

UMA ABORDAGEM SOBRE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM PRODUTOS NATURAIS

Leonardo Luiz Borges¹; Tathiana Carvalho Lúcio¹; Eric de Souza Gil¹, Eduardo Fernandes Barbosa²

barbosaeduardofernanDES@gmail.com

¹ Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO, Brasil

² Instituto de Biologia Animal – Universidade de Brasília, Brasília-DF, Brasil

Data de recebimento: 02/05/2011 - Data de aprovação: 31/05/2011

RESUMO

Os agentes antioxidantes ocupam um lugar de destaque dentro da indústria farmacêutica, sendo importante a realização de pesquisa sistematizada desses compostos e de suas capacidades de neutralizar agentes nocivos a sistemas biológicos, como por exemplo, os radicais livres. Neste trabalho foram avaliadas metodologias para determinação da capacidade antioxidante de alguns sistemas complexos, como extratos vegetais, alimentos, vinho, entre outros, através de diversos métodos. A detecção de antioxidantes foi baseada em três categorias de métodos: eletroquímicos; colorimétricos (DPPH e ABTS) e biológicos. Além desses, outras técnicas instrumentais foram mencionadas, mostrando a versatilidade de mecanismos que podem ser utilizados para revelar a concentração dessas substâncias. A CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) é uma ferramenta bastante útil na identificação e quantificação destes compostos e pode estar acoplada ao método DPPH. Os métodos analíticos apresentados nesse trabalho possuem vantagens e certas limitações, sendo que a abordagem aqui apresentada desenvolveu-se nas fronteiras existentes entre esses dois parâmetros.

PALAVRAS-CHAVE: antioxidantes, radicais livres, DPPH, ABTS, CLAE.

AN APPROACH TO ANALYTICAL METHODS FOR DETERMINATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY IN NATURAL PRODUCTS

ABSTRACT

Antioxidants have been placing a highlighted position in the pharmaceutical industry, becoming the systematic research of these compounds important, for their ability to neutralize harmful agents in biological systems such as free radicals. In this work were evaluated some methodologies to determine the antioxidant capacity of some complex systems, as plant extracts, food, wine, among others. The detection of antioxidants was based on three categories of methods: electrochemical, colorimetric (DPPH e ABTS), and biological. Besides these, other instrumental techniques were pointed out, showing the versatility of the mechanisms that can be use to unveil the concentration of these substances. The HPLC (High Performance Liquid Chromatography) is a very useful tool in the identification and quantification of these compounds and can be coupled to the DPPH method. Each analytical method cited here has advantages and limitations, and the approach presented in this work ranges within these two parameters.

KEYWORDS: antioxidants, free radicals, DPPH, ABTS, HPLC.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de novos métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante ou quantificação de antioxidantes específicos em matrizes complexas como extratos vegetais, frutas e alimentos em geral, pode ser justificado pela relevância comercial e farmacológica destes aditivos, bem como pela necessidade de metodologias mais simples e baratas (PALANISAMY et al, 2011).

Várias evidências indicam que diversos componentes antioxidantes, que não apenas vitaminas e minerais, contribuem na proteção oferecida por frutas e vegetais ao dano oxidativo (BUTERA et al, 2002; KUBOLA et al, 2011)

Assim sendo, a capacidade antioxidante total de extratos vegetais não traduz precisamente, o que ocorre *in vivo* nas células vegetais, já que nestas há uma atividade dinâmica de um sistema antioxidante formado por enzimas (superóxido dismutase, catalase, ascorbato redutase, etc) e compostos de baixo peso molecular, tais como flavonóides, taninos, ácidos cinâmicos, ácido ascórbico, tocoferol, antocianinas, entre outros (NEILL et al, 2002).

A produção destes fitoantioxidantes depende também das condições ambientais e pode ser induzida ou regulada por condições de *stress*, tais como elevada radiação, temperatura, desequilíbrio mineral ou mesmo ataques patogênicos (NEILL et al, 2002; WILMES et al, 2011)

Por outro lado, em determinadas situações antioxidantes podem agir como pró-oxidantes. Como exemplo, antioxidantes que inibem peroxidação lipídica podem acelerar dano oxidativo a DNA, proteínas e carboidratos (MARKUS; MORRIS, 2008).

Nesse contexto, as atividades antioxidantes de derivados vegetais têm sido avaliadas por diferentes métodos, colorimétricos, biológicos e eletroquímicos, entre outros métodos instrumentais.

Entre os métodos colorimétricos destacam-se aqueles que relacionados à habilidade dos antioxidantes em neutralizar radicais como DPPH[·] (1,1-difenil-2-picrilhidrazila) ou ABTS[·] [sal de amônio do ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzenotiazolina-6-sulfônico)]. Entre os métodos biológicos existem aqueles que avaliam a capacidade do antioxidante na proteção a peroxidação lipídica e oxidação protéica (Hotta et al, 2001). A medida do consumo de oxigênio em emulsões com oxidação lipídica iniciada por metamioglobina também é bastante praticada neste intento.

Já as técnicas eletroquímicas correlacionam potenciais de oxidação, intensidade de corrente ou outros parâmetros eletroquímicos correlacionáveis à capacidade antioxidante (HOTTA et al, 2001; BLASCO et al, 2004; MORIMITSU; OKAZAKI, 2009).

Técnicas Eletroquímicas

As técnicas eletroquímicas apresentam grande potencial para caracterização detalhada de fitoantioxidantes, pois fornecem parâmetros físico-químicos capazes de nos mostrar não apenas o potencial redox, mas também números de elétrons envolvidos (*n*), influência de prótons, constantes de reação etc. Entre as técnicas mais difundidas destacam-se a voltametria cíclica e de pulso diferencial, a coulometria, bem como técnicas acopladas (KILINC, 2009).

A eletrólise de fluxo contínuo utilizando eletrodo de fibra de carbono em solução hidroalcoólica de KCl 50 mM e diferentes soluções carreadoras foi utilizada na determinação da atividade antioxidante de vários antioxidantes naturais, entre estes os ácidos ascórbico, caféico, clorogênico e elágico, a cisteína, a curcumina e a catequina (HOTTA et al, 2001).

Em outro trabalho em que se avaliaram a atividade antioxidante de 34 produtos naturais por várias técnicas, observou-se que a correlação entre técnicas eletroquímicas e capacidade anti-radicalar (ensaio DPPH) era maior quando comparada a número de elétrons (eletrólise em fluxo contínuo) que ao potencial de oxidação (voltametria cíclica) (HOTTA et al, 2002).

Entretanto, compostos fenólicos geralmente produzem radicais fenóxi instáveis que rapidamente polimerizam-se sobre a superfície de eletrodos sólidos, levando estes a passivação (ANDREESCU et al, 2003). Assim sendo, a correlação entre atividade antioxidante e potencial de oxidação nem sempre é simples e direta necessitando por vezes ensaios paralelos para melhor compreensão. Por exemplo, catecóis podem dimerizar sob oxidação eletroquímica produzindo outras espécies eletroativas e resultando em aumento dos níveis de corrente esperado (HOTTA et al, 2001). Já em outros casos ao contrário observam-se picos com intensidades muito abaixo da esperada, as quais poderiam estar associadas a processos de adsorção com passivação do eletrodo.

