

Comunicado 50

Técnico

ISSN 1516-8638
Jaguariúna, SP
Julho, 2011

Determinação quantitativa da atividade antioxidante de extratos brutos de microrganismos pelo método de captura de radical livre DPPH

Suikinai Nobre Santos¹
Rodrigo Fernandes Castanha²
Lenita Lima Haber³
Márcia Ortiz Mayo Marques⁴
Shirlei Scramim⁵
Itamar Soares de Melo⁶

Introdução

Antioxidantes são compostos capazes de reduzir a ação de espécies reativas de oxigênio (radicais livres) que podem causar danificação em tecidos orgânicos. A formação de radicais livres está associada com o metabolismo natural das células, pois o consumo do oxigênio durante o crescimento celular resulta na geração de compostos que interagem com lipídios e produzem radicais livres na forma de superóxidos, hidroxilas e peróxidos (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

A ação de tais radicais em organelas celulares por meio da oxidação de lipídios, lisossomos e membranas mitocondriais, causa um desequilíbrio eletrolítico de constituintes endo e exonucleares, o qual resulta em danos celulares e teciduais por

diferentes mecanismos. Tais eventos contribuem para o desenvolvimento de patologias como inflamação, artrites, doenças gastrointestinais, isquemia, cardiovasculares, desordem no sistema nervoso e doenças neurodegenerativas. Portanto, a utilização de substâncias com ação de capturar radicais livres surge como uma alternativa na terapia de varias doenças, o que torna importante a busca de novos compostos capazes de inibir processos oxidativos, *in vivo*, sem a presença de risco para a saúde humana (HUANG et al., 2007).

Por milhares de anos a diversidade genética tem sido fonte de fármacos, e um número expressivo de drogas modernas (por exemplo, na terapia anticancerígena, antimicrobiana, antiparasitária) são isoladas de fontes naturais provenientes, principalmente, de países com clima tropical e subtropical

¹ Doutoranda em Microbiologia Agrícola Esalq/USP, Laboratório de Microbiologia Ambiental, Rod. SP 340, km 127,5 - Caixa Postal 69, Tanquinho Velho, 13.820-000, Jaguariúna, SP.

² Tecnólogo em Saneamento Ambiental, Assistente da Embrapa Meio Ambiente, Rod. SP 340, km 127,5 - Caixa Postal 69, Tanquinho Velho, 13.820-000, Jaguariúna, SP. rodrigo@cnpma.embrapa.br

³ Pos-doutoranda, Laboratório de Fitoquímica, Instituto Agronômico de Campinas, Av. Barão de Itapura, 1481 - Campinas, 13020-902.

⁴ Pesquisadora, Laboratório de Fitoquímica, Instituto Agronômico de Campinas, Av. Barão de Itapura, 1481 - Campinas, 13020-902.

⁵ Química, Doutora em Química Orgânica, Pesquisadora da Embrapa Meio Ambiente, Rod. SP 340, km 127,5 - Caixa Postal 69, Tanquinho Velho, 13.820-000, Jaguariúna, SP. scramin@cnpma.embrapa.br

⁶ Biólogo, PhD. em Fitopatologia, Pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Rod. SP 340, km 127,5 - Caixa Postal 69, Tanquinho Velho, 13.820-000, Jaguariúna, SP. itamar@cnpma.embrapa.br

como o Brasil. Tendo em vista, a riqueza de espécies e nichos ecológicos existentes nestes ecossistemas, são então, amplamente utilizadas como alvo para procura de novas biomoléculas com aplicabilidade farmacológica, agrícola e industrial. As plantas e os micro-organismos cultiváveis são as principais fontes de moléculas biológicas ativas e terapeuticamente úteis, como alcalóides, terpenóides, fenólicos e glicosídeos. Contudo, observa-se que a maior parte dos estudos em busca de novos produtos naturais, no Brasil, tem-se concentrado nas espécies vegetais para o isolamento de seus compostos ativos em relação à gama de efeitos biológicos tradicionais, como antitumoral, antioxidante e hipoglicêmico (PUPO; GALLO, 2007; STROBEL ; DAISY, 2003; THIERICKE, 2000).

