MÉTODOS ANALÍTICOS PARA QUANTIFICAR A HABILIDADE DE QUELAR ÍONS DE METAIS DE TRANSIÇÃO (FE^{2+} E CU^{2+}): VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO EM EXTRATOS DE CAFÉ

Vitor Rafael Alvarenga Brizola (PROVIC/UEPG), Jânio Sousa Santos, Daniel Granato (Orientador), e-mail: brizolavitor@hotmail.com
Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Engenharia de Alimentos

Ciências Agrárias, Engenharia de Alimentos

Palavras-chave: Antioxidante, Compostos fenólicos, quelante.

Resumo
Afim de padronizar análises experimentais para quantificar a habilidade de quelar Fe^{2+} e Cu^{2+}, analisou-se cafés brasileiros (n=20) como um estudo caso em relação a sua atividade antioxidante usando métodos convencionais (DPPH e FRAP) e o conteúdo fenólico total (TPC). Complementarmente, analisou-se a validação dos dois métodos. Em resumo, ambos micro análises podem ser usadas para rastreio da habilidade de extratos a base de plantas para quelar Fe^{2+} e Cu^{2+} *in vitro*.

Introdução

Os radicais livres, em especial as espécies reativas de oxigênio (ROS), podem reagir com compostos químicos presentes nas células de diversos tecidos, portanto, causam danos via processo de oxidação-redução. Nesse sentido, os antioxidantes podem oferecer resistência contra o processo oxidativo induzido pelas ROS por eliminação dos radicais livres e outras espécies reativas não-radicalares, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (HALLIWELL & GUTTERRIDGE, 2007). O peróxido de hidrogênio por si só não é muito reativo, mas em condições fisiológicas, pode atravessar membranas celulares e gerar íons hidroxila (OH^-) em presença de metais de transição (Fe^{+2} ou Cu^{+2}), via reação de Fenton e Haber-Weiss. Portanto, remover H_2O_2 e metais de transição de células e sistemas contendo alimentos é essencial para garantir a estabilidade oxidativa.

A capacidade de quelar metais de transição é considerada um mecanismo secundário para estimar a "atividade antioxidante" de um extrato/composto e estudos recentes demonstraram repetidamente que alguns metais de transição, especialmente Fe^{2+} e Cu^{2+}, estão envolvidos no desenvolvimento de algumas doenças degenerativas não transmissíveis , como a doença de Alzheimer, Parkinson e Wilson também assim como doenças cardiovasculares e estresse oxidativo (DUSEK et al. 2015).

Materiais e Métodos

Amostras de café e procedimento de extração
Um total de n = 20 amostras de café (*Coffea arabica*) produzidas em diferentes locais do Brasil foram analisados neste estudo. Extração 1:10 (m/v) à 85ºC por 10 minutos sob agitação, água ultrapura como solvente.

Conteúdo fenólico total
O teor fenólico total (TPC) foi quantificado usando o teste de Prussian Blue como descrito por Margraf et al. (2015). Os resultados foram expressos como mg de equivalentes de ácido gálico/L de café (mg GAE/L).

Habilidade de quelar Fe^{2+} e Cu^{2+}

A capacidade dos extratos para quelar Fe^{2+} foi avaliada utilizando o método colorimétrico proposto por Carter (1971), com modificações. A capacidade dos extratos de café para quelar Cu^{2+} foi avaliada utilizando o método que emprega violeta de pirocatecol (PV) como agente cromógeno (SAIGA et al. 2003). Os resultados foram expressos em mg equivalentes de EDTA/L de café (mg EDTAE/L).

Repetitividade, reprodutibilidade, linearidade e recuperação

Os valores de *p* abaixo de 5% foram considerados significativos (GRANATO et al. 2014). A recuperação foi medida pela leitura n = 12 repetições e o intervalo de confiança ± 95% foi calculado usando software Statistica v. 7 (Statsof, EUA).

