

# APLICACIÓN DE DIVERSOS MÉTODOS QUÍMICOS PARA DETERMINAR ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN PULPA DE FRUTOS<sup>1</sup>

E. Marta KUSKOSKI<sup>2,3</sup>, Agustín G. ASUERO<sup>2</sup>, Ana M. TRONCOSO<sup>2</sup>

Jorge MANCINI-FILHO<sup>4</sup>, Roseane FETT<sup>3,\*</sup>

## RESUMO

APLICAÇÃO DE DIVERSOS MÉTODOS QUÍMICOS PARA DETERMINAR ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM POLPA DE FRUTAS. Considerado um dos principais países produtores de sucos de frutas, o Brasil é o terceiro maior produtor de frutas tropicais. A diversidade de frutas no mercado é cada vez maior e, a cada dia, se introduz uma nova fruta tropical, cujas propriedades e características ainda não foram totalmente estudadas. O governo brasileiro tem apoiado o comércio exterior, investindo em feiras que promovem e inserem novos produtos em dezolitos países do mercado Europeu, como a "Brazilian Fruit Festival" que tem por objetivo divulgar frutas *in natura*, polpas congeladas e sucos processados. A cada dia se publicam novas pesquisas, associando o consumo de frutas com os efeitos benéficos à saúde humana. Este trabalho teve por objetivo determinar o conteúdo de compostos fenólicos totais (FT), estimar as antocianinas totais (AT) e a capacidade antioxidante de polpa de frutas comercializadas congeladas, aplicando os métodos espectrofotométricos mais citados para determinar a atividade antioxidante (ABTS, DPPH e DMPD). Determinou-se a atividade antioxidante das polpas de frutas de maior consumo no mercado sul brasileiro (amora, uva, açaí, goiaba, morango, acerola, abacaxi, manga, graviola, cupuaçu e maracujá), aplicando método ABTS com medidas em dois tempos (1 e 7 minutos), DPPH (30 e 60 minutos) e DMPD (10 minutos). Os valores TEAC (atividade antioxidante equivalente ao Trolox) obtidos oscilam entre valores mínimos e máximos de 2,0 e 67,2  $\mu\text{mol/g}$  aplicando método ABTS, 1,02 e 67,0  $\mu\text{mol/g}$  aplicando DPPH e 4,2 e 46,6  $\mu\text{mol/g}$  aplicando DMPD. A capacidade antioxidante obtida para os métodos ABTS e DPPH está correlacionada com o teor de compostos fenólicos e antocianinas.

**Palavras-chave:** compostos fenólicos, ensaios antioxidantes, polpa de frutas tropicais.

## RESUMEN

El Brazil es considerado un de los principales países productores de zumos de frutas, ocupando en concreto la tercera posición respecto a esto. La diversidad de frutos en el mercado es cada vez mayor, introduciéndose diariamente nuevos frutos tropicales cuyas propiedades y actividades no están aún totalmente determinadas. El gobierno brasileño apoya el comercio exterior de frutos, invirtiendo fondos en exposiciones que promueven y sitúan a los nuevos productos en los países de la Unión Europea, tal como la "Brazilian Fruit Festival" que promociona frutos *in natura*, pulpas congeladas y zumos procesados. Se publican cada vez en mayor número nuevas investigaciones que asocian el consumo de frutas con efectos beneficiosos para la salud humana. Este trabajo tiene por objeto la determinación del índice de fenoles totales (FT), antocianos totales (AT) y la capacidad antioxidante de las pulpas de frutas comerciales congelados, aplicando los métodos espectrofotométrico químicos mas en boga para la determinación de la actividad antioxidante (ABTS, DPPH y DMPD). Se ha determinado la capacidad antioxidante de las pulpas de los frutos tropicales de mayor consumo en el mercado del sur de Brazil (mora, uva, açaí, guayaba, fresa, acerola, piña, mango, graviola, cupuaçu y maracujá) aplicando el método ABTS con medidas a dos tiempos (1 y 7 minutos), DPPH (30 y 60 minutos) y DMPD (10 minutos). Los valores TEAC (capacidad antioxidante equivalente al Trolox) obtenidos de las pulpas oscilan entre mínimos y máximos de 2,0 y 67,2  $\mu\text{mol/g}$  aplicando el ensayo ABTS, 1,02 y 67,0  $\mu\text{mol/g}$  aplicando DPPH y 4,2 y 46,6  $\mu\text{mol/g}$  aplicando DMPD. La capacidad antioxidante obtenida por los métodos ABTS y DPPH se encuentra correlacionada con el contenido de compuestos fenólicos y antocianos.

**Palabras clave:** compuestos fenólicos, ensayos antioxidantes, pulpas de frutas tropicales.

## 1 - INTRODUCCIÓN

En todo el mundo se observa un aumento destacado en el consumo de frutos tropicales. El cultivo de la fruticultura ocupa en Brazil un área de dos millones de hectáreas y genera un PIB de 1,5 billones de dólares. Existen más de 30 puntos de producción, distribuidos en la geografía de norte a sur. La balanza comercial de frutas frescas en Brazil, cerró el año 2003 con un superávit de 267 millones de dólares, un 39% superior al del año anterior. En el

período desde enero a julio del 2004, el aumento de las ventas externas superó en un 23% al del mismo periodo del año 2003 [1].

