

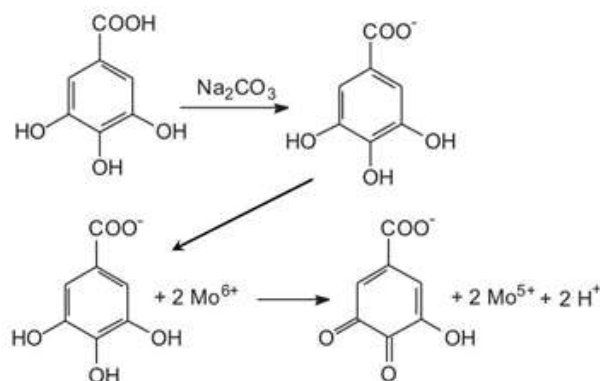
## Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu para extratos de algas

Janaína S. 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

O ensaio colorimétrico que utiliza o reagente Folin-Ciocalteu é um método espectrofotométrico simples e baseia-se na interação das substâncias redutoras com o reagente de Folin-Ciocalteu. A composição química deste reagente inclui o ácido fosfotúngstico ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) e ácido fosfomolibdico ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ), que são reduzidos a partir dos extratos ou substâncias testadas e que, originalmente, possuem coloração amarela. Um meio com pH alcalino propicia que substâncias redutoras, como as substâncias fenólicas, dissociem um próton, levando à formação do ânion fenolato. Este ânion é capaz de reduzir o reagente de Folin-Ciocalteu formando óxido de tungstênio ( $W_8O_{23}$ ) e óxido de molibdênio ( $Mo_8O_{23}$ ). Estes óxidos possuem coloração azul que é detectável na banda do espectro de 760 nm, possibilitando a quantificação dessas substâncias através da espectrofotometria (Genovese et al., 2003; Ikawa et al., 2003; Huang et al., 2005) (Fig. 1). Assim, a coloração final da reação será tanto mais azul quanto maior a quantidade de substâncias redutoras ou substâncias fenólicas (Fig. 2). No entanto, o reagente de Folin-Ciocalteu não é específico para grupos fenólicos, sofrendo interferências de outras substâncias redutoras presentes na amostra, como ácido ascórbico, proteínas e açúcares redutores (Ikawa et al., 2003).



**Figura 1.** Reação de substâncias redutoras com reagente de Folin-Ciocalteu. No exemplo, o ácido gálico, em condição alcalina reage com o complexo fosfomolibdico do reagente de Folin-Ciocalteu. Na reação, há a mudança na cor, de amarelo para azul, indicando que houve redução do complexo fosfomolibdico.

Contudo, no grande grupo das substâncias fenólicas, os flavonoides e os ácidos fenólicos são os que mais se destacam e são considerados os antioxidantes fenólicos mais comuns de fontes naturais. Essas substâncias apresentam-se amplamente distribuídas nas plantas, sendo, desta maneira, encontradas em todas as frutas e outros organismos fotossintetizantes.

As substâncias fenólicas apresentam em sua estrutura um anel aromático com uma ou mais hidroxilas ligadas a ele. Sua estrutura química confere atividade redutora para esse grupo de substâncias, que podem atuar doando elétrons ou agindo no sequestro de radicais livres (antioxidantes).

<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)

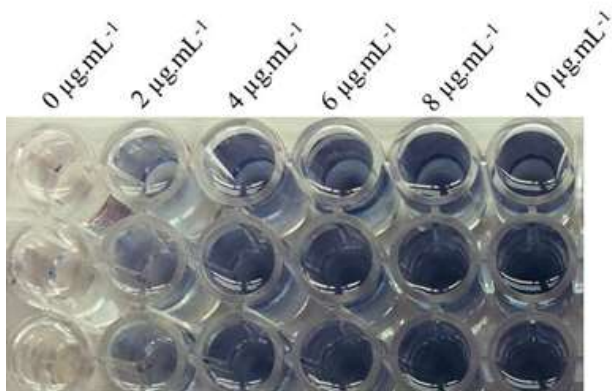
<sup>2</sup>Doutora pelo Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade de São Paulo, [cromossomo@gmail.com](mailto:cromossomo@gmail.com)

<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)

Atualmente, o ensaio de Folin-Ciocalteu é um dos mais aceitos e utilizados para avaliar a atividade indireta do potencial antioxidante de uma amostra, utilizando como princípio medir o poder redutor em extratos vegetais (Karakaya, 2004).

