

DETERMINAREA ACTIVITĂȚII ANTIOXIDANTE ÎN EXTRACTELE DIN MATERII PRIME VEGETALE

Autori: Marina TÎRSÎNĂ, Olga MIGALATIEV, Ana JENAC, Vavil CARAGIA

Institutul Științifico - Practic de Horticultură și Tehnologii Alimentare

Abstract: Activitatea antioxidantă totală în mostrele de CO₂-extracte a fost evaluată prin metoda spectrofotometrică indirectă DPPH și a doua metodă cu utilizarea radicalului ABTS. Ambele metode au demonstrat că CO₂-extractul din germe de grâu prezintă capacitatea antioxidantă cea mai sporită, aceasta constituind 576,15 μg/ml quercetină. Spre deosebire de prima metodă, în cazul doi cea mai mică capacitate antioxidantă o posedă CO₂-extractul din semințe de struguri fiind doar de 20,58 μg/ml quercetină.

Cuvinte cheie: activitate antioxidantă, metoda DPPH, trolox, quercetină, CO₂-extracte, substanțe azeotrope.

Introducere

Un interes deosebit în domeniul alimentației îl reprezintă monitorizarea antioxidantilor, substanțe cu un rol extrem de important în prevenirea unor maladii (cancer, boli cardiovasculare etc.) și în încetinirea unor procese degradative precum îmbătrânirea. În momentul de față există o varietate de metode utilizate în monitorizarea activității antioxidante.

Activitatea antioxidantă totală în mostrele de CO₂-extracte a fost evaluată prin metoda spectrofotometrică indirectă care utilizează 2,2 - difenil - 1 - picrilhidrazil (DPPH) ca sistem de generare a radicalului liber stabil DPPH și a doua metodă cu utilizarea radicalului ABTS (2,2 - azinobis - 3-ethylbenzo - thiazoline-6-sulfonate).

Metoda de testare a capacității antiradicalice cu aplicarea ABTS (2,2 azinobis 3-etilbenzotiazolină-6-acid sulfonic) este cunoscută și utilizată pe larg pentru stabilirea activității antioxidante a substanțelor indiferent de natura lor. În baza metodei date se determină activitatea antioxidantă atât a substanțelor pure, cât și a complexelor antioxidante. În calitate de standard se folosește acidul ascorbic, trolox, quercetină, rutină și acidul galic.

1. Metode și materiale

1.1. Materiale

În calitate de obiecte de cercetare au fost luate extracte obținute cu ajutorul CO₂ supercritic, dar și cu CO₂ și etanol. Materiile prime utilizate pentru obținerea extractelor liposolubile au fost șrotul de miez de nucă obținut după presarea la rece (Rovazena SRL), semințe și pieliță de tomate (Orhei-Vit S.A.), semințe de struguri și germe de grâu (Sano Vita, România).

1.2. Reactivi

Soluție metanolică DPPH (1,1 difenil-2-picril hidrazil), dimetil sulfoxid – DMSO,

Reagentul stock radical ABTS (2,2 azinobis 3-etilbenzotiazolină-6- acid sulfonic), soluție tampon fosfat salin - PBS (pH – 7,4), persulfat de potasiu (K₂S₂O₇), H₂O distilată.

1.3. Metode

Metoda DPPH. Radicalul DPPH[•] (1,1 difenil-2-picril hidrazil de culoare violetă), utilizat în calitate de substrat, este redus prin adăugarea de atomi de hidrogen cu obținerea de 1,1 difenil-2-picril hidrazil de culoare galbenă. Concentrația radicalului DPPH[•] în soluția de lucru, precum și durata reacției sunt individuale și se determină pentru fiecare caz în parte în dependență de natura substanței antioxidante și a solventului utilizat.

Procedul de determinare a capacității de captare (scavenging) a radicalilor liberi (RL).

Sol. stock 2 mM DPPH în metanol: se dizolvă 8 mg DPPH în 10 ml metanol. Soluția de lucru se pregătește în ex tempore: la 5 ml sol. stock se adaugă 45 ml metanol. Se amestecă și se măsoară absorbanta la 515 – 520 nm (A_0), se incubează 30 min. la 25 °C (15-30 min.) și se măsoară absorbanta la 520 nm, A_{30} .

Micșorarea absorbantei soluției de DPPH indică creșterea activității de captare a RL.