Los frutos, en adición a los nutrientes esenciales y a una serie de micronutrientes tales como minerales, fibras y vitaminas, aportan diversos componentes metabolitos secundarios de naturaleza fenólica, denominados polifenoles [14]. El consumo de frutos y verduras esta asociado al bajo riesgo de incidencias y mortalidad de cáncer [7], y a menores índices de mortalidad por enfermedad coronaria [18, 22], según se desprende de diversos estudios epidemiológicos. Los fenoles, especialmente los flavonoides [16] y los antocianos [9, 16, 24, 31], muestran una gran capacidad para captar radicales libres causantes del estrés oxidativo, atribuyéndoseles a su vez un efecto beneficioso en la prevención de enfermedades tales como: cardiovasculares, circulatorias, cancerígenas y neurológicas [20, 21, 26, 44, 48, 52]. Poseen actividades anti-inflamatoria, antialérgica, antitrombótica, antimicrobiana y antineoplásica [34, 40, 41, 43].

<sup>1</sup>Recebido para publicação em 13/10/2004. Aceito para publicação em 30/09/2005 (001414).

<sup>2</sup>Universidad de Sevilla, Departamento de Química Analítica y Departamento de Bioquímica, Bromatología y Toxicología, Facultad de Farmacia, C/ García González nº 2, 41012 - Sevilla, ES.

<sup>3</sup>Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Rod. Admar Gonzaga 1346, Itacorubi, Florianópolis, Br.CEP: 88034-001.

<sup>4</sup>Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Universidade de São Paulo, USP, Br. \*A quem a correspondência deve ser enviada: Rua Laurindo Januário da Silveira, 1364-A. Canto da Lagoa. Florianópolis/SC. 88062-200.

Existen diversos métodos para evaluar la actividad antioxidante [5, 8, 29, 36], ya sea *in vitro* o *in vivo*. Una de las estrategias más aplicadas en las medidas *in vitro* de la capacidad antioxidante total de un compuesto, mezcla o alimento, consiste en determinar la actividad del antioxidante frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical; la pérdida de color ocurre de forma proporcional con la concentración [2, 31]. No obstante, las determinaciones de la capacidad antioxidante realizadas *in vitro* nos dan tan sólo una idea aproximada de lo que ocurre en situaciones complejas *in vivo*.

La capacidad antioxidante de una mezcla no viene dada solo por la suma de las capacidades antioxidantes de cada uno de sus componentes; también depende del microambiente en que se encuentra el compuesto. Los compuestos interactúan entre sí pudiendo producirse efectos sinérgicos o inhibitorios. Por otra parte, es necesario considerar que los ensayos *in vivo* pueden presentar algunos inconvenientes, como la adaptabilidad en respuesta al aumento del estrés oxidativo [35, 36, 39, 43].

Alternativamente, diversos compuestos cromógenos (ABTS, DPPH, DMPD, DMPO y FRAP) son utilizados para determinar la capacidad de los compuestos fenólicos que contienen los frutos para captar los radicales libres generados, operando así en contra los efectos perjudiciales de los procesos de oxidación, que implican a especies reactivas de oxígeno (EROS) [4, 13, 23, 38, 45].

Los métodos más aplicados son ABTS y DPPH [3, 5, 32, 34, 35]. Ambos presentan una excelente estabilidad en ciertas condiciones, aunque también muestran diferencias. El DPPH es un radical libre que puede obtenerse directamente sin una preparación previa, mientras que el ABTS tiene que ser generado tras una reacción que puede ser química (dióxido de manganeso, persulfato potasio, ABAP) [3, 25, 38, 45], enzimática (peroxidase, mioglobulina), o también electroquímica [19, 20]. Con el ABTS se puede medir la actividad de compuestos de naturaleza hidrofílica y lipofílica, mientras que el DPPH solo puede disolverse en medio orgánico, y el DMPD solo en medio acuoso [3, 5, 11, 38]. El radical ABTS<sup>•+</sup> tiene, además, la ventaja de que su espectro presenta máximos de absorbancia a 414, 654, 754 y 815 nm en medio alcohólico, mientras que el DPPH presenta un pico de absorbancia a 515 nm [23, 42], y el DMPD a 505 nm [11].

Este trabajo tiene por objeto determinar la capacidad antioxidante de pulpas de frutos congelados comercializados en el sur de Brazil, tales como mora (*Morus nigra*), uva (*Vitis vinifera*), açai (*Euterpe oleracea Mart.*), guayaba (*Psidium guajava*), fresa (*Fragaria vesca var.*), acerola (*Malpighia glabra Linn.*), piña (*Ananas comosus L.*), mango (*Mangifera indica L.*), graviola (*Anona muricata L.*), cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) y maracuyá (*Passiflora sp.*), así como comparar la relación entre el contenido de fenoles totales y antocianos. Se han aplicado con este fin los tres principales métodos químicos disponibles: ABTS, DMPD y DPPH.

## 2 - MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1 - Material

Se han empleado Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico 97%), y ácido ascórbico (*Sigma-Aldrich Chemical Co.*, Gillingham, Dorset, UK) como antioxidante de referencia. El DPPH (2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo, D-9132), ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico, A-1888), y DMPD (dicloridrato de *N,N*-Dimetil-*p*-fenilendiamina, D-0401) proceden de *Sigma-Aldrich* (Dorset, UK). Las pulpas de frutas, 100% natural, fueron obtenidas al azar, en embalajes de 100 g, conservadas congeladas a -15°C. Las muestras se preparan de acuerdo con la indicación del fabricante, 100 g se disuelven en 250 mL de agua Milli-Q, y se diluye con etanol y agua Milli-Q, según el método aplicado y centrifugadas a 14000 rpm durante 15 min. El registro de los espectros de absorción y las medidas de absorbancia, a longitud de onda fija, se llevan a cabo con un Espectrofotómetro HP modelo 8452A (Cheadle Heath, Stockport Cheshire, UK). Los análisis estadísticos se realizan con ayuda del Software Statistica® 6.0, aplicando ANOVA (Ensayo de Tukey studentizado-HSD).

