



## ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS VEGETAIS\*

Melissa dos Santos OLIVEIRA\*\*

Giniani Carla DORS\*\*

Leonor Almeida de SOUZA-SOARES\*\*\*

Eliana BADIALE-FURLONG\*\*\*

■ **RESUMO:** A proposta desta investigação foi medir os conteúdos fenólicos totais, avaliar a atividade antioxidante, e a atividade antifúngica de extratos de laranja, limão, maçã, banana, batata, berinjela, arroz e trigo. Os conteúdos de fenóis totais dos extratos foram quantificados por método espectrofotométrico, utilizando o reagente folin-ciocalteau e testados quanto a atividade antioxidante em um sistema enzimático na redução da atividade da peroxidase. Foi avaliada a atividade antifúngica sobre o fungo *Aspergillus flavus*, sendo sua produção de aflatoxina B<sub>1</sub> avaliada em placas de petri com BDA. Os valores de velocidade máxima das reações enzimáticas indicaram que os extratos vegetais estudados promoveram inibições de 22% a 98% na reação de escurecimento enzimático em 10 minutos. O comportamento das velocidades das reações de escurecimento em diferentes concentrações de substrato sugere que as reações de inibição são do tipo não competitiva, exceto para os extratos das cascas de banana, berinjela e polpa de maçã. Os extratos das polpas de limão, laranja e banana e das cascas de maçã apresentaram atividade antioxidante maior que a atividade antifúngica sobre *Aspergillus flavus*. Todos os extratos vegetais, excetuando-se a polpa da batata, inibiram totalmente a produção de aflatoxinas.

■ **PALAVRAS-CHAVES:** Atividade antioxidante; compostos fenólicos; atividade antifúngica; micotoxinas; peroxidase.

### INTRODUÇÃO

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias que em pequenas concentrações, em comparação ao substrato oxidável, retardam ou previnem significativamente o início ou a propagação da cadeia de reações de oxidação. Estes compostos inibem não só a peroxidação dos lipídios, mas também, a oxidação de outras moléculas, como proteínas, DNA, entre outras.<sup>8</sup>

Compostos químicos que possuem atividade antioxidante geralmente são aromáticos e contêm pelo menos uma hidroxila podendo ser sintéticos como o butil hidroxianisol (BHA) e o butil hidroxitolueno (BHT), largamente utilizados pela indústria de alimentos. Os naturais, denominados substâncias bioativas, incluem organosulfurados, os fenólicos (tocoferóis, flavonóides e ácidos fenólicos), os terpenos, carotenóides e o ácido ascórbico que fazem parte da constituição de diversos alimentos.<sup>19,30</sup>

Diversos autores vêm mencionando que os vegetais da dieta são fonte de antioxidantes fenólicos.<sup>12,16,30,31,35,36</sup> As frutas, hortaliças, grãos e especiarias, além de plantas medicinais são as principais fontes de compostos antioxidantes mostradas pela literatura.<sup>1,2,20,24,31,32</sup> As pesquisas buscam substâncias com atividade antioxidante, provenientes de fontes naturais, que possam atuar sozinhas ou sinergicamente com outros aditivos; que funcionem como alternativa para prevenir a deterioração oxidativa de alimentos e limitem o uso dos antioxidantes sintéticos e agentes conservadores.<sup>19</sup>

Além disso, vem sendo demonstrado que estes compostos podem atuar como antifúngicos e inibidores da produção de micotoxinas, tais como a aflatoxina, por atuarem na regulação da peroxidação lipídica, inibindo a formação de peróxidos e conseqüente estresse oxidativo que está relacionado a biosíntese de aflatoxinas.<sup>10,11,23,28,29</sup>

Evidências científicas permitem afirmar que a propriedade antioxidante de vegetais se deve, principalmente, a seus compostos fenólicos.<sup>3,12</sup> Kaur & Kapoor<sup>14</sup> encontraram uma correlação significativa e positiva ( $r^2 = 0,66$ ,  $p < 0,05$ ) entre a atividade antioxidante e conteúdo de fenóis totais em vegetais da dieta asiática.

Diferentes propostas vêm sendo realizadas para avaliar a atividade antioxidante de compostos fenólicos, mas pouco tem sido feito para determinar o efeito inibidor de compostos fenólicos dos mesmos em sistemas enzimáticos, particularmente com respeito à peroxidase. Esta é uma enzima que aparece em células de diferentes seres vivos e

\*Trabalho elaborado com apoio financeiro da FAPERGS e do CNPq.

\*\*Curso de Pós-Graduação – Engenharia e Ciência de Alimentos – Fundação Universidade Federal do Rio Grande – FURG – Laboratório de Micotoxinas – 96201-900 – Rio Grande- RS – Brasil.

\*\*\*Departamento de Química – Fundação Universidade Federal do Rio Grande – FURG – Laboratório de Micotoxinas – 96201-900 – Rio Grande- RS – Brasil.

que tem por função oxidar compostos doadores de elétrons, tendo como agente doador de oxigênio a água oxigenada. Bioquimicamente a função desta enzima é proteger as células possíveis danos, e sua atividade se manifesta, principalmente, em situações de desequilíbrios físico-químicos do sistema. O excesso da ação desta enzima pode resultar em danos indesejáveis nas células. No caso dos alimentos, as principais alterações são perdas do flavor, da cor e dos nutrientes. A atuação da peroxidase sobre compostos doadores de elétrons a torna atrativa para se estimar a atividade antioxidante de diferentes compostos, como por exemplo, os fenóis. No trabalho de Hemeda e Klein<sup>9</sup> foi demonstrada a atividade antioxidante de  $\alpha$ -tocoferol, quercetina, ácidos rutínico e clorogênico sobre a atividade da peroxidase extraída de diferentes vegetais. Colla et al<sup>5</sup> testaram a atividade antioxidante de extrato fenólicos de *Spirulina platensis* usando peroxidase extraída de batata.

