

## Atividade Antioxidante de Extrato de Fruto de Aroeira (*Schinus terebenthifolius* Raddi) Antioxidant Activity of Extracts from Fruit of Aroeira (*Schinus terebenthifolius* Raddi)

DEGÁSPARI, C. H.\*<sup>1</sup>; WASZCZYNSKYJ, N.<sup>2</sup>; SANTOS, R. J. dos<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Aluna do Doutorado em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná,

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná.

<sup>3</sup> Aluno do Mestrado em Ciência de Alimentos, Universidade de São Paulo.

Recebido em: 07/2004 Aprovado em: 08/2004

### RESUMO

Este trabalho teve como objetivo analisar a atividade antioxidante de extratos aquoso e alcoólico obtidos a partir dos frutos da *Schinus terebenthifolius* Raddi ou aroeira-vermelha, diretamente ligados à quantidade de compostos fenólicos existentes nestes extratos. Os frutos da aroeira apresentam um teor intermediário de compostos fenólicos: inferior a frutos, porém superior a grãos, sendo de 88 µg de catequina/ g de amostra base seca para o extrato obtido pela extração em água quente (extrato aquoso) e 685 µg de catequina/ g de amostra base seca para o extrato obtido pela extração em etanol absoluto (extrato alcoólico). O extrato alcoólico se mostrou com a presença da flavona apigenina, além de ácido elágico. Já o extrato aquoso apresentou a flavanona naringina. Quanto ao seu poder antioxidante, pode-se concluir que os poderes antioxidantes de ambos os extratos são bons, quando se compara aos poderes antioxidantes dos comumente empregados BHT (butil-hidroxi-tolueno) e BHA (butil-hidroxi-anisol), visto que se trata de extratos vegetais, cujo poder antioxidante é, em geral, mais fraco que os antioxidantes artificiais. No caso do extrato alcoólico, o mesmo apresentou um poder antioxidante quatro vezes menor que o BHT e o BHA. O extrato aquoso, por sua vez, apresentou um poder antioxidante seis vezes menor que o BHT e o BHA. PALAVRAS-CHAVE: Atividade antioxidante, Compostos fenólicos, *Schinus terebenthifolius*.

### ABSTRACT

This work had as objective analyzes the antioxidant activity of aqueous and alcoholic extracts obtained from of the *Schinus terebenthifolius* Raddi fruits or aroeira-vermelha, directly linked to the amount of phenolics compouds existent in these extracts. The aroeira fruits present an intermediate quantity of phenolics compouds: inferior to fruits, however superior to grains, being of 88 µg of catequine/ g of sample dry base for the extract obtained by the extraction in hot water (aqueous extract) and 685 µg of catequine/ g of sample dry base for the extract obtained by the extraction with absolute etanol (alcoholic extract). The alcoholic extract was shown with the presence of the flavone apigenin, besides elagic acid, while in the aqueous extract was observed the flavanone naringine. As for its antioxidant power, it can be concluded that the antioxidant powers of both extracts are good, when it is compared to the antioxidant powers of the commonly used BHT (butylated hydroxytoluene) and BHA (butylated hydroxyanisole), because it is vegetable extracts, whose antioxidant power is, in general, weaker than the artificial antioxidants. In the case of the alcoholic extract, the same presented a power antioxidant four times smaller than BHT and BHA. The aqueous extract, for its time, presented a power antioxidant six times smaller than BHT and BHA.

KEY WORDS: Antioxidant activity, Phenolics compouds, *Schinus terebenthifolius*.

### INTRODUÇÃO

A *Schinus terebenthifolius* Raddi, popularmente conhecida como aroeira-vermelha, é uma árvore de folhas perenes, originária da América do Sul, especialmente do Brasil, Paraguai e Argentina. Os frutos são do tipo drupa e têm coloração verde no início e depois se tornam vermelhos. Essa casca vermelha seca que se transforma em uma espécie de concha de papel que envolve a semente. A semente é única, marrom escura e mede cerca de 0,3 milímetros de diâmetro (BORNHAUSEN, 2002; USP, 2002).

