

Fotos: Mailson de Matos

COMUNICADO
TÉCNICO

417

Colombo, PR
Setembro, 2018

Embrapa

Metodologia científica: determinação da capacidade antioxidante de lignina pela captura do radical livre DPPH

Washington Luiz Esteves Magalhães
Mailson de Matos
Tainise Vergara Lourençon

Metodologia científica: determinação da capacidade antioxidante de lignina pela captura do radical livre DPPH

Washington Luiz Esteves Magalhães, Engenheiro químico, doutor em Ciências e Engenharia de Materiais, pesquisador da Embrapa Florestas, Colombo, PR; **Mailson de Matos**, Engenheiro químico, doutorando em Engenharia e Ciência dos Materiais na Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR; **Tainise Vergara Lourençon**, Engenheira Industrial Madeireira, doutora em Engenharia Florestal, pesquisadora na Aalto University/Finlândia.

Introdução

Compostos antioxidantes são desejáveis e valiosos aditivos empregados em vários setores como alimentação, medicina, construção e combustíveis, em todas as etapas da produção (processamento, tratamento, embalagem, transporte e armazenamento). Eles servem para reduzir ou prevenir degradação por oxidação dos materiais. A falta de atividade antioxidante pode trazer um dos grandes problemas que é a redução da qualidade e/ou tempo de armazenamento de produtos.

Ultimamente a atenção tem sido voltada ao uso de antioxidantes naturais para substituir aqueles de origem fóssil comumente utilizados (Kirschweg et al., 2017). Seja pela demonstração dos riscos causados por estes antioxidantes (Brocca et al., 2002) ou pela ideia de usar um componente natural, seguro e renovável (Caleja et al., 2017). Neste contexto, a lignina extraída de materiais

lignocelulósicos, a qual possui uma estrutura química complexa contendo anéis aromáticos com grupamentos metoxila e hidroxila, pode ser uma excelente escolha como antioxidante (Figueiredo et al., 2018).

Nesse sentido, inúmeros trabalhos têm utilizado as mais variadas metodologias para avaliar a capacidade antioxidante de substâncias. Estes métodos podem ser baseados: no poder de redução de metais, como ferro (FRAP - Ferric Reducing Antioxidant Power) e cobre (CUPRAC - Cupric Reducing Antioxidant Capacity); na captura de radical peroxila (ORAC - Oxygen Radical Absorbance Capacity; TRAP - Total Radical Trapping Antioxidant Potential), na quantificação de produtos formados durante a peroxidação de lipídios (oxidação do LDL, oxidação do β -caroteno) e na captura de radical orgânico, como ABTS: 2,2'-azino-bis-(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulphonate) e DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, dentre os mais usuais (Kirschweg et al., 2017).

O radical livre DPPH é obtido diretamente por dissolução do reagente em meio orgânico. O método DPPH se baseia na captura do radical DPPH por antioxidantes (Figura 1), levando à redução do composto e consequente diminuição da absorbância (Abs) da solução, no comprimento de onda de 515 nm (Brand-Williams et al., 1995).

A concentração inibitória (IC_{50}) refere-se à mínima concentração necessária de antioxidante para inibir 50% de uma determinada concentração de radical. A concentração de eficiência (EC_{50}) é definida pela quantidade de antioxidante necessária para reduzir 50% da quantidade inicial de radical, obtida a partir da razão entre o valor de IC_{50} e da concentração inicial do radical (Savatović et al., 2012).

Visando metodologias mais claras e capazes de serem reproduzidas, no que diz respeito à determinação da capacidade antioxidante de ligninas, este comunicado descreve as informações necessárias para a determinação da concentração inibitória e concentração de eficiência. Também está relatada a atividade antioxidante dada em percentual

de redução do radical em três diferentes concentrações. As metodologias foram baseadas em adaptações feitas nos laboratórios do núcleo de Produtos Florestais da Embrapa Florestas.

Materiais necessários

Reagentes

- 1,4 – Dioxano 90%.
- Metanol P.A.
- Água destilada.
- DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl-hidrazil) (PM = 394,32).
- Lignina em pó, seca.

Equipamentos e vidrarias

- Agitador de tubos de ensaio.
- Banho de ultrassom.
- Balança analítica.
- Balão volumétrico 5 mL, 10 mL, 100 mL.
- Cubetas de vidro (4 cm x 1 cm) com tampa.
- Espectrofotômetro UV-Vis.
- Pipetas automáticas.
- Tubos de ensaio âmbar com tampa (8 mL).

