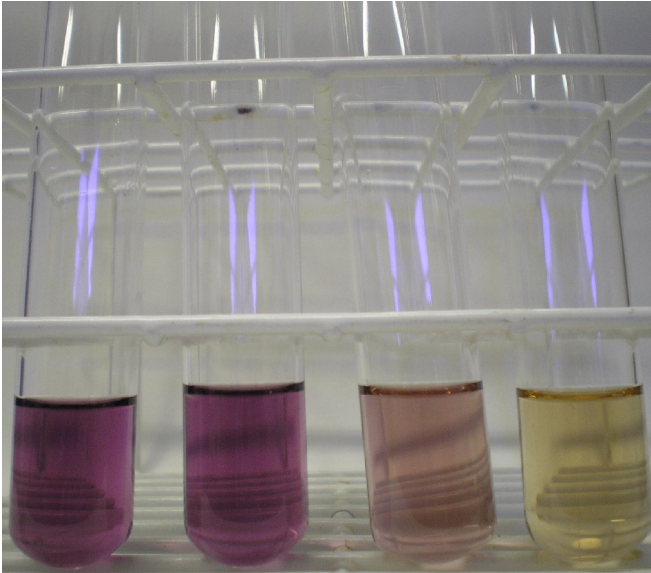


Foto: Maria do Socorro M. Rufino



Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH

Maria do Socorro Moura Rufino¹
Ricardo Elesbão Alves²
Edy Sousa de Brito³
Selene Maia de Moraes⁴
Caroline de Goes Sampaio⁵
Jara Pérez-Jiménez⁶
Fulgencio Diego Saura-Calixto⁷

Introdução

Antioxidante é um composto que protege o sistema biológico contra o efeito nocivo de processos ou reações que podem causar oxidação excessiva (KRINSKY, 1994). Evidências epidemiológicas crescentes do papel de alimentos antioxidantes na prevenção de certas doenças têm conduzido ao desenvolvimento de grande número de métodos para determinar a capacidade antioxidante (PÉREZ-JIMÉNEZ e SAURA-CALIXTO, 2006). Estes métodos podem ser baseados na captura do radical peroxila (ORAC, TRAP), poder de redução do metal (FRAP; CUPRAC), captura do radical hidroxila (método de desoxirribose), captura do radical orgânico (ABTS, DPPH), quantificação de produtos formados durante a peroxidação de lipídios (TBARS, oxidação do LDL, co-oxidação do β -caroteno) (FRANKEL e MEYER, 2000; SÁNCHEZ-MORENO, 2002; ARUOMA, 2003), etc. Dentre estes métodos,

ABTS, FRAP, DPPH e ORAC são alguns dos mais usados atualmente (PÉREZ-JIMÉNEZ e SAURA-CALIXTO, 2006).

O método DPPH (BRAND-WILLIAMS et al., 1995) é baseado na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) por antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorvância a 515 nm. Esse método foi modificado por SÁNCHEZ-MORENO et al. (1998) para medir os parâmetros cinéticos.

O DPPH é um radical livre que pode ser obtido diretamente por dissolução do reagente em meio orgânico (Fig. 1).

Neste comunicado são relatadas todas as informações necessárias para a determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical DPPH, baseadas em adaptações / modificações feitas nos laboratórios da Embrapa Agroindústria Tropical.

¹ Engenheira Agrônoma, M. Sc., Bolsista da CAPES, Doutoranda, UFRS, 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@cnpat.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, Madrid, Espanha