Outro aspecto importante no que diz respeito às limitações da eletroquímica é a sua insensibilidade para compostos que exercem ação antioxidante por outros mecanismos como, por exemplo, quelação, que é um mecanismo que não envolve fluxo de elétrons capaz de ser detectado pelos métodos eletroquímicos (KILMARTIN, 2001). O campo de aplicação dos métodos eletroquímicos apesar de limitações decorrentes da complexidade das amostras e em virtude da diversidade de variáveis metodológicas é bastante vasto.

Aplicações das técnicas eletroquímicas

Extratos

A composição heterogênea de tecidos vegetais resulta em uma grande variedade de possibilidades de interações químicas, fatores que aumentam expressivamente a complexidade destes sistemas (KUBOLA et al, 2011).

O uso de um método eletroquímico acoplado a sistemas de injeção em fluxo foi avaliado para investigar a atividade antioxidante de extratos metanólicos plantas da família Labiatae (*Rosmarinus officinalis*; *Salvia officinalis*; *Thyme vulgaris*; *Origanum vulgare*; *Mentha piperita*; *Laurus nobilis* e *Ocimum basilicum*). O modelo utilizou sistema de injeção em fluxo acoplado a detector amperométrico, equipado com eletrodo de trabalho de carbono vítreo (vs Ag/AgCl), fluxo de 1,0 mL.min⁻¹ e potencial determinado por voltametria hidrodinâmica (0,2 a 0,8V) de 0,5 V. O eluente composto por mistura contendo 70% de Metanol PA, 28% de Tampão acetato 0,1 M, pH 4,0 e 2% e perclorato de sódio.

Para realização destes ensaios, uma tomada de ensaio de 0,25 g de extratos secos das amostras obtidas em supermercado foram extraídas em tubos de centrifuga por sonicação por cinco minutos e então centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos para posterior remoção do sobrenadante, o qual foi seco sob vácuo em temperatura ambiente. Em seguida volumes de 20 µL de soluções 20 µg/mL do resíduo seco preparados em com eluente foram injetados no sistema e os valores

expressos em função do equivalente do agente antioxidante trolox. Os resultados obtidos foram correlacionados com ensaios de DPPH e composição total de fenólicos, obtendo-se respectivamente as seguintes correlações: $r = 0,9856$ e $r = 0,9203$ (COSIO et al, 2006).

A atividade antioxidante de folhas verdes e vermelhas de *Elatostema rugosum*, uma planta nativa da Nova Zelândia, foi investigada por voltametria cíclica no sentido de se avaliar contribuição das antocianinas neste papel. Neste estudo, 5g de extrato fresco foram homogenizados em 60 mL de mistura de ácido acético, água e metanol (0,5:20:80), filtrado e clarificado por centrifugação e então diluídos 10 vezes em tampão fosfato pH 5,5. Os voltamogramas foram determinados utilizando eletrodo de carbono vítreo e como eletrólito Tampão fosfato 0,05mM pH 5,5 ou 7,0 contendo 8% de metanol. Paralelamente, foram feitos voltamogramas com antioxidantes padrões como ácido ascórbico, ácido cafeico, catequina, ácido *p*-cumárico, bem como outros ensaios, incluindo DPPH, doseamento de flavonóides e determinação de atividade de enzimas antioxidantes (NEILL et al, 2002). No estudo foram observados por voltametria linear ascendente (positive sweep), três picos (372, 840 e 990 mV), tendo sido o segundo menos discernível que demais em pH 7,0, fato que ilustra a importância do pH nos mecanismos antioxidantes. A largura dos picos foi atribuída a contribuição de diferentes espécies antioxidantes de baixo peso molecular. Ressaltou-se ainda que, o primeiro pico (372 mV) se aproxima muito dos potenciais observados para padrões puros como cianidina, petunidina e ácido caféico, podendo-se admiti-los como principais contribuintes para este sinal (NEILL et al, 2002).

Fitoquímicos

No caso de fitocompostos isolados, o uso de técnicas eletroanalíticas pode se estender ao campo da caracterização eletroquímica. Para fitofármacos tradicionais como ácido ascórbico, quercetina e rutina, o comportamento eletroquímico já foi estudado de forma detalhada com objetivo de se correlacionar aspectos estruturais com o mecanismo de atividade antioxidante por vários cientistas (BRETT et al, 2003).

Vários fitoantioxidantes comumente, presentes em quantidades consideráveis várias plantas têm sido investigados por técnicas eletroquímicas. Ácido ascórbico, ácido elágico, resveratrol, diversos flavonóides (rutina, quercetina, catequinas, hesperidina, por exemplo), taninos, antocianinas e derivados do ácido benzóico e cinâmico, entre outros, são alguns exemplos de moléculas amplamente distribuídas em plantas que exibem alta atividade antioxidante.

O quadro 1 apresenta potenciais e condições de ensaio observados na literatura para alguns exemplos de fitoantioxidantes.

QUADRO 1 – Potenciais anódicos para fitoantioxidantes tradicionais.

Composto	E_{pa}(mV)	Eletródo	Tipo de Eletrólito	Referência
Ácido Elágico	361	PFC	Etanol:Tampão Fosfato(1:1) pH 7,0	[BLASCO, 2004]
Ácido Caféico	448	CV	Tampão Acetato pH 7,0	[MARKOVIC, 2001]
	212	PFC	Etanol:Tampão Fosfato(1:1) pH 7,0	[BLASCO, 2004]
Ácido Clorogênico	261	PFC	Etanol:Tampão Fosfato(1:1) pH 7,0	[BLASCO, 2004]
Ácido Gálico	418	CV	Etanol:Sol.Ácido Tartárico(1:1) pH 3,6	[KILMARTIN, 2001]
Ácido Rosmarínico	266	PFC	Etanol:Tampão Fosfato(1:1) pH 7,0	[BLASCO, 2004]
Catequina	215	PFC	Etanol:Tampão Fosfato(1:1) pH 7,0	[BLASCO, 2004]
	202	CV	Tampão Fosfato pH 7,0	[BUTERA, 2002]
Hesperidina	524	PFC	Etanol:Tampão Fosfato(1:1) pH 7,0	[BLASCO, 2004]
Hidroquinona	207	PFC	Etanol:Tampão Fosfato(1:1) pH 7,0	[BLASCO, 2004]
Piragolol	160	PFC	Etanol:Tampão Fosfato(1:1) pH 7,0	[BLASCO, 2004]
Quercetina	178	PFC	Etanol:Tampão Fosfato(1:1) pH 7,0	[BLASCO, 2004]]
	376	CV	Etanol:Sol.Ácido Tartárico(1:1) pH 3,6	[KILMARTIN, 2001]
Resveratol	667	CV	Etanol:Sol.Ácido Tartárico(1:1) pH 3,6	[KILMARTIN, 2001]
Rutina	360	PFC	Etanol:Tampão Fosfato(1:1) pH 7,0	[BLASCO, 2004]

CV = Carbono Vítreo, PFC = Plastic formed Carbon

Diterpenos lactônicos derivados do ácido carnosico são importantes constituintes de plantas medicinais. Os potenciais anódicos entre 0,4 e 0,7 V e potenciais de redução próximos de zero são condizentes com a atividade antioxidante destes derivados (MARKOVIC et al, 1996).

