido gálico. b.s = base seca

A partir dos resultados obtidos na Tabela 1, observa-se que o metanol 80% acidulado apresenta melhor poder extrator de compostos fenólicos para todos os materiais vegetais, se comparado com o etanol 80% colocando em evidência a característica altamente polar dos compostos fenólicos.

Quando extraído com metanol 80% acidulado o material vegetal que apresentou maior teor de compostos fenólicos totais (mg EAG/100g) foi a guabiroba (5196,66), seguido da ora-pro-nobis (1693,33) e da acerola (1656,66), não entanto estas duas últimas folhas não apresentaram diferença estatística entre si.

Os teores de compostos fenólicos totais obtidos neste trabalho foram superiores aos determinados por Shirahigue (2008) nos bagaços das uvas Isabel (430,55 mg/100g) e Niágara (522,22 mg/100g) e inferiores aos teores quantificados por Asolini *et al.* (2006) em folhas de erva-mate (14.500 mg/100g), alecrim (8.000 mg/100g) e tanchagem (6.500 mg/100g) reconhecidas com fonte de compostos fenólicos.

### 3.2 Atividades Antioxidante de Extratos Vegetais, BHT, trolox, ácido ascórbico e galato de propila determinada pelo método do DPPH

A adição de extratos com atividade antioxidante a solução de DPPH causa uma redução rápida na densidade ótica em 517 nm. O grau de descoloração

indica a capacidade dos extratos em sequestrar o radical (SHIRAHIGUE, 2008).

A atividade antioxidante dos extratos de folhas de acerola, guabiroba, ora-pro-nobis e das substâncias de referência (BHT, trolox, ácido ascórbico e galato de propila) determinados pelo método do radical DPPH expresso em (%) estão apresentados na Figura 1.

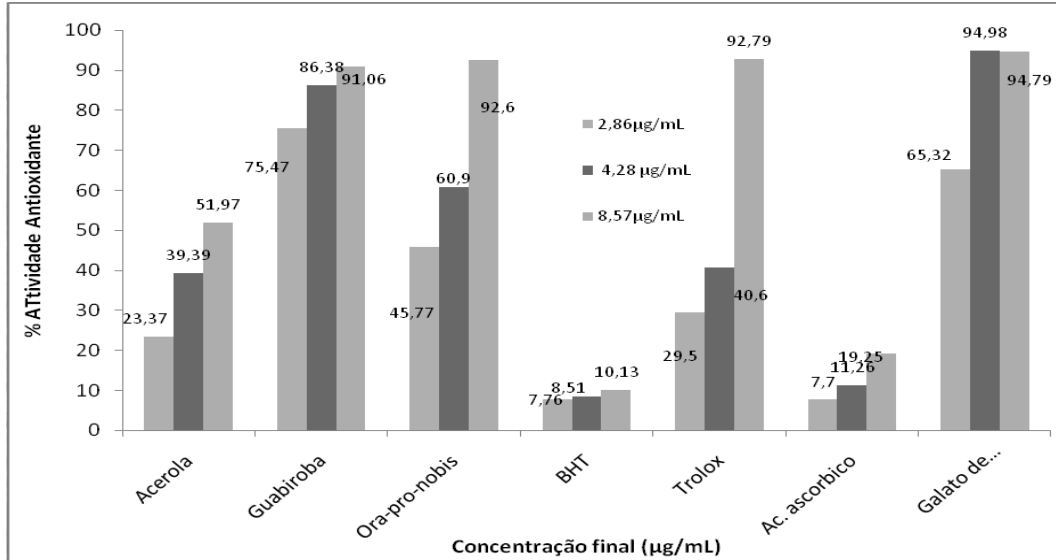


Figura 1: Atividade antioxidante (%) dos extratos de acerola, guabiroba, ora-pro-nobis comparativamente a ácido ascórbico, BHT, galato de propila e trolox, em concentrações finais de 2,86, 4,28 e 8,57 µg/mL.