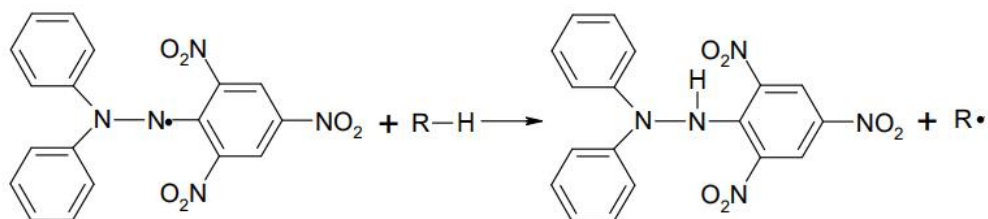


Figura 1. Redução do radical livre DPPH por antioxidante.

Preparo de soluções

Solução dioxano:água (90:10 v/v)

Em balão volumétrico de 100 mL, adicionar 90 mL de dioxano PA e completar o volume para 100 mL com água destilada, homogeneizar e transferir para um frasco de vidro âmbar, devidamente etiquetado. Pode ser armazenado por tempo indeterminado.

Solução de DPPH 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$

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. Essa quantidade serve, em média, para quatro amostras.

Soluções de lignina

Deve-se pesar 2,5 mg da amostra de lignina seca, em triplicata, transferir para

um balão volumétrico de 5 mL e completar o volume do balão com dioxano 90%, de modo que a concentração de lignina seja de 500 mg L^{-1} . As soluções preparadas devem ser submetidas ao banho de ultrassom, por 30 minutos e armazenadas em tubos de ensaio com tampa. A partir da solução de 500 mg L^{-1} , preparar no mínimo mais duas diluições (recomenda-se 250 mg L^{-1} e 100 mg L^{-1}), pois, para a determinação da atividade antioxidante são necessárias no mínimo três concentrações de antioxidante.

Curva de DPPH

A partir da solução de DPPH 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$, preparar em balões volumétricos de 10 mL, soluções de DPPH de 10, 20, 30, 40 a 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Tabela 1).

Para a determinação da curva de calibração do DPPH, em ambiente escuro, transferir uma alíquota de 3,9 mL de cada solução de DPPH para cubetas de vidro, adicionar 0,1 mL de dioxano 90%

Tabela 1. Preparo e concentração final das soluções de DPPH.

Solução DPPH 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (mL)	Metanol (mL)	[DPPH] ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	[DPPH] com 0,1 mL de dioxano 90% ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
0,0	10,0	0	0,0
1,667	8,333	10	9,75
3,333	6,667	20	19,50
5,000	5,000	30	29,25
6,667	3,333	40	39,00
8,333	1,667	50	48,75
10,000	0,0	60	58,50

em cada uma das cubetas, de modo que as concentrações finais de DPPH são as apresentadas na Tabela 1 (essas concentrações devem ser utilizadas para preparar o gráfico para calibração de absorbância versus concentração de DPPH). Realizar a leitura em espectrofotômetro UV-Vis a 515 nm. Para a leitura do ponto zero (solução sem a presença de DPPH) deve ser feita a medida de absorbância da amostra com 3,9 mL de metanol, acrescida de 0,1 mL de dioxano 90%, esta solução também deve ser usada como linha base do espectrofotômetro.

Preparar um gráfico com as concentrações de DPPH ($\mu\text{mol L}^{-1}$) no eixo das ordenadas e as respectivas absorbâncias no eixo das abscissas e calcular a equação da reta (Figura 2). O quadrado do coeficiente de correlação de Pearson (R^2) deve ser o mais próximo possível de 1.

Determinação da atividade antioxidante (AA)

Em ambiente escuro, transferir uma alíquota de 0,1 mL de cada solução de lignina preparada para tubos de ensaio, com tampa e envoltos em papel alumínio. Adicionar 3,9 mL da solução de radical DPPH $60 \mu\text{mol L}^{-1}$, e homogeneizá-la usando agitador de tubos. Neste passo ocorre uma diluição da amostra, em que a concentração final é determinada pela seguinte equação:

$$C_{\text{final}} = \frac{C_{\text{inicial}} \times 0,1}{4} \quad (1)$$

Considerando as concentrações recomendadas neste comunicado, para o preparo das soluções de lignina, as concentrações finais serão: 12,5, 6,25 e $2,5 \text{ mg L}^{-1}$. Preparar também uma solução controle, em triplicata, contendo