O uso da eletrólise em fluxo contínuo revelou que para compostos polifenólicos como catequina, ácido elágico e curcumina, pode-se correlacionar intensidade de corrente e número de elétrons n com atividade antioxidante. Igualmente, no caso de catecóis observou-se valores de n maiores que os esperados pelo respectivo número de hidroxilas (HOTTA et al, 2001).

O ácido caféico, um polifenol amplamente, distribuído em plantas superiores como glicosídeos, ésteres, ou forma livre, é outro fitocomposto que por sua alta atividade antioxidante vem sendo exaustivamente estudado por técnicas eletroquímicas (HOTTA et al, 2002). O uso da voltametria cíclica e análise por

simulação digital foram propostos para desvendar os mecanismos de oxidação-redução deste importante fitoantioxidante, confirmando-se por ambas as técnicas a dependência do pH (HOTTA et al, 2002).

Glicosídeos da silibina, compostos com reconhecida ação hepatoprotetora, foram investigados por voltametria cíclica e ensaios espectrofotométricos, por sua ação antiradical livre e antilipoperoxidativa. No estudo verificou-se que embora os glicosídeos fossem doadores de elétrons mais fracos que a silibina livre, estes apresentavam ação antiradical livres mais potente, tanto em ensaios por descoloração com DPPH[·], quanto com ABTS^{·+}. Pode-se justificar este fato a melhor solubilidade dos glicosídeos em relação a silibina livre, sendo que em solução o efeito do solvente sobre estabilidade de radicais pode ter grande influência nestes mecanismos (KOSINA et al, 2002).

TÉCNICAS ESPECTROFOTOMÉTRICAS

Os métodos espectrofotométricos são relativamente simples baseando-se invariavelmente, na capacidade de “descolorante” da amostra. Os ensaios mais utilizados recebem o nome do reagente cuja absorção será atenuada pelo antioxidante, ou seja, ensaios de DPPH e ABTS. Reagentes estes responsáveis pelo fator custo do método espectrofotométrico e que indicam a capacidade antioxidante total do produto no que diz respeito a varrer radicais livres (BUTERA et al, 2002).

Ensaio DPPH

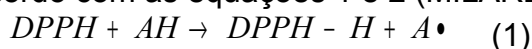
O teste de DPPH é um dos métodos indiretos para se determinar a atividade antioxidante mais antigo sendo sugerido originalmente em 1950 para se descobrir os doadores de hidrogênio em matérias naturais. Mais tarde foi quantificado para determinar o potencial antioxidante de compostos fenólicos isolados e alimentos tão bem como amostras biologicamente relevantes (ROGINSKY; LISSI, 2005). Uma característica desse método é que ele não envolve condições drásticas de temperatura e oxigenação (SILVA et al, 1999). O DPPH pode reagir com compostos fenólicos, bem como com ácidos aromáticos contendo apenas um grupamento (SANTOS et al, 2007).

O método de DPPH[·] é muito utilizado para se determinar a atividade antioxidante em extratos e substâncias isoladas como: compostos fenólicos (SOUSA et al, 2007), fenilpropanóides, fenólicos totais, flavonóis (LEJA et al, 2007), cumarinas (VOGEL et al, 2005), quitosana com diferentes pesos moleculares (Kim; Thomas, 2006), antocianinas, antocianidinas (LEJA et al, 2007; DE LIMA et al, 2007), carotenóides (AJILA et al, 2007), rutina, kaempferol (SILVA et al, 2005). Estudo realizado com matéria prima vegetal em estado bruto mostrou-se inadequado devido a sua elevada complexidade química e inerente presença de interferentes potenciais como pigmentos coloridos. (SOUZA et al, 2007).

Esse método consiste em avaliar a capacidade antioxidante via atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila – DPPH[·]. O radical DPPH[·] possui coloração púrpura absorvendo a um comprimento de onda máximo de aproximadamente 516 nm. Por ação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar (R[·]), o DPPH[·] é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância. A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais

livres e/ou porcentagem de DPPH· remanescente no meio reacional. O DPPH apresenta-se como um método simples podendo também ser usado para avaliar a atividade antioxidante de formas sintéticas (ex: nimesulida, dapsona e ácido acetilsalicílico), algas, quitosanas, etc., mas por ser um método colorimétrico não é muito aplicado para substâncias coloridas devido a interferências por pigmentos (CHANDRASEKAR et al, 2006; KIM; THOMAS, 2006; RAYMUNDO et al, 2004).

A reação do radical livre DPPH com um antioxidante (AH) ou uma espécie radical (R·) ocorre de acordo com as equações 1 e 2 (MILARDOVIC, 2005):



A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante, sendo que a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada concentração eficiente (CE₅₀), também chamada de concentração inibitória (CI₅₀). Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua CE₅₀ e maior a sua atividade antioxidante (SOUSA et al, 2007).

A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante, sendo que a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada concentração eficiente (CE₅₀), também chamada de concentração inibitória (CI₅₀). Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua CE₅₀ e maior a sua atividade antioxidante (SOUSA et al, 2007).

Análise quantitativa da atividade antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante se dá através da monitorização do consumo do radical livre DPPH· pelas alíquotas de ensaio das amostras, através da medida do decréscimo das respectivas medidas de absorbância. As medidas são realizadas em espectrofotômetro UV-Vis no comprimento de onda de 515-517nm.

Atividade sequestrante de radicais livres de DPPH

A atividade sequestrante (%ASRL) ou porcentagem de descoloração (% descoloração) pode ser expressa em porcentagem por comparação a um controle ou branco, segundo a seguinte equação:

$$\%ASRL = (\%DESCOLORAÇÃO) = \frac{Ac - At}{Ac} \times 100$$

Onde, Ac: absorbância controle ou branco; At: absorbância teste (amostra).

Os radicais livres de DPPH·, que inicialmente apresentam cor roxa por possuírem elétron livre, perdem esta cor quando um radical hidrogênio doado por uma molécula antioxidante entra em ressonância com a molécula de DPPH·, diminuindo-se, assim, a absorbância. O DPPH é um radical estável e com baixa taxa de deterioração e reatividade com a maioria dos compostos. Assim sendo, apenas reagentes redutores fortes são capazes de reagir com estes radicais estáveis em um modo estequiométrico. A baixa absorbância indica atividade sequestrante de radicais livres (SANTOS et al, 2007).

O quadro 2 apresenta resultados referentes a % de descoloração do DPPH para diversas plantas e compostos (VITURRO et al, 1999).

QUADRO 2: % de descoloração do DPPH .

	% Descoloração do DPPH (µg/mL)	% Descoloração do DPPH (µg/mL)	% Descoloração do DPPH (µg/mL)
Planta e compostos	100	10	1
<i>Mutisia friesiana</i>			
Extrato bruto	87	57	33
Humahuaca	70	28	11
Cochinoca	70	11	9
Fração 12-13	50	21	9
Fração 12-13 (7-11)	42	17	0
Fração 18-20	43	36	0
<i>Sanicula graveolens</i>			
Extrato bruto	23	20	0
Ácido clorogênico	50	27	0
Ácido dicafeóquínico	53	42	0
Quercetina -3- O-galactosídeo	41	32	0
Quercetina-3- O-raminosídeo	29	25	0
Ácido caféico	100	100	20
Quercetina	100	94	18

Fonte: VITURRO et al, 1999

Ensaio ABTS

De acordo com HALLIWELL (1996), os efeitos defensivos de antioxidantes naturais em frutas e vegetais estão relacionados a três grandes grupos: ácido ascórbico e fenólicos como antioxidantes hidrofílicos e carotenóides como antioxidantes lipofílicos. Um dos métodos mais utilizados para medir a atividade antioxidante é através da captura do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS^{•+}), que pode ser gerado através de uma reação química, eletroquímica ou enzimática (*Fig. 1*). Com essa metodologia, pode-se medir a atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica (KUSKOSKI et al, 2005).

