

COMUNICADO
TÉCNICO

216

Brasília, DF
Outubro, 2023

Embrapa

Método de avaliação antioxidante de material vegetal por DPPH em microplaca e controle de qualidade

Vera Lúcia Perussi Polez
Karen Chrockatt de Sá Dantas
Ananda de Oliveira Duarte
Gabriella Magarelli
Luciano Paulino da Silva

Método de avaliação antioxidante de material vegetal por DPPH em microplaca e controle de qualidade¹

¹ Vera Lúcia Perussi Polez, bióloga, doutora em Ciências (área de concentração Bioquímica), pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF. Karen Chrockatt de Sá Dantas, graduanda em Biotecnologia, Universidade de Brasília (UnB), Brasília, DF. Ananda de Oliveira Duarte, graduanda em Biotecnologia, Universidade de Brasília (UnB), Brasília, DF. Gabriella Magarelli, química, doutora em Ciências (área de concentração Química Analítica) analista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF. Luciano Paulino da Silva, biólogo, doutor em Biologia Animal, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

Apresentação

Os Bancos Ativos de Germoplasma (BAGs) da Embrapa têm como finalidade a conservação do material genético de espécies vegetais para uso imediato ou futuro. Eles representam uma importante fonte de diversidade genética e matéria-prima para diferentes aplicações na área agrícola, biotecnológica e alimentícia. A diversidade presente nos acessos das espécies vegetais armazenadas nos BAGs pode ser explorada pela caracterização de diferentes acessos. Isso é considerado uma estratégia relevante para a valorização e elucidação de possíveis aplicações futuras. A nanotecnologia verde utiliza substâncias químicas não tóxicas, biodegradáveis e de baixo custo para sintetizar nanomateriais. Os extratos vegetais são amplamente utilizados para a síntese de nanopartículas metálicas, sendo importante a avaliação da atividade antioxidante desses extratos.

Para essa avaliação, o método baseado na eliminação do radical livre estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) pode ser utilizado por ser prático, reprodutível e permitir adaptações. É possível calcular a porcentagem de atividade antioxidante, a porcentagem de DPPH remanescente no meio, a concentração inibitória (IC50) e a concentração de eficiência (EC50) a partir dos resultados obtidos. Embora o DPPH seja frequentemente utilizado em amostras dissolvidas em solventes orgânicos, é possível utilizá-lo em amostras aquosas. Na análise da atividade antioxidante, é de grande importância estabelecer parâmetros de controle de qualidade do método para que os resultados alcancem a confiabilidade exigida. O controle interno da qualidade, conhecido como controle intralaboratorial, é gerido pelo próprio laboratório e realizado frequentemente por meio de monitoramento do ensaio/processo pela análise de amostras controle. As amostras controle têm

resultados analíticos conhecidos e são analisadas na mesma sequência analítica que as amostras. Dois parâmetros essenciais foram selecionados para o controle de qualidade. O primeiro é a avaliação da precisão do método por testes de repetibilidade e precisão intermediária. O segundo refere-se à avaliação da estabilidade do método por meio de carta controle da média. O controle interno da qualidade é gerenciado pelo próprio laboratório por meio da análise de amostras controle com resultados analíticos conhecidos na mesma sequência analítica que as amostras. A precisão intermediária é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um mesmo laboratório, enquanto a carta controle das médias é útil para o monitoramento da propriedade do processo sob controle.

Introdução

Os Bancos Ativos de Germoplasma (BAGs) da Embrapa são unidades de conservação de material genético para uso imediato ou com potencial de uso futuro. Os BAGs representam uma importante fonte de diversidade genética e matéria-prima para diversas aplicações na área agrícola, biotecnológica, alimentícia, entre outras (Pádua et al., 2020). A Embrapa conserva 165 BAGs de espécies vegetais de importância para o agronegócio e a segurança alimentar da população brasileira (Portal Alelo, 2023). Entre as vantagens de se utilizar material proveniente de um BAG está

a possibilidade de explorar a grande variedade intraespecífica presente nos acessos. Portanto, a caracterização de diferentes acessos é uma importante estratégia de valorizá-los e elucidar possíveis aplicações futuras.

A nanotecnologia verde utiliza substâncias químicas relativamente não tóxicas, biodegradáveis e de custo baixo para sintetizar nanomateriais por meio de rotas de síntese verde. Neste caso, pode-se utilizar como fonte primária ou iniciadora da rota um organismo biológico ou partes dele, como órgãos, tecidos, células, biomoléculas ou metabólitos (Mittal et al., 2013; Silva, 2017).

Os extratos vegetais são amplamente utilizados na síntese verde de nanopartículas metálicas. A atividade antioxidante destes extratos exerce influência nesse processo, visto que a síntese ocorre por processos de oxirredução (Martinez-Cabanas, 2021; Silva, 2017). Dessa forma, a avaliação da atividade antioxidante de extratos aquosos de acessos vegetais conservados em BAGs torna-se uma estratégia relevante para essa aplicação.

