

Métodos para determinação
de capacidade

ANTIOXIDANTE

Veronica de Melo Sacramento
Pedro Henrique Fonseca Veloso
Vanessa de Andrade Royo
Natallia Santos Abreu
Kamila Soares Freitas Souto
Afrânio Farias de Melo Júnior



Métodos para determinação
de capacidade

ANTIOXIDANTE

Veronica de Melo Sacramento
Pedro Henrique Fonseca Veloso
Vanessa de Andrade Royo
Natallia Santos Abreu
Kamila Soares Freitas Souto
Afrânio Farias de Melo Júnior



Editora chefe

Prof^a Dr^a Antonella Carvalho de Oliveira

Editora executiva

Natalia Oliveira

Assistente editorial

Flávia Roberta Barão

Bibliotecária

Janaina Ramos

Projeto gráfico

Bruno Oliveira

Camila Alves de Cremo

Luiza Alves Batista

Imagens da capa

iStock

Edição de arte

Luiza Alves Batista

2023 by Atena Editora

Copyright © Atena Editora

Copyright do texto © 2023 Os autores

Copyright da edição © 2023 Atena

Editora

Direitos para esta edição cedidos à Atena Editora pelos autores.

Open access publication by Atena

Editora



Todo o conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição Creative Commons. Atribuição-Não-Comercial-NãoDerivativos 4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0).

O conteúdo do texto e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores, inclusive não representam necessariamente a posição oficial da Atena Editora. Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Todos os manuscritos foram previamente submetidos à avaliação cega pelos pares, membros do Conselho Editorial desta Editora, tendo sido aprovados para a publicação com base em critérios de neutralidade e imparcialidade acadêmica.

A Atena Editora é comprometida em garantir a integridade editorial em todas as etapas do processo de publicação, evitando plágio, dados ou resultados fraudulentos e impedindo que interesses financeiros comprometam os padrões éticos da publicação. Situações suspeitas de má conduta científica serão investigadas sob o mais alto padrão de rigor acadêmico e ético.

Conselho Editorial**Ciências Exatas e da Terra e Engenharias**

Prof. Dr. Adélio Alcino Sampaio Castro Machado – Universidade do Porto

Prof^a Dr^a Alana Maria Cerqueira de Oliveira – Instituto Federal do Acre

Prof^a Dr^a Ana Grasielle Dionísio Corrêa – Universidade Presbiteriana Mackenzie

Prof^a Dr^a Ana Paula Florêncio Aires – Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Prof. Dr. Carlos Eduardo Sanches de Andrade – Universidade Federal de Goiás

Prof^a Dr^a Carmen Lúcia Voigt – Universidade Norte do Paraná

Prof. Dr. Cleiseano Emanuel da Silva Paniagua – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás

- Prof. Dr. Douglas Gonçalves da Silva – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof^a Dr^a Érica de Melo Azevedo – Instituto Federal do Rio de Janeiro
Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará
Prof^a Dr^a Glécilla Colombelli de Souza Nunes – Universidade Estadual de Maringá
Prof^a Dr^a Iara Margolis Ribeiro – Universidade Federal de Pernambuco
Prof^a Dra. Jéssica Verger Nardeli – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
Prof. Dr. Juliano Bitencourt Campos – Universidade do Extremo Sul Catarinense
Prof. Dr. Juliano Carlo Rufino de Freitas – Universidade Federal de Campina Grande
Prof^a Dr^a Luciana do Nascimento Mendes – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Marcelo Marques – Universidade Estadual de Maringá
Prof. Dr. Marco Aurélio Kistemann Junior – Universidade Federal de Juiz de Fora
Prof^a Dr^a Maria José de Holanda Leite – Universidade Federal de Alagoas
Prof. Dr. Miguel Adriano Inácio – Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais
Prof. Dr. Milson dos Santos Barbosa – Universidade Tiradentes
Prof^a Dr^a Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof^a Dr^a Neiva Maria de Almeida – Universidade Federal da Paraíba
Prof. Dr. Nilzo Ivo Ladwig – Universidade do Extremo Sul Catarinense
Prof^a Dr^a Priscila Tessmer Scaglioni – Universidade Federal de Pelotas
Prof^a Dr Ramiro Picoli Nippes – Universidade Estadual de Maringá
Prof^a Dr^a Regina Célia da Silva Barros Allil – Universidade Federal do Rio de Janeiro
Prof. Dr. Sidney Gonçalo de Lima – Universidade Federal do Piauí
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista

Métodos para determinação de capacidade antioxidante

Diagramação: Letícia Alves Vitral
Correção: Maiara Ferreira
Indexação: Amanda Kelly da Costa Veiga
Revisão: Os autores
Autores: Veronica de Melo Sacramento
Pedro Henrique Fonseca Veloso
Vanessa de Andrade Royo
Natallia Santos Abreu
Kamila Soares Freitas Souto
Afrânio Farias de Melo Júnior

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)	
S123	Métodos para determinação de capacidade antioxidante / Veronica de Melo Sacramento, Pedro Henrique Fonseca Veloso, Vanessa de Andrade Royo, et al. – Ponta Grossa - PR: Atena, 2023.
<p>Outros autores Natallia Santos Abreu Kamila Soares Freitas Souto Afrânio Farias de Melo Júnior</p> <p>Formato: PDF Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader Modo de acesso: World Wide Web Inclui bibliografia ISBN 978-65-258-0907-6 DOI: https://doi.org/10.22533/at.ed.076230302</p>	
<p>1. Antioxidantes. I. Sacramento, Veronica de Melo. II. Veloso, Pedro Henrique Fonseca. III. Royo, Vanessa de Andrade. IV. Título.</p> <p>CDD 613.286</p>	
<p>Elaborado por Bibliotecária Janaina Ramos – CRB-8/9166</p>	

Atena Editora

Ponta Grossa – Paraná – Brasil

Telefone: +55 (42) 3323-5493

www.atenaeditora.com.br

contato@atenaeditora.com.br

DECLARAÇÃO DOS AUTORES

Os autores desta obra: 1. Atestam não possuir qualquer interesse comercial que constitua um conflito de interesses em relação ao conteúdo publicado; 2. Declararam que participaram ativamente da construção dos respectivos manuscritos, preferencialmente na: a) Concepção do estudo, e/ou aquisição de dados, e/ou análise e interpretação de dados; b) Elaboração do artigo ou revisão com vistas a tornar o material intelectualmente relevante; c) Aprovação final do manuscrito para submissão.; 3. Certificam que o texto publicado está completamente isento de dados e/ou resultados fraudulentos; 4. Confirmam a citação e a referência correta de todos os dados e de interpretações de dados de outras pesquisas; 5. Reconhecem ter informado todas as fontes de financiamento recebidas para a consecução da pesquisa; 6. Autorizam a edição da obra, que incluem os registros de ficha catalográfica, ISBN, DOI e demais indexadores, projeto visual e criação de capa, diagramação de miolo, assim como lançamento e divulgação da mesma conforme critérios da Atena Editora.

DECLARAÇÃO DA EDITORA

A Atena Editora declara, para os devidos fins de direito, que: 1. A presente publicação constitui apenas transferência temporária dos direitos autorais, direito sobre a publicação, inclusive não constitui responsabilidade solidária na criação dos manuscritos publicados, nos termos previstos na Lei sobre direitos autorais (Lei 9610/98), no art. 184 do Código Penal e no art. 927 do Código Civil; 2. Autoriza e incentiva os autores a assinarem contratos com repositórios institucionais, com fins exclusivos de divulgação da obra, desde que com o devido reconhecimento de autoria e edição e sem qualquer finalidade comercial; 3. Todos os e-book são *open access*, *desta forma* não os comercializa em seu site, sites parceiros, plataformas de *e-commerce*, ou qualquer outro meio virtual ou físico, portanto, está isenta de repasses de direitos autorais aos autores; 4. Todos os membros do conselho editorial são doutores e vinculados a instituições de ensino superior públicas, conforme recomendação da CAPES para obtenção do Qualis livro; 5. Não cede, comercializa ou autoriza a utilização dos nomes e e-mails dos autores, bem como nenhum outro dado dos mesmos, para qualquer finalidade que não o escopo da divulgação desta obra.

APRESENTAÇÃO

Neste manual você conhicerá os princípios relacionados às substâncias antioxidantes e encontrará as principais metodologias empregadas *in vitro*, na atualidade, para quantificar a capacidade antioxidante. O objetivo principal é tornar mais simples a seleção e utilização das técnicas DPPH, ABTS, FRAP, Sistema β -caroteno, TBARS e ORAC para o cálculo da atividade antioxidante. A partir de uma linguagem clara e prática, aspectos gerais sobre radicais livres e substâncias antioxidantes são abordados, bem como a exemplificação de cálculos e aspectos gráficos relativos às soluções e seus comportamentos diante da luz UV. Esta proposta visa contribuir para a utilização dessas técnicas por acadêmicos e profissionais de Química, Biologia, Biotecnologia, Agronomia, Engenharias e áreas afins.

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	2
CAPÍTULO 1	
ANTIOXIDANTES E RADICAIS LIVRES	5
ASPECTOS GERAIS.....	5
ASPECTOS ANTIOXIDANTES RELACIONADOS AOS ALIMENTOS	6
ASPECTOS QUÍMICOS.....	6
OS PROCESSOS OXIDATIVOS: CARACTERÍSTICAS GERAIS.....	8
Espécies reativas de oxigênio (EROs)	8
Radical hidroxil ($\bullet\text{OH}$)	9
Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)	9
Radical superóxido ($\text{O}_2\bullet^-$)	9
Oxigênio singlete	9
QUANTO AOS MECANISMOS	10
Mecanismo químico	10
Mecanismo enzimático	11
Estresse Oxidativo	12
A atividade antioxidant e a medida da capacidade antioxidant	12
Mecanismos e métodos	13
REFERÊNCIAS	14
CAPÍTULO 2	
PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS DAS AMOSTRAS	16
PROTOCOLO DESCrito POR DUDONNÉ ET AL., 2009:	17
DESCRÍÇÃO SEGUNDO OLIVEIRA ET AL., 2016:	17
PROCEDIMENTO DE ACORDO COM RAJURKAR E HANDE, 2011:	17
PROCEDIMENTO DE ACORDO COM SOUSA ET AL., 2007:	17

PROCEDIMENTO ADAPTADO DE RUFINO ET AL., 2007:	17
PROCEDIMENTO DE ACORDO COM ROESLER ET AL., 2007:	18
Preparação do extrato aquoso	18
Preparação do extrato etanólico	18
PROCEDIMENTO DE ACORDO COM BOROSKY ET AL., 2012:	18
Preparo de amostras de derivados do leite, segundo Zuleta et al., 2009:	19
Procedimento de acordo com Sousa et al., 2018:	19
Preparo conforme Meda et al., 2005:	19
Procedimento segundo Buriol et al., 2009:	19
Procedimento segundo Freitas et al., 2006:	20
REFERÊNCIAS	21
 CAPÍTULO 3	
CURVA PADRÃO	23
MÉTODO PARA A OBTENÇÃO DE CURVA PADRÃO DE ÁCIDO GÁLICO (SACRAMENTO ET AL., 2020).	24
MÉTODO PARA A OBTENÇÃO DE CURVA PADRÃO DE TROLOX (ÁCIDO 6- HIDROXI-2,5,7,8- TETRAMETILCROMANO-2- CARBOXÍLICO) (BOROSKY ET AL., 2015)	25
DETERMINAÇÃO DA CURVA PADRÃO (BOROSKI ET AL., 2015).....	26
REFERÊNCIAS	29
 CAPÍTULO 4	
DPPH - MÉTODO DE SEQUESTRO DO RADICAL LIVRE DPPH (2,2-DIFENIL-1-PI- CRIL-HIDRAZINA)	30
CARACTERÍSTICAS GERAIS	30
ASPECTOS QUÍMICOS.....	30
COMO FAZER?	31
PREPARO DAS SOLUÇÕES	32
Solução de DPPH - 60 µM	32

SUMÁRIO

Soluções das amostras	32
Procedimento	32
DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	33
OUTRAS INFORMAÇÕES RELEVANTES	33
REFERÊNCIAS	36
 CAPÍTULO 5	
MÉTODO RADICAL ABTS (2,2-AZINOBIS (3-ETILBENZOTIAZOLINA-6-ÁCIDO SULFÔNICO))	39
CARACTERÍSTICAS GERAIS	39
ASPECTOS QUÍMICOS.....	39
COMO FAZER?	40
PREPARO DE SOLUÇÕES	41
Solução estoque de ABTS (7 mM).....	41
Solução de persulfato de potássio (140 mM).....	41
Preparação do cátion radical ABTS ^{•+}	41
Solução padrão de Trolox 2 mM.....	41
DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (AAT)	41
REFERÊNCIAS	43
 CAPÍTULO 6	
FRAP - MÉTODO DE REDUÇÃO DO FERRO FRAP (FERRIC REDUCING ANTIOXIDANT POWER)	44
CARACTERÍSTICAS GERAIS	44
ASPECTOS QUÍMICOS.....	44
COMO FAZER?	45
PREPARO DE SOLUÇÕES	46
Solução de HCl 40 mM.....	46
Solução de TPTZ 10 mM	46
Solução de Cloreto Férrico 20 mM	46

Solução tampão acetato de sódio 0,3 M (pH 3,6)	46
Solução do Reagente FRAP	46
Solução Padrão de Sulfato de Ferro (II) 2000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	46
CURVA PADRÃO DO SULFATO DE FERRO (II)	47
DETERMINAÇÃO DA CURVA PADRÃO – PADRÃO SULFATO DE FERRO (II)	47
DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (AAT).....	48
RESULTADOS E INTERPRETAÇÕES.....	49
OUTRO PADRÃO PODE SER O TROLOX- METODOLOGIA DESCrita POR SILVA ET AL., 2018	49
REFERÊNCIAS	50
 CAPÍTULO 7	
SISTEMA β-CAROTENO/ÁCIDO LINOLEICO- DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE NO SISTEMA β-CAROTENO/ÁCIDO LINOLEICO.....	51
CARACTERÍSTICAS GERAIS	51
ASPECTOS QUÍMICOS.....	51
COMO FAZER?	51
PREPARO DE SOLUÇÕES	52
Solução controle de Trolox (200 mg. L^{-1})	52
Tratamento da água destilada.....	52
Solução β -Caroteno (20 mg. L^{-1})	52
Solução Sistema β -caroteno/Ácido Linoleico	52
DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (AAT).....	53
REFERÊNCIAS	54
 CAPÍTULO 8	
TBA OU TBARS (THIOBARBITURIC ACID REACTIVE SUBSTANCES) - ENSAIO ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO – ESPÉCIES REATIVAS	55
CARACTERÍSTICAS GERAIS	55

ASPECTOS QUÍMICOS.....	55
PROCEDIMENTOS PARA A REALIZAÇÃO DO MÉTODO TBARS (MÉTODO ORIGINAL OHKAWA ET AL., 1979 MODIFICADO POR MORAIS ET AL. 2006)	57
REFERÊNCIAS	59
 CAPÍTULO 9	
ORAC- OXYGEN RADICAL ABSORBANCE CAPACITY.....	60
CARACTERÍSTICAS GERAIS	60
ASPECTOS QUÍMICOS.....	60
COMO FAZER?	61
PREPARO DOS REAGENTES	61
Solução estoque de fluoresceína.....	61
Solução de trabalho de fluoresceína	61
Solução de AAPH (160 mmol. L ⁻¹).....	62
Soluções das amostras	62
Solução padrão de Trolox- estoque	62
Soluções de trabalho do padrão Trolox	62
REFERÊNCIAS	65

ANTIOXIDANTES E RADICAIS LIVRES

ASPECTOS GERAIS

Durante todo o tempo, os organismos em sua atividade metabólica normal produzem radicais livres, tais moléculas, reagem com componentes vitais como proteínas e ácidos nucleicos que geram substâncias oxidáveis e contribuem com danos que ocasionam o desenvolvimento mais acelerado do envelhecimento, doenças degenerativas como aterosclerose, artrites e câncer e doenças crônicas como diabetes, doença de Parkinson e Alzheimer (Boroski et al., 2015).

Conceitos mais simplistas sobre os radicais livres, os denominam como moléculas que têm um elétron isolado, livre para se ligar a qualquer outro elétron, são extremamente reativos, podendo ser gerados por fontes endógenas ou exógenas (Vasconcelos et al., 2014).

Fontes endógenas comuns são decorrentes de processos biológicos como a atividade de enzimas (oxidases, lipogenases, desidrogenases, peroxidases) ou pela presença de metais de transição no interior da célula de sistemas de transporte de elétrons. Já as fontes exógenas incluem o tabaco, poluição do ar, solventes orgânicos, anestésicos, pesticidas, radiações, alimentos gordurosos, alimentos que contém aditivos, hormônios, conservantes, bebidas alcoólicas, drogas (Boroski et al., 2015).

Os organismos contam com substâncias capazes de impedir ou amenizar a quantidade de ataques dos radicais livres causando estabilidade ou desativação dos mesmos, estas substâncias são conhecidas como antioxidantes (Yashin et al., 2017).

