



Análises bioquímicas de frutas

Dra. Paula Porrelli Moreira da Silva
Laboratório de Frutas e Hortaliças - ESALQ/USP

05 de Maio de 2023

Contextualização



Compostos bioativos em frutas

1. Metabólitos secundários das plantas
2. Normalmente conferem cores às plantas → atração de pássaros, insetos e animais → polinização, germinação e dispersão de sementes
3. Nas plantas conferem proteção a pragas, condições de estresse (luz UV, temperaturas extremas)
4. Se classificam de acordo com a sua rota biossintética
 - a. Todos possuem pelo menos um anel aromático com um grupo hidroxila ligado a ele
5. Grupos principais:
 - a. **ácidos fenólicos**
 - b. **Flavonoides**
 - c. outros fenólicos - estilbenos, ligninas e taninos

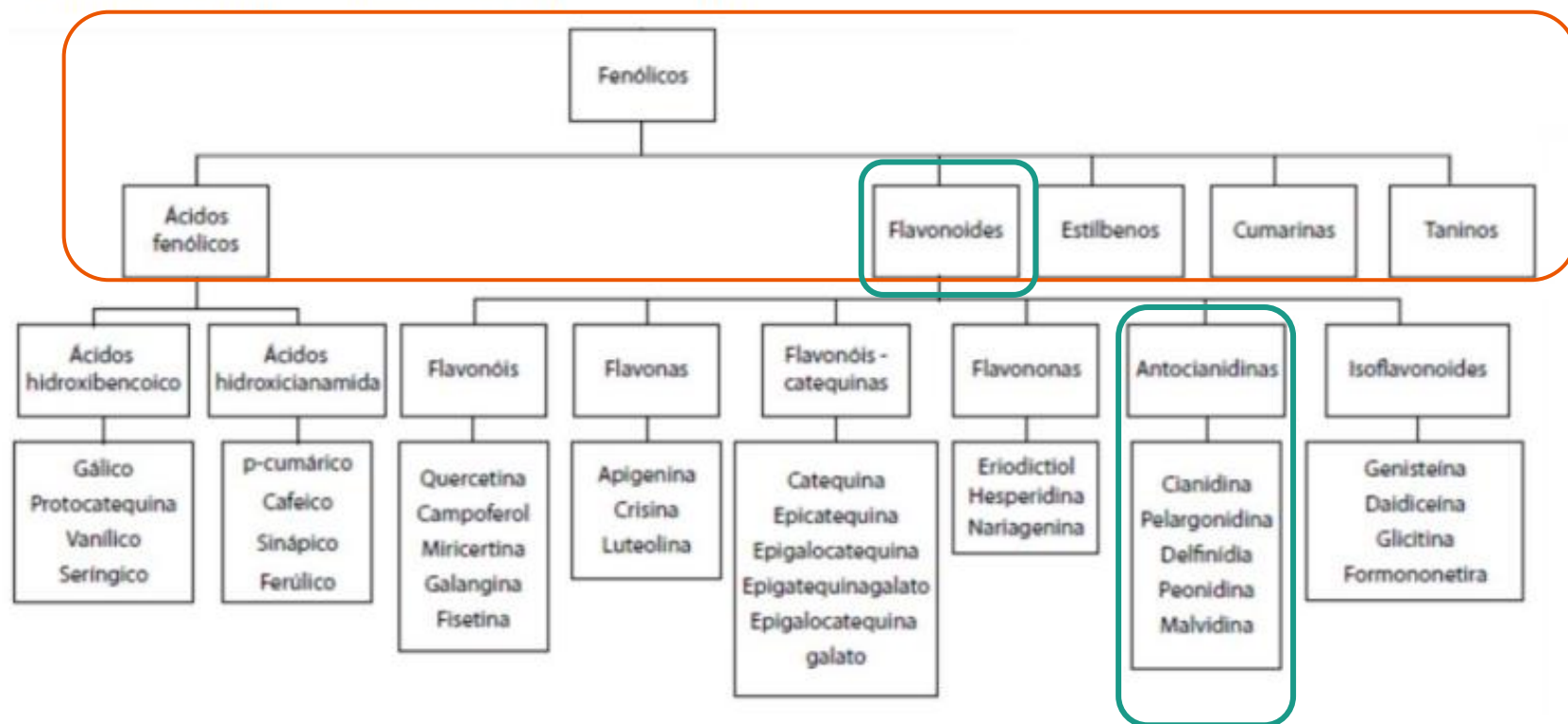
Contextualização



Antioxidantes

1. Antioxidante = substância que em baixas concentrações retarda ou previne a oxidação da matéria-prima
2. Antioxidantes naturais:
 - a. Tocoferóis
 - b. Vitamina C - ácido ascórbico
 - c. Carotenóides → pigmentos amarelos/laranjas, participam da fotossíntese
 - Possuem caráter lipofílico - não diluem em água
 - a. **Compostos fenólicos** → maior classe de compostos bioativos alimentares
 - presentes principalmente em frutas e hortaliças, seus derivados e alguns grãos

Figura 1. Classificação dos compostos fenólicos.



Fonte: adaptado de LIU (2004).

Contextualização



Capacidade antioxidante de compostos bioativos

1. Capacidade antioxidante = estabilização dos radicais livres presentes nas matérias-primas.
2. Vários mecanismos de ação:
 - a. Doação de um átomo de hidrogênio de um grupo hidroxila (OH) da sua estrutura aromática