Antioxidantes são compostos que ajudam a prevenir ou retardar o processo de oxidação celular (Pisoschi, 2012; Bedlovičová, 2020). Os antioxidantes podem ser classificados em primários, sinérgicos, removedores de oxigênio, biológicos, agentes quelantes e antioxidantes mistos (Halliwell, 1995). Uma das metodologias mais utilizadas para medir a atividade antioxidante é o método DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) que

foi mencionado em cerca de 18600 publicações entre 2013 e 2023 (Google Acadêmico, 2023). Além de ser amplamente reportado na literatura, o método é prático por ser aplicável em temperatura ambiente, sendo altamente reprodutível e permitindo adaptações.

O DPPH é um radical de nitrogênio estável que pode ser utilizado como estratégia para medir a atividade antioxidante total (AAT) em compostos. Esse radical é reduzido quando entra em contato com um antioxidante, sendo possível monitorar essa redução pela diminuição da absorvância durante a reação (Brand-Williams et al., 1995). A partir dos resultados obtidos, é possível calcular a porcentagem de atividade antioxidante e/ou a porcentagem de DPPH remanescente no meio. Adicionalmente, é possível calcular a concentração inibitória (IC50), que é definida como a concentração mínima necessária de antioxidante para inibir 50% de uma determinada concentração de radical. Outra medida calculada é a concentração de eficiência (EC50), que corresponde à quantidade de antioxidante necessária para reduzir 50% da quantidade inicial de radicais, sendo obtida a partir da razão entre o valor do IC50 e a concentração inicial de radical (Savatovic et al., 2012; Magalhães et al., 2018). O DPPH é geralmente utilizado em amostras dissolvidas em solventes orgânicos, embora possa ser utilizado em amostras aquosas (Bobo-García, 2015; Sahid, 2021). No entanto, o uso do DPPH em amostras aquosas requer adaptações para a homogeneização da reação. Neste caso, o método foi

adaptado para melhorar a medição da atividade antioxidante em extratos aquosos de materiais biológicos provenientes de acessos de plantas conservadas em BAGs, em reações de volume reduzido, especialmente aqueles utilizados para a síntese verde de nanopartículas.

Na análise da atividade antioxidante, é de grande importância estabelecer parâmetros de controle de qualidade do método para que os resultados alcancem a confiabilidade exigida. O controle interno da qualidade, conhecido como controle intralaboratorial, é gerido pelo próprio laboratório e realizado frequentemente por meio de monitoramento do ensaio/processo pela análise de amostras controle. As amostras controle têm resultados analíticos conhecidos e são analisadas na mesma sequência analítica que as amostras. Os resultados do controle devem apresentar precisão e exatidão adequadas para garantir a confiabilidade dos resultados da análise de toda a sequência analítica (De Oliveira et al., 2013). Neste comunicado, foram selecionados dois parâmetros essenciais: a avaliação da precisão do método por testes de repetibilidade e precisão intermediária, e a avaliação da estabilidade do método por meio de carta controle da média. As condições de repetibilidade incluem a análise de amostras ou padrões com propriedades conhecidas em réplica, utilizando o mesmo procedimento de medição, o mesmo analista, o mesmo instrumento sob as mesmas condições, o mesmo local e repetições em curto espaço de tempo. A precisão intermediária é reconhecida como a mais

representativa da variabilidade dos resultados em um mesmo laboratório quando pelo menos um fator for modificado na análise em réplica, como, por exemplo, dia de análise ou analista. Na carta controle das médias, a propriedade do processo sob controle, representada pela média, não deve ultrapassar os limites de controle inferior (LCI) e de controle superior calculados (LCS) (De Oliveira et al., 2013). Tais ferramentas são úteis e fáceis de aplicar na rotina, o que representa uma vantagem para o monitoramento contínuo dos experimentos e identificação de desvios e possíveis tendências em relação aos dados gerados.

Materiais, equipamentos e reagentes

Equipamentos e vidrarias

- Balança analítica
- Agitador vortex
- Centrífuga para microtubos
- Leitora de microplacas
- Cronômetro digital
- Micropipetas (P20, P200, P1000)
- Balão volumétrico de 100 mL
- Proveta de 50 mL
- Microplaca de 96 poços de fundo chato

- Microtubos de polipropileno com capacidade de 1,5 mL
- Papel de filtro (qualitativo 80 g)
- Funil simples
- Papel alumínio
- Capela de exaustão química
- Reservatório para descarte de lixo químico
- Reservatório para descarte de lixo biológico

Reagentes

- Álcool metílico P.A. (99,9%)
- Álcool etílico P.A. (99,9%)
- Água purificada tipo 1
- Ácido gálico P.A. (98,0%), PM = 188,14 g/Mol
- Extran® (1%)
- DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), PM = 394,32 g.Mol⁻¹

Preparo de soluções

- DPPH (0,06 mM)

Em balão volumétrico, dissolver 2,4 mg de DPPH em 100 mL de álcool metílico P.A. Em seguida, filtrar a solução e armazená-la no escuro a 4 °C até o momento das análises. A solução deve ser preparada no dia das análises para evitar

degradação do DPPH e utilizando-se uma capela de exaustão química.

