

# Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos

## Methods for Measuring Antioxidant Activity of Fruits

Natália Rocha Sucupira<sup>a\*</sup>; Aline Braga da Silva<sup>a</sup>; Gerlândia Pereira<sup>a</sup>; Juliana Nascimento da Costa<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Universidade Federal do Ceará, Departamento de Tecnologia de Alimentos, CE, Brasil

\*E-mail: natsucupira@yahoo.com.br

Recebido: 31 de março de 2012; Aceito: 17 de maio de 2012

### Resumo

Os estudos envolvendo compostos antioxidantes naturalmente presentes em alimentos e a prevenção ou controle de algumas doenças não transmissíveis têm chamado a atenção da comunidade científica e da população em geral. Entre os alimentos que contêm antioxidantes naturais, as frutas e os vegetais são os que mais contribuem para o suprimento dietético destes compostos, associados aos efeitos benéficos à saúde humana. Os métodos para avaliação da atividade antioxidante total (AAT) propostos na literatura são diversos, porém alguns são mais apropriados que outros, dependendo da natureza dos compostos presentes na constituição de cada fruta. O presente trabalho realizou uma revisão de literatura com as principais metodologias utilizadas para a avaliação da atividade antioxidante de frutas a fim de acompanhar o progresso metodológico dos principais ensaios antioxidantes atualmente em uso.

**Palavras-chave:** Métodos. Alimentos. Prevenção de Doenças. Antioxidantes.

### Abstract

*Studies on antioxidants present in foods and the prevention or control of non-communicable diseases have attracted the attention of the scientific community and the general population. Among natural antioxidants, fruits and vegetables are those which contribute most to the dietary supply of these compounds associated with beneficial effects on human health. Methods for evaluation of total antioxidant activity (TAA) proposed by the literature are diverse, but some are more appropriate than others depending on the nature of the compounds present in each fruit. This study reviewed the main methodologies on literature to evaluate the antioxidant activity of fruits, in order to monitor the methodological progress of the main antioxidant assays currently in use.*

**Keywords:** *Methods. Food. Disease Prevention. Antioxidants.*

### 1 Introdução

O consumo de frutas está aumentando nos mercados interno e internacional, devido ao crescente reconhecimento dos benefícios à saúde e valor terapêutico desses alimentos. O Brasil possui grande número de espécies de frutas nativas e exóticas com potencial interesse para a agroindústria, além de provável fonte futura de renda para a população local. Esses frutos representam uma oportunidade para produtores locais de ganhar acesso aos mercados especiais, nos quais os consumidores dão ênfase à presença de nutrientes capazes de prevenir doenças degenerativas<sup>1</sup>. O consumo de frutas já não é simplesmente resultado de gosto pessoal ou preferência, mas se tornou uma preocupação de saúde, devido à presença de importantes nutrientes nas frutas.

Evidências epidemiológicas têm demonstrado que o consumo regular de frutas está associado à redução da mortalidade e morbidade por algumas doenças crônicas não transmissíveis. Compostos fitoquímicos com ação antioxidante presentes nas frutas, como por exemplo, os polifenóis, têm apresentado efeito protetor nestes alimentos, contra doenças crônico-degenerativas<sup>2</sup>.

A capacidade antioxidante pode ser expressa por meio de

vários parâmetros, incluindo a remoção de um radical peróxil (ORAC - oxygen radical absorbance capacity, TRAP - total reactive antioxidant potential), a capacidade de redução de metal (FRAP - ferric reducing antioxidant power, CUPRAC - cupric ion reducing antioxidant capacity), a capacidade de remoção de radical orgânico (ABTS - 2,2'-azino-bis (ácido 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfônico), DPPH - peroxidação do 2,2-difenil-1-picrylhydrazil) e a quantificação de produtos formados durante a peroxidação de lipídeos (TBARS, a oxidação do LDL, co-oxidação do  $\beta$ -caroteno)<sup>3</sup>.

Os métodos FRAP, ABTS, DPPH e ORAC são mais utilizados para determinar a capacidade antioxidante *in vitro*. O método de branqueamento de  $\beta$ -caroteno, que avalia o nível de inibição dos radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoléico, também é bastante conhecido<sup>4</sup>.

Os métodos para avaliação da atividade antioxidante total (AAT) propostos na literatura são diversos, porém alguns são mais apropriados que outros, dependendo da natureza dos compostos presentes na constituição de cada fruta. Deste modo, existem métodos para frutos ricos em compostos hidrofílicos e métodos para frutos ricos em compostos lipofílicos<sup>5</sup>.