### 2.2 - Determinación de antocianos totales (AT)

**Método por diferencia de pH.** Permite la estimación alternativa del contenido de antocianos totales [13]. Se utilizan dos sistemas tampón: ácido clorhídrico/cloruro de potasio de pH 1,0 (0,025 M) y ácido acético/acetato sódico de pH 4,5 (0,4 M). A 0,2 mL de una muestra diluida (para conseguir una absorbancia en el rango de 0,100-1,200 a 510 nm) se añaden 1,8 mL de la correspondiente disolución tampón y se mide la absorbancia frente a un blanco a 510 y 700 nm. Se calcula la absorbancia final a partir de:

$$A = (A_{\text{max. vis}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH}1,0} - (A_{\text{max. vis}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH}4,5}$$

La concentración de pigmentos monoméricos en el extracto se expresa en cianidina-3-glucósido.

$$\text{Antocianos monoméricos (mg/100 g)} = \frac{A \times PM \times FD \times 100}{(\epsilon \times l)}$$

A = Absorbancia; PM = peso molecular

FD = Factor de dilución;  $\epsilon$  = absorptividad molar

La concentración final de antocianos (mg/100 g) se calcula en base al volumen de extracto y peso de muestra. Se expresa en cianidina 3-glucósido (PM: 449,2 y  $\epsilon$ : 26900).

### 2.3 - Determinación de fenoles totales (FT)

El método espectrofotométrico desarrollado por FOLIN y CIOCALTEAU [10], para la determinación de fenoles totales, se fundamenta en su carácter reductor y es el más empleado. Se utiliza

como reactivo una mezcla de ácidos fosfowolfrámico y fosfomolibdico en medio básico, que se reducen al oxidar los compuestos fenólicos, originando óxidos azules de wolframio ( $W_8O_{23}$ ) y molibdeno ( $Mo_8O_{23}$ ). La absorbancia del color azul desarrollado se mide a 765 nm. Los resultados se expresan en mg de ácido gálico por 100 g de pulpa de frutos.

## 2.4 - Actividad antioxidante

### 2.4.1 - Método ABTS

Según la metodología desarrollada por RE *et al.* [38] y descrita por KUSKOSKI *et al.* [25] el radical ABTS<sup>•+</sup> se obtiene tras la reacción de ABTS (7 mM) con persulfato potásico (2,45 mM, concentración final) incubados a temperatura ambiente ( $\pm 25^\circ\text{C}$ ) y en la oscuridad durante 16 h. Una vez formado el radical ABTS<sup>•+</sup> se diluye con etanol hasta obtener un valor de absorbancia comprendido entre 0,70 ( $\pm 0,1$ ) a 754 nm (longitud de onda de máxima absorción). Las muestras filtradas (antocianos) se diluyen con etanol hasta que se produce una inhibición del 20 al 80%, en comparación con la absorbancia del blanco, tras añadir 20  $\mu\text{L}$  de la muestra. A 980  $\mu\text{L}$  de dilución del radical ABTS<sup>•+</sup> así generado se le determina la  $A_{754}$  a 30°C, se añade 20  $\mu\text{L}$  de la muestra (dilución de antocianos) y se mide de nuevo la  $A_{754}$  pasado 1 minuto. La absorbancia se mide de forma continua transcurridos 7 minutos. El antioxidante sintético de referencia, Trolox, se ensaya a una concentración de 0-15  $\mu\text{M}$  (concentración final) en etanol, en las mismas condiciones, lo que se hace también con ácido ascórbico (0-20 mg/100 mL). Los resultados se expresan en TEAC (actividad antioxidante equivalente a Trolox) y en VCEAC (actividad antioxidante equivalente a vitamina C), en este último caso por tratarse de alimentos.

### 2.4.2 - Método DPPH

Este método, desarrollado por BRAND-WILLAMS *et al.* [6], se basa en la reducción de la absorbancia medida a 515 nm del radical DPPH<sup>•</sup>, por antioxidantes. Con mo-

dificaciones el método descrito por KIM *et al.* [23], se basa en la medida de la absorbancia del radical DPPH<sup>•</sup> 100  $\mu\text{M}$  (3,9 mL) disuelto en metanol al 80%, a la longitud de onda de 517 nm. Se añade 0,1 mL de la muestra o patrón, la mezcla se homogeniza cuidadosamente, y se mantiene en la oscuridad durante 30 minutos. Las medidas de absorbancia a 517 nm se realizan antes de añadir la muestra ( $A_0$ ) y pasados los 30 y 60 minutos ( $A_t$ ). La concentración de DPPH<sup>•</sup> en el medio de reacción se calcula a partir de una curva de calibrado obtenida por regresión lineal. Los resultados se expresan en TEAC, o sea, actividad equivalente a Trolox ( $\mu\text{M/g}$  de muestra peso fresco). El antioxidante sintético de referencia Trolox, a una concentración de 0,08-1,28 mM en disolución de metanol al 80%, se ensaya en las mismas condiciones, expresándose los resultados en TEAC y VCEAC.