Estas considerações e a solubilidade, em sistemas aquosos, dos compostos fenólicos norteou o propósito deste trabalho que abrangeu quantificar o conteúdo de fenólicos totais, avaliar o efeito antioxidante sobre a atividade da peroxidase, verificar o efeito inibidor sobre o desenvolvimento do fungo toxigênico *Aspergillus flavus* e a respectiva produção de Aflatoxina B<sub>1</sub> de extratos vegetais das porções comestíveis e das cascas de frutas, tubérculos e cereais.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Preparo dos Extratos Fenólicos

Os vegetais estudados neste trabalho foram laranja (*Citrus sinensis*, Osbeck), limão (*Citrus limon*), maçã gala (*Malus domestica Borkh*), banana prata (*Musa spp.*), batata inglesa rosa (*Solanum tuberosum L.*), berinjela (*Solanum melongina, L.*), arroz beneficiado (*Oryza sativa*) e trigo integral (*Triticum aestivum*) adquiridos no comércio da cidade de Rio Grande, RS. As cascas das frutas e do tubérculo foram separadas de suas porções comestíveis (polpas), sendo ambos cortados em cubos de 5mm de aresta. Os grãos descascados foram moídos em moinho de facas até 0,35 mm de granulometria.

A extração dos compostos fenólicos foi realizada a frio com álcool metílico na proporção de 1:5 (massa seca: solvente) em agitadores horizontais, seguida da partição com hexano e clarificação com hidróxido de bário 0,1M e sulfato de zinco 5%. O conteúdo de fenóis totais foi quantificado através do método espectrofotométrico utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu, empregando-se uma curva padrão com diferentes concentrações de tirosina (0 a 5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e os resultados expressos em  $\mu\text{g}$  de fenóis/g de vegetal em base seca.<sup>4</sup> Os extratos metanólicos foram concentrados sob pressão reduzida a 40°C para eliminar o metanol e obter um extrato aquoso.

### Teste de Atividade Antioxidante em Sistema Aquoso

A atividade antioxidante dos extratos vegetais estudados foi determinada pela inibição da reação de escurecimento enzimático do guaiacol catalisada pela peroxidase da batata.

### Preparo do Extrato Enzimático

A enzima peroxidase foi extraída da polpa da batata (20g) com 100mL de solução tampão fosfato pH 7, sob agitação em blender por 2 minutos, seguida de filtração. Uma alíquota de 10 mL do sobrenadante foi adicionada a 20 mL de acetona para precipitação da enzima. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o resíduo protéico foi ressuspensionado com EDTA 0,25M.

*Efeito dos extratos vegetais sobre o escurecimento enzimático catalisado por peroxidase.*

A reação enzimática foi realizada a 30°C e pH 7,0 utilizando-se o guaiacol como substrato em presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,08%. Os extratos vegetais foram adicionados como inibidores da reação e no grupo controle o volume de extrato vegetal foi substituído por água destilada. A absorbância foi medida a 470 nm em um espectrofotômetro VARIAN modelo CARY 100 no tempo zero e após 5, 10, 15, 20 e 25 minutos de reação. A unidade de atividade enzimática específica foi definida como a absorbância produzida por miligrama de proteína do extrato enzimático em 1 minuto. A atividade antioxidante foi expressa como o percentual de inibição da reação de escurecimento após 10 minutos de reação, em relação ao seu controle.

*Avaliação do mecanismo de inibição de peroxidase pelos extratos vegetais.*

Diferentes concentrações do substrato (guaiacol) foram utilizados na reação enzimática e os resultados foram plotados segundo o método gráfico de Lineweaver e Burk para se avaliar o comportamento cinético. A reação ocorreu em solução tampão fosfato pH 7,0, com o extrato enzimático da batata, peróxido de hidrogênio 0,08% e diferentes alíquotas de guaiacol 0,5% (0, 0,1, 0,3, 0,5, 0,8, 1,0 mL) como substrato da reação. Além do grupo controle o procedimento foi repetido na presença dos extratos vegetais.

### Teste de Atividade Antifúngica e Antimicotoxigênica

Os testes de atividade antifúngica contra o *Aspergillus flavus* foram realizados *in vitro*, em placas de Petri contendo meio Agar Batata Dextrose (BDA). Os extratos vegetais foram adicionados ao meio de cultura, de forma a perfazer as seguintes concentrações de fenóis totais: Cascas e polpas de banana: 58 e 40  $\mu\text{g}_{\text{fenóis}} \cdot \text{mL}^{-1}_{\text{ágar}}$ ; limão: 370 e 170  $\mu\text{g}_{\text{fenóis}} \cdot \text{mL}^{-1}_{\text{ágar}}$ ; laranja: 250 e 170  $\mu\text{g}_{\text{fenóis}} \cdot \text{mL}^{-1}_{\text{ágar}}$ ; maçã: 200 e 88  $\mu\text{g}_{\text{fenóis}} \cdot \text{mL}^{-1}_{\text{ágar}}$ ; berinjela: 60 e 40  $\mu\text{g}_{\text{fenóis}} \cdot \text{mL}^{-1}_{\text{ágar}}$ ; batata: 38 e 67  $\mu\text{g}_{\text{fenóis}} \cdot \text{mL}^{-1}_{\text{ágar}}$ ; e grão de arroz e trigo: 6 e 9  $\mu\text{g}_{\text{fenóis}} \cdot \text{mL}^{-1}_{\text{ágar}}$ .

mL<sup>-1</sup> <sub>ágar</sub>, respectivamente. No experimento controle água estéril em foi adicionada em substituição aos extratos vegetais. Após o preparo das placas de Petri, 5µL da suspensão de esporos do fungo *Aspergillus flavus* (10<sup>7</sup>esporos.mL<sup>-1</sup>) foram colocados no centro das placas e estas incubadas a 30°C por 7 dias. O diâmetro do crescimento do micélio foi medido em centímetros no 3<sup>a</sup>, 5<sup>a</sup> e 7<sup>a</sup> dia de incubação. Os experimentos foram realizados com triplicata.<sup>21</sup> Após 14 dias de incubação as placas foram congeladas para posterior determinação da aflatoxina B<sub>1</sub> no meio de crescimento. A extração das micotoxinas seguiu o método adaptado de Tanaka et al.<sup>27</sup> e a identificação e a quantificação foram realizadas em cromatografia de camada delgada.<sup>26</sup>