Verificou-se na Figura 1 que os extratos de guabiroba e ora-pro-nobis, apresentaram respectivos valores 75,77 e 45,77 % de atividade anitoxidante (AA) na concentração de 2,86 µg/mL e ultrapassando 90 % de AA na concentração de 8,57 µg/mL. O extrato de folhas de acerola foi a que manifestou a menor atividade antioxidante, na maior concentração (8,57 µg/mL) atingiu valor de 51,97 % de AA.

A atividade antioxidante dos extratos de guabiroba (91,06%) e ora-pro-nobis (92,6%) foi similar ao do trolox (92,79%) na concentração de 8,57 µg EAG/mL e ao do galato de propila nas concentrações de 4,28 e 8,57 µg EAG/mL, respectivamente 94,89 e 94,79%. Já o BHT e ácido ascórbico apresentaram baixa capacidade sequestrante (7,76 a 19,25% AA) do radical DPPH notadamente inferior aos extratos vegetais dosados nas mesmas concentrações em equivalentes de ácido gálico. Shirahigue *et al.* (2008) obtiveram resultados similares quanto ao poder de captação do DPPH por parte BHT, sendo a atividade antioxidante de 14,16% na concentração de 90 µg/mL.

### 3.3 Determinação da concentração mínima (IC<sub>50</sub>) para reduzir em 50% a concentração do DPPH

O DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) é um radical estável, quando reage com substâncias com atividade antioxidante é convertido em 2,2-difenil-1-picril hidrazina, descolorando-se, diminuindo o valor da absorbância lida no espectrofotômetro. Uma pequena quantidade de extrato capaz em diminuir em 50 % a absorbância da solução de DPPH, nas condições do teste, estará reduzindo pela metade a capacidade de oxidação do radical. Assim, um extrato que apresente alta capacidade de sequestrar radicais livres possui baixo valor de IC<sub>50</sub> (ROESLER *et al.* 2007). Os resultados do IC<sub>50</sub> expressos em µg EAG/mL estão apresentados na Tabela 2.

Os extratos que apresentaram as menores concentrações para reduzir em 50 % a atividade do radical DPPH foram ora-pro-nobis (3,22 µg/mL) e guabiroba (3,81 µg/mL), e o maior foi o extrato de folhas de acerola (9,32 µg/mL).

Tabela 2. Valores de IC<sub>50</sub> dos extratos nas folhas secas de acerola, guabiroba e ora-pro-nobis, e dos antioxidantes padrões.

Amostra	IC <sub>50</sub> µg EAG/mL	mg EAG/ 100g (b.s)
Acerola	9,32	1410,00 ± 00 <sup>c</sup>
Ora-pro-nobis	3,22	940 ± 27,07 <sup>1</sup>
Guabiroba	3,81	3316,67 ± 60,27 <sup>a</sup>
BHT	26,1	
Ácido ascórbico	16,23	
Trolox	4,46	
Galato de propila	2,20	

Médias seguidas de letra diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si (p<0,05) pelo teste de Tukey. EAG = equivalente de ácido gálico. b.s = base seca

Cabe destacar que todos os extratos de folhas foram mais eficientes na captura do radical DPPH do que os antioxidantes BHT (26,1 µg/mL) e ácido ascórbico (16,23 µg/mL). Os extratos de ora-pro-nobis e guabiroba com valores de IC<sub>50</sub> (3,22 e 3,81 µg/mL) apresentaram atividade antioxidante similar aos dos antioxidantes galato de propila (2,20 µg/mL) e trolox (4,46 µg/mL).

Na Tabela 2 observa-se que não há relação direta entre a concentração de compostos fenólicos totais (mg EAG/100g) e o IC<sub>50</sub> visto que o extrato de folhas de ora-pro-nobis que apresentou o menor teor de compostos fenólicos totais (940 ± 27,07 mg EAG/100g) foi mais eficiente (IC<sub>50</sub> de 3,22 µg EAG/mL) na captura do radical DPPH quando comparados com os extratos das folhas de guabiroba (IC<sub>50</sub> de 3,81 µg EAG/mL) e de acerola (IC<sub>50</sub> de 9,32 µg EAG/mL) que apresentaram teores de compostos fenólicos totais, de 3316,67 e 1410,00 mg/100g, respectivamente.