As comunidades biológicas pouco exploradas ou inexploradas, tais como os micro-organismos gerais e/ou endofíticos, estão frequentemente associadas à diversidade biológica e diretamente relacionada à descoberta de moléculas químicas com potencial de atividade biológica. Estes organismos são cosmopolitas (habitam tecidos internos de espécies vegetais, corpos d'água, solo e ar) produzem metabólitos que desempenham funções favoráveis à sua relação interespecífica com o ambiente. Uma vez isolado, selecionado e preservado, um micro-organismo produtor de biomoléculas de interesse, pode ser submetido à pesquisa e desenvolvimento o que, às vezes, torna-se difícil com plantas raras ou de crescimento lento. Nesse contexto, os micro-organismos isolados dos ecossistemas brasileiros podem ser considerados fonte promissora para bioprospeção de novos produtos naturais resultantes do metabolismo microbiano, tendo em vista a sua aplicação biotecnológica (BUTLER, 2004; HUANG et al., 2007; STROBEL; DAISY, 2003, TAN; ZOU, 2001; THIERICKE, 2000).

Estudos mostram compostos das classes dos flavonóides, taninos e fenóis que apresentam alta atividade antioxidante. Diante disso, micro-organismos isolados de ambientes tropicais, atualmente são utilizados como fontes de metabólitos variados por estarem envolvidos na produção de compostos como enzimas, alcalóides, antibióticos, anticancerígenos e outros, os quais favorecem a adaptação em diferentes nichos ecológicos (ARUOMA et al., 1996; FERREIRA; MATSUBARA, 1997; SOKMEN et al., 2005; SOUSA et al., 2007).

A técnica da captura do radical livre DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), inicialmente descrita por Brand-Williams em 1995, é baseada na reação química apresentada na figura 1, que avalia essa captura do radical livre DPPH por antioxidantes, produzindo um decréscimo na absorbância a 517 nm. Este método foi adaptado por Milardovic et al., 2006 e assim estão sendo feitas outras adaptações na presente pesquisa.

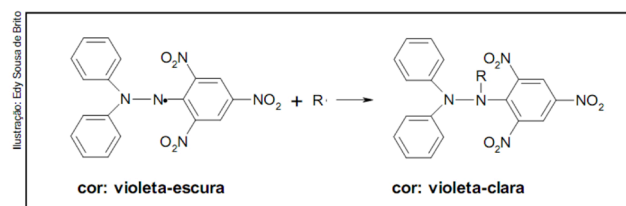


Fig. 1. Reação de captura do DPPH*.

O escopo deste trabalho é a disponibilização da metodologia científica utilizada na determinação quantitativa da atividade antioxidante de extratos livre DPPH, baseadas nas adaptações realizadas no Laboratório de Microbiologia Ambiental em parceria com o Laboratório de Produtos Naturais, ambos da Embrapa Meio Ambiente.

Materiais Necessários

Reagentes

- Ácool etílico P.A.
- Água destilada
- DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl-hidrazil) (PM = 394,3)
- Sigma, código 095K1452
- Meio líquido caldo agar nutriente
- Meio líquido caldo batata dextrose

Equipamentos e Vidrarias

- Balança analítica
- Balão volumétrico 100 mL
- Centrífuga
- Cronômetro digital
- Cubetas de vidro
- Espectrofotômetro com UV-VIS
- Funil de Buchner
- Funil de porcelana poroso
- Funil de separação

- Kitassato
- Membrana de celulose de 0,45 µm
- Trolox - Sigma, código 095K1452
- Microtubo tipo eppendorf graduado (2 mL)
- Pipeta automática (10 - 100 µL)
- Rotaevaporador
- Shaker com temperatura controlada

Preparo de Soluções:

Solução de DPPH a 0,004 %

Dissolver 4 mg de DPPH em álcool etílico e completar o volume para 100 mL em um balão volumétrico. Preparar e utilizar apenas no dia da análise.

Solução de Trolox a 0,05 %

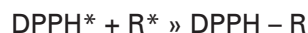
Dissolver 5 mg de Trolox em álcool etílico e completar o volume para 1 mL em um microtubo tipo eppendorf. Posteriormente, em outro microtubo, adicionar 10 µL desta solução a 990 µL de álcool etílico. Preparar e utilizar apenas no dia da análise.

Obtenção de extratos orgânicos dos micro-organismos isolados

Os isolados bacterianos devem ser cultivados em meio líquido caldo nutriente (CN) e os isolados de fungos em caldo batata dextrose (CBD). Incubar 300 mL de caldo em "Shaker" 28°C, 180 rpm, por cerca de 72 horas. Após o crescimento microbiano, filtrar os caldos de culturas em sistema de filtração a vácuo, com membrana de celulose de 0,45 µm, para a retirada das colônias microbianas. Realizar extrações líquido-líquido do sobrenadante, com 100 mL de acetato de etila em funil de separação na proporção 1/1. Este processo deve ser repetido por três vezes para cada operação. Adicionar sulfato de sódio anidro à fase orgânica reunida, na concentração de 5%. Após a filtragem e evaporação dos solventes em rotaevaporador, são obtidos extratos brutos para a avaliação da atividade antioxidante.