- Ácido gálico (10^{-4} M)

Para a solução estoque a 10^{-2} M, pesar 17 mg de ácido gálico e dissolver em aproximadamente 2 mL de álcool etílico P.A. e diluir em q.s.p. 10 mL de água purificada tipo 1. Aliquotar a solução em microtubos de 1,5 mL, envolver em papel alumínio e armazenar em freezer (-20 °C). Para a solução de uso, diluir 1 mL da solução estoque em q.s.p. 100 mL de água purificada tipo 1, resultando em uma solução a 10^{-4} M. Em seguida, colocar em microtubos de 1,5 mL (alíquotas), envolver em papel alumínio e armazenar em freezer (-20 °C) até o momento do uso.

Protocolo do método de avaliação de DPPH adaptado em microplaca

Curva padrão de DPPH

A partir da solução padrão de DPPH 0,06 mM, preparar soluções de DPPH de 5 μ M a 55 μ M, em microtubos de 1,5 mL, conforme apresentado na Tabela 1. Preparar cada solução em triplicata e utilizar álcool metílico puro como branco.

Agitar as soluções preparadas em microtubos de 1,5 mL no agitador

Tabela 1. Preparo das reações para curva padrão de DPPH.

Microtubo	Álcool metílico P.A. (μ L)	DPPH 0,06 mM (μ L)	Concentração de DPPH (μ M)
1	600	0	0
2	550	50	5
3	450	150	15
4	350	250	25
5	250	350	35
6	150	450	45
7	50	550	55

vortex. Depois, transferir 200 μ L de cada solução para a microplaca de 96 poços em ambiente escuro e, após uma hora realizar a leitura no espectrofotômetro a 515 nm (ou em leitora de placa 492 nm).

Para a construção do gráfico, plote as concentrações de DPPH no eixo X e as médias das absorvâncias subtraídas da média do valor de branco (álcool metílico P.A.) no eixo Y. Em seguida, calcule a equação da reta e o R^2 (Figura 1)

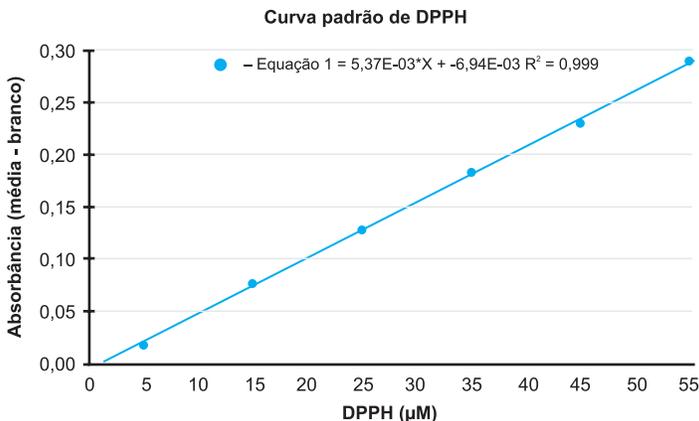


Figura 1. Exemplo de curva padrão do DPPH com a equação da reta (Equação 1).

Extração das amostras de materiais vegetais dos BAGs para avaliação da atividade antioxidante total (AAT)

A preparação da amostra desempenha um papel essencial na separação do(s) componente(s) de interesse de outros compostos presentes na matriz que podem interferir posteriormente na determinação analítica. O processo de limpeza pode variar de acordo com o tipo de amostra. No presente trabalho, as amostras foram higienizadas utilizando Extran[®], conforme descrito a seguir: mergulhe as amostras individualmente em Extran[®] 1% por um minuto, enxágue com água purificada tipo 1 e seque em papel de filtro. Corte as amostras em pedaços de aproximadamente 1 cm. Obtenha os extratos através da infusão com água

purificada tipo 1. Após ferver a água, adicione a amostra (20 mg para cada mL de água) e deixe por 2 minutos. Em seguida, filtre o extrato utilizando um papel de filtro e ajuste o volume com água purificada tipo 1 para 20 mg mL^{-1} . Use as amostras imediatamente ou congele em alíquotas de 1 mL em microtubos e armazene em um freezer em baixa temperatura (preferencialmente a $-40 \text{ }^\circ\text{C}$ ou $-80 \text{ }^\circ\text{C}$) até o momento de uso.

