

## DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA LARANJA-AZEDA (*CITRUS AURANTIUM L.*)

LAURA ABIB GRASSI<sup>1</sup>; FERNANDA MOURA RIBEIRO TRINDADE<sup>2</sup>; SIMONE PIENIZ<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Univeridade Federal de Pelotas – laura\_abib@hotmail.com

<sup>2</sup>Univeridade Federal de Pelotas– fezinhhamrt@hotmail.com

<sup>3</sup>Univeridade Federal de Pelotas – nutrisimone@yahoo.com.br

### 1. INTRODUÇÃO

As frutas silvestres são conhecidas por apresentarem diversos compostos bioativos (SUCUPIRA et al. 2012) em sua composição. Dessa forma, oferecem benefícios para a saúde, a exemplo disso, tem-se a eliminação de radicais livres por meio da atividade antioxidante (LI et al. 2005), onde este tem a capacidade de emparelhar elétrons desemparelhados.

Frente a isso, tem-se estudado a fruta *Citrus aurantium L.* (BOUCHARD et al. 2005), conhecida popularmente como laranja-azeda ou laranja amarga (ALONSO 2007). A laranja azeda tem seu fruto (casca, polpa e albedo), flores e folhas utilizados para fins medicinais, aromáticos e na culinária. Recentemente, as pesquisas aumentaram devido as suas propriedades nutricionais (MOURA & AREAS 2012).

Ainda de acordo com MOURA & AREAS (2012), a fruta é recomendada para auxiliar em diferentes situações, como sedativo, anticonvulsivante, para tratamentos respiratórios, dor, emagrecimento, entre outros. A literatura relata que o consumo frequente da fruta pode ajudar na redução da ocorrência do estresse oxidativo, sendo este um dos principais causadores do envelhecimento precoce e morte celular. Tal achado é caracterizado pela atividade antioxidante apresentada pela fruta (LOPES et al. 2000). No seu extrato, extraído de diversas partes da planta, os flavonoides podem ser encontrados (SIMÕES et al. 2004). Estes, segundo LOPES et al (2000) são responsáveis pela capacidade antioxidante, atividade anti-inflamatória, ação antialérgica, atividade contra o desenvolvimento de tumores, também ações antimicrobianas e antivirais.

As frutas, em especial, são caracterizadas por serem uma fonte de antioxidantes naturais. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a ação antioxidante da fruta laranja-azeda (*Citrus aurantium L.*) na casca e no albedo.

### 2. METODOLOGIA

Foram obtidas amostras maduras da fruta em regiões do Sul do Brasil, no estado do Rio Grande do Sul. As frutas foram selecionadas visualmente, de acordo com a aparência, diâmetro e maturação. As amostras foram coletadas em sacos plásticos e encaminhadas até o Laboratório de Ensaio de Alimentos da Faculdade de Nutrição, da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), onde foram armazenadas no ultrafreezer a – 80°C.

As amostras foram extraídas da casca e do albedo da fruta, em concentrações de 10%, 20% e 30% de álcool etílico (99,8%) e água destilada (temperatura ambiente). As amostras foram pesadas na quantidade referente as concentrações e adicionado o respectivo solvente (álcool ou água) para completar o volume de 100 mL.

Foram realizadas as análises de peroxidação lipídica por meio da reação ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) e capacidade antioxidante pelo método do sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil).

A reação ao ácido tiobarbitúrico foi determinada de acordo com a metodologia de OHKAWA et al. (1979) com modificações. Primeiramente, os tubos de ensaio contendo água Mili Q, Azeite de Oliva Extra Virgem submetidos à oxidação por 100 $\mu$ M de sulfato ferroso, foram incubados em banho maria, a 80°C, por 10 minutos. Após, foi adicionado em cada tubo as amostras, com diferentes concentrações e diferentes solventes, Lauril Sulfato de Sódio (SDS) 8,1%, Tampão de Ácido Acético pH 3,44 e Ácido Tiobarbitúrico (TBA) 0,6% e incubado novamente, em banho maria a 100 °C por 1 hora. Os produtos da reação foram determinados por medida de absorbância em 532nm, em espectrofotômetro. A concentração de TBARS foi calculada por meio de uma curva padrão, concentrações conhecidas de 1,1,3,3 – tetrametoxipropano, e os resultados expressos em nm de Malonaldeído (MDA) g<sup>-1</sup> de amostra. O experimento foi realizado em duplicata em dois experimentos independentes.

