

DETERMINAÇÃO DE POLIFENÓIS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS DA AMAZÔNIA

Hellen Alexandre de OLIVEIRA¹

Ceci SALES-CAMPOS²

Maria de Jesus Coutinho VAREJÃO³

Cristiano Souza do NASCIMENTO³

¹Bolsista IC INPA-PIBIC/CNPq;

²Orientadora COTI /INPA; ³Colaborador COTI /INPA.

INTRODUÇÃO

Os resíduos sólidos são um dos assuntos de maior relevância na agenda ambiental da maioria dos países e seu descarte tem sido uma preocupação crescente. Com esse estudo, procurou-se oferecer uma opção de destino para uma parte desse resíduo, a biomassa, que é constituída de matéria orgânica que pode ser reaproveitada para diversos fins (Luczynski *et al.* 2011).

Substratos a base de resíduos agroindustriais vem sendo estudados pelo grupo de pesquisa CNPq “Produção de fungos comestíveis a partir de resíduos madeireiros e agroindustriais na Amazônia”. Um dos fungos bastante cultivado é o *Pleurotus ostreatus*, fungo com altíssimo valor econômico, além de ser de fácil cultivo (Beltran-Garcia *et al.* 1997; Rajarathnam *et al.* 1992; Sales-Campos 2008). Para tanto, estudos de caracterização química dos substratos implantados com os resíduos estudados se fazem necessários para uma maior seleção do fungo com melhor desempenho a se utilizar e conseqüentemente uma maior atividade antioxidante.

Os subprodutos agrícolas contêm uma variedade de espécies biologicamente ativas, ricas em polifenóis, que na maioria das vezes é descartada (Rice-Evans 2001). Muitos processos de oxidação indesejados, incluindo a deterioração de alimentos e uma variedade de doenças, envolvem radicais livres. Os polifenóis presentes nos subprodutos agroindustriais são produtos com potencial valor agregado, com aplicação como aditivos alimentícios naturais e agentes que previnem doenças (Schieber *et al.* 2001).

Estudos comprovam que a quantidade de polifenóis de um composto está diretamente relacionada a sua capacidade antioxidante. Esta por sua vez, pode ser determinada por diversos métodos. Estes métodos podem ser baseados na captura do radical peroxila ou hidroxila (método de desoxirribose), na captura do radical orgânico, entre outros.

A formação de radicais livres está associada ao metabolismo normal do organismo. Estudos indicam correlação entre esses radicais e doenças degenerativas como o câncer. A ingestão de antioxidantes exógenos de fontes como frutas e vegetais pode minimizar a ação dos radicais livres e, conseqüentemente, reduzir os riscos dessas doenças. Por isso, nos últimos anos, o aumento do consumo de fontes naturais de antioxidantes e os estudos desses compostos têm sido observados. No estudo realizado as maiores fontes desses compostos são semente de açaí e casca de rambutan.

Nos últimos anos, a suspeita dos efeitos tóxicos de alguns compostos sintéticos usados em alimentos fez crescer o interesse em produtos naturais. Algumas indústrias, como as produtoras de aditivos alimentares, farmacêuticas e cosméticas, têm investido em pesquisas de compostos bioativos extraídos e purificados de fontes naturais.

O método DPPH utilizado como metodologia padrão é baseado na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) por antioxidantes, onde este é um radical livre que pode ser obtido diretamente por dissolução do reagente em meio orgânico (Brand e Williams *et al.* 1995).

Assim, objetivou-se, quantificar os polifenóis totais de três resíduos agrofloretais de ocorrência na região amazônica, bem como determinar o potencial antioxidante desta matéria-prima.

MATERIAL E MÉTODOS

Resíduos agrofloretais de ocorrência no Amazonas foram obtidos no mercado local. Cerca de 2 a 2,5 Kg de resíduo foram utilizados para obtenção de extratos vegetais. Os resíduos estudados são: cascas dos frutos de abacaxi (*Ananas comosus*: Bromeliaceae), semente de açaí (*Euterpe oleracea*: Palmae), casca e semente de rambutã (*Nephelium sp.*: Sapindaceae).

