



# ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÁCIDO GÁLICO E DO TROLOX UTILIZANDO OS MÉTODOS ABTS E FENÓLICOS TOTAIS FRENTE VARIAÇÕES DE TEMPERATURA, TEMPO E pH.

## RESUMO

O objetivo do trabalho será avaliar através de diferentes métodos analíticos o comportamento dos compostos fenólicos Trolox e ácido gálico frente a variações de temperatura, tempo e pH a partir da metodologia de superfície de resposta. Os parâmetros avaliados na metodologia de superfície de resposta, do tipo Box-behnken, em função da capacidade antioxidante obtida pelos métodos de ABTS e fenólicos totais foram temperatura, tempo e pH. Diante dos resultados obtidos pode-se observar que todos os fatores apresentaram importância significativa para construção do modelo e que as superfícies de resposta ajudaram a interpretar os resultados, auxiliando na escolha das melhores condições experimentais priorizando a maior atividade antioxidante dos compostos. Desta forma, podemos concluir que no método ABTS, o pH e a temperatura foram os que apresentaram maior influência, podendo então se estabelecer uma combinação ótima de 60,88°C e pH de 5,20. No método Fenólicos Totais, o tempo e a temperatura influenciaram mais o ácido gálico com condição ótima de 29,01 min e 34,12 °C enquanto que o pH e o tempo apresentaram maior impacto no Trolox com condição ótima de pH 3,40 e tempo de 29,01 min.

**PALAVRAS-CHAVE:** Antioxidantes. ABTS. Fenólicos Totais.

**Andressa Lopes Ferrari**  
[ferraridessa@hotmail.com](mailto:ferraridessa@hotmail.com)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil

**Elton Guntendorfer Bonafé**  
[eltongbonafe@gmail.com](mailto:eltongbonafe@gmail.com)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil

**Sharise Beatriz Roberto**  
[sharise\\_beatriz@hotmail.com](mailto:sharise_beatriz@hotmail.com)  
Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil

**Luana Caroline de Figueiredo**  
[luanacaroline@utfpr.edu.br](mailto:luanacaroline@utfpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil

## INTRODUÇÃO

Antioxidantes são moléculas que possuem a capacidade de neutralizar um radical livre sem perder sua estabilidade. A neutralização de radicais livres inibe ou atrasa os danos celulares (LOBO *et al.*, 2010). Dentre os compostos fenólicos, classe de substâncias que apresentam capacidade antioxidante, o ácido gálico, apresenta propriedades anticancerígenas e antimicrobianas e é utilizado como antioxidante em alimentos (ROCHA *et al.*, 2015). Outro composto antioxidante estudado no trabalho é o Trolox (ácido 2-carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano), um antioxidante sintético, análogo a vitamina E, solúvel em água, o que proporciona uma grande aplicação como eliminador de radicais livres frente a outros que são solúveis apenas a lipídeos (SANTOS *et al.*, 2003).

Existem vários métodos empregados para determinação da capacidade antioxidante em diversas amostras. Entre os métodos, a metodologia—proposta por Sui *et al.* (2014) apresenta aplicação disseminada e realiza suas medidas a partir da captura do radical livre ABTS, sendo monitorado sua descoloração quando em contato com alguma substância antioxidante em comprimento de onda de 734 nm (SOUZA, 2013), enquanto que a determinação de Fenólicos Totais utiliza-se o reagente Folin-Ciocalteau para determinar o teor de compostos fenólicos totais (CTF).

Alguns fatores podem interferir na atividade antioxidante dos compostos, como temperatura, pH e tempo. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o comportamento dos compostos antioxidantes, Trolox e ácido Gálico, frente a variações de temperatura, tempo e pH a partir da metodologia de superfície de resposta tipo Box-behnken em função da capacidade antioxidante obtida pelos métodos de ABTS e Folin-Ciocalteau.

## METODOLOGIA

**Preparo das soluções de pH:** As soluções tampões foram preparadas partindo de uma solução estoque de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,2 mol/L e de uma solução de ácido cítrico 0,1 mol/L. Para obter os seis valores de pH as soluções estoques foram utilizadas seguindo as seguintes proporções em volume: 63,15%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  / 36,85% ácido cítrico (6,06); 58,27%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  / 41,73% ácido cítrico (5,20); 51,5%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  / 48,5% ácido cítrico (4,46); 43,64%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  / 56,36% ácido cítrico (3,40) e 38,55%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  / 61,45% ácido cítrico (3,06).

