

ANÁLISES QUÍMICAS

FRAP em Frutas



Espectrofotometro + Cubeta de Acrílico
Vortex (Agitador de Tubos)



Solução de TPTZ (2,4,6-tripiridyl-s-triazine)

Cada amostra requer 0,2 mL de solução

Para 25 mL de solução → 0.080 g de TPTZ
0.030 mL de HCl

Para 50 mL de solução → 0.160 g de TPTZ
0.060 mL de HCl

Solução Tampão Acetato (pH 3.6)

Cada amostra requer 1,5 mL de solução

Para 100 mL de solução → 0.310 g de Acetato de Sódio
1.600 mL de Ácido Acético

Para 200 mL de solução → 0.620 g de Acetato de Sódio
3.200 mL de Ácido Acético

Solução de Cloreto de Ferro

Cada amostra requer 0,2 mL de solução

Para 25 mL de solução → 0.135 g de FeCl_3
Para 50 mL de solução → 0.270 g de FeCl_3

Solução FRAP

Cada amostra requer 1,5 mL de solução

Para 25 mL de solução → 25 mL de Tampão Acetato
2,50 mL de solução de TPTZ
2,50 mL de solução de Cloreto de Ferro

Aquecer esta solução a 37 °C para utilizar nas análises.

Solução de Ácido Ascórbico (1000 $\mu\text{mol/L}$)

Necessário para a curva de calibração

Para 100 mL de solução → 0,017 g de ácido ascórbico





Preparação

Pesar 5 g de Fruta *in Natura*
ou o equivalente em fruta seca de 5 g da fruta *in natura*

Macerar ou cortar a fruta em pedaços bem pequenos
Colocar a amostra em becker pequeno

Adicionar 10 mL de água
Homogeneizar usando um Turrax até formar uma pasta ou suco

Transferir para tubo de centrifuga

Centrifugar a amostra



Leitura

Ler absorbância em espectrofotômetro usando cubeta de acrílico
Branco = água
Amostra = Fase sobrenadante (filtrado)

Para cada leitura use um tubo de ensaio
Adicionar 0,050 mL de amostra (ou água para o branco)
Adicionar 1,500 mL de solução FRAP

Ler a absorbância no tempo 0 (zero)
Esperar por 4 min e ler a absorbância novamente

Leitura a 593 nm

A leitura deve ser feita a 37 °C. Utilizar o sistema de aquecimento do espectro para realizar esta análise



Cálculo

Calcular a diferença de absorbância entre a leitura no tempo 0 (zero) e a leitura no tempo 4 min.

Utilizar a curva de calibração para calcular a capacidade antioxidante expressa em equivalente em ácido ascórbico ($\mu\text{mol AA}$).





Observações

Leituras entre 0,200 a 2,000 são desejáveis

Caso a leitura da absorbância der abaixo de 0,200 então:

Pode ser necessário aumentar a quantidade de amostra inicial – o ideal é fazer testes iniciais com 2 g, 5 g e 10 g de amostra e verificar a melhor opção para a quantidade de amostra a ser utilizada.



Curva de Calibração

Fazer curva com pelo menos 5 pontos.

Ler absorbância em espectrofotômetro usando cubeta de acrílico

Para cada leitura use um tubo de ensaio

Adicionar x mL de solução de ácido ascórbico

Adicionar y mL de água

Em que: x = 0,200; 0,400; 0,600; 0,800 e 1,000 mL

y = 0,800; 0,600; 0,400; 0,200 e 0,000 mL

Na cubeta de leitura

Adicionar 0,050 mL de solução diluída de ácido ascórbico

Adicionar 1,500 mL de solução FRAP

Obs: estes valores proverão uma curva para capacidade antioxidante entre 100 a 1000 µmol/L equivalente em ácido ascórbico (AA)

Ler a absorbância no tempo 0 (zero)

Esperar por 4 min e ler a absorbância novamente

Leitura a 593 nm

A leitura deve ser feita a 37 °C. Utilizar o sistema de aquecimento do espectro para realizar esta análise

Fazer gráfico Abs x Conc. Ácido Ascórbico

(Benzie & Strain, 1996)



Referência

Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70–76.