Determinação da Atividade Antioxidante

A redução do DPPH* é acompanhada pelo monitoramento do decréscimo na absorvância em comprimento de onda característico durante a reação. Em sua forma radical, o DPPH* tem maior absorção no comprimento de onda a 517 nm, mas sob redução por antioxidante (AH) ou uma espécie radical (R*) a absorvância é reduzida, como apresenta a equação abaixo:



A capacidade de sequestro do radical livre DPPH pela amostra é determinada pela habilidade de transferência de hidrogênio para o radical livre estável DPPH. A propriedade de sequestrar radicais livres dos compostos presentes em vários extratos de plantas ou micro-organismos tem sido recentemente apontada sugerindo um possível papel redutor destes compostos, diminuindo os riscos de doenças cardiovasculares em humanos. O sequestro de radicais livres é um dos mecanismos reconhecidos pelo qual ocorre a ação dos antioxidantes (BRAND-WILLIAMS et al., 1995).

A partir do extrato obtido, preparou-se as soluções em microtubos tipo eppendorf em três diluições diferentes em triplicata. Em ambiente escuro, transferiu-se uma alíquota de 100 µL de cada diluição do extrato para microtubos tipo eppendorf com 900 µL do radical DPPH (item solução de DPPH a 0,004 %) e a mistura foi homogeneizada por agitação. O controle foi preparado com 100 µL de álcool etílico e 900 µL do radical DPPH homogeneizado. Realizou-se o controle da solução de DPPH com adição de 100 µL da solução controle (item solução de Trolox a 0,05%) com 900 µL do radical DPPH e homogeneização. Para validação da análise, a % de redução de trolox foi de 50% (± 5). Após a homogeneização incubou-se as amostras por 25 minutos, com ausência total de luz. As leituras no espectrofotômetro foram feitas a 517 nm. Utilizou-se álcool etílico, como branco, para calibrar o espectrofotômetro.

A atividade antioxidante dos compostos é expressa em porcentagem de redução do DPPH obtida pela Equação 1, descrita abaixo (tabela 1). Para cada amostra o ensaio deve ser realizado em triplicata e os resultados devem ser apresentados em Concentração Efetiva 50% (EC50).

Equação 1:

$$\% \text{ redução do DPPH} = [(\text{Abs. Amostra} - \text{Abs. Branco}) / \text{Abs branco}] \times 100$$

Abs = absorvância (517 nm)

Tabela 1. Percentual de redução do DPPH pelos extratos fúngicos utilizados de acordo com as concentrações apresentadas na tabela abaixo.

Amostra	% de Redução do DPPH				
	mg/L				
	0,312	0,625	1,25	2,5	5
03a	7,90	10,00	14,00	21,00	29,00
03b	10,00	17,00	24,00	39,90	68,00
108a	40,00	43,00	66,00	71,50	73,00
108b	9,00	10,00	10,00	15,00	25,00
177a	-5,00	-1,00	-3,00	-20,00	-77,00
177b	-2,00	-1,00	-2,00	-12,00	-26,00
391a	8,64	14,50	23,66	37,73	53,80
391b	-0,75	1,08	3,70	7,33	11,45

a – extrato bruto pH ácido;

b – extrato bruto pH básico;

Cálculo do EC50

A concentração efetiva 50%, expressa a concentração mínima de antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH.

A partir das absorbâncias obtidas das diferentes diluições dos extratos, plotou-se a % de redução do DPPH no eixo Y e a concentração dos extratos (mg/mL) no eixo X, e determinou-se a equação da reta (Eq. 2)

$$Y = -ax + b \text{ (Equação 2)}$$

Onde:

y = % redução do DPPH

x = EC50 (mg/mL)

Para calcular o EC50 utilizou-se a equação da reta, substituindo o valor de y (Eq. 2) por 50 para obter a concentração da amostra com capacidade de reduzir 50% do DPPH, como apresentados na fig. 2 e tabela 2. Os extratos com valores de EC50 mais próximo a zero são considerados como antioxidantes e os organismos produtores desses extratos podem ser considerados como potenciais em aplicabilidade biotecnológica.