 - b. Transferência de um elétron $\rightarrow$ 1 elétron é transferido para o radical livre
 - c. Quelando metais de transição, como o Fe^{2+} e o Cu^+
3. Além de prever o potencial antioxidante do alimento (saudabilidade), a análise é importante para avaliar a proteção contra a oxidação e a deterioração do alimento

Extratos de frutas para análise (inicial)

Antocianinas, Compostos fenólicos, DPPH, ABTS

1. Homogeneização - moinho analítico
 - fruta congelada ou *in natura*
 - liofilizado ou desidratada: quantificar diretamente.
1. Fruta (gramas) + 10 mL etanol 80%
 - pré-teste de concentração
1. Misturar em vórtex
2. Descansar 24 h sob refrigeração

5. Centrífuga refrigerada:

- 10000 g
- 15 minutos
- 4°C

6. Sobrenadante → colocar em frasco âmbar

7. Manter sob congelamento



Extratos de frutas diluído

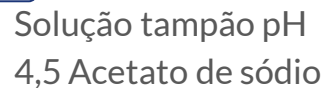
DPPH, ABTS, e algumas vezes para Compostos fenólicos



1. Diluição do extrato inicial em outros frascos âmbar codificados
2. 0,35 mL extrato inicial + 5 mL etanol 80%
 - Concentração do extrato diluído: 0,007 g de fruta por cada 1 mL de solução
3. Misturar bem.
4. Armazenar sob congelamento até o momento da análise



- Metodologia baseada na alteração da cor de antocianinas pelo pH do meio



<https://www.canalciencia.ibict.br/ciencia-em-sintese/1/ciencias-exatas-e-da-terra/167-antocianinas-corantes-naturais-para-alimentos-cosmeticos-tintas-e-experiencias-para-ensinar-e-aprender-quimica>

ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS TOTAIS

Pré-testes de quantificação de extrato de fruta

Tabela 1: Sugestão para pré-testes de diluição da amostra (extrato de fruta e soluções tampão).