## 2 Desenvolvimento

### 2.1 Antioxidantes

Um antioxidante pode ser definido como uma substância que, em baixas concentrações, retarda ou previne a oxidação do substrato<sup>6</sup>. Algumas características são necessárias para ser considerado um bom antioxidante, por exemplo, ter a presença de substituintes doadores de elétrons ou de hidrogênio ao radical, em função de seu potencial de redução; capacidade de deslocamento do radical formado em sua estrutura; capacidade de quelar metais de transição implicados no processo oxidativo; e acesso ao local de ação, dependendo de sua hidrofília ou lipofília e de seu coeficiente de partição<sup>7</sup>.

Quanto ao mecanismo de combate aos radicais livres, os antioxidantes podem ser classificados em primários e secundários. Outra classificação divide os antioxidantes em sintéticos e naturais<sup>5</sup>.

Os antioxidantes são conhecidos pela ação em diferentes níveis do processo de oxidação envolvendo moléculas de lipídeos. Eles podem agir diminuindo a concentração de oxigênio; evitando a fase de iniciação da oxidação; quelando íons metálicos; decompondo produtos primários a compostos que não são radicais<sup>8</sup>.

Existem algumas lacunas com relação aos antioxidantes, tais como: a inexistência de recomendação para cada antioxidante; falta de padronização quanto ao real valor antioxidante dos alimentos; e possíveis efeitos tóxicos da administração de elevadas doses desses compostos<sup>5</sup>.

Os antioxidantes naturais incluem os tocoferóis, vitamina C, carotenóides e compostos fenólicos. Os compostos fenólicos existentes nas plantas atuam protegendo-as contra injúrias em seus tecidos, contra a ação de subprodutos provenientes da fotossíntese que podem causar danos e também contra plantas herbívoras. Muitos desses compostos têm similaridades quanto à estrutura molecular básica, em que todos possuem pelo menos um anel aromático com um grupo hidroxila ligado a ele, incluindo, principalmente, os ácidos fenólicos e flavonóides, que conferem defesa contra o ataque de radicais livres<sup>8</sup>.

#### 2.1.1 Vitamina C

O ácido ascórbico é considerado um dos mais potentes e o menos tóxicos dos antioxidantes naturais. É um sequestrador muito eficaz de radicais, tais como: o ânion superóxido, o radical hidroxila, o peróxido de hidrogênio e o oxigênio singlete. Em soluções aquosas, também combate eficientemente espécies reativas de nitrogênio, impedindo a nitrosação de moléculas<sup>9</sup>.

O ácido ascórbico também pode atuar como pró-oxidante. Na presença de metais com mais de um estado de valência, como o  $Fe^{2+}$  e o  $Cu^+$ , os radicais ascorbato e hidroxila podem ser gerados, iniciando o processo de peroxidação lipídica<sup>11</sup>.

Entre as principais fontes de vitamina C, estão os frutos cítricos, acerola, goiaba e kiwi, além de algumas hortaliças,

como brócolis, couve de Bruxelas, tomate e pimentão.

### 2.2 Carotenóides

São pigmentos naturais que possuem papel muito importante na fisiologia dos vegetais, conferindo-lhes cor e participando da fotossíntese, conjuntamente com a clorofila. Muitos dos carotenóides presentes nos vegetais apresentam atividades de pró-vitamina A e antioxidante<sup>10</sup>.

Os carotenóides podem capturar eficientemente radicais de oxigênio singlete e radicais peroxila. São os mais eficientes inativadores naturais do oxigênio singlete, atuando de duas formas diferentes: uma via física, que ocorre pela transferência de energia das moléculas de oxigênio singlete aos carotenóides; e uma via química, que constitui aproximadamente 0,5% do total da inativação do oxigênio singlete. Sequestram radicais peroxila por interação química. Os carotenóides possuem caráter lipofílico, atuando como antioxidante sobre as lipoproteínas LDL e HDL<sup>11</sup>.

### 2.3 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos compõem a grande classe dos fitoquímicos alimentares. Sua fórmula química contém pelo menos um anel aromático, ao qual está unida uma (ou mais) hidroxila(s). Existe grande variedade de compostos fenólicos, classificados em dois grupos, flavonóides e não flavonóides<sup>12</sup>. Estes compostos são considerados como os antioxidantes mais ativos nos vegetais, sendo encontrados com grande frequência<sup>13</sup>. No entanto, os estudos sobre os efeitos benéficos à saúde humana só foram intensificados a partir da década de 90<sup>14</sup>.