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os frutos limão, laranja, banana, berinjela, maçã, o tubérculo batata e os grãos de arroz e de trigo estão, comumente presentes na dieta da população no sul do Rio Grande do Sul e foram coletadas no comércio, aleatoriamente, sendo considerados aqueles aspectos subjetivos empregados pelos consumidores (cor e firmeza, principalmente) como aptos para o emprego doméstico. A determinação do teor de fenóis totais foi realizada nas cascas das frutas e do tubérculo, separadamente da sua porção comestível, para a estimativa das fontes potenciais de compostos fenólicos, as quais são descartadas diariamente como resíduos do emprego destes produtos na dieta cotidiana. A Tabela 1 apresenta os resultados levantados sobre o conteúdo de compostos fenólicos nos vegetais estudados.

Tabela 1 – Teores dos fenóis totais nos extratos vegetais.

Porções comestíveis	Fenóis totais (µg <sub>fenóis</sub> .g (bs) <sup>-1</sup> )	Cascas	Fenóis totais (µg <sub>fenóis</sub> .g (bs) <sup>-1</sup> )
p. limão	2700±57	c. limão	5500±160
p. laranja	4500±52	c. laranja	4200±37
p. maçã	1000±2,6	c. maçã	4700±140
p. banana	310±8,5	c. banana	1010±25
p. berinjela	390±5,8	c.berinjela	2200±96
p. batata	410±14	c. batata	990±38
Arroz	40±1,1		
Trigo	290±9,5		

p = polpa; c = casca; média ± desvio padrão de triplicata

O arroz foi o material que apresentou menor conteúdo de compostos fenólicos (40 µg<sub>fenóis</sub>.g(bs)<sup>-1</sup>). Os extratos das porções externas dos vegetais apresentam valores entre 2 e 5 vezes superiores aos de suas respectivas polpas, com exceção do extrato de laranja. Tal perfil era esperado tendo em vista que a função protetora atribuída a estes compostos seria mais abundante nas porções mais externas.<sup>23,29</sup> Os descartes ricos em fenóis podem ser interessantes como matérias prima para a obtenção de antioxidantes naturais, dada a sua abundância nos resíduos domésticos e industriais.

Considerando-se a abundância dos compostos fenólicos nas porções estudadas foi avaliada a atividade antioxidante dos extratos em um sistema enzimático aquoso sobre a ação da peroxidase, que permitiria inferir sobre o mecanismo de inibição de oxidação uma vez que o potencial antioxidante de uma substância depende de sua estrutura química.

A Tabela 2 apresenta a concentração de compostos fenólicos contida nos extratos utilizados em cada experimento, a atividade enzimática específica e a inibição em porcentagem, causada pela presença dos extratos vegetais no meio de reação. Cabe salientar que não foi observada relação linear crescente entre os teores de fenóis e a inibição do escurecimento avaliada pela inibição da atividade enzimática específica relativa ao controle (ausência de extrato). Este efeito indica que os tipos e as estruturas dos compostos fenólicos presentes influenciam mais na atividade antioxidante que a concentração dos fenólicos totais, conforme o que vem sendo preconizado em literatura.

Kahkonen et al.<sup>12</sup> estudaram 96 extratos fenólicos de porções comestíveis e não comestíveis de frutas, vegetais, ervas, cereais, brotos e sementes e encontraram alto conteúdo de compostos fenólicos e alta atividade antioxidante, porém, também, não encontraram uma correlação significativa entre o teor de fenóis totais e a atividade antioxidante determinados nos vegetais. Velioglu et al.<sup>30</sup> encontraram uma correlação significativa de 0,4253 (R<sup>2</sup> = 0,4253 p<0,001) entre o conteúdo de fenóis e a atividade antioxidante de 28 produtos vegetais analisados.

Tabela 2 – Conteúdo de fenóis, atividade enzimática específica e a inibição exercida pelos extratos vegetais em 10 minutos de reação.

Tipo de Extrato	Fenóis totais (µg <sub>fenóis</sub> .mL <sup>-1</sup> )	AES (abs.mg.min <sup>-1</sup> )	Inibição (%)
c. limão	108,3	0,013	76
p. limão	40,0	0,004	93
c. laranja	73,3	0,014	74,5
p. laranja	41,7	0,001	98
c. maçã	50,0	0,01	82
p. maçã	18,3	0,021	62
c. banana	13,3	0,035	36
p. banana	8,3	0,014	74,5
c. berin.	13,3	0,041	25,5
p. berin.	8,3	0,05	10
c. batata	10,0	0,035	36
p. batata	10,0	0,043	22
arroz	1,3	0,022	60
trigo	2,0	0,027	50

p = polpas; c = cascas; AES = Atividade enzimática específica

As Figuras 1 e 2 ilustram o comportamento da reação de escurecimento enzimático do guaiacol catalisada pela peroxidase em ausência e presença de extratos das cascas e polpas dos vegetais, respectivamente, ao longo de 25 minutos.

Pela Figura 1 pode ser observado que houve diminuição da velocidade de escurecimento ao longo do tempo, ou seja, a reação de escurecimento enzimático foi inibida em presença dos extratos vegetais destacando os de cascas de limão, laranja e maçã. Nestes casos as atividades inibitórias coincidem com os maiores teores fenólicos encontrados.

Wolfe et al.<sup>33</sup> verificaram que as cascas de diferentes variedades de maçã apresentaram alto conteúdo de compostos fenólicos (300 a 580mg ácido gálico/ 100g de casca), principalmente flavonóides e antocianinas, a atividade antioxidante e antiproliferação de células cancerígenas foram mais elevadas que a polpa desta fruta.