O material foi encaminhado para o laboratório de Química da Madeira COTI/INPA, onde foi seco, moído, peneirado e armazenado em frasco de vidros para análises posteriores.

Determinação da umidade (ASTM 1982)

As amostras foram liofilizadas em liofilizador advantage plus (SP scientific 2.0), onde no processo, que dura em média 3 dias, as amostras passam pela fase de congelamento a -45°C , posteriormente a fase de condensação a vácuo a -50°C , e a água passa do estado sólido para gasoso por sublimação.

No processo para a determinação da umidade foi utilizada a seguinte fórmula:

$$U\% = (P_u - P_s) / P_s \times 100$$

Onde: P_u : massa úmida antes da liofilização

P_s : massa seca após a liofilização

Obtenção de extratos (adaptado de Larrauri et al. 1997)

Foi procedida a extração a frio utilizando 10 gramas de cada resíduo, em duas etapas: 1ª extração com metanol (50%) e a 2ª extração com acetona 70%. Cada fração ficou em repouso por 60 minutos à temperatura ambiente e após o tempo foi centrifugada (15.000 rpm/15 min.) em microcentrífuga spin lan (SL-5GR). Ao final, o sobrenadante de cada fração foi transferido para balão volumétrico e completado o volume para 100 mL com água destilada (Extrato metanol-acetona: ME-AC). Para determinação da concentração de extrato, colocou-se 1 ml de cada solução extrativa em placa de petri, em estufa a $90 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e pesou-se até peso constante. Onde a concentração foi calculada pela fórmula abaixo e depois suposta para 100 ml:

$$C = m/V$$

m: massa da placa em peso constante- massa da placa seca

V: volume adicionado de solução

Determinação dos polifenóis totais pelo método Folin ciocalteau (Procedimento operacional padrão- Embrapa)

Determinação da curva padrão

A partir da solução inicial de 100 mL de Ácido Gálico 50 ppm, utilizando diluições sucessivas, preparou-se as demais soluções variando de 0 a 40 ppm.

Em seguida acrescentou-se 1 mL do folin ciocalteau (1:3), 2 mL do carbonato de sódio 20% e 2 mL de água destilada (Obanda e Owor 1997). Homogeneizou-se a amostra e esta foi deixada em repouso à temperatura ambiente e protegido da luz. Após 30 minutos, as leituras foram feitas em espectrofotômetro a 700 nm, Este por sua vez foi zerado com água destilada.

Determinação dos Polifenóis Extraíveis Totais (PET)

Em tubos de ensaio, foi preparado no mínimo três repetições em triplicata, a partir do extrato obtido anteriormente. Em ambiente escuro, adicionou-se 1 mL do extrato, 1 mL do folin ciocalteau (1:3), 2 mL do carbonato de sódio (20%), 2 mL de água destilada e homogeneizou-se. As leituras, em espectrofotômetro a 700 nm, foram realizadas aos 30 minutos após a adição dos reagentes (Obanda e Owor 1997). O branco da leitura foi 1 mL de água destilada acrescentando todos os reagentes acima citados. O espectrofotômetro foi zerado com o branco.

A partir da absorbância, determinou-se a concentração das amostras. Em seguida, foi determinada a equação da reta. Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico / 100 g de fruta.

Determinação da atividade antioxidante pela captura do radical livre - DPPH (adaptado de Rufino et al. 2007)

Preparação da curva do DPPH

Uma solução de DPPH (60 μM) foi preparada e alíquotas de 10 a 60 μM foram lidas em espectrofotômetro a 515 nm. A partir dos dados obtidos, foi plotado um gráfico concentração de DPPH X absorbância onde se obteve a equação da reta.

Determinação da atividade antioxidante total (AAT)

A partir do extrato metanol-acetona (ME-AC), foram realizadas 3 diluições na proporção de 1:1, 1:2, e 1:3 de cada solução extrativa e reagidas com solução de DPPH (0,06 mM) em ambiente escuro. Procedeu-se as leituras UV ($\lambda = 515$ nm), onde foi acompanhada a redução da absorbância até sua estabilização (~ 30 min). Todas as leituras foram realizadas em triplicatas.