Em geral os compostos fenólicos são multifuncionais como antioxidantes, pois atuam de várias formas: combatendo os radicais livres através da doação de um átomo de hidrogênio de um grupo hidroxila (OH) da sua estrutura aromática, que possui a capacidade de suportar um elétron desemparelhado através do deslocamento deste ao redor de todo o sistema de elétrons da molécula; quelando metais de transição, como o  $Fe^{2+}$  e o  $Cu^+$ ; interrompendo a reação de propagação dos radicais livres na oxidação lipídica; modificando o potencial redox do meio; reparando a lesão a moléculas atacadas por radicais livres<sup>11-15</sup>.

Os compostos fenólicos se apresentam amplamente distribuídos entre as distintas partes das plantas, porém sua maior concentração está nas frutas, nas hortaliças e em seus derivados, tais como: azeite virgem de oliva, vinho tinto, chá, cerveja, entre outros. Também em cereais e leguminosas são encontrados em concentrações consideráveis. Os distintos alimentos de origem vegetal contêm diferentes tipos de compostos fenólicos, em concentrações variáveis<sup>16</sup>.

#### 2.3.1 Compostos fenólicos em frutas

Os compostos fenólicos são importantes constituintes de várias frutas e hortaliças, sendo que a quantificação dessas substâncias revela informações a respeito da atividade

antioxidante, qualidade do alimento e dos potenciais benefícios a saúde<sup>17</sup>.

Frutas e hortaliças, além de fornecerem componentes importantes para desempenharem funções básicas do organismo como, por exemplo, ácido ascórbico,  $\beta$ -caroteno e ácido fólico, são fontes de compostos bioativos diretamente associados à prevenção de doenças<sup>18</sup>.

As moléculas típicas de antioxidantes são derivadas das formas isoméricas dos polifenóis e flavonas, isoflavonas, flavonóis, catequinas, cumarinas, ácidos fenólicos e outras substâncias encontradas nos vegetais<sup>19</sup>.

A avaliação e determinação de polifenóis totais em frutas e hortaliças produzidas e consumidas no Brasil são essenciais para avaliar os alimentos-fonte de compostos bioativos e estimar sua ingestão pela população<sup>18</sup>.

A utilização do método de Folin Ciocalteu permite quantificar o teor de flavonóides, antocianinas e compostos fenólicos presentes nas amostras. Esse método foi descrito por Singleton e Rossi, em 1965<sup>20</sup>.

#### 2.4 Métodos utilizados na avaliação da atividade antioxidante

A determinação da atividade antioxidante dos alimentos, além de prever o potencial antioxidante do alimento antes de ser ingerido, é importante para avaliar a proteção contra a oxidação e a deterioração do alimento, reações que podem levar à diminuição da sua qualidade e do seu valor nutricional<sup>20</sup>.

Foram descritos numerosos métodos de mensuração da atividade antioxidante de substâncias e alimentos, mas todos eles têm em comum a presença de um agente oxidante, um substrato adequado e uma estratégia de medida do ponto final<sup>20</sup>.

Os métodos que determinam a atividade antioxidante de alimentos são classificados em dois grupos: o primeiro se baseia na captura de radicais livres; o segundo, na determinação da oxidação de uma molécula alvo<sup>20</sup>.

As metodologias para a determinação da capacidade antioxidante são numerosas e podem estar sujeitas a interferências, além de se basearem em fundamentos diversos. Dessa forma, levando-se em conta os pontos fortes, pontos fracos e aplicabilidade de cada tipo de ensaio<sup>3</sup>, atualmente preconiza-se a utilização de duas ou mais técnicas, já que nenhum ensaio usado isoladamente para determinar a capacidade antioxidante irá refletir exatamente a “capacidade antioxidante total” de uma amostra<sup>21</sup>.

#### 2.5 Determinação da captura de radicais livres

Nos últimos anos, desenvolveu-se a técnica analítica de espectrometria de ressonância de spin de elétrons (ESR). Como a vida média dessas espécies é muito baixa (entre  $10^{-9}$  segundos), não se consegue realizar a medida de forma direta, mas acoplando o radical livre a um composto nitroso capaz de com ele formar um aduto; esse complexo é estável e pode ser detectado por ESR<sup>22</sup>. Esse método ainda é pouco utilizado, em face do alto custo de instrumentação.

#### 2.6 Determinação da oxidação de moléculas

Desenvolveram-se diversos métodos para medir a atividade dos radicais livres sobre moléculas do organismo, como as proteínas, os ácidos nucleicos e os lipídeos<sup>23</sup>.