Os resultados demonstram que as cascas de batata e banana, também, são potenciais fontes de antioxidante. Diferentes pesquisadores relataram o alto conteúdo de compostos fenólicos na casca de batata, destacando o ácido clorogênico, e a propriedade antioxidante do seu extrato

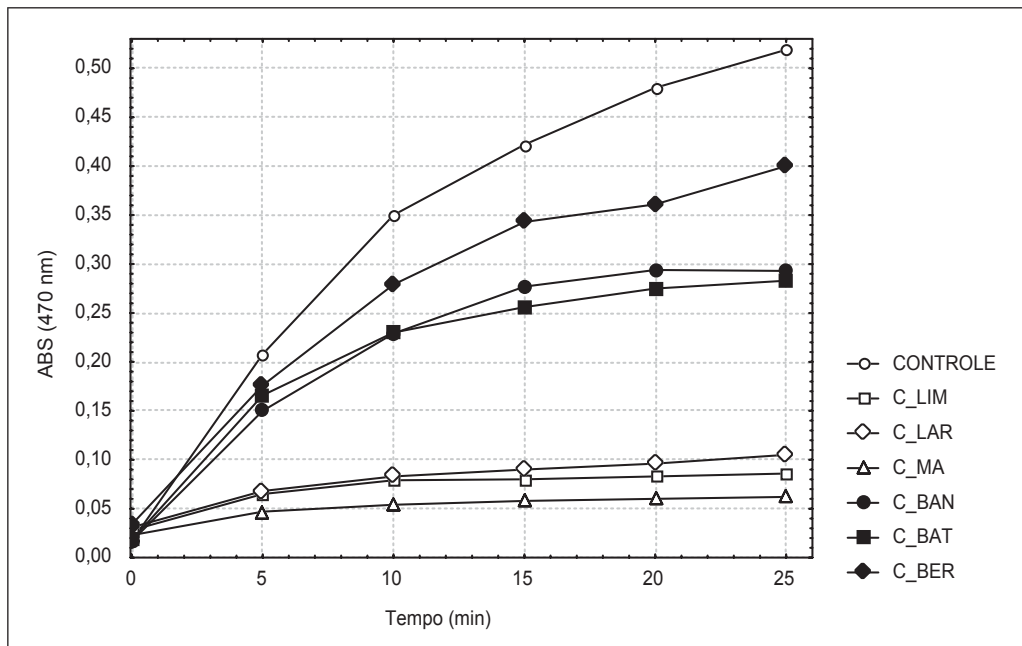


FIGURA 1 – Inibição da reação de escurecimento enzimático pelos extratos das cascas vegetais. *CONTROLE* = reação sem adição de extrato vegetal; *C\_LIM* = cascas de limão; *C\_LAR* = cascas de laranja; *C\_MA* = cascas de maçã; *C\_BAN* = cascas de banana; *C\_BAT* = cascas de batata; *C\_BER* = cascas de berinjela.

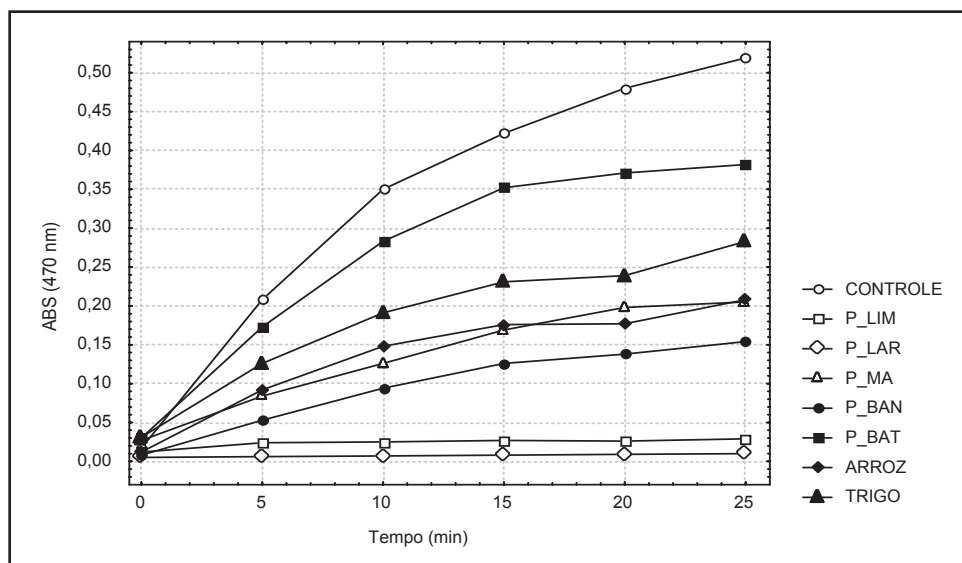


FIGURA 2 – Inibição da reação de escurecimento enzimático pelos extratos das porções comestíveis vegetais. *CONTROLE* = reação sem adição de extrato vegetal; *P\_LIM* = polpas de limão; *P\_LAR* = polpas de laranja; *P\_MA* = polpas de maçã; *P\_BAN* = polpas de banana; *P\_BAT* = polpas de batata; *ARROZ* = extrato de arroz; *TRIGO* = extrato de trigo.



com diferentes solventes, inclusive a água. Estes extratos da casca da batata foram aplicados na conservação de óleo de soja e carne de porco irradiada.<sup>13, 36, 25</sup>

No caso deste trabalho o extrato fenólico de polpas de batata (Figura 2) foi o que afetou menos a reação de escurecimento, pois este tecido foi a fonte enzimática e conseqüentemente apresentou maior afinidade do extrato vegetal pelo sistema de seu próprio substrato.

Entre os cereais, os extratos de grão de trigo apresentaram menor atividade antioxidante e os efeitos dos extratos de arroz se assemelharam aos extratos de polpas de maçã (62%).