O método do Folin, descrito neste protocolo, é um procedimento rápido que foi testado com extratos de diferentes tipos de algas como as algas verdes *Chaetomorpha* sp., *Cladophora* sp., *Ulva fasciata* e *Desmodesmus* sp., as algas vermelhas *Pterocladia capillacea*, *Pyropia spiralis*, *Palisada flagellifera*, *Bostrychia radicans*, *Gracilariopsis tenuifrons* e *Gracilaria* spp. e a alga parda *Sargassum* spp. Além disso, o presente protocolo, adaptado para microplacas, traz as vantagens de: (a) utilizar pequena quantidade de biomassa de amostra, (b) requerer de pequenos volumes de reagentes e (c) gerar pouco resíduo quando comparado ao protocolo original descrito por Singleton & Rossi (1965) e Waterman & Mole (1994).



**Figura 2.** Microplaca com a reação da curva padrão para ácido gálico (0-10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Note que o aumento da cor representa maior absorbância da amostra e, portanto, maior quantidade de substâncias redutoras/atividade antioxidante. Para cada ponto da curva de ácido gálico são apresentadas três repetições.

## Metodologia

### 1. Preparo das soluções

1.1. Solução saturada de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  10% (MM = 106  $\text{g.mol}^{-1}$ ): pesar 10 g de carbonato de

sódio e dissolver em 100 mL de água ultrapura, misturar até a dissolução do sal. Aguardar a formação de precipitado e filtrar a solução em filtro de papel. Armazenar por tempo indeterminado em temperatura ambiente. **Atenção:** a solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  saturada deve ser filtrada toda vez que for necessário, pois com o tempo pode haver formação de novos cristais.

1.2. Solução estoque de ácido gálico 0,2  $\text{mg.mL}^{-1}$  (ácido 3,4,5-triidroxi benzoico; MM = 170,12  $\text{g.mol}^{-1}$ ): dissolver 1 mg de ácido gálico 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. A solução estoque pode ser armazenada por, pelo menos, seis meses em freezer  $-20^\circ\text{C}$ .

1.3. Solução estoque de BHA 2  $\text{mg.mL}^{-1}$  (2-terc-butil-4-hidroxianisol e 3-terc-butil-4-hidroxianisol; MM = 180,24  $\text{g.mol}^{-1}$ ): dissolver 2 mg de BHA em 1 mL de metanol P.A. A solução estoque pode ser armazenada por, pelo menos, seis meses em freezer  $-20^\circ\text{C}$ .

1.4. Solução estoque de BHT 1,2  $\text{mg.mL}^{-1}$  (hidroxitolueno butilado; MM = 220,35  $\text{g.mol}^{-1}$ ): dissolver 1,2 mg de BHT em 1 mL de metanol P.A. A solução estoque pode ser armazenada por, pelo menos, seis meses em freezer  $-20^\circ\text{C}$ .

1.5. Solução estoque de quercetina 0,3  $\text{mg.mL}^{-1}$  (3,5,7,3'-4'-pentahidroxi flavona; MM = 302,2  $\text{g.mol}^{-1}$ ): dissolver 1 mg de quercetina em 1 mL de metanol P.A. A seguir, pegue 300  $\mu\text{L}$  desta solução e complete o volume para 1000  $\mu\text{L}$  com metanol. A solução estoque pode ser armazenada por, pelo menos, seis meses em freezer  $-20^\circ\text{C}$ .

1.6. Solução estoque de rutina 1,5  $\text{mg.mL}^{-1}$  (MM = 610,51  $\text{g.mol}^{-1}$ ): dissolver 1,5 mg de rutina em 1 mL de metanol P.A. Recomenda-se preparar a solução no dia do uso.