Este pequeno fruto inscreve-se entre as muitas especiarias existentes e que são utilizadas essencialmente para acrescentar sabor e refinamento aos pratos da culinária mundial. O sabor suave e levemente picante do fruto da aroeira-vermelha, bem como sua bonita aparência, de uso decorativo, permite o seu emprego em diversas preparações, podendo ser utilizada na forma de grãos inteiros ou moídos. No entanto, a aroeira é especialmente

apropriada para a confecção de molhos que acompanham as carnes brancas, de aves e peixes, por não abafar o seu gosto sutil USP, 2002).

As partes utilizadas que apresentam propriedades medicinais são: casca, folhas e frutos. É adstringente, anti-diarréica, anti-inflamatória, depurativa, diurética e febrífuga. Não é utilizada como componente para cosmetologia. Devido à composição de seus óleos essenciais, é usada no tratamento de distúrbios respiratórios. Popularmente, também é empregada no tratamento da diarreia, inflamações, para promover a transpiração e a eliminação de líquidos. A casca da aroeira tem ação contra febre, hemoptises e afecções uterinas em geral. Da casca extrai-se um óleo empregado contra tumores e doenças da córnea (BORNHAUSEN, 2002).

As matérias-primas *in natura* disponíveis em frutas, vegetais em geral e condimentos contém numerosos fitoquímicos além dos compostos fenólicos como por exemplo: compostos nitrogenados, carotenóides, ácido ascórbico e tocoferóis. Muitos destes fitoquímicos apresentam significativa capacidade antioxidante e são associados à baixa incidência e baixa mortalidade de câncer em seres humanos (YILDIRIM et al., 2001; ZHENG e WANG, 2001; BIRCH et al., 2001; SLUIS et al., 2001; TOMÁS-BARBERÁN et al., 2001; WANG e ZHENG, 2001; WATANABE, 1998; VINSON et al., 2001).

A partir do início dos anos 80, o interesse em encontrar antioxidantes naturais para o emprego em produtos alimentícios ou para uso farmacêutico, tem aumentado consideravelmente, com o intuito de substituir antioxidantes sintéticos, os quais tem sido restringidos devido ao seu potencial de carcinogênese, bem como pela comprovação de diversos outros males como: aumento do peso do fígado e significativa proliferação do retículo endoplasmático (YILDIRIM et al., 2001; ZHENG e WANG, 2001; MELO e GUERRA, 2002; SIMÃO, 1985).

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material botânico e obtenção dos extratos

A atividade e a concentração de antioxidantes fenólicos em frutos de aroeira foram estudadas neste trabalho. Os frutos obtidos foram cuidadosamente selecionados evitando-se o topo e as partes mais baixas da árvore. Este procedimento foi adotado devido ao fato de que a concentração total de flavonóides é muito menor na ausência de luz. A colheita se deu no mês de fevereiro de 2004 (período de frutificação de janeiro a junho), a partir de um exemplar da *Schinus terebenthifolius* Raddi já adulta situada em latitude sul 25° 25' 36,8" , longitude oeste 49° 17' 51,0" e altitude de 892 metros. O material colhido foi limpo de sujidades, sendo selecionados apenas os frutos maduros com coloração variando do rosa ao vermelho. Os frutos verdes foram descartados visto que trata-se de uma fruta não climatérica.

Os frutos foram secos em estufa estática numa temperatura de 50° C por 96 horas até a redução total da umidade (umidade inicial de 39%). Após a secagem obteve-se um total de 300 g de material seco. Os frutos secos foram moídos em um moinho microtritador (IKA Labortechnik) até uma granulometria aproximada de 32 mesh. Após moídos, os frutos foram submetidos à extração com éter de etílico em aparelho Soxhlet (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985), visando a retirada de substâncias lipídicas (teor de lipídios da fruta de 15% em base seca ou 12% base úmida) (BIRCH et al., 2001).