Reducerea valorilor extincției (% Inhibiție) a soluției de DPPH se calculează conform ecuației:

$$\% \text{ Inhibiție} = (A_{DPPH} - A_{PROBA}) / A_{DPPH} * 100\% \quad (1)$$

Activitatea antioxidantă se exprimă ca IC_{50} definită ca concentrația de material testat necesară pentru reducerea cu 50% a concentrației inițiale de DPPH (cauzează diminuarea cu 50% a concentrației inițiale de DPPH).

Metoda de captare a radicalilor cu ABTS (2,2 – azinobis – 3- ethylbenzo – thiazoline-6-sulfonate)

Determinarea capacității antiradicalice cu utilizarea radicalului cation $ABTS^{\cdot+}$.

Radicalul $ABTS^{\cdot+}$ este generat prin oxidarea ABTS (2,2 azinobis 3-etilbenzotiazolină-6- acid sulfonic) cu persulfat de potasiu și este redus prin adăugare de atomi de hidrogen.

Se amestecă 10-20 μ l probă de cercetat (diluată în metanol sau DMSO) cu 180-190 μ l reagent de lucru (volumul final - 200 μ l) în godeurile microplăcii. Se agită și se măsoară Abs (A_0) la 734 nm. Se incubează 8 min. la temperatura de 25 °C și se măsoară absorbanta (A_8) la 734 nm.

Capacitatea de captare a radicalilor liberi se exprimă prin valorile IC_{50} (mg/l) care denotă concentrația de probă luată în studiu, necesară pentru reducerea cu 50% a absorbantei soluției de ABTS.

2. Rezultate și discuții

A fost trasată curba de calibrare, datele obținute fiind înregistrate la calculator și prelucrate în Excel 2007, astfel obținându-se atât curba, cât și ecuația cu ajutorul căreia s-a calculat concentrația de trolox sau quercetină μ g/ml probă. Valoarea coeficientului linear de corelație din ecuația obținută este de 0,998.

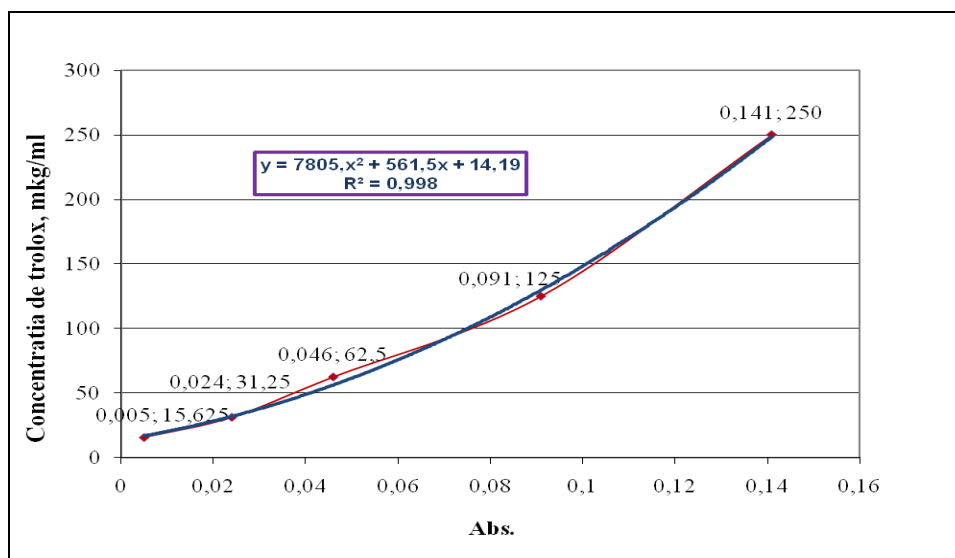


Fig. 1. Curba de calibrare și ecuația de regresie pentru determinarea capacității antioxidante raportată la trolox