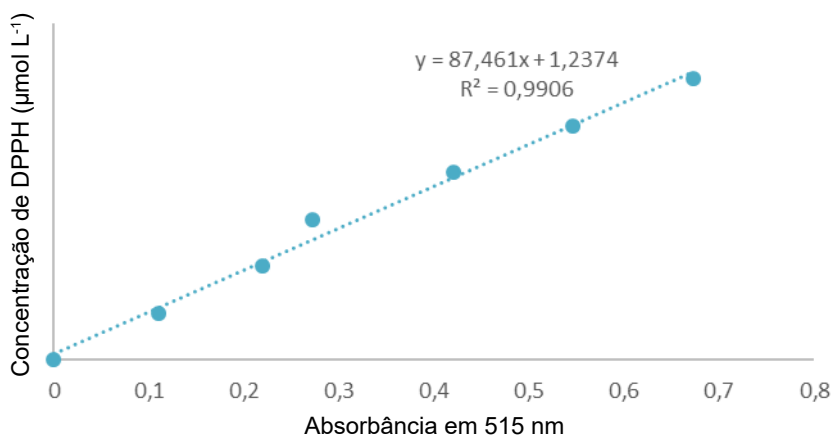


Figura 2. Exemplo de curva de calibração da absorbância versus concentração de DPPH.

0,1 mL de dioxano 90% e 3,9 mL da solução de radical DPPH e homogeneizá-la. Utilizar uma solução contendo 3,9 mL de álcool metílico e 0,1 mL de dioxano 90%, como branco, para servir de linha de base para o espectrofotômetro.

As amostras nas três diferentes concentrações devem ser monitoradas, com leituras em 515 nm, ao longo do tempo: as medidas devem ser realizadas no tempo zero e de 30 em 30 minutos, até ser observada a redução e estabilização da absorbância, que ocorre quando todo o antioxidante é consumido pela reação com o radical. Entre o intervalo de uma leitura para a outra, a amostra deve ser retornada para o tubo de ensaio de origem, possibilitando assim a medida de mais de uma amostra. A absorbância da solução controle deve ser lida nos mesmos tempos que as amostras. As cubetas e tubos de ensaio devem ficar fechados, para evitar a evaporação do solvente, e em ambiente escuro.

A medida da Abs final para o cálculo de IC_{50} só deve ser feita após a estabilização da absorbância (tempo IC_{50}). Para experimentos posteriores, com a mesma amostra, a leitura pode ser feita apenas no tempo estabelecido anteriormente para a estabilização das leituras (tempo IC_{50}).

Porcentagem de redução do radical e percentual de radical remanescente

A quantidade de radical DPPH remanescente na solução é calculada a partir

da razão entre a absorbância da amostra e a média das absorbâncias da solução controle no tempo de IC_{50} (equação 2). Calcular a média das triplicatas.

$$\%DPPH_{\text{remanescente}} = \frac{Abs_{\text{amostra}}}{Abs_{\text{controle}}} \times 100 \quad (2)$$

A porcentagem de redução é obtida pela diferença entre a porcentagem total de radical no início da reação (100%) e o percentual de radical remanescente (equação 3). Calcular a média das triplicatas. Vale salientar que cada concentração utilizada apresentará um valor de percentual de redução diferente, convém expressar qual a concentração de antioxidante utilizada, recomenda-se apresentar o resultado para 500 mg L⁻¹.

$$\%Redução \text{ de DPPH} = 100 - \%DPPH_{\text{remanescente}} \quad (3)$$

Concentração inibitória - IC_{50}

Após o cálculo da porcentagem de radical remanescente, determinar a equação da reta que correlaciona a concentração final de lignina com a porcentagem de DPPH remanescente, colocando os valores de concentração no eixo das abscissas e a porcentagem remanescente no eixo das ordenadas. O quadrado do coeficiente de correlação de Pearson (R^2) deve ser o mais próximo possível de 1, caso contrário verificar os dados obtidos. A partir da equação da reta, calcular qual a concentração de antioxidante necessária para que haja 50% de DPPH remanescente no sistema (IC_{50}) (equação 4), o resultado

é dado em mg L⁻¹. Calcular a média das triplicatas.

$$IC_{50} = \frac{50 - b}{a} \quad (4)$$

Onde:

b = Intercepção do eixo y

a = Inclinação da reta

Concentração eficiente - EC₅₀

O valor de EC₅₀ é obtido a partir da razão entre o valor de IC₅₀ e da concentração inicial do radical. A concentração inicial de DPPH é determinada a partir da média das absorbâncias das amostras controle, no tempo zero, com o uso da equação da reta da curva de calibração de DPPH (equação 5).

$$[DPPH]_{t=0} = (\overline{Abs}_{controle} \times a + b) \times \frac{394,32}{1000} \quad (5)$$

Onde:

b = Intercepção do eixo y

a = Inclinação da reta

Portanto, para se obter o valor de EC₅₀ basta aplicar a equação 6. O resultado

é dado em mg de lignina/mg de DPPH. Calcular a média das triplicatas IC₅₀.

$$EC_{50} = \frac{IC_{50}}{[DPPH]_{t=0}} \quad (6)$$

Exemplo

Para testar a metodologia foram avaliadas as amostras de antioxidante comercial BHT; lignina pirolítica isolada a partir do bio-óleo de pirólise rápida de finos de eucalipto; e lignina de eucalipto obtida pelo processo lignoboost modificado pela empresa Suzano. Os resultados são apresentados na Tabela 2. Todo o memorial de cálculo está apresentado no material suplementar **CT 417 doc suplementar Metodo DPPH**.