Nas técnicas de determinação *in vitro* da oxidação lipídica, os substratos lipídicos são diversos: ácido linoléico, ésteres metílicos dos ácidos graxos e a LDL. Outro substrato empregado são os lipossomos. A oxidação pode ser iniciada pela adição de íons metálicos ( $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ), de AAPH [2,2-azobis(aminopropano) diidrocloreto], de peróxido de hidrogênio, ou ainda pela aplicação de calor<sup>22</sup>.

A oxidação dos ácidos graxos insaturados leva à sua quebra, com consequente formação, dentre outros compostos, do malonaldeído (MDA), que pode ser determinado pelo método TBARS (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico), no qual se faz reagir o MDA com o ácido tiobarbitúrico para formar um pigmento rosado, que apresenta um máximo de absorção a 532-535 nm<sup>24</sup>.

#### 2.7 Método de co-oxidação do $\beta$ -caroteno/ácido linoléico

Esse tipo de avaliação da atividade antioxidante é realizada em meio emulsionado, pela técnica de co-oxidação de substratos. Foi descrita inicialmente por Lima<sup>20</sup> e modificada por Miller<sup>25</sup>. É um método colorimétrico, realizado em comprimento de onda de 470 nm, baseado na leitura referente à descoloração da solução preparada com  $\beta$ -caroteno e ácido linoléico, em meio aquoso. A descoloração ocorre em função das estruturas radiculares formadas pela oxidação do ácido linoléico, que atacam as duplas ligações do  $\beta$ -caroteno, perdendo seu cromóforo, resultando na descoloração do pigmento alaranjado, característico da solução. A presença de antioxidantes no sistema protege o ácido linoléico, prolongando o período de formação dos radicais<sup>26</sup>.

Trata-se de um ensaio espectrofotométrico baseado na oxidação (descoloração) do  $\beta$ -caroteno, induzida pelos produtos da degradação oxidativa do ácido linoléico<sup>27</sup>, ou seja, o método avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoléico<sup>4</sup>.

Normalmente se utiliza o antioxidante sintético butilhidroxitolueno (BHT) como padrão positivo para comparação dos resultados. Esse método tem sido utilizado para analisar várias matrizes alimentares, principalmente frutos e sementes ricas em lipídeos<sup>20</sup>.

Esta metodologia, apesar dos inconvenientes como interferência de substâncias oxidantes ou redutoras no ensaio é amplamente usada, pois uma vez que não necessita de elevadas temperaturas durante sua execução, permite a determinação do poder antioxidante em produtos termossensíveis<sup>5</sup>.

Este modelo na avaliação da capacidade antioxidante de extratos de canola, girassol e mostarda<sup>28</sup>, também foi empregado na avaliação da capacidade antioxidante dos extratos aquoso e etéreo do cotilédone da semente rajada de girassol, observando-se uma correlação positiva da atividade

antioxidante com os métodos ORAC, DPPH e FRAP<sup>29</sup>.

## 2.8 Método do radical ABTS

O radical ABTS $\bullet$ + é produzido a partir de um precursor, o ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfônico. O radical ABTS é um composto cromóforo quimicamente estável, apresenta alta solubilidade em água e um máximo de absorvância a 414 nm, e de medidas secundárias de absorvância a 645, 734 e 815 nm<sup>30</sup>.

O radical ABTS $\bullet$ + deve ser gerado por reações enzimáticas ou químicas, podendo ser solubilizado em meios orgânicos e aquosos nos quais a atividade antioxidante pode ser determinada, dependendo da natureza dos compostos antioxidantes<sup>31</sup>.

O método do ABTS (2,2-azino-bis(ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt) está baseado na habilidade dos antioxidantes em capturar o cátion ABTS $\bullet$ +. Esta captura provoca um decréscimo na absorvância, que é lida a partir da mistura do radical com o antioxidante em diferentes tempos, sendo representadas graficamente<sup>32</sup>.

Este método apresenta vantagem em relação a outros, pois pode ser utilizado tanto para amostras hidrossolúveis quanto lipossolúveis<sup>20</sup>. Tem sido utilizado em vários tipos de frutos como acerola, goiaba, camu-camu, açaí, maracujá, pitanga, entre outros.

O método ABTS $\bullet$ + apresenta excelente estabilidade, sendo um dos testes mais rápidos de atividade antioxidante e que oferece resultados reprodutíveis, além de oferecer vários máximos de absorção e uma boa solubilidade, permitindo análises de compostos tanto de natureza lipofílica como hidrofílica<sup>33</sup>.