Os extratos vegetais das polpas de laranja e de limão continuaram apresentando os maiores potenciais de inibição do processo oxidativo, seguidos pelos extratos da polpa de banana que não é o mais rico na concentração de compostos fenólicos. Gardner et al.<sup>7</sup> atribuíram a atividade antioxidante das polpas de limão e de laranja ao seu conteúdo de ácido ascórbico, mas neste caso considerando o tipo de extração realizada para obtenção de fenóis dificilmente proporcionaria o efeito do ácido ascórbico no resultado observado. Corroboram com esta observação os resultados de Lu & Foo<sup>17</sup> que demonstraram que os polifenóis como a epicatequina, o ácido clorogênico e a quercetina-3-glicosídeo extraídos de maçã apresentaram forte atividade antioxidante de 2 a 3 vezes superior as das vitaminas C e E.

Embora estejam disponíveis diferentes estudos que demonstram a atividade antioxidante de compostos fenólicos de diversas fontes nem sempre os mecanismos para esta atividade são esclarecidos.<sup>18, 34</sup>

Neste trabalho foi empregada a relação de Michaelis-Menten na sua forma linearizada de Lineweaver-Burke para se avaliar o mecanismo de inibição da oxidação do guaiacol pela peroxidase.

As Figuras 3 e 4 demonstram as velocidades das reações de escurecimento enzimático com diferentes concentrações de substrato na ausência e presença dos extratos vegetais. Os gráficos das figuras sugerem que a inibição da peroxidase da batata pelos extratos estudados é do tipo não competitiva, pois a inclinação das diferentes curvas permanece constante, exceto nos casos dos extratos das cascas da banana e da berinjela e da polpas de maçã. Na inibição não competitiva, o inibidor não se combina com a enzima livre, nem afeta sua reação normal com o substrato, mas sim com o complexo Enzima-Substrato formando Enzima-Substrato-Inibidor que não sofre a etapa seguinte da reação para obter o produto.<sup>15</sup> Neste caso, indicando que os compostos responsáveis pela inibição do escurecimento são fenóis de estrutura distinta do guaiacol, possivelmente com maior grau de polimerização, pois não se ligam ao centro ativo diretamente.

Na Tabela 3 estão apresentados os valores de Km e velocidades máximas estimadas a partir das equações das retas dos gráficos de Lineweaver-Burke das Figuras 3 e 4. As velocidades máximas da reação de escurecimento enzimático diminuíram em presença dos extratos vegetais, o que caracteriza o efeito de inibição da oxidação do guaiacol catalisado pela peroxidase. Os valores de Km das reações em presença dos extratos fenólicos também diminuíram em relação à reação controle. Isto não ocorreu nas reações

que continham os extratos das cascas de banana e berinjela e polpa da maçã, o que pode confirmar que estes extratos apresentam um tipo de inibição diferente dos demais, sendo possivelmente decorrente de estruturas fenólicas diferentes dos outros.

Tabela 3 – Valores de Km e velocidades máximas das reações de escurecimento enzimático em presença de extratos vegetais.

Tipo de Extrato	Km controle	Km extrato	V <sub>máx.</sub> controle	V <sub>máx.</sub> extrato
c. limão	0,60	0,20	0,06	0,011
p. limão	0,90	0,40	0,14	0,004
c. laranja	0,60	0,25	0,06	0,006
p. laranja	0,90	0,002	0,14	0,0005
c. maçã	0,60	0,065	0,06	0,004
p. maçã	1,20	1,30	0,073	0,036
c. banana	0,60	1,00	0,06	0,01
p. banana	0,90	0,80	0,14	0,06
c. berin.	1,00	1,10	0,044	0,018
p. berin.	1,20	0,60	0,073	0,057
c. batata	0,60	0,40	0,06	0,023
p. batata	0,90	0,53	0,14	0,075
arroz	0,90	0,70	0,14	0,03
trigo	0,90	0,25	0,14	0,015

p = polpas; c = cascas.

A literatura mostra que as atividades antioxidante e antifúngica podem estar relacionadas ao tipo de compostos fenólicos presentes em uma ampla variedade de vegetais<sup>6,30,31</sup> fato que motivou a possibilidade de se associar a atividade antifúngica e antimicotoxigênica com a atividade antioxidante.

Os compostos fenólicos possuem comprovada ação antifúngica e esta pode ocorrer, entre outros mecanismos, pela inativação de sistemas enzimáticos do microrganismo envolvidos na produção de energia e na síntese de componentes estruturais.<sup>22</sup> A atividade antioxidante dos extratos vegetais sobre a atividade da peroxidase pode indicar seu potencial de inibição do desenvolvimento fúngico e produção de micotoxinas.

Na Figura 5 estão apresentadas as porcentagens de inibição provocadas pelas presenças dos extratos fenólicos vegetais nas reações de escurecimento enzimático e no crescimento do *Aspergillus flavus* em 7 dias de incubação. Estas foram denominadas atividade antioxidante e atividade antifúngica, respectivamente.

Embora sejam propriedades diferentes, permitem a visualização da intensidade dos dois efeitos. Em geral sempre superior a 50% de inibição de oxidação e desenvolvimento fúngico. Segundo este sistema de comparação, as cascas apresentaram atividade antifúngica mais acentuada que a antioxidante, visto que se trata de tecido de proteção.