Todos os parâmetros avaliados, para todas as amostras, apresentaram coeficiente de variação de até 10%, valor que é aceito para metodologias de determinação de atividade antioxidante frente ao radical DPPH (Szabo et al., 2007), mostrando que há homogeneidade entre os resultados obtidos, validando assim a metodologia.

Tabela 2. Resultados obtidos para alguns antioxidantes.

Amostra	% redução DPPH ^a	IC ₅₀ (mg L ⁻¹)	EC ₅₀ (mg /mg DPPH)
BHT	89 ± 4 (7%)	4,1 ± 0,2 (7%)	0,18 ± 0,01 (7%)
Lignina pirolítica (LP)	76 ± 2 (4%)	6,7 ± 0,4 (10%)	0,30 ± 0,02 (10%)
Lignina lignoboost (LB)	82 ± 0,4 (1%)	5,3 ± 0,3 (9%)	0,23 ± 0,01 (9%)

^a Para a concentração de 500 mg L⁻¹.

Números entre parênteses se referem ao coeficiente de variação.

Referências

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT: Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995. DOI: 10.1016/S0023-6438(95)80008-5.

BROCCA, D.; ARVIN, E.; MOSBÆK, H. Identification of organic compounds migrating from polyethylene pipelines into drinking water. **Water Research**, v. 36, n. 15, p. 3675-3680, 2002. DOI: 10.1016/S0043-1354(02)00084-2.

CALEJA, C.; BARROS, L.; ANTONIO, A. L.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; FERREIRA, I. C. F. R. A comparative study between natural and synthetic antioxidants: evaluation of their performance after incorporation into biscuits. **Food Chemistry**, v. 216, p. 342-346, 2017. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.08.075.

FIGUEIREDO, P.; LINTINEN, K.; HIRVONEN,

J. T.; KOSTIAINEN, M. A.; SANTOS, H. A. Properties and chemical modifications of lignin: towards lignin-based nanomaterials for biomedical applications. **Progress in Materials Science**, v. 93, p. 233-269, 2018. DOI: 10.1016/j.pmatsci.2017.12.001.

KIRSCHWENG, B.; TÁTRAALJAI, D.; FÖLDES, E.; PUKÁNSZKY, B. Natural antioxidants as stabilizers for polymers. **Polymer Degradation and Stability**, v. 145, 2017. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2017.07.012.

SAVATOVIĆ, S. M.; CETKOVIC, G. S.; CANADANOVIC-BRUNET, J. M.; DJILAS, S. M. Kinetic behaviour of the DPPH radical-scavenging activity of tomato waste extracts. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 77, n. 10, p. 1381-1389, 2012.

SZABO, M.; IDITOIU, C.; CHAMBRE, D.; LUPEA, A. X. Improved DPPH determination for antioxidant activity spectrophotometric assay. **Chemical Papers**, v. 61, n. 3, p. 214-216, 2007. DOI: 10.2478/s11696-007-0022-7.

Exemplares desta edição
podem ser adquiridos na:

Embrapa Florestas

Estrada da Ribeira, km 111, Guaraituba,
Caixa Postal 319
83411-000, Colombo, PR, Brasil
Fone: (41) 3675-5600
www.embrapa.br/florestas
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

1ª edição

Versão digital (2018)



Comitê Local de Publicações
da Embrapa Florestas

Presidente

Patrícia Póvoa de Mattos

Vice-Presidente

José Elidney Pinto Júnior

Secretária-Executiva

Neide Makiko Furukawa

Membros

*Álvaro Figueredo dos Santos, Gizelda Maia
Rego, Guilherme Schnell e Schühli, Ivar
Wendling, Luis Cláudio Maranhão Froufe,
Maria Izabel Radomski, Marilice Cordeiro
Garrastazu, Valderés Aparecida de Sousa*

Supervisão editorial/Revisão de texto

José Elidney Pinto Júnior

Normalização bibliográfica

Francisca Rasche

Projeto gráfico da coleção

Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica

Neide Makiko Furukawa

CGPE 14720