

Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do método de sequestro do radical livre DPPH para extratos de algas

Janaína Pires¹, Priscila B. Torres², Déborah Y.A.C. dos Santos³, Fungyi Chow⁴

Setembro 2017

Introdução

Diversos métodos são descritos na literatura para avaliar o potencial antioxidante *in vitro* de extratos e/ou substâncias isoladas (Alves et al., 2010). Um dos ensaios antioxidantes mais comuns é baseado na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), produzindo um decréscimo da absorbância a 515/517 nm. Nesse processo, ocorre uma reação de oxirredução, onde o radical DPPH, que apresenta coloração violeta, é reduzido para DPPH-H (DPPH reduzido e estável), alterando a coloração da mistura de roxo para amarelo (Fig. 1).

Este ensaio se baseia no mecanismo de SET (do inglês *Single Electron Transfer*) ou

de transferência de um elétron, processo que permite detectar a capacidade de um potencial antioxidante em transferir um elétron e reduzir qualquer substância, incluindo metais, carbonilas e radicais (Prior et al., 2005). A substância antioxidante age como doador de um átomo de hidrogênio quando é adicionada à solução de DPPH, reduzindo o radical DPPH e formando a hidrazina, propiciando assim a mudança de coloração na solução, de violeta para amarelo claro (Castelo-Branco & Torres, 2011; Fig. 1). Por não ser um método específico para determinados tipos de substâncias, serve como um ensaio simples para avaliar o potencial antioxidante total de amostras vegetais.

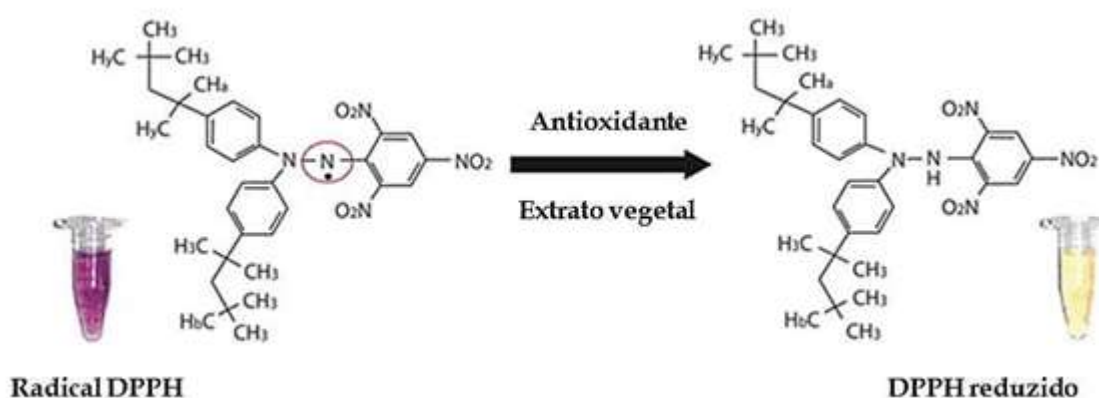


Figura 1. Esquema geral da reação do ensaio de DPPH. A solução do radical DPPH, de coloração roxa, é reduzida por antioxidantes contidos no extrato vegetal, modificando a coloração da solução de roxo para amarelo.

¹Doutora pelo Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade de São Paulo, jana.pires1@gmail.com

²Doutora pelo Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade de São Paulo, cromossomo@gmail.com

³Professora Associada, dyacsan@ib.usp.br

⁴Professora Doutora, fchow@ib.usp.br

O DPPH é um radical livre orgânico, amplamente utilizado como indicador de atividade antioxidante de extratos e óleos vegetais, sendo vantajoso por ser um radical estável. O método do DPPH foi descrito inicialmente por Blois (1958) e, posteriormente, adaptado por Brand-Williams et al. (1995), os quais estabeleceram e popularizaram seu uso nas pesquisas de antioxidantes. Alguns fatores como tipo de solvente, pH, concentração das amostras e tempo de reação influenciam o método. Além disso, há a obrigatoriedade do radical estar dissolvido sempre em solventes orgânicos como, por exemplo, etanol ou metanol (Cheng et al., 2009).

