

Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* de compostos fenólicos de alimentos

The in vitro antioxidant activity of food phenolic compounds

ABSTRACT

GIADA, M.L.R.; MANCINI-FILHO, J. The *in vitro* antioxidant activity of food phenolic compounds. *Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.* = J. Brazilian Soc. Food Nutr., São Paulo, SP, v. 28, p. 91-107, dez. 2004.

In the last years epidemiological studies have suggested associations between the intake of polyphenol-rich foods and beverages and the prevention of several diseases. However, the wide diversity of polyphenolic compounds makes these natural antioxidants difficult to measure separately. This is why several methods have been developed to measure the in vitro antioxidant capacity from all antioxidants contained in biological samples, especially in complex matrixes such as wine and vegetables. These assays involve different mechanisms of the antioxidant defense system, from chelation of metallic ions to the measurement of oxidative damage protection to biomolecules. They can be divided into two groups: those that measure scavenging activity of free radicals and those that use lipids as substrate. Although there is a great multiplicity of methods, there are no approved, standardized methods. All of them present advantages and disadvantages. In this way, the in vitro phenolic compounds antioxidant activity can and need be evaluated by different tests to different mechanisms. Nonetheless, all of the assays based in different chemistry reactions offer a wide divergence of results. For this reason, more valid guidelines and assay protocols are needed to bring some order to the present situation in this important field.

Keywords: natural antioxidants; antioxidant capacity; analytical methods.

MARIA DE LOURDES REIS GIADA¹; JORGE MANCINI-FILHO¹

¹Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental/Faculdade de Ciências Farmacêuticas/ Universidade de São Paulo.

Endereço para correspondência:

Maria de Lourdes Reis Giada, Laboratório de Lípidos, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental – FCF/USP, Bl. 14, Av. Prof. Lineu Prestes, 580, São Paulo, SP, CEP 05508-900.
e-mail: mlgiada@usp.br; jmancini@usp.br

Agradecimentos:

À CAPES-PICDT pela concessão de bolsa de doutorado e ao CNPq pelo apoio financeiro ao projeto: Avaliação da Atividade Antioxidante Naturalmente Presente nos Alimentos.

RESUMEN

En los últimos años ciertas investigaciones han señalado que el consumo de vegetales o bebidas ricas en polifenoles puede reducir el riesgo de apareamiento de varias enfermedades. Sin embargo, la gran diversidad química existente hace con que estos compuestos con actividad antioxidante sean difíciles de separar y de cuantificar individualmente, lo que resultó en el desenvolvimiento de varios ensayos para la evaluación de la actividad antioxidante de distintas muestras biológicas in vitro, particularmente en matrices complejas como vinos y vegetales. Son ensayos que comprenden distintos mecanismos del sistema de defensa antioxidante y que van desde la quelación de iones metálicos hasta la medida del daño oxidante en biomoléculas. Se pueden dividir estos ensayos en dos grandes grupos: los basados en el rescate de radicales libres y los que usan lípidos como sustrato. Sin embargo, en la actualidad no existen métodos aprobados o estandarizados. Todos presentan ventajas y desventajas. De este modo la actividad antioxidante de compuestos fenólicos in vitro puede y debe ser evaluada con métodos diferentes para mecanismos diferentes. Asimismo, todos estos ensayos basados en reacciones químicas diferentes ofrecen resultados numéricos también diferentes y difíciles de comparar. Así, metodologías más específicas y protocolos de ensayo con más validez respecto a sustratos, condiciones de análisis, concentraciones y cálculos, son imprescindibles para ofrecer cierto orden a la situación actualmente existente en este importante campo de estudio.

Palabras clave: antioxidantes naturales; capacidad antioxidante; métodos analíticos.

RESUMO

Nos últimos anos pesquisas mostraram que o consumo de alimentos ricos em polifenóis pode reduzir o risco do desenvolvimento de várias doenças. Entretanto, a grande diversidade química existente torna estes compostos com atividade antioxidante difíceis de separar, bem como quantificar individualmente, o que levou ao aparecimento de vários ensaios para avaliação da atividade antioxidante em diferentes tipos de amostras biológicas in vitro, particularmente em matrizes complexas como vinhos e vegetais. São ensaios que envolvem diferentes mecanismos do sistema de defesa antioxidante, desde a quelação de íons metálicos até a medida da prevenção do dano oxidativo a biomoléculas. Estes ensaios podem ser divididos em dois grandes grupos: os baseados na varredura de radicais livres e os que empregam lípidos como sustrato. Contudo, não existem hoje métodos aprovados ou padronizados. Todos apresentam vantagens e desvantagens. Desta forma, a atividade antioxidante in vitro de compostos fenólicos pode e deve ser avaliada com diferentes testes para diferentes mecanismos. Todavia, todos estes ensaios baseados em reações químicas diferenciadas oferecem resultados numéricos distintos e difíceis de comparar. Assim, metodologias mais específicas e protocolos de ensaio mais válidos quanto a sustratos, condições de análise, concentrações e cálculos, tornam-se necessários para se trazer alguma ordem à situação atualmente existente neste importante campo de estudo.

Palavras-chave: antioxidantes naturais; capacidade antioxidante; métodos analíticos.

INTRODUÇÃO

Os compostos fenólicos contribuem para as propriedades sensoriais (cor, aroma, adstringência) de frutas e outros vegetais. Por outro lado, possuem efeitos indesejáveis em sistemas alimentares como, por exemplo, a formação de complexos fortes com as proteínas dos alimentos e da saliva bem como com enzimas digestivas (SÁNCHEZ-MORENO, 2002a; SOARES, 2002).

Contudo, várias plantas têm sido estudadas como fontes de antioxidantes naturais potencialmente seguros em substituição aos artificiais, assim como de mais baixo custo de obtenção e alta eficiência em relação aos antioxidantes naturais que vêm sendo empregados na indústria de alimentos (ácido ascórbico, tocoferóis). Dos vários compostos que têm sido isolados, uma ampla faixa de polifenóis de plantas, apresentando propriedades antioxidantes tem sido estudada, e proposta para proteção contra oxidação lipídica (MOURE *et al.*, 2001).