### 2.4.3 - Método DMPD

Se determina la actividad antioxidante aplicando el método propuesto por FOGLIANO *et al.* [11]. Este se basa en añadir 1 mL de la disolución de DMPD 100 mM a 100 mL de disolución tamponada con ácido acético/acetato de sodio 0,1 M (pH 5,25). Tras la adición de 0,2 mL de una disolución de cloruro férrico 0,05 M (concentración final de 0,1 mM) se forman radicales cationes coloreados (DMPD<sup>•+</sup>). Un mililitro de esta disolución se traslada a una cubeta midiéndose su absorbancia, comprendida entre 0,90 ( $\pm 0,1$ ), a 506 nm. Se añade 50  $\mu\text{L}$  de una disolución patrón de antioxidante o de muestras diluidas y transcurridos diez minutos (a 25°C) se hace otra medida de absorbancia a 506 nm. La disolución tamponada de acetato se utiliza como blanco de referencia. Los resultados se expresan en TEAC, o sea, actividad equivalente a Trolox (en mM o  $\mu\text{M}$ ) o bien en VCEAC, actividad equivalente a vitamina C (mg/L o mg/100 g).

## 3 - RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1 - Antocianos y fenoles totales

El contenido total de antocianos y de polifenoles se recoge en la *Tabla 1*. La cantidad de antocianos totales en

**TABLA 1** – Determinación de antocianos totales (AT), fenoles totales (FT) y VCEAC (actividad antioxidante equivalente a vitamina C) de pulpa de frutos aplicando los métodos DPPH, ABTS y DMPD (media  $\pm$  DE, n =3)

Muestras	FT <sup>a</sup> (mg/100 g)	AT <sup>a</sup> (mg/100 g)	VCEAC (mg/100 g)		
			DPPH (30 min)	ABTS (1 min)	DMPD (10 min)
Mora	118,9 $\pm$ 2,1	41,8 $\pm$ 1,8	82,6 $\pm$ 2,6	125,8 $\pm$ 3,2	58,8 $\pm$ 0,4
Uva	117,1 $\pm$ 0,6	30,9 $\pm$ 0,1	105,9 $\pm$ 0,4	161,5 $\pm$ 3,3	60,8 $\pm$ 1,9
Açaí	136,8 $\pm$ 0,4	22,8 $\pm$ 0,8	108,5 $\pm$ 2,6	163,4 $\pm$ 4,0	75,5 $\pm$ 1,3
Guayaba	83,0 $\pm$ 1,3	2,7 $\pm$ 0,2	100,7 $\pm$ 2,2	120,0 $\pm$ 4,5	69,7 $\pm$ 0,0
Fresa	132,1 $\pm$ 3,8	23,7 $\pm$ 2,3	132,8 $\pm$ 0,3	202,5 $\pm$ 0,5	73,2 $\pm$ 0,3
Acerola	580,1 $\pm$ 4,6	16,0 $\pm$ 0,5	959,1 $\pm$ 19,0	1198,9 $\pm$ 8,1	789,3 $\pm$ 13,8
Piña	21,7 $\pm$ 4,5	nd	41,1 $\pm$ 0,8	64,8 $\pm$ 5,2	89,9 $\pm$ 0,9
Mango	544,9 $\pm$ 7,3	nd	174,3 $\pm$ 0,5	224,7 $\pm$ 4,6	411,2 $\pm$ 6,1
Graviola	84,3 $\pm$ 5,8	nd	57,15 $\pm$ 1,8	76,8 $\pm$ 4,0	79,6 $\pm$ 4,0
Cupuáçu	20,5 $\pm$ 3,0	nd	43,18 $\pm$ 2,3	37,0 $\pm$ 0,0	85,1 $\pm$ 4,6
Maracuyá	20,0 $\pm$ 2,6	nd	46,66 $\pm$ 1,6	54,0 $\pm$ 1,9	83,7 $\pm$ 4,3

<sup>a</sup> datos espectrofotométricos. VCEAC: actividad antioxidante equivalente al ácido ascórbico (mg/100g peso muestra). Nd: no detectada.

las pulpas de mora, uva, fresa, açai, acerola y guayaba es de 41,8; 30,9; 23,7; 22,8; 16,0 y 2,7 mg/100 g peso fresco, respectivamente. Mora y uva presentan el mayor contenido de antocianos y las pulpas de acerola y guayaba el menor, mientras que piña, mango, graviola, cupuaçu y maracuyá no lo contienen. Los contenidos totales de flavonoides, antocianos y compuestos fenólicos no flavonoides se obtienen tras la determinación de fenoles totales que se encuentran compilados en la *Tabla 1*. Los extractos de pulpa de acerola contienen un elevado contenido de polifenoles totales (580,1 mg/100 g) al igual que la pulpa de mango (544,9 mg/100 g), mientras que las pulpas de açai (136,8 mg/100 g), fresa (132,1 mg/100 g), mora (118,9 mg/100 g) y uva (117,1 mg/100 g) muestran contenidos más bajos, aunque también elevados.

### 3.2 - Actividad antioxidante

Los resultados obtenidos en la determinación de la actividad antioxidante por los métodos indicados (*Tabla 1* y *2*) se han expresado en equivalentes a vitamina C (VCEAC), o equivalentes a Trolox (TEAC), para las distintas muestras de pulpas de frutos. De todas las muestras ensayadas, los valores VCEAC encontrados varían entre máximos y mínimos de 1198,9 y 37,0 mg/100 g para los ensayos con ABTS, 959,1 y 43,18 para los ensayos con DPPH, y entre 789,3 y 83,7 mg/100 g para los ensayos desarrollados con DMPD (*Tabla 1*).