Após evaporação natural do éter, a amostra foi dividida em duas partes distintas e

iguais de 150 g, e partiu-se para a extração dos compostos fenólicos com dois solventes distintos: etanol absoluto PA (99,7% de pureza) e água deionizada. O emprego do metanol na fase de extração, embora seja considerado o melhor solvente para compostos fenólicos, não foi utilizado devido à sua toxicidade, sendo que o mesmo deveria ser totalmente removido depois da extração para que pudesse ser empregado como aditivo alimentício, o que dificultaria ou inviabilizaria todo o processo. Para a extração com etanol, 3 porções de 50 g de amostra foram adicionadas a 400 mL do solvente e mantidos sob agitação em "Shaker" provido de banho-maria a 20° C por 1 hora. Decorrido este tempo de extração, as amostras foram misturadas e filtradas à vácuo, obtendo-se então o extrato alcoólico. Para o extrato aquoso, 3 amostras de 50 g foram adicionadas de 400 mL de água a 50°C cada uma e mantidas sob agitação em "Shaker" provido de banho-maria a 50°C por 1 hora. Decorrido este tempo de extração, as amostras foram misturadas e peneiradas a 32 mesh (para retirar o material mais grosso), centrifugadas por 20 minutos a 3.000 rpm (para retirar o material mais fino) e filtradas à vácuo (para retirar o sobrenadante final), obtendo-se então o extrato aquoso (YILDIRIM et al., 2001; ZHENG e WANG, 2001; KÄHKÖNEN et al., 2001; CORDENUNSI et al., 2002; BURNS et al., 2001).

Do extrato alcoólico obtido, o etanol foi removido em evaporador rotatório ( $T < 50^{\circ} \text{C}$ ) (Fisatom) para obtenção do extrato seco, que foi diluído em 7 mL de metanol. O extrato aquoso foi liofilizado (Ilshin Lab Co.) numa pressão de 5 mm Hg e  $T = -50^{\circ} \text{C}$ , diluído em 30 mL de metanol e filtrado à vácuo. O extrato alcoólico e o extrato aquoso ambos diluídos em metanol, foram mantidos estocado em freezer vertical numa temperatura de  $-18^{\circ} \text{C}$  até o momento de utilização nas análises (SLUIS, 2001).

#### **Determinação de compostos fenólicos totais**

Foram utilizados 0,25 ml dos extratos obtidos, ou da diluição adequada dos mesmos, e adicionados 2 ml de água destilada e 0,25 ml do reagente de Folin-Ciocalteu. Após 3 min à temperatura ambiente, adicionaram-se 0,25 ml de solução saturada de carbonato de sódio, sendo os tubos colocados em banho-maria a 37° C durante 30 minutos para desenvolvimento de cor. As leituras das absorvâncias foram realizadas a 750 nm e os resultados foram expressos em mg equivalentes de catequina por g de amostra (base úmida), (ZIELINSKIE e KOZLOWSKA, 2000; GENOVESE et al., 2003).

#### **Identificação e quantificação dos compostos fenólicos**

Foi utilizado um cromatógrafo de fase reversa HP 1100 acoplado a um detetor de varredura por diodo. A coluna utilizada foi a Prodigy 5 $\mu$  ODS3 com fase reversa de sílica (250 mm x 4,6 mm, Phenomenex) e os solventes de eluição foram (A) água/ tetrahidrofurano/ ácido trifluoroacético 98:2:0,1 e (B) acetonitrila. As amostras foram injetadas em duplicata. A calibração foi feita injetando os padrões 3 vezes a 4 concentrações diferentes (CORDENUNSI et al., 2002).

