

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE UTILIZANDO SISTEMA β -CAROTENO/ÁCIDO LINOLÉICO E MÉTODO DE SEQÜESTRO DE RADICAIS DPPH^{•1}

Joaquim Maurício DUARTE-ALMEIDA², Ricardo José dos SANTOS²,
Maria Inês GENOVESE², Franco Maria LAJOLO^{2,*}

RESUMO

A atividade antioxidante de extratos de frutas (acerola, amora, açaí e morango) e compostos puros foi avaliada por meio de dois métodos: sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais livres (DPPH[•] - 2,2-difenil-1-picrilhidrazila). As metodologias foram previamente adaptadas para a realização em microplacas, de forma a reduzir a quantidade de reagentes e amostras necessárias, aumentar o número de análises simultâneas e permitir a automatização das leituras de absorbância. Os resultados mostraram que a atividade antioxidante dos extratos metanólicos dos frutos estava de acordo com a apresentada pelos compostos puros, isto é ácido ascórbico e compostos fenólicos, nos dois sistemas. O extrato de acerola, devido ao seu alto conteúdo de vitamina C, comportou-se como pró-oxidante e os de açaí, amora e morango como antioxidantes no sistema β -caroteno/ácido linoléico. Entretanto, quando avaliado pelo método de seqüestro de radicais livres, o extrato de acerola apresentou a maior atividade antioxidante, seguido pelos extratos de amora, açaí e morango. As adaptações realizadas nos métodos de avaliação de atividade antioxidante utilizando microplaca permitiram a realização de múltiplas análises simultâneas, além de minimizar significativamente o uso de reagentes e amostras.

Palavras-chave: antioxidante, frutas, DPPH[•], β -caroteno, microplaca, fenólicos.

SUMMARY

EVALUATION OF THE ANTIOXIDANT ACTIVITY USING THE β -CAROTENE/LINOLEIC ACID SYSTEM AND THE DPPH SCAVENGING METHOD. The antioxidant activity of fruit extracts (acerola, açaí, black-berry and strawberry) and pure compounds has been analysed by two methods: β -carotene/linoleic acid and DPPH[•](2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging assay. First, those methodologies were adapted to be performed in microplates, in order to reduce the sample and reagent amounts, to increase the number of simultaneous analyses and to automate absorbance lectures. The results showed that the antioxidant activity of the fruit extracts was in accordance with those of pure ascorbic acid and phenolic compounds, in the two systems. The acerola extract, due to its high vitamin C content, acted as pro-oxidant, but açaí, black-berry and strawberry extracts acted as antioxidants in β -carotene/linoleic acid system. However, by the DPPH[•] radical scavenging assay the acerola extract presented the highest antioxidant activity, followed by açaí, black-berry and strawberry. The adaptation of methods to evaluate the antioxidant activity using microplate allowed the realization of multiple analyses simultaneously and minimized significantly the use of reagents and samples.

Keywords: antioxidant, fruit, DPPH[•], β -carotene, microplate, phenolics.

1 - INTRODUÇÃO

Os radicais de oxigênio (radicais hidroxila e peroxila) e o ânion superóxido têm um papel importante nas reações bioquímicas/fisiológicas do corpo humano. No entanto, se houver produção excessiva de radicais de oxigênio durante os processos patofisiológicos ou devido a fatores ambientais adversos e não existirem antioxidantes disponíveis *in vivo*, podem ocorrer doenças e danos profundos em tecidos [1, 2].

Antioxidantes são substâncias que retardam a velocidade da oxidação, através de um ou mais mecanismos, tais como inibição de radicais livres e complexação de metais [3]. Eles podem ser sintéticos ou naturais e, para serem utilizados em alimentos, devem ser seguros para a saúde. Alguns dos antioxidantes sintéticos mais importantes são hidroxianisol de butila (BHA) e o hidroxitolueno de butila (BHT) e entre os naturais destacam-se ácido ascórbico, vi-

tamina E e β -caroteno [4]. Os compostos fenólicos também são potentes antioxidantes, podendo agir como redutores de oxigênio singlete, atuando nas reações de oxidação lipídica, assim como na quelação de metais [5, 6]. Compostos antioxidantes estão naturalmente presentes em frutas, sendo que algumas apresentam altas concentrações de determinados grupos [7, 8]. A acerola apresenta grandes concentrações de ácido ascórbico enquanto que em morango, amora e açaí, predominam determinados grupos de flavonóides como antocianinas, flavonóis e flavonas [9, 10, 11, 12, 13].