Preparo das reações para avaliação da atividade antioxidante total (AAT)

Para avaliar a AAT é preciso executar a reação em ambiente escuro e seguir a ordem: adicionar $10 \mu\text{L}$ a $30 \mu\text{L}$ das amostras (extratos) completando o volume para $150 \mu\text{L}$ com água purificada tipo 1, em microtubos de $1,5 \text{ mL}$, conforme indicado

na Tabela 2. Em seguida, adicione 450 μL de DPPH (0,06 mM). A partir da adição do DPPH, o tempo de contagem da reação é iniciado. Como controles, são utilizados: i. álcool metílico; ii. álcool metílico + DPPH; iii. ácido gálico + DPPH. Os detalhes das reações encontram-se na Tabela 2.

Agite as reações preparadas em microtubos de 1,5 mL no vortex. Após

30 minutos de reação agite novamente os microtubos no vortex e transfira 200 μL de cada reação para a microplaca de 96 poços em ambiente escuro. Caso as amostras utilizadas formem precipitado, recomenda-se centrifugar os microtubos para no mínimo 3,8 g por 2 minutos antes da transferência para a microplaca. A leitura no espectrofotômetro a 492 nm deve ser feita após uma hora de reação.

Tabela 2. Preparo das reações para avaliação da atividade antioxidante total (AAT).

Microtubo	Álcool metílico P.A. (μL)	Água purificada tipo 1 (μL)	Ácido gálico 10 ⁻⁴ M (μL)	Amostra (μL)	DPPH 0,06 mM (μL)	Volume final (μL)
1	600	-	-	-	-	600
2	150	-	-	-	450	600
3	-	90	60	-	450	600
4	-	140	-	10	450	600
5	-	130	-	20	450	600
6	-	120	-	30	450	600

Avaliação da precisão do método e controle interno da qualidade

Para a determinação da precisão do método de avaliação da capacidade antioxidante de extratos vegetais pelo método de DPPH em microplaca, as seguintes etapas devem ser seguidas:

- Para a determinação da repetibilidade, analisar a porcentagem de inibição do radical DPPH pelo

padrão de ácido gálico (controle interno) em dois níveis de concentração (baixo e alto). Para cada nível de concentração, utilizar cinco replicatas, sendo que a repetibilidade do método deverá ser expressa em termos de desvio padrão relativo (DPR) do conjunto de dados.

- Para a determinação da precisão intermediária, avaliar de modo semelhante, levando-se em

consideração os desvios padrão relativos de dois conjuntos de dados extraídos por dois analistas diferentes.

- Como critério de aceitação da precisão do método, estabelecer DPR <

5,0% para a repetibilidade e DPR < 10% para a precisão intermediária de acordo com referência AOAC Internacional (2016). A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos nos experimentos de precisão.

Tabela 3. Dados obtidos para a determinação da precisão do método de avaliação da atividade antioxidante total (AAT) de extratos vegetais por DPPH.

Concentração de ácido gálico (µg)	% inibição do DPPH Analista 1	% inibição do DPPH Analista 2	Média	Desvio-padrão	DPR (%) Precisão Intermediária
0,51	72,6	71,5	70,9	1,3	1,9
	71,6	71,5			
	69,5	70,9			
	70,5	71,5			
	67,9	71,5			
Média	70,9	71,4			
Desvio padrão	1,3	0,3			
DPR (%) Repetibilidade	1,9	0,4			
Concentração de ácido gálico (µg)	% inibição do DPPH Analista 1	% inibição do DPPH Analista 2	Média	Desvio-padrão	DPR (%) Precisão Intermediária
1,02	88,9	88,8	89,1	0,7	0,8
	88,9	88,8			
	90,0	88,2			
	90,0	88,8			
	90,0	88,0			
Média	89,6	88,6			
Desvio padrão	0,6	0,3			
DPR (%) Repetibilidade	0,6	0,4			

Para a avaliação da estabilidade do método de avaliação da capacidade antioxidante de extratos vegetais, seguir o seguinte procedimento:

- Analisar a média das absorbâncias da solução de DPPH após reação

com 1,02 µg (60 µL) de padrão de ácido gálico ao longo de 20 reações, no mínimo;

- Construir a carta controle das médias, representada por um gráfico, atribuindo para o eixo das

abscissas numeração sequencial das reações (podem ser as datas das reações), e no eixo das ordenadas, os resultados obtidos das médias das absorvâncias das reações de DPPH com 1,02 µg de ácido gálico, em triplicata, menos a absorvância do branco (Figura 1).