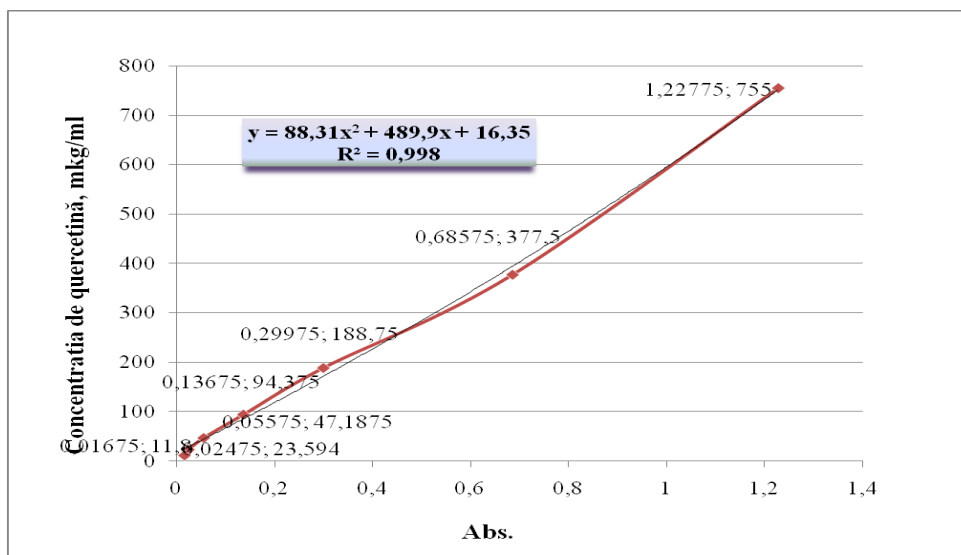


Fig. 2. Curba de calibrare și ecuația de regresie pentru determinarea capacității antioxidante raportat la quercetină

În urma prelucrării datelor experimentale cu utilizarea programei Excel 2007, s-au obținut două ecuații de calcul a concentrației de trolox și respectiv de quercetină (y) cu ajutorul cărora s-a calculat capacitatea antioxidantă a uleiurilor. Datele obținute sunt prezentate în figura 3.

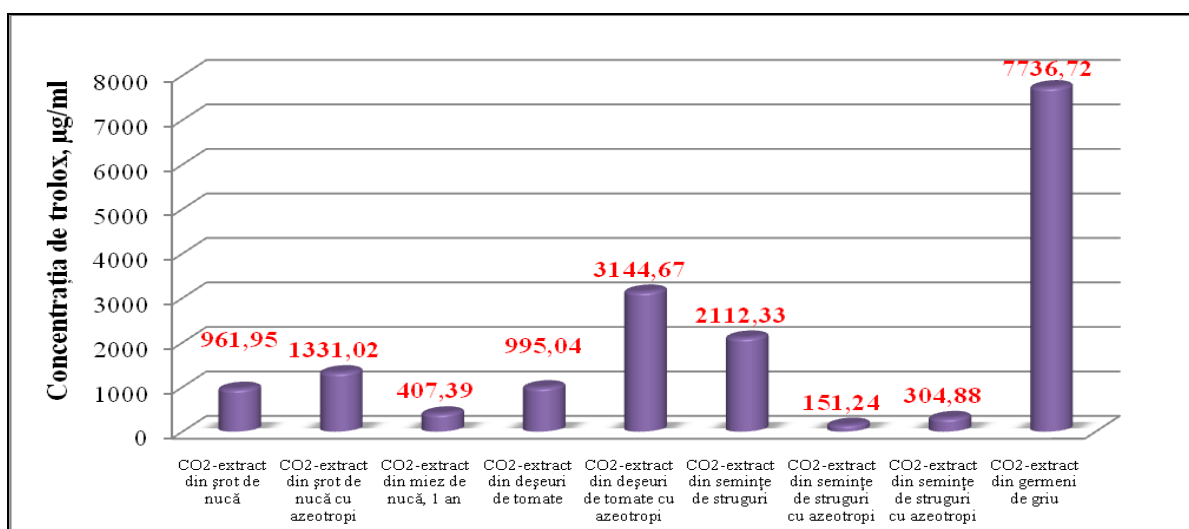


Fig. 3. Capacitatea antioxidantă a CO₂-extractelor și uleiurilor din materie primă vegetală, μg/ml trolox

Conform datelor prezentate în figura 3, cea mai mare capacitate antioxidantă o posedă CO₂-extractul din germeni de grâu, aceasta constituind 7736,72 μg/ml trolox. De asemenea, capacitate antioxidantă sporită prezintă și extractul obținut cu azeotropi din deșeuri de tomate și CO₂-extractul din semințe de struguri, valorile acestora fiind de 3144,67 și respectiv 2112,33 μg/ml trolox. Valori apropiate sunt în CO₂-extractele din șrot de miez de nucă, valoarea extractului obținut cu azeotropi constituind 1331,02, iar a CO₂-extractului din șrot de nucă – 961,95, fiind apropiată de cea a CO₂-extractului din deșeuri de tomate – 995,04 μg/ml trolox. Cele mai mici valori ale capacității antioxidante au fost determinate pentru CO₂-extractul din semințe de struguri obținut cu azeotropi (fracția uleioasă – 151,24 și sedimentul – 304,88 μg/ml trolox). S-a constatat că după un an de păstrare, CO₂-extractul din miez de nucă are capacitatea antioxidantă de 407,39 μg/ml trolox.