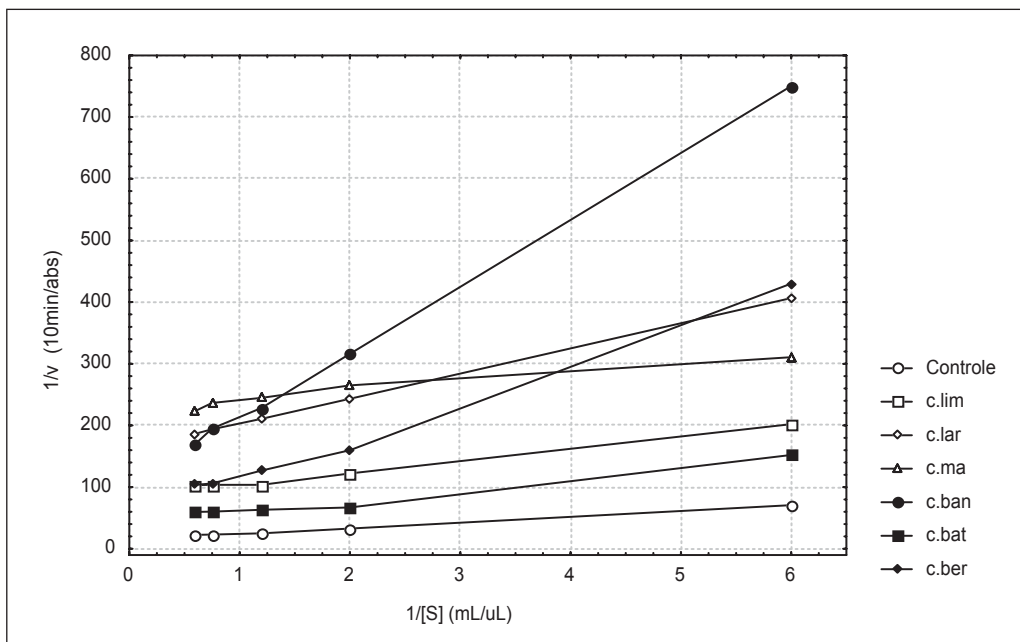


FIGURA 3 – Demonstração da velocidade de reação de escurecimento enzimático em diferentes concentrações de substrato na ausência e presença de extratos das cascas vegetais. *Controle: reação de escurecimento sem adição de extratos vegetais; c.lim = extrato vegetal das cascas de limão; c.lar = cascas de laranja; c.ma = cascas de maçã; c.ban = cascas de banana; c.bat = cascas de batata; c.ber = cascas de berinjela.*

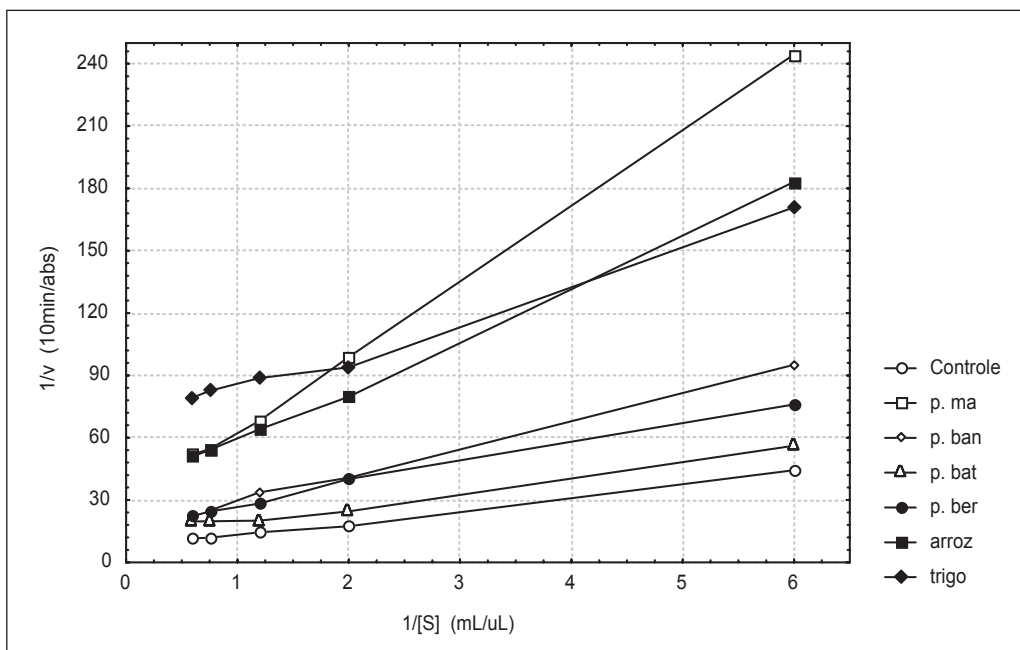


FIGURA 4 – Demonstração da velocidade de reação de escurecimento enzimático em diferentes concentrações de substrato na ausência e presença de extratos das porções comestíveis vegetais. *Controle: reação de escurecimento sem adição de extratos vegetais; p.ma = extrato vegetais das polpas de maçã; p.ban = polpas de banana; p.bat = polpas de batata; p.ber = polpas de berinjela; arroz = extrato de arroz; trigo = extrato de trigo.*