Em outro ensaio proposto por Miller et al, o radical cátion ABTS^{•+} Foi obtido em presença de H₂O₂, apresentando máximos de absorção a 417,645,734 e 815 nm. Na presença de antioxidantes doadores de hidrogênio, pode medir-se a diminuição da formação deste radical por espectrofotometria (SILVA et al, 1999).

Esse radical pode reagir de forma enérgica com compostos doadores de hidrogênio, como compostos fenólicos, sendo convertido em uma forma não colorida de ABTS^{•+}. Assim, a atividade anti-radicalar de flavonóides, ésteres do ácido gálico e aldeído caféico extraídos das folhas de *Tachigalia paniculata* (Leguminosae) foi

avaliada usando-se entre outros ensaios o ABTS^{•+}. Os autores observaram que dois derivados glicosídicos da miricetina e o galato de metila se mostraram ativos frente ao cátion radical ABTS^{•+}, destacando as propriedades antioxidantes destes compostos. Também é possível determinar a quantidade de ABTS^{•+} consumida devido a reação com amostras contendo compostos fenólicos que foi expressa em Trolox equivalentes (unidades de concentração). Esse valor foi designado como TEAC (Capacidade antioxidante trolox equivalente), isso fornece uma estimativa da quantidade de moléculas de radicais consumidas pelo antioxidante (CAMPOS, 1997).

Na versão comercial do teste ABTS^{•+} conhecido como TEAC protocolo, ABTS^{•+} é gerado de ABTS pela sua reação com o radical ferromioglobina e H₂O₂ na presença de peroxidase (CAMPOS, 1997).

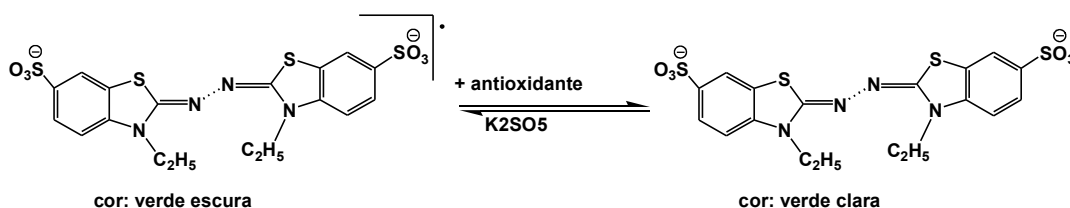


FIGURA 1. Estabilização do radical ABTS^{•+} por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio. Adaptada de SOUSA et al, 2007.

A vantagem do teste ABTS consiste na sua relativa simplicidade que permite a aplicação na rotina de qualquer laboratório. O valor TEAC caracteriza a capacidade da amostra testada em reagir com ABTS^{•+}, bem como em inibir processos oxidativos. Com muitos compostos fenólicos e em outras amostras com substâncias com atividade antioxidante isso ocorre lentamente (CAMPOS, 1997).

O resultado da determinação do TEAC é dependente do tempo de incubação assim como da taxa da amostra quantificada (EVANS et al, 1996). Esta dependência somada a pouca seletividade do ABTS^{•+} na reação com átomos doadores de hidrogênio constituem na limitação desse método (CAMPOS, 1997). Deste modo, divergências nos resultados de TEAC podem ser atribuídas a fatores limitantes como a diferença no tempo de incubação ou na estratégia de obtenção de ABTS^{•+}.

O quadro 3 apresenta valores de atividades antioxidantes para várias amostras de óleos essenciais frente ao radical ABTS^{•+} (MANTLE et al, 1998).

QUADRO 3: comparação da atividade antioxidante de óleos extraídos de plantas frente ao radical ABTS⁺

Óleo da planta	Atividade antioxidante(Trolox equivalente[mM])
Canela	2,12±0,27x10³
Pimenta	3,16±0,33x10²
Louro	2,52±0,34x10²
Tomilho	1,66±0,20
Ylang Ylang	1,14±0,18
Melissa	1,10±0,19
Angelica	0,86±0,19
Hyssop	0,81±0,18
Camomila	0,78±0,19
Verbena	0,70±0,13
Marjoram	0,26±0,05
Citronela	0,16±0,03
Rosa Maria	0,16±0,03
Neroli	<0,1
Geranium	<0,1
Cedarwood	<0,1
Limo	<0,1
Lavanda	<0,1
Bergamota	<0,1
Limao	<0,1
Sage	<0,1
Anis	<0,1
Camphor	<0,1

Fonte: MANTLE et al, 1998

MÉTODO BIOQUÍMICO

A peroxidação lipídica constitui a principal causa de deterioração dos corpos graxos (lipídios e matérias graxas) sendo assim, a inibição da peroxidação lipídica constitui uma das atividades bastante desejadas dos antioxidantes. Devido a abundância nas células e susceptibilidade à oxidação pela presença de grupos metilênicos entre duplas ligações, os ácidos graxos poliinsaturados representam importantes alvos para os oxidantes (SILVA et al, 1999).

A peroxidação lipídica inicia-se pelo ataque à bicamada lipídica de qualquer espécie suficientemente reativa para abstrair um átomo de hidrogênio bis-alílico de um ácido graxo poliinsaturado. Após ser iniciado, o processo torna-se autocatalítico e somente termina quando se esgotarem as reservas de ácidos graxos insaturados e oxigênio. Os principais produtos de finais da lipoxidação compreendem álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres e outros hidrocarbonetos derivados da decomposição de hidroperóxidos.

O processo da peroxidação lipídica pode ser dividido em três etapas: iniciação, propagação e terminação. A fase de iniciação representa o início da peroxidação, em que os ácidos graxos poliinsaturados sofrem ataque de uma espécie que é suficientemente reativa para abstrair um átomo de hidrogênio a partir de um grupo metileno (-CH₂-), formando um radical de carbono. Este radical é

estabilizado por um rearranjo molecular para formar um dieno conjugado, ou seja, duas duplas ligações intercaladas por uma ligação simples. Em meio aeróbio, o radical alquila inicialmente formado se combina com o oxigênio formando o radical peroxila, o qual pode abstrair um hidrogênio alílico de um outro ácido graxo, gerando outro radical carbono e promovendo a etapa de propagação. A reação peroxila com o átomo de hidrogênio abstraído gera um hidroperóxido lipídico. Peróxidos cíclicos também podem ser formados, quando o radical peroxila reage com uma dupla ligação na mesma cadeia de ácido graxo, o que também pode propagar a peroxidação lipídica.