Os vegetais, em geral são ricos em antioxidantes, a partir do metabolismo secundário, compostos como os flavonoides, taninos, compostos fenólicos em geral, são sintetizados em diversas partes: caules, folhas, raízes, e ainda que sofram com as variações sazonais, incidência solar, quantidade de sais minerais e água disponibilizados, horário e período da coleta do material já se tem muitos estudos sobre plantas que produzem metabólitos com aspectos antioxidantes investigados ou em investigação (Gobbo-Neto e Lopes, 2007).

O impacto que esses compostos como tocoferóis, vitamina C, carotenoides e fenólicos ocasionam no organismo das pessoas pode ficar mais claro a partir da observação da qualidade da alimentação. A determinação do teor de ácido ascórbico, de compostos fenólicos (antocianinas e flavonoides), e de carotenoides, compostos com reconhecida ação antioxidante em vegetais, constitui o primeiro passo para o entendimento de que os alimentos naturais possuem grande importância para a saúde (Oliveira et al., 2011).

ASPECTOS ANTIOXIDANTES RELACIONADOS AOS ALIMENTOS

Os alimentos funcionais se caracterizam por oferecer vários benefícios à saúde, além do valor nutritivo inerente à sua composição química, podem desempenhar um papel potencialmente benéfico na redução do risco de doenças crônico-degenerativas, estes alimentos diferenciam-se dos objetivos finais dos chamados nutracêuticos que devem proporcionar benefícios médicos e de saúde, incluem a prevenção e/ou tratamento da doença (Moraes e Colla, 2006).

Esses alimentos e ingredientes funcionais geram benefícios relativos às atividades antioxidantes e são recomendados na dieta usual, sejam naturais ou contidos em componentes naturais (Oliveira et al. 2011; Dudonné et al., 2009).

Destaca-se no Brasil, a diversidade de frutas tropicais cultivadas e a crescente preocupação da população com a saúde e com os benefícios gerados por tais, isso tem direcionado consumidores a busca por uma dieta mais saudável e responsável (Oliveira et al., 2011).

A partir do desenvolvimento de pesquisas relacionadas às frutas e hortaliças que contém Vitamina C (ácido ascórbico), carotenoides e outros nutrientes, notou-se que a contribuição destes alimentos para a capacidade antioxidante tem relação com os compostos fenólicos presentes (Oliveira et al., 2009).

ASPECTOS QUÍMICOS

Dentre a grande diversidade de compostos secundários produzidos pelas plantas, aqueles que apresentam em sua estrutura, pelo menos uma unidade de fenol (um grupo hidroxila ligado a um anel aromático) são denominados compostos fenólicos e constituem um grupo quimicamente heterogêneo (Sousa et al., 2007).

Parte desses compostos é solúvel apenas em solventes orgânicos, outros apresentam características estruturais de ácidos carboxílicos e glicosídeos e são solúveis em água, e alguns são representados por grandes polímeros insolúveis em água (Alves et al., 2010).

Essa heterogeneidade estrutural permite a estes compostos exercerem diferentes papéis nos vegetais:

- defesa contra patógenos e herbívoros;
- atrativo de polinizadores ou dispersores de frutos;
- efeitos alelopáticos (redução do crescimento de plantas competidoras adjacentes);

- proteção contra a radiação UV (Morais et al., 2006).

Os antioxidantes podem agir e alterar molecularmente radicais livres a produtos estáveis, quelar íons metálicos, evitar o início do processo oxidativo e diminuir a concentração de espécies reativas de oxigênio (Gouveia e Lima, 2017).

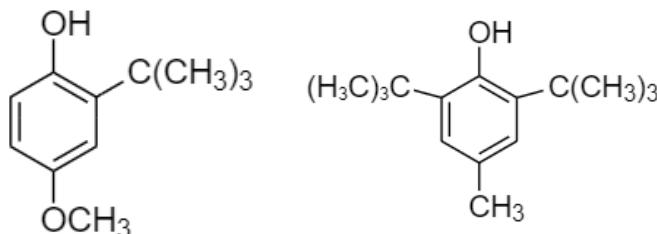
O reconhecimento de um bom antioxidante pode acontecer a partir de princípios como:

- ter a presença de substituintes doadores de elétrons ou de hidrogênio ao radical, em função de seu potencial de redução;
- capacidade de deslocamento do radical formado em sua estrutura;
- capacidade de quelar metais de transição implicados no processo oxidativo;
- acesso ao local de ação, dependendo de sua hidrofilia ou lipofilia (Alves et al., 2010).

Outras classificações relativas aos antioxidantes podem ser: quanto ao mecanismo de combate aos radicais livres sendo classificados como:

- primários ou secundários;
- naturais ou sintéticos;
- processo de oxidação envolvendo substâncias lipídicas ou não (Moharram & Youssef, 2014).

Os antioxidantes primários são comumente utilizados em alimentos, e tem origem sintética (Figura 1.1) como o butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), galato de propila (PG), terc-butil hidroquinona (TBHQ), tais compostos por terem característica sintética tem seus valores controlados por órgãos responsáveis em cada país, devido às quantidades limitantes referentes ao consumo humano com segurança, componentes naturais também são adicionados aos alimentos é o caso dos tocoferóis e carotenoides (Ramalho e Jorge, 2006). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é o órgão que regula e fiscaliza tal situação.



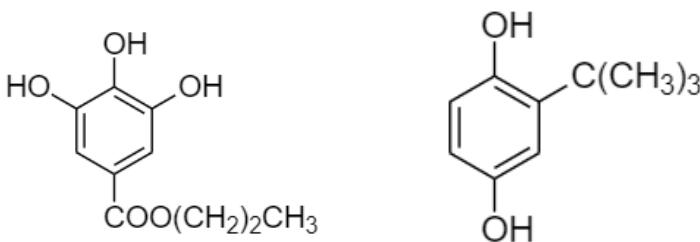


Figura 1.1: Antioxidantes de origem sintética utilizados em alimentos. BHA (butilhidroxianisol); BHT (butilhidroxitolueno); PG (galato de propila); (TBHQ) terc-butil hidroquinona.

Fonte: Autores, 2022

A característica principal dos antioxidantes secundários está no mecanismo de atuação, tais substâncias diminuem a taxa de oxidação por diferentes formas, mas não convertem radicais livres em produtos mais estáveis, podem quedar metais pró oxidantes e desativá-los, repor hidrogênio, decompor hidroperóxidos a espécies estáveis, desativar o oxigênio singlete, sequestrar oxigênio e também absorver radiação UV (Giada, 2014).

A denominação sinergista é utilizada para esta classificação, pois promove atividade antioxidante em conjunto com os antioxidantes primários. Exemplos: ácido cítrico, ácido ascórbico e tartárico (Ramalho e Jorge, 2006).

OS PROCESSOS OXIDATIVOS: CARACTERÍSTICAS GERAIS

Espécies reativas de oxigênio (EROs)

O oxigênio é uma molécula altamente reativa e pode ser parcialmente reduzida para formar um número de agentes quimicamente reativos. O processo de transferência de elétrons, ou a absorção de energia pode levar o oxigênio a gerar as Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) (Gouveia e Lima, 2017).

Nessa situação o oxigênio fica com um elétron desemparelhado no último orbital, ou seja, ocupa um orbital atômico ou molecular sozinho, instável e muito reativo (radical livre), a capacidade de se ligar a diversas moléculas gera a oxidação delas. É pertinente entender que a denominação radical livre está na verdade inserida no cenário de reações de óxido-redução (Andrade et al., 2010).

Consequentemente existe grande necessidade em se conhecer substâncias que possuam propriedades antioxidantes, para que se evite em condições fisiológicas os danos ocasionados pelas EROs (Barbosa et al., 2010).

Os principais tipos de EROs são: radical hidroxila, peróxido de hidrogênio, superóxido e oxigênio singlete.

Radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$)

Trata-se do radical livre mais reativo nos sistemas biológicos, é um produto intermediário originado na presença de íons ferro ou íons cobre reduzido, a partir do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), uma vez formado pode iniciar a lipoperoxidação (oxidação de ácidos graxos poliinsaturados das membranas biológicas, pode lesar alvos como DNA (ácido desoxirribonucleico), proteínas, carboidratos e lipídios. Pode ser gerado a partir da fissão homolítica do peróxido de hidrogênio por meio de radiação UV, ozônio e radiação ionizante (Andrade et al., 2010).

Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

Não é exatamente um radical livre, porém está envolvido como intermediário reativo do oxigênio e participa ativamente na reação que produz o radical hidroxila.

Radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$)

Este radical é o mais comum e abundante nas células, centrado em oxigênio. Pode ser produzido a partir do transporte de elétrons entre organelas ou reações de auto-oxidação do oxigênio molecular em que o radical superóxido pode ser o iniciador ou propagador das cadeias reativas radicalares. Como agente redutor, é capaz de reduzir o ferro iônico e seus complexos proteicos, podendo causar danos aos aminoácidos ou então causar perda da função proteica. Apesar disso, a sua maior toxicidade está na capacidade de facilitar a geração de radical hidroxila ou produzir radicais mais reativos que ele próprio (Barreiros e David, 2006).

Oxigênio singlete

Gerado por reações fotossensíveis em que moléculas absorvem luz e a energia excedente é transferida a uma molécula de oxigênio, este, em estado excitado trata-se de espécie reativa denominada oxigênio singlete que possui a capacidade de modificar o DNA. Para o singlete não há restrição quanto à transferência de elétrons, sendo assim altamente reativo (Uenojo et al., 2017).

Um exemplo típico trata-se da foto oxidação (processo de fotossíntese) irreversível e envolve diretamente os pigmentos receptores de luz, os quais, ao absorverem muita luz, ficam muito tempo excitados e interagem com o O_2 produzem radicais livres, como superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), e podem destruir pigmentos (Streit et al., 2005).

Nome	Fórmula	Comentários/Exemplos
Átomo de hidrogênio	H [•]	Radical livre mais simples.
Triclorometil	CCl ₃ [•]	Radical centrado no carbono (o elétron desemparelhado está no C). Formado durante o metabolismo do tetracloreto de carbono. Radicais de carbono reagem com o O ₂ e formam radical peroxil.
Superóxido	O ₂ [•]	Radical centrado no oxigênio.
Hidroxila	•OH	Altamente reativo, ataca todas as biomoléculas.
Tiil/Pertiil	RS [•] / RSS [•]	Radical centrado em enxofre.
Peroxil/ Alcoxil	RO ₂ [•] / RO [•]	Centrado em O ₂ , formado na quebra de peróxidos.
Radicais centrados em nitrogênio	C ₆ H ₃ N=N [•]	Formado nos eritrócitos pela oxidação da fenilhirazina (composto que provoca a lise das mesmas e hemorragias).
Óxidos de nitrogênio	NO [•] / NO ₂ [•]	Óxido nítrico é formado <i>in vivo</i> a partir do aminoácido L-arginina; dióxido de nitrogênio é formado pela reação do NO [•] com O ₂ ambos ocorrem no ar poluído e na fumaça de cigarros.
Metais de transição	Fe, Cu, e outros	Mudam o número de oxidação e são poderosos catalisadores de reações de radicais livres.

Quadro 1.2: Radicais livres mais comuns.

Fonte: Adaptado de <https://www.ufrgs.br/leo/eosb/quimica.htm>

QUANTO AOS MECANISMOS

Para a proteção dos organismos contra oxidações dois mecanismos podem ocorrer: químico e enzimático.

Mecanismo químico

Moléculas com propriedades antioxidantes (Quadro 1.3) devem fazer parte da dieta: Vitamina E, Vitamina C, carotenoides, flavonoides, selênio, na tentativa de diminuir a ação tóxica das EROs produzidas de forma intra e extracelular (Sousa et al., 2007).

Vitamina C (ácido ascórbico):	A vitamina C possui intensa atividade antioxidante contra radicais livres gerados em meio hidrofílico. Elimina os radicais livres do plasma, citosol e outros compartimentos aquosos. Trata-se do mais potente e menos tóxico dos antioxidantes naturais que atuam sobre radicais livres (hidroxila, peróxido) na fase aquosa e combate eficientemente espécies reativas de nitrogênio, impedindo a nitrosação de moléculas (amônia convertida em nitrito). Pode atuar como pró-oxidante na presença de metais de transição como ferro e cobre (Sucupira et al., 2012).
Vitamina E (tocoferóis e outros antioxidantes hidrofóbicos)	Atua fundamentalmente nas membranas e nas bicamadas lipídicas. Doação de hidrogênios fenólicos aos radicais l

	livres lipídicos, interrompendo a propagação em cadeia. O α-tocoferal é o composto que apresenta maior poder antioxidante (Sousa et al., 2007).
Carotenos e xantofilas	Ainda que muito investigados em relação aos aspectos da pigmentação de alimentos (amarelo ao vermelho). Pessoas que os consomem, apresentam um menor risco de adquirirem certos tipos de câncer, doenças cardiovasculares, degeneração macular e cataratas. Carotenoides atuam como agentes quelantes do oxigênio singlete, assim o potencial antioxidante promove a inibição de doenças pela ação dos radicais livres sendo reguladores de resposta do sistema imune (Uenojo et al., 2007). Possuem caráter lipofílico, atuando como antioxidante sobre as lipoproteínas LDL e HDL (Sucupira et al., 2012).
Flavonoides	Os polifenóis são os mais investigados. Encontrados em alimentos vegetais e incluem um grande número de moléculas diferentes que pode resultar em diversas atividades biológicas são potentes antioxidantes capazes de atuar como aceptores de radicais livres ou de íons metálicos (Oliveira et al., 2006). Dentre eles estão: antocianinas, flavonas, isoflavonas, flavonóis, catequinas, flavanonas e as proantocianidinas (Sucupira et al., 2012).
Compostos fenólicos	Categoria de substâncias antioxidantes de ocorrência natural, caracterizados também por inibirem a peroxidação lipídica e a lipoxigenase <i>in vitro</i> . Possui propriedades redutoras e as características na estrutura química possibilitam a neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (Sousa et al., 2007). Trata-se do maior grupo de fitoquímicos importantes na alimentação humana.

Quadro 1.3: Algumas características de moléculas com propriedades antioxidantes.

Fonte: Autores, 2022.

Mecanismo enzimático

Após a exposição dos organismos às EROs, o sistema de defesa inicia a produção de enzimas antioxidantes como as superóxido dismutases (SOD), peroxirredoxinas (Prx), catalase (CAT) e glutationa (GSH), glutationa peroxidases (GPr), glutationa redutase (GR) em qualquer meio seja aquoso ou lipídico para decompor oxigênio singlete, peróxido de hidrogênio e lipoperóxidos agir também como varredoras de radicais (Barbosa et al., 2010; Ferreira e Matsubara, 1997).

A figura 1.4, a seguir, resume as classificações dos antioxidantes:

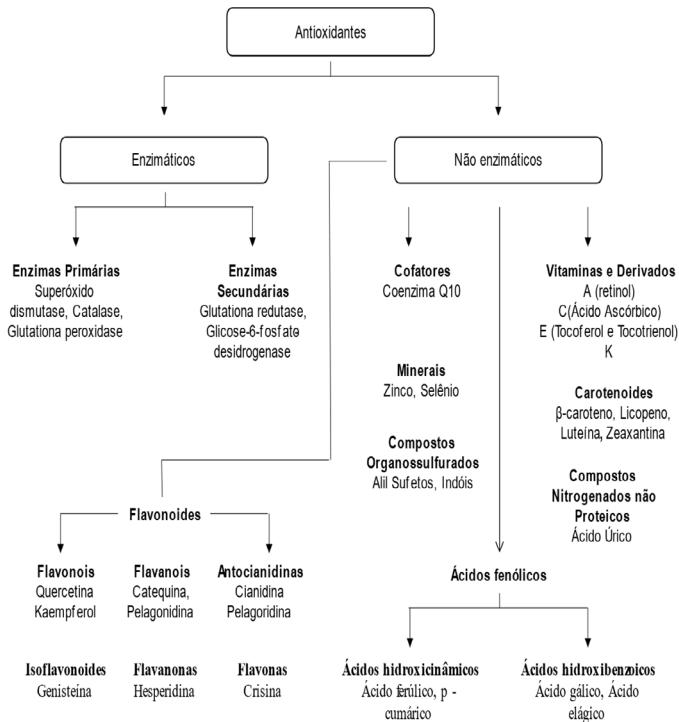


Figura 1.4: Classificação dos antioxidantes.

Fonte: Adaptado de: Morrahama e Youssef, 2014.

Estresse Oxidativo

Quando a ação de compostos antioxidantes é superada pela produção de radicais livres, os mecanismos tornam-se insuficientes tem-se o Estresse Oxidativo (Barbosa et al., 2010).

Sob as condições de estresse oxidativo existirá falta de equilíbrio dinâmico entre a produção de oxidantes e a concentração de defesas antioxidantes o que poderá resultar condições patológicas e possível morte celular. Dentre os males deste desequilíbrio entre formação e remoção de EROs estão o câncer, isquemia, diabetes, mal de Alzheimer, doenças cardiovasculares e desordem neurológica (Vasconcelos et al., 2014).

A atividade antioxidante e a medida da capacidade antioxidante

As várias definições propostas para a atividade antioxidante tem geralmente focado na capacidade de um composto ser doador de hidrogênio ou doador de elétrons (Macdonald-Wicks et al., 2006). Sendo assim, os ensaios relativos à medida da capacidade antioxidante referem-se às reações de transferência de hidrogênio ou elétron único. Assim, tem-se a eliminação de radicais ou a diminuição dos mesmos (Sucupira et al., 2012).