#### **Determinação do índice de atividade antioxidante (sistema b-caroteno/ácido linoléico)**

Para o preparo de mistura reativa adicionaram-se 40 mg de ácido linoléico, 400 mg Tween 40, 50  $\mu\text{L}$  de uma solução de  $\beta$ -caroteno (2 mg/mL clorofórmio) e 1 mL de clorofórmio

em erlenmeyer. Após a secagem completa do clorofórmio sob nitrogênio, adicionaram-se 50 mL de água previamente saturada com oxigênio durante 30 minutos e agitou-se vigorosamente. A mistura reativa deve estar límpida e apresentar absorvância entre 0,6 e 0,7 em 470 nm. Para a reação de oxidação, utilizaram-se 2,9 mL desta mistura reativa, 100 µL de metanol para o grupo controle, ou o mesmo volume para as amostras em metanol, e colocadas em banho a 50° C. As leituras das absorvâncias foram realizadas, no início e com intervalos de 15 minutos (MARCO, 1968; MILLER, 1971).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a extração dos compostos fenólicos dos frutos da aroeira adotou-se duas metodologias distintas: extração com água quente e extração com etanol absoluto (99,7% de pureza). Estas duas substâncias empregadas na extração foram escolhidas para evitar que um possível resíduo da substância extratora pudesse interferir no grau de pureza do extrato final que será empregado como aditivo alimentício.

Com relação à quantificação dos compostos fenólicos, os mesmos foram determinados como catequina equivalente, usando a seguinte equação linear baseada na curva de calibração:

$$Y = 42,426 X + 61,262, \quad R^2 = 0,999$$

Onde Y é a absorvância e X o equivalente de catequina (µg/ml de extrato)

Encontrou-se um total de 88 mg de catequina/g de amostra base seca para o extrato obtido pela extração em água quente e 685 mg de catequina/g de amostra para o extrato obtido pela extração em etanol absoluto. Comparando-se com os dados de literatura (CORDENUNSI et al., 2002) observa-se que, a quantidade de compostos fenólicos do morango (fruta base úmida extração aquosa), varia de 1.586 µg de catequina/g a 2.892 µg de catequina/g de amostra, ou seja, quando se compara o fruto da aroeira com um fruto, considerado como fonte de compostos fenólicos, o mesmo se apresenta com uma quantidade inferior de compostos fenólicos.

Por outro lado, quando se compara a quantidade de compostos fenólicos a partir de um trabalho realizado com diferentes tipos de grãos (ZIELINSKI e KOZLOWSKA, 2000), verifica-se que os frutos da aroeira apresentam uma quantidade de compostos fenólicos mais elevada comparativamente aos grãos. Um exemplo disso é observado quando se analisa o teor de compostos fenólicos do trigo sarraceno, tido como uma fonte de excelência de compostos fenólicos. Sua composição é de 117,72 µg de catequina/g de amostra em base seca com extração metanólica.

Assim sendo, poder-se-ia considerar o fruto da aroeira como uma fonte intermediária de compostos fenólicos, superior à maioria dos grãos encontrados, porém inferior a frutos.

Quando se analisa sua atividade antioxidante, comparativamente aos clássicos BHA e BHT observa-se que sua inibição à oxidação do reagente é pequena. Para o extrato aquoso, numa concentração de 73,24 mg (equivalentes de catequina)/mL, obteve uma % de inibição de 25 +/- 1. Quando se compara ao BHA, onde se partiu de 25 mg/mL, a percentagem de inibição foi de 46 +/- 2. Para o BHT, onde se partiu de 25 mg/mL, a percentagem de inibição foi de 52 +/- 2. A partir destes dados, pode-se verificar que com uma concentração 3 vezes menor de BHA e BHT, obteve-se uma % de inibição 2 vezes maior, ou seja, o poder

antioxidante do extrato aquoso é baixo, comparativamente ao BHA e BHT, ou seja, é necessária uma quantidade 6 vezes maior do extrato aquoso para se obter o mesmo efeito antioxidante (QUADRO 01).