Diversas técnicas têm sido utilizadas para determinar a atividade antioxidante *in vitro*, de forma a permitir uma rápida seleção de substâncias e/ou misturas potencialmente interessantes, na prevenção de doenças crônico-degenerativas. Dentre estes métodos destacam-se o sistema de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoléico e o método de seqüestro de radicais livres, tais como DPPH[•] - 2,2-difenil-1-picrilhidrazila. O método de oxidação do β -caroteno/ácido linoléico avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoléico. O método está fundamentado em medidas espectrofotométricas da descoloração (oxidação) do β -caroteno induzida pelos produtos de degradação oxidativa do ácido linoléico [14,15]. Igualmente ao sistema β -caroteno/ácido linoléico,

¹Recebido para publicação em 24/10/2005. Aceito para publicação em 28/4/2006 (001624)

²Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo (SP)

E-mail: fmlajolo@usp.br

*A quem a correspondência deve ser enviada

o método de radicais livres está baseado no descoramento de uma solução composta por radicais estáveis DPPH• de cor violeta quando da adição de substâncias que podem ceder um átomo de hidrogênio [2, 16]. Entretanto, o primeiro método determina a atividade de uma amostra ou composto de proteger um substrato lipídico da oxidação, enquanto que o método de inibição de radicais DPPH• baseia-se na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um oxidante. Estas metodologias utilizam quantidades significativas de reagentes, padrões e amostras, e apresentam limitações em relação ao número de análises simultâneas que podem ser realizadas.

A separação e a identificação de compostos antioxidantes, tais como os compostos fenólicos, através de técnicas que empregam extração em fase sólida (EFS) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), torna necessária a utilização de métodos que avaliem grandes números de amostras e principalmente em quantidades reduzidas. A proposta do presente trabalho foi avaliar a atividade antioxidante de compostos puros e extratos de frutas, por meio de dois métodos, com o objetivo de otimizar a velocidade de aquisição de dados, reduzindo também as quantidades de reagentes e de amostras.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Material

Os frutos *in natura* de açaí (*Euterpe oleracea* Martius), acerola (*Malpighia glabra* L.), amora (*Rubus* L.) e morango (*Fragaria x ananassa* Duch.) foram adquiridos na Ceagesp (Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo) em estágio maduro, prontos para consumo. Após os frutos serem lavados em água corrente, foram cortados em pedaços, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -80°C até o momento das análises, quando foram triturados e homogeneizados em gral com pistilo, sob nitrogênio líquido.

Todos os reagentes e solventes utilizados foram de grau analítico. Os padrões de ácido ascórbico, ácido clorogênico (ácido 5-O-cafeoilquinico), ácido elágico, ácido gálico, ácido linoléico, hidroxianisol de butila (BHA), hidroxitolueno de butila (BHT), catequina, β-caroteno, DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), monopalmítico de polioxi-etilenosorbitana (Tween 40) e quercetina foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, EUA). O padrão de rutina foi obtido da Merck (Darmstadt, Alemanha). Todos os padrões foram preparados na concentração de 1 mM em metanol.

2.2 - Métodos

2.2.1 - Preparo dos extratos dos frutos

A extração foi realizada em duplicata homogeneizando-se 1 g de amostra em 20 mL de metanol 70% em Ultra-Turrax (Polytron®-Kinematica Gmbh, Kriens-Luzern, Suíça), por 1 min em velocidade média, em banho de gelo. O extrato obtido foi filtrado utilizando-se papel de filtro Whatman nº 6. O resíduo

foi re-extraído com o mesmo volume de solvente, sendo filtrado em seguida. Os extratos obtidos foram reunidos, ajustando-se o volume final para 50 mL com metanol 70%.

2.2.2 - Determinação da atividade antioxidante utilizando-se sistema β-caroteno/ácido linoléico

Este método foi originalmente descrito por MARCO [14] e posteriormente modificado por MILLER [15]. Para o preparo da mistura reativa, adicionou-se 20 µL de ácido linoléico, 200 mg de Tween 40, 25 µL de solução de β-caroteno a 2 mg/mL em clorofórmio e 500 µL de clorofórmio em erlenmeyer. Posteriormente, a mistura foi submetida à completa evaporação do clorofórmio sob nitrogênio. A esta mistura isenta de clorofórmio, adicionou-se cerca de 25 mL de água previamente saturada com oxigênio durante 30 min e agitou-se vigorosamente.