A terceira etapa, a terminação, dá-se pela aniquilação dos radicais formados originando produtos não radicalares. Os radicais peroxila e alcóxila também podem: sofrer dismutação ou clivagem formando aldeídos; formar uma ligação covalente com resíduos de aminoácidos ou sofrer um rearranjo formando produtos secundários da peroxidação lipídica. A velocidade do processo é limitada pelas fases de iniciação e propagação (LIMA; ABDALLA, 2001).

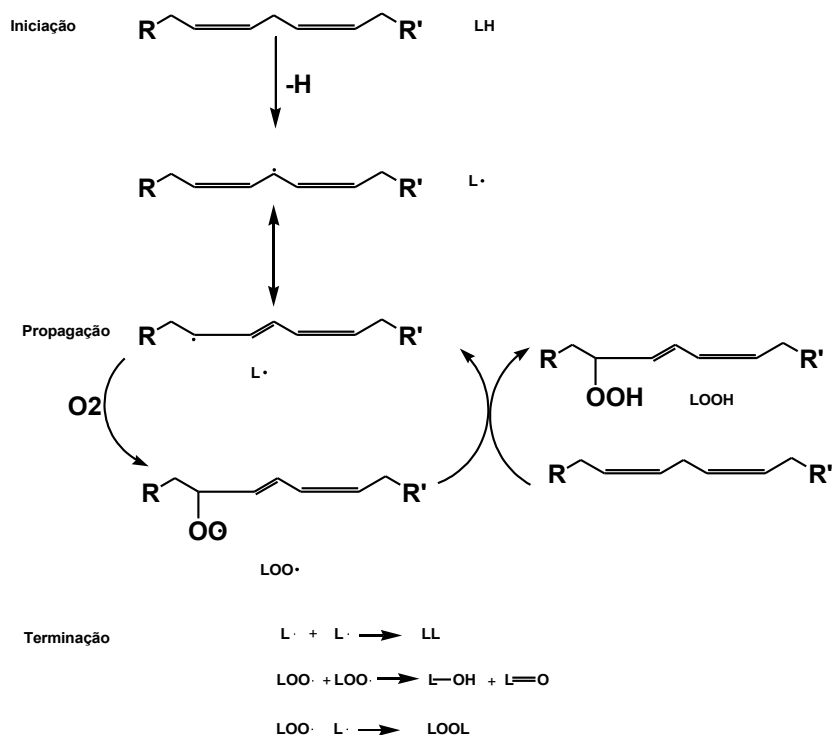


FIGURA 7 - Esquema representando as principais reações ocorridas durante o processo de peroxidação lipídica. Figura adaptada de LIMA (2001).

Vários métodos são descritos na literatura para avaliação da peroxidação lipídica (figura 2), como a determinação de espécies reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), que foi desenvolvido no final da década de 40 e é comumente usado para testes tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Trata-se de um teste baseado na reação do ácido tiobarbitúrico com os produtos de decomposição dos hidroperóxidos. Um dos principais produtos formados no processo oxidativo é o malonaldeído, um aldeído com 3 átomos de carbono. Neste teste uma molécula de malonaldeído reage com duas moléculas de TBA (figura 3) para formar um

complexo de cor vermelha, o qual absorve a 532-535 nm e apresenta máximos de absorção secundários a 245 e 305 nm. A reação ocorre em meio ácido (pH 1-2) e a alta temperatura (100°C), no sentido de aumentar a sua velocidade e sensibilidade (SILVA et al, 1999; SANTOS, 2007).

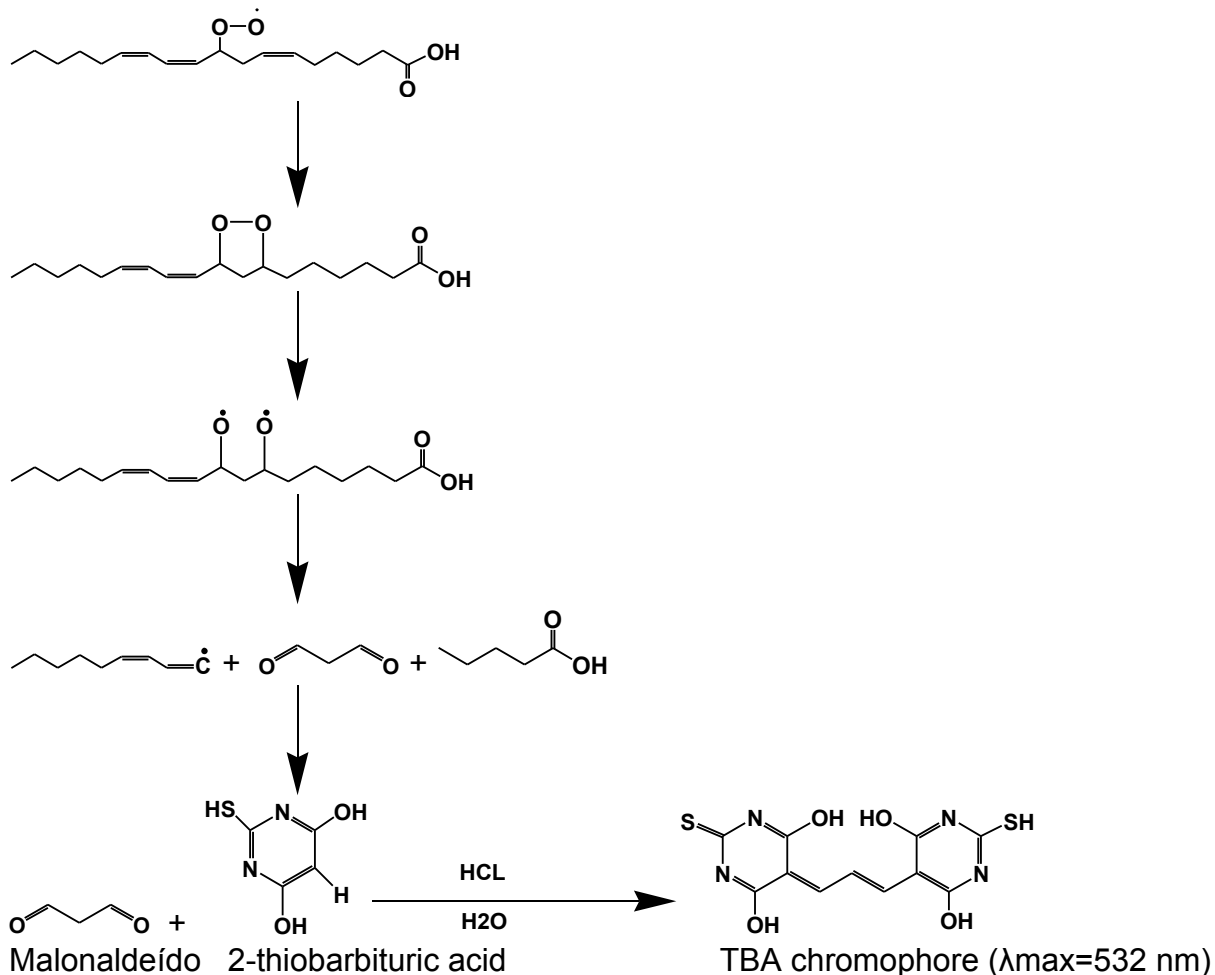


FIGURA - 3. Esquema de formação de malonaldeído. Figura adaptada de LIMA (2001).