Novos métodos de geração do radical ABTS foram desenvolvidos, como a partir da oxidação do sal por persulfato de potássio, cuja reação ocorre na ausência de luz, por um período 12 a 16 horas. A energia de ativação requerida é baixa e a reação começa imediatamente, mas não alcança um máximo de absorvância até o transcurso de 6 horas. O ABTS reage estequiometricamente a uma relação 1:0,5 com o persulfato de potássio<sup>34</sup>.

Esse método baseia-se na geração do ABTS $\bullet$ +, que apresenta cor azul esverdeado, por meio da reação do ABTS com persulfato de potássio que possui absorção máxima em 645, 734 e 815 nm. Com a adição de um antioxidante, ocorre a redução do ABTS $\bullet$ + a ABTS promovendo a perda da coloração do meio reacional. Com a perda de cor, a porcentagem de inibição do ABTS $\bullet$ + é determinada em função do Trolox, um padrão submetido às mesmas condições de análise do antioxidante. O método é aplicável ao estudo de antioxidantes hidrossolúveis e lipossolúveis, compostos puros e extratos vegetais.

## 2.9 Método do radical DPPH

O DPPH é um método químico, aplicado para determinar a capacidade antioxidante de um composto em sequestrar

radicais livres, sendo um dos mais utilizados, pois ele é considerado um método rápido, prático e com boa estabilidade.

O DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil) é um radical de nitrogênio orgânico, estável, de cor violeta, que possui absorção na faixa de 515-520 nm. A redução do radical DPPH é monitorada pelo decréscimo da absorvância durante a reação<sup>19</sup>.

O sequestro de radicais livres é um dos mecanismos reconhecidos pelo qual ocorre a ação dos antioxidantes. O método de sequestro do radical livre DPPH pode ser utilizado para avaliar a atividade antioxidante de compostos específicos ou de um extrato em curto período de tempo<sup>19</sup>.

O método DPPH tem sido muito utilizado para avaliar a capacidade antioxidante de frutas. O método apresenta vantagens quando os antioxidantes analisados são mais solúveis em solventes orgânicos, e por ser um radical livre estável está disponível comercialmente, o que evita sua geração por distintas formas (como ocorre com o método ABTS), além de facilitar seu uso<sup>20</sup>.

Na presença de um doador de hidrogênio ou elétron a intensidade de absorção diminui e a solução com o radical perde cor, tornando-se amarela, de acordo com o número de elétrons capturados, ou seja, quando o elétron desemparelhado do átomo de nitrogênio no DPPH recebe um átomo de hidrogênio proveniente de compostos antioxidantes, ocorre a mudança de cor<sup>19</sup>.

Analisando polpa congelada de acerola, Kuskoski *et al.*<sup>35</sup> obtiveram 959,1 mg/100g (VCEAC - atividade antioxidante equivalente em vitamina C) aos 30 minutos de reação, usando o método de sequestro do radical DPPH e atividade antioxidante de 1,33 mg/100g TEAC - atividade antioxidante equivalente ao Trolox), expressa em matéria fresca.

Foi observado que os frutos *in natura* de acerola tinham a maior capacidade de sequestro de radicais livres, em relação aos extratos de amora, açaí e morango. Os autores comentam que esta capacidade deve-se, em grande parte, ao alto teor de ácido ascórbico presente na fruta, comprovando a capacidade antioxidante do ácido ascórbico<sup>4</sup>.

## 2.10 Método ORAC (Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio)

O método consiste na medida do decréscimo da fluorescência das proteínas, como consequência da perda de sua conformidade ao sofrer dano oxidativo<sup>36</sup>. Utiliza como molécula alvo dos radicais livres de oxigênio as ficobiliproteínas  $\beta$ -ficoeritrinas ou R-ficoeritrina (PE), altamente fluorescentes, que contêm um pigmento vermelho fotorreceptor (34 grupos prostéticos tetrapirrólicos unidos covalentemente). Essas proteínas derivam de espécies de algas roxas e cianobactérias e possuem um peso molecular de 250.000 daltons<sup>36</sup>.

Os radicais peroxila diminuem a fluorescência da ficoeritrina e da fluoresceína. O antioxidante adicionado reage rapidamente com os radicais, doando átomos de hidrogênio e

inibindo a perda da intensidade da fluorescência. Essa inibição é proporcional à atividade antioxidante<sup>37</sup>.

O ensaio ORAC usando fluoresceína pode medir a atividade antioxidante dos componentes hidrofílicos e lipofílicos de uma amostra, usando  $\beta$ -ciclodextrina metilada, que aumenta a solubilidade em água dos compostos lipossolúveis, pois é uma molécula anfipática<sup>37</sup>.