O ensaio do DPPH é um procedimento rápido e simples, e as contribuições do presente protocolo são: (i) validação para a análise de extratos de diferentes tipos de macroalgas, as algas verdes *Chaetomorpha* sp., *Cladophora* sp. e *Ulva fasciata*, as algas vermelhas *Pterocladia capillacea*, *Pyropia spiralis*, *Palisada flagellifera*, *Bostrychia radicans*, *Gracilariopsis tenuifrons* e *Gracilaria* spp. e a alga parda *Sargassum* spp., (ii) adaptação para microplacas de 96 poços, (iii) utilização de pequenas quantidades de biomassa de amostra, (iv) requerimento de pequenos volumes de reagentes e (v) geração de poucos resíduos quando comparado aos protocolos originais.

Recentemente, Furlan et al. (2015), em um estudo realizado com *Croton sphaerogynus*, adaptaram o protocolo para ser desenvolvido em microplacas de 96 poços, diminuindo consideravelmente o volume de reagentes e a quantidade de amostra necessária.

Metodologia

1. Preparo das soluções

1.1. Solução de DPPH $32 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ($80 \mu\text{M}$; $\text{MM} = 394,32 \text{ g.mol}^{-1}$): em balão volumétrico, dissolver 1,6 mg de DPPH em volume final de 50 mL de metanol. Homogeneizar a solução em ultrassom por 25 min ou vórtex por 40-50

min. Verificar a absorbância da solução de DPPH a 517 nm, que deve estar entre 0,9 a 1,1. O volume preparado é suficiente para três microplacas de 96 poços. A solução pode ser armazenada em geladeira (4°C) por 10 dias em frasco âmbar.

1.2. Solução estoque de ácido ascórbico $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ (ácido L-ascórbico; $\text{MM} = 176,12 \text{ g.mol}^{-1}$): dissolver 1 mg de ácido ascórbico em 1 mL de metanol P.A. Diluir esta solução em 50% utilizando o mesmo solvente. A solução estoque pode ser armazenada por, pelo menos, seis meses em freezer -20°C .

1.3. Solução estoque de ácido gálico $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ (ácido 3,4,5-triidroxibenzoico; $\text{MM} = 170,12 \text{ g.mol}^{-1}$): dissolver 1 mg de ácido gálico em 1 mL de metanol P.A. A seguir, pegue $100 \mu\text{L}$ desta solução e complete o volume para $1000 \mu\text{L}$ com metanol P.A. A solução estoque pode ser armazenada por, pelo menos, seis meses em freezer -20°C .

1.4. Solução estoque de BHA $0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$ (2-terc-butil-4-hidroxianisol e 3-terc-butil-4-hidroxianisol; $\text{MM} = 180,24 \text{ g.mol}^{-1}$): dissolver 1 mg de BHA em 1 mL de metanol P.A. A seguir, pegue $200 \mu\text{L}$ desta solução e complete o volume para $1000 \mu\text{L}$ com metanol P.A. A solução estoque pode ser armazenada por, pelo menos, seis meses em freezer -20°C .

1.5. Solução estoque de BHT 1 mg.mL^{-1} (hidroxitolueno butilado; $\text{MM} = 220,35 \text{ g.mol}^{-1}$): dissolver 1 mg de BHT em 1 mL de metanol P.A. A solução estoque pode ser armazenada por, pelo menos, seis meses em freezer -20°C .

1.6. Solução estoque de quercetina $0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$ (3,5,7,3'-4'-pentahidroxi flavona; $\text{MM} = 302,2 \text{ g.mol}^{-1}$): dissolver 1 mg de quercetina em 1 mL de metanol P.A. A seguir, pegue $200 \mu\text{L}$ desta solução e complete o volume para $1000 \mu\text{L}$ com metanol P.A. A solução estoque pode ser armazenada por, pelo menos, seis meses em freezer -20°C .