- Determinar a linha central da carta controle representada pelas médias das médias das absorvâncias das reações de DPPH com 1,02 µg de ácido gálico durante o período analisado.
- Determinar os limites de controle superior e inferior que apontam erros formados ou com tendência de se formarem. Para a determinação dos limites de controle, aplicar as equações 1 e 2.
- Verificar a ocorrência de pontos fora dos limites de controle, que indicam a presença de causas especiais (falhas operacionais) avaliando se os resultados das médias das absorvâncias das reações de DPPH com ácido gálico ultrapassam os limites superior e inferior (LCS e LCI).
- Se houver a constatação de pontos fora de controle, as causas deverão ser identificadas e corrigidas, e após isso, calcular novos limites. Repetir o processo até considerar que o processo atingiu o estado de controle.

Os dados da Tabela 4 foram usados como exemplo para o cálculo dos limites e construção da carta controle da reação de DPPH com o padrão de ácido gálico

para o monitoramento do método de avaliação da capacidade antioxidante de extratos vegetais (Figura 2).

$$\text{Equação 1: LCS} = \bar{X} + 3 \times \sigma$$

$$\text{Equação 2: LCI} = \bar{X} - 3 \times \sigma$$

Em que:

\bar{X} = Média das médias das absorvâncias durante o período estudado

σ = Desvio padrão das médias

Cálculos necessários para a avaliação da atividade antioxidante total (AAT)

A concentração de eficiência (EC50) é uma propriedade bastante utilizada para expressar a AAT de material vegetal (Rufino et al., 2007; Savatović et al., 2012; Magalhães et al., 2018). Esta é definida pela quantidade eficiente de antioxidante necessária para reduzir 50% a concentração inicial de DPPH. Quanto menor o valor de EC50 maior é a capacidade antioxidante da amostra.

Para o cálculo do EC50 são necessários os seguintes parâmetros e seus procedimentos:

- a) Média das absorvâncias da solução controle:
 - Preparar a solução controle em triplicata referente à 450 µL de DPPH 0,06 mM +150 µL de metanol conforme protocolo descrito no tópico "Curva padrão de DPPH".

Tabela 4. Dados utilizados para a construção da carta controle de médias de absorvâncias de ácido gálico (1,02 µg).

Medidas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Média das absorvâncias	0,030	0,031	0,039	0,026	0,021	0,019	0,018	0,020	0,023	0,034
Medidas	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Média das absorvâncias	0,026	0,023	0,025	0,028	0,019	0,020	0,017	0,023	0,025	0,028
Média das médias (linha central da carta controle)										
0,0247										
Desvio das médias										
0,0057										
LCS										
$X + 3 \times \sigma = 0,0445$										
LCI										
$X - 3 \times \sigma = 0,0071$										

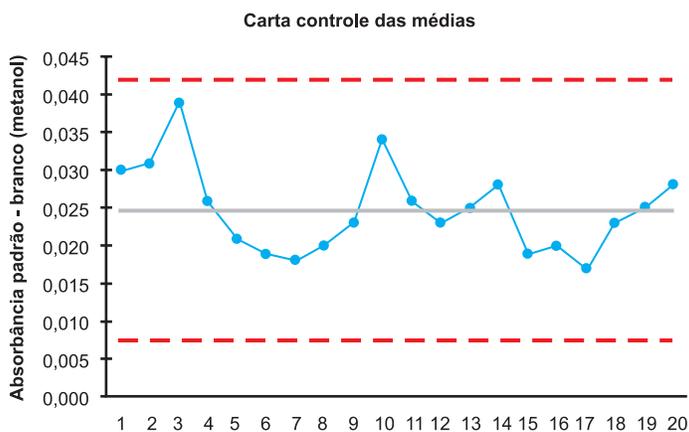


Figura 2. Carta de controle para absorvâncias de ácido gálico (médias). Em que: 1) linha azul representa as médias das absorvâncias de ácido gálico ao longo dos dias utilizando-se dois analistas; 2) linha cinza: média das médias da absorvância de ácido gálico; 3) linha vermelha (pontilhada) limite de controle.

- Medir as absorvâncias das réplicas da solução controle após tempo de estabilização definido pelo protocolo.
 - Calcular a média das absorvâncias.
- b) Equação da curva de regressão de DPPH;
- A equação de regressão de DPPH está representada na Equação 1. Nessa equação substitua: y = Média das absorvâncias da solução controle \div 2 e obtenha x = resultado em μ M DPPH.
 - Transforme μ M DPPH em g de DPPH conforme a equação: $g \text{ DPPH} = (\mu\text{M DPPH} / 1 \times 10^6) \times 394,3$ (massa molar do DPPH) - Expressão 1.
- c) Cálculo da atividade antioxidante total (AAT).
- Plotar as diferentes concentrações do extrato em mg L^{-1} no eixo X (mg L^{-1}) e as respectivas médias das absorvâncias no eixo Y. Determinar a equação da reta (Equação 2).
 - Substituir a média da absorvância da solução controle \div 2 pelo Y da Equação 2 e encontre X (mg L^{-1}), que corresponde à amostra necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH (EC50).
 - Para que seus dados possam ser comparados universalmente, é

importante expressar EC50 (mg L^{-1}) em g amostra / g DPPH. Para isso use a expressão: $g \text{ material vegetal} / g \text{ DPPH} = (\text{EC50 (mg/L)} / 1.000 * 1) / g \text{ DPPH}$, Expressão 2.