Adicionalmente, nos últimos anos pesquisas mostraram que o consumo de vegetais e bebidas ricos em polifenóis pode reduzir o risco do desenvolvimento de várias doenças (DUTHIE *et al.*, 2000; SÁNCHEZ-MORENO, 2002b). Assim, vários estudos têm também analisado o potencial antioxidante de uma grande variedade de alimentos vegetais (semente de cacau, feijões, condimentos, frutas). Entre as bebidas, destacam-se o vinho tinto, o chá preto e o verde. Sementes como tamarindo, canola, sésamo, linhaça e girassol são outras fontes de antioxidantes naturais (DUTHIE *et al.*, 2000; MOURE *et al.*, 2001; SCALBERT e WILLIAMSON, 2000).

A Figura 1 mostra as estruturas químicas de alguns dos principais compostos fenólicos comumente encontrados em alimentos.

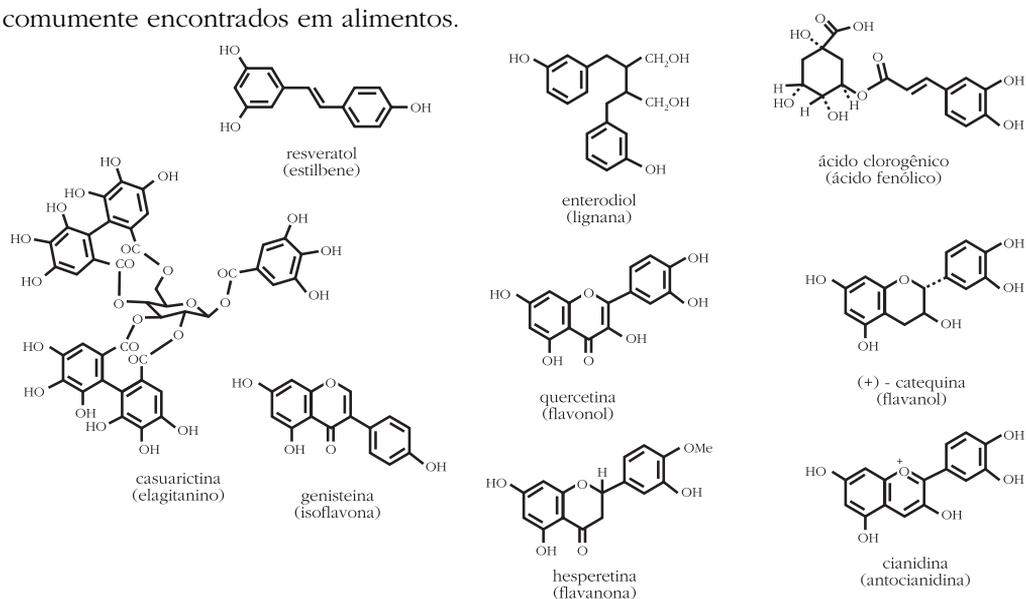


Figura 1 Estruturas químicas de polifenóis comumente encontrados em alimentos

Todavia, para melhor compreender a capacidade fisiológica dos compostos fenólicos, deve-se considerar que *in vitro* a capacidade antioxidante dos mesmos, varia não somente em função da estrutura química destas substâncias, mas também do tipo e polaridade do solvente empregado em sua extração, dos procedimentos de isolamento e da pureza dos compostos estudados, do substrato a ser protegido pelos antioxidantes, bem como se o ensaio será desenvolvido em sistema aquoso ou lipídico. Alguns estudos têm sugerido que o fator determinante da atividade antioxidante é a natureza lipofílica das moléculas e a afinidade do antioxidante por lípidos (MOURE *et al.*, 2001).

Quanto à solubilidade, os antioxidantes podem ser classificados em dois grupos: antioxidantes hidrofílicos, tais como vitamina C e a maioria dos compostos fenólicos, e antioxidantes lipofílicos, principalmente vitamina E e carotenóides (HUANG *et al.*, 2002).

Os compostos fenólicos, devido a grande diversidade química existente, tornam-se difíceis de separar, bem como quantificar individualmente em matrizes biológicas (PRIOR e CAO, 2000). Desta forma, vários ensaios *in vitro* têm sido desenvolvidos para avaliar a capacidade antioxidante total de diferentes amostras biológicas, particularmente em matrizes complexas tais como plasma, soro, vinhos, frutas e outros vegetais, bem como tecidos animais (MILLER e RICE-EVANS, 1997). São ensaios que envolvem diferentes mecanismos do sistema de defesa antioxidante, desde a decomposição de peróxidos, avaliação da varredura de radicais (MOURE *et al.*, 2001) ou quelação de íons metálicos (PULIDO *et al.*, 2000), até a medida da prevenção do dano oxidativo a biomoléculas, tais como proteínas ou DNA (MOURE *et al.*, 2001).

Embora exista uma grande diversidade de métodos, não existem métodos aprovados ou padronizados (FRANKEL e MEYER, 2000). Esta grande diversidade de métodos empregados proporciona resultados numéricos distintos, difíceis de comparar (MARTÍNEZ-VALVERDE *et al.*, 2000). Em estudos com compostos modelos, dramáticas diferenças no potencial antioxidante de compostos fenólicos foram observadas, podendo um composto modelo mostrar-se fortemente antioxidante em um método, enquanto em outro apresentar características pró-oxidantes (FRANKEL e MEYER, 2000). Contudo, os compostos fenólicos de ocorrência natural, diferentemente dos antioxidantes sintéticos BHA e BHT, mostraram atividade pró-oxidante a baixas concentrações quando avaliados por alguns métodos (ANTOLOVICH *et al.*, 2002). Por outro lado, um fenômeno conhecido como “paradoxo polar” também tem sido repetidamente relatado: antioxidantes hidrofílicos são mais efetivos do que antioxidantes lipofílicos em volumes elevados de óleo, enquanto antioxidantes lipofílicos apresentam maior atividade em emulsões (MOURE *et al.*, 2001). Adicionalmente, o conhecimento ainda é limitado de como a partição e a efetividade antioxidante de compostos fenólicos naturais são governados pela estrutura química dos mesmos em sistemas heterofásicos (FRANKEL e MEYER, 2000).