**Método de ABTS:** A preparação do radical  $\text{ABTS}^{*+}$  foi feita de acordo com Sui *et al.* (2014), reagindo-se uma solução estoque de ABTS 7 mM com persulfato de potássio 2,45 mM, mantendo essa mistura no escuro por 16 horas. Para uma absorbância de aproximadamente 0,70-0,75 utiliza-se 3,9 mL da solução do radical em 120,00 mL de metanol. As leituras de absorbância foram realizadas no espectrofotômetro Agilent Cary 60 UV-VIS no comprimento de onda de 734 nm.

**Método de Fenólicos totais:** Para o método de Fenólicos Totais seguiu-se a metodologia descrita por Singleton e Rossi (1965), utilizando-se o reagente Folin-Ciocalteau, diluído 1:1 em água destilada, e uma solução saturada de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Adicionou-se então em um tubo de ensaio 250  $\mu\text{L}$  das soluções padrões, 250  $\mu\text{L}$  do reagente Folin-Ciocalteau, 500  $\mu\text{L}$  de solução saturada de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e 4,00 mL de água destilada, para o branco adicionou-se 250  $\mu\text{L}$  de metanol ao invés de solução padrão. As soluções foram mantidas ao abrigo da luz por 25 minutos e

então foram centrifugadas por 10 minutos a 1000 rpm. As leituras de absorvância foram realizadas no espectrofotômetro Agilent Cary 60 UV-VIS em 725 nm.

**Metodologia de superfície de resposta:** Os fatores avaliados no trabalho foram tempo, temperatura e pH com os níveis inferiores e superiores de 5-35 minutos, 25-70°C e 3-6 para tempo, temperatura e pH, respectivamente com 3 repetições no ponto central. Os resultados foram avaliados no software Design Expert 7.0.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos para o método de ABTS e fenólicos totais avaliando a capacidade antioxidante dos dois compostos, ácido gálico e Trolox, podem ser observados na tabela 1 e na tabela 2.

Tabela 1. Valores de absorvância pelo método ABTS

pH	t (min)	T (°C)	Ácido Gálico (abs)	Trolox (abs)
4,46	20,06	47,50	0,2269	0,1879
4,46	20,06	47,50	0,2182	0,2014
4,46	20,06	47,50	0,2082	0,1941
4,46	20,06	23,00	0,1773	0,1610
4,46	5,00	47,50	0,1972	0,1763
4,46	20,06	70,00	0,1707	0,1449
4,46	35,11	47,50	0,1948	0,1688
3,40	11,10	60,88	0,0896	0,0590
3,40	29,01	34,12	0,0654	0,0468
3,40	11,10	34,12	0,0931	0,0654
3,40	29,01	60,88	0,1023	0,0940
5,20	29,01	60,88	0,3978	0,3837
5,20	29,01	34,12	0,2463	0,1721
5,20	11,10	34,12	0,3204	0,3115
5,20	11,10	60,88	0,3931	0,3903
3,06	20,06	47,50	0,0450	0,0294
6,06	20,06	47,50	0,4124	0,3631

Fonte: Autoria própria (2017).

Tabela 2. Valores de absorvância pelo método Fenólicos Totais

pH	t (min)	T (°C)	Ácido Gálico (abs)	Trolox (abs)
4,46	20,06	47,50	0,0228	0,0107
4,46	20,06	47,50	0,0213	0,0114
4,46	20,06	47,50	0,0229	0,0115
4,46	20,06	23,00	0,0558	0,0155
4,46	5,00	47,50	0,0479	0,0084
4,46	20,06	70,00	0,0434	0,0066
4,46	35,11	47,50	0,0352	0,0073
3,40	11,10	60,88	0,0448	0,0104
3,40	29,01	34,12	0,0691	0,0240
3,40	11,10	34,12	0,0677	0,0206
3,40	29,01	60,88	0,0499	0,0273
5,20	29,01	60,88	0,0469	0,0169
5,20	29,01	34,12	0,0732	0,0232
5,20	11,10	34,12	0,0609	0,0211
5,20	11,10	60,88	0,0359	0,0131
3,06	20,06	47,50	0,0450	0,0159
6,06	20,06	47,50	0,0346	0,0204

Fonte: Autoria própria (2017).