Uma outra forma bastante utilizada para expressar a capacidade antioxidante é por meio do percentual de inibição do DPPH. Em teoria, quanto maior o percentual de inibição ou estabilização do radical DPPH pela amostra, maior será a sua atividade antioxidante.

A porcentagem de inibição é obtida pela diferença entre a porcentagem total do radical no início da reação (100%) e o percentual de radical remanescente [% Inibição de DPPH = $100 - \% \text{DPPH remanescente}$], Expressão 3, sendo que:

- A quantidade de radical DPPH remanescente na solução é calculada a partir da razão entre a absorvância da amostra e a média das absorvâncias da solução controle [% DPPH remanescente = $(\text{Abs. amostra} \div \text{Abs. controle}) \times 100$], Expressão 4, sendo que a Abs. da amostra depende da sua concentração e o % de inibição é dependente dessa concentração.

Aplicação (exemplo prático)

A atividade antioxidante total do extrato aquoso de casca de caju (20×10^3

mg L⁻¹), proveniente do acesso BGC 473 obtido no BAG da Embrapa, foi avaliada de acordo com as etapas descritas nos tópicos "Preparo das reações para avaliação da atividade antioxidante total (AAT)". Os acessos foram obtidos nos BAGs Embrapa. Os acessos foram submersos individualmente em Extran® 1% (durante 1 minuto), enxaguados em água purificada tipo 1 e secados em papel de filtro. Os acessos foram cortados em aproximadamente 1 cm. Os extratos foram obtidos por infusão. Para cada 20mg de amostra era adicionado 1mL de água em estado de fervura durante 2 minutos. Em seguida o extrato obtido era filtrado utilizando-se papel de filtro e o volume do extrato foi corrigido para concentração final de 20 mg mL⁻¹ utilizando-se água purificada tipo 1. As amostras foram usadas imediatamente ou congeladas em alíquotas de 1mL em microtubos e armazenadas em freezer -40 °C até o momento do uso. Já as reações foram realizadas de acordo com a Tabela 5. As médias das absorvâncias obtidas para a solução controle

e para o extrato em diferentes concentrações foram subtraídas pela absorvância do branco (álcool metílico P.A) e estão apresentadas na Tabela 6.

A partir dos dados obtidos da Tabela 6, construiu-se a curva de regressão do extrato, no qual o eixo X representa a concentração de extrato em mg L⁻¹ e o Y as médias das absorvâncias (Figura 3).

A partir da equação da reta obtida: $Y = -8,7 \times 10^{-5} X + 0,134$, calculou-se o EC50 após a substituição do Y por 0,081 que representa a metade da absorvância do controle (metanol + DPPH : 0,163 ÷ 2).

$$Y = -8,7 \times 10^{-5} X + 0,134$$

$$0,081 = -8,7 \times 10^{-5} X + 0,134$$

$$x = 0,0061X10^5$$

$$x = 610 \text{ mg L}^{-1}$$

$$x = 610 \text{ mg L}^{-1} = \text{EC50}$$

Para que os dados pudessem ser comparados universalmente, o EC50 foi calculado em termos de gramas de

Tabela 5. Preparo das reações com as amostras (extrato aquoso de caju) para a avaliação da atividade antioxidante total (AAT).

Microtubo	Álcool metílico P.A. (µL)	Água purificada tipo 1 (µL)	Ácido gálico 10 ⁻⁴ M (µL)	Amostra (µL)	DPPH 0,06 mM (µL)	Volume final (µl)
1	600	-	-	-	-	600
2	150	-	-	-	450	600
3	-	90	60	-	450	600
4	-	140	-	10	450	600
5	-	130	-	20	450	600
6	-	120	-	30	450	600

Tabela 6. Medida da avaliação da atividade antioxidante total (AAT) em extrato aquoso de caju em diferentes concentrações em um volume final de reação de 600 μL .

Microtubo	Ácido gálico 10^{-4} M (μL)	Amostra (μL)	Concentração padrão ou amostra	Absorbância (média)
1	-	-	-	0,035 +/- 0,001
2	-	-	-	0,163 +/- 0,012
3	60	-	1,7 mg L^{-1}	0,018 +/- 0,001
4	-	10	$3,33 \cdot 10^2$ mg L^{-1}	0,105 +/- 0,001
5	-	20	$6,67 \cdot 10^2$ mg L^{-1}	0,076 +/- 0,003
6	-	30	$1,0 \cdot 10^3$ mg L^{-1}	0,047 +/- 0,001