PRINCIPAIS MÉTODOS *in vitro* PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

MÉTODOS BASEADOS NA VARREDURA DE RADICAIS LIVRES

A maioria dos métodos para avaliação da atividade antioxidante *in vitro* de compostos fenólicos é baseada na capacidade destes em varrer radicais livres do meio pela rápida doação de um átomo de hidrogênio para estes radicais (PRIOR e CAO, 2000). Para se medir esta capacidade, testes com diferentes radicais têm sido desenvolvidos tais como os radicais superóxido, hidroxil, óxido nítrico, peroxil, cátion do 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolona-6-sulfonato) e 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (MOURE *et al.*, 2001).

Estes ensaios têm sido divididos em dois grupos: ensaios de inibição, onde a extensão da varredura de um radical livre pré-formado, pela doação de H- ou elétron, é comparada com a de um composto antioxidante padrão (geralmente o ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico ou TROLOX, um análogo hidrossolúvel da vitamina E ou α -tocoferol) e usada como indicador da atividade antioxidante e vários outros ensaios, envolvendo a presença de um sistema antioxidante durante a geração do radical (RE *et al.*, 1999).

Portanto, cada um destes ensaios envolve a geração de um radical diferente, agindo através de uma variedade de mecanismos, bem como a medida de uma gama de produtos finais, em tempo fixo ou sobre um intervalo de tempo (RE *et al.*, 1999).

Entre estes ensaios, os descritos na Tabela 2 são os mais representativos.

ENSAIO DO PODER ANTIOXIDANTE EM REDUÇÃO FÉRRICA - FRAP

Inicialmente designado para determinar a atividade antioxidante do plasma e, posteriormente aplicado a outros substratos tais como alimentos, o ensaio FRAP, ou Ensaio da Habilidade do Plasma em Redução Férrica, foi renomeado para Ensaio do Poder Antioxidante em Redução Férrica (PULIDO *et al.*, 2000). Este ensaio, baseia-se na medida direta da habilidade dos antioxidantes (redutores) da amostra em reduzir, em condições de baixo pH, o complexo Fe^{+3} /tripiridiltriazina (TPTZ), presente em excesso estequiométrico, para a forma ferrosa Fe^{+2} , de intensa cor azul e absorção máxima a 593nm (OU *et al.*, 2002).

Os valores do ensaio FRAP são obtidos monitorando a referida redução a 593nm, lida contra um reagente branco a um pré-determinado intervalo de tempo depois da mistura reagente/amostra, e comparada com àquela contendo íons ferrosos em concentração conhecida (BENZIE e STRAIN, 1996).

O ensaio FRAP é econômico, os reagentes são simples de preparar, os resultados são altamente reproduzíveis e o procedimento é direto e rápido (BENZIE e STRAIN, 1999). A principal desvantagem deste método é de que a capacidade redutora medida, pode

Tabela 2 Principais métodos baseados na varredura de radicais livres

Métodos	Radical Livre Empregado	Sistema Solvente	Condições/ Indutores da Reação	Medição/ Quantificação
FRAP	Fe ⁺³ / TPTZ	Aquoso	pH 3,6 , 37°C, 4 min. ou temperatura ambiente, 6 a 8min.	Δ 593nm, quantidade de Fe ⁺³ reduzida
Descoloração do ABTS ⁺	ABTS ⁺	Etanol	30°C, ABTS e persulfato de potássio, 6min.	Δ 734nm, % inibição do radical ABTS ⁺
ORAC	ROO [·]	Tampão fosfato pH 7,0	37°C, AAPH, 30min., β ou R-PE pH 7,0 ou fluoresceína pH 7,4	Emissão 565nm - Excitação 540nm, AUC da fluorescência da PE
DPPH [·]	DPPH [·]	Metanol	20min – 6h	Δ 515nm, Descoloração do radical DPPH [·]
Metasulfato-NADH fenazina	Superóxido ₂ ^{-d}	Tampão fosfato pH 7,4	25°C, Fenazina metasulfato-NADH, NBT	Δ 560nm, Redução do NBT, % inibição
Xantina-xantina-oxidase	O ₂ ⁻	Tampão fosfato pH 7,5	25°C, xantina, 30min.	Δ 290nm, % inibição da atividade da enzima

não refletir necessariamente a atividade antioxidante. Uma vez que o método não inclui um substrato oxidável, nenhuma informação é fornecida sobre as propriedades protetoras dos antioxidantes (FRANKEL e MEYER, 2000). Em adição, o ensaio não mede os antioxidantes contendo grupos –SH (PRIOR e CAO, 2000).

Outro método colorimétrico que aparece com grande frequência na bibliografia científica para avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos é o ensaio de descoloração do radical 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato).

ENSAIO DE DESCOLORAÇÃO DO RADICAL 2,2'-AZINOBIS-(3-ETILBENZOTIAZOLINA-6-SULFONATO) - ABTS⁺

No ensaio de descoloração do ABTS⁺, o radical monocátion cromóforo verde/azul ABTS⁺, pré-formado a partir do 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato), é gerado pela oxidação do ABTS com persulfato de potássio e reduzido na presença de antioxidantes

doadores de hidrogênio. A adição do antioxidante ao radical cátion pré-formado o reduz novamente a ABTS, em uma extensão e escala de tempo, dependendo da atividade e concentração do antioxidante, bem como da duração da reação. Assim, a extensão da descoloração, como % de inibição do radical ABTS⁺, é determinada em função da concentração e do tempo e calculada em relação à atividade do TROLOX como padrão, sob as mesmas condições (RE *et al.*, 1999).