La actividad antioxidante es dependiente de la concentración del extracto [21, 36]. La mejor respuesta obtenida, teniendo en cuenta los disolventes aplicados, es una concentración próxima a 0,04 g/mL para la mayor parte de las pulpas, exceptuando la pulpa de acerola con la que se obtiene una concentración de 0,004 g/mL. La media de los mayores valores de TEAC 67,6; 13,2; 12,0; 9,4 y 9,2  $\mu$ M/g, determinados por ABTS, corresponden a las pulpas de acerola, mango, fresa, açai y uva, respectivamente. Los datos, cuando se expresan en VCEAC (1198,9; 224,7; 202,0; 163,4 y 161,5 mg/100 g) conservan el mismo orden de prelación. Se justifica expresarlo de esta última manera dado que las

muestras ensayadas son alimentos, y la vitamina C es un nutriente que se encuentra diariamente en nuestra dieta [23].

Entre los métodos utilizados para determinar la capacidad de un antioxidante para captar radicales libres, el radical ABTS<sup>•+</sup> es uno de los más aplicados, al considerarse un método de elevada sensibilidad, práctico, rápido y muy estable [3]; a pesar de esto los valores actividad antioxidante pueden depender del tiempo escogido para efectuar la medida. La absorbancia medida por el método ABTS se determinada a los 1 y 7 minutos; los resultados obtenidos por algunos investigadores indican que la reacción con el radical ABTS<sup>•+</sup> no se completa hasta pasado 1 minuto, y según RE *et al.* [38] el tiempo de 4 minutos es el más apropiado. No obstante, SELLAPPAN *et al.* [45], sugieren tiempos de medida de 6 minutos para los patrones de referencia y de 7 minutos para los compuestos puros, extractos de plantas o de alimentos.

Dadas las diferencias descritas en los tiempos de medida, en este trabajo se realiza una comparación entre las medias de los valores TEAC obtenidos a los 1 y 7 minutos. Aunque se observa un aumento en los valores TEAC, obtenidos a los 7 minutos (*Tabla 2*), la diferencia entre los resultados obtenidos a 1 minuto no es significativa al nivel de confianza de 95% ( $p=0,05$ ), por lo que se considera que el tiempo de 1 minuto es suficiente para determinar la reactividad de las pulpas de frutos congelados. Este hecho es muy oportuno, dado que posibilita la medición de un gran número de muestras. Considerando que los radicales libres tienen vida media cortas, y dado que en la evaluación de la actividad antioxidante de un compuesto no sólo reviste importancia la estructura química y la concentración, sino también el tipo de productos de reacción formados, VILLANO *et al.*, [51] realizan un estudio acerca de la influencia de la dilución y el tiempo sobre la actividad oxidante de los vinos, observando que los valores obtenidos a los 2 minutos se correlacionan más con los valores de FT ( $r=0.9012$ ) que a los 15 minutos ( $r=0.8462$ ) adoptando, por tanto, 2 minutos como el tiempo óptimo para determinar la actividad antioxidante de vinos.

**TABLA 2** – Determinación de la actividad antioxidante (TEAC), equivalente a Trolox, de pulpa de frutos tropicales aplicando métodos DMPD, DPPH y ABTS (media $\pm$ DE, n=3)

Muestras	DMPD <sup>a</sup>	DPPH <sup>a</sup>		ABTS <sup>a</sup>	
	TEAC 10 min	TEAC 30 min	TEAC 60 min	TEAC 1 min	TEAC 7 min
Mora	3,6 $\pm$ 0,2	4,3 $\pm$ 0,2	5,9 $\pm$ 0,3	6,4 $\pm$ 0,8	7,1 $\pm$ 0,2
Uva	3,6 $\pm$ 0,1	7,0 $\pm$ 0,3	8,5 $\pm$ 0,5	8,5 $\pm$ 0,7	9,2 $\pm$ 0,2
Açai	4,5 $\pm$ 0,1	6,9 $\pm$ 0,2	8,3 $\pm$ 0,1	9,1 $\pm$ 0,4	9,4 $\pm$ 0,2
Guayaba	4,2 $\pm$ 0,1	5,9 $\pm$ 0,4	7,4 $\pm$ 0,01	7,2 $\pm$ 0,8	8,2 $\pm$ 0,4
Fresa	4,3 $\pm$ 0,0	9,2 $\pm$ 0,01	10,5 $\pm$ 0,2	11,2 $\pm$ 0,2	12,0 $\pm$ 0,3
Acerola	46,6 $\pm$ 0,7	53,2 $\pm$ 5,3	68,0 $\pm$ 2,2	66,5 $\pm$ 3,1	67,6 $\pm$ 0,4
Piña	5,3 $\pm$ 0,0	0,5 $\pm$ 0,01	0,6 $\pm$ 0,1	2,9 $\pm$ 0,6	3,4 $\pm$ 0,3
Mango	24,3 $\pm$ 0,3	12,9 $\pm$ 0,2	13,7 $\pm$ 0,4	11,8 $\pm$ 0,9	13,2 $\pm$ 0,3
Graviola	4,8 $\pm$ 0,3	2,88 $\pm$ 0,2	4,5 $\pm$ 1,4	4,3 $\pm$ 0,4	4,8 $\pm$ 0,3
Cupuaçu	5,1 $\pm$ 0,2	0,73 $\pm$ 0,2	1,11 $\pm$ 0,1	1,7 $\pm$ 0,1	2,0 $\pm$ 0,1
Maracuyá	5,0 $\pm$ 0,2	0,9 $\pm$ 0,2	1,02 $\pm$ 0,4	2,3 $\pm$ 0,6	2,7 $\pm$ 0,1

<sup>a</sup>TEAC: actividad antioxidante equivalente al Trolox ( $\mu$ mol TE/g peso muestra).

