

Ciência de Alimentos

ADAPTAÇÃO DO MÉTODO DPPH[•] PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM GOMA XANTANA

**Mirian Tavares da Silva*, Cristina Soares Gettens, Letícia Marques de Assis, Rosane da
Silva Rodrigues, Patrícia Diaz de Oliveira, Angelita da Silveira Moreira.**

*Laboratório de Fisiologia Pós-colheita, Curso Superior de Tecnologia em Agroindústria, Instituto federal Sul-
Rio-Grandense, Campus Pelotas Visconde da Graça, Pelotas, RS.*

*E-mail: miriantavaressilva@yahoo.com.br

RESUMO – Estudos recentes tem atraído a atenção para o potencial antioxidante dos polissacarídeos, dentre os quais destaca-se a xantana, um exoheteropolissacarídeo produzido por bactérias do gênero *Xanthomonas*, espessante e estabilizante com propriedades reológicas e estabilidade excepcionais. Para determinar a atividade antioxidante de variadas substâncias foram desenvolvidos diversos métodos, como o baseado na captura do radical orgânico DPPH[•] (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) por antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorbância a 517nm. Há uma grande dificuldade para utilização desse método na detecção do potencial antioxidante da xantana em função da restrita solubilidade e elevada viscosidade da mesma. A xantana é insolúvel em alcoóis e em solução hidroalcoólica com elevado teor de álcool. Já o radical DPPH[•] só é solúvel em solventes orgânicos. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo a adaptação do método de captura do radical DPPH[•] para aplicação em soluções de xantana. Nos ensaios realizados foram alterados solvente da solução DPPH[•], proporções entre solução de amostra:solução DPPH[•], temperatura e tempo de reação. O ensaio que englobou a utilização de etanol como solvente para o radical DPPH[•], uso da proporção xantana:solução do radical DPPH[•] 2:1 (v/v), 35 °C e 60 min proveu os melhores resultados, 8,65%, 13,6% e 25,5% para soluções aquosas de xantana a 0,3%, 0,5% e 1% (m/v), respectivamente. Os resultados atestam a potencialidade do método, embora ainda sejam necessários mais testes para comprovação de sua aplicabilidade.

Palavras-chave: Polissacarídeo, DPPH[•], etanol, proporção amostra:solvente, tempo, temperatura.

1. INTRODUÇÃO

Existem cada vez mais evidências indicando que espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas por luz solar, luz ultravioleta, radiação ionizante, reações químicas e processos metabólicos podem ter efeitos patológicos, tais como danos ao DNA, carcinogênese e degeneração celular relacionada com o envelhecimento (YASSER, 2007). Dessa forma, pesquisas buscam alternativas para reduzir os efeitos prejudiciais do excesso de EROs e melhorar a capacidade antioxidante do organismo, como meio de prevenção de enfermidades e suas complicações. Segundo Shami & Moreira (2004), substâncias antioxidantes podem ser definidas como compostos químicos que inibem oxidações ou que, quando presentes em baixa concentração, comparada à do substrato oxidável, diminuem ou inibem significativamente a oxidação do mesmo.

Recentemente, tem sido demonstrado que alguns polissacarídeos desempenham um papel importante como antioxidantes. Dentre esses destaca-se a xantana, um exoheteropolissacarídeo produzido por bactérias fitopatogênicas do gênero *Xanthomonas* (QIAN, 2007). Bastante conhecida como agente espessante com propriedades reológicas e estabilidade excepcional, obteve bons resultados quanto ao potencial redutor de radicais livres em sistemas de emulsões óleo em água utilizando óleo de girassol (YASSER, 2007). Pesquisas apontam, ainda, que modificações químicas potencializem a sua atividade antioxidante, como observado por XIONG et al. (2013) e DELATTRE et al. (2014).

Diversos métodos têm sido desenvolvidos para avaliação do potencial antioxidante das substâncias; esses métodos podem ser baseados na captura do radical peroxila (ORAC, TRAP), poder de redução do metal (FRAP; CUPRAC), captura do radical hidroxila (método de desoxirribose), captura de radical orgânico (ABTS, DPPH[•]), quantificação de produtos formados durante a peroxidação de lipídios (TBARS, oxidação do LDL, co-oxidação do caroteno), etc (ARUOMA, 2003).