Contudo, este ensaio inicialmente chamado de Capacidade Antioxidante em Equivalente TROLOX (TEAC), foi primariamente desenvolvido em tampão aquoso sendo indicado para avaliação da capacidade antioxidante de compostos hidrossolúveis (MILLER e RICE-EVANS, 1997). Como os alimentos, geralmente, contêm em sua composição tanto compostos hidrossolúveis quanto lipossolúveis com capacidade antioxidante, a possibilidade de aplicação deste método para a avaliação da capacidade antioxidante total de misturas é interessante. Desta forma, VAN DEN BERG *et al.* (1999) estudaram a modificação do ensaio TEAC original visando o aprimoramento do mesmo para a avaliação de compostos lipossolúveis. Estes autores estudaram a solubilização de compostos lipossolúveis empregando diferentes solventes orgânicos compatíveis com a água e a pré-geração do radical ABTS com o composto azo termolábel 2,2'-azobis-(2-amidinopropano) HCl, o que previne tanto a interferência de compostos que afetariam a formação do radical como que a medida da capacidade antioxidante seja superestimada.

Apesar dos recentes melhoramentos e uso crescente, o ensaio ABTS tem várias limitações. A habilidade de um antioxidante para varrer o radical ABTS⁺ pode não refletir a atividade antioxidante do mesmo, devido a outros mecanismos ativos nos alimentos ou substratos fisiologicamente relevantes, incluindo quelação de metais e os efeitos do antioxidante entre as fases de diferentes polaridades (FRANKEL e MEYER, 2000).

Por outro lado, uma aproximação mais biológica quanto à capacidade antioxidante dos compostos estudados envolve a geração de radicais livres de significado fisiológico, tais como o radical peróxido (ROO[·]). O ensaio mais comum a este respeito é o da Capacidade de Absorbância do Radical Oxigênio (ORAC) (HOLLMAN, 2001).

ENSAIO DA CAPACIDADE DE ABSORBÂNCIA DO RADICAL OXIGÊNIO (ORAC)

Originalmente, o ensaio ORAC baseia-se na detecção do dano químico às β ou R-Picoeritrinas (β ou R-PE), proteínas que funcionam como componentes armazenadores de luz em cianobactérias e algas vermelhas. A fluorescência produzida por estas proteínas é maior que 0,9 e constitui a base da medida sensível da integridade física e química das mesmas (HUANG *et al.*, 2002). Sob as condições do ensaio, a perda da fluorescência da PE, na presença de radicais livres, é tomada como índice de dano oxidativo à proteína. A inibição da ação do radical livre pelo antioxidante, o que reflete na proteção contra a perda de fluorescência da PE, é a medida da sua capacidade antioxidante contra radicais livres. Além do uso da β ou R-PE, como indicador sensível ao ataque do radical

livre, e do TROLOX como padrão, o ensaio original emprega a 2,2'-azobis (2-amidinopropano) diidroclorido ou AAPH, a 37°C, como sistema gerador de radical livre ROO· e a técnica da área sob a curva (AUC) ou curva decrescente de fluorescência da amostra comparada com o branco, para a quantificação da capacidade antioxidante (PRIOR e CAO, 2000).

Com a medida da fluorescência da PE, como aplicada no ensaio ORAC, existe muito menos interferência de compostos coloridos comparado com as medidas de absorbância usadas em outros métodos similares. Por outro lado, devido à razão molar muito alta (>2.000) do AAPH para o antioxidante usado neste procedimento, o ensaio ORAC tem elevada especificidade e mede a capacidade de um antioxidante em remover diretamente os radicais livres. A técnica AUC combina a percentagem de inibição e a extensão do tempo de inibição da ação do radical livre pelo antioxidante em uma única quantidade, o que a faz superior aos outros métodos similares que usam percentagem de inibição em um tempo fixo ou a extensão do tempo de inibição a uma percentagem de inibição fixa. O radical ROO· é o mais comum em sistemas biológicos, dando aos resultados do ensaio ORAC relevância para sistemas biológicos. O ensaio possui também a vantagem adicional de permitir o uso de outras fontes oxidantes, tais como radicais OH· e metais de transição como o Cu⁺⁺ (PRIOR e CAO, 2000).

Todavia, o uso da PE como prova de fluorescência tem suas limitações. A principal desvantagem é que se assume que o mecanismo oxidativo e o de proteção da fluorescência da PE correspondem aos de substratos biológicos críticos (FRANKEL e MEYER, 2000).

Devido a estes problemas um aprimoramento do ensaio ORAC foi desenvolvido e validado usando a fluoresceína ou FL (3',6'-diidroxi-*spiro*[isobenzofurano-1[3H], 9'[9h]-xanteno]-3- μ m) 48nM, em tampão fosfato 75mM, pH 7,4, pré-incubada a 37°C por 15 minutos, como prova de fluorescência (OU *et al.*, 2001).

Entretanto, a aplicação do ensaio ORAC continuava limitada a antioxidantes hidrofílicos, devido ao ambiente aquoso dos mesmos. Visando a expansão do corrente ensaio ORAC/FL para antioxidantes lipofílicos, a β -ciclodextrina aleatoriamente metilada ou CDAM (oligossacarídeos cíclicos (α -1,4) ligados da α -D-glucopiranosose) foi introduzida para melhorar a solubilidade dos antioxidantes lipofílicos em água (HUANG *et al.*, 2002).

Outros métodos baseados na varredura de radicais livres têm sido relatados. Porém, os que utilizam a reação com o DPPH·, o sistema metassulfato-NADH fenazina e o sistema xantina-xantina-oxidase têm recebido maior atenção (SÁNCHEZ-MORENO *et al.*, 1998).

ENSAIO RADICAL 2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZIL (DPPH·)

O ensaio DPPH· baseia-se na varredura do radical estável DPPH· do meio pelos antioxidantes (PULIDO *et al.*, 2000). O radical DPPH· foi um dos mais antigos radicais sintéticos usados para se estudar os efeitos estruturais na atividade de antioxidantes

fenólicos. Este radical comercialmente disponível serve como radical oxidável a ser reduzido pelo antioxidante (AH), bem como indicador para a reação $\text{DPPH} \cdot + \text{AH} \rightarrow \text{DPPH-H} + \text{A} \cdot$ (FRANKEL e MEYER, 2000).