O método ORAC possui uma vantagem muito importante com relação aos outros métodos de determinação da capacidade antioxidante que usam a absorvância, que é o uso da fluorescência como medida do dano oxidativo, pois, assim, ocorre menor interferência dos compostos coloridos presentes nas amostras. Isso é fator importante a se considerar quando se analisam alimentos que possuem cor (especialmente frutos e hortaliças), suplementos de produtos naturais e vinho tinto. Outra vantagem é o uso de radicais peroxila ou hidroxila como pró-oxidantes, conferindo maior significado biológico em relação aos métodos que usam oxidantes não,,necessariamente, pró-oxidantes fisiológicos<sup>20</sup>.

### 2.11 Método FRAP

O método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) também é utilizado para medir a capacidade antioxidante de frutos. Neste método, o complexo férrico-tripiridiltriazina ( $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TPZ) é reduzido ao complexo ferroso ( $\text{Fe}^{\text{II}}$ -TPZ), na presença de um antioxidante e em condições ácidas. O complexo formado por esta reação possui uma coloração azul intensa, com absorção máxima a 593 nm<sup>38</sup>.

### 2.12 Avaliação da atividade antioxidante em frutos

Comparando-se os métodos ABTS e ORAC para a determinação da atividade antioxidante de diferentes espécies frutíferas tropicais e cítricas do Estado do Ceará, Pereira<sup>39</sup> observou que dentre os frutos estudados, o que apresentou maior atividade antioxidante foi a goiaba 'Paluma', com média de 21  $\mu\text{M}$  Trolox/g de polpa. O mesmo fruto também apresentou maior atividade antioxidante total pelo método ORAC. A maior diferença entre os métodos utilizados foi para o pomelo, que apresentou a segunda maior atividade antioxidante pelo método ORAC e a oitava posição em ordem decrescente pelo ABTS. Estes resultados sugerem que o método ORAC apresentou-se mais sensível, sendo capaz de quantificar compostos não determinados pelo método ABTS.

A atividade antioxidante de polpas de frutas de grande consumo no mercado sul brasileiro (amora, uva, açaí, goiaba, morango, acerola, abacaxi, manga, graviola, cupuaçu e maracujá) foi determinada aplicando-se o método ABTS. Os valores de atividade antioxidante equivalente ao Trolox obtidos oscilaram entre valores mínimos e máximos de 2,0 e 67,6  $\mu\text{Mol TEAC g}^{-1}$  em peso fresco<sup>33</sup>.

Estudos com goiaba em diferentes estádios de maturação demonstraram que as goiabas "de vez" apresentaram atividade FRAP de 46,62  $\mu\text{M}$  sulfato ferroso/g de fruta, que foi reduzida para 35,00  $\mu\text{M}$  sulfato ferroso/g de fruta, nas maduras<sup>40</sup>.

Ao estudar os compostos bioativos e a capacidade antioxidante total de dezoito frutas tropicais não tradicionais brasileiras pelo método ABTS, Rufino<sup>41</sup> observou valores de atividade antioxidante, desde 6,3  $\mu\text{M}$  Trolox.g<sup>-1</sup> de polpa para o umbu, a 152,7  $\mu\text{M}$  Trolox. g<sup>-1</sup> de polpa para o camu-camu, demonstrando a grande variação existente para capacidade antioxidante entre as frutas. Frutos de acerola analisados pelos métodos DPPH, ABTS e FRAP, apresentaram atividade antioxidante total de  $670 \pm 64,5 \text{ EC}_{50}$  (g/g DPPH);  $96.6 \pm 6.1 \mu\text{mol trolox/g}$ ;  $148 \pm 16 \mu\text{mol Fe}_2\text{SO}_4 \cdot \text{g}^{-1}$ , respectivamente<sup>42</sup>.

Estudos avaliando a capacidade antioxidante de frutas pelo método DPPH, com resultados expressos em percentual de sequestro deste radical, obtiveram atividade antioxidante na seguinte ordem decrescente, goiaba > mamão 'Formosa' > laranja 'Pera' > abacaxi 'Pérola' > manga 'Rosa'<sup>72</sup>.

Avaliando-se diferentes frutas nativas, observou-se que a capacidade de sequestro do radical DPPH foi superior para o camu-camu, em relação aos frutos de cambuci, tucumã e uxi. Os frutos araçá e araçá-boi, que não se mostraram muito eficientes através dos outros métodos, apresentaram valores acima da média pelo método com  $\beta$ - caroteno. Os frutos camu-camu e maná-cubiu foram os que apresentaram maiores valores de capacidade antioxidante pelo método de ORAC. Através do teste de correlação, obteve-se um  $r = 0,93$ , podendo-se afirmar que houve correlação positiva entre a capacidade antioxidante determinada por meio do método de ORAC e os teores de fenólicos totais<sup>43</sup>.