Os dois maiores valores para o ácido gálico obtidos pelo método ABTS foram para as combinações de pH: 6,06, tempo: 20,06 min e temperatura: 47,50°C com o valor de 0,4124 e pH: 5,20, tempo: 29,01 min e temperatura:

60,88°C com o valor de 0,3978, entretanto para pH:5,20 e temperatura: 60,88°C obteve-se um valor de 0,3931. As combinações para o Trolox foram pH: 5,20, tempo: 11,10 min e temperatura: 60,88°C com o valor de 0,3903 e pH: 5,20, tempo: 29,01 min e temperatura: 60,88°C com o valor de 0,3837.

. Para o método Fenólicos Totais, os dois maiores valores para o ácido gálico foram para as combinações de pH: 5,20, tempo: 29,01 min e temperatura: 34,12°C com valor de 0,0732 e pH: 3,40, tempo: 29,01 min e temperatura: 34,12°C com o valor de 0,0691. Aqui se pode notar que embora o pH tenha mudado o tempo e a temperatura foram os mesmos. Utilizando o Trolox como antioxidante, os dois maiores valores foram pH: 3,40, tempo: 29,01 min e temperatura: 60,88°C com o valor de 0,0273 e pH: 3,40, tempo:29,01 e temperatura: 34,12°C com o valor de 0,0240, diferentemente do ácido gálico o pH se manteve o mesmo, assim como o tempo, enquanto que a temperatura variou.

As superfícies de respostas, obtidas a partir da matriz planejamento, podem ser visualizadas abaixo.

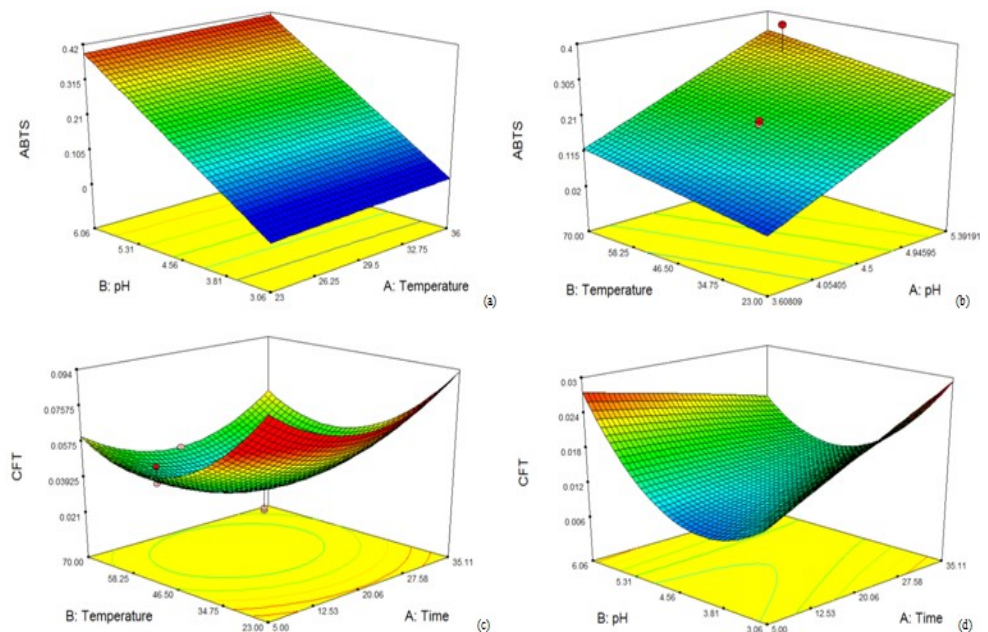


Figura 1: (a) Superfície de resposta para o ácido gálico pelo método ABTS frente à interação entre pH e temperatura, (b) Superfície de resposta para o Trolox pelo método ABTS frente à interação entre temperatura e pH, (c) Superfície de resposta para o ácido gálico pelo método Fenólicos Totais frente à interação entre temperatura e tempo e (d) Superfície de resposta para o Trolox pelo método Fenólicos Totais frente à interação entre pH e tempo.