1.7. Solução estoque de rutina 2 mg.mL^{-1} ($\text{MM} = 610,51 \text{ g.mol}^{-1}$): dissolver 2 mg de

rutina em 1 mL de metanol P.A. Recomenda-se preparar no dia do uso.

1.8. Solução estoque de Trolox $0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$ (ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico; $MM = 250,29 \text{ g.mol}^{-1}$): dissolver 1 mg de Trolox em 1 mL de metanol P.A. A seguir, pegue 200 μL desta solução e complete o volume para 1000 μL com metanol P.A. A solução estoque pode ser armazenada por, pelo menos, seis meses em freezer -20°C .

2. Extração a partir de amostras frescas e congeladas

Triturar 300 mg de massa fresca de alga com auxílio de um pistilo e nitrogênio líquido. Adicionar 1 mL de metanol (concentração do extrato bruto = 300 mg.mL^{-1}) e deixar em maceração por 3 h a temperatura ambiente e local protegido da luz. Centrifugar a 12.000 rpm por 15 min a temperatura ambiente e recolher o sobrenadante (extrato bruto) em um microtubo novo. **Atenção:** se a amostra apresentar potencial antioxidante baixo, realizar a extração com maior biomassa de alga ou menor volume de solvente, obtendo assim um extrato bruto inicial mais concentrado. Recomenda-se que as amostras sejam já acondicionadas em microtubo de 2 mL no momento da coleta, pois isso facilitará a trituração do material, que poderá ser realizada no próprio microtubo.

3. Preparo de amostras a partir de extratos secos

No caso de extratos já secos, dissolver os extratos secos em metanol ou DMSO 10%. Preparar o extrato bruto em concentração de 3 mg.mL^{-1} .

4. Preparo das curvas padrões

Para cada curva padrão, recomenda-se incluir pelo menos quatro pontos, além da concentração zero, e três réplicas para cada

ponto. Preparar as curvas padrões para obtenção das concentrações finais na mistura de reação de acordo com a Tabela 1.

Tomando como exemplo o ácido gálico, em uma microplaca de 96 poços, preparar a curva padrão seguindo os volumes de reagentes da Tabela 2. Incubar a microplaca por 30 min, protegida da luz direta. Ler as absorbâncias em espectrofotômetro de microplacas UV/vis a 517 nm (Fig. 2). Construir uma curva de regressão linear relacionando a concentração do padrão ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) e os valores de absorbância (Fig. 3).

Tabela 1. Listagem de padrões com conhecida atividade antioxidante para redução do radical DPPH e faixas de concentrações testadas para a curva padrão.

Padrão	Faixa de concentração final na mistura de reação (no poço)
Ácido ascórbico	0 - $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$
Ácido gálico	0 - $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$
BHA	0 - $12 \mu\text{g.mL}^{-1}$
BHT	0 - $45 \mu\text{g.mL}^{-1}$
Quercetina	0 - $8 \mu\text{g.mL}^{-1}$
Rutina	0 - $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$
Trolox	0 - $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$



Figura 2. Microplaca com a reação da curva padrão para ácido gálico ($0 - 2 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Note que a perda da cor violeta representa menor absorbância e, portanto, maior redução do radical DPPH. Para cada ponto da curva de ácido gálico são apresentadas três repetições.

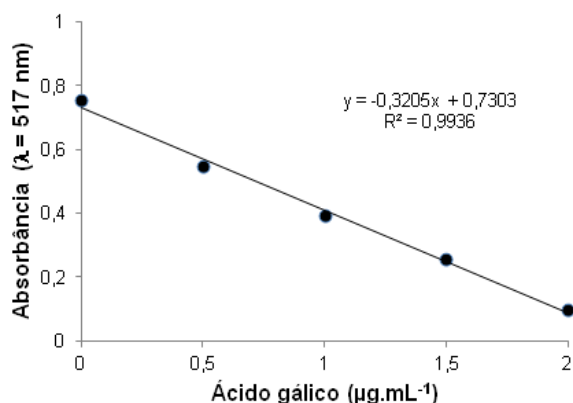


Figura 3. Curva padrão de ácido gálico nas concentrações de 0 a 2 µg.mL⁻¹. O gráfico foi plotado em função da concentração de ácido gálico (µg.mL⁻¹) e as respectivas absorbâncias lidas em 517 nm.