Existem muitos métodos de análise da atividade antioxidante (AA), com fundamentos, mecanismos de ação, maneiras de expressar resultados e aplicações muito diferentes. A escolha do mais apropriado para a medida da AA de alimentos e produtos naturais deve levar em consideração aspectos como:

- simplicidade,
- aceitação,
- validade,
- padronização.

Aspectos tais, que observados para cada tipo amostra, aconselha-se também que os dados obtidos a partir dos ensaios sejam comparados com antioxidantes sintéticos de destaque na literatura, preferencialmente aqueles que mantém informações bem expressivas. Assim, torna-se possível gerar um perfil antioxidante (Sucupira et al., 2012).

As metodologias antioxidantes são na maioria monitoradas por meio de um espectrofômetro UV visível, e fundamentalmente apresentam o princípio em que uma amostra seja capaz de eliminar ou neutralizar um radical sintético que é gerado determinando por meio de cálculos a capacidade antioxidante (Oliveira, 2015).

Mecanismos e métodos

Os ensaios *in vitro* baseiam-se em métodos biológicos ou químicos e servem para avaliar a eficiência dos antioxidantes em um modelo de laboratório. Métodos biológicos avaliam o desempenho antioxidante a partir de reações com enzimas ou leveduras. Já para os métodos químicos a atividade antioxidante é testada frente a um radical ou íon metálico específico com a observância de:

- transferências de elétrons (TE) ou
- transferência de um átomo de hidrogênio (TAH)

Dentre esses estão as reações de oxirredução entre o oxidante e o antioxidante como o DPPH (2, 2-difenil-1-picril-hidrazina), ABTS (2,2' – azino-bis(3-etylbenzotiazolina-6-sulfônico), FRAP (Ferric Reducing Ability Power) e ORAC- Oxygen Radical Absorbance Capacity (Sucupira et al., 2012).

REFERÊNCIAS

- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**. [S. I.]: FapUNIFESP (SciELO), 2010. DOI 10.1590/s0100-40422010001000033.
- ANDRADE, E. R., MELO-STERZA, F. A., SENEDA, M., ALFIERI, A. A. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, 2010.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. de C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. P.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**. [S. I.]: FapUNIFESP (SciELO), 2010. DOI 10.1590/s1415-52732010000400013.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**. [S. I.]: FapUNIFESP (SciELO), 2006. DOI 10.1590/s0100-40422006000100021.
- BOROSKI, M.; VISENTAINER, J. v.; COTTICA, S. M.; MORAIS, D. R. **Antioxidantes: princípios e métodos analíticos**, 1^a ed. Curitiba, Editora Appris, 141 p., 2015.
- DUDONNÉ, S.; VITRAC, X.; COUTIÈRE, P.; WOILLEZ, M.; MÉRILLON, J.-M. Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. [S. I.]: American Chemical Society (ACS), 2009. DOI 10.1021/jf803011r.
- FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**. [S. I.]: Elsevier BV, 1997. DOI 10.1590/s0104-42301997000100014.
- GIADA, M. de L. R. UMA ABORDAGEM SOBRE A CAPACIDADE ANTIOXIDANTE IN VITRO DE ALIMENTOS VEGETAIS E BEBIDAS. DEMETRA: **Alimentação, Nutrição & Saúde**. [S. I.]: Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2014. DOI 10.12957/demetra.2014.8256..
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**. [S. I.]: FapUNIFESP (SciELO), 2007. DOI 10.1590/s0100-40422007000200026.
- GOUVEIA, S. S. e LIMA9999*, A. A. Relação entre espécies reativas de oxigênio e a promoção carcinogênica. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**. 2017.
- MOHARRAM, H. A., YOUSSEF, M. M. **Methods for Determining the Antioxidant Activity: A Review**. Alexandria Journal of Food Science and Technology, 2014.
- MORAES, F. P, COLLA, L. M. ALIMENTOS FUNCIONAIS E NUTRACÊUTICOS: DEFINIÇÕES, LEGISLAÇÃO E BENEFÍCIOS À SAÚDE. **Revista Eletrônica de Farmácia**. [S. I.]: Universidade Federal de Goias, 23 out. 2007. DOI 10.5216/ref.v3i2.2082..
- MORAIS, S. M. de; CATUNDA JÚNIOR, F. E. A.; SILVA, A. R. A. da; MARTINS NETO, J. S.; RONDINA, D.; CARDOSO, J. H. L. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de Croton do nordeste do Brasil. **Química Nova**. [S. I.]: FapUNIFESP (SciELO), out. 2006. DOI 10.1590/s0100-40422006000500004.

OLIVEIRA V. P., ESPESCHIT, A. C. R., PELUZIO, M. C. G. **Flavonoides e doenças cardiovasculares: ação antioxidante**. Rev Med Minas Gerais, 2006.

OLIVEIRA, A. C. de; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**. [S. I.]: FapUNIFESP (SciELO), 2009. DOI 10.1590/s0100-40422009000300013.

OLIVEIRA, D. D. S.; AQUINO, P. P.; RIBEIRO, S. M. R.; PROENÇA, R. P. da C.; PINHEIRO-SANT'ANA, H. M. Vitamina C, carotenoides, fenólicos totais e atividade antioxidante de goiaba, manga e mamão procedentes da Ceasa do Estado de Minas Gerais. **Acta Scientiarum. Health Science**. [S. I.]: Universidade Estadual de Maringá, 2011. DOI 10.4025/actascihealthsci.v33i1.8052.

OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH•: estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. [S. I.]: FapUNIFESP (SciELO), 2015. DOI 10.1590/1983-084x/12_165.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**. [S. I.]: FapUNIFESP (SciELO), 2006. DOI 10.1590/s0100-40422006000400023.

SOUZA, C. M. de M.; SILVA, H. R. e; VIEIRA-JR., G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S. da; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. de M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**. [S. I.]: FapUNIFESP (SciELO), 2007. DOI 10.1590/s0100-40422007000200021

STREIT, N. M.; CANTERLE, L. P.; CANTO, M. W. do; HECKTHEUER, L. H. H. As clorofilas. **Ciência Rural**. [S. I.]: FapUNIFESP (SciELO), 2005. DOI 10.1590/s0103-84782005000300043.

SUCUPIRA, N. R. et al. Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. **Journal of Health Sciences**, 2012.

UENOJO, M.; MARÓSTICA JUNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. Carotenóides: propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. **Química Nova**. [S. I.]: FapUNIFESP (SciELO), 2007. DOI 10.1590/s0100-40422007000300022

VASCONCELOS, T. B., CARDOSO, A. R. N. R., JOSINO, J. B., MACENA, R. H. M. M., BASTOS, V. P. D. Radicais Livres e Antioxidantes: Proteção ou Perigo?. **Journal of Health Sciences**, 2014.

MACDONALD-WICKS, L. K.; WOOD, L. G.; GARG, M. L. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. [S. I.]: Wiley, 2006. DOI 10.1002/jsfa.2603.

YASHIN, A.; YASHIN, Y.; XIA, X.; NEMZER, B. Antioxidant Activity of Spices and Their Impact on Human Health: A Review. **Antioxidants**. [S. I.]: MDPI AG, 2017. DOI 10.3390/antiox6030070.

PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS DAS AMOSTRAS

Trata-se de etapa fundamental na análise de antioxidantes. Para sólidos é comum triturar para melhorar o contato com o solvente. Já para amostras líquidas podem ser submetidas à liofilização, extração ou pode ocorrer análise direta sem pré-tratamentos (Boroski et al., 2015).

Note que alguns fatores são relevantes na determinação da utilização do método. Observe as condições iniciais do material a ser examinado: material triturado permite maior superfície de contato com solvente e reagente, a qualidade do solvente relativa à polaridade, pode ser melhor em alguns casos a mistura de solventes como etanol e água, acetona e água ou metanol (substância tóxica) e água, solução com alguma turbidez deve ser centrifugada antes da reação (Perez-Jimenez e Saura-Calixto, 2006).

Em se tratando de matrizes alimentares, a riqueza de compostos como carboidratos proteínas e metais pode atuar juntamente com as espécies antioxidantes, o que possibilita a geração de falsos resultados positivos (Boroski et al., 2015).

Observados diversos fatores tais como: temperatura, pH, tempo de extração, agitação/rupturas, efeito luminoso e tipo de solvente, pode-se inferir que a avaliação da capacidade antioxidant está sob a forte influência do método de extração para a obtenção do rendimento e a composição dos antioxidantes (Silva et al., 2018).

Procedimentos prévios podem ser, segundo Boroski et al., 2015:

- Hidrodestilação: amostra em contato com água e submetida a aquecimento com temperaturas inferiores a 100°C, utilização do aparelho de Clevenger. Esta técnica permite que compostos com capacidade antioxidant sejam concentrados.
- Fracionamento: separa substâncias com diferentes polaridades, para isto exige-se um conhecimento prévio de quais substâncias ou possíveis classes de substâncias presentes. Faz-se a trituração e adiciona-se solvente após procedimentos de filtração à vácuo, evaporação, ressolubilização inicia-se o fracionamento com solventes de diferentes polaridades.
- Hidrólise: para extração de compostos fenólicos a partir do uso de solventes polares, para evitar resultados subestimados em sementes ou compostos que se encontrem na forma glicosada, é recomendado procedimento adicional usando ácido sulfúrico, e extração lipídica com hexano e éter dietílico em sistema Soxhlet.

Alguns procedimentos para extrações descritos na literatura foram selecionados:

Amostra: *extrato vegetal (folhas, caules, raízes)*

PROTOCOLO DESCrito POR DUDONNÉ ET AL., 2009:

Utilize 125g de material vegetal em água destilada a 50 °C sob agitação, em seguida faça a filtração para remoção da água, use um rotaevaporador a 50 °C para obtenção do pó. Este pó deve permanecer protegido da luz e servirá nas análises de atividade antioxidante. (Não aborda a quantidade de água usada)

DESCRIÇÃO SEGUNDO OLIVEIRA ET AL., 2016:

Seque as frondes devem em estufa (50 °C) por um período aproximado de 36 horas, triture em moinho de facas e realize a tamisação para obter diversas granulometrias.

Utilize para o preparo dos extratos um pó fino abaixo de 500 μm , sendo 10 g de matéria vegetal para 150,00 mL do solvente extrator.

Caso esta extração esteja associada ao procedimento Soxhlet apresentará melhores resultados, tal procedimento deve totalizar cerca de 8 horas com a utilização de extrato etanólico ou extrato hidroalcoólico (70%) – responsável pelo melhor rendimento.

PROCEDIMENTO DE ACORDO COM RAJURKAR E HANDE, 2011:

Prepare os extratos vegetais em metanol, adicione 100 mL de metanol a 1 g de pó vegetal. As infusões devem ser agitadas no agitador magnético à temperatura ambiente durante 5 horas.

Centrifugue o material a 6000 rpm a 4 °C durante 10 minutos e armazene sobrenadante a - 4 °C para análise posterior.

PROCEDIMENTO DE ACORDO COM SOUSA ET AL., 2007:

Seque o material vegetal à temperatura ambiente e faça uma moagem em moinho de facas. Prepare os extratos por maceração com etanol à temperatura ambiente por quatro vezes consecutivas com duração média de 4 dias para cada extração. Em seguida, leve o material para ser concentrado em rotaevaporador e por fim faça uma liofilização do mesmo.

Amostra: extrato de frutas

PROCEDIMENTO ADAPTADO DE RUFINO ET AL., (2007):

Utilize entre 1 g e 25 g de amostra, de acordo com a fruta.

Pese a amostra em béquer de 100 mL, adicione 40 mL de metanol 50%, homogeneíze e deixe em repouso por 60 minutos à temperatura ambiente.

Centrifugue a amostra a 15.000 rpm, durante 15 minutos, transfira o sobrenadante

para um balão volumétrico de 100 mL.

A partir do resíduo da primeira extração, adicione 40 mL de acetona 70%, homogeneíze e deixe em repouso por 60 minutos, à temperatura ambiente.

Centrifugue novamente a 15.000 rpm durante 15 minutos, transfira o sobrenadante para o balão volumétrico contendo o primeiro sobrenadante e complete o volume para 100 mL com água destilada.

PROCEDIMENTO DE ACORDO COM ROESLER ET AL., 2007:

Preparação do extrato aquoso

Separe as frutas em sementes, polpas e cascas. Realize a homogeneização por aproximadamente 20 minutos com água destilada na proporção de 1:3 (m.m⁻¹) fruta: água.

Filtre o material em gazes e faça uma nova extração com água em condições idênticas.

Faça a liofilização do material retido no filtro e do filtrado a -18 °C e 13,3 Pa.

Armazene esses extratos em frascos âmbar a -18 °C até sua utilização.

Preparação do extrato etanólico

Separe as frutas em sementes, polpas e cascas e utilize o material resultante na extração com solução aquosa de etanol (5:95, v.v⁻¹, água: etanol) na proporção de 1:3 (m.m⁻¹) fruta: solução de etanol.

Filtre o material em gazes e faça uma nova extração do resíduo nas mesmas condições.

Coloque o resíduo e o extrato etanólico em um rotaevaporador a 40 °C e realize a liofilização para ambos a -18 °C a 13,3 Pa.

Armazene em frascos âmbar a -18 °C até sua utilização.

Amostra: *leite e derivados*

PROCEDIMENTO DE ACORDO COM BOROSKY ET AL., 2012:

- Precipitação das proteínas: Utilize o vortex para efetivar a mistura de 0,50 mL de leite com 2,0 mL de metanol a -20 °C (grau HPLC) durante 15 segundos. Aguarde 24 horas nesta mesma temperatura, filtre o sobrenadante que será analisado.

Se a turbidez permanecer após este tempo, continue mantendo a mistura à -20 °C

e centrifugue até a completa limpidez.

Preparo de amostras de derivados do leite, segundo Zuleta et al., 2009:

Para a análise da capacidade antioxidante de iogurtes e sorvetes, faz-se necessária a precipitação das proteínas do leite, isto pode ocorrer usando a proporção de 1:1 (v/v) de leite e 20% de ácido tricloroacético em água.

Agite a amostra por 30 segundos. Incube-as em banho maria a 42 °C durante 10 minutos e posteriormente centrifugue por 15 minutos.

Realize as análises usando o sobrenadante.

Atenção: Para o teste FRAP o pH deve ser ajustado entre 4 e 10.

Para o teste ORAC não há necessidade desta preparação.

Amostra: *mel*

PROCEDIMENTO DE ACORDO COM SOUSA ET AL., 2018:

Adicione 4 mL de mel em 8 mL de água do milli-Q (água desmineralizada). Em seguida homogeneíze e faça uma extração por 60 minutos em ultrassom a temperatura ambiente.

PREPARO CONFORME MEDA ET AL., 2005:

Dilua 5 g de mel em água destilada até completar o balão volumétrico de 50 mL, em seguida realize uma filtração em um filtro de papel Whatman nº 3.

Amostra: *própolis*

PROCEDIMENTO SEGUNDO BURIOL ET AL., 2009:

Use etanol 95% (v/v) como solvente extrator, a concentração de própolis e o teor alcoólico podem variar.

Macere a amostra sob agitação magnética. O procedimento deve ocorrer sob proteção da luz e a presença do solvente durante 24 horas.

Filtre à vácuo, o solvente deve ser evaporado sob pressão reduzida ou com a utilização do equipamento *spray dryer* (um método de produção de pó seco a partir de líquido ou suspensão por secagem rápida com gás quente).

Amostra: *cerveja*

PROCEDIMENTO SEGUNDO FREITAS ET AL., 2006:

Separe uma alíquota de 50 mL da amostra de cerveja. Agite mecanicamente para a desgaseificação e utilize nas análises imediatamente.