A mistura reativa, assim preparada, apresentou-se límpida com absorvância entre 0,6 e 0,7 em 470 nm. Para determinar as absorvâncias, utilizou-se uma microplaca de poliestireno com 96 cavidades (Costar, Cambridge, MA), para uso em comprimento de onda entre 340 e 800 nm. Em cada cavidade da microplaca foram adicionados 250 µL desta mistura reativa e 10 µL de metanol (controle) ou o mesmo volume para as soluções padrão ou extratos das amostras.

A placa foi incubada a 45°C para acelerar as reações de oxidação e iniciar o descoramento do β-caroteno. As leituras das absorvâncias foram realizadas imediatamente e com intervalos de 15 min, durante 120 min, em espectrofotômetro de microplaca Benchmark Plus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). As análises foram realizadas em triplicatas e assim como os padrões, as amostras foram diluídas para assegurar que as leituras estivessem na faixa linear da curva padrão. As curvas foram preparadas com 100, 200, 300, 400, 500 e 600 µmoles de ácido ascórbico, 25, 50, 100, 150 e 200 µmoles de BHA e BHT e 150, 300, 450, 600 e 750 µmoles de quercetina.

Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição da oxidação, que foi calculada em relação ao decaimento da absorvância do controle (Ac), e deve ser menor que 0,2 para ser considerado que houve 100% de oxidação, após 120 min de reação. Eventualmente, se a absorvância não for menor que 0,2, deve-se aumentar a concentração do ácido linoléico (agente oxidante), aumentando-se também proporcionalmente a concentração do Tween 40 (agente emulsificante). A queda da absorvância das amostras (Aam) foi correlacionada com a queda do controle, obtendo-se a porcentagem de inibição da oxidação (% I) através da Equação 1:

$$Ac = Abs_{\text{inicial}} - Abs_{\text{final}}$$

$$Aam = Abs_{\text{inicial}} - Abs_{\text{final}}$$

$$\% I = \frac{Ac - Aam}{Ac} \times 100 \quad (1)$$

A eficiência do antioxidante foi também expressa através dos valores de F1 e F2, de acordo com YANISHILIEVA & MARINOVA [17], calculados a partir da curva de oxidação (absorbância a 470 nm vs tempo em min). A eficiência em bloquear a reação em cadeia, através da interação com os radicais peróxidos, foi mensurada na primeira parte da curva (entre 15 e 45 min após o início da reação). A relação entre as tangentes das curvas da solução padrão e do controle expressa a eficiência do antioxidante (F1) (Equação 2):

$$F1 = \frac{\text{tg solução padrão}}{\text{tg controle}} \quad (2)$$

A possibilidade de o antioxidante participar de outras reações durante o processo oxidativo foi medida durante a segunda parte da curva (entre 75 e 90 min após o início da reação), através da relação entre as tangentes das curvas cinéticas da solução padrão e do controle (F2) (Equação 3):

$$F2 = \frac{\text{tg solução padrão}}{\text{tg controle}} \quad (3)$$

2.2.3 – Determinação da atividade antioxidante através do método de seqüestro de radicais livres (DPPH•)

A atividade antioxidante foi determinada através da capacidade dos antioxidantes presentes nas amostras em seqüestrar o radical estável DPPH• [16]. Foi preparada uma solução metanólica de DPPH• a 20 mg/mL, de forma a apresentar absorbância em 517 nm entre 0,6 e 0,7.

As determinações foram realizadas adicionando-se em cada cavidade da microplaca 250 µL da solução de DPPH• e 40 µL de metanol para o controle, ou o mesmo volume para as soluções padrões (BHA, BHT, ácido ascórbico, ácido clorogênico e quercetina) e extratos das amostras. As leituras das absorbâncias foram realizadas após 25 min de reação em espectrofotômetro de microplaca com incubação a 25°C. As análises foram realizadas em triplicatas.

O decaimento da absorbância das amostras (Aam) correlacionado ao decaimento da absorbância do controle (Ac) resulta na porcentagem de seqüestro de radicais livres (% SRL), que pode ser expressa através da Equação 4:

$$\% \text{ SRL} = \frac{Ac - Aam}{Ac} \times 100 \quad (4)$$

Uma curva de calibração foi preparada com 20, 40, 80, 120 e 160 µmoles de BHT e os resultados foram expressos em µmoles equivalentes de BHT/g amostra.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao se determinar a atividade antioxidante pelo siste-

ma β-caroteno/ácido linoléico utilizando-se microplaca de poliestireno com 96 cavidades, ocorreu uma expressiva redução do uso de reagentes e de amostras. No método tradicional, o volume pode chegar até 5 mL de reagente, dependendo da cubeta utilizada para se efetuar as leituras no espectrofotômetro [18]. Como na microplaca a capacidade máxima de cada cavidade é de 350 µL, padronizou-se um volume de 250 µL para a solução reativa e de 10 µL para amostras, controle ou padrões. Essa redução foi de 95%. No método de seqüestro de radicais livres (DPPH•), a redução de reagentes foi semelhante à do sistema β-caroteno/ácido linoléico.