Ao se analisar a atividade antioxidante do extrato alcoólico, comparativamente ao BHA e BHT, partiu-se de uma concentração de 98,76 mg (equivalentes de catequina)/mL, com uma percentagem de inibição de 53 +/- 3. Novamente os dados do BHA e BHT que são de: BHA 25 mg/mL, com uma % de inibição de 46 +/- 2, os índices são novamente maiores. Para se obter o mesmo efeito antioxidante que o BHA e BHT teve-se que utilizar uma quantidade 4 vezes maior (QUADRO 01).

QUADRO 01 – Resultados da atividade antioxidante dos extratos dos frutos da *Schinus terebenthifolius* Raddi comparativamente ao BHT e BHA.

PRODUTOS	CONCENTRAÇÃO ( $\mu\text{g/mL}$ )	PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO
Extrato aquoso	73,24	25 +/- 1
Extrato alcoólico	98,76	53 +/- 3
BHT ou butil-hidroxi-tolueno	25,00	52 +/- 2
BHA ou butil-hidroxi-anisol	25,00	64 +/- 2

Assim sendo, associando-se os resultados obtidos para a quantificação de compostos fenólicos com a atividade antioxidante, pode-se concluir que o poder antioxidante de ambos os extratos são bons, quando se compara ao poder antioxidante dos conhecidos e comumente empregados BHA e BHT, visto que se trata de extratos vegetais, cujo poder antioxidante é, em geral, mais fraco que os antioxidantes artificiais.

Com relação à análise de HPLC, verificou-se que a amostra obtida a partir do extrato alcoólico apresentou a presença da flavona apigenina (quatro picos) nos tempos de retenção de 25 a 27 minutos, o que justifica a sua coloração amarelada. Os quatro picos de apigenina são em tempo de retenção diferentes, devido ao fato de estarem ligadas a açúcares distintos ou em posições diferentes. Apresentou também um pico de ácido elágico no tempo de retenção de 14 minutos, conforme exibido na FIGURA 01.

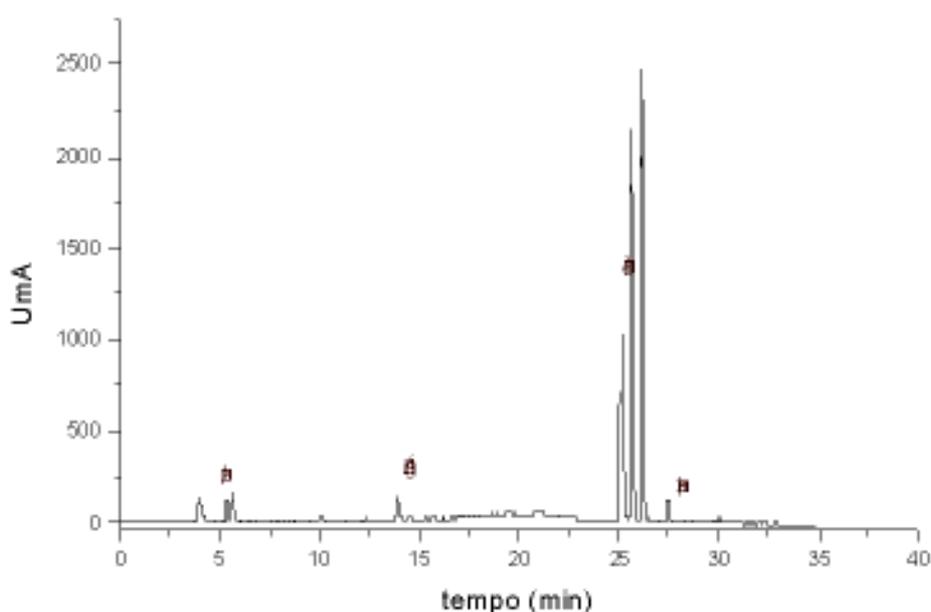


FIGURA 01 - Análise pelo HPLC do extrato alcoólico dos frutos da *Schinus terebenthifolius* Raddi.

