

Foto: Maria do Socorro M. Rufino



Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP)

Maria do Socorro Moura Rufino¹
Ricardo Elesbão Alves²
Edy Sousa de Brito³
Selene Maia de Morais⁴
Caroline de Goes Sampaio⁵
Jara Pérez-Jiménez⁶
Fulgencio Diego Saura-Calixto⁷

Introdução

Antioxidantes podem ser definidos como qualquer substância que, presente em baixas concentrações, quando comparada a um substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação desse substrato de maneira eficaz. O sistema de defesa antioxidante é formado por compostos enzimáticos e não-enzimáticos, presentes tanto no organismo (localizados dentro das células ou na circulação sanguínea) como nos alimentos ingeridos (Moreira & Shami, 2004).

O consumo de substâncias antioxidantes na dieta diária pode produzir uma ação protetora efetiva contra esses processos oxidativos que ocorrem no organismo. Foi descoberto que várias doenças, entre as quais câncer, aterosclerose, diabetes, artrite, malária, AIDS e doenças do coração, podem estar ligadas aos danos causados por formas de oxigênio extremamente

reativas. Essas substâncias, também, estão ligadas a processos responsáveis pelo envelhecimento do corpo (Degaspari & Waszczynskyj, 2004).

Pulido et al. (2000) descrevem o método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) – Poder Antioxidante de Redução do Ferro (Fig. 1) como uma alternativa desenvolvida para determinar a redução do ferro em fluidos biológicos e soluções aquosas de compostos puros. O método pode ser aplicado não somente para estudos da atividade antioxidante em extratos de alimentos e bebidas, mas, também, para o estudo da eficiência antioxidante de substâncias puras, com resultados comparáveis àqueles obtidos com outras metodologias mais complexas.

Thaipong et al. (2006) estimaram a atividade antioxidante total de extratos obtidos de frutos de goiaba, pelos métodos ABTS, DPPH, FRAP e ORAC, e verificaram

¹ Engenheira Agrônoma, M. Sc., Bolsista da CAPES, Doutoranda, UFRSA, BR 110, Km 47, 59625-900, Mossoró, RN, marisrufino@yahoo.com.br

² Engenheiro Agrônomo, D. Sc. em Pós-Colheita, Pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical, R. Dra. Sara Mesquita, 2270, Pici, 60511-110, Fortaleza, CE, elesbao@pesquisador.cnpq.br

³ Químico Industrial, D. Sc. em Tecnologia de Alimentos, Pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical, edy@cnpq.embrapa.br

⁴ Química Industrial, Ph. D., Professora Titular, UECE, Av. Paranjana, 1700, Campus do Itaperi, 60740-000, Fortaleza, CE, selene@uece.br

⁵ Graduanda em Química, Bolsista CNPq, UECE

⁶ Licenciada em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Doutoranda/I3P-CSIC, Departamento de Metabolismo y Nutrición, Instituto del Frío, CSIC, Ciudad Universitaria, José Antonio Novais, 10, 28040, Madri, Espanha

⁷ Licenciado em Ciências Químicas, Professor, Pesquisador, D.Sc., CSIC, fsaura@if.csic.es