En la metodología que aplica la DPPH, los tiempos de medida empleados son, en su mayoría, de 30 minutos [4, 6, 23], y en algunos casos de 20 minutos [33, 46]. En el presente trabajo se miden las muestras a los 30 y 60 minutos, con objeto de comprobar la influencia del tiempo de medida en los valores actividad antioxidante. De acuerdo con los datos representados en la *Tabla 2* los valores TEAC a los 60 minutos son más elevados, llegando a aumentar entre un 10 y un 50%. El análisis estadístico revela diferencias significativas entre los tiempos de 30 y 60 minutos, especialmente en el caso de las muestras de graviola, guayaba y acerola. Considerando que los valores obtenidos reflejan la cantidad y la reactividad de los antioxidantes presentes en la muestra en determinado tiempo, se torna difícil establecer una relación estructura-actividad y determinar los tiempos de reacción, toda vez que las muestras poseen una composición compleja. Se hace necesario, por consiguiente, un estudio debidamente extenso y específico en este sentido.

El tiempo de medida necesario para realizar las medidas de DPPH (30 minutos) en comparación con el método ABTS (1 minuto), supone una desventaja en su aplicación, en adición también al elevado coste de la DPPH. Debe señalarse que, a pesar de las diferencias metodológicas, los resultados obtenidos con los métodos ABTS y DPPH permiten alcanzar conclusiones prácticamente similares. Los resultados obtenidos con el método DMPD, ya sean expresados en TEAC o VCEAC, no son consistentes con los obtenidos mediante los ensayos de la ABTS y DPPH. Dichos valores son bajos, poco reproducibles y en algunos casos incoherentes (*Tablas 1 y 2*).

El orden decreciente de la capacidad antioxidante obtenida, determinada por el método ABTS, es de acerola > mango > fresa > açai > uva > mora > guayaba > graviola > piña > maracuyá > cupuaçu; y de acerola > mango > fresa > açai > uva > guayaba > mora > graviola > maracuyá > cupuaçu > piña, cuando se aplica DPPH, observase prácticamente igual prelación para los métodos ABTS y DPPH, a excepción de la piña y la guayaba. Sin embargo, cuando se aplica el ensayo DMPD el orden coincide tan solo para las dos primeras muestras: acerola > mango > cupuaçu > maracuyá > graviola > açai > fresa > guayaba > uva > mora.

Se observa correlación entre la determinación de fenoles totales (FT) y la actividad antioxidante para los métodos ABTS y DPPH, así como una respuesta lineal entre los valores VCEAC obtenidos con el método ABTS y los fenoles totales ( $r^2=0.995$ ), cuando se considera las muestras con presencia de antocianos. Sin embargo cuando se hace la comparación con las muestras que no contienen antocianos el coeficiente disminuye a  $r^2=0.599$ . Estos datos indican la correlación existente con esta propiedad y la influencia de los antocianos en la muestra. En el caso del método DPPH los valores encontrados son  $r^2=0.992$  y  $r^2=0.595$ , respectivamente, para las muestras con presencia de antocianos y las que no lo contienen y en el caso del método DMPD el coeficiente de correlación de fenoles totales fue de  $r^2=0.991$  para las muestras con antocianos, y de  $r^2=0.831$  para

las muestras sin antocianos (piña, mango, graviola, cupuaçu y maracuyá).

Muchos trabajos relacionan la capacidad antioxidante con el contenido de fenoles totales y los antocianos [12, 19, 33, 37, 47, 49]; cada componente fenólico puede contribuir de forma y proporción diferente. Sin embargo en algunos trabajos se ha encontrado una correlación baja [17] y en una publicación reciente HASSIMOTO *et al.*, [15], verifican la actividad antioxidante de pulpas congeladas de frutas consumidas en Brazil, haciendo uso de la inhibición de la peroxidación inducida y la inhibición de la co-oxidación del beta-caroteno, no encontrando relación alguna entre el contenido total de fenoles y la vitamina C con la capacidad antioxidante. No obstante los autores observan que las muestras ricas en antocianos son las que presentan la mayor capacidad antioxidante. Es necesario considerar que dicha correlación no solo depende de la concentración y la calidad antioxidante, sino también de su interacción con otros componentes y la metodología aplicada.

#### 4 - CONCLUSIÓN

Entre los métodos químicos utilizados para determinar la capacidad antioxidante (captación de radicales libres), el radical ABTS<sup>•+</sup> es uno de los más rápidos, originando resultados reproducibles y coherentes. Además, el ABTS presenta importantes ventajas; muestra varios máximos de absorción y una buena solubilidad, permitiendo el ensayo de compuestos tanto de naturaleza lipofílica como hidrofílica. El tiempo de 1 minuto, para el método ABTS, puede ser suficiente para medidas de pulpas de frutos mientras que para el método DPPH se requiere un tiempo de 60 minutos, presentándose en algunas muestras diferencias significativas en los resultados, lo que sugiere la realización de estudios adicionales. Los resultados obtenidos con el método DMPD han sido poco reproducibles y en algunos casos incoherentes. En conclusión, las pulpas de frutos tropicales congeladas comercializadas en el sur de Brazil poseen elevados valores de capacidad antioxidantes, destacando en este sentido los frutos de la acerola y el mango. A los compuestos fenólicos y los antocianos se atribuyen esta capacidad antioxidante, observándose una correlación directa entre los valores de fenoles y antocianos totales con los valores TEAC y VCEAC.