Outra grande dificuldade apresentada pelo método original é a necessidade de grande quantidade de cubetas para que se possam realizar as replicatas e os ensaios com soluções padrão. Com a microplaca foi possível realizar, simultaneamente, análises de várias amostras e padrões em uma só placa.

O sistema β-caroteno/ácido linoléico requer leituras das amostras de 15 em 15 min durante 120 min. No método original pode ocorrer variação nos intervalos dependendo da destreza do analista ocasionando falhas na precisão das leituras. As leituras no leitor de microplaca são automáticas e seqüenciais, ocorrendo maior precisão, não requisitando a presença do analista durante o ensaio. O leitor de microplaca ao final do período do ensaio reproduz os resultados das leituras em planilhas, evitando-se assim erros nas leituras das amostras e reduzindo o tempo gasto do analista no registro das análises. Desta forma, a adaptação de ambas as metodologias para realização em microplacas com leituras automatizadas mostrou-se extremamente vantajosa.

3.1 - Determinação da atividade antioxidante pelo sistema β-caroteno/ácido linoléico

Inicialmente foram testadas soluções padrões dos antioxidantes BHA, BHT, quercetina e ácido ascórbico. Os padrões sintéticos (BHA, BHT) foram escolhidos por sua ampla utilização na indústria alimentícia, enquanto que os naturais, por estarem normalmente presentes em frutas e vegetais [4, 19, 20, 21].

Os resultados mostraram (Figura 1) que o BHA apresentou maior eficiência em comparação ao BHT em concentrações reduzidas, mas acima de 50 µmoles ocorreu o inverso. Diferentemente do observado para a quercetina, BHA e BHT não apresentaram linearidade em suas curvas (Figura 1), devido à existência de várias etapas na oxidação (iniciação, propagação e fase terminal) e também pelas particularidades dos antioxidantes [22, 23].

O ácido ascórbico é amplamente conhecido por sua atividade antioxidante e por isso é utilizado em cosméticos ou em tratamentos de doenças degenerativas [24]. O ácido ascórbico no sistema β-caroteno/ácido linoléico apresentou atividade pró-oxidante, neste caso, representada pela porcentagem de inibição negativa (Figura 2). Nas cinco concentrações analisadas, o ácido ascórbico apresentou

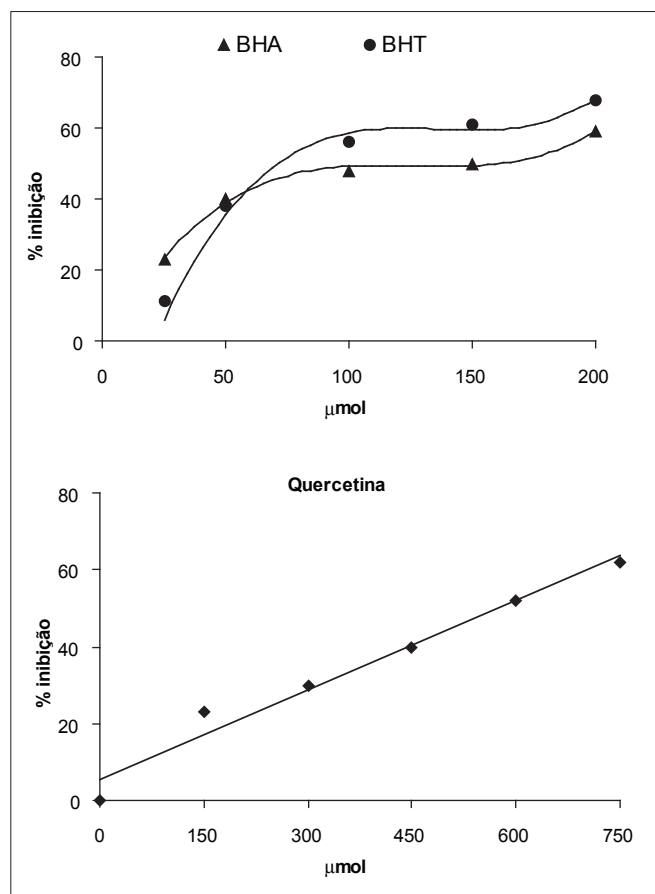


FIGURA 1 – Curva de atividade antioxidante dos padrões de BHA, BHT e quercetina, determinada utilizando-se o sistemas β -caroteno/ácido linoléico

atividade pró-oxidante e esta foi proporcional à concentração. Isso ocorreu porque o ácido ascórbico, após doar os dois hidrogênios redutores, ficou passível de receber elétrons, devido ao radical ascorbila formado, que é um agente oxidante [25]. A atividade pró-oxidante do ácido ascórbico no sistema β -caroteno/ácido linoléico, assim como no método do lipossomo, foi previamente relatada por HASSIMOTO *et al.* [26].