MÉTODO CROMATOGRÁFICO

HPLC

Os métodos cromatográficos são um grupo de técnicas de separação de misturas, de modo que o mesmo instrumento faz a separação dos analitos contidos na amostra e sua quantificação (ZHANG et al, 2011; BARROS et al, 2011; DOUSA; GIBALA, 2010; TSAO; DENG, 2004). O processo da quantificação funciona, basicamente, pela adsorção do analito de interesse na fase estacionária. O tempo de retenção permite a separação das várias substâncias que compõe a amostra: analito(s) e interferentes. A atividade antioxidante de alimentos é basicamente determinada por compostos fenólicos. A análise de vários produtos naturais utilizando HPLC foi considerada um progresso. Dentre esses diversos produtos pode-se citar: chá, vinho, frutas e vegetais. Entretanto, é impossível indicar um

trabalho onde todos os compostos foram determinados. A maior dificuldade é a determinação de compostos fenólicos condensados e oligomerizados em vinho tinto e cacau, assim como em chá preto (ROGINSKY; LISSI, 2005).

Mesmo com a composição dos compostos fenólicos conhecida, a atividade antioxidante não pode ser devidamente calculada com precisão através desses dados. Primeiro, as atuais informações sobre antioxidantes são bastante pobres e muito conflitantes. Segundo, a total atividade antioxidante não pode ser a atividade antioxidante dos compostos individuais devido a complexa interação entre eles (sinergismo, antagonismo), que tem sido pobremente investigado (ROGINSKY; LISSI, 2005).

Uma mistura de metanol, água e ácido acético (30:69:1, v/v) pode ser utilizada como fase móvel numa taxa de 1 mL/min em uma injeção de 20 µL. Um sistema LC-10AT HPLC equipado com uma bomba foi associado a um detector de UV no espectro visível para análise de compostos ativos como ácido caféico e ácido clorogênico em diferentes tratamentos em uma coluna Cosmosil 5C18-MS-II (CHEN et al, 2003).

O HPLC também pode ser bastante útil no tratamento com calor de compostos ativos e suas respectivas quantificações de acordo com a temperatura ou o tempo de exposição à energia térmica, através do acompanhamento da taxa de degradação dos mesmos, técnica essa utilizada para o ácido caféico e ácido clorogênico (CHEN et al, 2003).

É possível fazer uma associação entre metodologias de detecção de antioxidantes, um método específico de HPLC foi desenvolvido para a avaliação da atividade antioxidante de formulações poliherbal usando a coluna LiChrospher® RP-18e(250mm×4 mm, 5µM) frente ao radical livre DPPH. Este procedimento de HPLC foi utilizado para a estimativa da atividade antioxidante de poliherbais hepatoprotetores. Enquanto o método colorimétrico falhou na estimativa desses valores, HPLC foi livre de interferências, além de ser mais específico. A fase móvel utilizada foi uma mistura de metanol e água (80:20, v/v) bombeados numa taxa de 1mL/min (CHANDRASEKAR et al, 2006).

O método HPLC é bastante sensível e pode ser usado como uma ferramenta valiosa no controle de qualidade para a determinação rápida da atividade antioxidante de uma variedade de produtos incluindo extratos de plantas, alimentos, drogas e formulações que contenham poliherbais (CHANDRASEKAR et al, 2006). Através dos gráficos seguintes pode-se verificar a quantificação existente na associação DPPH-HPLC (Figura 4).

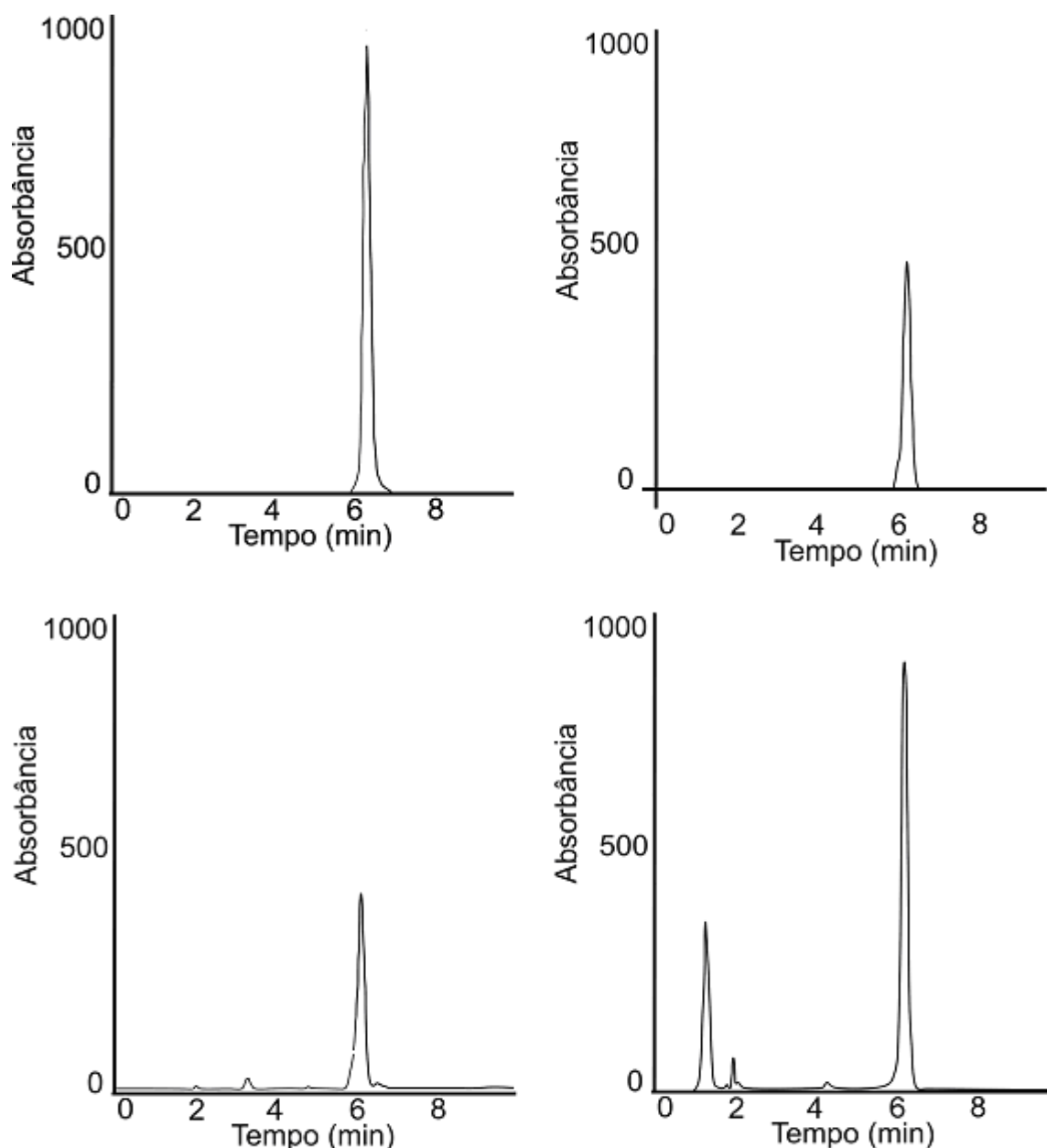


FIGURA 4: Cromatogramas de HPLC associado a DPPH: a) branco, e depois com a incubação com—trolox 60 μ M, c) Silymarin 120 μ M e d) Livomyn 60 μ M. Condições do HPLC: coluna LiChrospher® 100 RP-18e (250mm $\times$ 4 mm, 5 μ M); fase móvel, uma mistura de metanol e água (80:20, v/v); taxa de fluxo, 1 mL/min, detecção no comprimento de onda 517 nm; volume de injeção, 20 μ L. Adaptada de CHANDRASEKAR et al, 2006.