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

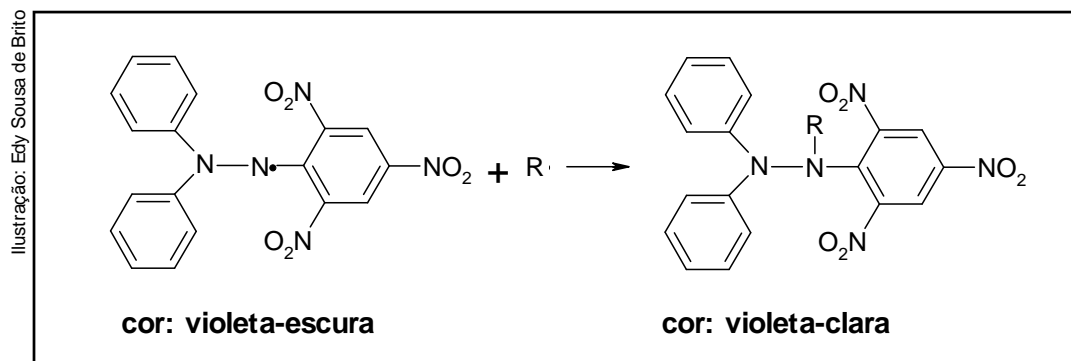


Fig. 1. Estabilização do radical livre DPPH.

Materiais Necessários

Reagentes

- Acetona P.A.
- Álcool metílico P.A.
- Água destilada
- DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl-hidrazil) (PM = 394,3) - *Sigma*, código 095K1452, ou equivalente

Equipamentos e vidrarias

- Agitador de tubos de ensaio
- Balança analítica
- Balão volumétrico 100 mL e 1.000 mL
- Cronômetro digital
- Cubetas de vidro (4 x 1 cm)
- Espectrofotômetro
- Pipeta automática (10 – 1000 µL)
- Proveta de 50 mL
- Tubos de ensaio com tampa rosqueada (8 mL)

Preparo de Soluções

Solução de álcool metílico 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 controle de álcool metílico, acetona e água

Em balão volumétrico de 100 mL, adicionar 40 mL da solução de álcool metílico 50% (item "solução de álcool metílico a 50%") e 40 mL da solução de acetona 70% (item anterior). Completar o volume para 100 mL com água destilada, homogeneizar e transferir para um frasco de vidro, devidamente etiquetado. Armazenar em temperatura ambiente por tempo indeterminado.

Solução de DPPH 0,06 mM

Dissolver 2,4 mg de DPPH em álcool metílico e completar o volume para 100 mL em um balão volumétrico com álcool metílico, homogeneizar e transferir para um frasco de vidro âmbar, devidamente etiquetado. Preparar e usar apenas no dia da análise.

Curva do DPPH

Preparo das soluções

A partir da solução inicial de DPPH (60 µM), preparar em balões volumétricos de 10 mL, soluções variando a concentração de 10 µM a 50 µM conforme a Tabela 1.

Tabela 1. Preparo das soluções para curva do DPPH.

Solução de DPPH (mL)	Álcool metílico (mL)	Concentração final de DPPH (µM)
0	10	0
1,7	8,3	10
3,3	6,7	20
5,0	5,0	30
6,7	3,3	40
8,3	1,7	50
10	0	60

Determinação da curva do DPPH

Em ambiente escuro, transferir uma alíquota de, aproximadamente, 4 mL de cada solução de DPPH (10 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 40 μ M, 50 μ M e 60 μ M) para cubetas de vidro e realizar a leitura em espectrofotômetro a 515 nm. Utilizar álcool metílico, como branco, para calibrar o espectrofotômetro.

Plotar as concentrações de DPPH (μ M) no eixo X e as respectivas absorbâncias no eixo Y (Fig. 2) e calcular a equação da reta.

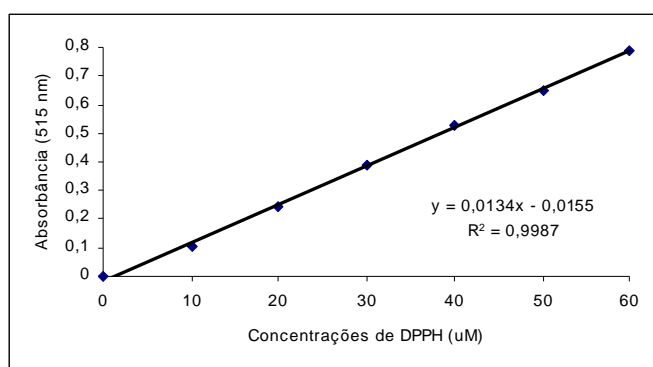


Fig. 2. Exemplo de curva do DPPH x absorbância.