Ao final da leitura (estabilização da absorbância), dividiu-se o valor da absorbância inicial do controle $Y_i/2$ (Curva DPPH) e substituiu-se na equação obtida (Eq1), para encontrar o consumo em μM DPPH (x). A partir deste valor converte-se para g DPPH = μM DPPH / 1.000.000 * 394,3 (peso molecular do DPPH).

A partir das absorvâncias obtidas das diferentes diluições dos extratos, foi plotada a absorvância no eixo Y e diluição (mg/L) no eixo X determinando a segunda equação da reta (Eq. 2). Para calcular a AAT deve-se substituir a absorvância equivalente a 50 % da concentração do DPPH (item determinação da atividade antioxidante total) pelo y (Eq. 1) e encontrar o resultado que corresponde à amostra necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH (EC50).

Cálculo do EC50

$$y = ax + b \quad (\text{Eq. 2})$$

onde:

y = Absorvância inicial do controle / 2 (item determinação da atividade antioxidante total)

x = EC50 (mg/L).

A partir do resultado (mg/L) encontrado na equação 2, dividir por 1.000 para ter o valor em g e, em seguida, dividir pelo valor encontrado em g DPPH para obter o resultado final que é expresso em g fruta (porção comestível) / g DPPH.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os resíduos foram congelados e liofilizados para se realizar as análises, observando-se que as amostras das sementes de açaí e rambutan tiveram uma umidade menor em relação às outras, pois a dureza das sementes dificulta o processo de liofilização (Tabela 1).

Tabela 1. Valores dos parâmetros analisados visando atividade antioxidante.

Extratos	Umidade (%)	Rendimento do extrato (%)	Concentração de compostos fenólicos (g de ácido gálico/100g de fruto)	Concentração de compostos antioxidantes (mg de fruta/g de DPPH)
Cascas de abacaxi	80,82	19,71	0,0426	Não apresentou atividade
Sementes de açaí	9,32	5,75	2,35	2,38
Sementes de rambutan	22,3	7,45	0,6091	Não apresentou atividade
Casca de rambutan	77,38	14,45	2,56	4,31

Nas amostras de semente (açaí e rambutan), percebeu-se uma umidade mais baixa em relação às cascas, isso se deve ao fato de que as condições de liofilização são mais favoráveis para amostras em cascas, pois não é possível a utilização de sensores de controle do equipamento quando se analisa sementes.

Para sementes de açaí o teor de umidade encontrado foi de 9,32%. Este valor pode ser explicado pelo fato de que as sementes poderiam estar mais secas e a liofilização não é favorável à amostra, tendo em vista que ela apresentou umidade após a liofilização. Segundo Araújo *et al.* (1994), o valor encontrado para umidade de sementes liofilizadas foi de 33%, bem acima do encontrado no estudo, porém este valor pode variar em decorrência da área coletada, e das condições de liofilização.

Pode-se perceber que em relação ao extrato, as amostras de cascas de abacaxi obtiveram o maior rendimento, porém a menor concentração de compostos fenólicos e antioxidantes, isso é facilmente explicado pelo fato de que, na extração, os solventes orgânicos são capazes de extrair os mais diversos compostos como antocianinas, taninos, tocoferóis, lipídios, entre outros, e não necessariamente somente polifenóis.

Todos os extratos estudados apresentaram uma relação entre compostos fenólicos e atividade antioxidante, visto que os que apresentaram maior concentração de polifenóis foram os que tiveram maior atividade antioxidante.

Os extratos de casca de rambutan foram os que tiveram um maior teor de polifenóis e conseqüentemente maior atividade antioxidante, logo, segundo Arnao (2001) essa matéria prima pode ser utilizada no combate aos radicais livres e outros antioxidantes que estão relacionados ao processo de envelhecimento, nas doenças degenerativas como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais.

O metanol foi o solvente mais eficiente para a extração dos fenólicos. A atividade antioxidante total dos extratos dos resíduos estudados foi linearmente proporcional à concentração de fenólicos totais. Considerando-se a aplicação desses resíduos estes resultados podem ser úteis, viáveis considerando que possivelmente apresentam potenciais antioxidantes naturais.