5. Ensaio das amostras

Em uma microplaca de 96 poços, preparar a mistura do ensaio para cada amostra seguindo os volumes indicados na Tabela 3. Incubar a microplaca por 30 min protegida da luz direta. Após esse tempo, ler as absorbâncias em espectrofotômetro de microplacas UV/vis a 517 nm.

Tabela 2. Volumes das soluções para construção da curva padrão do ensaio de DPPH em microplaca, utilizando o ácido gálico como padrão.

Concentração final no poço (µg.mL ⁻¹)	Sol. DPPH (µL)	Ácido gálico 0,1 mg.mL ⁻¹ (µL)	¹ Metanol (µL)	Volume total (µL)
Branco*	---	---	300	300
0**	280	---	20	300
0,5	280	1,5	18,5	300
1	280	3,0	17	300
1,5	280	4,5	15,5	300
2	280	6	14	300

*O valor da absorbância do Branco deve ser descontado em todas as absorbâncias de cada um dos pontos da curva padrão.

**A concentração 0 também corresponde ao Controle DPPH.

¹ Usar DMSO 10% caso os extratos tenham sido dissolvidos neste solvente.

Tabela 3. Volumes das soluções para o ensaio de DPPH em microplaca com os extratos das algas.

Amostra	Sol. DPPH (µL)	Amostra (µL)	¹ Metanol (µL)	Volume total (µL)
Controle DPPH	280	---	20	300
Branco*	---	---	300	300
Amostra	280	20	---	300
Branco amostra**	---	20	280	300

*O valor da absorbância do Branco deve ser descontado na absorbância do Controle DPPH.

**Amostras ou extratos ricos em pigmentos podem interferir na leitura da absorbância. Portanto, é necessário fazer um Branco amostra para cada uma das amostras. A absorbância do Branco amostra deve ser descontada na absorbância da respectiva amostra, a fim de descontar possíveis interferências de leitura, da mesma forma que o Branco na curva padrão e para o Controle DPPH.

¹ Usar DMSO 10% caso os extratos tenham sido dissolvidos neste solvente.

Considerando a concentração do extrato bruto de amostras frescas e congeladas (300 mg.mL⁻¹; ver item 2) ou de extratos previamente secos (3 mg.mL⁻¹; ver item 3) e os volumes utilizados na mistura de reação do ensaio (Tabela 3), a concentração máxima que poderá ser atingida a partir desses extratos será 20 mg.mL⁻¹ ou 0,2 mg.mL⁻¹ (concentração final da mistura de reação), respectivamente. Tendo isso em mente, sugere-se que sejam testadas pelo menos cinco concentrações diferentes do extrato bruto, por exemplo, 0, 5, 10, 15 e 20 mg.mL⁻¹ no caso de amostras frescas e congeladas. O ensaio com diferentes concentrações de extrato bruto será fundamental para estimar o EC₅₀ (concentração efetiva à qual o extrato induz metade do efeito máximo).

6. Cálculo do potencial antioxidante

O potencial antioxidante pode ser expresso como porcentagem de atividade antioxidante, mg de equivalentes padrão por g de extrato bruto e/ou EC₅₀. Os valores de absorbância usados nos cálculos devem ser já descontados com o seu respectivo Branco.

