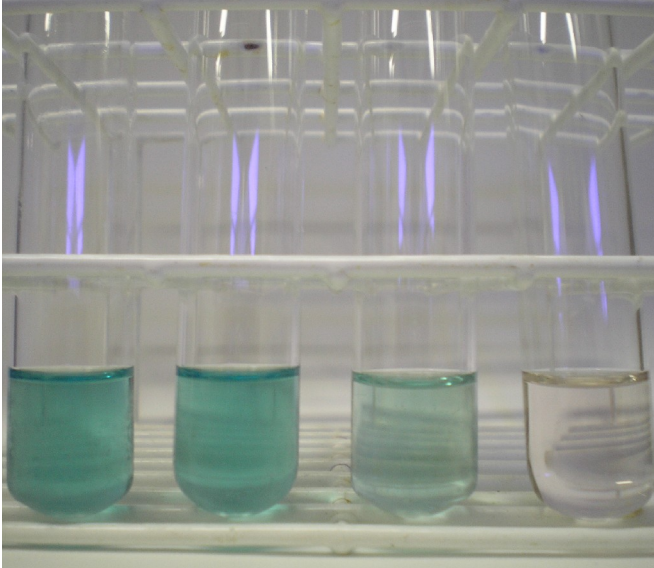


Foto: Maria do Socorro M. Rufino



Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS^{•+}

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

Os radicais livres do oxigênio, com seus elétrons não-pareados, podem atacar e danificar, praticamente, qualquer molécula encontrada no organismo. São tão ativos que, uma vez formados, ligam-se a diferentes compostos em frações de segundo. Ao fazê-lo, eles podem entregar seu elétron não-pareado ou capturar um elétron de outra molécula, a fim de formar um par. De uma forma ou de outra, os radicais acabam ficando estáveis, mas a molécula atacada, em si, transforma-se em um radical. Isso inicia uma reação em cadeia que pode agir destrutivamente sobre um tecido (YOUNGSON, 1995).

As espécies reativas do oxigênio são: ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxila (OH^{\bullet}), óxido nítrico (NO), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical lipídico (L^{\bullet}), entre outros. Eles são importantes nos processos

biológicos de produção de energia e fagocitose (BOREK, 1997). Entre as espécies, o radical hidroxila é mais reativo na indução de lesões nas moléculas celulares. Além disso, o peróxido de hidrogênio, apesar de não ser considerado um radical livre, é capaz de atravessar a membrana nuclear e induzir danos à molécula de DNA (ANDERSON, 2000).

Renaud et al. (1998) relatam que o interesse dos consumidores e da comunidade científica em relação aos antioxidantes naturais tem aumentado, particularmente em relação àqueles encontrados em frutas e vegetais, tendo em vista que estudos farmacológicos demonstram a associação entre o seu consumo e o baixo risco de doenças degenerativas.

De acordo com Halliwell (1996), os efeitos defensivos de antioxidantes naturais em frutas e vegetais estão relacionados a três grandes grupos: ácido ascórbico e

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@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, Madrid, Espanha

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

fenólicos como antioxidantes hidrofílicos e carotenóides como antioxidantes lipofílicos.

Um dos métodos mais utilizados para medir a atividade antioxidante é através da captura do radical 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), que pode ser gerado através de uma reação química, eletroquímica ou enzimática (Fig. 1). Com essa metodo-

logia, pode-se medir a atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica (KUSKOSKI et al., 2005).

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

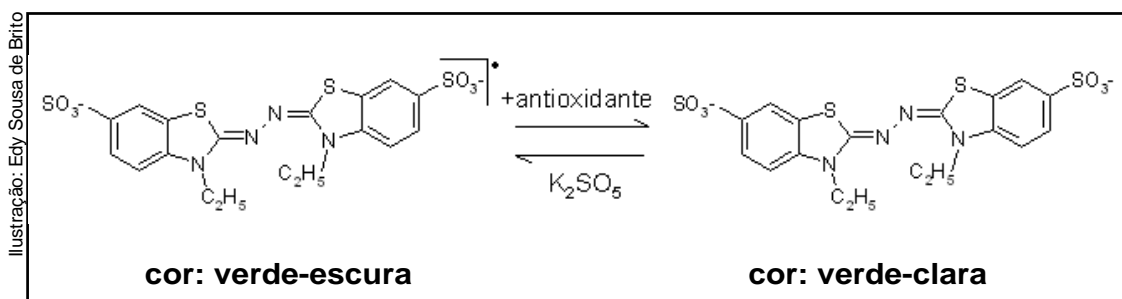


Fig. 1. Estabilização do radical ABTS^{•+} por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.

Materiais Necessários

Reagentes

- ABTS (2,2' - AZINO - BIS (3-ethylbenzo - thiazoline - 6 - sulfonic acid) diammonium salt (PM = 548,68) - Sigma, código A1888 ou equivalente.
- Acetona P.A.
- Água destilada
- Álcool etílico P.A.
- Álcool metílico P.A.
- Persulfato de Potássio (PM = 270,3) – Acros Organics, código 202015000 ou equivalente.
- Trolox (6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico) (PM = 250,29) - Sigma, código 218940050, ou equivalente.

Equipamentos e vidrarias

- Agitador de tubos de ensaio
- Balança analítica
- Balão volumétrico de 10 mL, 50mL e 1.000 mL
- 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 estoque de ABTS 7 mM

Dissolver 192 mg de ABTS 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. Armazenar sob refrigeração por até um mês.