Protocolo do Método DPPH

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. Nas 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 0,1 mL de cada diluição do extrato para tubos de ensaio com 3,9 mL do radical DPPH (item "solução de DPPH 0,06 mM") e homogeneizar em agitador de tubos. Utilizar 0,1 mL da solução controle (item "solução controle de álcool metílico, acetona e água") com 3,9 mL do radical DPPH e homogeneizar. Utilizar álcool metílico, como branco, para calibrar o espectrofotômetro. As leituras (515 nm) devem ser monitoradas a cada minuto, onde é observada a redução da absorbância até sua estabilização. A leitura da absorbância final para o cálculo do EC_{50} só deve ser feita após a estabilização da absorbância (tempo EC_{50}). Para experimentos posteriores, com uma mesma fruta, a leitura pode ser feita apenas no tempo estabelecido anteriormente (tempo EC_{50}), acompanhado, também, da leitura inicial do controle.

Após a leitura, substituir (Eq. 1) o valor correspondente a metade da absorbância inicial do controle pelo y da equação da curva do DPPH (Fig. 2) para encontrar o consumo em μ M DPPH e, em seguida, transformar para g DPPH.

Equivalência de controle e DPPH

$$y = ax - b \quad (\text{Eq. 1})$$

(Equação da curva do DPPH representada na Fig. 2), onde:

y = Absorbância inicial do controle / 2 (item "determinação da atividade antioxidante total")

x = resultado em μ M DPPH

Obs.: converter para g DPPH, através da transformação:

g DPPH = (μ M DPPH / 1.000.000) · 394,3 (peso molecular do DPPH).

A partir das absorbâncias obtidas das diferentes diluições dos extratos, plotar a absorbância no eixo Y e diluição (mg/L) no eixo X e determinar a equação da reta (Eq. 2). Para calcular a AAT deve-se substituir a absorbância equivalente a 50 % da concentração do DPPH (item "determinação da atividade antioxidante total") pelo y (Eq. 2) e encontrar o resultado que corresponde à amostra necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH (EC_{50}).

Cálculo do EC₅₀

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

onde:

y = Absorbância inicial do controle / 2 (item "determinação da atividade antioxidante total")

x = EC₅₀ (mg/L).

A partir do resultado (mg/L) encontrado na equação 2, dividir por 1.000 para ter o valor em g e, em seguida, dividir pelo valor encontrado em g DPPH (Eq. 1) para obter o resultado final (Eq. 3) que é expresso em g fruta (porção comestível) / g DPPH.

EC₅₀ expresso em g fruta / g DPPH

$$\text{g fruta / g DPPH} = (\text{EC}_{50} \text{ (mg/L)} / 1.000 \cdot 1) / \text{g DPPH}$$

(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

- ARUOMA, O.I. Methodological characterizations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. **Mutation Research**, v.9-20, p.523-524, 2003.
- BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v.28, p.25-30. 1995.
- FRANKEL, E.N.; MEYER, A.S. The problem of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.80, p.1925-1941, 2000.
- KRINSKY, N.I. The biological properties of carotenoids. **Pure and Applied Chemistry**, v. 66, p. 1003-1010, 1994.
- 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 Agriculture and Food Chemistry**, v. 45, p. 1390-1393, 1997.
- PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International**, v.39, p.791-800, 2006.
- SÁNCHEZ-MORENO, C. Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science and Technology International**, v.8, p.121-137, 2002.
- SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J.A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.76, p.270-276. 1998.
- YOUNGSON, R. **Como combater os radicais livres: o programa de saúde dos antioxidantes**. Rio de Janeiro: Campus, 1995, 168 p.

Comunicado Técnico, 127

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@cnpat.embrapa.br

1ª edição on line: julho de 2007

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.