A seguir, os compostos fenólicos mais freqüentemente encontrados nos vegetais [8] foram avaliados em relação a sua atividade antioxidante (Tabela 1). Para que os compostos fenólicos sejam considerados antioxidantes e possam exercer seu papel biológico é necessário que, em baixa concentração, sejam capazes de impedir, retardar e prevenir a auto-oxidação ou oxidação mediada por radicais livres e que o produto formado após a reação seja estável [4]. Os resultados mostraram que a quercetina apresentou maior porcentagem de inibição, mesmo em menor concentração. Isso ocorre devido à quercetina ser um flavonol com cinco hidroxilas fenólicas reativas, sendo que duas destas estão ligadas ao anel B (anel que possui maior atividade redutora), apresentando estabilidade por ressonância [27].

A rutina possui uma estrutura semelhante à da quercetina, mas com uma substituição glicosídica em uma das

hidroxilas, por essa razão, apresenta uma menor atividade, demonstrando a sensibilidade do método frente a pequenas alterações na estrutura da molécula. Dentre os ácidos fenólicos analisados, apenas o ácido clorogênico apresentou baixa atividade antioxidante, resultado esperado em virtude do ácido clorogênico possuir poucas hidroxilas redutoras [28].

TABELA 1 – Atividade antioxidante de compostos fenólicos determinada através do sistema β -caroteno/ácido linoléico

Padrões	% I	F1	F2
ácido clorogênico (900 μ M)	25 \pm 3	0,64 \pm 0,04	0,85 \pm 0,02
ácido elágico (1.100 μ M)	34 \pm 1	0,54 \pm 0,04	0,78 \pm 0,02
ácido gálico (1.000 μ M)	41 \pm 3	0,50 \pm 0,05	0,64 \pm 0,02
catequina (700 μ M)	34 \pm 4	0,57 \pm 0,01	0,75 \pm 0,04
quercetina (540 μ M)	42 \pm 4	0,50 \pm 0,07	0,67 \pm 0,07
rutina (1.600 μ M)	28 \pm 2	0,62 \pm 0,04	0,84 \pm 0,02

Os resultados estão expressos na forma de média \pm desvio padrão (n=3); % I – porcentagem de inibição; F1 – relação entre as tangentes das curvas cinéticas da solução-padrão e o controle entre 15 e 75 min; F2 – relação entre as tangentes das curvas cinéticas da solução-padrão e o controle entre 105 e 165 min

A determinação do decaimento da absorbância a 470 nm (descoramento do β -caroteno) com o tempo de reação (Figura 3) permitiu o cálculo dos valores de F1 e F2, os quais forneceram dados adicionais sobre a atividade antioxidante. De acordo com os resultados (Tabela 1), a atuação dos compostos fenólicos como antioxidantes foi mais eficiente no bloqueio da formação de peróxidos (F1), lembrando que, quanto mais próximos os valores de F1 e F2 estiverem de 1, menor será a atividade antioxidante. A rutina e os ácidos clorogênico e elágico apresentaram baixa atividade antioxidante, principalmente na segunda etapa da cinética de oxidação (F2).

A partir dos dados obtidos, procedeu-se à avaliação da atividade antioxidante dos extratos metanólicos obtidos a partir de frutas. Das quatro frutas utilizadas (morango, acerola, açaí e amora) para esse ensaio, apenas a acerola, conhecida por ter altas concentrações em ácido ascórbico [9], apresentou atividade pró-oxidante (Figura 4) corroborando os dados obtidos com a substância pura (Figura 2). Por outro lado, as amostras de morango, de amora e de açaí que contêm maiores concentrações de