REFERÊNCIAS

- BOROSKI, M.; GIROUX, H. J.; SABIK, H.; PETIT, H. V.; VISENTAINER, J. V.; MATUMOTO-PINTRO, P. T.; BRITTEN, M. Use of oregano extract and oregano essential oil as antioxidants in functional dairy beverage formulations. **LWT - Food Science and Technology**. [S. I.]: Elsevier BV, 2012. DOI 10.1016/j.lwt.2011.12.018.
- BOROSKI, M., VISENTAINER, J. V., COTTICA, S. M., MORAIS, D. R. **Antioxidantes: princípios e métodos analíticos**, 1^a ed. Curitiba, Editora Appris, 141 p., 2015.
- BURIOL, L.; FINGER, D.; SCHMIDT, E. M.; SANTOS, J. M. T. dos; ROSA, M. R. da; QUINÁIA, S. P.; TORRES, Y. R.; DALLA SANTA, H. S.; PESSOA, C.; MORAES, M. O. de; COSTA-LOTUFO, L. V.; FERREIRA, P. M. P.; SAWAYA, A. C. H. F.; EBERLIN, M. N. Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: uma alternativa ao extrato etanólico. **Química Nova**. [S. I.]: FapUNIFESP (SciELO), 2009. DOI 10.1590/s0100-40422009000200006.
- DUDONNÉ, S.; VITRAC, X.; COUTIÈRE, P.; WOILLEZ, M.; MÉRILLON, J.-M. Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. [S. I.]: American Chemical Society (ACS), 2009. DOI 10.1021/jf803011r.
- FREITAS, G. L., KUSKOSKI, E. M., GONZAGA, L., FETT, R. Avaliação da atividade antioxidante de diferentes cervejas aplicando os métodos ABTS e DPPH. **Alim. Nutr.**, 2006.
- MEDA, A.; LAMIEN, C. E.; ROMITO, M.; MILLOGO, J.; NACOULMA, O. G. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**. [S. I.]: Elsevier BV, 2005. DOI 10.1016/j.foodchem.2004.10.006.
- OLIVEIRA, V. B.; ZUCHETTO, M.; OLIVEIRA, C. F.; PAULA, C. S.; DUARTE, A. F. S.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por clae-dad de dicksonia sellowiana (presl.). Hook, dicksoniaceae. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. [S. I.]: FapUNIFESP (SciELO), 2016. DOI 10.1590/1983-084x/15_106.
- PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International**. [S. I.]: Elsevier BV, 2006. DOI 10.1016/j.foodres.2006.02.003.
- RAJURKAR, N. S. e HANDE, S. M. Estimation of Phytochemical Content and Antioxidant Activity of Some Selected Traditional Indian Medicinal Plants. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2011.
- ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S.; PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. [S. I.]: FapUNIFESP (SciELO), 2007. DOI 10.1590/s0101-20612007000100010.
- RUFINO, M. S. M., ALVES, R.E., BRITO, E.S., MORAIS, S.M., SAMPAIO, C. G., JIMENEZ, J.P., CALIXTO, F. D. S. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH**. Embrapa. 127. 2007.

SILVA, L. A. da; RAPOSO, J. D. A.; CAMPOS, L. P. G.; CONCEIÇÃO, E. C. da; OLIVEIRA, R. B. de; MOURÃO, R. H. V. Atividade antioxidante do óleo essencial de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. por diferentes métodos de análises antioxidantes (ABTS, DPPH, FRAP, β -caroteno/ácido linoleico). **Revista Fitos.** [S. I.]: Fiocruz - Instituto de Tecnologia em Farmacos, 2018. DOI 10.5935/2446-4775.20180011.

SOUSA, A. V. B. de; RODRIGUES JÚNIOR, F. das C.; SANTOS, G. M. dos; MOREIRA-ARAÚJO, R. S. do R.; PORTO, R. G. C. L. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA CAJUÍNA E DO MEL PRODUZIDOS NO ESTADO DO PIAUÍ - BRASIL. **Interfaces Científicas - Saúde e Ambiente.** [S. I.]: Universidade Tiradentes, 2018. DOI 10.17564/2316-3798.2018v6n2p21-32.

SOUSA, C. M. de M.; SILVA, H. R. e; VIEIRA-JR., G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S. da; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. de M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova.** [S. I.]: FapUNIFESP (SciELO), 2007. DOI 10.1590/s0100-40422007000200021..

ZULUETA, A.; ESTEVE, M. J.; FRÍGOLA, A. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. **Food Chemistry.** [S. I.]: Elsevier BV, 2009. DOI 10.1016/j.foodchem.2008.09.033.

CURVA PADRÃO

Ainda que dois pontos definam uma reta, tem-se a necessidade de realizar medições em no mínimo cinco pontos, soluções contendo o padrão em diferentes concentrações. A leitura das absorbâncias deve ser feita em triplicata, pois quanto maior for a linearidade melhor a capacidade do método em fornecer resultado proporcional à concentração da substância analisada, dentro da faixa de aplicação (Ribani et al., 2004).

Quando os pontos obtidos têm pouca dispersão o coeficiente de determinação R^2 é igual ou muito próximo a 1, e significa melhor ajuste do modelo linear que deve ser pelo menos 0,99. Sendo assim, há uma menor incerteza dos coeficientes de regressão estimados (Causey et al., 1990).

Na prática, a solução padrão pode ser preparada inicialmente de forma mais concentrada, e será considerada solução estoque, as demais preparadas a partir da diluição desta serão consideradas soluções de trabalho.

Ribani et al., 2004 fazem duas abordagens neste sentido:

- Uma única solução estoque e diluições sucessivas das soluções de trabalho preparadas
- Através do preparo de todas as soluções diluídas, partindo sempre da solução estoque.

As mesmas circunstâncias de medição tais como: procedimentos, materiais, analista, condições de temperatura, local e curtos intervalos de tempo são consideradas muito importantes pois compõem os aspectos relativos à repetitividade, o que promove a concordância entre os resultados (Ribani et al., 2004).

As variações das concentrações iniciais e finais de algumas das principais substâncias utilizadas em leituras espectrofotométricas para a determinação de atividade antioxidante relativa à redução do radical antioxidante DPPH estão descritas na tabela 3.1 a seguir:

Substância padrão	Faixa de concentração ($\mu\text{g. mL}^{-1}$)
Ácido ascórbico	0 – 20
Ácido gálico	0 – 2
BHA	0 – 12
BH	0 – 45
Quercetina	0 – 8
Rutina	0 – 100
Trolox	0 – 10

Tabela 3.1 Listagem de padrões com conhecida atividade antioxidante do radical DPPH e faixas de concentrações testadas para a curva padrão. Adaptada de: Pires et al., 2017.

Construa uma curva de regressão linear que relate a concentração do padrão ($\mu\text{g. mL}^{-1}$) e os valores de absorbância sugeridos, ao seguir as indicações do método realize a leitura da absorbância em 517nm.

MÉTODO PARA A OBTENÇÃO DE CURVA PADRÃO DE ÁCIDO GÁLICO (SACRAMENTO ET AL., 2020).

Faça uma solução 40 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ de ácido gálico em etanol. Para isso, utilize a massa de 0,004g de ácido gálico, solubilize em etanol e complete o volume em balão volumétrico de 100 mL. Homogeneíze.

Concentrações sugeridas: 0,4; 0,8; 1,2; 1,6 e 2,0 $\mu\text{g. mL}^{-1}$. Faça soluções completando com álcool até o volume total igual a 1000 μL . Homogeneíze.

Para isso, utilize a equação: $C_{\text{inicial}} \times V_{\text{inicial}} = C_{\text{final}} \times V_{\text{final}}$

Onde: C = concentração e V = volume

Solução 0,4 $\mu\text{g. mL}^{-1}$

$$C_{\text{inicial}} \times V_{\text{inicial}} = C_{\text{final}} \times V_{\text{final}}$$

$$40 \mu\text{g.mL}^{-1} \times V_{\text{inicial}} = 0,4 \mu\text{g.mL}^{-1} \times 1000 \mu\text{L}$$

Acompanhe os resultados por meio da tabela 3.2:

$C(\mu\text{g.mL}^{-1})$ Ácido gálico	$V (\mu\text{L})$ solução de ácido gálico	$V(\mu\text{L})$ Etanol para completar a solução
0,4	10	990
0,8	20	980
1,2	30	970
1,6	40	960
2,0	50	950

Tabela 3.2: Valores de concentração e volumes a partir da solução padrão de ácido gálico.

A solução que representa concentração zero de ácido gálico é considerada como controle negativo. Solução controle deve possuir 1000 μ L de etanol e 1000 μ L de DPPH (60 μ g. mL $^{-1}$).

Todas as soluções devem ser mantidas em ambiente protegido da luz durante todo o processo reativo, aguarde 30 minutos (metodologia adotada).

Após esse tempo realize a leitura espectrofotométrica da solução controle e das soluções padrões no comprimento de onda a 517nm.

Exemplo de uma curva padrão de ácido gálico (Figura 3.3):

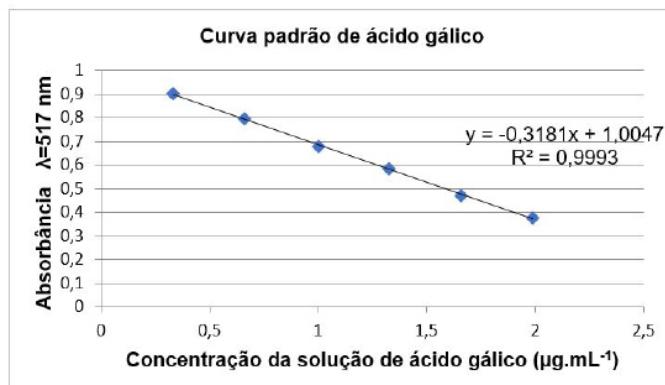


Figura 3.3: Curva padrão de ácido gálico.

Fonte: Sacramento et al., 2020

Observe possíveis resultados e a interpretação:

Leitura a 517 nm da solução controle: 1,074

Valor da leitura da solução controle/2 = 1,074/ 2 = 0,537

A concentração de ácido gálico correspondente ao utilizar a equação da reta é:

$$Y = -0,3181 x + 1,0047$$

$$0,537 = -0,3181 x + 1,0047$$

Assim, tem-se que $x = 1,47 \mu$ g. mL $^{-1}$

Esse valor corresponde a concentração de ácido gálico capaz de promover a redução de 50% da concentração inicial de DPPH, ou seja: EC50 = 1,47 μ g. mL $^{-1}$

MÉTODO PARA A OBTENÇÃO DE CURVA PADRÃO DE TROLOX (ÁCIDO 6-HIDROXI-2,5,7,8- TETRAMETILCROMANO-2- CARBOXÍLICO) (BOROSKY ET AL., 2015)

Curva-Padrão de Trolox

Prepare soluções a partir da solução padrão de Trolox (2000 μ mol. L $^{-1}$) ou seja 25

mg de Trolox dissolvido em etanol, complete o volume para 50 mL em balão volumétrico, homogeneíze e transfira para frasco âmbar.

Faça soluções de trabalho com as concentrações: (100, 500, 1000, 1500 e 2000) $\mu\text{mol. L}^{-1}$ preparadas em balões de 10 mL.

Cálculos:

→ Dica: $C_{\text{inicial}} \times V_{\text{inicial}} = C_{\text{final}} \times V_{\text{final}}$

Onde: C (concentração) e V (volume)

Exemplo: Solução $C_{\text{final}} = 100 \mu\text{M}$

$C_{\text{inicial}} = 2 \text{ mM} = 2000 \mu\text{mol. L}^{-1}$

$V_{\text{inicial}} = ?$ (quanto usar da solução padrão)

$V_{\text{final}} = 10 \text{ mL}$

$C_{\text{inicial}} \times V_{\text{inicial}} = C_{\text{final}} \times V_{\text{final}}$

$2000 \mu\text{mol. L}^{-1} \times V_{\text{inicial}} = 100 \mu\text{mol. L}^{-1} \times 10 \text{ mL}$

$V_{\text{inicial}} = 0,5 \text{ mL}$ da solução padrão de Trolox

Assim, tem-se:

Volume de álcool etílico para complementar 10 mL no balão volumétrico será:

$V_{\text{álcool etílico}} = 10 - 0,5 = 9,5 \text{ mL}$

Desta forma, após calculados os valores é possível tabelá-los, tabela 3.4:

Volume da solução padrão Trolox (mL)	Volume de álcool etílico (mL) para completar o balão volumétrico	Concentração da solução de Trolox ($\mu\text{mol. L}^{-1}$)
0,5	9,5	100
2,5	7,5	500
5,0	5,0	1000
7,5	2,5	1500
10,0	0	2000

Tabela 3.4: Soluções de trabalho sugeridas para o padrão Trolox.

DETERMINAÇÃO DA CURVA PADRÃO (BOROSKI ET AL., 2015).

Realize a transferência de alíquota de 30 μL de cada solução de Trolox calculada anteriormente, para tubos de ensaio, em ambiente escuro, misture com 3,0 mL da solução do radical ABTS (a ser descrito). Agite para homogeneizar.

Após 6 minutos, realize a leitura espectrofotométrica em comprimento de onda igual a 734 nm.

→ Lembre-se: o branco para calibração do aparelho deve conter apenas álcool etílico.

Verifique os cálculos a partir de um exemplo de curva padrão de Trolox (Figura 3.5).

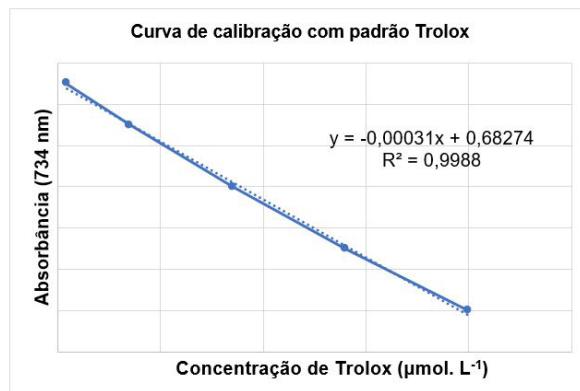


Figura 3.5: Exemplo de curva de calibração com o padrão Trolox com leitura em $\lambda = 734$ nm para análise de ABTS

Adaptado de: Boroski et al., 2015.

Para o gráfico considere no eixo X os valores das concentrações de Trolox ($\mu\text{mol. L}^{-1}$) versus as absorbâncias no eixo Y. Calcule a equação da reta, a partir dela, calcule a absorbância referente a 1.000 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ de Trolox da seguinte forma:

$$Y = -ax + b$$
$$x = 1000 \mu\text{mol de Trolox}$$

$Y = \text{absorbância correspondente a } 1000 \mu\text{mol. L}^{-1} \text{ de Trolox}$

A partir da equação da reta: $y = -0,00030 x + 0,68274$ substitua o x

$$Y = -0,00030 \cdot 1000 + 0,68274$$
$$Y = 0,38274$$

Neste caso, a absorbância correspondente a 1000 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ de Trolox calculado foi: 0,38274.

Assim, a partir das absorbâncias obtidas das soluções de diferentes concentrações dos extratos, faça o gráfico com a absorbância no eixo Y e as diferentes concentrações da solução do extrato no eixo X. Em seguida, determine a equação da reta através de regressão linear.

Para calcular a capacidade antioxidante de uma amostra em equivalente Trolox basta substituir o valor da absorbância (0,38274) que corresponde a concentração de 1000 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ do padrão Trolox.

Supondo que o gráfico de concentração da amostra X Absorbância, corresponda à

equação:

$$Y = 0,51506 - 0,00031x$$

O valor obtido para o termo x corresponde à concentração de extrato (mg. L⁻¹) equivalente a 1000 μ mol. L⁻¹ de Trolox.

$$0,38274 = 0,51506 - 0,00031x$$

$$X = 426,84 \text{ mg. L}^{-1}$$

REFERÊNCIAS

BOROSKI, M., VISENTAINER, J. V., COTTICA, S. M., MORAIS, D. R. **Antioxidantes: princípios e métodos analíticos**, 1^a ed. Curitiba, Editora Appris, 141 p., 2015.

CAUSEY, A. G.; HILL, H. M.; PHILLIPS, L. J. Evaluation of criteria for the acceptance of bioanalytical data. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. [S. I.]: Elsevier BV, 1990. DOI 10.1016/0731-7085(90)80092-4.

PIRES, J., TORRES, P. B., SANTOS, D. Y. A. C., CHOW, F. Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do método de sequestro do radical livre DPPH para extratos de algas. **Instituto de Biociências**, Universidade de São Paulo, 2017.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**. [S. I.]: FapUNIFESP (SciELO), 2004. DOI 10.1590/s0100-40422004000500017.

SACRAMENTO, V. de M.; SANTOS, K. T.; ROCHA, D. F. de O.; CABRAL, E. C.; EBERLIN, M. N.; MERCADANTE-SIMÓES, M. O.; FONSECA, F. S. A. da; MELO JÚNIOR, A. F.; MENEZES, E. V.; OLIVEIRA, D. A. de; ROYO, V. de A. Chemical profile and antioxidant activity in *Diplopterys pubipetala* (Malpighiaceae). **Natural Product Research**. [S. I.]: Informa UK Limited, 2020. DOI 10.1080/14786419.2020.1855644.

DPPH - MÉTODO DE SEQUESTRO DO RADICAL LIVRE DPPH (2,2-DIFENIL-1-PICRIL-HIDRAZINA)

CARACTERÍSTICAS GERAIS

- Método desenvolvido por Blois (1958).
- Trata-se de um dos métodos mais usados, altamente sensível, preciso, rápido, simples, econômico (Oliveira, 2015);
- as modificações no método são comuns, porém uma das mais difundidas é metodologia proposta por Brand-Williams et al., 1995.
- Adaptações comuns em relação ao método: variação de solventes para dissolver o DPPH[•]; concentrações iniciais da solução de DPPH[•]; alíquotas das várias substâncias utilizadas e da solução inicial de DPPH[•]; tempos de reação com o radical DPPH[•]; absorbâncias (Mishra et al., 2012; Oliveira, 2015).

ASPECTOS QUÍMICOS

- A estrutura química do radical DPPH (DPPH[•]), difere de muitos radicais que exibem instabilidade e reatividade altas, no caso, a estrutura química deste composto se trata de um radical livre estável, pois possui três anéis aromáticos que apresentam efeito de ressonância importante para estabilizar a carga eletrônica do radical DPPH[•] (Figura 4.1a). A estabilização também é ocasionada pela presença dos três grupos nitro e em dois átomos de nitrogênio em que os elétrons se deslocam (Oliveira, 2015).
- Na presença de um doador de hidrogênio ou elétron, o DPPH sofre redução e a intensidade de absorção diminui e a solução com o radical perde cor (Figura 4.1b), variando do púrpuro ao amarelo (Sucupira et al., 2012; Silveira et al., 2018).