Atividade antioxidante

Captura de 2,2-difenil-1-picrilidrazilo (DPPH)

A atividade de sequestrar radicais livres através do radical DPPH foi avaliada como descrito por Zheng et al. (2015), com condições propostas por Granato et al. (2014). Os resultados foram expressos como mg de equivalentes de ácido ascórbico por litro de café (mg AAE/L).

Poder antioxidante de redução férrica (FRAP)

O poder antioxidante de redução férrica (FRAP) foi quantificado usando o método proposto por Benzie e Strain (1996), com pequenas modificações. Os resultados foram expressos em mg equivalentes de ácido ascórbico por litro (mg AAE/L).

Análises estatísticas

Os resultados são expressos como as médias seguidas pelo desvio padrão de três leituras. Teste de Grubb (α = 0,05) foi usado para verificar possíveis resíduos. A análise de correlação baseada no coeficiente de correlação de Pearson (*r*) foi realizada para medir o grau de associação entre as variáveis emparelhadas. Statistica v. 7 (Statsoft, EUA) e Ação v. 2.9 (Statcamp, Brasil) foram utilizados para análises estatísticas.

Resultados e Discussão

Antes de analisar as amostras de café, os métodos de capacidade de quelar Fe^{2+} e Cu^{2+} foram testados e padronizados (Tabela 1).

Tabela 1. Experimentos para testar as análises de quelar íons de metais de transição

Parâmetro de validação	Habilidade de quelar Fe^{2+}	Habilidade de quelar Cu^{2+}
Recuperação (%)	96,66 ± 6,66 ($CI_{95\%}$ = 22,97 – 25,36 mg/L)	98,91 ± 4,51 ($CI_{95\%}$ = 57,53 – 61,17 mg/L)
Repetitividade (% RSD)	6,90	4,56
Reprodutibilidade (% RSD)	6,75	3,57
Linearidade	*Variação*: 6,25 – 100 mg/L *Curva*: y = -1,1888* x + 108,374 *Parâmetros estatísticos*: R^2 = 0,9942; R^2_{adj} = 0,9927 p < 0,0001	*variação*: 0 – 100 mg/L *Curva*: y = -1,6172 * x +161,292 *Parâmetros estatísticos*: R^2 = 0,9993; R^2_{adj} = 0,9991 p < 0,0001

O conteúdo fenólico total e a atividade antioxidante das amostras de café medidas pelas análises de FRAP e DPPH, juntamente com a capacidade da amostra de quelar Fe^{2+} e Cu^{2+}, são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Capacidade de quelar metais, atividade antioxidante e conteúdo fenólico total de diferentes amostras de café brasileiro

Amostras	Poder quelante Cu^{2+} (mg EDTAE/L)	Poder quelante Fe^{2+} (mg EDTAE/L)	Fenólicos totais (mg GAE/L)	DPPH (mg AAE/L)	FRAP (mg AAE/L)
1	1242 ± 129	1307 ± 136	2043 ± 81	1490 ± 49	4179 ± 196
2	1502 ± 9	1689 ± 128	2214 ± 77	1865 ± 87	5614 ± 146
3	1162 ± 13	833 ± 90	2166 ± 28	1675 ± 73	4503 ± 154
4	1710 ± 49	1817 ± 102	2298 ± 29	2293 ± 64	7579 ± 142
5	1549 ± 44	1642 ± 118	2196 ± 24	1757 ± 34	5643 ± 50
6	1434 ± 53	1055 ± 89	2184 ± 29	1788 ± 111	5356 ± 99
7	1294 ± 26	1595 ± 73	2250 ± 40	1806 ± 278	5151 ± 84
8	1660 ± 98	1023 ± 69	2331 ± 4	2120 ± 125	6225 ± 163
9	1707 ± 64	1707 ± 44	2260 ± 36	1973 ± 256	5606 ± 199
10	1632 ± 63	1298 ± 205	2243 ± 40	1871 ± 89	5631 ± 353
11	1509 ± 64	1772 ± 47	2290 ± 28	1894 ± 214	5614 ± 191
12	1349 ± 212	1784 ± 31	2253 ± 17	1941 ± 181	4995 ± 308
13	1269 ± 37	1322 ± 137	2152 ± 47	1753 ± 114	4597 ± 191
14	1552 ± 101	1310 ± 90	2237 ± 52	1773 ± 108	5274 ± 292
15	1499 ± 72	1002 ± 144	2351 ± 9	1816 ± 91	5389 ± 109
16	1422 ± 232	1698 ± 67	2220 ± 26	1806 ± 62	4806 ± 31
17	1549 ± 185	1615 ± 106	2198 ± 63	1835 ± 227	5241 ± 169
18	1692 ± 71	1758 ± 13	2306 ± 50	1728 ± 126	5487 ± 189
19	1559 ± 81	1589 ± 77	2306 ± 44	1757 ± 89	5430 ± 223
20	1682 ± 101	1778 ± 79	2298 ± 19	1743 ± 163	4843 ± 195