Já a amostra obtida a partir do extrato aquoso, foi encontrada a presença da flavanona naringina no tempo de retenção de 26 minutos, conforme exibido na FIGURA 02. Concluindo-se que esta baixa quantidade encontrada é devida à instabilidade dos flavonóides em água, por serem facilmente hidrolisados. Por isso, o melhor solvente de extração é o etanol ou metanol. Isto também justifica a leve atividade antioxidante encontrada para esta amostra.

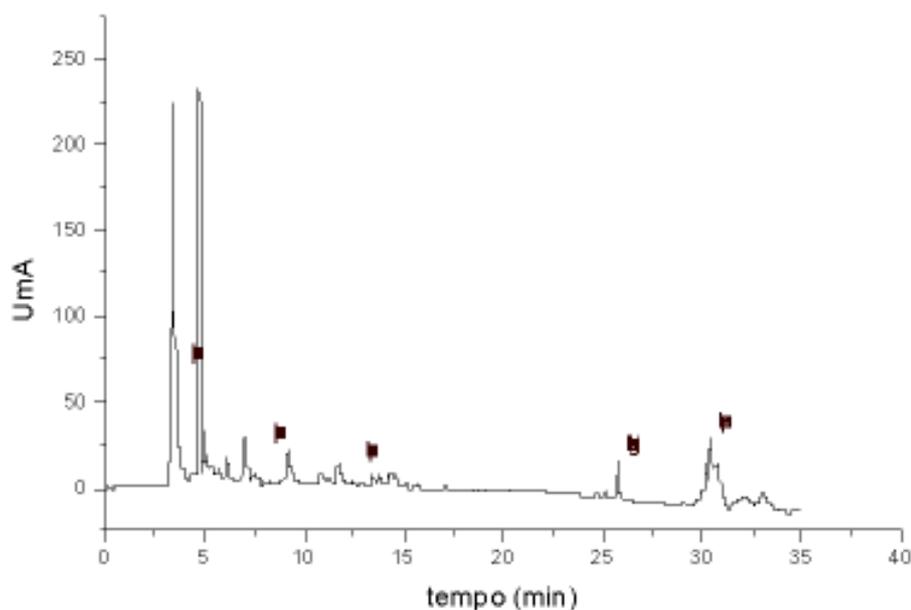


FIGURA 02 - Análise pelo HPLC do extrato aquoso dos frutos da *Schinus terebinthifolius* Raddi.

## CONCLUSÃO

Os frutos da *Schinus terebinthifolius* ou aroeira-vermelha apresentam um teor intermediário de compostos fenólicos: inferior a frutos, porém superior a grãos, sendo de 88  $\mu\text{g}$  de catequina/ g de amostra base seca para o extrato obtido pela extração em água quente (extrato aquoso) e 685  $\mu\text{g}$  de catequina/ g de amostra base seca para o extrato obtido pela extração em etanol absoluto (extrato alcoólico).

O extrato alcoólico se mostrou com a presença da flavona apigenina, além de ácido elágico. Já o extrato aquoso apresentou a flavanona naringina.

Quanto ao seu poder antioxidante, pode-se concluir que os poderes antioxidantes de ambos os extratos são bons, quando se compara ao poder antioxidante dos conhecidos e comumente empregados BHA e BHT, visto que se trata de extratos vegetais, cujo poder antioxidante é, em geral, mais fraco que os antioxidantes artificiais. No caso do extrato alcoólico, o mesmo apresentou um poder antioxidante 4 vezes menor que o BHT e o BHA. O extrato aquoso, por sua vez, apresentou um poder antioxidante 6 vezes menor que o BHT e o BHA.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIRCH, A.E., FENNER, G.P.; WATKINS, R.; BOYD, L.C. Antioxidant proprieties of evening primrose seed extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Chicago: v.49, p. 4502-4507, 2001.
- BORNHAUSEN, R. **Ervas do Sítio**. Disponível em: <<http://www.ervasdositio.com.br/enciclopedia/enciclopedia.asp>>. Capturado em: 24/jan./2002.