Foi analisada a correlação de Pearson entre os compostos bioativos e a atividade antioxidante total pelo método ABTS de dezoito frutas tropicais, obtendo-se coeficientes de correlações positivas e significativas para o teor de vitamina C (0,70) e para o conteúdo de compostos fenólicos (0,92)<sup>41</sup>.

Quando avaliada a atividade antioxidante total pelo método DPPH, em frutos de dezenove clones comerciais de aceroleira, observou-se correlação positiva significativa a 1% de probabilidade entre a atividade antioxidante total, polifenóis (0,73) e vitamina C (0,78)<sup>5</sup>.

Estudos com variedades de goiabas cultivadas na Colômbia demonstraram correlação significativa entre os compostos fenólicos totais, o método FRAP e o método DPPH<sup>44</sup>. Os métodos utilizados para determinação da atividade antioxidante de frutos, quando aplicados isoladamente, podem não fornecer resultados seguros, devido principalmente à complexidade dos compostos com capacidade antioxidante presente nesses vegetais. A escolha desses métodos deve ser feita rigorosamente, de acordo com os tipos de antioxidantes a serem testados<sup>19</sup>.

## 3 Conclusão

Os métodos de análises de atividade antioxidante *in vitro* têm se tornado relevantes, uma vez que auxiliam na busca por substâncias bioativas, bem como na seleção de matéria-prima para estudo. A escolha do método é importante para comprovar a presença de compostos antioxidantes, que

previnem o ataque de radicais livres e doenças degenerativas. Cada método de análise possui particularidades, portanto testes preliminares devem ser realizados a fim de adequar o ensaio a ser adotado. Devido aos diversos tipos de radicais e aos diferentes sítios de ação, dificilmente haverá um único método capaz de representar de forma segura e precisa a verdadeira atividade antioxidante de uma substância.