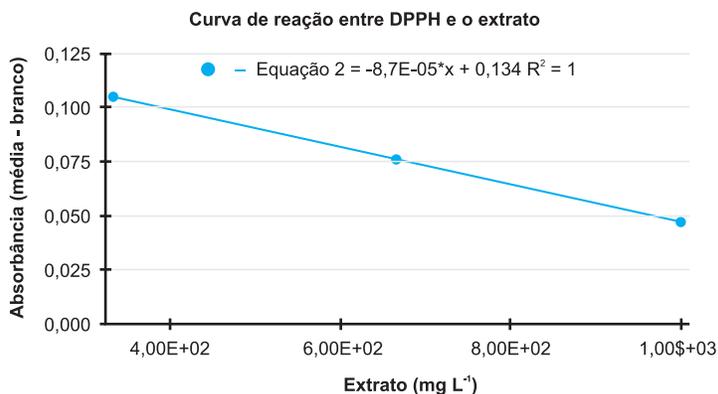


Figura 3. Curva de reação entre DPPH e o extrato aquoso de cascas de caju.

amostra por gramas de DPPH (g amostra / g DPPH). Para isso utilizou-se as Expressões 1 e 2:

$\text{g DPPH} = (\mu\text{M DPPH} / 1 \times 10^6) \times 394,3$
(massa molar do DPPH) - Expressão 1.

$\mu\text{M DPPH} = [(0,163 / 2) + 6,9 \times 10^{-3}] / 5,4 \times 10^{-3} = 16,27$

$\text{g DPPH} = (16,27 / 1 \times 10^6) \times 394,3 = 6,4 \times 10^{-3}$ g

$\text{g amostra} / \text{g DPPH} = (\text{EC}_{50} (\text{mg L}^{-1}) / 1.000 \times 1) / \text{g DPPH}$ - Expressão 2.

$\text{g amostra} / \text{g DPPH} = (610 / 1.000 \times 1) / 6,4 \times 10^{-3} \text{ g} = 95,3$ g amostras / grama de DPPH

As porcentagens de inibição do ácido gálico e dos extratos de caju (BGC 473) nas concentrações de 333 mg L^{-1} , 667 mg L^{-1} e 1.000 mg L^{-1} foram determinadas por meio das expressões 3 e 4 e apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7. Determinação da AAT de extratos de cascas de caju expressa em porcentagem de inibição de DPPH.

Amostra	Concentração do padrão de ácido gálico e dos extrato (mg L ⁻¹)	DPPH remanescente	% Inibição do DPPH
Padrão ácido gálico	1,7	$0,018 \div 0,163 \times 100 = 11,04$	$100 - 11,04 = 88,96$
Extrato de caju	333	$0,105 \div 0,163 \times 100 = 64,42$	$100 - 64,42 = 35,58$
Extrato de caju	667	$0,076 \div 0,163 \times 100 = 46,63$	$100 - 46,63 = 53,37$
Extrato de caju	1000	$0,047 \div 0,163 \times 100 = 28,83$	$100 - 28,83 = 71,17$

Gerenciamento dos resíduos

A gestão de resíduos para medição da AAT de extratos vegetais utilizando o método de DPPH deve ser realizada com cuidado para minimizar os danos ao meio ambiente e à saúde humana. Devem ser segregados os resíduos químicos contendo somente o DPPH (antes e após a reação com os extratos e com o ácido gálico), os resíduos contendo somente o padrão de ácido gálico dissolvido e os resíduos de solventes orgânicos (solventes não halogenados). Estes resíduos devem ser acondicionados em frascos apropriados de polietileno ou em frascos de vidro, etiquetados com as informações do resíduo, inclusive com a concentração aproximada, vedados e dispostos em locais apropriados até serem recolhidos para descarte final. Recomenda-se sempre seguir as diretrizes padrão estabelecidas pelas agências governamentais

relevantes ao gerenciamento de resíduos químicos.

Referências

- BEDLOVIČOVÁ Z.; STRAPÁČ I.; BALÁŽ M.; SALAYOVÁ A. A brief overview on antioxidant activity determination of silver nanoparticles. **Molecules**, v. 25, n. 14, p. 3191, jul. 2020. DOI: 10.3390/molecules2514319.
- BOBO-GARCÍA, G.; DAVIDOV-PARDO, G.; ARROQUI, C.; VÍRSEDA, P.; MARÍN-ARROYO, M. R.; MONTSERRAT, N. Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison with conventional spectrophotometric methods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 1, p. 204-209, jan. 2015. DOI: 10.1002/jsfa.6706.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT — Food science and Technology**, v.28, n.1, p. 25–30., fev. 1995. DOI: 10.1016/S0023-6438(95)80008-5.
- MAGALHÃES, W. L. E.; MATOS, M. de; LOURENÇON, T. V. **Metodologia científica: determinação da capacidade antioxidante de**

lignina pela captura do radical livre DPPH.

Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2018, 8 p. (Embrapa Florestas. Comunicado técnico, 417).

HALLIWELL, B. Antioxidant characterization: methodology and mechanism. **Biochemical pharmacology**, v. 49, n. 10, p. 1341-1348, mai. 1995. DOI: 10.1016/0006-2952(95)00088-h

MITTAL, A. K.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. **Biotechnology advances**, v. 31, n. 2, p. 346-356, mar. 2013. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2013.01.003.

MARTÍNEZ-CABANAS, M.; LÓPEZ-GARCÍA, M.; RODRÍGUEZ-BARRO, P.; VILARIÑO, T.; LODEIRO, P.; HERRERO, R.; BARRIADA, J. L.; VICENTE, M. E. S de. Antioxidant capacity assessment of plant extracts for green synthesis of nanoparticles. **Nanomaterials**, v. 11, n. 7, p. 1679, jul. 2021. DOI: 10.3390/nano11071679

OAC International, Guidelines for Standard Method Performance Requirements, AOAC Official Methods of Analysis. Appendix F, p. 1. 2016. Disponível em: <https://www.aoac.org/wp-content/uploads/2019/08/app_f.pdf>. Acesso em 18 jul. 2023.

OLIVEIRA, C. C de; GRANATO, D.; CARUSO, M. S. F.; SAKUMA, A. M. **Manual para elaboração de cartas de controle para monitoramento de processos de medição quantitativos em laboratórios de ensaio**. São Paulo, SP: Instituto Adolf Lutz, 2013. 76 p. E-book. Disponível em: <http://www.ial.sp.gov.br/resources/editorinplace/ial/2016_3_19/manual-carta-controle_ial_2013.pdf> Acesso em 17 jul. 2023.

PADUA, J. G.; ALBUQUERQUE, M. do S. M.; MELLO, S. C. M. **Bancos e coleções de germoplasma da Embrapa: conservação e uso**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos

e Biotecnologia, 2020. 164 p. Disponível em: file:///C:/Users/vpolez/Downloads/doc-371-Final-%20(5).pdf. Acesso 12 jul. 2023. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 371).

PISOSCHI, A. M.; NEGULESCU, G. P. Methods for total antioxidant activity determination: a review. **Biochem Anal Biochem**, v. 1, n. 1, p. 106, jan. 2012. DOI: 10.4172/2161-1009.1000106

PORTAL ALELO. **Curadoria de Recursos Genéticos**. 2023. Disponível em: <<https://alelo.cenargen.embrapa.br/Curadoria/Executar?acao=Curadoria.cVegetal>>. Acesso em 12 jul. 2023.

RUFINO, M. do S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S. de; MORAIS, S. M. de; SAMPAIO, C. de G.; PÉREZ - JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. **Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH**. Fortaleza, CE: Embrapa Agroindústria Tropical, 4 p., 2007. (Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado técnico, 127).

SAHID, Z. D.; SYUKUR, M.; MAHARIJAYA, A.; NURCHOLIS, W. Polyphenol content and pharmacological activities of *Capsicum frutescens* and *C. chinense* genotypes. **Biodiversitas Journal of Biological Diversity**, v. 22, n. 9, p. 3838-3843, set. 2021. DOI: <https://doi.org/10.13057/biodiv/d220929>.

SILVA, L. P.; BONATTO, C. C.; PEREIRA, F. D. E. S.; SILVA, L. D.; ALBERNAZ, V. L.; POLEZ, V. L. P. Nanotecnologia verde para síntese de nanopartículas metálicas. In: RESENDE, R. R. (Org). **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria**: fundamentos e aplicações. São Paulo, SP: Blucher, 2017. v. 4, p. 967-1012.

**Embrapa Recursos Genéticos
e Biotecnologia**
Parque Estação Biológica (PqEB)
Av. W5 Norte (final)
CEP: 70770-917, Brasília, DF
Fones: (61) 3448-4700/(61) 3448-4739
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

1ª edição
Publicação digital (2023): PDF



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA E
PECUÁRIA



Comitê Local de Publicações (CLP)
da Embrapa Recursos Genéticos
e Biotecnologia

Presidente
Marcelo Lopes da Silva

Secretária-Executiva
Ana Flávia do Nascimento Dias

Membros
*Andrielle Câmara Amaral Lopes,
Bruno Machado Teles Walter,
Débora Pires Paula, Edson Junqueira
Leite, Marcos Aparecido Gimenes,
Solange Carvalho Barrios Roveri José*

Supervisão editorial
Ana Flávia do N. Dias

Revisão de texto
Maria Cristina Ramos Jubé

Normalização bibliográfica
Rosameres Rocha Galvão

Tratamento das ilustrações
Júlio César da Silva Delfino

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica e capa
Júlio César da Silva Delfino

Imagem da capa
Karen Chrockatt de Sá Dantas

CGPE 018339