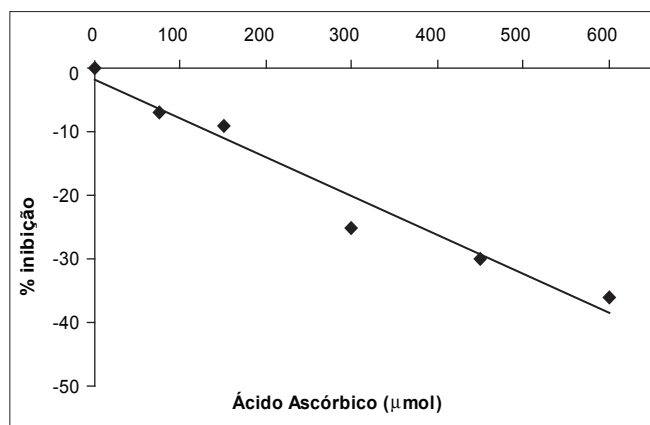


FIGURA 2 – Curva de atividade antioxidante do ácido ascórbico determinada utilizando-se o sistema β -caroteno/ácido linoléico

flavonóides e outros compostos fenólicos apresentaram atividades antioxidantes elevadas (*Figura 4*), o que estaria de acordo com os resultados obtidos para as substâncias isoladas (*Tabela 1*).

Uma correlação negativa entre a atividade antioxidante (ORAC) e o teor de ascorbato foi encontrada em morango, mirtilo e framboesa, porém a atividade antioxidante correlacionou-se positivamente com o teor de antocianinas e fenólicos totais [29].

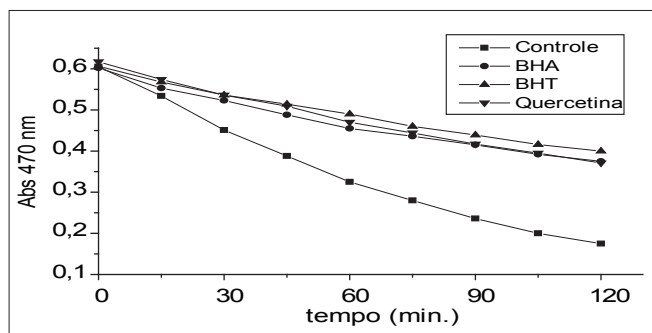


FIGURA 3 – Curva do decoloramento do β -caroteno na presença de BHT (20 μ g/mL), BHA (20 μ g/mL), quercetina (200 μ g/mL) e do controle

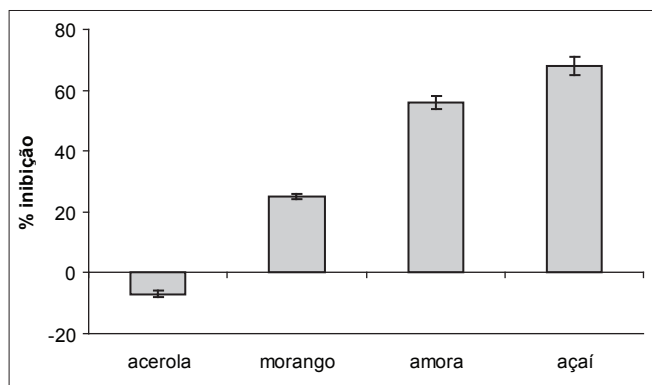


FIGURA 4 – Atividade antioxidante da acerola, do morango, da amora e do açaí determinada pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico

3.2. Atividade antioxidante através do método de seqüestro de radicais livres (DPPH•)

Este método se baseia na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um radical livre, o DPPH•, que ao se reduzir perde sua coloração púrpura. Desta forma, avalia apenas o poder redutor do antioxidante, que ao doar um elétron se oxida, e por este motivo não detecta substâncias pró-oxidantes. O ácido ascórbico, por exemplo, no sistema β -caroteno/ácido linoléico apresentou atividade pró-oxidante (*Figura 2*), devido à formação do radical ascorbila, mas neste sistema o radical não interfere na reação (*Figura 5*). Assim como observado no sistema β -caroteno/ácido linoléico, a quercetina apresentou a maior porcentagem de seqüestro de radicais livres em comparação aos padrões sintéticos BHA e BHT.

Este método se baseia na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um radical livre, o DPPH•, que ao se reduzir perde sua coloração púrpura. Desta forma, avalia apenas o poder redutor do antioxidante, que ao doar um elétron se oxida, e por este motivo não detecta substâncias pró-oxidantes. O ácido ascórbico, por exemplo, no sistema β -caroteno/ácido linoléico apresentou atividade pró-oxidante (*Figura 2*), devido à formação do radical ascorbila, mas neste sistema o radical não interfere na reação (*Figura 5*). Assim como observado no sistema β -caroteno/ácido linoléico, a quercetina apresentou a maior porcentagem de seqüestro

As amostras dos frutos através deste método apresentaram um perfil diferente daquele observado no método anteriormente descrito (*Figura 5*). A acerola apresentou a maior capacidade de seqüestro de radicais livres. Esta capacidade deve-se quase que, exclusivamente, ao alto teor de ácido ascórbico presente nestas amostras, comprovando que ao contrário do ocorrido no sistema β -caroteno/ácido linoléico, o ácido ascórbico possui atividade antioxidante neste sistema. O açaí, que apresentou a maior porcentagem de inibição da oxidação no sistema β -caroteno/ácido linoléico, teve uma atividade inferior quando comparado à acerola e amora. O morango apresentou a menor atividade em ambos os métodos (*Figura 6*).