Solução de persulfato de potássio 140 mM

Dissolver 378,4 mg de persulfato de potássio em água destilada e completar o volume para 10 mL em um balão volumétrico com água destilada, homogeneizar e transferir para um frasco de vidro âmbar, devidamente etiquetado. Armazenar em temperatura ambiente por até um mês.

Preparo do radical ABTS^{•+}

O radical ABTS^{•+} é preparado a partir da reação de 5 mL da solução estoque de ABTS com 88 µL da solução de persulfato de potássio. Manter a mistura no escuro, à temperatura ambiente, por 16 horas. Em seguida, diluir 1 mL desta mistura em álcool etílico até obter uma absorvância de 0,70 nm ± 0,05 nm a 734 nm. Preparar e usar apenas no dia da análise.

Solução padrão de trolox 2 mM

Dissolver 25 mg de trolox em álcool etílico e completar o volume para 50 mL em um balão volumétrico com álcool etílico, homogeneizar e transferir para um frasco de vidro âmbar, devidamente etiquetado. Preparar e usar apenas no dia da análise.

Curva-Padrão do Trolox

Preparo das soluções

A partir da solução padrão de trolox (2.000 µM), preparar, em balões volumétricos de 10 mL, soluções variando a concentração de 100 µM a 1.500 µM, conforme a Tabela 1.

Tabela 1. Preparo das soluções para curva-padrão.

Solução padrão de trolox (mL)	Álcool etílico (mL)	Concentração final (µM)
0,5	9,5	100
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 30 µL de cada solução de trolox (100 µM, 500 µM, 1.000 µM, 1.500 µM e 2.000 µM) para tubos de ensaio, misturar com 3,0 mL da solução do radical ABTS (item "Preparo do radical ABTS^{•+}") e homogeneizar em agitador de tubos. Realizar a leitura (734 nm) após 6 minutos da mistura e utilizar álcool etílico como branco para calibrar o espectrofotômetro.

Plotar as concentrações de trolox (µM) no eixo X e as respectivas absorvâncias no eixo Y (Fig. 2) e calcular a equação da reta.

A partir da equação da reta, calcula-se a absorvância referente a 1.000 µM de trolox (NENADIS et al., 2004), de acordo com a Equação 1.

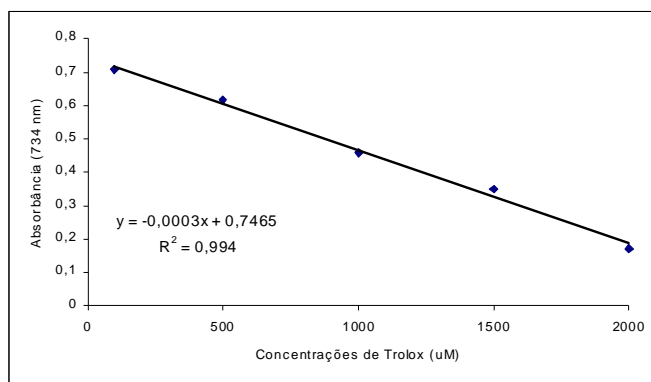


Fig. 2. Exemplo de curva-padrão de trolox.

Absorvância correspondente a 1.000 µM de trolox

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

onde:

x = 1.000 µM do trolox

y = absorvância correspondente a 1.000 µM de trolox

Protocolo do Método ABTS

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 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 30 µL de cada diluição do extrato para

tubos de ensaio com 3,0 mL do radical ABTS^{•+} e homogeneizar em agitador de tubos. Realizar a leitura (734 nm) após 6 minutos da mistura e utilizar o álcool etílico, 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 µM do padrão trolox (Eq. 1). O valor obtido para o termo x corresponde à diluição da amostra (mg/L) equivalente a 1.000 µM de trolox (Eq. 2).

Cálculo das diluições do extrato (mg/L) equivalente a 1.000 µM de trolox

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

onde:

y = Absorbância correspondente a 1.000 µM de trolox (Equação 1)

x = Diluição da amostra (mg/L) equivalente a 1.000 µM de trolox

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

Cálculo final expresso em (µM trolox / g)

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

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

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

- ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research**, v.350, n.1, p.103-108, 2000.
- BOREK, C. Antioxidants and cancer. **Science and Medicine**, p.52-62, 1997.
- KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A.G.; TRONCOSO, A.M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicação de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.4, p.726-732, 2005.
- HALLIWELL, B. Antioxidants in human health and disease. **Annual Review of Nutrition**, v.16, p.33-50, 1996.
- 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. **J. Agric. Food Chem.** v. 45, p.1390-1393, 1997.
- NENADIS, N.; WANG, L.F.; TSIMIDOU, M. ZHANG, H.Y. Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS^{•+} assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.52, p.4669-4674, 2004.
- RENAUD, S.C., GUEGUEN, R., SHENKER, J., D'HOUTAUD, A. Alcohol and mortality in middle-aged men from eastern France. **Epidemiology**, v.9, p.184-188, 1998
- YOUNGSON, R. **Como Combater os Radicais Livres: O Programa de Saúde dos Antioxidantes**. Rio de Janeiro: Campos, 1995. 168p.

Comunicado Técnico, 128

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.