O grau de descoloração do radical DPPH, a 515nm, pela ação dos antioxidantes é medido espectrofotometricamente em uma solução metanólica até a absorbância permanecer constante e indica a eficiência de varredura do antioxidante adicionado (SÁNCHEZ-MORENO *et al.*, 1998).

Um índice antioxidante foi proposto como parâmetro para se determinar a “eficiência antiradical” (EA), baseado na quantidade de antioxidante requerida para um decréscimo de 50% (EC_{50}) na concentração inicial do radical DPPH e o tempo necessário para se atingir o estado constante ($\text{T}_{\text{EC}_{50}}$) na concentração de radical DPPH ($\text{EA} = 1/\text{EC}_{50} \times \text{T}_{\text{EC}_{50}}$) (SÁNCHEZ-MORENO *et al.*, 1998).

Contudo, este ensaio é limitado porque o radical DPPH interage com outros radicais (alquil) e a curva resposta/tempo para atingir o estado constante não é linear com diferentes proporções de antioxidante/DPPH (FRANKEL e MEYER, 2000).

ENSAIO METASULFATO-NADH FENAZINA

No ensaio metasulfato-NADH fenazina, os ânions superóxidos são estimados pela medida espectrofotométrica do produto da redução do tetrazolium nitro azul (NBT). Os ânions podem ser gerados em um sistema enzimático (xantina-xantina-oxidase) e não enzimático (metasulfato-NADH fenazina). O sistema enzimático constitui-se de uma solução de 100 μM de xantina, 600 μM de NTB em tampão fosfato 0,1M (pH 7,4) e 0,07 unidades/ml de xantina oxidase. Esta mistura é incubada a 25°C, por 10 minutos, e lida a 560nm contra brancos os quais não contém a enzima. A geração não enzimática de ânions superóxidos é medida nas amostras, as quais contém metasulfato fenazina 10 μM , NADH 78 μM e NBT 25 μM em tampão fosfato 0,1M (pH 7,4). Depois de 2 minutos de incubação à temperatura ambiente a cor é lida a 560nm contra os brancos. Os valores IC_{50} para inibição da geração de ânions superóxido pelos compostos investigados foram calculados (ROBAK e GRYGLEWSKI, 1988).

ENSAIO DA ATIVIDADE DA XANTINA-OXIDASE

A xantina oxidase (EC 1.2.3.2) é uma enzima que gera radicais ânions O_2^- . Embora o radical superóxido não seja capaz de iniciar diretamente a oxidação lipídica, na presença de íons metálicos gera o radical $\text{OH} \cdot$ altamente reativo pela reação de Fenton (FRANKEL e MEYER, 2000).

A avaliação da atividade antiradical de um composto pelo ensaio da xantina oxidase baseia-se na inibição da atividade desta enzima pelo composto estudado (NORO *et al.*, 1983).

A maior função da xantina oxidase é oxidar a hipoxantina e xantina a ácido úrico (HAYASHI *et al.*, 1988), o que resulta em uma expressiva elevação na absorvância a 290nm. Esta elevação na absorvância é medida após o término da reação, em 30 minutos, pela adição de HCl 1 N à mistura ensaiada, conforme descrito por NORO *et al.* (1983), os quais modificaram o método original relatado por KALCKAR (1947).

A principal crítica a este método é que o uso da medida dos efeitos inibitórios sobre a xantina oxidase como índice da atividade antiradical não é um bom parâmetro, uma vez que a varredura de O_2^- não é o único mecanismo para inibição da oxidação lipídica, tanto em alimentos quanto em sistemas biológicos (FRANKEL e MEYER, 2000).

No que se refere ao segundo grupo de metodologias, as usadas para a avaliação do grau de eficácia de sistemas antioxidantes são as mesmas que se utilizam para a determinação da estabilidade oxidativa de sistemas lipídicos (SILVA *et al.*, 1999), conforme descrito a seguir.

MÉTODOS QUE EMPREGAM LÍPIDES COMO SUBSTRATO

Neste grupo de metodologias, a grande diversidade de métodos analíticos (químicos, físicos e/ou físico-químicos) propostos também coloca algumas dificuldades de seleção do método mais adequado para um determinado estudo de avaliação da capacidade antioxidante. Da mesma forma, a diversidade das condições de ensaio (substratos lipídicos, concentrações, tempo de oxidação, temperaturas, oxigenação), e dos sistemas modelos usados tem gerado algumas dificuldades no que diz respeito à interpretação e comparação dos resultados obtidos através destas metodologias (SILVA *et al.*, 1999).

Dentre estes métodos, os descritos na Tabela 3 são os mais usados ou foram alvo de maior atenção na última década.

SISTEMA ÁCIDO LINOLÉICO / β -CAROTENO

O sistema modelo ácido linoléico e β -caroteno para determinação da atividade antioxidante de extratos de alimentos foi primeiramente empregado por MARCO (1968) e modificado por MILLER (1971). Neste método, os produtos da degradação do ácido linoléico pela oxidação, devida a diferentes indutores (oxigênio, luz, calor), são medidos indiretamente pela taxa de destruição oxidativa do β -caroteno, determinada espectrofotometricamente a 450-470nm (ANTOLOVICH *et al.*, 2002). A queda na leitura da densidade ótica das amostras é correlacionada com o controle (sem antioxidante), considerado como 100% de oxidação, e estabelecida a percentagem de inibição da oxidação, subtraindo-se a percentagem de oxidação de cada amostra de 100 (MELO e MANCINI FILHO, 1989).

Outra determinação que emprega lípide como substrato e que vem sendo comumente usada para determinação da atividade antioxidante é a dienos conjugados (ANTOLOVICH *et al.*, 2002).