Para uma análise em fungos comestíveis (que podem ser considerados antioxidantes naturais) os extratos de cascas de abacaxi e sementes de rambutan podem ser considerados os que teriam uma maior atividade fúngica, pelo fato de não apresentarem um alto teor de antioxidante tornando mais fácil a degradação desses substratos.

CONCLUSÃO

Os resultados reportados neste estudo indicam a forte correlação entre polifenóis e atividade antioxidante, onde o extrato aquoso das cascas de rambutan e também sementes de açaí mostram fortes propriedades antioxidantes, as quais podem ser principalmente atribuídas aos compostos fenólicos; e os extratos de cascas de abacaxi e semente de rambutan foram os que obtiveram menor teor de polifenóis e conseqüentemente, a atividade antioxidante se apresentou muito pequena e inviável de se detectar.

O estudo se mostrou de grande importância para o desenvolvimento de novas alternativas a saúde, para a análise da matéria – prima possivelmente utilizada em substratos para o cultivo de fungos comestíveis, evidenciando a relação de polifenóis e antioxidante, onde o substrato de cascas de rambutan são os mais fortes para se realizar estudos posteriores que relacione sua alta atividade, podendo ser aprofundado também no estudo de doenças.

REFERÊNCIAS

- Araújo, E.F.; Silva, R.F.; Araújo, R.F. 1994. Avaliação da qualidade de sementes de açaí armazenadas em diferentes embalagens e ambientes. *Revista Brasileira de Sementes*, 16(1): 76-79.
- Arnao, M.B. 2000. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends in Food Science & Technology*, 11: 419-421.
- Beltran -Garcia M.J.; Estarron-Espinosa, M.; Ogura, T. 1997. Volatile compounds secreted by oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus*) and their antibacterial activities. *J. Agric. Food Chem*, 45: 4049-4052.
- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science & Technology*, 28(1): 25-30.
- Cheyrier, V. 2005. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *Am. J. Clin. Nutr.*, 81: 223S-229S.
- Larrauri, J.A. 1997. Rupérez, p.; Saura-Calixto, F. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. *Journal Agriculture and Food Chemistry*, 45: 1390-1393.
- Luczynski, M.; Machado, L.C.G.T.; Padilha, J.; Rendeiro, G.; Macedo, E.N. 2011. Viabilidade econômica da utilização da semente de *Euterpe oleracea* Mart. (açaí) como recurso energético. *Biomassa & Energia*, 4(2): 149-162.
- Naczki, M.; Shahidi, F. 2006. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41: 1523-1542.
- ASTM. D2016-74. 1983. Annual book of ASTM Standards: Wood. Methods of test for moisture content of wood. American Society Testing and Materials, ASTM, EUA. 486 pp.
- ASTM -E871. 1982. Annual book of ASTM Standards: Wood. Standard Test Method for Moisture Analysis of Particulate Wood Fuels American Society Testing and Materials, ASTM, EUA. 216 pp.
- Obanda, M.; Owuor, P. O. 1997. Flavanol Composition and Caffeine Content of Green Leaf as Quality Potential Indicators of Kenyan Black Teas. *Journal of Science of food and Agriculture*, 74: 209-215.
- Rice-Evans, C.A. 2001. Flavonoid antioxidants. *Curr. Med. Chem.*, 8: 797-807.
- Rufino, M.S.M.; Alves, R.E.; Brito, E.S.; Morais, S.M.; Sampaio, C.G.; Pérez-Jiménez, J.; Saura-Calixto, F. 2007. Comunicado técnico - metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. Fortaleza: Embrapa, 4p.
- Sales-Campos, C. 2008. *Aproveitamento de resíduos madeireiros e da agroindústria regional para o cultivo de fungos comestíveis de ocorrência na região amazônica*. 2008. 183 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas, UFAM, Manaus.
- Schieber, A.; Stintzing, F.C.; Carle, R. 2001. By-products of plant food processing as a source of functional compounds: recent developments. *Trends Food Science Technology, Cambridge*, 12: 401-413.
- Soobrattee, M.A.; Neergheen, V.S.; Luximon-Ramma, A.; Aruoma, O.I.; Bahorun, T. 2005. Phenolics as potencial antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation Research*, 579: 200-213.