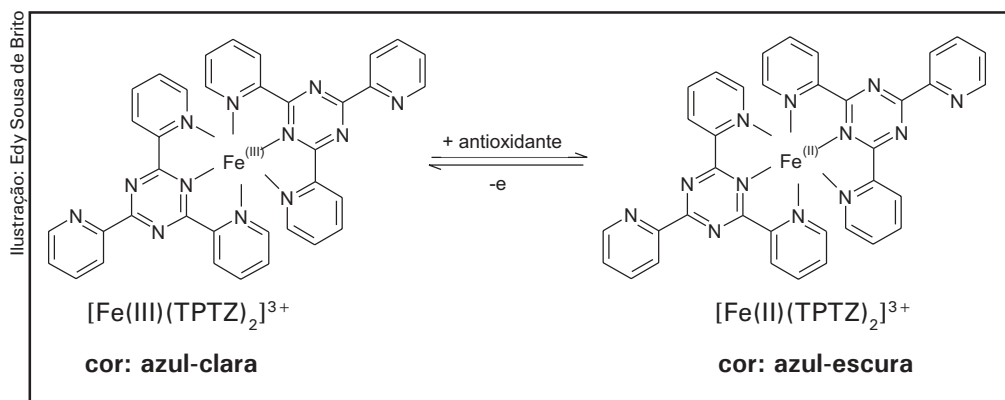


Fig. 1. Redução do complexo TPTZ (2,4,6-tris(2-piridil)-1,3,5-triazina) com Fe³⁺.

que FRAP foi a técnica mais reprodutível e aquela que apresentou uma elevada correlação com os teores de ácido ascórbico e grupos fenólicos.

Neste comunicado são relatadas todas as informações necessárias para a determinação da atividade antioxidante total em frutas, pelo método de redução do ferro (FRAP), baseadas em adaptações/modificações feitas nos laboratórios da Embrapa Agroindústria Tropical.

Materiais Necessários

Reagentes

- Acetato de sódio trihidratado (PM = 136,08)
- Acetona P.A.
- Ácido acético glacial P.A.
- Ácido clorídrico P.A. (PM = 36,5; d = 1,19)
- Água destilada
- Álcool metílico P.A.
- Cloreto férrico hexahidratado (PM = 270,3)
- Sulfato ferroso heptahidratado (PM = 278,02)
- TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina) (PM = 312,34) - *Sigma*, código T1253 ou equivalente.

Equipamentos e Vidrarias

- Agitador de tubos de ensaio
- Balança analítica
- Balão volumétrico de 10 mL, 50 mL e 1.000 mL
- Banho-maria
- Cronômetro digital
- Cubetas de vidro (4 x 1 cm)

- Espectrofotômetro
- Pipeta automática (10 µL – 1.000 µL)
- Proveta de 50 mL
- Tubos de ensaio com tampa rosqueada (8 mL)

Preparo de Soluções

Solução de Metanol a 50%

Em balão volumétrico de 1 L, adicionar 500 mL de álcool metílico; completar o volume para 1.000 mL com água destilada, homogeneizar e transferir para um frasco de vidro devidamente etiquetado. Armazenar em temperatura ambiente por tempo indeterminado.

Solução de Acetona a 70%

Em balão volumétrico de 1 L, adicionar 700 mL de acetona; completar o volume para 1.000 mL com água destilada, homogeneizar e transferir para um frasco de vidro devidamente etiquetado. Armazenar em temperatura ambiente por tempo indeterminado.

Solução de HCl 40 mM

Em balão volumétrico de 1 L, adicionar 3,34 mL de HCl concentrado; completar o volume para 1.000 mL com água destilada, homogeneizar e transferir para um frasco de vidro devidamente etiquetado. Armazenar em temperatura ambiente por tempo indeterminado.

Solução de TPTZ 10 mM

Dissolver 3,12 g de TPTZ em, aproximadamente, 5 mL de HCl 40 mM e completar o volume para 1 L em um balão volumétrico com HCl 40 mM, homogeneizar e transferir para um frasco de vidro âmbar devidamente etiquetado. Armazenar sob refrigeração por até um mês.

Solução de Cloreto Férrico 20 mM

Dissolver 5,4 g de cloreto férrico em água destilada e completar o volume para 1 L em um balão volumétrico com água destilada, homogeneizar e transferir para um frasco de vidro âmbar devidamente etiquetado. Armazenar sob refrigeração por até um mês.

Tampão Acetato 0,3 M, pH 3,6

Dissolver 3,1g de acetato de sódio em 16 mL de ácido acético glacial e completar o volume para 1 L em um balão volumétrico com água destilada, homogeneizar e transferir para um frasco de vidro âmbar devidamente etiquetado. Armazenar em temperatura ambiente por tempo indeterminado.

Solução do Reagente FRAP

O reagente FRAP é obtido a partir da combinação de 25 mL de tampão acetato 0,3 M, 2,5 mL de uma solução de TPTZ 10 mM e 2,5 mL de uma solução aquosa de cloreto férrico 20 mM, devendo ser usado imediatamente após sua preparação.