O método DPPH[•], desenvolvido por Blois (1958), sofreu várias modificações ao longo dos anos, sendo a adaptação de Brand-Williams (1995) uma das mais utilizadas como ponto de partida para adaptações de uso em diferentes amostras. O princípio do método baseia-se na transferência de elétrons onde, por ação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar, o radical DPPH[•] (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), que possui cor púrpura e elevada absorvância a 517nm, é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com consequente redução da absorção, podendo a mesma ser monitorada espectrometricamente. A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres. A grande dificuldade para utilização desse método na detecção da atividade antioxidante da xantana está na sua solubilização. A xantana é solúvel preferencialmente em água, onde forma soluções viscosas mesmo em pequenas concentrações; ou em soluções hidroalcoólicas de elevada proporção aquosa. Em soluções hidroetanólicas, por exemplo, o polímero começa a precipitar em concentrações alcoólicas a partir de 37% (FLAHIVE III, 1994). Já o radical DPPH[•] só é solúvel em solventes orgânicos, sendo o metanol o mais utilizado. Sendo assim, para promover a reação entre a xantana e o radical DPPH[•] é necessário usar solventes diferentes para amostra e radical, além de equacionar as proporções utilizadas para que a fração aquosa seja superior. A alta viscosidade e opacidade das soluções formadas pela xantana dificultam ainda mais a utilização de

espectrofotometria, meio pelo qual se verifica a absorvância na técnica. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo a adaptação do método de análise antioxidante DPPH[•] para utilização em soluções de xantana.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

Foi utilizada xantana da marca Farmaquímica, lote nº M1201, álcool etílico P.A. Synthi e reagente DPPH[•] (2,2-Diphenyl-1-picryl-hidrazil) (PM = 394,3) marca Sigma.

2.2. Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical livre DPPH[•]

Utilizou-se a metodologia clássica desenvolvida por Blois (1958), modificada por Brand-Williams (1995), como base para determinação da atividade antioxidante em goma xantana pela captura do radical DPPH[•]. Foram realizados dois ensaios com diferentes concentrações e proporções de xantana e DPPH[•], e temperatura de reação. Em ambos os casos o solvente utilizado foi etanol.

No primeiro ensaio (E1), uma alíquota de 0,1 mL de cada solução aquosa de xantana, 0,3% e 0,5% (m/v), foi adicionada a 3,9 mL da solução do radical DPPH[•] (0,06 mM em etanol), obtendo uma mistura de proporção 1:39 que foi homogeneizada em agitador de tubos. Utilizou-se 0,1 mL de etanol na solução controle com 3,9 mL do radical DPPH[•]. As amostras foram mantidas na ausência de luz, à temperatura ambiente (23±2°C), durante 30 e 60 minutos, sendo as medidas de absorvância realizadas a 517nm.

No segundo ensaio (E2), juntou-se 3 mL de cada solução aquosa de xantana, nas concentrações de 0,3%, 0,5% e 1% (m/v), com 1,5 mL (2:1 v/v) da solução etanólica de DPPH[•] (0,06 mM). As amostras foram mantidas a 35 °C durante 60 minutos. Após o tempo de reação, adicionou-se 5 mL de álcool etílico, de modo a precipitar a xantana. Procedeu-se então à filtração e a leitura da absorvância do filtrado a 517nm.

As leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV-VIS marca PG Instrumentes, modelo T90. Os resultados foram expressos em percentual de inibição (% I) calculados através da Equação 1.

Equação 1. $\% I = [AC - AA / AC] \times 100$.

Onde:

AB = Absorvância do controle

AA = Absorvância da amostra

2.3. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média e coeficiente de variação (CV), sendo os dados submetidos à análise de variância (ANOVA), teste F, e teste de Tukey para comparação de médias, ao nível de 5% de significância, utilizando-se o programa SASM-Agri (CANTERI, 2001).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas tabelas 1 e 2 estão os resultados obtidos (em % de inibição) para a atividade antioxidante de xantana utilizando-se a metodologia de sequestro do radical DPPH^{*}, com as adaptações testadas (E1 e E2).

Tabela 1. Atividade antioxidante da goma xantana (em % de inibição) pelo método de sequestro do radical DPPH, adaptado em relação à concentração da solução de xantana, proporção solução de xantana:solução de DPPH* e temperatura.

	Concentração da solução aquosa de xantana (% m/v)	Proporção solução aquosa xantana: solução etanólica DPPH	Atividade antioxidante	
			30 min	60 min
Ensaio 1	0,3	1:39	0,37 ^a	0,30 ^d
	0,5		-0,03 ^a	0,97 ^d
Ensaio 2	0,3	2:1	--	8,65 ^c
	0,5		--	13,6 ^b
	1		--	25,5 ^a

Coefficiente de variação (%) ensaio 1: 406,81 (30 min), 130,59 (60 min); ensaio 2: 3,65 (60 min). Temperatura de reação E1 23 °C; E2 35 °C.