O método DPPH utilizado foi o descrito por BRAND-WILLIAMS et al. (1996) baseado na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) por antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorbância a 515 nm. O DPPH foi utilizado na concentração de 60  $\mu$ M, dissolvido em álcool metílico. Em ambiente escuro, foi transferida uma alíquota de 0,1 mL do extrato da fruta para tubos de ensaio contendo 3,9 mL do radical DPPH (60  $\mu$ M) e, em seguida, homogeneizados. Foram utilizados 0,1 mL de uma solução controle (solução controle de álcool metílico 50% (40 mL), acetona 70% (40 mL) e água (20 mL)) com 3,9 mL do radical DPPH (60  $\mu$ M). Após o preparo, as amostras foram armazenadas em ambiente escuro por 1 hora, posterior a isso foi realizada a leitura da absorbância de cada amostra. Como branco foi utilizado álcool metílico e a curva padrão foi realizada a partir da solução inicial de DPPH (60  $\mu$ M), variando a concentração de 10  $\mu$ M a 50  $\mu$ M. Os resultados foram expressos em EC<sub>50</sub> ( $\mu$ g mL<sup>-1</sup>). O experimento foi realizado em duplicata em dois experimentos independentes.

Os dados que apresentaram distribuição simétrica foram analisados estatisticamente por meio da análise de varância (One-way ANOVA), com nível de significância de 5% para comparação das médias, com auxílio do programa GraphPad Prism 7.0.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quando analisada a amostra contendo o extrato aquoso e etanólico da casca, por meio do sequestro de radicais livres pelo método DPPH, foi observada diferença significativa em todas as concentrações (no estado aquoso, as concentrações 10%, 20% e 30% tiveram as médias 4,84, 3,99 e 1,93 nmol MDA mL<sup>-1</sup>, respectivamente e no meio etanólico as concentrações 10%, 20% e 30% tiveram as médias 19,61, 9,26 e 1,59 nmol MDA mL<sup>-1</sup>, respectivamente) quando comparadas ao controle (29,17 nmol MDA mL<sup>-1</sup>), demonstrando, desta forma, capacidade antioxidante. Em contrapartida, na amostra contendo extrato aquoso do albedo, apenas as concentrações 10% e 20% (13,54 e 3,13nmol MDA mL<sup>-1</sup>, respectivamente) apresentaram diferença significativa quando comparadas ao controle (29,17 nmol MDA mL<sup>-1</sup>). No entanto, quando analisado o extrato etanólico, todas as concentrações apresentaram efeito antioxidante (as concentrações 10%, 20 e 30% tiveram as médias 5,04, 5,04 e -0,58 nmol MDA mL<sup>-1</sup>, respectivamente) comparadas ao controle (29,16 nmol MDA mL<sup>-1</sup>).

Os resultados da peroxidação lipídica pelo método de TBARS revelaram que o extrato aquoso da casca apresentou diferença significativa em todas as concentrações analisadas (as concentrações 10%, 20% e 30% tiveram as médias 661,65, 407,59 e 377,74 nmol MDA mL<sup>-1</sup>, respectivamente). Porém, ao analisar o extrato etanólico da casca, observou-se que apenas a concentração de 10% apresentou diferença significativa (1621,82 nmol MDA mL<sup>-1</sup>) em relação ao controle (2345,61 nmol MDA mL<sup>-1</sup>). Quando analisada a amostra do albedo, todas as concentrações demonstraram capacidade antioxidante no extrato aquoso (as concentrações 10%, 20% e 30% tiveram as médias 796,90, 526,39 e 391,95 nmol MDA mL<sup>-1</sup>, respectivamente); já, no extrato etanólico, somente as concentrações de 10% e 20% demonstraram diferença significativa (1440,27 e 941,29 nmol MDA mL<sup>-1</sup>) quando comparadas ao controle (2345,61 nmol MDA mL<sup>-1</sup>).