- BURNS, J.; GARDNER, P.T.; MATTHEWS, D.; DUTHIE, G.G.; LEAN, M.E.J.; CROZIER, A. Extraction of phenolics and changes in antioxidant activity of red wines during vinification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Chicago: v.49, p. 5797-5808, 2001.
- CORDENUNSI, B.R.; NASCIMENTO, J.R.O.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Influence of cultivar on quality parameters and chemical composition of strawberry fruits grown in Brazil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Chicago: v. 50, n. 9, p. 2581-2586, 2002.
- GENOVESE, M.I.; SANTOS, R.J.; HASSIMOTTO, N.M.A.; LAJOLO, F.M. Determinação do conteúdo de fenólicos totais em frutas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. São Paulo: v 39, n. 3, p.167-169, 2003.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v.1. São Paulo: O Instituto, 1985.
- KÄHKÖNEN, M.P.; HOPIA A.I.; HEINONEN, M. Berry phenolics and their antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Chicago: v.49, p. 4076-4082, 2001.
- KÄHKÖNEN, M.P.; HOPIA A.I.; HEINONEN, M. Berry phenolics and their antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Chicago: v.49, p. 4076-4082, 2001.
- MARCO, G. J. **A rapid method for evaluation of antioxidants**. Journal of American Oil Chemistry Society. Chicago: v. 45, p. 594-598, 1968.
- MELO, E.A.; GUERRA, N.B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Boletim da SBCTA**. Campinas: v.36, n. 1, p. 1-11, 2002.
- MILLER, H. E. A simplified method for the evaluation of antioxidant. **Journal of American Oil Chemistry Society**. Chicago: v. 48, p. 91, 1971.
- SIMÃO, A.M. **Aditivos para alimentos sob o aspecto toxicológico**. São Paulo: Nobel, 1985.
- SLUIS, A.A.; DEKKER, M.; JAGER, A.; JONGEN, W.M.F. Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: effect of cultivar, harvest year, and storage conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Chicago: v.49, p. 3606-3613, 2001.
- TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; GIL, M.I.; CREMIN, P.; WATERHOUSE, A.L.; PIERCE, B.H.; KADER, A.A. HPLC-DAD-ESIMS analysis of phenolic compounds in nectarines, peaches, na plums. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Chicago: v.49, p. 4748-4760, 2001.
- USP. **Biblioteca Virtual do Estudante Brasileiro - Aroeira**. Disponível em: <<http://www.bibvirt.futuro.usp.br/acervo/paradidat/frutas/aroeira/aroeira.html>>. Capturado em: 24/jan./2002.
- VINSON, J.A.; SU, X.; ZUBIK, L.; BOSE, P. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Chicago: v.49, p. 5315-5321, 2001.
- WANG, S.Y.; ZHENG, W. Effect of plant growth temperature on antioxidant capacity in strawberry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Chicago: v.49, p. 4977-4982, 2001.
- WATANABE, M. J. Catechins as antioxidants from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moech). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Chicago: v. 46, n. 3, p. 839-845, 1998.
- YILDIRIM, A.; MAVI, A.; KARA, A.A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Chicago: v.49, p. 4083-4089, 2001.
- ZHENG, W.; WANG, S.Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Chicago, v.49, p. 5165-5170, 2001.
- ZIELINSKI, H.; KOZŁOWSKA, H. Antioxidant activity and total phenolics in selected cereal grains and their different morphological fractions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Chicago: v. 48, p. 2008-2016, 2000.