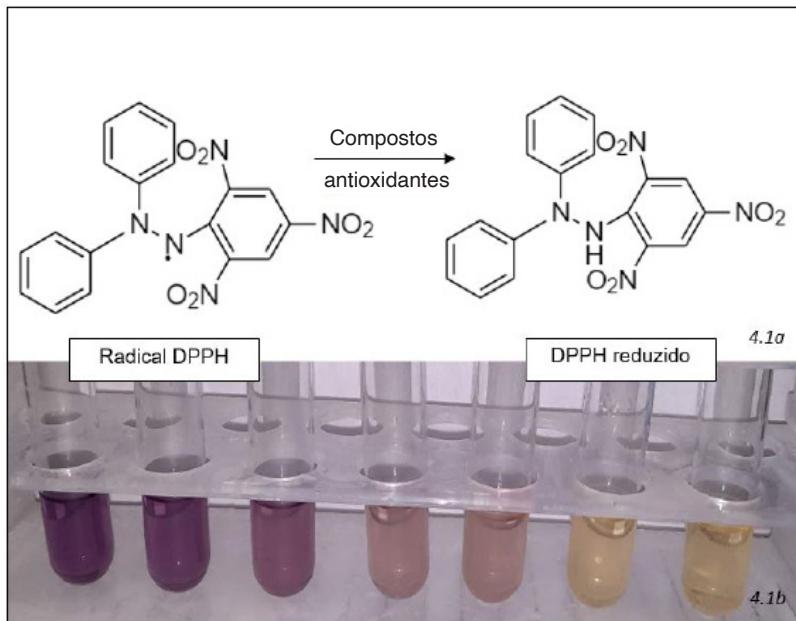


Figura: 4.1 a - Reação de redução do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil a 2,2-difenil-picrilhidrazina, através da ação de compostos antioxidantes (Adaptado de Oliveira et al., 2020). 4.1b- Alteração na coloração da reação de oxirredução da solução contendo radical DPPH e extrato de cerveja (Autores, 2022).

A diminuição da absorbância pode ser monitorada por um espectrofotômetro de UV/visível para determinar a capacidade antioxidante da substância testada, sendo que a leitura da absorbância relativa à concentração inicial de DPPH na cubeta deve ser escolhido para resultar absorbância com valores inferiores a 1,0 (Molyneux, 2004).

O índice de atividade antioxidante (IAA) pode ser expresso pela fórmula:

$$\text{IAA} = \text{Concentração final do DPPH}^\bullet (\mu\text{g. mL}^{-1}) / \text{CE50} (\mu\text{g. mL}^{-1})$$

que é utilizada visto que não há uma avaliação universal para o método DPPH[•]

(Scherer e Godoy 2009).

COMO FAZER?

- Contém modificações dos métodos originais de Brand-Williams et al., 1995 e Rufino et al. 2007.
- Materiais necessários para a realização do método de sequestro do radical DPPH estão listados no quadro 4.2.

Reagentes	Equipamentos
Etanol P.A. Água destilada DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl-hidrazila)	Agitador de tubos de ensaio Balança analítica Balões volumétricos Cronômetro digital Cubetas de vidro/ quartzo Espectrofotômetro Pipeta de alta precisão Proveta

Quadro 4.2: Materiais, equipamentos e vidrarias para a realização do método de sequestro do radical DPPH.

PREPARO DAS SOLUÇÕES

Solução de DPPH - 60 μ M

Dissolva em álcool etílico 2,4 mg de DPPH, e complete o volume para 100 mL em balão volumétrico com álcool etílico. Homogeneíze e transfira para um frasco de vidro âmbar, identificado.

Soluções das amostras

Verifique o capítulo 2 deste manual (Preparo dos extratos das amostras).

Sugestão: pese 20 mg do extrato e dissolva em 10,0 mL de etanol, assim a concentração é 2,0 mg. mL⁻¹.

Procedimento

Pipete volumes iniciais da solução do extrato (25, 50, 75, 100 e 125 μ L) em tubos de ensaio. Complete o volume com etanol até 1000 μ L. Realize em triplicata ao abrigo da luz. Adicione 1,0 mL da solução etanólica de DPPH (60 μ M).

Após 30 minutos realize a leitura da absorbância a λ = 517 nm.

Controle: deve conter 1000 μ L de etanol e 1000 μ L da solução de DPPH

Branco para calibração do espectrofotômetro: apenas etanol

As medidas de absorbâncias obtidas devem ser plotadas no eixo Y, enquanto as concentrações do extrato em mg. mL⁻¹ no eixo X. Assim como para a curva padrão obtenha a equação da reta e o R² mais próximo de 1 possível.

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Após a obtenção da equação de reta por meio da regressão linear, realiza-se o cálculo da concentração de eficiência EC_{50} .

Atenção  deve-se observar se os valores de volume de solução do extrato devem ser aumentados ou diminuídos para que o IC_{50} seja atingido.

Equação da curva do extrato

$$Y = aX - b$$

Onde: Y = absorbância inicial do controle/2

X = resultado em μM DPPH

(Conversão em gramas: 1 μM de DPPH corresponde a $394,3 \times 10^{-6}$)

Com as absorbâncias obtidas dos extratos, realize a plotagem dos dados absorbância no eixo Y e diluições no eixo X e determine a equação da reta.

Assim:

$$X = EC_{50} \text{ (mg. L}^{-1}\text{)}$$

A equação que expressa o EC_{50} em g extrato/g DPPH é:

$$\text{g extrato/g DPPH} = (EC_{50} \text{ (mg. L}^{-1}\text{)}) / 1000 \times 1/g \text{ DPPH}$$

Note: o valor inicial de EC_{50} encontrado estava em mg. L^{-1} e foi convertido a g. L^{-1} ao se dividir por 1000.

OUTRAS INFORMAÇÕES RELEVANTES

Quanto maior o consumo de DPPH^{\bullet} por uma amostra, menor será seu IC_{50} e maior a sua atividade antioxidante (Sousa et al., 2007).

A absorbância e o decaimento obtidos a partir da quantidade remanescente do radical DPPH podem variar consideravelmente com os diferentes tipos e concentrações de extratos contendo os antioxidantes, conforme dados da tabela 4.3 a seguir:

Concentração inicial da solução de DPPH-	Tempo de Reação (minutos)	Quantidade da solução de DPPH- utilizado	Tipos de solventes utilizados	Absorbância	Referência
0,1 mM	30	50 μ L	Metanol	515 nm	(Yao et al., 2012)
0,5 mM	30	2 mL	Metanol	517 nm	(Alam et al., 2012)
6×10^{-5} M	1 e 5	975 μ L	Etanol	515 nm	(Amira et al., 2012)
31,5 μ M	0 a 120	1 mL	Etanol	518 nm	(Fagali; Catalá, 2008)
0,06 mM	0 a 9	3,9 mL	Metanol	515 nm	(Rufino et al., 2007)
3,8 mM	6	20 μ L	Etanol	520 nm	(Mot; Silaghi-Dumitrescu; Sârbu, 2011)
100 mM	20	700 μ L	Metanol	515 nm	(Locatelli et al., 2009)
60 μ M	Monitorado a até o estado de equilíbrio (6 horas)	1,95 mL	Metanol	515 nm	(López-Giraldo et al., 2009)
0,4 mM/L	Monitorado no tempo de 30 minutos, 2, 6, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120 e 144 horas	0,5 mL	Etanol	517	(Liang et al., 2010)
100 mM	Monitorado ao longo de 5 h	2,9 mL	Etanol	516	(Ordoudi et al., 2006)
0,3 mM	A cada 10 minutos até 1 hora	1 mL	Etanol	540	(Liu et al., 2008)
0,1 mM	A cada 15 minutos até o estado de equilíbrio	2 mL	Metanol	517	(Lu; Yeap Foo, 2000)
100 μ M	30	2,95	Acetato de etila	520	(Prevc et al., 2013)
0.025 mM	180	20 mL	Tampão fosfato de sódio em pH 7,0	517	(Niu et al., 2012)
$1,55 \times 10^{-4}$ M	60	-	Água e etanol em uma mistura de 1/1	524	(Friaa et al., 2008)
3,8 mg/50 mL	30	0,975 mL	Acetona, hexano e metanol	515	(Fernandez-Orozco et al., 2011)
0,4 mM	30	3 mL	Solução metanólica 0,004%	517	(Liang; Jin; Liu, 2011)
0,05 mM	5	0,5 mL	Solução aquosa de micela	528	(Noipa et al., 2011)

Tabela 4.3: Alterações ou modificações do método do DPPH.
Fonte: Adaptado de Oliveira (2015).

Dependendo do meio em que ocorre a solubilização do radical DPPH pode-se justificar o aumento na solubilidade pela transferência de um átomo de hidrogênio do próprio

etanol ou metanol para o átomo de nitrogênio que está ligado aos dois anéis aromáticos do radical DPPH[•] (Oliveira, 2015).

A absorbância da solução de DPPH[•] pode sofrer uma diminuição em torno de 20 a 35% devido à presença da luz e ao tempo de exposição, influenciando, assim, o resultado obtido (Oliveira, 2015).

O DPPH apresenta-se como um método simples podendo também ser usado para avaliar a atividade antioxidante de formas sintéticas (ex: nimesulida, dapsona e ácido acetilsalicílico), algas, quitosanas etc. (Borges et al., 2011).

REFERÊNCIAS

- ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 2, p. 143-152, 2013
- AMIRA, E. A. et al. Effects of the Ripening Stage on Phenolic Profile, Phytochemical Composition and Antioxidant Activity of Date Palm Fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2012.
- BLOIS, M. S. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. **Nature**. [S. I.]: Springer Science and Business Media LLC, 1958. DOI 10.1038/1811199a0.
- BORGES, L. L., LÚCIO, T. C., GIL, E. S., BARBOSA, E. F. Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. **Enciclopédia Biosfera**, 2011.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**. [S. I.]: Elsevier BV, 1995. DOI 10.1016/s0023-6438(95)80008-5.
- FAGALI, N.; CATALÁ, A. Antioxidant activity of conjugated linoleic acid isomers, linoleic acid and its methyl ester determined by photoemission and DPPH techniques. **Biophysical Chemistry**, v. 137, n. 1, p. 56-62, 2008.
- FERNANDEZ-OROZCO, R. et al. DPPH-scavenging capacity of chloroplastic pigments and phenolic compounds of olive fruits (cv. Arbequina) during ripening. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 6, p. 858-864, 2011.
- FRIAIA, O.; BRAULT, D. Kinetics of the reaction between the antioxidant Trolox and the free radical DPPH in semiaqueous solution. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 4, n. 12, p. 2417-23, 2006.
- LIANG, B.; JIN, M.; LIU, H. Water-soluble polysaccharide from dried *Lycium barbarum* fruits: Isolation, structural features and antioxidant activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 4, p. 1947-1951, 2011.
- LIANG, X.L. et al. Improved in Vitro Assays of Superoxide Anion and 1,1-Diphenyl- 2-picrylhydrazyl (DPPH) Radical-Scavenging Activity of Isoflavones and Isoflavone Metabolites. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 22, p. 11548-11552, 2010.
- LIU, D. et al. The scavenging capacity and synergistic effects of lycopene, vitamin E, vitamin C, and β-carotene mixtures on the DPPH free radical. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, n. 7, p. 1344-1349, 2008.
- LOCATELLI, M. et al. Study of the DPPH-scavenging activity: Development of a free software for the correct interpretation of data. **Food Chemistry**, v. 114, n. 3, p. 889-897, 2009.
- LÓPEZ-GIRALDO, L. J. et al. Kinetic and Stoichiometry of the Reaction of Chlorogenic Acid and Its Alkyl Esters against the DPPH Radical. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 3, p. 863-870, 2009.
- LU, Y.; YEAP FOO, L. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. **Food Chemistry**, v. 68, n. 1, p. 81-85, 2000.

MISHRA, K.; OJHA, H.; CHAUDHURY, N. K. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. **Food Chemistry**. [S. I.]: Elsevier BV, fev. 2012. DOI 10.1016/j.foodchem.2011.07.127.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin J. Sci. Technol.**, 2004.

MOT, A. C.; SILAGHI-DUMITRESCU, R.; SÂRBU, C. Rapid and effective evaluation of the antioxidant capacity of propolis extracts using DPPH bleaching kinetic profiles, FT-IR and UV-vis spectroscopic data. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 4–5, p. 516-522, 2011.

NIU, Y. et al. Temperature-dependent stability and DPPH scavenging activity of liposomal curcumin at pH 7.0. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1377-1382, 2012.

NOIPA, T. et al. New approach for evaluation of the antioxidant capacity based on scavenging DPPH free radical in micelle systems. **Food Research International**, v. 44, n. 3, p. 798-806, 2011.

OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH: estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. [S. I.]: FapUNIFESP (SciELO), 2015. DOI 10.1590/1983-084x/12_165.

ORDOUDI, S. A. et al. Structure–DPPH• Scavenging Activity Relationships: Parallel Study of Catechol and Guaiacol Acid Derivatives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 16, p. 5763-5768, 2006.

PREVC, T. et al. DPPH assay of vegetable oils and model antioxidants in protic and aprotic solvents. **Talanta**, v. 109, n. 0, p. 13-19, 2013.

RUFINO, M. D. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. D. G.; PÉREZ-JIMENES, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. **Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH**. Embrapa Agroindústria Tropical-Comunicado Técnico, 2007.

RUFINO, M. S. M. et al. Free radical-scavenging behaviour of some north-east Brazilian fruits in a DPPH system. **Food Chemistry**, v. 114, n. 2, p. 693- 695, 2009.

SCHERER, R.; GODOY, H. T. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. **Food Chemistry**. [S. I.]: Elsevier BV, 2009. DOI 10.1016/j.foodchem.2008.06.026.

SILVEIRA, A. C., KASSUIA, Y. S., DOMAHOVSKI, R. C., LAZZAROTTO, M. **Método de DPPH adaptado: uma ferramenta para analisar atividade antioxidante de polpa de frutos da erva-mate de forma rápida e reproduzível**. COMUNICADO TÉCNICO 421, Dez., 2018.

SOUZA, C. M. de M.; SILVA, H. R. e; VIEIRA-JR., G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S. da; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. de M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**. [S. I.]: FapUNIFESP (SciELO), abr. 2007. DOI 10.1590/s0100-40422007000200021.

SUCUPIRA, N.R., SILVA, A. B., PEREIRA, G., COSTA. Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. **Journal of Health Sciences**, 2012.

YAO, H. et al. Screening and quantitative analysis of antioxidants in the fruits of *Livistona chinensis* R. Br using HPLC-DAD-ESI/MS coupled with pre-column DPPH assay. **Food Chemistry**, v. 135, n. 4, p. 2802- 2807, 2012.

MÉTODO RADICAL ABTS (2,2-AZINOBIS (3-ETILBENZOTIAZOLINA-6-ÁCIDO SULFÔNICO))

CARACTERÍSTICAS GERAIS

- aplicado em soluções de substâncias puras, misturas aquosas e bebidas;
- a reação ocorre por meio enzimático para a geração do radical a partir de peroxidases, mioglobina (Miller et al. 1993);
- Re et al., 1999 desenvolveram o Ensaio de capacidade antioxidante equivalente de Trolox (TEAC) (Huang et al., 2005)
- por meio químico a geração de radical se dá com a utilização de dióxido de magnésio, persulfato de potássio (PP), [2,2'-azobis-(2- amidinopropeno) HCl] ABAP (Rufino et al. 2007);
- medida da atividade antioxidante em compostos de natureza lipídica ou hidrofílica (Rufino et al. 2007);
- análise pode ser realizada em diferentes valores de pH;
- indicado para ensaios contendo compostos coloridos (ex: antocianinas) já que apresentam absorção máxima próxima a região infravermelha (Kuskoski et al. 2004).

ASPECTOS QUÍMICOS

De forma original o método ABTS^{•+} foi baseado na ativação da metamioglobina com peróxido de hidrogênio na presença do ABTS (Miller e Rice- Evans, 1996). Assim haveria a produção do cátion radical na presença ou ausência dos antioxidantes, porém a crítica consistia no fato de que outros antioxidantes de reação mais rápida também poderiam contribuir para a redução do radical ferrilmiocglobina (Re et al., 1999).

A técnica modificada usa ABTS e o persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$ - PP) e revela a produção do cromóforo azul/verde radical ABTS com máximo de absorbância a 342 nm (Re et al., 1999).

Adição de antioxidantes para o cátion radical pré-formado reduzem ABTS até certo ponto e em uma escala de tempo, dependendo da atividade antioxidante, a concentração do antioxidante e a duração da reação. Assim, a extensão de descoloração como porcentagem de inibição do ABTS^{•+} é determinado em função da concentração e do tempo e calculado em relação à reatividade radical de Trolox ((6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) como padrão, nas mesmas condições (Sucupira et al., 2012).

As bandas máximas de absorbância do cátion radical ABTS^{•+} mudam um pouco em

diferentes solventes devido ao efeito solvatocrômico: metanol (744-745 nm), etanol (753 nm) e propanol-1 (757 nm) (Ilyasov et al., 2020).

