DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA CAPTURA DO RADICAL LIVRE DPPH•

MATERIAIS

Reagentes

- Álcool metílico P.A.
- DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl-hidrazil) (PM= 394,3) - Sigma Aldrich (D9132)
- Trolox (Hidroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) - Sigma Aldrich (238813)
- Solventes para extração
- Extratos das amostras

Equipamentos e vidrarias

- Balança analítica
- Balões volumétricos de 10, 100 e 200 mL
- Béqueres de 50 mL
- Papel alumínio
- Pipeta automática (100-1000 µL e 1000-5000 µL)
- Pipetas de pasteur (plástico)
- Tubos de ensaio
- Agitador de tubos de ensaio (vortex)
- Cubetas de vidro
- Espectrofotômetro

Preparo das soluções

A. Solução mãe de DPPH (600 µmol/L – 50 mL)

Pesar 0,0118 g de DPPH em um béquer de 30 mL, dissolver em metanol e transferir para um balão volumétrico de 50 mL, sem perdas. Completar o volume com metanol para 50 mL, homogeneizar e transferir para um fraco de vidro âmbar, devidamente etiquetado. Armazenar em geladeira por até 5 dias.

B. Solução reagente de DPPH 60 µmol /L – 100 mL

Pipetar 10 mL da solução mãe de DPPH com uma pipeta volumétrica de 10mL, transferir para um balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com metanol. Ler a absorbância dessa solução utilizando metanol como branco, a absorbância deverá estar na faixa entre 0,57 e 0,63 (controle), caso esteja fora dessa faixa preparar outra solução reagente; se necessário, refazer a solução mãe de DPPH.

C. Solução mãe de Trolox (2000 µmol/L – 100 mL)

Diluir 0,0516 g de Trolox para um volume final de 100 mL com o solvente usado na extração da amostra, homogeneizar e transferir para um frasco de vidro âmbar. Armazenar na geladeira por até 5 dias.

CURVA DE CALIBRAÇÃO

1. Pipetar os volumes listados abaixo da solução mãe de Trolox para balões volumétricos de 10 mL. Completar o volume para 10 mL com o solvente usado para extrair as amostras.

Padrão	Solução mãe (mL)	Completar para (mL)	Concentração final (µmol TE/L)
P0	0,0	10	0
P1	1,0	10	200
P2	2,0	10	400
P3	3,0	10	600
P4	4,0	10	800
P5	5,0	10	1000

2. Em 18 tubos de ensaio de 5 a 10 mL cor âmbar ou envolvidos em papel alumínio, adicionar:
   - 3,9 mL da solução reagente de DPPH (60 µmol/L)
   - 0,1 mL das soluções padrão de Trolox (P0 a P5 em triplicata)

3. Agitar por 10 segundos no vortex;

4. Repousar por 120 minutos, à temperatura ambiente (na ausência de luz);

5. Ligar o espectrofotômetro 30 minutos antes da leitura, no comprimento de onda adequado (517 nm);

6. Zerar o espectrofotômetro (auto zero) e colocar os brancos (metanol) nas duas cubetas.

7. Deixar a cubeta de referência (R) com o branco durante as leituras subsequentes.

8. Realizar leitura em espectrofotômetro a 517 nm, colocando a cubeta com solução para leitura na posição das amostras (S) do espectrofotômetro.

9. A partir dos valores de concentração e absorbância das soluções padrão, construir a curva de calibração e obter os parâmetros a (coeficiente angular), b (coeficiente linear) e r^2 (coeficiente de correlação) da reta de regressão, conforme exemplo abaixo.

Tubo	Conc (µmol/L)	Abs
1	0	0,5775
2	0	0,5780
3	0	0,5790
4	200	0,4700
5	200	0,4698
6	200	0,4703
7	400	0,3700
8	400	0,3655
9	400	0,3655
10	600	0,2400
11	600	0,2370
12	600	0,2478
13	800	0,1210
14	800	0,1205
15	800	0,1220
16	1000	0,0328
17	1000	0,0323
18	1000	0,0333

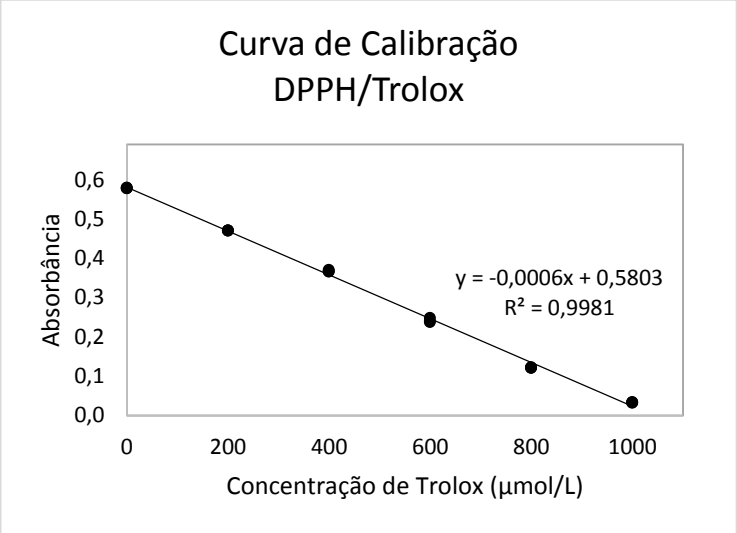

Figura 1. Curva padrão de ácido gálico (20-100 mg/L) (Os valores são fictícios, apenas para ilustração)

- A curva de calibração é obtida no Excel após inserir um gráfico de dispersão e adicionar linha de tendência. Os parâmetros da curva são calculados usando as seguintes funções do Excel:

a	=INCLINAÇÃO("Abs";"Conc")
b	=INTERCEPÇÃO("Abs";"Conc")
r^2	=(CORREL("Abs";"Conc"))^2

Sendo que "Abs" representa as células contendo os valores de absorbância, e "Conc" as que contém os valores de concentração (mg/L)

Caso r^2 seja menor que 0,99, deve-se refazer a curva de calibração.

ANÁLISE DAS AMOSTRAS

1 Em tubos de ensaio de 5 a 10 mL cor âmbar ou envolvidos em papel alumínio, adicionar (em triplicata):
- 3,9 mL da solução reagente de DPPH 60 μmol/L (verificar a absorbância dessa solução antes de usar, deve estar entre 0,57-0,63)
- 0,1 mL do extrato obtido da amostra

2 Fazer dois tubos em branco contendo
- 3,9 mL de metanol
- 0,1 mL solvente usado na extração da amostra

3 Agitar por 10 s no vortex;

4 Repousar por 120 minutos, à temperatura ambiente (na ausência de luz);

5 Ligar o espectrofotômetro 30 minutos antes da leitura, no comprimento de onda adequado (517 nm);

6 Zerar o espectrofotômetro (auto zero) e colocar os brancos nas duas cubetas.

7 Deixar a cubeta de referência (R) com o branco durante as leituras subsequentes.

8 Realizar a leitura das amostras, colocando a cubeta com solução para leitura na posição das amostras (S) do espectrofotômetro.

9 Anotar os valores de absorbância (Abs) para cada amostra e realizar os cálculos para determinar a concentração de Trolox equivalente (TE) no extrato e o teor de TE no alimento

REFERÊNCIA

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

SANCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Oxford, v. 76, n. 2, p. 270-276, 1998.