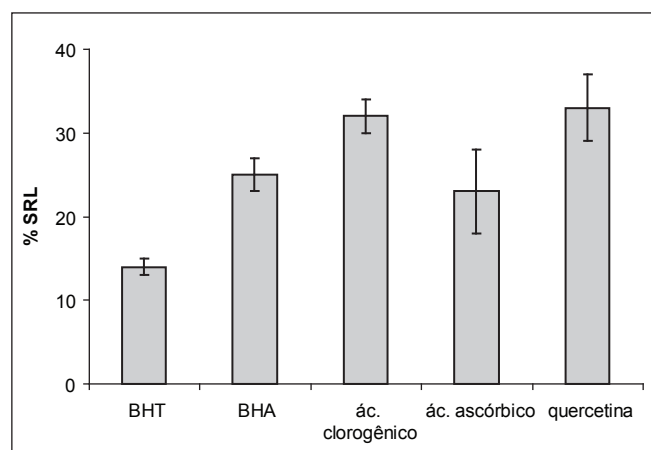


FIGURA 5 – Atividade antioxidante expressa pela porcentagem de seqüestro de radicais DPPH• (% S.R.L.) das soluções padrão a 50 μ M

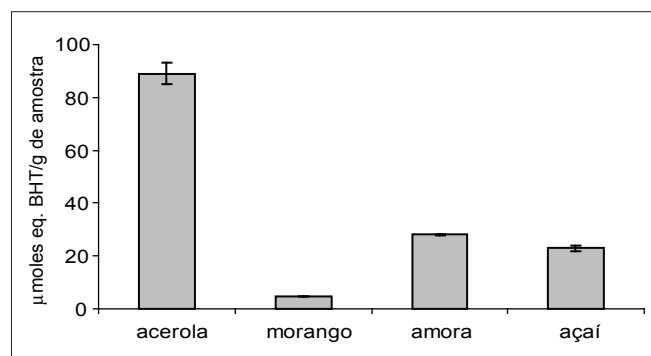


FIGURA 6 – Avaliação da atividade antioxidante das amostras de frutos utilizando o método de seqüestro de radicais DPPH•

4 - CONCLUSÕES

A atividade antioxidante dos extratos das frutas mostrou-se de acordo com a dos padrões analisados, tornando possível uma analogia entre os dados. No sistema β -caroteno/ácido linoléico, o extrato de acerola comportou-se como pró-oxidante e o açaí, a amora e o morango comportaram-se como antioxidantes. No método de seqüestro de radicais livres, o extrato de acerola apresentou a maior atividade antioxidante, seguido pelos extratos de amora, açaí e morango.

