

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

Janaína Pires<sup>1</sup>, Priscila B. Torres<sup>2</sup>, Déborah Y.A.C. dos Santos<sup>3</sup>, Fungyi Chow<sup>4</sup>

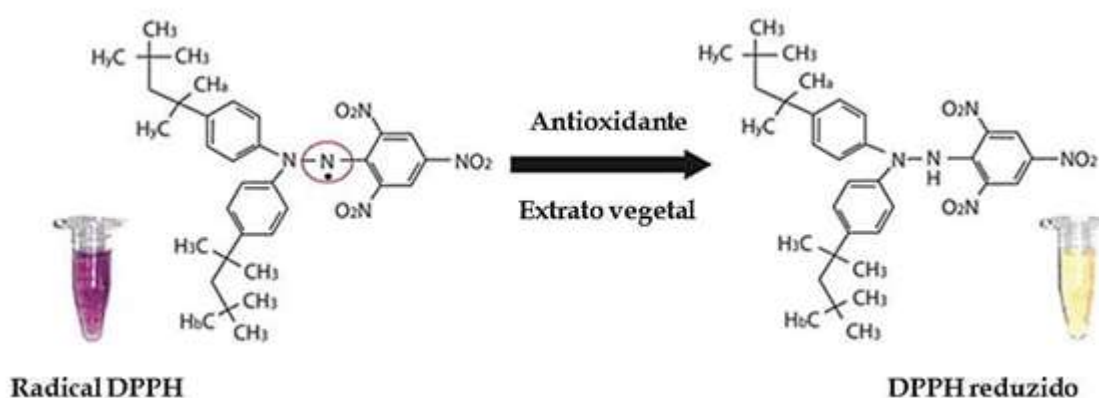
Setembro 2017

## 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 absorvância 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.

<sup>1</sup>Doutora pelo Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade de São Paulo, [jana.pires1@gmail.com](mailto:jana.pires1@gmail.com)

<sup>2</sup>Doutora pelo Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade de São Paulo, [cromossomo@gmail.com](mailto:cromossomo@gmail.com)

<sup>3</sup>Professora Associada, [dyacsan@ib.usp.br](mailto:dyacsan@ib.usp.br)

<sup>4</sup>Professora Doutora, [fchow@ib.usp.br](mailto: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 ( $4^{\circ}\text{C}$ ) 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  $-20^{\circ}\text{C}$ .

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  $-20^{\circ}\text{C}$ .

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  $-20^{\circ}\text{C}$ .

1.5. Solução estoque de BHT  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  (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  $-20^{\circ}\text{C}$ .

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  $-20^{\circ}\text{C}$ .

1.7. Solução estoque de rutina  $2 \text{ mg.mL}^{-1}$  ( $\text{MM} = 610,51 \text{ g.mol}^{-1}$ ): 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  $\mu\text{L}$  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  $-20^\circ\text{C}$ .

## 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 =  $300 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) 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  $3 \text{ mg.mL}^{-1}$ .

## 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.

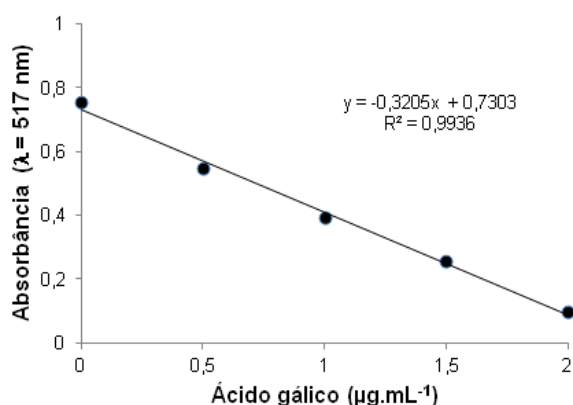
Tomando como exemplo o ácido gálico, em uma microplaca de 96 poços, preparar a curva padrão seguindo os volumes de reagentes da Tabela 2. Incubar a microplaca por 30 min, protegida da luz direta. Ler as absorbâncias em espectrofotômetro de microplacas UV/vis a 517 nm (Fig. 2). Construir uma curva de 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<sup>-1</sup>. O gráfico foi plotado em função da concentração de ácido gálico (µg.mL<sup>-1</sup>) 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 <sup>-1</sup> )	Sol. DPPH (µL)	Ácido gálico 0,1 mg.mL <sup>-1</sup> (µL)	<sup>1</sup> 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.

<sup>1</sup> 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)	<sup>1</sup> 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.

<sup>1</sup> 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<sup>-1</sup>; ver item 2) ou de extratos previamente secos (3 mg.mL<sup>-1</sup>; 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<sup>-1</sup> ou 0,2 mg.mL<sup>-1</sup> (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<sup>-1</sup> no caso de amostras frescas e congeladas. O ensaio com diferentes concentrações de extrato bruto será fundamental para estimar o EC<sub>50</sub> (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 EC<sub>50</sub>. 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<sup>-1</sup>, 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 EC<sub>50</sub>

O EC<sub>50</sub> 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. EC<sub>50</sub> 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.