#### 4 Conclusão

O metanol 80%-acidulado apresenta melhor poder extrator de compostos fenólicos para todos os materiais vegetais, se comparado com o etanol 80%, sendo assim um bom solvente para a quantificação de compostos fenólicos em matrizes vegetais.

Comparado com os antioxidantes de referência trolox e galato de propila, os extratos de guabiroba e ora-pro-nobis apresentaram valores de atividade antioxidante similares. Já o BHT e ácido ascórbico tem uma capacidade seqüestraste do radical DPPH notadamente inferiores aos extratos vegetais dosados nas mesmas concentrações em equivalentes de ácido gálico.

Verificou-se que as folhas de acerola, guabiroba e ora-pro-nobis são fontes de compostos fenólicos e seus extratos possuem atividade antioxidante, sendo interessante a avaliação dessa propriedade em sistemas alimentícios suscetíveis a oxidação lipídica visando seu uso como novas alternativas de antioxidantes naturais para aplicações alimentícias.

#### 5 Referências

- AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. **Approved Methods**, 8<sup>th</sup> ed., vol. II, AACC, St. Paul, 1990.
- AMERINE, M.A.; OUGH, C.S. **Análisis de vinos y mostos**. Zaragoza: Acribia, 1976.
- ANGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n.1, p. 232-240, 2007.
- ASOLINI, C. F.; TEDESCO, A.M.; CARPES, S.T.; FERRAZ, C.; ALENCAR, S. M. de. Atividade antioxidante e antibacteriana dos compostos fenólicos dos extratos de plantas usadas como chás. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.9, n.3, p.209-215, 2006.
- BATISTA, E. S.; COSTA, A. G. V.; PINHEIRO-SANT'ANA, H. M.; Adição da vitamina E aos alimentos: implicações para os alimentos e para a saúde humana. **Revista de Nutrição**, v.20, n.5, p. 525-535, 2007.
- BOTTERWECK, A.A.M.; VERHAGEN, H.; GOLDBOHM, R.A.; J. KLEINJANS, J.; van den BRANDT, P.A. Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands cohort study. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, n.7, p.599-605, 2000.
- DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.
- DUARTE- ALMEIDA, J.M.; SANTOS, R.J.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M.. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β-caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.2, p.446-452, 2006.
- MELO, E. A.; GUERRA, N.B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos. SBCTA**. v. 36, n. 1, p. 1-11, 2002.
- MENSOR L.L.; MENEZES F.S.; LEITÃO G.G.; REIS A.S.; dos SANTOS T.C.; COUBE C.S.; LEITÃO S.G. Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v.15, n. 2, p. 127-130, 2001.
- PACKER, L.; **Principal Oxidants and antioxidants**, San Diego: Academic Press, 1999.
- RAMALHO, V.; JORGE, N. Antioxidante utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.
- ROESLER, R.; MALTA, L.G; CARRASCO, L.C. HOLANDA, R.B. Atividade antioxidante de frutas do

cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.1, pp. 53-60, 2007.

SALDANHA, L. A. **Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* de extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) verde e tostada e chá verde (*Camellia sinensis*)**. 2005. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública. Universidade de São Paulo, 2005.

SHIRAHIGUE, L. D. **Caracterização química de extratos de semente e casca de uva e seus efeitos antioxidante sobre carne de frango processada e armazenada sob refrigeração**. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

SHIRAHIGUE, L.D.; PLATA-OVIEDO, M.; ALENCAR, S. M. de; REGITANO D'ARCE, M.A.B.; VIEIRA, T.M.F. de S.; OLDONI, T.L.C.; CONTRERAS-CASTILLO, C.J. Wine industry residue as antioxidant in cooked chicken meat. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, n.5, p. 863–870, 2010.

VELIOGLU, Y.S.; MAZZA, G.; GAO, L.; OOMAH, B.D. Antioxidant activity and total phenolics select fruits, vegetables, and grain products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n 10, p. 4113-4117, 1998.