¹Médias (n = 6 para E1 e n= 3 para E2) com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

No E1 verificou-se que diferentes concentrações de xantana não diferem significativamente em relação à atividade antioxidante em ambos os tempos analisados. Os elevados C.V. permitem inferir que a precipitação da xantana observada no estágio inicial da reação interfere negativamente na reação entre os compostos. A xantana, quando em presença de elevadas concentrações de álcool, como a utilizada neste ensaio, precipita rapidamente, indisponibilizando os grupamentos reativos para captura do radical livre.

A atividade antioxidante da xantana pelo método adaptado conforme ensaio 2 (E2) acompanhou o aumento da concentração da solução de xantana. O aumento do volume da amostra (solução polimérica) em relação à solução de DPPH^{*} no E2 evitou a precipitação prévia da xantana, possibilitando à mesma reduzir o radical DPPH^{*}. A elevação da temperatura média de reação de 23°C para 35°C aumentou a energia cinética das moléculas, fazendo com que essas se movimentassem mais, acelerando a reação.

A elevada viscosidade da solução de xantana, bem como sua opacidade, são fatores interferentes na leitura da absorbância. Assim, a precipitação e filtração da solução após a reação resultaram em uma solução límpida, sem interferentes.

Não foi encontrada literatura acerca da determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH' para xantana de forma isolada. Yasser (2007) verificou percentual de inibição de 60%, do radical DPPH após 60 minutos de reação a temperatura ambiente, para emulsões de óleo de girassol em água (pH 7) contendo 0,02% de xantana na emulsão. Este resultado é bastante superior ao deste estudo. Contudo, deve-se considerar que o óleo de girassol contém tocoferóis, fosfolipídios (lecitina) e β -caroteno, entre outras substâncias (TELLES, 2006) capazes de interferir no resultado.

Os resultados obtidos no E2 indicam a potencialidade da aplicação do método de captura do radical DPPH' em xantana. Para comprovação da eficiência desse método são necessários maiores estudos que envolvam, por exemplo, o aumento da concentração do radical DPPH na solução alcoólica, visto que o teor alcoólico da solução de reação não pode ser elevado.

4. CONCLUSÃO

A adaptação do método DPPH' para verificação da atividade antioxidante da goma xantana utilizando-se proporção 2:1 para amostra em meio aquoso: DPPH' em etanol, temperatura a 35°C, tempo de reação de 60 minutos e precipitação da amostra ao final da reação, onde se obtém após filtração uma solução límpida para leitura da absorbância, mostrou resultados promissores. Outros testes, que comprovem a eficiência do método, são ainda necessários.

6. REFERÊNCIAS

- ARUOMA, O. I. Methodological characterizations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. **Mutation Research**, v.9-20, p.523-524, 2003.
- CANTERI, M. G., ALTHAUS, R. A., VIRGENS FILHO, J. S., GIGLIOTI, E. A., GODOY, C. V. SASM - Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scoft - Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, V.1, N.2, p.18-24. 2001.
- DELATTRE, C. et al. Antioxidant activities of a polyglucuronic acid sodium salt obtained from TEMPO-mediated oxidation of xanthan. **Carbohydrate Polymers**. V. 116, p. 34-41, 2014.
- FLAHIVE, J. J., FOUFOPOULOSA, A. & ETZEL, M. R. Alcohol precipitation of xanthan gum from pure solutions and fermentation broths. **Separation Science and Technology**. V. 29, n. 13, p. 1673-1687, 1994.
- YASSER F. M. KISHK & HANAN M. A. Al-Sayed. Free-radical scavenging and antioxidative activities of some polysaccharides in emulsions. **LTW**, v.40, p. 270-277. 2007.
- QUIAN, F; AN, L; WANG, M; LI, C; LI, X. Isolation and characterization of a xanthan-degrading Microbacterium sp. strain XT11 from garden soil. **Journal of Applied Microbiology**. V. 102, p 1362-1371, 2007.

SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição**, v.17, n.2, 2004.

TELLES, Michele Marcon. Caracterização Dos Grãos, Torta E Óleo De Três Variedades De Girassol (Helianthus Annuus L.) E Estabilidade Do Óleo Bruto. **Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos)** - Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, p. 12-13, 2006.

XIONG, Xiaoying. et. al. Preparation and antioxidant activity of xanthan oligosaccharides derivatives with similar substituting degrees. **Food Chemistry**. V. 164, n. 1, p. 7-11, 2014.