FD (fator de diluição) FD = vol. final/vol amostra	Volume amostra centrifugada (mL)	Volume tampão (mL) – pH 1,0 e pH 4,5
25	0,2	4,8
12,5	0,4	4,6
8,333	0,6	4,4
6,25	0,8	4,2
5	1,0	4,0

Volume final: Máx 5 mL
Usar os mesmos volumes
para os dois pHs
Branco: etanol 80% +
tampão
Esperar 20 a 50 min
Leitura: 520 e 700 nm
Resultado: 0,2 e 1,4 AU



ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS TOTAIS



Análise ex. Grumixama

- 1 mL extrato de fruta (0,1 g/mL)
- 4 mL de tampão (pH 1 e pH 4,5)
- homogeneizar e esperar até 50 min
- leitura em espectrofotômetro nos 2 comprimentos de onda e nos 2 pHs

Cálculo dos resultados: mg L⁻¹ de equivalente cianidina 3-glicosídeo

$$\text{Antocianinas totais} = \frac{A \times PM \times FD \times 10^3}{E \times 1}$$

Onde:

A = leitura de absorbância: $A = [(A_{520} - A_{700}) \text{ pH } 1,0] - [(A_{520} - A_{700}) \text{ pH } 4,5]$

PM = peso molecular do padrão: cianidina 3-glicosídeo = 449,2 g/mol

FD = fator de diluição:

$$FD = \frac{\text{Volume de solução depois de diluída}}{\text{Volume de solução antes de diluída}}$$

10³ = fator de correção: g para mg L⁻¹

E = coeficiente de extinção molar = 26900 para cianidina-3-glicosídeo (L mol⁻¹ cm⁻¹)

1 = comprimento da trajetória em cm (da cubeta)

Compostos fenólicos totais



SINGLETON, V.L.; ROSSI Jr., J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture, v.16, n.3, p.144-158, 1965.

- **Quantificação de: flavonóides, antocianinas e compostos fenólicos presentes nas amostras**
- Soluções:
 - ácido gálico → para a curva padrão → preparar no dia
 - Folin-Ciocalteu 10% e carbonato de sódio anidro 4% → usadas na curva padrão e na quantificação
- Os resultados da análise dependerão de uma curva padrão bem feita

Compostos fenólicos totais

Curva padrão



Tabela 4: Concentração de cada ponto da curva padrão de ácido gálico

Concentração (µg/mL)	Solução padrão (mL)	Etanol 80% (mL)	Volume total (mL)
10	0,1	4,9	5,0
20	0,2	4,8	5,0
40	0,4	4,6	5,0
60	0,6	4,4	5,0
80	0,8	4,2	5,0
100	1,0	4,0	5,0

obs: 0 = branco = etanol 80%

Triplicata

Branco: etanol 80% + reagentes

- 0,5 mL solução padrão ácido gálico
- 2,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu 10%
- agitar e esperar 5 minutos
- 2,0 mL carbonato de sódio 4%
- agitar
- 2 h no escuro
- absorvância a 765 nm

Curva padrão - compostos fenólicos

R² - acima de 0,98

Equação $y = ax + b$

y = leitura

x = concentração de ácido gálico

Curva padrão			
Concentração do. gálico (µg/mL)	rep	leitura 765 nm	Média
10	1	0,145	0,145
	2	0,145	
	3	0,144	
20	1	0,224	0,225
	2	0,223	
	3	0,228	
40	1	0,444	0,452
	2	0,451	
	3	0,461	
60	1	0,681	0,688
	2	0,687	
	3	0,696	
80	1	0,944	0,947
	2	0,937	
	3	0,959	
100	1	1,153	1,158
	2	1,157	
	3	1,164	

Concentração (µg/mL)	leitura 765
10	0,14
20	0,23
40	0,45
60	0,69
80	0,95
100	1,16

R² = 0,988

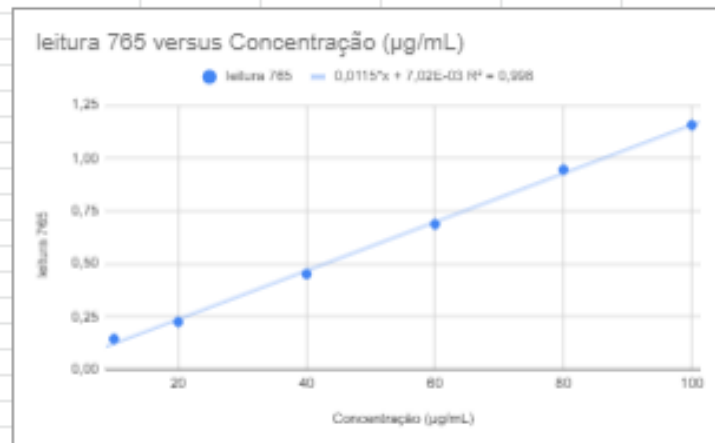
$y = 0,0115 \cdot x + 0,00702$

y = leitura 765

x = concentração do gálico

Obs: equação 'invertida'