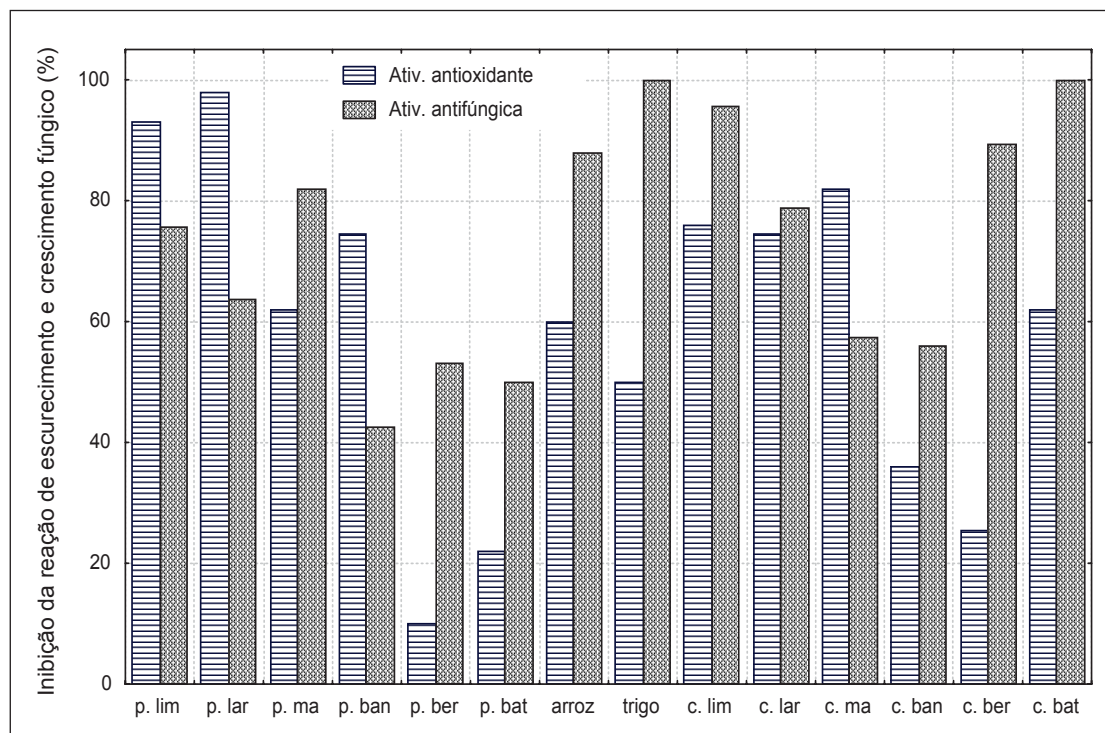


FIGURA 5 – Atividade antioxidante e atividade antifúngica de extratos vegetais contendo compostos fenólicos. *lim* = limão; *lar* = laranja; *ma* = maçã; *ban* = banana; *ber* = berinjela; *bat* = batata; *p.* = polpa; *c.* = casca.

Apenas os extratos das polpas de limão, laranja, banana e de cascas de maçã apresentaram atividades antioxidantes maiores que a atividade antifúngica, sugerindo que a inibição do desenvolvimento fúngico foi ocasionada por outro mecanismo ou que esta relação não foi linear.

A determinação de aflatoxinas no meio onde foi inoculado o fungo *Aspergillus flavus* revelou que as mesmas concentrações de extratos fenólicos adicionados ao meio de crescimento que proporcionaram as atividades fúngicas apresentadas na Figura 5, provocaram a inibição total da produção de aflatoxina. A produção de aflatoxina B<sub>1</sub> ocorreu apenas quando foi empregado extrato de polpa de batata que inibiu em 57% a produção da micotoxina em relação ao controle. Jayashree & Subramanyam<sup>10,11</sup> constataram que o estresse oxidativo foi um pré-requisito para a produção da aflatoxina por *A. parasiticus* conduzindo ao aumento da peroxidação lipídica e a geração de radicais livres. Os mesmos autores observaram<sup>10</sup> que um antioxidante fenólico como o eugenol inibe a produção de aflatoxina pela inibição da peroxidação lipídica e passos da biossíntese das aflatoxinas sem alterar muito o crescimento do *A. parasiticus*. Os resultados deste trabalho sugerem que a propriedade antioxidante pode ser responsável pela atividade antimicotoxigênica demonstrada pelos extratos fenólicos estudados. Esta ação inibitória sobre a atividade da peroxidase demonstrada pelos extratos fenólicos pode ocorrer, também, sobre outros sistemas enzimáticos de oxido-redução que estejam envolvidos nas etapas de síntese das micotoxinas por fungos micotoxigênicos. No caso deste trabalho o extrato de batata com menor potencial antioxidante foi o que não impediu a produção de aflatoxina

B<sub>1</sub> como os demais extratos, fato que é consistente com o mecanismo sugerido.

## CONCLUSÕES

Os extratos das cascas de limão, laranja e maçã apresentaram as maiores inibições sobre a atividade da peroxidase de batata na reação de escurecimento tendo o guaiacol como substrato. Assim como os extratos das polpas de limão, laranja e banana.

A avaliação do tipo de inibição enzimática realizada pelos extratos fenólicos indica que se trata de inibição enzimática do tipo não competitiva, com exceção dos extratos de casca de banana e berinjela e polpa de maçã.

Os extratos fenólicos estudados apresentaram inibição sobre o crescimento fúngico e a produção de aflatoxina B<sub>1</sub> pelo fungo *A. flavus*, exceto na presença do extrato da polpa da batata.

OLIVEIRA, M.S.; DORS, G. C.; SOUZA-SOARES, L. A.; BADIALE-FURLONG, E. Antioxidant activity of phenolic compounds from plant extracts. *Alim. Nutr.*, Araraquara, v.18, n. 2, p. 267-275, 2007.

■ **ABSTRACT:** The purpose of this investigation was to assess the antioxidant activity and measure the phenolic content and antifungal activity of orange, lemon, apple, banana, potato, eggplant, rice and wheat extracts. The extracts were tested for antioxidant activity in an enzymatic

system, by assaying the reduction of peroxidase activity. The total phenols were estimated spectrophotometrically, with Folin-Ciocalteu reagent. Antifungal activity against both the growth of toxigenic fungus *Aspergillus flavus* and its production of aflatoxin B<sub>1</sub> were examined on potato dextrose agar plates. The maximum reaction rates indicated that the plant extracts under study promoted inhibition from 22% to 98% of the enzymatic browning reaction in 10 minutes. The velocity profiles of browning reactions at various substrate concentrations suggest that the inhibition of the reactions is of the uncompetitive type, except for the banana peel, eggplant and apple pulp extracts. Only the lemon, orange and banana pulp and apple peel showed stronger antioxidant than antifungal activity against *Aspergillus flavus*. However, all the phenolic extracts, with the exception of potato pulp, totally inhibited aflatoxin production by this fungus.