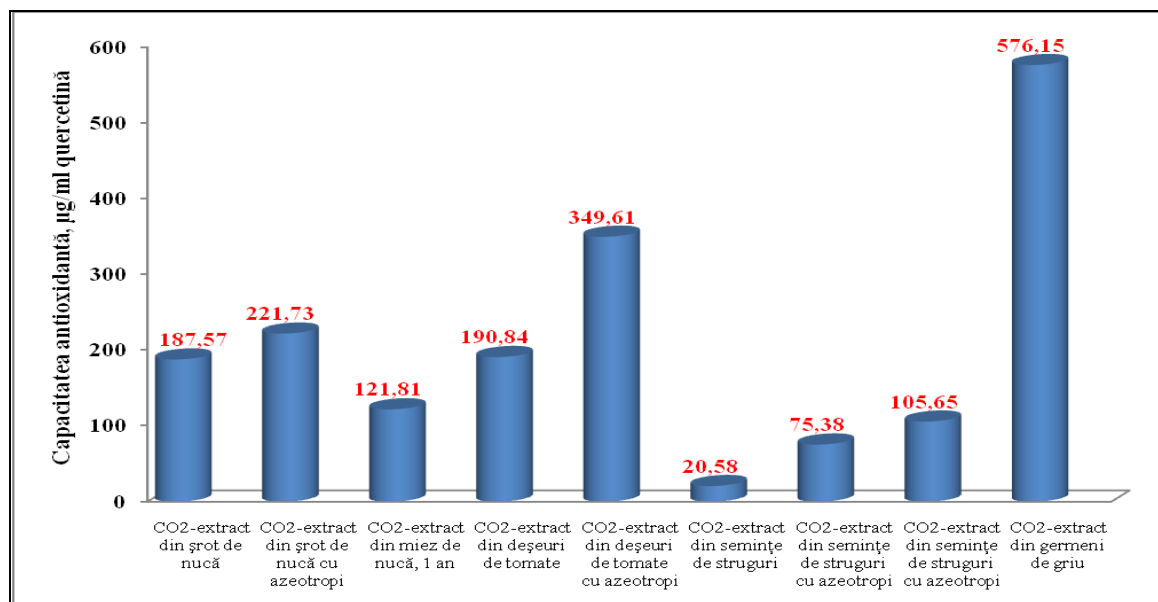


Fig. 4. Capacitatea antioxidantă a CO₂-extractelor și uleiurilor din materie primă vegetală, µg/ml quercetină

Conform fig. 4, se observă aceeași dinamică a capacității antioxidante și pentru metoda ABTS, însă valorile acestea fiind mai mici și exprimate în µg/ml quercetină. Ca și în cazul metodei DPPH, prin această metodă de asemenea CO₂-extractul din germeni de grâu prezintă capacitatea antioxidantă cea mai sporită, aceasta constituind 576,15 µg/ml quercetină. Spre deosebire de prima metodă, în cazul doi cea mai mică capacitate antioxidantă o posedă CO₂-extractul din semințe de struguri fiind doar de 20,58 µg/ml quercetină.

Conform surselor bibliografice, valoarea capacității antioxidante depinde de conținutul de substanțe biologice active cu proprietăți antioxidante, deci rămâne de cercetat în continuare dependența și natura substanțelor care influențează capacitatea antioxidantă.

Concluzii

A fost determinată capacitatea antioxidantă în mostrele de CO₂-extracte prin metodele DPPH și ABTS, stabilindu-se astfel că capacitate antioxidantă sporită posedă CO₂-extractul din germeni de grâu, aceasta constituind 7736,72 µg/ml trolox. De asemenea, capacitate antioxidantă sporită prezintă și extractul cu azeotropi din deşeuri de tomate și CO₂-extractul din semințe de struguri valorile acestora fiind de 3144,67 și respectiv 2112,33 µg/ml trolox. Pentru CO₂-extractul din miez de nucă cu azeotropi capacitatea antioxidantă a constituit 1331,02, iar a CO₂-extractului din şrot de nucă – 961,95, fiind apropiată de cea a CO₂-extractului din deşeuri de tomate – 995,04 µg/ml trolox.

Bibliografie

1. Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M. *Antioxidants in food - Practical applications*, Woodhead Publishing Ltd and CRC Press LLC, 2001, 380 p.
2. Hertog, M., Fesrens, E., Hollman, P. et al. *Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study (1993)* The Lancet 342, 1007–11.
3. Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. *Use of free radical method to evaluate antioxidant activity*. *Food science and technology*. 1995.