Tabela 3 Principais métodos que empregam lípides como substrato

Métodos	Sistema Solvente	Condições/ Indutores da Reação	Medição/ Quantificação
Sistema β-caroteno/ ácido linoléico	Aquoso	50°C em cubetas, Diferentes indutores, Ácido linoléico com β -caroteno emulsificados em Tween	Δ 470nm, % de inibição da oxidação do β -caroteno
Dienos conjugados	Tampão pH 7,4	37 ou 40°C, minutos, AAPH Ácido linoléico emulsificado em SDS	Δ 234nm, Dienos conjugados
TBARS	Tampão pH 1,0 – 2,0	100°C, TBA, íon Cu^{++} , Fe^{+++} ou AAPH Ácido linoléico emulsificado em Tween ou SDS	Δ 532 - 535nm, Valor TBA
Índice de Peróxido	—	Iodeto de potássio, amido, Tiosulfato de potássio	milimoles de O_2 ativo/Kg de matéria graxa
LDL humana	PBS	2-várias horas, Cu^{+2} , metamioglobina	Hexanal, Δ 234nm Dienos conjugados, Tempo de indução, 50% de oxidação ou % inibição
Rancimat	Aquoso	110-140°C, Ar seco ou O_2	Tempo de indução

DIENOS CONJUGADOS

A conjugação de dienos, resultante da oxidação lipídica e com pico de absorção a 230-235nm, é comumente usada como ponto final para determinação da atividade antioxidante de uma amostra. Inicialmente, o lípide (comumente ácido linoléico emulsificado em sulfato dodecil sódico ou SDS) sofre abstração de um átomo de hidrogênio de um grupo CH_2 , e, em seguida, o produto é usualmente estabilizado por um rearranjo molecular para formar um dieno conjugado. A oxidação é iniciada pela adição de íons Cu^{+2} , íons Fe^{+3} , AAPH ou DPPH e/ou a aplicação de calor. A quantificação dos dienos conjugados pode ser obtida calculando-se a elevação na absorbância por massa de amostra

a um tempo fixo. Os resultados têm também sido obtidos pela medição da fase LAG e percentagem de inibição (ANTOLOVICH *et al.*, 2002; FRANKEL e MEYER, 2000).

A medida da formação de dienos conjugados oferece a vantagem de se medir um estágio mais inicial do processo de oxidação. Por outro lado, mesmo em sistemas lipídicos simples, a medida através da espectrofotometria ultra violeta (UV) é uma medida genérica e fornece pouca informação sobre a estrutura dos compostos. A seletividade e sensibilidade pode ser aumentada pela separação de diferentes dienos conjugados usando a cromatografia líquida de alta eficiência ou CLAE (ANTOLOVICH *et al.*, 2002), espectrofotometria diferencial ou segunda derivada (SILVA *et al.*, 1999).

Entretanto, o método mais comumente usado para detecção da oxidação lipídica é o ensaio das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), conforme descrito a seguir (SCHMEDES e HOLMER, 1989).

ENSAIO DAS SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)

O ensaio TBARS baseia-se na reação do ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) com os produtos da decomposição dos hidroperóxidos de ácidos graxos insaturados, resultantes da oxidação de um substrato lipídico (ácido linoléico, metil linoleato, bem como amostras de tecidos e LDL) com a adição de um íon metálico de transição (Cu^{+2} , Fe^{+3} ou uma fonte de radical livre como o AAPH, também referido como ABAP) (ANTOLOVICH *et al.*, 2002). Um dos principais produtos formados é o malonaldeído, um aldeído com átomos de carbono que reage com 2 moléculas de TBA, formando um pigmento vermelho/violeta (TBARS), que é medido espectrofotometricamente com uma absorbância máxima a 532-535nm. A reação ocorre em meio ácido (pH 1,0-2,0) e a elevada temperatura (100°C) para aumentar a sua velocidade e sensibilidade (SILVA *et al.*, 1999).

A adição de um antioxidante inibe a oxidação e, desta forma, a absorção é reduzida. Os resultados são tipicamente quantificados contra uma curva de calibração para o malonaldeído bis(dimetilacetal) ou malonaldeído bis(dietilacetal) e expressos em valor TBA, definido como peso, em mg, de TBA por Kg de amostra (SILVA *et al.*, 1999). Os resultados podem também ser descritos em termos de % de inibição da oxidação (ANTOLOVICH *et al.*, 2002).

Embora a reação não seja muito específica e as condições de reação tenham um efeito significativo no desenvolvimento da cor, pois é determinado tanto o malonaldeído já formado naturalmente da decomposição do hidroperóxido quanto o liberado secundariamente devido a etapa de aquecimento na reação TBA (SCHEMEDES e HOLMER, 1989), o ensaio TBARS é usado. O procedimento pode ser melhorado pelo uso da CLAE, Cromatografia a Gás (CG) ou Cromatografia a Gás-Espectroscopia de Massa (CG-EM), para caracterizar espécies aldeídicas individuais, o que não identifica a fonte de malonaldeído nas amostras ou elimina a possibilidade de um composto com propriedades espectrais similares co-eluírem (ANTOLOVICH *et al.*, 2002).

ÍNDICE DE PERÓXIDOS

O índice de peróxidos representa o conteúdo total de hidroperóxidos e peróxidos de hidrogênio dos lípides ou material lipídico. Um método classicamente usado para dosar peróxidos é o método iodométrico de Lea, onde o iodo produzido a partir da oxidação do iodeto de potássio pelos hidroperóxidos e peróxidos da amostra é titulado com solução de tiosulfato padrão e amido como indicador do ponto final da reação. O índice de peróxidos é calculado como milimoles de oxigênio ativo por Kg de matéria graxa (SILVA *et al.*, 1999).

As limitações envolvendo este procedimento são bem conhecidas e incluem a pobre sensibilidade e seletividade, a possível fixação do iodo liberado às ligações insaturadas dos ácidos graxos levando a resultados subestimados, a oxidação do iodeto pelo oxigênio dissolvido, bem como variações na reatividade de diferentes peróxidos. Assim, outros métodos para determinação do oxigênio peróxido têm sido usados como, por exemplo, o método colorimétrico, onde os peróxidos presentes na amostra oxidam o Fe^{+2} a Fe^{+3} que é, então, dosado por colorimetria, a Δ 500nm, sob a forma de cloreto ou tiocianato férrico. Todavia, o método iodométrico ainda permanece como o procedimento padrão (ANTOLOVICH *et al.*, 2002).