1.7. Solução estoque de Trolox 2  $\text{mg.mL}^{-1}$  (ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico; MM = 250,29  $\text{g.mol}^{-1}$ ): dissolver

2 mg de Trolox em 1 mL de 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<sup>-1</sup>) e deixar em maceração por 3 h a temperatura ambiente e em local protegido da luz. Centrifugar a 12.000 rpm por 15 min a temperatura ambiente e recolher o sobrenadante em um microtubo novo (extrato bruto). **Atenção:** no caso da amostra apresentar potencial antioxidante muito baixo, a extração pode ser realizada com maior biomassa de alga ou menor volume de solvente, obtendo-se um extrato bruto inicial mais concentrado. Recomenda-se que as amostras sejam já acondicionadas em microtubo de 2 mL no momento da amostragem, pois isso facilitará a posterior 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, preparar o extrato da amostra em concentração de 3 mg.mL<sup>-1</sup> em metanol ou DMSO 10%.

## 4. Preparo das curvas padrões

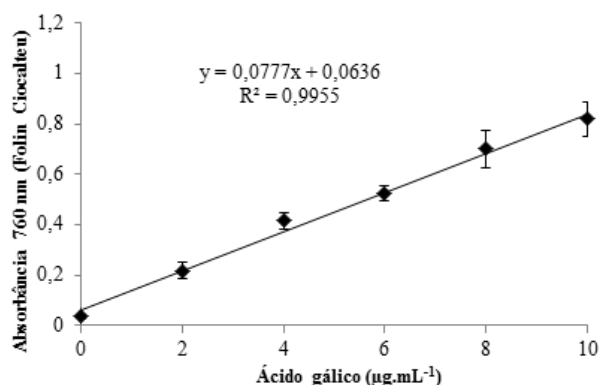
Para cada curva padrão, recomenda-se incluir pelo menos quatro pontos (Fig. 2), além da concentração zero, e três réplicas para cada ponto. Preparar as curvas padrões para obtenção das concentrações finais na mistura de reação de acordo com a Tabela 1.

Tomando como exemplo o ácido gálico, em uma microplaca de 96 poços, preparar a curva padrão seguindo os volumes de reagentes da Tabela 2. A solução de carbonato de sódio deve ser sempre a última

a ser adicionada. Incubar a microplaca com os padrões por 20 min em temperatura ambiente e protegido da luz direta. Ler as absorbâncias em espectrofotômetro de microplacas UV/vis a 760 nm. Construir uma curva de regressão linear relacionando a concentração do padrão (µg.mL<sup>-1</sup>) e os valores de absorbância (Fig. 3).

**Tabela 1.** Lista de padrões com conhecida atividade antioxidante para quantificação de substâncias redutoras através do método de Folin Ciocalteu e faixas de concentrações testadas para a curva padrão.

| Padrão       | Faixa de concentração final na mistura de reação (no poço) |
|--------------|--|
| Ácido gálico | 0 - 10 µg.mL <sup>-1</sup>                                 |
| BHA          | 0 - 90 µg.mL <sup>-1</sup>                                 |
| BHT          | 0 - 44 µg.mL <sup>-1</sup>                                 |
| Quercetina   | 0 - 20 µg.mL <sup>-1</sup>                                 |
| Rutina       | 0 - 90 µg.mL <sup>-1</sup>                                 |
| Trolox       | 0 - 100 µg.mL <sup>-1</sup>                                |



**Figura 3.** Curva padrão de ácido gálico nas concentrações de 0 a 10 µg.mL<sup>-1</sup> versus as absorbâncias lidas a 760 nm.

## 5. Ensaio das amostras

Em uma microplaca de 96 poços, misturar, em penumbra, os volumes indicados na Tabela 3 para cada amostra. Incubar a microplaca com as amostras por 20 min em temperatura ambiente e protegido da luz

direta. Ler as absorvâncias em espectrofotômetro de microplacas UV/vis a 760 nm.

Considerando as concentrações do extrato bruto de amostras frescas e congeladas (300 mg.mL<sup>-1</sup>; ver item 2) ou das amostras de extratos previamente secos (3 mg.mL<sup>-1</sup>; ver item 3) e os volumes utilizados na mistura de reação do ensaio, as concentrações máximas que poderão ser atingidas nas misturas de

reação a partir desses extratos serão 20 mg.mL<sup>-1</sup> ou 0,2 mg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Tendo isso em mente, sugere-se que sejam testadas pelo menos quatro concentrações diferentes do extrato bruto, por exemplo, 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 pode servir para estimar a concentração de extrato com melhor potencial antioxidante.