Normalmente, o ABTS $\cdot\cdot$ é pré-gerado um dia antes, misturando o PP e o ABTS para reposar durante a noite (Ilyasov et al., 2020).

A equação a seguir (Figura 5.1) representa a estabilização do radical ABTS $\cdot\cdot$ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.

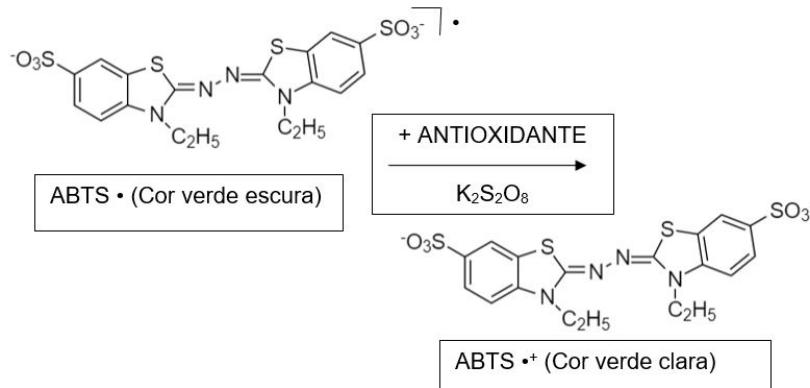


Figura 5.1: Estabilização do radical ABTS a partir da reação com um antioxidante e persulfato de potássio para a formação de ABTS \cdot^+ .

COMO FAZER?

- A medição da atividade antioxidante, a seguir, contém modificações dos métodos originais (RUFINO et al., 2007 e BOROSKI et al., 2015).
- Os reagentes, equipamentos e vidrarias estão listados no quadro 5.2.

Reagentes	Equipamentos e vidrarias
ABTS (2,2 azino bis (ácido 3-etylbenzotiazolina-6 sulfônico) sal de diamônio)	Agitador de tubos de ensaio
Água destilada	Balança analítica
Etanol P.A.	Balões volumétricos
K2S2O8 (Persulfato de Potássio - PP)	Cronômetro digital
Trolox (6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico)	Cubetas
	Espectrofotômetro
	Proveta

Quadro 5.2: Reagentes, equipamentos e vidrarias para a realização do método radical ABTS.

PREPARO DE SOLUÇÕES

Solução estoque de ABTS (7 mM)

Dissolva 192 mg do sal de ABTS e solubilize em água destilada, complete o volume para 50 mL em um balão volumétrico.

Homogeneíze e armazene (sob refrigeração, por no máximo um mês em frasco de vidro âmbar)

Solução de persulfato de potássio (140 mM)

Prepare esta solução em um balão volumétrico de 10 mL, para isso, pese 378,4 mg de persulfato de potássio e solubilize em água destilada.

Homogeneíze e armazene (temperatura ambiente, por no máximo um mês em frasco de vidro âmbar)

Preparação do cátion radical ABTS^{•+}

Use 5 mL da solução estoque de ABTS e 88 μ L da solução de persulfato de potássio.

Homogeneíze e mantenha a mistura por 16 horas em repouso, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

Dilua 1 mL desta mistura em álcool etílico (cerca de 55 a 90 mL) a absorbância a 734 nm deve estar próxima a $0,70 \pm 0,05$ nm.

Solução padrão de Trolox 2 mM

Descrita no capítulo 3: Curva Padrão

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (AAT)

Prepare no mínimo cinco diluições em tubos de ensaio, a partir do extrato, em triplicata.

Em ambiente escuro, transferira uma alíquota de 30 μ L de cada diluição do extrato para tubos de ensaio contendo 3,0 mL do radical ABTS^{•+} e homogeneíze.

As leituras destas soluções devem ser realizadas após 6 minutos a 734 nm.

Para a calibração do espectrofotômetro utilize etanol.

Gráfico: Utilize os valores das absorbâncias no eixo Y e as diluições (mg/L) no eixo

X.

Em seguida, determine 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 (caso a substância padrão utilizada tenha sido Trolox) em que:
$$Y = -ax + b$$

O valor obtido para o termo x corresponde à diluição da amostra (mg/L) equivalente a 1.000 μM de Trolox.

Cálculo das diluições do extrato (mg/L) equivalente a 1.000 μM de trolox $y = ax + b$
onde:

y = Absorbância correspondente a 1.000 μM de trolox

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

O resultado Z é expresso em μM trolox/ g de extrato

Assim:

$$X(g) = x/1000$$

$$Z = 1000 / X(g) \cdot 1$$

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 extrato. Cálculo final expresso em ($\mu\text{M}/\text{g}$).

REFERÊNCIAS

BOROSKI, M., VISENTAINER, J. V., COTTICA, S. M., MORAIS, D. R. **Antioxidantes: princípios e métodos analíticos**, 1^a ed. Curitiba, Editora Appris, 141 p., 2015.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. [S. I.]: American Chemical Society (ACS), 2005. DOI 10.1021/jf030723c.

ILYASOV, I. R.; BELOBORODOV, V. L.; SELIVANOVA, I. A.; TEREKHOV, R. P. ABTS/PP Decolorization Assay of Antioxidant Capacity Reaction Pathways. **International Journal of Molecular Sciences**. [S. I.]: MDPI AG, 2020. DOI 10.3390/ijms21031131.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; GARCÍA-PARILLA, M. C.; TRONCOSO, A. M.; FETT, R. Actividad antioxidant de pigmentos antociánicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. [S. I.]: FapUNIFESP (SciELO), 2004. DOI 10.1590/s0101-20612004000400036.

MILLER, N. J.; RICE-EVANS, C. A. Spectrophotometric determination of antioxidant activity. **Redox Report**. [S. I.]: Informa UK Limited, 1996. DOI 10.1080/13510002.1996.11747044.

MILLER, N. J.; RICE-EVANS, C.; DAVIES, M. J. A new method for measuring antioxidant activity. **Biochemical Society Transactions**. [S. I.]: Portland Press Ltd., 1993. DOI 10.1042/bst021095s.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**. [S. I.]: Elsevier BV, 1999. DOI 10.1016/s0891-5849(98)00315-3.

RUFINO, M. D. S., ALVES, R. E., BRITO, E. S., MORAIS, S. M., SAMPAIO, C. G., JIMENEZ, P. J., SAURA- CALIXTO, F. D. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS**. Comunicado técnico 128, jul, 2007.

SUCUPIRA, N.R., SILVA, A. B., PEREIRA, G., COSTA. Métodos para determinação da atividade antioxidant de frutos. **Journal of Health Sciences**, 2012.

FRAP - MÉTODO DE REDUÇÃO DO FERRO FRAP (FERRIC REDUCING ANTIOXIDANT POWER)

CARACTERÍSTICAS GERAIS

- Metodologia inicialmente desenvolvida para medir a força antioxidante em plasma sanguíneo, a partir da determinação do poder de redução do íon férrico (presente no complexo 2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina (TPTZ)) e produção do íon ferroso (Fe^{2+}) (Benzie e Strain, 1996).
- Método simples e reprodutível amplamente utilizado para determinar a atividade antioxidante das plantas, extratos de alimentos, fluidos biológicos, especiarias, vegetais, frutas e óleos essenciais (Wojtunik-Kulesza, 2020).
- Esse método, em conjunto com outros ensaios antioxidantes possibilitou resultados consistentes para mais de 70 plantas medicinais investigadas (Katalinic et al., 2006).
- É recomendável realizar este teste e algum outro para correlacionar as técnicas e seus resultados (Rufino et al., 2006).

ASPECTOS QUÍMICOS

- Neste método ocorre a redução do complexo íon férrico-TPTZ (2,4,6-tri (2-piridil) -1,3,5-triazina) a partir da presença de antioxidantes. A quantidade de ferro reduzido (Fe^{3+} a Fe^{2+}) pode ser relacionada a quantidade de antioxidantes e evidenciada por meio da absorbância (Moon e Shibamoto, 2009).
- Complexo $[Fe^{3+}(TPTZ)_2]^{3+}$ inicial quando reage com uma substância antioxidante redutora em um meio ácido, recebe um elétron e reduz-se a $[Fe^{2+}(TPTZ)_2]^{2+}$, na figura 6.1 é possível verificar a reação do ensaio FRAP (Sucupira et al., 2012).
- Este ensaio deve ocorrer em condições ácidas, visto que, o pH tem efeito importante na redução da capacidade de antioxidantes. Em meio ácido a capacidade de redução pode ser suprimida devido à protonação com compostos antioxidantes, já em pH básico, ocorre a dissociação de prótons de compostos fenólicos o que pode ocasionar a capacidade de reduzir uma amostra (Huang et al., 2005).
- A absorbância é medida a 593 nm devido à formação ao composto Fe^{2+} de cor azul marinho muito intenso a partir do complexo de Fe^{3+} oxidado incolor pela ação de antioxidantes doadores de elétrons. Quanto maior a absorbância maior é o efeito antioxidante (Vijayalakshmi e Ruckmani, 2016).
- A técnica é limitada ao meio aquoso e às substâncias que tenham menor capacidade de redução que o próprio íon férrico para não contribuir com o aumento

da absorbância e consequente equívoco no resultado (Sucupira et al., 2012).

- Os resultados do FRAP podem variar dependendo da escala de tempo da análise. Fenóis de reação rápida que se ligam ao ferro ou se decompõem em compostos com menor ou reatividades diferentes são melhor analisadas com tempos de reação curtos (4 minutos), porém algumas destas substâncias reagem de forma mais lenta o que requer tempos mais longos (30 minutos) (Prior et al., 2005).
- Substâncias padrão neste ensaio: Trolox, ácido ascórbico, BHT e catequina (Katalinic et al., 2006).

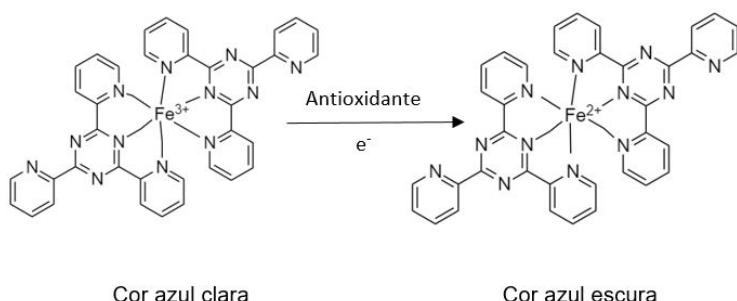


Figura 6.1: Redução do complexo TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) com Fe^{3+} . Reação do ensaio FRAP.

COMO FAZER?

- Método de acordo com Benzie e Strain, 1996 com adaptações de Rufino et al., 2006.
- Os materiais necessários para a realização do método FRAP estão listados no quadro 6.2.

Reagentes	Equipamentos e vidrarias
Acetato de sódio trihidratado	Agitador de tubos de ensaio
Ácido clorídrico P.A.	Balança analítica
Água destilada	Balões volumétricos
Etanol	Banho-maria
Cloreto de ferro (III) hexahidratado	Cronômetro digital
Sulfato de ferro (II) heptahidratado	Cubetas de vidro
TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil) - s - triazina)	Espectrofotômetro
	Pipeta
	Proveta
	Tubos de ensaio

Quadro 6.2: Reagentes, equipamentos e vidrarias necessários para a realização do método FRAP.

PREPARO DE SOLUÇÕES

Solução de HCl 40 mM

Adicione 3,34 mL de HCl em água destilada e complete o volume em balão volumétrico de 1 L.

Homogeneíze e armazene em frasco de vidro à temperatura ambiente por tempo indeterminado.

Solução de TPTZ 10 mM

Dissolva 3,12 g de TPTZ em, aproximadamente 5 mL da solução de HCl 40 mM e complete o volume para 1 L em um balão volumétrico com HCl 40 mM.

Homogeneíze e transfira para um frasco de vidro âmbar devidamente etiquetado.

Armazene sob refrigeração por até um mês.

Solução de Cloreto Férrico 20 mM

Dissolva 5,4 g de cloreto férrico em água destilada e complete o volume para 1 L em um balão volumétrico com água destilada.

Homogeneíze e armazene em frasco de vidro âmbar, sob refrigeração, por até um mês.

Solução tampão acetato de sódio 0,3 M (pH 3,6)

Dissolva 3,1g de acetato de sódio em 16 mL de ácido acético glacial e complete o volume para 1 L em um balão volumétrico com água destilada.

Homogeneíze e armazene em frasco de vidro âmbar.

Solução do Reagente FRAP

Para esta solução use tampão acetato 0,3 M (25 mL), solução de TPTZ 10 mM (2,5 mL) e solução aquosa de cloreto de ferro (III) 20 mM (2,5 mL)

Importante: esta solução do reagente FRAP deve ser utilizada imediatamente após sua preparação.

Solução Padrão de Sulfato de Ferro (II) 2000 $\mu\text{mol. L}^{-1}$

Dissolva 27,8 mg de sulfato ferroso em água destilada e complete o volume com água destilada, use um balão volumétrico de 50 mL

Prepare e use esta solução no dia da análise.

Homogeneíze e armazene em um frasco de vidro âmbar para armazenamento.

CURVA PADRÃO DO SULFATO DE FERRO (II)

Prepare balões volumétricos de 10 mL com soluções variando a concentração de 500 μM a 1500 μM feitas a partir da solução padrão de sulfato ferroso (2.000 μM).

Cálculos:

→ Dica: $C_{\text{inicial}} \times V_{\text{inicial}} = C_{\text{final}} \times V_{\text{final}}$

Onde: C (concentração) e V (volume)

Exemplo: Solução $C_{\text{final}} = 500 \mu\text{M}$

$C_{\text{inicial}} = 2 \text{ mM} = 2000 \mu\text{M}$

$V_{\text{inicial}} = ?$ (quanto usar da solução padrão)

$V_{\text{final}} = 10 \text{ mL}$

$C_{\text{inicial}} \times V_{\text{inicial}} = C_{\text{final}} \times V_{\text{final}}$

$2000 \mu\text{M} \times V_{\text{inicial}} = 500 \mu\text{M} \times 10 \text{ mL}$

$V_{\text{inicial}} = 2,5 \text{ mL}$ da solução padrão de Sulfato de Ferro (II)

Assim, tem-se:

Volume de álcool etílico para complementar 10 mL no balão volumétrico será:

$V_{\text{álcool etílico}} = 10 - 2,5 = 7,5 \text{ mL}$

Após calculados é possível tabelá-los (Tabela 6.3) da seguinte forma:

Solução padrão de sulfato ferroso (mL)	Água destilada (mL)	Concentração final (μM)
2,5	7,5	500
5,0	5,0	1000
7,5	2,5	1500
10	0	2000

Tabela 6.3: Volumes de solução sulfato ferroso para a curva padrão.

DETERMINAÇÃO DA CURVA PADRÃO – PADRÃO SULFATO DE FERRO (II)

Transfira uma alíquota de 90 μL de cada solução de sulfato de ferro (II) (500 μM , 1.000 μM , 1.500 μM e 2.000 μM) para tubos de ensaio.

Acrescente 270 μL de água destilada misture com 2,7 mL do reagente FRAP.

Homogeneíze as soluções em mantenha em banho-maria a 37 °C.

Após 30 minutos faça a leitura espectrofotométrica no comprimento de onda igual a 593 nm.

→ Calibre o espectrofotômetro utilizando o reagente FRAP como branco.

Para fazer o gráfico use as concentrações de sulfato de ferro (II) (mM) que devem ser plotadas no eixo X e as respectivas absorbâncias no eixo Y.

Calcule a equação da reta.

A partir da equação da reta, calcule a absorbância referente a 1000 mM de sulfato ferroso.

Sendo:

$$y = ax + b$$

Onde, x = 1.000 μ M de sulfato ferroso

y = Absorbância correspondente a 1.000 μ M de sulfato ferroso

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (AAT)

Prepare em tubos de ensaio, no mínimo cinco diluições diferentes do extrato (sugestões no Capítulo 3), em triplicata.

→ Dependendo do tipo de extrato, pode ser que haja necessidade da realização de uma centrifugação antes da leitura da absorbância.

Transfira uma alíquota de 90 μ L de cada diluição do extrato para tubos de ensaio, acrescente 270 μ L de água destilada, misture com 2,7 mL do reagente FRAP, homogeneíze em agitador de tubos e mantenha em banho-maria a 37 °C.

Após 30 minutos da mistura preparada faça a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 593 nm.

→ Atenção: realize estes procedimentos em ambiente escuro.

Use o reagente FRAP como branco para calibrar o espectrofotômetro.

Com os valores das absorbâncias obtidas nas diferentes diluições dos extratos plote a absorbância no eixo Y e a diluição dos extratos (mg/ L) no eixo X.

Determine a equação da reta.

Para o cálculo da 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 corresponde à diluição da amostra (mg/L) equivalente a 1.000 μ M de sulfato ferroso.

$$y = ax + b$$

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), deve-se dividi-lo por 1.000 para ter o valor em

grama. O resultado é calculado pela divisão de 1.000 (μM) pelo valor de $X(\text{g})$ e multiplicado por 1(g) para encontrar o valor final (Z) que é expresso em μM sulfato ferroso/g de extrato.