DIAZ-URIBE et al. (2016) realizou um estudo com resíduos da casca do fruto laranja-azeda com a finalidade de analisar a capacidade antioxidante do mesmo. Os resultados das análises evidenciaram que a amostra utilizada apresentou capacidade de estabilizar a ação dos radicais livres, conferindo-lhe efeito antioxidante. De acordo com ALARCON (2011) o ácido ascórbico (vitamina C) reage com facilidade aos radicais livres, atuando como antioxidante. ALARCON (2011) também conclui que a laranja-azeda é um fruto rico em ácido ascórbico (vitamina C), tendo obtido o melhor resultado dentre os frutos cítricos analisados (*Citrus aurantium*, *Citrus aurantifolia* e *Citrus reticulata*), o que pode justificar sua ação positiva frente as análises. Estes resultados corroboram com os resultados do presente estudo, no qual ambos extratos (casca e albedo) em ambos solventes (água e álcool) demonstraram capacidade de inibir a ação dos radicais livres pelo método DPPH e, da mesma forma, capacidade de inibir a peroxidação lipídica pelo método de TBARS.

#### 4. CONCLUSÕES

Com o aumento das pesquisas em relação a promoção da saúde, os efeitos benéficos das frutas vêm sendo amplamente estudados. Dessa forma, com o presente estudo, pode-se concluir que a laranja-azeda (*Citrus aurantium*) apresentou capacidade antioxidante em todas as concentrações analisadas pelos métodos de TBARS quando utilizado extrato aquoso da casca e do albedo e, pelo método DPPH quando utilizado o extrato aquoso e etanólico da casca e, no albedo, quando utilizado o extrato etanólico somente. Além disso, outros estudos estão sendo desenvolvidos para elucidar os efeitos da fruta pesquisada quanto a caracterização centesimal, fitoquímica, bem como o efeito termogênico da mesma em animais.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALARCÓN, M.F.M. **Determinación, cuantificación y comparación de la concentración de vitamina C en naranja (*citrus aurantium*), limón (*citrus aurantifolia*) y mandarina (*citrus reticulata*) por HPLC.** 2011. Disertación previa a la obtención del Título Licenciado en Ciencias Químicas – Pontificia Universidad Católica Del Ecuador, Facultad de CienciasExactas y Naturales - Escuela de CienciasQuímicas.

ALONSO, Jorge R. **Tratado de fitofármacos y nutracéuticos.** 2.ed. Buenos Aires: Corpus Editorial. 2007. 1150 p.

BOUCHARD, N.C.; HOWLAND, M.A.; GRELLER, H.A.; HOFFMAN, R.S.; NELSON, L.S. Ischemic stroke associated with use of an ephedra-free dietary

- supplement containing synephrine. **Mayo Clinic Proceedings**, v.80, n.4, p.541-545, 2005.
- BRAND-WILLIAMS, W; CUVELIER, M-E; BERSET, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.
- DIAZ-URIBE C., VALLEJO W., OLIVEROS G., MUÑOZ A. Study of scavenging capacity of naringin extracted from Citrus uranium peel against free radicals. **Prospect**, v.14, n.2, p.31-35, 2016.
- LI, L.; NG, T.B.; GAO, W.; LI, W.; FU, M.; NIU, S.M.; ZHAO, L.; CHEN, R.R.; LIU, F. Antioxidant activity of gallic acid from rose flowers in senescence accelerated mice. **Life sciences**, v.77, n.2, p.230-240, 2005.
- LOPES, R.M.; OLIVEIRA, T.T.; NAGEM, T.J.; PINTO, A.S. Flavonóides: farmacologia de flavonóides no controle hiperlipidêmico em animais experimentais. **Biotecnologia CienDesenvolv.**, v.3, n.17, p.18-22, 2000., v. 17, p. 18-22, 2000.
- MOURA, R.B.; AREAS, T.F. Laranja da Terra: Evidências Científicas para Diferentes Aplicações Terapêuticas. **Revista Fitos Eletrônica**, v.7, n.2, p.110-118 2012.
- OHKAWA, H.; OHISHI, N.; Anal. **Biochem**. 1979, 95, 351.
- SIMÕES, C.M.O.; MENTZ, L.A; SCHENKEL, E.P.; IRGANG, B.E.; STEHMANN, J.R. **Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Editora da Universidade UFRGS, 1986.
- SUCUPIRA, N.R.; SILVA, A.B.; PEREIRA, G.; COSTA, J.N. Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. **UNOPAR Cient. Cienc. Biol. Saúde**, v.14, n.4, p.263-269, 2012.