

COMPARAÇÃO ENTRE SOLVENTES E DE TEMPOS DE REAÇÃO PELA CAPTURA DO RADICAL LIVRE ABTS^{•+} EM GRÃOS DE GIRASSOL

MENDONÇA, André Oliveira de¹; LANGARO, Ana Claudia¹; MANICA-BERTO, Roberta¹; NOHATTO, Marcos André¹; ULGUIM, André da Rosa¹; AGOSTINETTO, Dirceu²

¹Centro de Herbologia (CEHERB) – DFs/FAEM/UFPel, Caixa Postal 354 - CEP 96010-900. e-mail: andreh_mendonca@hotmail.com; namelia.langaro@gmail.com; robertamanica@yahoo.com.br; marcosnohatto@hotmail.com; andre_ulguim@yahoo.com.br; agostinnetto@ig.com.br

1. INTRODUÇÃO

O girassol (*Helianthus annuus* L.) é uma cultura, entre as oleaginosas, que ganhou importância dentro da cadeia agrícola mundial, com aumento médio de 5,3% nos últimos 10 anos (FAO, 2010). Entre os principais entraves no girassol, encontra-se o manejo de plantas daninhas, pois o controle dessas está limitado à falta de herbicidas registrados, consequentemente, a competição estabelecida com as plantas daninhas pode prejudicar a produtividade da cultura.

Acredita-se que a competição também apresenta influência na composição dos ácidos graxos e outros metabólitos secundários no grão. Estudos sobre períodos de competição conduzidos com feijão (SALGADO et al., 2007), milho (ISIK et al., 2006) e girassol (BRIGHENTI et al., 2004), demonstraram que a duração de cada período varia com a cultura e as espécies daninhas presentes na área. Mas, nenhum estudo mostrou os resultados sobre a qualidade do óleo e/ou sobre o efeito nas propriedades fitoquímicas do grão de girassol.

O grão do girassol apresenta propriedades fitoquímicas que têm capacidade antioxidante, e essas podem ser avaliadas por diversos métodos. O método do ABTS é o mais utilizado, onde a atividade antioxidante é medida pela captura do radical 2,2'-azobis (3-etilbenzenotiazolina-6-ácido sulfônico) que pode ser gerado através de reação química, eletroquímica ou enzimática (RUFINO et al., 2007). Esse método se baseia na formação do radical ABTS^{•+} pelo radical ferrilmioglobina formado pela reação entre a metamioglobina e H₂O₂ na presença de peroxidase.

Para avaliar os efeitos da competição sobre o grão necessita-se previamente a adequação de metodologias, como o ABTS, que permitam quantificar a capacidade antioxidante dos compostos. Dessa forma, o trabalho tem por objetivo selecionar o melhor solvente a ser utilizado para extração e o tempo ideal de reação no método ABTS.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos a campo e em laboratório da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), em Capão do Leão-RS.

O experimento a campo foi conduzido no Centro Agropecuário da Palma (CAP/UFPel). Antes da semeadura, foi realizada dessecação da cobertura vegetal, a fim de eliminar as plantas daninhas presentes e uniformizar a emergência dessas e da cultura. O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, com quatro repetições, sendo que cada unidade experimental ocupou área de 16 m² (5,0 m x 3,2 m). A cultivar de girassol utilizada

foi BRS 321, de ciclo precoce. A espécie daninha presente foi nabo (*Raphanus raphanistrum*) em população média de 189 m².

O experimento foi composto por dois fatores: períodos de convivência e períodos de controle do nabo com a cultura do girassol. No período de convivência, a cultura foi mantida na presença do competidor por períodos iniciais crescentes de 0, 7, 14, 24, 28, 35 e 120 (todo o ciclo da cultura) dias após a emergência (DAE), a partir dos quais foram controladas. No período de controle, a cultura foi mantida livre de plantas daninhas nos mesmos períodos descritos anteriormente e as plantas de nabo emergidas após esses intervalos não foram controladas. A remoção do nabo foi realizada através de capina manual.

No laboratório, inicialmente foi realizada a determinação dos carotenóides totais e a partir disso, foram selecionados os tratamentos que apresentavam o maior e menor teor desse composto, para em seguida validar o método da capacidade antioxidante via ABTS. O tratamento com mais carotenóides totais caracterizou-se pela ausência da planta daninha (controle) até os 28 DAE, e o tratamento com menor valor para a variável caracterizou-se pela ausência durante todo o ciclo da cultura (120 dias).

Para a estruturação da validade desse método seguiu-se o delineamento completamente casualizado em esquema bifatorial 3 x 2, três solventes (hexano, acetona e metanol) e dois tempos de reação (10 e 30 minutos), avaliados separadamente para cada tratamento.

Para a determinação da capacidade antioxidante, usou-se o método descrito por Erel (2004), com adaptações. Inicialmente, formou-se o radical ABTS^{•+}, a partir da reação de 7 mM de ABTS com 2,45 mM de persulfato de potássio (concentração final), incubada à temperatura ambiente e na ausência de luz, por 12 horas. Transcorrido esse tempo, a solução foi diluída em etanol p.a. até obter-se solução com absorvância de 0,70 ($\pm 0,01$) a 734 nm (longitude de onda de máxima absorção). As amostras (grãos) foram previamente trituradas e passaram por processo de extração por 24 horas em diferentes solventes: hexano p.a., acetona p.a. e metanol p.a. Para realizar as medidas, foram adicionados 100 μ L do extrato da amostra correspondente a cada solvente em 900 μ L da solução contendo o radical, determinando-se a absorvância em espectrofotômetro (Ultraspec 2000 UV/visível - Pharmacia Biotech), a 734 nm, após 10 e 30 minutos de reação. Como solução padrão, usou-se o antioxidante sintético Trolox nas concentrações de 10 a 200 μ M em etanol p.a.. Foram elaboradas duas curvas padrões, aos 10 minutos ($y = -0,0025x + 0,4823$; $R^2 = 0,995$) e aos 30 minutos ($y = -0,0022x + 0,4292$; $R^2 = 0,998$) de reação. Todas as leituras foram realizadas em triplicata, e os resultados foram representados em TEAC, ou seja, capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (mM g⁻¹ de peso da matéria fresca).