6.1. Porcentagem de atividade antioxidante (%AAO)

O ensaio baseia-se na alteração da coloração roxa para amarela; ou seja, quanto mais o radical DPPH (violeta) for reduzido para DPPH-H menor será o valor da absorbância na mistura de reação em 517 nm. Portanto, ele descreve uma curva decrescente (Fig. 3). Assim, para o cálculo da %AAO substituir os valores obtidos nos ensaios na fórmula abaixo:

$$\% \text{ AAO} = \frac{(\text{Abs Controle DPPH} - \text{Abs amostra}) \times 100}{\text{Abs Controle DPPH}}$$

6.2. Equivalentes padrão por massa de extrato

Os resultados podem também ser calculados com base a um padrão conhecido,

por exemplo, ácido gálico. Para tal, a curva padrão de ácido gálico (Fig. 3), em µg.mL⁻¹, deve ser transformada para µg de ácido gálico. Utilizando essa nova curva em µg de ácido gálico, substituir o valor de Y na equação da reta da curva padrão pela absorbância da amostra e calcular o valor de X correspondente à equivalência da absorbância da amostra em µg de ácido gálico. A seguir, deve-se calcular a massa de amostra (mg ou g) na mistura de reação e, finalmente, dividir o valor da amostra em equivalentes de ácido gálico pela sua massa (µg equivalentes de ácido gálico/g de amostra).

6.3. Cálculo de EC₅₀

O EC₅₀ representa a concentração de extrato efetiva que induz metade (50%) do efeito máximo. Para tal, é preciso avaliar o potencial antioxidante do extrato em, pelo menos, cinco concentrações diferentes. Basicamente, existem dois procedimentos: um baseado no ajuste de regressão linear da capacidade antioxidante *versus* as concentrações de extrato bruto, assim como o utilizado por Mensor et al. (2001). E outro no ajuste sigmoide da capacidade antioxidante *versus* o logaritmo das concentrações de extrato bruto (Chen et al., 2013).

Agradecimentos

Os autores agradecem à FAPESP (2013/07543-0) e BIOTA/FAPESP (2013/50731-1) pelos Auxílios à Pesquisas. JSP foi bolsista de doutorado CAPES. PBT foi bolsista de doutorado CNPq. DYACS e FC são bolsistas de produtividade PQ-CNPq.

Referências

- Alves C.Q., David J.M., David J.P., Bahia M.V. & Aguiar R.M. 2010. Métodos para determinação da atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. *Quim. Nova*, 33(10): 2202-2210.
- Blois M.S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181: 1199-1200.
- Brand-Williams W., Cuvelier M.E. & Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci. Technol.*, 28: 25-30.
- Castelo-Branco V.N. & Torres A.G. 2011. Total antioxidant capacity of edible vegetable oils: chemical determinants and association with oil quality. *Rev. Nutr.*, 24: 173-187.
- Chen Z., Bertin R. & Froidi G. 2013. EC₅₀ estimation of antioxidant activity in DPPH• assay using several statistical programs. *Food Chem.*, 138: 414-420.
- Chen O., Zhuang J., Guzzetta F., Lynch J., Angerhofer A. & Cao Y.C. 2009. Synthesis of water-soluble 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl nanoparticles: A new standard for electron paramagnetic resonance spectroscopy. *J. Amer. Chem. Soc.*, 131: 12542-12543.
- Furlan C.M., Santos K.P., Sedano-Partida M.D., Motta L.B., Santos D.Y.A.C., Salatino M.L.F., Negri G., Berry P.E., van Ee B.W. & Salatino A. 2015. Flavonoids and antioxidant potential of nine Argentinian species of *Croton* (Euphorbiaceae). *Braz. J. Bot.*, 38: 693-702.
- Mensor L.L., Menezes F.S., Leitão G.G., Reis A.S., Santos T.C., Coube C.S. & Leitão S.G. 2001. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytother. Res.*, 15: 127-130.
- Prior R.L., Wu X. & Schaich K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food. Chem.*, 53: 4290-4302.
- Zhu C., Lei Z. & Luo Y. 2015. Studies on antioxidative activities of methanol extract from *Murraya paniculata*. *Food Sci. Hum. Well.*, 4: 108-114.