Dessa forma, tem-se:

$$X(\text{g}) = x / 1.000$$

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

RESULTADOS E INTERPRETAÇÕES

A elevada capacidade redutora é indicada pelo aumento da absorbância. Esse poder de absorbância de conversão de Fe (III) a Fe (II) pode ser expressa em $\mu\text{mol. L}^{-1}$. Valores que podem ser expressos na curva de calibração com o sulfato ferroso.

A partir da regressão linear, tem-se a equação da reta. O valor de absorbância obtido em Y é possível comparar na reta do extrato até a obtenção do x na equação.

OUTRO PADRÃO PODE SER O TROLOX- METODOLOGIA DESCrita POR SILVA ET AL., 2018

Trolox pode ser testado nas concentrações de 25, 62,5, 125 e 250 mg. L^{-1} .

O ensaio ocorre com a adição em tubos de ensaio de uma alíquota de 90 μL da solução padrão de Trolox, 270 μL de água destilada e 2,7 mL do reagente FRAP.

A mistura deve ser homogeneizada, mantida em banho-maria a 37 °C durante 30 min, e a leitura da absorbância medida a 593 nm.

A capacidade antioxidante da amostra será obtida através da curva de concentração da solução de Trolox (eixo x) versus absorbância da solução da amostra (eixo Y).

REFERÊNCIAS

- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**. [S. I.]: Elsevier BV, 1996. DOI 10.1006/abio.1996.029
- HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. [S. I.]: American Chemical Society (ACS), 2005. DOI 10.1021/jf030723c.
- KATALINIC, V.; MILOS, M.; KULISIC, T.; JUKIC, M. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. **Food Chemistry**. [S. I.]: Elsevier BV, 2006. DOI 10.1016/j.foodchem.2004.12.004..
- MOON, J.-K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant Assays for Plant and Food Components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. [S. I.]: American Chemical Society (ACS), 2009. DOI 10.1021/jf803537k
- PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAIKH, K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. [S. I.]: American Chemical Society (ACS), 2005. DOI 10.1021/jf0502698.
- RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; JIMENES-PEREZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. **Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP)**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2006. 4 p. (Comunicado Técnico).
- SILVA, L. A. da; RAPOSO, J. D. A.; CAMPOS, L. P. G.; CONCEIÇÃO, E. C. da; OLIVEIRA, R. B. de; MOURÃO, R. H. V. Atividade antioxidante do óleo essencial de Myrcia sylvatica (G. Mey.) DC. por diferentes métodos de análises antioxidantes (ABTS, DPPH, FRAP, β-caroteno/ácido linoleico). **Revista Fitoterá**. [S. I.]: Fiocruz - Instituto de Tecnologia em Farmacos, 2018. DOI 10.5935/2446-4775.20180011.
- SUCUPIRA, N.R., SILVA, A. B., PEREIRA, G., COSTA. Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. **Journal of Health Sciences**, 2012.
- VIJAYALAKSHMI, M.; RUCKMANI, K. Ferric reducing anti-oxidant power assay in plant extract. **Bangladesh Journal of Pharmacology**. [S. I.]: **Bangladesh Journals Online (JOL)**, 2016. DOI 10.3329/bjp.v11i3.27663.
- WOJTUNIK-KULESZA, K. A. Approach to Optimization of FRAP Methodology for Studies Based on Selected Monoterpenes. **Molecules**. [S. I.]: MDPI AG, 2020. DOI 10.3390/molecules25225267.

SISTEMA β -CAROTENO/ÁCIDO LINOLEICO-DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE NO SISTEMA β -CAROTENO/ÁCIDO LINOLEICO

(Teste de branqueamento do β -caroteno)

CARACTERÍSTICAS GERAIS

- Sistema desenvolvido por Marco (1968), modificado por Miller (1971).
- Método fundamentado na descoloração do β -caroteno induzida pela sua atividade de inibição de radicais livres, gerados durante a peroxidação do ácido linoleico (Silva et al., 2018)
- É um ensaio apropriado para avaliar antioxidantes lipofílicos, como óleos essenciais (Kulisic et al., 2004)

ASPECTOS QUÍMICOS

- A medida da atividade antioxidante de compostos orgânicos voláteis resulta da inibição da formação de dieno conjugado hidroperóxido a partir do ácido linoléico e β -caroteno junto à oxidação em um sistema aquoso emulsionado, no qual perde sua cor laranja ao reagir com os radicais (Lopes-Lutz et al., 2008).
- BHA (2,3-terc-butil-4-hidroxianisol) e trolox podem ser considerados como antioxidantes comuns para este ensaio (Silva et al., 2018).

COMO FAZER?

- Metodologia descrita por Rufino et al. (2006)
- No quadro 7.1 está contida a lista de reagentes, equipamentos e materiais para a realização do teste de branqueamento do β -caroteno.

Reagentes	Equipamentos e vidrarias
β -caroteno	Agitador de tubos de ensaio
Ácido linoleico	Balões Volumétricos
Água destilada	Balança analítica
Etanol	Banho-maria
Clorofórmio	Bécker
Trolox	Cronômetro digital
Tween 40	Cubetas
	Erlenmeyer
	Espectrofotômetro
	Oxigenador

	Pipeta de alta precisão Proveta Tubos de ensaio
--	---

Quadro 7.1 - Reagentes, equipamentos e vidrarias necessários para a realização do teste de branqueamento do β -caroteno.

PREPARO DE SOLUÇÕES

Solução controle de Trolox (200 mg. L⁻¹)

Dissolva 2 mg de Trolox em aproximadamente 5 mL de etanol e complete o volume para 10 mL em um balão volumétrico com etanol

Homogeneíze e armazene em um frasco de vidro âmbar apenas durante o dia da análise

Tratamento da água destilada

Submeta aproximadamente 500 mL de água destilada a borbulhamento com oxigênio (oxigenador) por 30 minutos.

Solução β -Caroteno (20 mg. L⁻¹)

Pese 20 mg de β -caroteno em um tubo de 2 mL protegido da luz, adicione 1 mL de clorofórmio, agite e utilize imediatamente.

Solução Sistema β -caroteno/Ácido Linoleico

Adicione 40 μ L de ácido linoleico, 530 μ L de Tween 40, 50 μ L da solução β -caroteno e, para solubilizar, adicione 1mL de clorofórmio.

Homegeneíze e evapore completamente o clorofórmio com o auxílio do oxigenador. Em seguida, adicione a água tratada com oxigênio até obter uma absorbância entre 0,6 e 0,7 nm a 470 nm.

A solução sistema β -caroteno/Ácido Linoleico apresenta uma coloração amarelo-alaranjada, e deve estar protegida da luz e ser utilizada prontamente.

Prepare as amostras dos extratos (Capítulo 3 contém sugestões para a preparação do extrato da amostra).

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (AAT)

Em tubos de ensaio, faça no mínimo três diluições diferentes, em triplicata.

Misture 0,4 mL de cada diluição do extrato com 5 mL da solução sistema β -caroteno/ácido linoleico.

Utilize como controle 0,4 mL da solução de Trolox com 5 mL da solução sistema β -caroteno/ácido linoleico.

Homogeneíze os tubos de ensaio em agitador e mantenha em banho-maria a 40 °C.

Realize a primeira leitura (470 nm) após 2 minutos de efetuada a mistura e depois em intervalos de quinze minutos até 120 minutos.

Calibre o espectrofotômetro com água.

Os resultados são expressos em percentagem de inibição da oxidação.

A redução da absorbância do sistema sem antioxidante é considerada como 100% de oxidação, de acordo com a equação:

$$\text{Redução da absorbância} = \text{Abs}_{\text{inicial}} - \text{Abs}_{\text{final}}$$

O decréscimo da leitura da absorbância das amostras é correlacionado com o sistema e estabelece a percentagem de oxidação, conforme a equação:

$$\% \text{Oxidação} = (\text{redução Abs}_{\text{amostra}} \times 100) / \text{redução Abs}_{\text{sistema}}$$

Ao subtrair a porcentagem de oxidação de cada amostra de 100 obtém-se a ação antioxidante da amostra e faz-se a comparação com a atividade antioxidante do padrão Trolox.

$$\text{Ação antioxidante} \rightarrow \% \text{Proteção} = 100 - (\% \text{ Oxidação})$$

REFERÊNCIAS

- KULISIC, T.; RADONIC, A.; KATALINIC, V.; MILOS, M. Use of different methods for testing antioxidant activity of oregano essential oil. **Food Chemistry**. [S. I.]: Elsevier BV, 2004. DOI 10.1016/j.foodchem.2003.07.024
- LOPES-LUTZ, D.; ALVIANO, D. S.; ALVIANO, C. S.; KOLODZIEJCZYK, P. P. Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of Artemisia essential oils. **Phytochemistry**. [S. I.]: Elsevier BV, 2008. DOI 10.1016/j.phytochem.2008.02.014.
- MARCO, G. J. A rapid method for evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. [S. I.]: Wiley, 1968. DOI 10.1007/bf02668958.
- MILLER, H. E. A simplified method for the evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists Society**. [S. I.]: Wiley, 1971. DOI 10.1007/bf02635693.
- RUFINO, M. D. S., ALVES, R. E., BRITO, E. S., FILHO, J. M., MOREIRA, A. V. B. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas no Sistema β-caroteno/Ácido Linoléico**. Comunicado técnico 126, Dez, 2006.
- SILVA, L. A. da; RAPOSO, J. D. A.; CAMPOS, L. P. G.; CONCEIÇÃO, E. C. da; OLIVEIRA, R. B. de; MOURÃO, R. H. V. Atividade antioxidante do óleo essencial de Myrcia sylvatica (G. Mey.) DC. por diferentes métodos de análises antioxidantes (ABTS, DPPH, FRAP, β-caroteno/ácido linoleico). **Revista Fitos**. [S. I.]: Fiocruz - Instituto de Tecnologia em Farmacos, 2018. DOI 10.5935/2446-4775.20180011.

TBA OU TBARS (THIOBARBITURIC ACID REACTIVE SUBSTANCES) - ENSAIO ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO – ESPÉCIES REATIVAS

CARACTERÍSTICAS GERAIS

- Ensaio primeiramente descrito por Ohkawa et al., (1979) usando tecidos animais (cérebro, músculos e fígado).
- O método TBARS é muito utilizado para estimar peroxidação lipídica nas membranas e sistemas biológicos (Rael et al. 2004).
- Teste importante por evidenciar o estado oxidativo, no prognóstico da rancidez nas indústrias de alimentos (Osawa et al., 2005).
- A formação de produtos citotóxicos como o malonaldeído pode ocorrer devido a atuação das EROs em componentes celulares, especialmente nas membranas, ocasionando alterações estruturais e relativas à permeabilidade podendo resultar até na morte celular (Oliveira et al., 2015).

ASPECTOS QUÍMICOS

- O método trata a análise espectrofotométrica relativa à atividade de extratos e frações sob a formação do malonaldeído (MDA) a partir da oxidação de ácidos graxos insaturados. É um método simples e sensível para mensuração da peroxidação lipídica, embora não seja muito específico (Andrade Júnior et al., 2005)
- Os peróxidos lipídicos produzidos a partir de estresse oxidativo quando quantificados pelo ensaio TBARS, acontecem a partir da utilização da reação do malondialdeído (MDA) com ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), medido opticamente (Ohkawa et al., 1979; Silva et al., 1999).
- O mecanismo da reação no qual o marcador MDA (um dos mais abundantes) é derivado da peroxidação lipídica de ácidos graxos poliinsaturados contendo três ou mais duplas ligações como o araquidônico (AA), eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenoico (DHA) (Barbosa et al., 2010).
- O MA não é o único produto de oxidação dos lipídios que reage com o TBA: os 4-hidroxialcenais, os 2,4-alcadienais e os 2-alcenais formam igualmente um cromogênio. Por isso é preferível utilizar o termo: “substâncias que reagem com o TBA” (TBARS) (Silva et al., 1999).
- O valor do pH é um importante fator que afeta a reatividade dos peróxidos de ácidos graxos com TBA (Ohkawa et al., 1979).
- A presença de TBARS acontece a partir do segundo estágio de auto-oxidação em que peróxidos são oxidados em aldeídos e cetonas e podem ser dosados

(Kaczmarek e Muzolf-Panek, 2021).

- Algumas substâncias (glicose, sacarose) contidas em amostras podem interferir na formação de TBARS, um efeito sinérgico que sobrestima a oxidação. No entanto, o MA pode não reagir com o TBA devido à sua complexação com proteínas, aminas e outros compostos. na reação de peroxidação lipídica (Silva et al., 1999).
- Neste ensaio TBARS uma molécula de MA reage com duas moléculas de TBA para formar um complexo de cor vermelha, (Figura 8.1) o qual absorve a 532-535 nm (Silva et al., 1999).

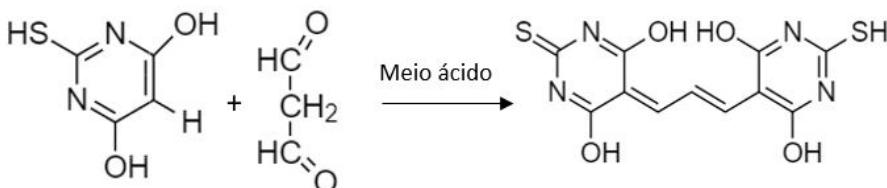


Figura 8.1: Reação do ensaio de TBA entre o ácido 2- tiobarbitúrico e o malonaldeído. Produto medido espectrofotometricamente a 532 nm.

De acordo com Osawa et al., 2005 as metodologias do teste de TBA baseadas em espectrofotometria podem ser agrupadas de quatro maneiras diferentes:

- Diretamente na amostra:

Por meio de aquecimento direto com a solução acidificada de TBA até um máximo desenvolvimento de cor. Este procedimento deve ser seguido da extração do complexo colorido com solventes orgânicos.

Solventes orgânicos usuais: butanol e éter de petróleo

Medição espectrofotométrica.

- Na porção lipídica da amostra:

Extração da porção lipídica da amostra, seguida da reação com o TBA para a formação do complexo colorido, com posterior medição espectrofotométrica.

- No extrato ácido-aquoso da amostra:

Faz-se o emprego de soluções de ácido tricloroacético (TCA) ou ácido perclórico, sendo o malonaldeído um dos componentes.

Esse extrato reage com a solução de TBA para a formação do complexo colorido que é medido espectrofotometricamente.

- Na porção do destilado da amostra:

Realiza-se a destilação do alimento com ácido, em seguida o reagente de TBA

acidificado é adicionado à porção do destilado.

Faz-se o aquecimento para o desenvolvimento máximo de cor e medição espectrofotométrica.

PROCEDIMENTOS PARA A REALIZAÇÃO DO MÉTODO TBARS (MÉTODO ORIGINAL OHKAWA ET AL., 1979 MODIFICADO POR MORAIS ET AL. 2006)

Use, como meio rico em lipídeos - solução de gema de ovo homogeneizada.

Recomenda-se o procedimento em quintuplicata.

Em tubos de ensaio (5) foram colocados 0,5 mL da solução de gema de ovo (10% m/v) e 0,1 mL de solução da amostra (óleos essenciais e padrões) dissolvida em metanol, completando o volume com 0,4 mL de água.

Realize o teste com três concentrações diferentes de cada amostra (100, 500 e 1000 ppm) m/v.

Adicione em cada tubo 0,05 mL de 2'-azobis (2- amidinopropano) dihidrocloreto (ABAP) na concentração de 0,07 mol/L para induzir a peroxidação dos lipídeos.

Acrescente 1,5 mL de solução 20% de ácido acético (pH 3,5) e 1,5 mL de solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) (0,8% m/v ou 0,02 M) em solução dedodecil sulfato de sódio (SDS) (1,1% m/v).

O tubo de ensaio com o experimento controle deve possuir todos os reagentes, com exceção da amostra testada, para se observar a completa peroxidação dos lipídeos.

Os tubos de ensaio devem permanecer em banho-maria à 95°C, sob agitação, durante 1 hora.

Após isso, realize o resfriamento, e adicione 5 mL de 1-butanol a cada tubo e centrifugue a 3000 rpm, durante 10 min.

Faça a leitura da absorbância da camada orgânica superior em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 532 nm.

Verifique por meio de cálculos o Índice Antioxidante da amostra em percentual (IA%), para isso, use a fórmula:

$$\text{IA\%} = 1 - (\text{A}_{\text{média}}/\text{A}_{\text{controle}}) \times 100,$$

Sendo:

$\text{A}_{\text{controle}}$ = a absorbância do controle totalmente oxidado

$\text{A}_{\text{média}}$ = a média aritmética das absorbâncias da amostra testada.

Neste método, você pode utilizar como padrão positivo os antioxidantes (2,6-diterc-butil-p-cresol) (BHT) e α -tocoferol (Vitamina E) nas mesmas proporções a que foram

submetidos os investigados (óleos essenciais, carnes, pescados e derivados).

Dicas importantes:

Para a realização do ensaio TBARS, deve-se conhecer a composição em ácidos graxos da amostra em análise, visto que o teste mede a extensão da oxidação de lipídios com três ou mais duplas ligações (Osawa et al., 2005)

Para misturas de vários constituintes, o ensaio terá apenas significado qualitativo e comparativo. Pode por exemplo, viabilizar a comparação em um único material em diferentes estágios de oxidação.