**Tabela 2.** Volumes de reagentes para construção da curva padrão de ácido gálico.

| Concentração final no poço (µg.mL <sup>-1</sup> ) | Água (µL) | Folin-Ciocalteu 1 N (µL) | Sol. estoque de ácido gálico 0,2 mg.mL <sup>-1</sup> | Metanol (µL) | Carbonato de sódio (µL) | Volume total (µL) |
|---|-----------|--------------------------|--|--------------|-------------------------|-------------------|
| 0*  | 200       | 20                       | ---  | 20           | 60                      | 300               |
| 2   | 200       | 20                       | 3  | 17           | 60                      | 300               |
| 4   | 200       | 20                       | 6  | 14           | 60                      | 300               |
| 6   | 200       | 20                       | 9  | 11           | 60                      | 300               |
| 8   | 200       | 20                       | 12   | 8            | 60                      | 300               |
| 10  | 200       | 20                       | 15   | 5            | 60                      | 300               |

\*A concentração 0 corresponde também ao Branco. A absorvância do Branco deve ser descontada em todas as absorvâncias de cada um dos pontos da curva padrão.

**Tabela 3.** Volumes de reagentes para o ensaio do Folin-Ciocalteu em microplaca com as amostras.

| Amostra          | Água (µL) | Folin-Ciocalteu 1 N (µL) | Amostra (µL) | Metanol (µL) | Carbonato de sódio (µL) | Volume total (µL) |
|------------------|-----------|--------------------------|--------------|--------------|-------------------------|-------------------|
| Branco*          | 200       | 20                       | ---          | 20           | 60                      | 300               |
| Amostra          | 180       | 20                       | 20           | 20           | 60                      | 300               |
| Branco-amostra** | 280       | ---                      | 20           | ---          | ---                     | 300               |

\*O valor da absorvância do Branco é o mesmo obtido para concentração zero da curva padrão na Tabela 2.

\*\*Amostras ou extratos ricos em pigmentos fotossintetizantes podem interferir na leitura da absorvância a 760 nm. Portanto, é necessário fazer um Branco amostra para cada uma das amostras. A absorvância do Branco amostra deve ser descontada na absorvância da respectiva amostra, a fim de descontar possíveis interferências de pigmentos na leitura.

<sup>1</sup>Usar DMSO 10% caso os extratos tenham sido dissolvidos neste solvente.

## 6. Cálculo do potencial antioxidante

O teor de substâncias redutoras pode ser expresso em equivalentes de padrão por massa de extrato (mg.g<sup>-1</sup>). Tomando-se o ácido gálico como exemplo, inicialmente, transformar a curva padrão de ácido gálico, construída em µg.mL<sup>-1</sup> (Fig. 3), para µg de ácido gálico. Utilizando essa curva em µg, substituir o valor de Y na equação da reta da curva padrão pela absorvância da amostra e calcular o valor de X correspondente à

equivalência da absorvância da amostra em µg de ácido gálico. A seguir, calcular a massa de amostra (mg ou g) na mistura de reação e, por fim, dividir o valor da amostra em equivalente de ácido gálico pela sua massa (µg equivalentes de ácido gálico/g de amostra).

Outras formas de calcular o potencial antioxidante são mediante o percentual de atividade ou pelo EC50.

### Agradecimentos

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

### Referências

- Genovese M.I., Santos R.J., Hassimotto N.M.A. & Lajolo F.M. 2003. Determinação do conteúdo de fenólicos totais em frutas. *Rev. Bras. Ciên. Farm.* 39: 167-9.
- Huang D., Ou B. & Prior R. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. F. Chem.* 53: 1841–1856.
- Ikawa M., Schaper T.D., Dollard C.A. & Sasner J.J. 2003. Utilization of Folin-Ciocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds. *J. Agric. F. Chem.* 51, 1811-1815.
- Karakaya S. 2004. Bioavailability of phenolic compounds. *Critical. Rev. F. Sci. Nutr.* 44: 453-464.
- Singleton V. & Rossi J. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16: 144–158.
- Waterman P. G. & Mole S. 1994. Extraction and chemical quantification. In: *Analysis of Phenolic Plant Metabolites*. Blackwell Scientific Publications, Oxford. pp. 83–85.