Solução Padrão de Sulfato Ferroso 2 mM

Dissolver 27,8 mg de sulfato ferroso em água destilada e completar o volume para 50 mL em um balão volumétrico com água destilada, homogeneizar e transferir para um frasco de vidro âmbar devidamente etiquetado. Preparar e usar apenas no dia da análise.

Curva-Padrão do Sulfato Ferroso

Preparo das soluções

A partir da solução padrão de sulfato ferroso (2.000 μM), preparar em balões volumétricos de 10 mL, soluções variando a concentração de 500 μM a 1500 μM , conforme a Tabela 1.

Tabela 1. Preparo das soluções para curva-padrão.

Solução padrão de sulfato ferroso (mL)	Água destilada (mL)	Concentração final (μM)
2,5	7,5	500
5,0	5,0	1.000
7,5	2,5	1.500
10	0	2.000

Determinação da Curva-Padrão

Em ambiente escuro, transferir uma alíquota de 90 μL de cada solução de sulfato ferroso (500 μM , 1.000 μM ,

1.500 μM e 2.000 μM) para tubos de ensaio, acrescentar 270 μL de água destilada e misturar com 2,7 mL do reagente FRAP, homogeneizar em agitador de tubos e manter em banho-maria a 37 °C. Realizar a leitura (595 nm) após 30 minutos da mistura e utilizar o reagente FRAP como branco para calibrar o espectrofotômetro.

Plotar em planilha as concentrações de sulfato ferroso (mM) no eixo X e as respectivas absorbâncias no eixo Y (Fig. 2) e calcular a equação da reta.

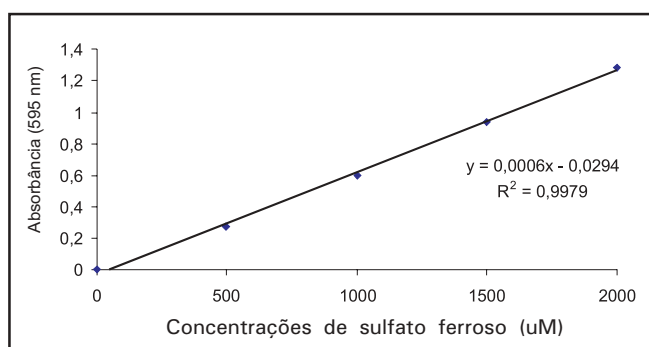


Fig. 2. Exemplo de curva-padrão de sulfato ferroso.

A partir da equação da reta (Fig. 2), calcular a absorbância referente a 1000 mM de sulfato ferroso (Pulido et al., 2000), de acordo com a Equação 1.

$$y = ax + b$$

(Eq. 1)

Onde,

x = 1.000 μM de sulfato ferroso

y = Absorbância correspondente a 1.000 μM de sulfato ferroso

Protocolo do Método FRAP

Obtenção dos Extratos da Fruta

Este procedimento foi adaptado de Larrauri et al. (1997). Como a concentração de compostos antioxidantes varia de fruta para fruta, fazem-se necessários testes prévios. Em análises realizadas no Laboratório de Fisiologia e Tecnologia Pós-Colheita, da Embrapa Agroindústria Tropical, com diferentes frutas, têm-se utilizado de 1 g a 25 g de amostra, de acordo com a fruta. Pesar a amostra em um béquer de 100 mL, adicionar 40 mL de metanol 50%, homogeneizar e deixar em repouso por 60 minutos à temperatura ambiente. Centrifugar a 25.406,55 g (15.000 rpm), durante 15 minutos, transferir o

sobrenadante para um balão volumétrico de 100 mL. A partir do resíduo da primeira extração, adicionar 40 mL de acetona 70%, homogeneizar e deixar em repouso por 60 minutos, à temperatura ambiente. Centrifugar novamente a 25.406,55 g (15.000 rpm) durante 15 minutos, transferir o sobrenadante para o balão volumétrico contendo o primeiro sobrenadante e completar o volume para 100 mL com água destilada.

