

OTMI ZA ÇÃ MÉTODODO DE AVAIL ÇÃ ODATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE AMORA-PRETA (*Rubus spp.*)

ACUNHA, Tanize dos Santos²; COR A, ~~R~~ Ana Paula
Antunes¹; FIGUEIREDO, Lauren Costa²; ZAMBIAZI, Rui Carlos²

¹Universidade Federal de Pelotas - Departamento de Ciência e Tecnologia

²Universidade Federal de Pelotas, Centro de Ciências Químicas, Farmacológicas e de Alimentos. apacorrea@gmail.com / zambiasi@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, às vezes ocorre internacionalmente, as pequenas frutas tem crescido de maneira significativa e ali mantem-se quem sendo modificados, no qual buscamos os nutrientes básicos micronutrientes essenciais como vitaminas e minerais, relacionadas com a prevenção (HARBONE; WILLIAMS, 2000). Dentre essas pequenas frutas, a amora-preta (*Rubus spp.*) se destaca como uma das mais promissoras. De acordo com Antunes (2002) a produção de amora-preta é interessante principalmente pelo baixo custo de cultivo, pela facilidade de manejo, rusticidade e pouca utilização de defensivos agrícolas.

Os fitonutrientes encontrados em frutas e hortaliças apresentam efeito antioxidante, sendo as pequenas frutas, como o morango, a framboesa e a amora-preta, ricas nestes compostos. Entre os compostos com atividade antioxidante, a amora-preta contém elevado conteúdo de flavonoides (MOYER et al., 2002, SELLAPAN et al., 2002), e em quantidades inferiores vitaminas C, E e carotenóides (JACQUES; ZAMBIAZI, 2011).

Naliteratura há vários estudos em diferentes sistemas de solventes e período de tempo para a obtenção destes compostos (REYES-CARMONA et al., 2005; PANTELIDIS et al., 2007), bem como, de diferentes processos de separação. Alguns autores utilizam o passo da filtração com o uso de filtro de nylon ou com papel (REYES-CARMONA et al., 2005; SELLAPAN et al., 2002) e outros pela centrifugação (WANG, BOWMAN E DING, 2008), a qual requer menor quantidade de vidrarias.

No que se refere a avaliação da atividade antioxidante, uma grande variedade de métodos vem sendo utilizados variando basicamente no tipo de reativo, pH e comprimento de onda mensurado. O DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) é um dos mais comumente aplicado para avaliar o potencial antioxidante em sucos, vinhos e frutas (VIEIRA et al., 2002). Considerado um método rápido (RIBEIRO et al., 2002), o DPPH é baseado na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) por antioxidantes, produzindo uma diminuição da absorção a 515 nm (BRAND-WILLIAMS et al., 1995). Frente a outros métodos, o DPPH apresenta a vantagem de necessitar um menor tempo para

obtenção do radical livre que é possível através deste radical diretamente por dissolução orgânica em meio orgânico (RUFINO et al.).

Dessa forma, o presente estudo tem por objetivo a adaptação e otimização de uma metodologia de extração e quantificação de compostos antioxidantes encontrados em amora-preta.

2. METODOLOGIA

2.1. Material

Para realização deste trabalho foram utilizadas amoras-preta (*Rubus* spp.) da cultivar Tupy, cultivadas em uma propriedade particular em Pelotas, RS. As frutas foram colhidas de forma aleatória, não com finalidade comercial (colheita orgânica e armazenadas sob congeladas até o momento das análises.

2.2. Preparo da amostra

Para a extração dos compostos fenólicos, pesou-se 5g da amostra em frascos de polipropileno com volume de 50 mL e adicionou-se 20 mL de metanol. As amostras foram submetidas a diferentes tratamentos relacionados ao tempo de extração e modo de separação do extrato. A extração foi realizada a temperatura de 20-25°C sob agitação de 90 oscilações por hora em intervalos de tempos de cinco minutos, 3hs e 24hs. A separação do extrato foi realizada através de centrifugação (Excelsa Baby II, Fanem, modelo 206-R) a 5.000 rpm e 25°C. Para todos os tratamentos as extrações foram feitas em triplicata. Os extratos foram armazenados a -18°C até o momento da realização das análises.

2.3. Análise de atividade antioxidante através do radical difenil-1-picril-hidrazil) (DPPH)

A determinação foi feita de acordo com o método de Brand-Williams, Cuvelier, e Berset (1995). Aliquotas de 50 µL de extrato foram adicionadas a 3,9mL de solução DPPH e avolumados para 4,0mL com metanol. Determinou-se a atividade antioxidante total após espectrofotometria (Ultraspec 2000, Pharmacia Biotech, Cambridge, Inglaterra) no comprimento de onda de 517nm. A capacidade antioxidante foi calculada a partir do padrão de Trolox e expressa em mg de equivalente ao Trolox por 100g de amostra. Os resultados foram avaliados através da análise estatística ANOVA a 5%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verificou-se que não há diferença significativa entre os diferentes tempos de extração, concluiu-se que é possível realizar o processo de extração e de filtração para quantificação da atividade de amora-preta em apenas cinco minutos. Este resultado apresenta uma vantagem importante que possibilita que um maior número de amostras possa ser analisado em um período de tempo, o que torna o método mais eficiente.

Tabela 1- Atividade antioxidante de amora-preta em diferentes tempos de separação do extrato.