Fonte própria.

## CONCLUSÃO

Os fatores analisados e os métodos influenciaram na atividade antioxidante do ácido gálico e do Trolox. No método ABTS, o pH e a temperatura foram os que apresentaram maior influência, podendo então se estabelecer uma combinação ótima. No método Fenólicos Totais, o tempo e a temperatura influenciaram mais o ácido gálico enquanto que o pH e o tempo apresentaram maior impacto no Trolox.

# ANALYSIS OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF GALIC ACID AND TROLOX USING THE ABTS AND TOTAL PHENOLIC METHODS FRONT TEMPERATURE, TIME AND PH VARIATIONS

## ABSTRACT

The objective of the work will be to evaluate the behavior of phenolic compounds Trolox and gallic acid in different analytical methods against variations in temperature, time and pH from the response surface methodology. The parameters evaluated in the Box-behnken type response surface methodology as a function of the antioxidant capacity obtained by the ABTS and total phenolic methods were temperature, time and pH. In view of the obtained results it can be observed that all the factors presented significant importance for the construction of the model and that the response surfaces helped to interpret the results, aiding in the choice of the best experimental conditions prioritizing the greater antioxidant activity of the compounds. In this way, it can be concluded that in the ABTS method, pH and temperature were the ones that had the greatest influence, and an optimal combination of 60.88 ° C and pH of 5.20 could be established. In the Total Phenolic method, time and temperature influenced gallic acid with optimum condition of 29.01 min and 34.12 ° C, while pH and time had a greater impact on Trolox with optimum pH 3.40 and time of 29.01 min.

**KEYWORDS:** Antioxidants. ABTS. Total Phenolic.

## AGRADECIMENTOS

Universidade Tecnológica Federal do Paraná/Brasil pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

LOBO, V.; PATIL, A.; PHATAK, A.; CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognsy Review**, v. 4, n. 8, p. 118-126, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3249911/>> Acesso em: 03 jul. 2017.

ROCHA, L. B.; MELO, A. M.; PAULA, S. L. A.; NOBRE, S. A. M.; ABREU, I. N. Gallic acid as the major antioxidant in pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) fruit peel. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 17, n. 4, 2015. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-05722015000400592](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722015000400592)> Acesso em: 03 jul. 2017.

SANTOS, L. C.; PIACENTE, S.; MONTORO, P.; PIZZA, C.; VILEGAS, W. Atividade antioxidante de xantonas isoladas de espécies de *Leiothrix* (Eriocaulaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 2, p. 67-74, 2003. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v13n2/a02v13n2.pdf>> Acesso em: 03 jul. 2017.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, n. 16, p. 144-158, 1965.

SOUZA, Wagner de. **Avaliação da atividade antioxidante e compostos fenólicos de extratos vegetais**. 2013. 37 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia de Alimentos) – UTFPR, Campo Mourão, 2013.

SUI, X.; DONG, X.; ZHOU, W. Combined effect of pH and high temperature on the stability and antioxidant capacity of two anthocyanins in aqueous solution. **Food Chemistry**, n. 163, p. 163-170, 2014

**Recebido:** 31 ago. 2017.

**Aprovado:** 02 out. 2017.

**Como citar:**

FERRARI, A. L. et al. Análise da atividade antioxidante do ácido gálico e do trolox utilizando os métodos Abts e fenólicos totais frente variações de temperatura, tempo e pH. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DA UTFPR, 22., 2017, Londrina. **Anais eletrônicos...** Londrina: UTFPR, 2017. Disponível em: < <https://eventos.utfpr.edu.br/sicite/sicite2017/index>. Acesso em: XXX.

**Correspondência:**

Andressa Lopes Ferrari  
Rua Marçílio Dias, 635, Apucarana - PR.

**Direito autoral:**

Este resumo expandido está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição-Não Comercial 4.0 Internacional.