Determinação da Atividade Antioxidante Total (AAT)

A partir do extrato obtido no item anterior, preparar em tubos de ensaio, no mínimo três diluições diferentes, em triplicata. Em ambiente escuro, transferir uma alíquota de 90 μ L de cada diluição do extrato para tubos de ensaio, acrescentar 270 μ L de água destilada, misturar com 2,7 mL do reagente FRAP, homogeneizar em agitador de tubos e manter em banho-maria a 37 °C. Realizar a leitura (595 nm) após 30 minutos da mistura preparada e utilizar o reagente FRAP como branco para calibrar o espectrofotômetro.

A partir das absorbâncias obtidas das diferentes diluições dos extratos, plotar a absorbância no eixo Y e a diluição (mg/L) no eixo X. Em seguida, determinar a equação da reta. Para calcular a AAT, deve-se substituir na equação da reta a absorbância equivalente a 1.000 μ M do padrão sulfato ferroso. O valor obtido para o termo x (Eq. 2) corresponde à diluição da amostra (mg/L) equivalente a 1.000 μ M de sulfato ferroso.

$$y = ax + b \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde,

y = Absorbância correspondente a 1.000 μ M de sulfato ferroso

x = Diluição da amostra (mg/L) equivalente a 1.000 μ M de sulfato ferroso

A partir do resultado encontrado (x) na equação 2, dividir por 1.000 para ter o valor em g. O resultado final (Eq. 3) é calculado pela divisão de 1.000 (μ M)

pelo valor de X(g) e multiplicado por 1(g) para encontrar o valor final (Z) que é expresso em μ M sulfato ferroso/g de fruta (porção comestível).

$$X(g) = x / 1.000$$

$$Z = 1.000 / X(g).1 \quad (\text{Eq. 3})$$

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à União Européia, pelo apoio financeiro - Projetos "Atividade antioxidante de frutas do Nordeste brasileiro como fator de Proteção da Saúde" - CNPq Edital CT-Saúde/MCT/MS 030/2004 - Processo 506.633/2004-7 e "Producing added value from under-utilised tropical fruit crops with high commercial potential" - Sixth Framework Programme - Contrato 0015279, respectivamente.

Referências

- DEGASPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades Antioxidantes de compostos fenólicos. *Visão Acadêmica*, Curitiba, v. 5, n. 1, p.33-40, 2004.
- LARRAURI, J.A.; RUPÉREZ, P.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 45, p. 1390-1393, 1997.
- MOREIRA, E. A. M.; SHAMI, N. J. I. E. Licopeno como agente antioxidante. *Revista de Nutrição*, Campinas, v. 17, n. 2, p.227-236, 2004.
- PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal Agriculture and Food Chemistry*, v. 48, p. 3396-3402, 2000.
- THAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U.; CROSBY, K; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; BYRNE, D.H. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, v.19, p.669-675, 2006.

Comunicado Técnico, 125

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Agroindústria Tropical
 Endereço: Rua Dra. Sara Mesquita 2270, Pici,
 CEP 60511-110 Fortaleza, CE
 Fone: (0xx85) 3299-1800
 Fax: (0xx85) 3299-1803 / 3299-1833
 E-mail: negocios@cpnat.embrapa.br

1ª edição *on line*: dezembro de 2006

Comitê de Publicações

Presidente: Francisco Marto Pinto Viana
Secretário-Executivo: Marco Aurélio da Rocha Melo
Membros: Janice Ribeiro Lima, Andréa Hansen Oster, Antonio Teixeira Cavalcanti Júnior, José Jaime Vasconcelos Cavalcanti, Afrânio Arley Teles Montenegro, Ebenézer de Oliveira Silva.

Expediente

Supervisor editorial: Marco Aurélio da Rocha Melo
Revisão de texto: José Ubiraci Alves
Editoração eletrônica: Arilo Nobre de Oliveira
Normalização bibliográfica: Ana Fátima Costa Pinto.