EDTAE (ácido etilenodiamino tetra acético equivalente); GAE (ácido gálico equivalente); AAE (ácido ascórbico equivalente)

A presença de grupos metoxila e hidroxila na posição *orto* de ácidos fenólicos aumenta a habilidade de quelar Cu^{2+} (ZHOU et al. 2006). Portanto, a capacidade de quelar Fe^{2+}/Cu^{2+} é dependente da estrutura fenólica, localização e número de grupos hidroxilos.

Como o café é uma fonte rica de ácidos fenólicos e alguns flavonóides (FELBERG, et al., 2015), obteve-se uma alta capacidade de quelação de cobre (II) e ferro (II).

Conclusões

No presente trabalho, análises espectrofotométricas de alto rendimento foram testadas e padronizadas para avaliar a habilidade de quelar Fe^{2+} e Cu^{2+} de amostras de café. Estes são os métodos mais adequados para obter padronização e resultados comparáveis para diferentes matrizes de alimentos (extratos e até mesmo compostos isolados) entre grupos de pesquisa.

Agradecimentos

Os autores agradecem à CAPES e ao C-LABMU-UEPG.

Referências

BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Analytical biochemistry**, 239(1), 70-76. 1996.

CARTER, P. Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent (ferrozine). **Analytical biochemistry**, 40(2), 450-458. 1971.

DUSEK, P. et al. The neurotoxicity of iron, copper and manganese in Parkinson's and Wilson's diseases. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, 31, 193-203. 2015.

FELBERG, I. et al. Effect of simultaneous consumption of soymilk and coffee on the urinary excretion of isoflavones, chlorogenic acids and metabolites in healthy adults. **Journal of Functional Foods**, 19, 688-699. 2015.

GRANATO, D.; DE ARAÚJO CALADO, V. M.; JARVIS, B. Observations on the use of statistical methods in food science and technology. **Food Research International**, 55, 137-149. 2014.

GRANATO, D. et al. Analytical strategy coupled with response surface methodology to maximize the extraction of antioxidants from ternary mixtures of green, yellow, and red teas (Camellia sinensis var. sinensis). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 62(42), 10283-10296. 2014.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free Radicals in Biology and Medicine. 4 ed. Oxford: **Oxford University Press**, 888p. 2007.

MARGRAF, T. et al. Comparison between Folin-Ciocalteu and Prussian Blue assays to estimate the total phenolic content of juices and teas using 96-well microplates. **Journal of food science**, 80(11), 2397-2403. 2015.

SAIGA, A. I.; TANABE, S.; NISHIMURA, T. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment**. Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51(12), 3661-3667. 2003.

ZHENG, L. et al. Pitfalls of using 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) assay to assess the radical scavenging activity of peptides: Its susceptibility to interference and low reactivity towards peptides. **Food Research International**, 76, 359-365. 2015.

ZHOU, K.; YIN, J. J.; YU, L. L. ESR determination of the reactions between selected phenolic acids and free radicals or transition metals. **Food Chemistry**, 95(3), 446-457. 2006.