$x = (y - 0,00702) / 0,0115$



Compostos fenólicos totais

Análise das amostras



Triplicata

Branco: etanol 80% + reagentes

- 0,5 mL extrato (inicial ou diluído)
- 2,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu 10%
- agitar e esperar 5 minutos
- 2,0 mL carbonato de sódio 4%
- agitar
- 2 h no escuro
- absorbância a 765 nm

Análise										
amostra	rep	[] extrato diluído (g fruta / solução extratora)	Leitura 765 nm	µg AG/0,5mL	µg AG/mL	µg AG/g	mg AG/g	mg AG/100 g fruta	média	DP
x	1	0,011	0,666	57,30	114,61	10315,50	10,32	1031,55	1047,73	3,26
	2	0,011	0,677	58,26	116,52	10487,69	10,49	1048,77		
	3	0,011	0,674	58,00	116,00	10440,73	10,44	1044,07		
	4	0,011	0,678	58,35	116,69	10503,35	10,50	1050,33		

CAPACIDADE ANTIOXIDANTE: MÉTODO DO SEQUESTRO DO RADICAL LIVRE ESTÁVEL DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

MENSOR, L.L.; MENEZES, F.S.; LEITÃO, G.G.; REIS, A.S.; SANTOS, T.C.; COUBE, C.S.; LEITÃO, S.G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. Phytotherapy Research, London, v. 15, n. 2, p. 127-130, 2001. <https://doi.org/10.1002/ptr.687>

- Peroxidação do 2,2-difenil-1-picrylhidrazil
- Método químico, rápido e prático
- DPPH estável → cor violeta - absorção entre 500 e 520 nm
- DPPH é reduzido pelo compostos bioativo - presença de um doador de hidrogênio ou elétron
 - decréscimo da absorbância
- Maior sensibilidade a compostos hidrofílicos e a solventes orgânicos
- 10 min para ler a metodologia
- Soluções → fazer no dia da análise
 - DPPH 0,3 nM
 - Trolox 2000 µM

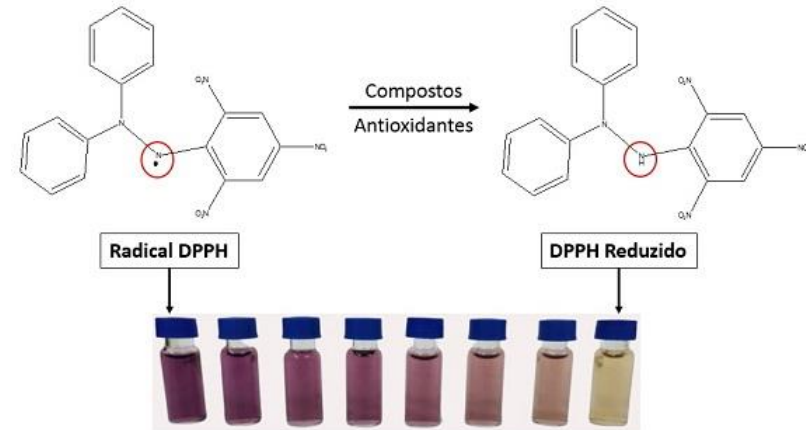


Figura 1: Reação de redução do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil a 2,2-difenil-picril-hidrazina, através da ação de compostos antioxidantes.