REFERÊNCIAS

- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. de C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**. [S. I.]: FapUNIFESP (SciELO), 2010. DOI 10.1590/s1415-52732010000400013..
- ANDRADE JÚNIOR, D. R. de; SOUZA, R. B. de; SANTOS, S. A. dos; ANDRADE, D. R. de. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. [S. I.]: FapUNIFESP (SciELO), 2005. DOI 10.1590/s1806-37132005000100011..
- KACZMAREK, A.; MUZOLF-PANEK, M. Predictive Modeling of Changes in TBARS in the Intramuscular Lipid Fraction of Raw Ground Beef Enriched with Plant Extracts. **Antioxidants**. [S. I.]: MDPI AG, 2021. DOI 10.3390/antiox10050736.
- MORAIS, S. M. de; CATUNDA JÚNIOR, F. E. A.; SILVA, A. R. A. da; MARTINS NETO, J. S.; RONDINA, D.; CARDOSO, J. H. L. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de Croton do nordeste do Brasil. **Química Nova**. [S. I.]: FapUNIFESP (SciELO), 2006. DOI 10.1590/s0100-40422006000500004..
- OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**. [S. I.]: Elsevier BV, 1979. DOI 10.1016/0003-2697(79)90738-3..
- OLIVEIRA, V. B.; ZUCHETTO, M.; PAULA, C. S.; VERDAM, M. C. S.; CAMPOS, R.; DUARTE, A. F. S.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Avaliação do potencial antioxidante frente à oxidação lipídica e da toxicidade preliminar do extrato e frações obtidas das frondes de Dicksonia sellowiana (Presl.) Hook. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. [S. I.]: FapUNIFESP (SciELO), 2015. DOI 10.1590/1983-084x/14_071..
- OSAWA, C. C.; FELÍCIO, P. E. de; GONÇALVES, L. Ap. G. Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos. **Química Nova**. [S. I.]: FapUNIFESP (SciELO), 2005. DOI 10.1590/s0100-40422005000400019.
- RAEL, L. T.; THOMAS, G. W.; CRAUN, M. L.; CURTIS, C. G.; BAR-OR, R.; BAR-OR, D. Lipid Peroxidation and the Thiobarbituric Acid Assay: Standardization of the Assay When Using Saturated and Unsaturated Fatty Acids. **BMB Reports**. [S. I.]: Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology - BMB Reports, 2004. DOI 10.5483/bmbrep.2004.37.6.749.
- SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**. [S. I.]: FapUNIFESP (SciELO), 1999. DOI 10.1590/s0100-40421999000100016.

ORAC- OXYGEN RADICAL ABSORBANCE CAPACITY

CARACTERÍSTICAS GERAIS

- O método ORAC foi inicialmente desenvolvido por Cao et al., 1992 (Zuleta et al., 2009).
- O ORAC utiliza os radicais peroxila como substâncias pró-oxidantes, geradas a partir do azo-iniciador AAPH (dihidrocloreto de 2,2'- azobis [2- metilpropionamida]) e como substrato tem-se a fluoresceína (Boroski et al., 2015).
- Serve para extratos com características hidrofílicas e lipofílicas, tais como amostras de fitoquímicos, frutas, tecidos animais, alimentos, suplementos (Huang et al., 2005).
- Por apresentar uma série de vantagens, a espectroscopia por fluorescência tem sido largamente utilizada na busca por antioxidantes de fontes naturais (Alves et al., 2010).
- Neste ensaio é fornecida uma fonte controlável de radicais peroxil que adequam reações de antioxidantes com lipídios em sistemas alimentares e fisiológicos (Thaipong et al., 2006).
- As substâncias antioxidantes na amostra, são responsáveis pela proteção da fluoresceína da degradação (oxidação) ocasionada pelo radical peroxil (Buroski et al., 2015)
- A alteração estrutural da fluoresceína devido ao ataque de radicais promove a perda da fluorescência, que de forma gráfica, a partir da utilização de substância padrão obtém-se uma curva de decaimento de fluorescência (AUC- area under curve) (Alves et al., 2010).
- Podem ocorrer interações entre a sonda fluorescente e antioxidantes, testes melhorados são realizados com fluoresceína (Huang et al., 2005).

ASPECTOS QUÍMICOS

- A avaliação antioxidante se dá pela inibição da oxidação, induzida pelo radical peroxil, por transferência de átomos de hidrogênio (Huang et al., 2005).
- As substâncias antioxidantes contidas nas amostras são as responsáveis pela manutenção da intensidade da fluorescência (Boroski et al., 2015)
- O azo-iniciador gera radicais peroxila quando sofrem decomposição térmica na presença de gás oxigênio (Boroski et al., 2015).
- A perda de fluorescência da fluoresceína pela ação dos radicais peroxila é devida à alteração estrutural que ela sofre, passando por várias etapas. A estrutura final ainda não foi elucidada (Ou et al., 2001).

- As ficoeritrinas são muito fotossensíveis e interagem com compostos fenólicos por ligações não bem esclarecidas (Zuleta et al. 2009).
- A atividade antioxidant de uma dada substância é determinada através da diferença entre a área da amostra subtraída pela área do branco (AUC), medida pelo decaimento da fluorescência com a adição da substância antioxidant no decorrer do tempo (Alves et al., 2010).
- O ensaio expressa o resultado em unidade de ORAC ou equivalentes de Trolox (TE), o qual corresponde à quantidade de Trolox em μM que tem a mesma atividade antioxidant de um litro de solução testada (Alves et al., 2010).

COMO FAZER?

- Metodologia de acordo com Buroska et al., 2015.
- No quadro 9.1 está contida a lista de reagentes, equipamentos e materiais para a realização do teste ORAC.

Reagentes	Equipamentos e vidrarias
AAPH (dihidrocloreto de 2,2' – azobis [2-metilpropionamida])	Balança analítica
Fluoresceina (3', 6'- dihidroxipiro[isobenzofurano -1 [3H], 9'[9H]-xanteno]-3-ona	Cubetas de quartzo
Solução tampão fosfato	Espectrofluorímetro
Trolox	Beckers
	Tubos de ensaio
	Balões volumétricos

Quadro 9.1: Reagentes, equipamentos e vidrarias necessários para a realização do teste ORAC.

PREPARO DOS REAGENTES

Solução estoque de fluoresceína

Utilize a balança analítica e meça 19,8 mg de fluoresceína e dissolva em 50,0 mL de solução tampão fosfato ($75 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ em $\text{pH}=7$).

*Esta solução estoque deve ser armazenada a -20°C e pode durar meses ao abrigo da luz.

Solução de trabalho de fluoresceína

O preparo deve ser diário, realize uma nova diluição sendo $25 \mu\text{L}$ da solução estoque em 25 mL de solução tampão fosfato seguida de outra diluição em que se utiliza $100 \mu\text{L}$ em 25 mL de solução tampão resultando numa concentração final de $4 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$.

Solução de AAPH (160 mmol. L⁻¹)

Dissolva 434 mg em 10,0 mL de solução tampão fosfato.

*Esta solução deve ser feita no dia da análise, tem durabilidade de apenas 8 horas e deve ser mantida ao abrigo da luz e sob refrigeração.

Soluções das amostras

Os métodos foram abordados neste manual no capítulo 3, como o método ORAC é muito sensível, estas soluções devem ser diluídas na solução tampão fosfato, porém utilizadas no máximo em 30 minutos.

Solução padrão de Trolox- estoque

Para o preparo desta solução, utilize 11 mg de Trolox e dissolva em 50 mL de solução tampão fosfato, sendo a concentração final igual a 852 $\mu\text{mol. L}^{-1}$.

*Esta solução pode ser armazenada por até 4 meses ao abrigo da luz e submetida a temperatura de -80° C.

Soluções de trabalho do padrão Trolox

A solução estoque deve ser diluída na solução tampão fosfato possibilitando a formação de soluções com concentrações que variem de 0 a 100 $\mu\text{mol. L}^{-1}$, conforme tabela 9.2.

Concentração final solução de trabalho Trolox ($\mu\text{mol. L}^{-1}$)	Volume da solução estoque Trolox (μL)	Volume da solução tampão fosfato (μL)
0	0	250
25	7,33	242,67
50	14,67	235,33
75	22,01	227,99
100	29,34	220,66

Tabela 9.2: Valores de volumes de solução estoque Trolox e solução tampão fosfato para obtenção das concentrações (0 até 100 $\mu\text{mol. L}^{-1}$).

→ Dica: $C_{\text{inicial}} \times V_{\text{inicial}} = C_{\text{final}} \times V_{\text{final}}$

onde: C (concentração) e V (volume)

Exemplo: Solução $C_{\text{final}} = 50 \mu\text{mol. L}^{-1}$

$C_{\text{inicial}} = 852 \mu\text{mol. L}^{-1}$ (Solução estoque Trolox)

$V_{\text{inicial}} = ?$ (quanto usar da solução estoque trolox)

$V_{\text{final}} = 250 \mu\text{L}$

$C_{\text{inicial}} \times V_{\text{inicial}} = C_{\text{final}} \times V_{\text{final}}$

$852 \mu\text{mol. L}^{-1} \times V_{\text{inicial}} = 50 \mu\text{mol. L}^{-1} \times 250 \mu\text{L}$

$V_{\text{inicial}} = 14,67 \mu\text{L}$

$V_{\text{solução tampão fosfato}} = 250 \mu\text{L} - 14,67 \mu\text{L}$

$V_{\text{solução tampão fosfato}} = 235,33 \mu\text{L}$

Determinação da atividade antioxidante

Construa a curva de calibração a 37°C , para isso, adicione $250 \mu\text{L}$ da solução que contém a amostra na cubeta de quartzo, ou tampão fosfato para o branco, ou de solução de Trolox.

Adicione $1500 \mu\text{L}$ de solução de fluoresceína 4 nmol. L^{-1} e mantenha a cubeta por 5 minutos sob proteção da luz a 37°C , para ambientar as soluções.

Posteriormente, adicione $250 \mu\text{L}$ de solução de AAPH (160 mmol. L^{-1}) com o início imediato da leitura da intensidade de fluorescência no comprimento de onda de excitação igual a 485 nm e de emissão de 515 nm .

Realize as leituras durante 30 minutos e que devem ter intervalos de 1 minuto.

*A decomposição térmica da solução de AAPH gera radicais peroxila e ao reagirem com a fluoresceína promovem a diminuição de fluorescência (Figura 9.3).

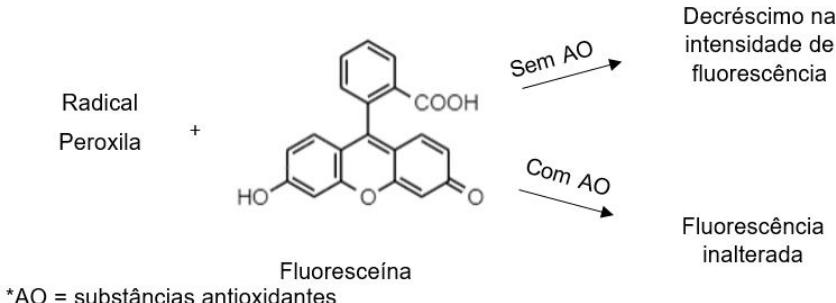


Figura 9.3: Influência de substâncias antioxidantes nas reações entre radical peroxila e a fluoresceína.

Atenção → após os 30 minutos de leitura da amostra, a intensidade de fluorescência deve ser menor que 10% do seu valor inicial. Caso, isso não ocorra, tem-se a necessidade de ajustar a concentração da solução a ser analisada.

Resultados - análise

Os resultados das análises são plotados em um gráfico intensidade de fluorescência

X tempo em minutos, a área sob a curva (AUC- area under curve) obtida para a solução padrão Trolox ou da amostra , e a área sob a curva obtida para o branco.

A AUC pode ser calculada a partir da equação:

$$AUC = (1 + f_1/f_0 + f_2/f_0 + \dots + f_{n+1}/f_0)$$

Onde: f_0 = intensidade de fluorescência inicial;

f_n = intensidade de fluorescência no tempo n.

Esse cálculo deve ser realizado para todas as re (triplicatas). A área líquida é calculada para a amostra ou para a solução padrão descontando-se o valor de AUC do branco.

$$\text{Área Líquida} = AUC - AUC_{\text{branco}}$$

Após obter a área líquida, realize o cálculo da capacidade antioxidant expressando-a em equivalente Trolox (TE), através da equação da reta de uma curva de calibração feita com solução Trolox descrita anteriormente.

Assim, tem-se que o valor Y da equação da reta corresponde a área líquida da amostra ou do padrão, enquanto x é o valor de ORAC, que pode ser expresso em μmol . L^{-1} TE para as amostras líquidas e μmol TE g^{-1} para amostras sólidas de extrato ou em μmol TE 100 g^{-1} de amostra em base úmida ou seca.

REFERÊNCIAS

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**. [S. I.]: FapUNIFESP (SciELO), 2010. DOI 10.1590/s0100-40422010001000033.

BOROSKI, M.; VISENTAINER, J. v.; COTTICA, S. M.; MORAIS, D. R. **Antioxidantes: princípios e métodos analíticos**, 1^a ed. Curitiba, Editora Appris, 141 p., 2015.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. [S. I.]: American Chemical Society (ACS), 2005. DOI 10.1021/jf030723c.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. L. Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. [S. I.]: American Chemical Society (ACS), 2001. DOI 10.1021/jf010586o..

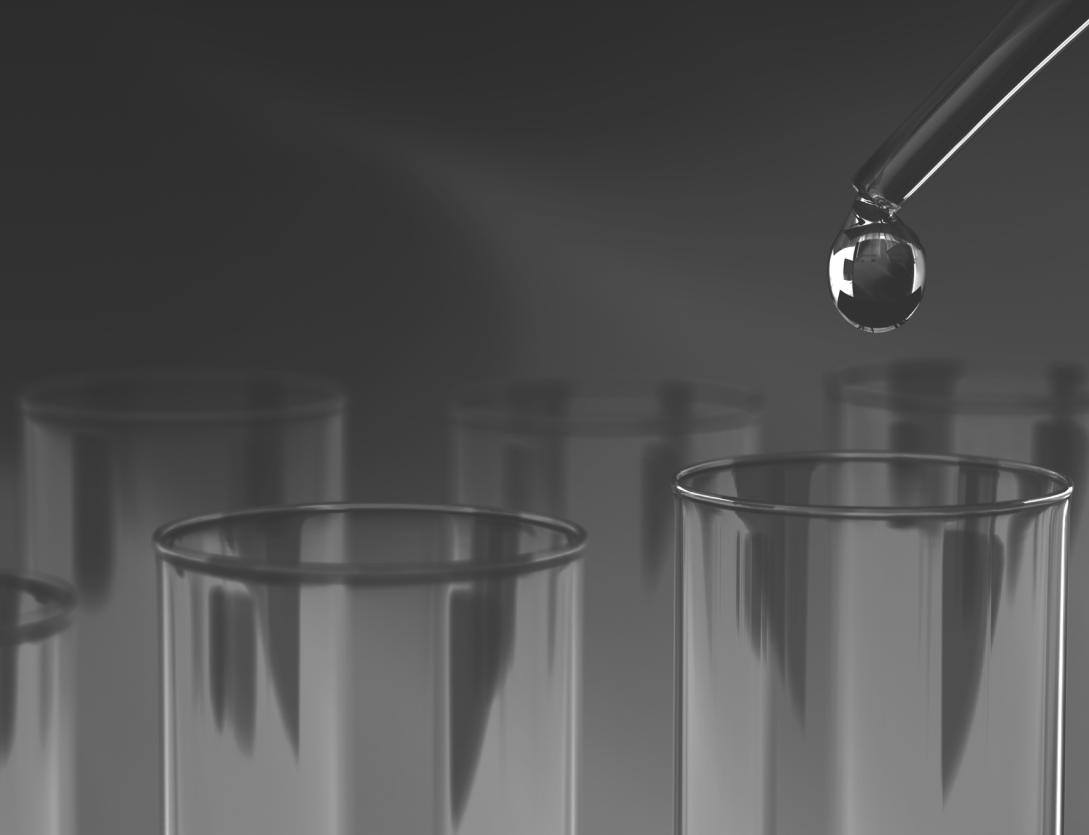
HAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U.; CROSBY, K.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; HAWKINS BYRNE, D. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**. [S. I.]: Elsevier BV, 2006. DOI 10.1016/j.jfca.2006.01.003.

ZULUETA, A.; ESTEVE, M. J.; FRÍGOLA, A. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. **Food Chemistry**. [S. I.]: Elsevier BV, maio 2009. DOI 10.1016/j.foodchem.2008.09.033.

Métodos para determinação
de capacidade

ANTIOXIDANTE

-  www.atenaeditora.com.br
-  contato@atenaeditora.com.br
-  [@atenaeditora](https://www.instagram.com/atenaeditora)
-  www.facebook.com/atenaeditora.com.br



Métodos para determinação
de capacidade

ANTIOXIDANTE

- 🌐 www.atenaeditora.com.br
- ✉️ contato@atenaeditora.com.br
- 📷 [@atenaeditora](https://www.instagram.com/atenaeditora)
- ⬇️ www.facebook.com/atenaeditora.com.br