■KEYWORDS: Antioxidant activity; phenolic compounds; antifungal activity; mycotoxins; peroxidase.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABDILLE, M. H. et al. Antioxidant activity of the extracts from *Dillenia indica* fruits. **Food Chem.**, v. 90, p. 891-896, 2005.
2. ALMEIDA-DORIA, R. F.; REGITANO-D'ARCE, A. B. Antioxidant activity of Rosemary and oregano ethanol extracts in soybean oil under thermal oxidation. **Ciênc. Tecnol. Alim.**, v. 20, n. 2, p. 197-203, 2000.
3. ATOUI, A. K. et al. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chem.**, v. 89, p. 27-36, 2005.
4. BADIALE-FURLONG, E. et al. Avaliação do potencial de compostos fenólicos em tecidos vegetais. **Vetor**, v. 13, p. 105-114, 2003.
5. COLLA, L. M.; BADIALE-FURLONG, E.; COSTA, J. A. V. Antioxidant properties of *Spirulina platensis* cultivated under different temperature and nitrogen regimes. **Arq. Biol. Tecnol.**, v. 50, n.1, p.161-167, 2007
6. EJECHI, B. O.; NWAFOR, O. E.; OKOKO, F. J. Growth inhibition of tomato-rot fungi by phenolic acids and essential oil extracts of pepperfruit (*Denmetia tripetala*). **Food Res. Intern.**, v. 32, n.6, p. 395-399, 1999.
7. GARDNER, P. T. et al. The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. **Food Chem.**, v. 68, p. 471-474, 2000.
8. HALLIWELL, B. et al. The characterization of antioxidants. **Food Chem. Toxicol.**, v. 33, n. 7, p. 601-617, 1995.
9. HEMEDA, H. M.; KLEIN, B. P. Effects of naturally occurring antioxidants on peroxidase activity of vegetable extracts. **J. Food Sci.**, v. 55, n. 1, p.184-185, 1990.
10. JAYASHREE, T.; SUBRAMANYAM, C. Antiaflatoxic activity of eugenol is due to inhibition of lipid peroxidation. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 28, p. 179-183, 1999.
11. JAYASHREE, T.; SUBRAMANYAM, C. Oxidative stress as a prerequisite for aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 29, p. 981-985, 2000.
12. KAHKONEN, M. P. et al. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **J. Agric. Food Chem.**, v. 37, n.10, p. 3954-3962, 1999.
13. KANATT, S. R. et al. Potato peel extract – a natural antioxidant for retarding lipid peroxidation in radiation processed lamb meat. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, p. 1499-1504, 2005.
14. KAUR, C.; KAPOOR, H. C. Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. **Intern. J. Food Sci. Technol.**, v. 37, p. 153-161, 2002.
15. LEHNINGER, A. L. **Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blucher, 1976. v. 1.
16. LIMA, V. L. A. G.; MÉLO, E. A.; LIMA, D. E. S. Teor de compostos fenólicos totais em chás brasileiros. **Braz. J. Food Technol.**, v. 7, n. 2, p. 187-190, jul./dez., 2004.
17. LU, Y.; FOO, L. Y. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. **Food Chem.**, v. 68, p. 81-85, 2000.
18. MARINOVA, E. M.; YANISHLIEVA, N. V. Antioxidant activity and mechanism of action of some phenolic acids at ambient and high temperatures. **Food Chem.**, v. 81, p. 189-197, 2003.
19. MELO, E. A.; GUERRA, N. B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Bol. SBCTA**, v. 36, n.1, p. 1-11, jan./jun. 2002.
20. MELO, E. A. et al. Atividade antioxidante de extratos de coentro (*Coriandrum sativum* L.). **Ciênc. Tecnol. Alim.**, v. 23, p. 195-199, dez. 2003.
21. NGUEFACK, J. et al. Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi. **Intern. J. Food Microb.**, v. 94, n.3, p. 329-334, 2004.
22. PORTE, A.; GODOY, R. L. O. Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): Propriedades antimicrobiana e química do óleo essencial. **B. CEPPA**, Curitiba, v. 19, n. 2, p.193-210, 2001.
23. RASOOLI, I.; ABYANEH, M. R. Inhibitory effects of Thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. **Food Control**, v.15, n.6, p. 479-483, 2004.
24. SAURA-CALIXTO, F.; GOÑI, I. Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet. **Food Chem.**, v. 94, n. 3, 442-447, 2006.
25. SINGH, N.; RAJINI P. S. Free radical scavenging activity of an aqueous extract of potato peel. **Food Chem.**, v. 85, p. 611-616, 2004.



26. SOARES, L. M. V.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Survey of Aflatoxins, Ochratoxin A, Zearalenone, and Sterigmatocystin in some brazilian foods by using multi-toxin-layer chromatographic method. **J. Ass. Off. Anal. Chem.**, v. 72, n. 1, p. 22-26, 1989.
27. TANAKA, T. Simultaneous determination of trichothecene mycotoxins and zearalenone in cereals by gas chromatography-mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, v.882, n.1-2, p. 23-28, 2000.
28. VARGAS, I. Antimicrobial and antioxidant compounds in the nonvolatile fraction of expressed orange essential oil. **J. Food Prot.**, v. 62, n. 8, p. 929-932, 1999.
29. VÁZQUEZ, B. I. Inhibitory effects of eugenol and thymol on *Penicillium citrinum* strains in culture media and cheese. **Int. J. food Microb.**, v. 67, p. 157-163, 2001.
30. VELIOGLU, Y. S. Antioxidant activity and total phenolic in selected fruits, vegetables, and grain products. **J. Agric. Food Chem.**, v. 46, p. 4113-4117, 1998.
31. VINSON, J. A. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: vegetables. **J. Agric. Food Chem.**, v. 46, p. 3630-3634, 1998.
32. WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R. L. Total antioxidant capacity of fruits. **J. Agric. Food Chem.**, v. 44, p. 701-705, 1996.
33. WOLFE, K. Antioxidant activity of apple peels. **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, p. 609-614, 2003.
34. YANISHLIEVA, N. V. Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. **Food Chem.**, v. 64, p. 59-66, 1999.
35. ZHANG, D.; HAMAUZU, Y. Phenolic, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant activity of broccoli and their changes during conventional and microwave cooking. **Food Chem.**, v. 88, p. 503-509, 2004.
36. ZIA-UR-REHMAN; HABIB, F.; SHAH, W.H. Utilization of potato peels extract as a natural antioxidant in soy bean oil. **Food Chem.**, v. 85, p. 215-220, 2004.