Este comportamento foi relacionado ao do ácido ascórbico nos dois sistemas. As adaptações dos métodos para avaliar a atividade antioxidante utilizando microplaca permitiram a realização de múltiplas análises, minimizaram o uso de reagentes e reduziram significativamente a quantidade de amostra necessária. A automatização das leituras de absorvância simplificou e reduziu o tempo e o trabalho despendido pelo analista, proporcionando também grande precisão nos resultados.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin J. Sci. Technol.**, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2004.
- [2] HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, n. 6, p. 1.841-1.856, 2005.
- [3] PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **J. Nat. Prod.**, v. 63, n. 7, p. 1.035-1.042, 2000.
- [4] RICE-EVANS, C.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Rad. Biol. Med.**, New York, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.
- [5] SATUÉ-GARCIA, M.T.; HEINONEN, M.; FRANKEL, E.N. Anthocyanins as antioxidants on human low-density lipoprotein and lecithin-liposome systems. **J. Agric. Food Chem.**, v. 45, n. 9, p. 3.362-3.367, 1997.
- [6] HOPIA, A.; HEINONEN, M. Antioxidant activity of flavonoid aglycones and their glycosides in methyl linoleate. **J. Am. Oil Society**, v. 76, p. 139-144, 1999.
- [7] HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 481-504, 2000.
- [8] ARABBI, P.R.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil end estimated by the Brazilian population. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 1.124-1.131, 2004.
- [9] ASSIS, S.A.; LIMA, D.C.; OLIVEIRA, O.M.M.F. Activity of pectinmethylesterase, pectin content and vitamin C in acerola fruit at various stages of fruit development. **Food Chem.**, v. 74, p. 133-137, 2001.
- [10] CORDENUNSI, B.R.; GENOVESE, M.I.; NASCIMENTO, J.R.O.; HASSIMOTTO, N.M.A.; SANTOS, R.J.; LAJOLO, F.M. Effects of temperature on the chemical composition and antioxidant activity of three strawberry cultivars. **Food Chem.**, v. 91, p. 113-121, 2005.
- [11] ASSIS, S.A.; LIMA, D.C.; OLIVEIRA, O.M.M.F. Activity of pectinmethylesterase, pectin content and vitamin C in acerola fruit at various stages of fruit development. **Food Chem.**, v. 74, p. 133-137, 2001.
- [12] MAATTA-RIIHINEN, K.R.; KAMAL-ELDIN, A.; TORRONEN, A.R. Identification and quantification of phenolic compounds in berries of *Fragaria* and *Rubus* species (family *Rosaceae*). **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, n. 20, p. 6.178-6.187, 2004.
- [13] POZO-INSFRAN, D.D.; BRENES, C.H.; TALCOTT, S.T. Phytochemical composition and pigment stability of açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, n. 6, p. 1.539-1.545, 2004.
- [14] MARCO, G.J. A rapid method for evaluation of antioxidants. **J. Am. Oil Society**, v. 45, p. 594-598, 1968.
- [15] MILLER, H.E. A simplified method for the evaluation of antioxidant. **J. Am. Oil Society**, v. 48, p. 91, 1971.
- [16] BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm. Wiss. Technol.**, v. 28, p. 25-30, 1995.
- [17] YANISHILIEVA, N.V.I.; MARINOVA, E.M. Effects of antioxidants on the stability of triacylglycerols and methyl esters of fatty acids of sunflower oil. **Food Chem.**, v. 54, p. 377-382, 1995.
- [18] PANOVSKA, T.K.; KULEVANOVA, S.; STEFOVA, M. *In vitro* antioxidant of some *Teucrium* species (*Lamiaceae*). **Acta Pharm.**, v. 55, p. 207-214, 2005.
- [19] SAIJA, A.; SCALESE, M.; LANZA, M.; MARZULLO, D.; BONINA, F.; CASTELLI, F. Flavonoids as antioxidants agents: importance of their interaction with biomembranes. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 19, n. 4, p. 481-486, 1995.
- [20] RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends Plant Sci.**, v. 2, p. 152-159, 1997.
- [21] KAO, E.; WANG, C.; LIN, W.; YIN, Y.; WANG, C.; TSENG, T. Anti-inflammatory potential of flavonoid contents from dried fruit *Crataegus pinnatifida* *in vitro* and *in vivo*. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, n. 2, p. 430-436, 2005.
- [22] SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications.** Lancaster. Technomic Publishing Co., p. 235-273, 1995.
- [23] DEMANN, J.M. **Principles of food chemistry.** Gaithersburg, Maryland. Aspen Publishers, Inc., 3rd ed., 520 p., 1999.
- [24] IRACHE, J.M.; EZPELETA, I.; VEGA, F.A. HPLC determination of antioxidant synergists and ascorbic acid in some fatty pharmaceuticals, cosmetics and food. **Chromatographia**, v. 35, n. 3-4, p. 232-236, 1993.
- [25] BORS, W.; BUETTNER, G.R. The vitamin C radical and its reactions In: Packer, L. and Fuchs, J. **Vitamin C in Health and Disease.** New York, Marcel Dekker, Inc., 1997, cap. 4, p. 75-94.
- [26] HASSIMOTO, N.M.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, n. 8, p. 2.928-2.935, 2005.
- [27] CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. **J. Mass Spectrom.**, v. 39, p. 1-15, 2004.

- [28] PANNALA, A.S.; CHAN, T.S.; O'BRIEN, P.J.; RICE-EVANS, C.A. Flavonoid b-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 282, n. 5, p. 1.161-1.168, 2001.
- [29] KALT, W.; FORNEY, C.F.; MARTIN, A.; PRIOR, R.L. Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits. **J. Agric. Food Chem.**, v. 47, n. 11, p. 4.638-4.644, 1999.

6 - AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Adair Vieira Júnior e a Alexandre Rodrigues Lobo pelo auxílio técnico e valiosas sugestões, e ao CNPq, à Capes e à Fapesp, pelo suporte financeiro.