Tratamento	TEAC relativa-DPPH (mg.100g ⁻¹ TE)	RSD (%)
24hs ¹	175,32 a	5,07
3hs ¹	207,90 a	4,47
5 min. ¹	205,10 a	5,36
5 min. ²	176,66 a	4,27

¹ Separação do extrato por centrifugação. ² Separação do extrato por filtração em membrana. RSD=Desvio Padrão Relativo. Letras seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo Teste de Tukey (p ≤ 0,05).

De acordo com Liu et al. (2000) a polaridade do solvente utilizado para o processo de extração de compostos fenólicos afeta a atividade antioxidante e está relacionada com a eficiência do processo. Segundo Andreo e Jorge (2006) Apud Shaidi e Naczki (1995), não existem sistemas de extração com solventes que sejam satisfatórios para compostos antioxidantes, mas o metanol é o mais utilizado para extração de compostos fenólicos (Salas, 2005). A escolha do solvente a ser utilizado depende da natureza química dos antioxidantes e presença de sua interação com carboidratos e outros componentes (ANDREO; JORGE, 2006 Apud SHAIKI; NACZKI, 1995).

Em relação ao método de separação do extrato do resíduo sólido com o metanol não houve diferença significativa (Tabela 1). Isso evidencia que embora ocorram perdas de compostos durante a filtração, não são significativas a ponto de comprometer o resultado do estudo. Dessa forma, contribui para a viabilidade do método visto que é possível e barato, fazendo o uso somente de álcool comum que torna o método mais barato.

Em estudo realizado por Silva (2007) no qual foi avaliado a atividade antioxidante de diferentes cultivares de amora-preta, o cultivar Tupy apresentou valores de TEAC-DPPH igual a 246,5 mg.100g⁻¹, valor superior ao encontrado no presente trabalho. Essas diferenças podem ser devidas a diversos fatores relacionados a condições ambientais e climáticas de colheita, procedimento de colheita, ponto de maturação na exposição à luz, localização geográfica, densidade das condições de estocagem, colheita e tipo de processamento ao qual é submetido o fruto (SELLAPAN et al., 2002). Assim como, alguns fatores no processo de extração, como o pH que podem afetar o isolamento dos compostos antioxidantes (ANDREO e JORGE, 2006 Apud SHAIKI e NACZKI, 1995).

4 CONCLUSÃO

O tempo necessário para a extração dos compostos fenólicos com a atividade antioxidante de amora-preta em metanol é apenas cinco minutos. O processo de separação do extrato e do material sólido pode ser feito por centrifugação ou filtração com algodão sem comprometer o resultado final.

REFERÊNCIAS

- ANDREO D; JORGE N. Antioxidantes naturais e suas aplicações. **B. CEPPA**, Curitiba v. 24, p. 319-336, 2006.
- ANTUNES, L.E.C. Amora-preta: Nova opção de cultivo. **Ciência & Tecnologia**, v.32, p. 151-158, 2000.
- BRAND-WILLIAMS, W. CUVÉLIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm-Wess-Tecology**, v.28, p.25-30. 1995
- HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, p. 481-504, 2000
- JACQUES, A.C.; ZAMBIAZI, R. C. Review: Fitofarmacologia da Amora-preta (*Rubus* spp.). **Semina: Ciências da Saúde**, v.32, p. 245-260, 2011.
- LIU, F.F.; ANG, C.Y.W.; SPRINGER, D. Optimization of extraction conditions for active components in *Hypericum perforatum* Using Surface methodology. **Journal Agriculture Food Chemistry**. Washington, v.48, p. 3364-3371, 2000.
- MOYER, R.A. et al. Anthocyanins, phenolics, and Antioxidants capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v.50, p.519-525, 2002.
- PANTELIDIS, G. E.; et al. Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. **Food Chemistry**, v. 102, p. 777-783, 2007
- REYES-CARMONA, J.; YOUSEF, G. G.; MARÍAS, J. L. Antioxidant Capacity of Fruit Extracts of Blackberry (*Rubus* sp.) Produced in Different Climatic Regions. **Journal of food Science**, v. 70, p. 497-503, 2005.
- RUFINO, M.S.; et al. Determinação da Atividade Antioxidante Total em frutas pela Captura do radical Livre ABTS+. **Embrapa**, ISSN 1679 2007.
- SELLAPPAN, S. AKOH, C. C.; KREWER, G. Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Georgia-Grown Blueberries and Blackberries. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v.50, p. 2432-2438, 2002.
- SHI, J.; NAWAZ, H.; POHORLY, J.; MITTAL, G.; KAKUDA, I.; JIANG, Y. Extraction of polyphenolics from plant material for functional foods -engineering and technology. **Food Reviews International**, New York, v. 21, p. 139-166, 2005.
- SILVA, R. S. **Propriedades antioxidantes e correlação com fenóis totais em cultivares de amora-preta in vitro, in vivo e in vivo**. 2007. 58p. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas.
- VILLANOVA, D.; et al. Radical scavenging ability of polyphenols by a free radical. **Talanta**, v.50, p.250-256, 2006.
- WANG, S. Y., BOWMAN, L., DING, M. Methyl jasmonate enhances antioxidant activity and flavonoid content in blackberries (*Rubus* sp.) and promotes antiproliferation of human cancer cells. **Food Chemistry**, v.107, p. 1261-1269, 2008.