CAPACIDADE ANTIOXIDANTE: MÉTODO DO SEQUESTRO DO RADICAL LIVRE ESTÁVEL DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

Curva padrão



Tabela 3: Concentração de cada ponto da curva padrão da análise de DPPH

Concentração final no frasco (μM)	Solução padrão de trolox (mL)	Etanol 80% (mL)	Volume total (mL)
0	0	5	5
100	0,25	4,75	5
200	0,5	4,5	5
300	0,75	4,25	5
400	1,0	4,0	5

Triplicata

Branco: etanol 80% + reagentes

- 1,25 mL de etanol 80%
- 0,25 mL de solução padrão referente a cada diluição
- 1 mL da solução DPPH 0,3 mM
- misturar e esperar 40 min
- Leitura a 518 nm



Concentração (µM)	rep	518 nm	Média 518 nm
0	1	1,065	1,028
	2	1,014	
	3	1,005	
100	1	0,791	0,786
	2	0,789	
	3	0,777	
200	1	0,601	0,585
	2	0,588	
	3	0,566	
300	1		0,359
	2	0,352	
	3	0,366	
400	1	0,267	0,119
	2	0,116	
	3	0,121	
*outlier			

Concentração trolox (µM)	leitura 518 nm
0	1,028
100	0,785667
200	0,585
300	0,359
400	0,1185

Equação da reta: $y = -2,25 \cdot 10^{-3} x + 1,02$

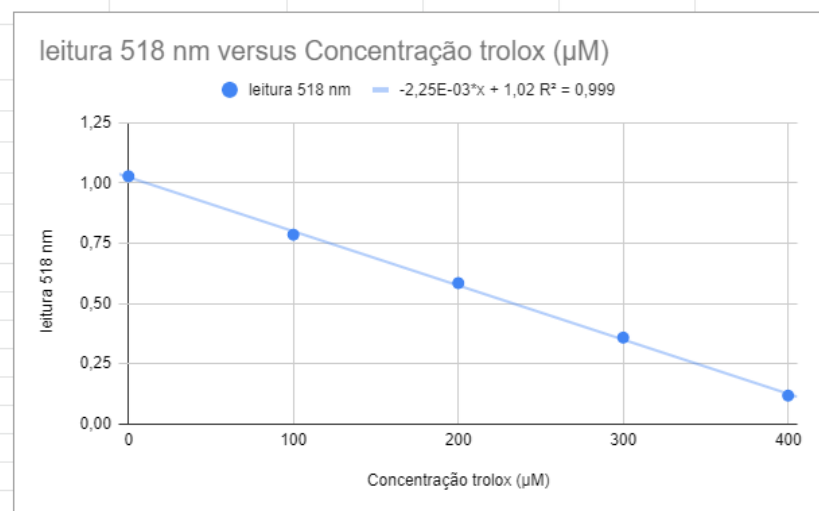
R² = 0,999

y= leitura 518

x= concentração de trolox (µM)

Obs: equação 'invertida'

$x = ((1,02 - y) \cdot 1000) / 2,25$



Cálculo da curva padrão de DPPH

Análise das amostras



CAPACIDADE ANTIOXIDANTE: MÉTODO DPPH

1º ETAPA - amostras

- 1,25 mL de etanol 80%
- 0,25 mL de extrato diluído
- 1 mL da solução DPPH 0,3 mM

Misturar - 40 minutos no escuro

Ler a 518 nm

Zerar o espec com etanol 80%

2º ETAPA - tubos controle

- 0,25 etanol 80%
- 1,25 mL de etanol
- 1,0 mL da solução DPPH 0,3 mM

Misturar - 40 minutos no escuro

Ler a 518 nm

Zerar o espec com etanol 80%

3º ETAPA - branco da amostra → altamente pigmentados

- 0,25 mL de extrato diluído
- 2,25 mL de etanol
- idem anterior



CAPACIDADE ANTIOXIDANTE: MÉTODO DPPH

Cálculo

Amostra	Rep	518 nm	Concentração trolox (µM) de extrato diluído	[] extrato diluído (g / solução extratora)	µM Trolox g-1	mM Trolox g-1	média geral	DP
x	1	0,618	178,67	0,011	16081,60816	16,08160816	18,88	0,21
	2	0,544	211,56	0,011	19041,90419	19,04190419		
	3	0,546	210,67	0,011	18961,89619	18,96189619		
	4	0,554	207,11	0,011	18641,86419	18,64186419		

usar a equação da reta obtida na curva padrão

CAPACIDADE ANTIOXIDANTE: método do radical ABTS

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, Nova York, v. 26, n. 9, p. 1231-1237, 1999.