Os dados obtidos foram avaliados quanto à sua normalidade e, posteriormente foram submetidos à análise de variância. Quando significativa, as médias dos solventes foram comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) e os tempos de reação pelo teste t ($p \leq 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Houve interação entre os fatores solvente e tempo de reação para a variável capacidade antioxidante quando as plantas de girassol foram submetidas a controle da planta daninha (nabo) até aos 28 dias após a emergência da cultura (Tabela 1). Já, quando as plantas de girassol foram submetidas ao controle da

planta daninha durante todo o ciclo constatou-se somente o efeito principal do solvente utilizado na extração (Tabela 2).

Tabela 1. Capacidade antioxidante expressa em equivalente de Trolox (mM TEAC g⁻¹) de grãos de girassol provenientes do tratamento com controle do nabo até os 28 dias após a emergência. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2011

Solventes	Tempo de reação	
	10 minutos	30 minutos
Hexano	0,36 a ^{1*}	0,38 a
Acetona	0,32 b ^{ns}	0,32 b
Metanol	0,26 c ^{ns}	0,27 c

¹ Médias seguidas por mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (p≤0,05).
^{ns} e * diferença na linha não significativa e significativa, respectivamente, pelo teste t (p≤0,05).

Tabela 2. Capacidade antioxidante expressa em equivalente de Trolox (mM TEAC g⁻¹) de grãos de girassol provenientes do tratamento com controle do nabo durante todo o ciclo da cultura. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2011

Solventes	Capacidade antioxidante (mmol g ⁻¹)
Hexano	0,34 a ^{1/}
Acetona	0,31 b
Metanol	0,27 c
Média Geral	0,31
CV (%)	2,1

¹ Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (p≤0,05).

Para ambos os tratamentos, o hexano foi o solvente que permitiu maior capacidade antioxidante (Tabelas 1 e 2). Isso se justifica pelo fato do hexano apresentar maior apolaridade que os demais solventes, possibilitando assim a extração, além dos compostos fenólicos, de outros compostos com propriedades lipofílicas, como os carotenóides que se encontram presentes no grão do girassol.

Quanto ao tempo, 10 minutos se mostraram suficientes para ocorrência da reação quando utilizado os solventes acetona e metanol (Tabela 1). Trabalhos apresentam divergência quanto ao tempo de medida da reação. Segundo RE et al. (1999), a quantificação pode ser realizada aos 2 minutos, pois nesse tempo o Trolox já reagiu completamente com o radical. Os autores relatam que quanto mais rápido um antioxidante reagir com um radical, melhor será sua atividade antioxidante em organismos animais, haja vista que os radicais livres, no organismo, possuem meia vida muito curta (10 a 6 segundos). Por outro lado, trabalhos utilizaram tempos mais longos de reação (4, 6, 10, 30 e 60 minutos), pois os antioxidantes alimentares normalmente não reagem tão prontamente com o radical; assim, sua quantificação em tempo muito curto subestimaria o valor TEAC.

A explicação para o uso de tempos mais longos é que certos antioxidantes seguem uma reação bifásica frente ao radical ABTS, com fase inicial rápida e, posteriormente, fase lenta (VAN DEN BERG et al., 1999). Segundo DE BEER et al. (2003), o uso de apenas 6 minutos de reação, trabalhando com azeite virgem de oliva, que tem compostos do metabolismo secundário semelhante ao dos grãos do girassol, apresentaram adequada capacidade de sequestrar os radicais ABTS^{•+}.

4. CONCLUSÕES

Os resultados possibilitam a adequação do método de captura do radical livre ABTS^{•+}, fixando o hexano como solvente de extração e tempo de 30 minutos de reação.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRIGHENTI, A.M.; CASTRO, C.; OLIVEIRA JR., R.S.; SCAPIM, C.A.; VOLL, E.; GAZZIERO, D.L.P. Períodos de interferência de plantas daninhas na cultura do girassol. **Planta Daninha**, v.22, p.251-257, 2004.
- DE BEER, D.; JOUBERT, E.; GELDERBLUM, W.C.A.; MANLEY, M. Antioxidant activity of south African red and white cultivar wines: free radical scavenger. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.90, p.569-577, 2003.
- EREL, O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*, v.37, p.277-285, 2004.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Production of cereals and share in world**. Disponível em: <<http://www.fao.org/statistics>> Acesso em: 05 jan. 2010.
- ISIK, D.; MENNAN, H.; BUKUN, B.; OZ, A.; NGOUAJIO, M. The critical period for weed control in corn in Turkey. **Weed Technology**, v.20, p.867-872, 2006.
- RE, R.; PELEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICEEVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v.26, p.1231-1237, 1999.
- RUFINO, M.S. M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.D. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS^{•+}. **Comunicado Técnico**, ISSN 1679-6535. Fortaleza, CE, 2007.
- SALGADO, T.P.; SALLES, M.S.; MARTINS, J.V.F.; ALVES, P.L.C.A. Interferência das plantas daninhas no feijoeiro carioca. **Planta Daninha**, v.25, p.443-448, 2007.
- 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 Chemistry**, v.66, p.511-517, 1999.