Pode-se estabelecer uma comparação entre HPLC e outro método de análise de antioxidantes, a eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), ambos os métodos exploram a variação do sinal (banda ou pico) de determinada amostra, como exemplo temos a soroalbumina humana (0,2% p/v em 100mM em fosfato de sódio PH 7) mediante a oxidação com hipoclorito (1% de uma solução contendo 4% de

cloro ativo) cujo sinal foi quantificado por análise densitométrica ou integração do pico (GRIPPA et al, 2000).

A determinação da atividade antioxidante do ácido ascórbico ($EC_{50};PAGE = 4.8 \times 10^{-4}$ M, $EC_{50};HPLC = 3.6 \times 10^{-4}$ M), glutatona ($EC_{50};PAGE = 1.5 \times 10^{-4}$ M, $EC_{50};HPLC = 2.0 \times 10^{-4}$ M) e melatonina ($EC_{50};PAGE = 5.2 \times 10^{-4}$ M, $EC_{50};HPLC = 3.2 \times 10^{-4}$ M) constata através dos valores obtidos que os dois métodos são praticamente equivalentes. Esses métodos podem ser muito úteis na triagem de novas drogas antioxidantes para patologias tais como catarata, doenças reumáticas, aterosclerose e doença de Alzheimer (GRIPPA et al, 2000).

OUTROS MÉTODOS INSTRUMENTAIS

A cromatografia de camada delgada pode ser aplicada na investigação da atividade antioxidante. Para tanto as amostras são aplicadas e após término do tempo de eluição a revelação se dá por *spray* com reagente revelador facilmente oxidável. Ensaios autográficos em cromatografia de camada delgada (CCD) utilizando betacaroteno como reagente revelador foram utilizados na avaliação de fitoantioxidantes em extratos hexânicos de frutos de ucu-ubá. Neste estudo, foi evidenciado a presença e atividade antioxidante de dois tocotrienóis e três lignanas, os quais se apresentaram como pontos amarelos em fundo branco, significando que os mesmos protegeram oxidação do betacaroteno. Também foram observados a presença de duas quinonas e três derivados de ácidos ω -arilalcanóicos, entretanto os mesmos foram ineficazes a proteção da oxidação do betacaroteno (SILVA et al, 2001).

A mesma metodologia foi utilizada para avaliar compostos antioxidantes em extratos metanólicos obtidos com folhas e raízes de *Maytenus aquifolium*, uma planta largamente distribuída na região do cerrado. Neste estudo, foram isolados catequinas e glicosídeos flavonólicos, os quais foram submetidos a voltametria cíclica e ensaios com DPPH. A correlação entre potenciais de oxidação ou atividade antiradical medida pelo ensaio DPPH pode ser evidenciada pelas cores observadas nas manchas de CCD, em que ao fundo branco variava de amarelo pálido a intenso, respectivamente para menor e maior atividade antioxidante. Igualmente, a presença significativa de antioxidantes hidrossolúveis em folhas é consistente com uso etnofarmacológico de infusões no tratamento de úlceras (CORSINO et al, 2003).

O uso de outras técnicas mais sofisticadas de separação como HPLC, CG-MS, bem como sistemas de injeção em fluxo (FIA), também merecem destaque na elucidação ou determinação de fitoantioxidantes em matrizes de variada complexidade.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O conjunto de técnicas relativas à quantificação da atividade antioxidante é consideravelmente amplo, podendo apresentar diferentes mecanismos e abordagens para realização das medidas, o que possibilita sua classificação em diferentes “clusters” de técnicas (eletroquímicos, colorimétricos e biológicos). Cada classe de métodos apresenta um conjunto de vantagens e desvantagens, as quais devem ser criteriosamente consideradas no momento de seleção da técnica mais adequada para a medida do potencial antioxidante de um determinado sistema, que podem apresentar distintos níveis de complexidade de componentes. Além das

metodologias clássicas, nos últimos anos tem sido observado um grande esforço na utilização de técnicas instrumentais mais sofisticadas e precisas para se melhorar a qualidade da detecção e quantificação da atividade antioxidante, numa constante busca de otimização da precisão, exatidão e confiabilidade dos resultados obtidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ÁJILA, C.M.;NAIDU, K,A, BHAT, SG, RAO, UJS. Bioactive compounds and antioxidant potential of mango peel extract. **Food Chemistry**. 105, 982-988. 2007

ANDREESCU, S, ANDREESCU, D, SADIK, OA. A new eletrocatalytic mechanism for the oxidation of phenols at platinum electrodes. **Eletrochemistry Communications**, 57, 2003.

[BARROS, L., DUEÑAS, M., FERREIRA, I.C.F.R., MARIA C. A., SANTOS-BUELGA, C. Use of HPLC-DAD-ESI/MS to profile phenolic compounds in edible wild greens from Portugal. **Food Chemistry** 127 \(1\), 169-173. 2011.](#)

BLASCO, AJ, GONZALEZ, MC, ESCARPA, A , Electrochemical approach for discriminating and measuring predominant flavonoids and phenolic acids using differential pulse voltammetry: towards an electrochemical index of natural antioxidants. **Analytica Chimica Acta**. 511, 71-81. 2004.

BRETT, AMO, GHICA, ME. Electrochemical oxidation of quercetin. **Electroanalysis**, 2003.

BUTERA, D, TESORIERE, L, DI GAUDIO, F, BONGIORNO, A, ALLEGRA, M, PINTAUDI, AM, KOHEN, R, LIVREA, MA. Antioxidant activities of Sicilian prickly pear (*Opuntia ficus indica*) fruit extracts and reducing properties of its betalains: Betanin and indicaxanthin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. (50), 6895-901. 2002.

CAMPOS, AM, LISSI, EA. Kinetics of the reaction between 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) derived radical cations and phenols. **International Journal of Chemical Kinetics**. 219–224. 1997.

CHANDRASEKAR, D, MADHUSUDHANA, K, RAMAKRISHNA, S, DIWAN, PV. Determination of DPPH free radical scavenging activity by reversed-phase HPLC: A sensitive screening method for polyherbal formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 40, 460-464. 2006.

CHEN, F, WU,A , CHEN, CY. The influence of different treatments on the free radical scavenging activity of burdock and variations of its active components. **Food Chemistry**. 86, 479–484. 2004.

CORSINO, J, SILVA, DHS, ZANONI, MVB, BOLZANI, VDS, FRANCA, SC, PEREIRA, MAS, FURLAN, M, Antioxidant flavan-3-ols and flavonol glycosides from *Maytenus aquifolium*. **Phytoterapy Research**. 17, 913-6. 2003.

COSIO, MS, BURATTI, S, MANNINO, S, BENEDETI, S, Use of an electrochemical method to evaluate the antioxidant activity of herb extract from the Labiatae family, **Food Chemistry**, 97, 725-731, 2006.