- Capacidade de remoção de radical orgânico (2,20-azino-bis (ácido 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfônico)
- $ABTS^{\bullet+}$: composto estável, altamente solúvel em água, absorbância máxima a 414 nm
- Baseia-se na habilidade dos antioxidantes em capturar o cátion $ABTS^{\bullet+} \rightarrow$ provocando decréscimo na absorbância
 - redução do $ABTS^{\bullet+}$ a ABTS $\rightarrow$ perda de cor
- Vantagem: pode ser usado para amostras **lipossolúveis e hidrossolúveis**
- É um teste rápido, prático e reprodutível



Imagem: EMBRAPA, 2007

https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAT/10225/1/Cot_128.pdf

CAPACIDADE ANTIOXIDANTE: método do radical ABTS

ATENÇÃO: PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES

1 DIA DE ANTECEDÊNCIA

Solução estoque (aquosa) de ABTS 7 mM

Solução aquosa de persulfato de potássio
140 mM

Solução de radical ABTS+•

- 5 mL da solução estoque ABTS 7 mM
- 88 µL da solução aquosa de persulfato de potássio 140 mM
- manter no escuro por pelo menos 16 h

NO DIA DA ANÁLISE

Solução de radical ABTS+• diluída - 100 mL

- 1 mL da solução preparada na 1ª etapa e completar o volume com **água destilada**
- ler a 734 nm
- corrigir a absorbância para leitura a 0,7:
 - acrescentar água se $> 0,7$
 - acrescentar mais solução de radical se $< 0,7$

Solução padrão de Trolox 2000 µM



CAPACIDADE ANTIOXIDANTE: método do radical ABTS

Curva padrão



Tabela 4: Pontos de diluição da curva padrão da análise de capacidade antioxidante pelo método radical ABTS

Concentração final no tubo (μM)	Solução padrão de trolox (mL)	Etanol 80% (mL)	Volume total (mL)
0	0	5	5
100	0,25	4,75	5
500	1,25	3,75	5
1000	2,5	2,5	5
1500	3,75	1,25	5
2000	5,0	0	5

Triplicata

- 20 μL de cada diluição da solução padrão de Trolox
- 2 mL de Solução radical ABTS+

Misturar e esperar 6 minutos

Ler a 734 nm

zerar o equipamento com água destilada



CAPACIDADE ANTIOXIDANTE: método do radical ABTS

Análise das amostras

1. Amostras (A) = triplicata

- 20 μ L de extrato diluído
- 2 mL de Solução radical ABTS+

Misturar em vórtex por 30 segundos

Esperar 6 minutos

Ler em espectrofotômetro a 734 nm

zerar com água

2. Controle

- 20 μ L de água destilada
- 2 mL de Solução radical ABTS+

Misturar em vórtex por 30 segundos

Esperar 6 minutos

Ler em espectrofotômetro a 734 nm

zerar **com** água



CÁLCULO: IDEM DPPH
curva e análise



**Obrigada pela
atenção!**

pporrelli@alumni.usp.br

DÚVIDAS?

Referências

LIU, R.H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. J. Nutr., 134(12 Suppl): 3479S-3485S, 2004.

SUCUPIRA, Natália Rocha et al. Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. Journal of Health Sciences, v. 14, n. 4, 2012.

<http://www.neplame.univasf.edu.br/atividade-antioxidante.html>

<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/188244/1/CT-421-1642-final.pdf>

https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAT/10225/1/Cot_128.pdf