LDL HUMANA

Uma hipótese prevalente, endossada por inúmeros estudos em animais, humanos e *in vitro*, postula que as partículas de LDL plasmáticas, compostas de colesterol, ésteres de colesterol e triglicerídeos de ácidos graxos insaturados n-3 e n-6, são prontamente oxidadas na presença de vários iniciadores de radicais livres, bem como de metais como os íons Cu^{+2} e radicais liberados pelas células endoteliais da parede das artérias, e podem levar ao desenvolvimento de arterioesclerose e doenças cardiovasculares (FRANKEL *et al.*, 1995; FRANKEL e MEYER, 2000).

Desta forma, uma grande diversidade de métodos *in vitro* para avaliar a atividade antioxidante na LDL humana tem sido empregados e um número de agentes tem sido usados para oxidá-la, incluindo Cu^{+2} , catalisadores biológicos (macrófagos, culturas de células endoteliais, metamioglobina, citocromo, ferro/ascorbato) e AAPH (FRANKEL e MEYER, 2000). A inibição da oxidação da mesma, catalisada pelo Cu^{++} , é determinada por cromatografia a gás “headspace” estática do hexanal produzido por oxidação dos ácidos graxos insaturados n-6 na LDL. Os resultados tem também sido quantificados pela medição dos dienos conjugados formados, tempo de indução, 50% de oxidação e percentagem de inibição (FRANKEL e MEYER, 2000).

Contudo, o método usado e a forma de indução para a medida da oxidação da LDL, incluindo o tipo de indutor e tempo de reação, parecem influenciar significativamente no grau de atividade antioxidante, embora outros fatores também possam ter um

largo impacto (FRANKEL e MEYER, 2000). Por outro lado, embora o uso extensivo, a LDL é um substrato dúbio uma vez que o nível de vitamina E na mesma, pode ser um fator importante para proteção da peroxidação do ácido graxo insaturado nesta. Em adição, é necessário precaução quando os resultados são extrapolados de testes *in vitro* para situação em humanos já que a atividade antioxidante *in vivo* é uma complexa interação de vários fatores relacionados (ANTOLOVICH *et al.*, 2002).

RANCIMAT

A estabilidade oxidativa dos óleos e gorduras comestíveis é um importante parâmetro para a avaliação da qualidade dos mesmos. A autooxidação é efetuada pelo oxigênio atmosférico (LÄUBLI; BRUTTEI, 1986).

Testes rápidos para predizer a resistência dos óleos e gorduras à oxidação têm sido procurados. Os mais antigos e mais comumente usados são o teste do Forno Schaal e o Método Oxigênio Ativo (AOM) (HASENHUETTI e WAN, 1992) ou teste de Swift (SILVA *et al.*, 1999).

Os testes de estabilidade de óleos e gorduras comestíveis recorrem a condições padronizadas de oxidação acelerada (oxigenação intensiva, tratamento térmico e/ou catálise metálica) e permitem estimar de forma rápida a estabilidade oxidativa de uma matéria graxa, ou a eficácia teórica de um antioxidante isolado ou em associação (SILVA *et al.*, 1999). São testes específicos para a análise da oxidação em alimentos, sendo altamente relevantes para as condições às quais óleos e gorduras estão sujeitos, tais como no processo de produção, manipulação de alimento ou uso doméstico (ANTOLOVICH *et al.*, 2002).

O aparelho Rancimat (METROHM AG, CH-9100 Herisau, Switzerland) tem sido apresentado como um método para se determinar a resistência de um óleo à oxidação. As condições de trabalho são semelhantes as do AOM embora, neste caso, se avaliam os produtos secundários de oxidação ao invés de peróxidos (SILVA *et al.*, 1999). Vários estudos na literatura têm sustentado uma correlação entre o AOM e o Índice de Estabilidade do Óleo (OSI) determinado pelo Rancimat (HASENHUETTI e WAN, 1992). O método empregado neste aparelho, baseia-se no registro das variações da condutividade da água destilada, na qual se faz a coleta dos ácidos de baixo peso molecular obtidos após a iniciação forçada da oxidação à elevada temperatura. Grande parte dos produtos voláteis formados pela termodecomposição consistem em ácido fórmico, que é recolhido em água destilada, medido condutimetricamente e a condutividade plotada automaticamente. O progresso das curvas de oxidação determinadas desta maneira virtualmente se assemelha ao do índice de peróxido. O t_i (ponto de maior inflexão) é determinado graficamente depois do término do experimento (ponto de interseção tangencial). As vantagens da técnica Rancimat são que ela é uma medida contínua, a qual não requer determinações analíticas periódicas (HASENHUETTI e WAN, 1992), bem como o aparelho não

requer supervisão durante o curso de um experimento (LÄUBLI e BRUTTEI, 1986). Contudo, o método condutimétrico apresenta inconvenientes pois, assim como no AOM, só se obtém resultados mensuráveis para níveis de oxidação elevados (IP>100), muito além do ponto correspondente ao aparecimento de *off flavors*. Em adição, à semelhança de todos os testes que recorrem a uma oxigenação intensiva a altas temperaturas, os produtos de decomposição que se formam nas condições térmicas do ensaio (T>100°C) não são da mesma natureza dos obtidos nas condições normais de armazenamento. Para minimizar estes inconvenientes, verifica-se, hoje em dia, uma tendência a efetuar as determinações a temperaturas mais baixas (60-90°C). Finalmente, as condições térmicas usadas tornam impossível a avaliação da capacidade antioxidante de compostos termolábeis, os quais podem decompor-se ao longo do ensaio (SILVA *et al.*, 1999).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Existe hoje uma grande diversidade de métodos para se avaliar a capacidade antioxidante total *in vitro* dos compostos fenólicos de alimentos. Porém, dos vários métodos disponíveis, a maioria é conduzida em sistema aquoso não sendo adequada para antioxidantes lipofílicos ou misturas. Todos fornecem somente uma direção sobre a capacidade antioxidante dos mesmos (MOURE *et al.*, 2001) e apresentam vantagens e desvantagens (VAN DEN BERG *et al.*, 1999). Desta forma, a atividade antioxidante *in vitro* pode e deve ser avaliada com diferentes testes para diferentes mecanismos. Contudo, todos estes ensaios baseados em reações químicas diferentes oferecem resultados diferentes. Em virtude da grande diversidade de resultados numéricos distintos, e difíceis de se comparar, obtidos a partir destes métodos, metodologias mais específicas e protocolos de ensaio mais válidos quanto a substratos, condições de análise, concentrações e cálculos, tornam-se necessários para se trazer alguma ordem a situação atualmente existente neste importante campo de estudo (FRANKEL e MEYER, 2000).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS/REFERENCES

- ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.D.; PATSALIDES, E.; McDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, v.127, p.183-198, 2002.
- BENZIE, I. F. F. ; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": then FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, v.239, p.70-76, 1996.

- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology*, v.299, p.15-27, 1999.
- DUTHIE, G. G.; DUTHIE, S. J.; KYLE, A. M. Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. *Nutrition Research Reviews*, v.13, n.1, p.79-106, 2000.
- FRANKEL, E. N.; WATERHOUSE, A. L.; TEISSEDE, P. L. Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v.43, n.4, p.890-894, 1995.
- FRANKEL, E. N.; MEYER, A. S. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.80, p.1.925-1.941, 2000.
- HAYASHI, T.; SAWA, K.; KAWASAKI, M.; ARISAWA, M.; SHIMIZU, M.; MORITA, N. Inhibition of cow's milk xanthine oxidase by flavonoids. *Journal of Natural Products*, v.51, n.2, p.345-348, 1988.
- HASENHUETTI, G. L.; WAN, P. J. Temperature effects on the determination of oxidative stability with the Metrohm Rancimat. *Journal of the American Oil Chemistry Society*, v.69, n.6, p.525-527, 1992.
- HOLLMAN, P. C. H. Evidence for health benefits of plant phenols: local or systemic effects? *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.81, p.842-852, 2001.
- HUANG, D.; OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J. A.; DEEMER, E. K. Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated β -cyclodextrin as the solubility enhancer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.50, p.1.815-1.821, 2002.
- KALCKAR, H. M. Differential spectrophotometry of purine compounds by means of specific enzymes. I. Determination of hydroxypurine compounds. *J. Biol. Chem.*, v.167, p.429-443, 1947.
- LÄUBLI, M. W.; BRUTTEI, P. A. Determination of the oxidative stability of fats and oils: comparison between the active oxygen method (AOCS Cd 12-57) and the Rancimat Method. *Journal of the American Oil Chemistry Society*, v.63, n.6, p.792-795, 1986.
- MARCO, G. J. A rapid method for evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemistry Society*, v.45, p.594-598, 1968.
- MARTÍNEZ-VALVERDE, I.; PERIAGO, M. J.; ROS, G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos Latinoamericanos de Nutrition*, v.50, n.1, p.5-18, 2000.
- MELO, M. S. O. M.; MANCINI FILHO, J. Antioxidantes naturais do fruto do dendezeiro (*Elaeis guineensis*, Jacq). *Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo*, v.25, n.2, p.147-157, 1989.
- MILLER, H. E. A simplified method for the evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemistry Society*, v.48, p.91, 1971.
- MILLER, N. J.; RICE-EVANS, C. A. Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS⁺ radical cation assay. *Free Radical Research*, v.26, p.195-199, 1997.
- MOURE, A.; CRUZ, J. M.; FRANCO, D.; DOMÍNGUEZ, J. M.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; NÚÑEZ, M. J.; PARAJÓ, J. C. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, v.72, p.145-171, 2001.
- NORO, T.; ODA, Y.; MIYASE, T.; UENO, A.; FUKUSHIMA, S. Inhibitors of xanthine oxidase from the flowers and buds of *Daphne genkwa*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v.31, n.11, p.3.984-3.987, 1983.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.49, p.4.619-4.626, 2001.

OU, B.; HUANG, D.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J. A.; DEEMER, E. K. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.50, p.3.122-3.128, 2002.

PRIOR, R. L. ; CAO, G. Analysis of botanicals and dietary supplements for antioxidant capacity: A review. *Journal of AOAC International*, v.83, n.4, p.950-956, 2000.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.48, p.3.396-3.402, 2000.

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*, v.26, n.9-10, p.1.231-1.237, 1999.

ROBAK, J.; GRYGLEWSKI, R. J. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochemical Pharmacology*, v.37, n.5, p.837-841, 1988.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.76, p.270-276, 1998.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Compuestos polifenólicos: estructura y clasificación. Presencia en alimentos y consumo. Biodisponibilidad y metabolismo. *Alimentaria*, v.1, p.19-27, 2002(a).

SÁNCHEZ-MORENO, C. Compuestos polifenólicos: efectos fisiológicos. actividad antioxidante. *Alimentaria*, v.1, p.29-40, 2002 (b).

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition*, v.130, p.2.073S-2.085S, 2000.

SCHMEDES, A.; HOLMER, G. A new Thiobarbituric acid (TBA) method for determining free malondialdehyde (MDA) and hydroperoxides selectively as a measure of lipid peroxidation. *Journal of the American Oil Chemistry Society*, v.66, n.6, p.813-817, 1989.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. *Química Nova*, v.22, n.1, p.94-103, 1999.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição*, v.15, n.1, p.1-16, 2002.

VAN DEN BERG, R.; HAENEN, G. R. M. M.; VAN DEN BERG, H.; BAST, A. Applicability of an improved TROLOX equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chemistry*, v.66, p.511-517, 1999.

Recebido para publicação em 2/2/04.

Aprovado em 12/8/04.