DE LIMA, AA, SUSSUCHI, EM, DE GIOVANI, WF. Eletrochemical and antioxidant properties of anthocyanins and anthocyanidins. **Croatica Chemica Acta**. 80, 29-34. 2007.

[DOUŠA, M., GIBALA, P. Fast HPLC method using ion-pair and hydrophilic interaction liquid chromatography for determination of phenylephrine in pharmaceutical formulations. **Journal of AOAC International**. 93 \(5\), 1436-1442. 2010.](#)

EVANS, CAR, MILLER, NJ, PAGANGA, G. **Antioxidant properties of phenolic Compounds**, 152-159, 1996.

GRIPPA, E, PAVONE, F, GATTO, MT, PETRUCCI, R , MARROSU, G, SILVESTRINI, B, SASO, L. In vitro evaluation of antioxidant activity by electrophoresis and high performance liquid chromatography. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1524, 171-177. 2000.

HALLIWELL, B, WISEMAN, H. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. **Biochemistry Journal**. 313 (17-29). 1996.

HOTTA, H, NAGANO, S, UEDA, M, TSUJINO, Y, KOYAMA, J, OSAKAI, T, Higher radical scavenging activities of polyphenolic antioxidants can be ascribed to chemical reactions following their oxidation. **Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects**. 2002.

HOTTA, H, SAKAMOTO, H, Nagano, S, Osakai, T, Tsujino, Y., Unusually large numbers of electrons for the oxidation of polyphenolic antioxidants. **Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects**, 2001.

HOTTA, H, UEDA, M, NAGANO, S, TSUJINO, Y, KOYAMA, J, OSAKAI, T, Mechanistic study of the oxidation of caffeic acid by digital simulation of cyclic voltammograms. **Analytical Biochemistry**. 303, 66-72. 2002.

[KILINC, E. Significance of chromatographic and voltammetric data for the classification of green teas in Türkiye: A principle component analysis approach. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**. 32 \(2\), 221-241. 2009.](#)

KILMARTIN, PA, Electrochemical detection of natural antioxidants: Principles and protocols. **Antioxidants and Redox Signaling**. 3(6), 941-55, 2001.

KIM, KW, THOMAS, RL. Antioxidative activity of chitosans with varying molecular weight. **Food Chemistry**. 2006.

KOSINA, P, KREN, V, GEBHARDT, R, GRAMBAL, F, ULRICHOVA, J, WALTEROVA, D, Antioxidant properties of silybin glycosides. **Phytoterapic Research**. 16, 33-39. 2002.

[KUBOLA, J., SIRIAMORN PUN, S., MEESO, N. Phytochemicals, vitamin C and sugar content of Thai wild fruits. **Food Chemistry**. 126 \(3\), 972-981. 2011.](#)

KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A.G.; TRONCOSO, A.M.; MANCINI_FILHO, J.; FETT, R. Aplicação de diversos métodos químicos para determinar atividade antioxidante em pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.4, p.726-732, 2005.

LEJA, M, MARECZEK, A, WYZGOLIK, G, KLEPACZ-BANIAK, J, CZEKONSKA, K. Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. **Food Chemistry**. 100, 237-240. 2007.

LIMA, ES, ABDALLA, DSP, Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas, **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. 37, 2001.

MANTLE, D., ANDERSON, J.G., BARNES, M., JONES, P., PERRY, E.K. Comparation of methods for determination of total antioxidant status: application to analysis of medicinal plant oils. **Comparative Biochemistry and physiology**. B 12 385-39.1998.

MARKOVIC, DA, DJARMATI, Z, JANKOV, RM, MARKOVIC, DM, IGNJATOVIC, LM, Electrochemical behaviour of rosmanol 9-ethyl ether, a diterpene lactone antioxidant isolated from sage, **Mikrochimica Acta**. 124(3-4), 219-26, 1996.

[MARKUS, M.A., MORRIS, B.J. Resveratrol in prevention and treatment of common clinical conditions of aging. **Clinical Interventions in Aging**. 3 \(2\), 331-339. 2008.](#)

MILARDOVIC, S, IVEKOVIC, D, GRABARIC, BS. A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical. **Bioelectrochemistry**. 68, 180-185. 2005.

[MORIMITSU, M., OKAZAKI, A. A novel electrode material for H₂O₂ oxidation of electrochemical glucose sensors. **ECS Transactions**. 19 \(6\), 211-218. 2009.](#)

NEILL, SO, GOULD, KS, KILMARTIN, PA, MITCHELL, KA, MARKHAM, KR, Antioxidant activities of red versus green leaves in *Elatostema rugosum*. **Plant Cell and Environment**. 25, 539-47. 2002.

[PALANISAMY, U.D., LING, L.T., MANAHARAN, T., Appleton, D. Rapid isolation of geraniin from *Nephelium lappaceum* rind waste and its anti-hyperglycemic activity. **Food Chemistry**. 127 \(1\), 21-27. 2011.](#)

RAYMUNDO, MS, HORTA, P, FETT. R, Atividade antioxidante in vitro de extratos de algumas algas verdes (Chlorophyta) do litoral catarinense (Brasil), **Revista Brasileira de Ciências Farmacológicas**. 40. 2004.

ROGINSKY, V, LISSI, EA. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**. 92, 235-254. 2005.

SANTOS, ET AL, Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade do café (*Coffea arabica*). **Química Nova**. 30, 604-610, 2007.

SILVA, BS, FERRERES, F, MALVA, JO, DIAS, ACP. Phytochemical and antioxidant characterization of *Hypericum perforatum* alcoholic extracts. **Food Chemistry**. 90, 157-167. 2005.

SILVA, FAM, BORGES, MFM, FERREIRA, MA. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**. 22, 1999.

SILVA, S.A.; SOUZA, A.G.; CONCEIÇÃO, M.M.; ALENCAR, A.L.S.; PRASAD, S.; CAVALHEIRO, J.M.O., Estudo termogravimétrico e calorimétrico da algaroba. **Química Nova**. 24, 4. 2001.

SOUSA, ET AL., Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**. 30, 351-355. 2007.

VITURRO, C, MOLINA, A, SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Free radical scavengers from *Mutisia friesiana* (Asteraceae) and *Sanicula graveolens* (Apiaceae). **Phytotherapy Research**. 13, 422-424. 1999.

VOGEL, H, GONZALEZ, M, FAINI, F, RAZMILIC, I, RODRIGUEZ, J, SAN MARTIN, J, URBINA, F. Antioxidant properties and TLC characterization of four Chilean *haplopappus*-species known as bailahue'n. **Journal of Ethnopharmacology**. 2004.

[WILMES, A., CREAN, D., AYDIN, S., PFALLER, W., JENNINGS, P., LEONARD, M.O. Identification and dissection of the Nrf2 mediated oxidative stress pathway in human renal proximal tubule toxicity. **Toxicology in Vitro**. 25 \(3\), 613-622. 2011.](#)

[ZHANG, C.-P., ZHENG, H.-Q., LIU, G., HU, F.-L. Development and validation of HPLC method for determination of salicin in poplar buds: Application for screening of counterfeit propolis. **Food Chemistry**. 127 \(1\), 345-350. 2011.](#)