#### 5 - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] APEX-Brasil (Agência de Promoção de Exportações do Brasil), Assessoria de imprensa. Ministerio do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. In: **Exportação de frutas ganha incentivo com campanha em 18 países**. Brasilia, 2004. Disponível em: <http://www.desenvolvimento.gov.br/sitio/ascom/noticias/noticia.php> Acesso em: 21 ago.2004.
- [2] ARENA, E.; FALLICO, B.; MACCARONE, E. Evaluation of antioxidant capacity of blood orange juices as influenced by constituents, concentration process and storage. **Food Chem.**, **74**, 423-427, 2001.
- [3] ARNAO, M.B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends Food**

- Sci. Technol.**, 11, 419-421, 2000.
- [4] ARNOUS, A.; MAKRIS, D.; KEFALAS, P. Correlation of pigment and flavanol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece. **J. Food Comp. Anal.**, 15, 655-665, 2002.
- [5] ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.D.; PATSALIDES, E.; MCDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst.**, 127, 183-198, 2002.
- [6] BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm. Wiss. Technol.**, 22, 25-30, 1995.
- [7] BLOCK, G.; PATTERSON, B.; SUBAR, A. Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. **Nutr. Cancer**, 18, 1-29, 1992.
- [8] CINTRA, R. M. G.; MANCINI-FILHO, J. Efeito antioxidante de especiarias: avaliação e comparação de métodos in vitro e in vivo. **Nutrire**, 22, 49-62, 2001.
- [9] ESPIN, J.C.; SOLER-RIVAS, C.; WICHERS, H.J.; GARCÍA-VIGUERA, C. Anthocyanin-based natural colorants: A new source of antiradical activity for foodstuff. **J. Agric. Food Chem.**, 48, 1588-1592, 2000.
- [10] FOLIN, C.; CIOCALTEAU, V. Tyrosine and tryptophan determination in proteins. **J. Biol. Chem.** 73, 627-650, 1927.
- [11] FOGLIANO, V.; VERDE, V.; RANDAZZO, G.; RITIENI, A. Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. **J. Agric. Food Chem.** 47, 1035-1040, 1999.
- [12] FRANKEL, E.N.; WATERHOUSE, A.L.; TEISSEDE, P.L. Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low density lipoproteins. **J. Agric. Food Chem.**, 43, 890-894, 1995.
- [13] GIUSTI, M.M.; WROLSTAD, R. E. Unit. F1.2.1-13. Anthocyanins. Characterization and measurement with UV-Visible spectroscopy. In: **Current Protocols in Food Anal. Chem.**, Wrolstad, R.E., E.; John Wiley & Sons: New York, 2001.
- [14] HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, 52, 481-504, 2000.
- [15] HASSIMOTO, N.M.A.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables and commercial frozen fruit pulps. **J. Agric. Food Chem.**, 53, 2928-2935, 2005.
- [16] HEIM, K.E.; TAGLIAFERRO, A.R.; BOBILYA, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **J. Nutr. Biochem.**, 13, 572-584, 2002.
- [17] HEINONEN, A.; MEYER, A.S.; FRANKEL, E.N. Antioxidant activity of berry phenols on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. **J. Agric. Food Chem.**, 46, 4107-4112, 1998.
- [18] HERTOOG, M.G.L.; HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B. Content of potentially anti-carcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in The Netherlands. **J. Agric. Food Chem.**, 40, 2379-2383, 1992.
- [19] IMEH, U.; KHOKHAR, S. Distribution of conjugated and free phenols in fruits: antioxidant activity and cultivar variations. **J. Agric. Food Chem.**, 50, 6301-6306, 2002.
- [20] ISHIGE, K.; SCHUBERT, D.; SAGARA, Y. Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. **Free Rad. Biol. Med.**, 30, 433-446, 2001.
- [21] KATSUBE, N.; KEIKO, I.; TSUSHIDA, T.; YAMAKI, K.; KOBORI, M. Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins. **J. Agric. Food Chem.**, 51, 68-75, 2003.
- [22] KNEKT, P.; JÄRVINEN, R.; REUNANEN, A.; MATELA, J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. **British Medical J.**, 312, 478-481, 1996.
- [23] KIM, D-O.; LEE, K.W.; LEE, H.J.; LEE, C.Y. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolics phytochemicals. **J. Agric. Food Chem.**, 50, 3713-3717, 2002.
- [24] KUSKOSKI, E.M.; VEGA, J.M.; RIOS, J.J.; FETT, R.; TRONCOSO, A.M.; ASUERO, A.G. Characterization of anthocyanins from the fruits of baguaçu (*Eugenia umbelliflora* Berg). **J. Agric. Food Chem.**, 51, 5450-5454, 2003.
- [25] KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A.G.; TRONCOSO, A.M.; GARCIA-PARILLA, M. C.; FETT, R. Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. **Rev. Bras. Ciênc. Tecnol. Alim.**, v. 24, n.4, 691-693, 2004.
- [26] LAPIDOT, T.; HAREL, S.; AKIRI, B.; GRANIT, R.; KANNER, J. pH-Dependent forms of red wine anthocyanins as antioxidants. **J. Agric. Food Chem.**, 47, 67-70, 1999.
- [27] MILLER, N.J.; DIPLOCK, A. T.; RICE-EVANS, C.A. Evaluation of the total antioxidant activity as a marker of the deterioration of apple juice on storage. **J. Agric. Food Chem.**, 43, 1794-1801, 1995.
- [28] MILLER, N.J.; RICE-EVANS, C.A. The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink. **Food Chem.**, 60, 331-337, 1997.
- [29] MOREIRA, A.V.B.; MANCINI-FILHO, J. Atividade antioxidante das especiarias mostarda, canela e erva doce em sistemas aquoso e lipídico. **Nutrire**, 24, 2003.
- [30] MOURE, A.; CRUZ, J.M.; FRANCO, D.; DOMINGUEZ, M.J.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; NUÑEZ, A.J.; PARAJÓ, J.C. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chem.**, 72, 145-171, 2001.
- [31] MOYER, R. A.; HUMMER, K. E.; FINN, C.E.; FREI, B.; WROLSTAD, R.E. Anthocyanins, phenolics, and Antioxidants capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. **J. Agric. Food Chem.**, 50, 519-525, 2002.
- [32] MONTOYA, B.H.; LEMESHKO, V.; LÓPEZ, J.B.; PAREJA, A.; URREGO, R.; TORRES, R. Actividad antioxidativa de algunos extractos vegetales. **Vitae**, 10, 2, 72-79, 2003.
- [33] PINELO, M.; MONZOCCO, L.; NUÑEZ, M.J.; NICOLI, M.C. Interaction among phenolics in food fortification: negative synergism on antioxidant capacity. **J. Agric. Food Chem.**, 52, 1177-1180, 2004.
- [34] PRIOR, R.L.; CAO, G.; MARTIN, A.; SOFIC, E.; MCEWAN, J.; O'BRIEN, C.; LISCHNER, N.; EHLENFELDT, M.; KALT, W.; KREWER, G.; MAINLAND, C.M. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity and variety of