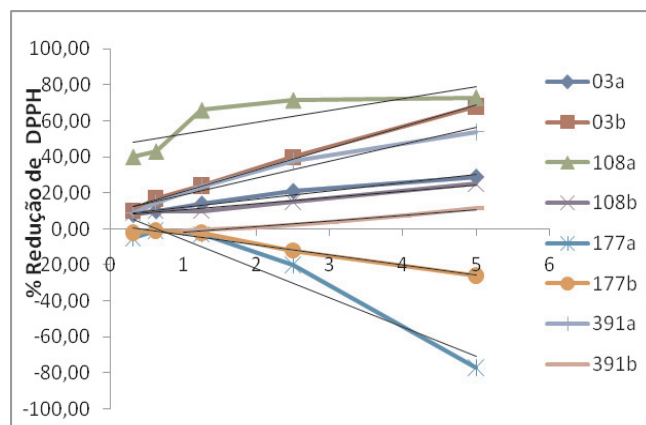


Fig. 2. Efeito da captura dos radicais livres DPPH do extrato bruto de linhagens fúngicas teste.

Tabela 2. Equação da reta usada para calcular EC50 da atividade antioxidante de extratos brutos de linhagens fúngicas teste.

Amostra	Equação da reta	R ²	EC ₅₀
03a	y = 4,4755x + 7,7092	0,9739	9,44
03b	y = 12,086x + 8,3649	0,9961	3,444
108a	y = 6,673x + 45,772	0,6358	0,633
108b	y = 3,4664x + 7,0841	0,9767	12,38
177a	y = -16,209x + 10,204	0,9275	-2,455
177b	y = -5,5351x + 2,1237	0,9696	-8,649
391a	y = 9,403x + 9,4462	0,9621	4,312
391b	y = 3,0664x - 4,6374	0,9766	17,818

(EC50 = coeficiente de equivalência)

Agradecimentos

Agradecemos ao CNPq pelo fomento e ao IAC pela parceria na elaboração deste trabalho.

Referências

ARUOMA, O.I. Free radicals: dietary advantages and disadvantages. In: SCANDALIOS, J. G.. (Ed.). Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses. Cold Spring Harbor: CSHL Press, 1996. (Cold Spring Harbor Monograph Series, 34).

BUTLER, M.S. The role of natural product chemistry in drug discovery. *Journal of Natural Products*, v. 67, n. 12, p. 2141-2153, 2004.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistemas de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 43, n.1, p. 61- 68, 1997.

HUANG, W.; CAI, Y.; XING, J.; CORKE, H.; SUN, M. A potential antioxidant resource: endophytic fungi from medicinal plants. *Economic Botany*, v. 61, p. 14-30, 2007.

MILARDOVIC, S.; IVEKOVIC, D.; GRABARIC, B.S. A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical. *Bioelectrochemistry*, v. 68, p. 175-180, 2006.

PUPO, M.T.; GALLO, M.C.B. Biologia química: uma estratégia para a pesquisa em produtos naturais. *Química Nova*, v. 30, p. 1446-1455, 2007.

SOUSA, C.M.M.; SILVA, H.R.; VIEIRA-Jr., G..M.; AYRES, M.C.C. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, v. 30, p. 351-355, 2007.

SOKMEN, M.; ANGELOVA, M.; KRUMOVA, E.; PASHOVA, S.; IVANCHEVA, S.; SOKMEN, A.; SERKEDJIEVA, J. In vitro antioxidant activity of polyphenol extracts with antiviral properties from *Geranium sanguineum* L. *Life Sciences*, v. 76, n. 25, p. 2981-2993, 2005.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospection for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 67, n. 4, p. 491-502, 2003.

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Products Reports*, v. 18, p. 448-459, 2001.

THIERICKE, R. Drug discovery from nature: automated high-quality sample preparation. *Journal of Automated Methods & Management in Chemistry*, v. 22, n. 5, p. 149-157, 2000.

Comunicado Técnico, 50

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Meio Ambiente
Endereço: Rod. SP 340 - Km 127,5 - Caixa Postal 69, Cep. 13820-000 Jaguariúna, SP
Fone: (19) 3311-2700
Fax: (19) 3311-2640
E-mail: sac@cnpma.embrapa.br

1ª edição 2011

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



Comitê de publicações

Presidente: *Marcelo Augusto Boechat Morandi.*
Secretário: *Sandro Freitas Nunes.*
Bibliotecária: *Maria Amélia de Toledo Leme*
Membro Nato: *Adriana M. M. Pires*
Membros: *Lauro Charlet Pereira, Vera Lúcia S. S. de Castro, Maria Conceição P.Y. Pessoa, Nilce Chaves Gattaz e Luiz Alexandre Nogueira de Sá.*

Expediente

Normalização Bibliográfica: *Maria Amélia de Toledo Leme*
Editoração eletrônica: *Alexandre R. da Conceição.*