## Referências

- Alves DE, Brito EA, Rufino MSM, Sampaio CG. Antioxidant activity measurement in tropical fruits: a case study with acerola. *Acta Horticulturae* 2008;773:299-305.
- Melo EA, Maciel MIS, Lima VLAG, Nascimento RJ. Capacidade antioxidante de frutas. *RBCF Rev Bras Ciênc Farm* 2008;44(2):193-201.
- Sanchez-Moreno C, Larrauri JA, Saura-Calixto F. A procedure to measure the antiradical efficiency of poly phenols. *J Sci Food Agric* 1998;76:270-6.
- Duarte-Almeida JM, Santos RJ, Genovese MI, Lajolo FM. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH•. *Ciênc Tecnol Aliment* 2006;26(2):446-52.
- Silva WS. Qualidade e atividade antioxidante em frutos de variedades de aceroleira. Dissertação [Mestrado em Tecnologia de Alimentos] - Universidade Federal do Ceará; 2008.
- Halliwel B, Aeschbach R, Loliger J, Arouma OI. The characterization of antioxidants. *Food Chem Toxicol* 1995;33(7):601-17.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004;79(5):727-47.
- Shahidi F. Natural antioxidants: an overview. In: Shahidi F. *Natural antioxidants: chemistry, health effects, and applications*. Newfoundland: Aocs; 1996. p.1-11.
- Weber P, Bendich A, Schalch W. Vitamin C and human health: a review of recent data relevant to human requirements. *Int Z Vitam* 1996;66:19-30.
- Rodríguez-Amaya DB, Kimura M. *Harvestplus handbook for Carotenoid analysis*. Washington: International Food Policy Research Institute; 2004.
- Podsedek A. Natural antioxidants capacity of brassica vegetables: a review. *J Food Compos Anal* 2007;40:1-11.
- Karakaya S. Bioavailability of phenolic compounds. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2004;44(6):453-64.
- Bianchi MLP, Antunes LMG. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev Nutr* 1999;12(2):123-30.
- Cerqueira FM, Medeiros MHG, Augusto O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. *Quim Nova* 2007;30(2):441-9.
- Kyngmi MS, Ebeler E. Flavonoid effects on DNA oxidation at low concentrations relevant to physiological levels. *Food Chem Toxicol* 2008;46:96-104.
- LIU F. Antioxidant activity of garlic acid from rose flowers in senescence accelerated mice. *Life Sci* 2005;77:230-40.
- Talcott ST, Percival SS, Pittet-Moore J, Celoria C. Phytochemical composition and antioxidant stability of fortified yellow passion fruit (*passiflora edulis*). *J Agric Food Chem* 2003;51:935-41.
- Faller Alk, Fialho E. Disponibilidade de polifenóis em frutas e hortaliças consumidas no Brasil. *Rev Saúde Pública* 2009;43(2):211-8
- Prado A. Composição fenólica e atividade antioxidante de frutas tropicais. Dissertação [Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos] - Universidade de São Paulo; 2009.
- Lima A. Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*, e identificação dos compostos fenólicos presentes no pequi (*caryocar brasiliense*, camb.). Tese. [Doutorado em Bromatologia] - Universidade de São Paulo; 2008.
- Prior RL, Cao G. *In vivo* total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radic Biol Med* 1999;27(11/12):1173-81.
- Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S, Roberts K. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst* 2002;127:183-98.
- Frei B. Efficacy antioxidants to prevent oxidative damage and inhibit disease. *J Nutr* 2004;134:3196-8.
- Sánchez-Moreno C. Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci Technol Int* 2002;8:121-37.
- Miller HE. Simplified method for evaluation of antioxidants. *J Am Chem Soc* 1971;48(2):91.
- Huang LH, Wang BG. Antioxidant capacity and lipophilic content of seaweeds collected from the Qingdao coastline. *J Agric Food Chem* 2004;58:4993-7.
- Silva FAM, Borges MFM, Ferreira MA. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. *Quim Nova* 1999;22(1):94-103.
- Matthaus B. Antioxidant activity of extracts of isolated from residues of oilseeds, such as rapeseed or sunflower. *Agr Food Ind Hi-Tech* 2002;13(4):22-5.
- Giada MLR. Avaliação da capacidade antioxidante dos compostos fenólicos do cotilédone da semente de girassol (*Helianthus Annuus* L) rajada. Tese. [Doutorado em Ciências Farmacêuticas] - Universidade de São Paulo; 2006.
- Miller NJ, Rice-Evans CA, Davies MJ, Gopinathann V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci* 1993;84(4):407-12.
- Arnao MB. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends Food Sci Tech* 2000;11(11):419-21.
- Pérez-Jiménez J, Saura-Calixto F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. *Food Res Int* 2006;39:791-800.
- Kuskoski EM, Asuero AG, Troncoso AM, Mancini Filho J, Fett R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante em pulpa de frutos. *Cien Tecnol Aliment* 2005;25(4):726-32.
- Henriquez C, Aliaga C, Lissi E. Formation and decay of the ABTS derived radical cation: A comparison of different preparation procedures. *Int J Chem Kin* 2002;34(12):659-65.
- Kuskoski EM, Asuero AG, Morales MT, Fett R. Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. *Ciênc Rural* 2006;36(4):1283-7.
- Prior RL, Cao G. *In vivo* total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radic Biol Med* 1999;27:1173-81
- Wu X, Beecher GR, Holden JM, Haytowitz DB, Gebhardt SE, Prior RL. Lipophilic and hidrofílic antioxidant capacities os common foods in the united states. *J Agric Food Chem* 2004;52(12):4026-37.
- Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma

- (Frap) as a measure of antioxidant power: the frap assay. *Anal Biochem* 1996;239:70-6.
39. Pereira ACS. Qualidade, compostos bioativos e atividade antioxidante total de frutas tropicais e cítricas produzidas no Ceará. Dissertação [Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos] - Universidade Federal do Ceará; 2009.
  40. Morgado CMA, Durigan JF, Santos LO. Avaliação da atividade antioxidante em frutos de goiaba “de vez” e maduros. Anais do 20º Congresso Brasileiro de Fruticultura 54th Annual Meeting of the Interamerican Society for Tropical Horticulture. Vitória-ES; 2008.
  41. Rufino MSM. Propriedades funcionais de frutas tropicais brasileiras não tradicionais. Tese [Doutorado em Fitotecnia] - Universidade Federal Rural do Semi-Árido; 2008.
  42. 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 Chem* 2010;121:996-1002.
  43. Gonçalves AESS. Avaliação da capacidade antioxidante de frutas e polpas de frutas nativas e determinação dos teores de flavonóides e vitamina C. Dissertação [Mestrado em Bromatologia] – Universidade de São Paulo; 2008.
  44. Rojas-Barquera D, Narváez-Cuenca CE. Determinación de vitamina C, compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante de frutas de guayaba cultivadas en Colombia. *Quím Nova* 2009;32(9):2336-40.