- Vaccinium specie. **J. Agric. Food Chem.**, 46, 2686-2693, 1998.
- [35] PRIOR, R.L.; CAO, G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. **Free Rad. Biol. Med.**, 27, 11/12, 1173-1181, 1999.
- [36] ROBARDS, K; PRENZLER, P.D.; TUCKER, G.; SWATSITANG, P.; GLOVER, W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. **Food Chem.**, 66, 401-436, 1999.
- [37] ROBERTS, W.G.; GORDON, M.H. Determination of the antioxidant activity of fruits and vegetables by a liposome assay. **J. Agric. Food Chem.**, 51, 1486-1493, 2003.
- [38] RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radic. Biol. Med.**, 26, 9/10, 1231-1237, 1999.
- [39] RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAPAGANDA, G. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biol. Med.**, 20, 933-956, 1996.
- [40] ROSS, J.A.; KASUM, C.M. Dietary Flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety. **Annu. Rev. Nutr.**, 22, 19-34, 2002.
- [41] SÁNCHEZ-MORENO, C. Compuestos polifenólicos: efectos fisiológicos. Actividad antioxidante. **Alimentaria.**, ene-feb, 29-40, 2002.
- [42] SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J.A.; SAURACALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **J. Sci. Food Agric.**, 76, 270-276, 1998.
- [43] SATUÉ-GRACIA, M.T.; HEINONEN, M.; FRANKEL, E.N. Anthocyanin as antioxidants on human low-density lipoprotein and lecithin-liposome systems. **J. Agric. Food Chem.**, 45, 3362-3367, 1997.
- [44] SCHRAMM, D.D. Y GERMAN, J.B. Potential effects of flavonoids on the etiology of vascular disease. **J. Nutr. Biochem.**, 9, 560-566, 1998.
- [45] SELLAPPAN, S.; AKOH, C.C.; KREWER, G. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-Grown blueberries and blackberries. **J. Agric. Food Chem.**, 50, 2432-2438, 2002.
- [46] SPAGNA, G.; TOMAINO, A.; CIMINO, F.; BARBAGALLO, R.; VENTURA, D.; BONINA, F.; SALJA, A. Chemical análisis and photoprotective effect of an extract of wine from *Jacquez* grapes. **J. Sci. Food Agric.**, 82, 1867-1874, 2002.
- [47] SUN, J.; CHU, Y.F.; WU, X.; LIU, R.H. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. **J. Agric. Food Chem.**, 50, 7449-7454, 2002.
- [48] TSUDA, T.; WATANABE, M.; OHSHIMA, K.; NORINOBU, S.; CHOI, S.W.; KAWAKISHI, S.; OSAWA, T. Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyanidin 3-O- $\beta$ -D glucoside and cyanidin. **J. Agric. Food Chem.**, 42, 2407-2410, 1994.
- [49] URSINI, F.; TUBARO, F.; RAPUZZI, P.; ZAMBURLINI, A.; MAIORINO, M. Wine antioxidants: Effects in vitro and in vivo. **Wine and Human Health**, Udine 9-11, 1996.
- [50] VAN DEN BERG, R.; HAENEN, G.R.M.M.; VAN DEN BERG, H.; BAST, A. Applicability of an improved trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. **Food Chem.**, 66, 511-517, 1999.
- [51] VILLAÑO, D.; FERNÁNEZ-PACHÓN, A.M.; TRONCOSO, A.M.; GARCIA-PARRILLA, M.C. The antioxidant activity of wines determined by the ABTS method: influence of sample dilution and time. **Talanta**, 64, 501-509, 2004.
- [52] WANG, J., MAZZA, G. Effects of anthocyanins and other phenolic compounds on the production of tumor necrosis factor alpha in LPS/IFN-gamma-activated RAW 264.7 macrophages. **J. Agric. Food Chem.**, 50, 4183-4189, 2002.