Ensaio antioxidante via o reagente DPPH

Dra. Priscila Torres

**Preparo do DPPH**

1. Dissolver 2,8 mg de DPPH em 50 mL de metanol (Depende do grau de degradação do reagente ou do lote). Sonicar por 25 min. Guardar a solução protegida da luz na geladeira por até 1 semana.

**Preparo das amostras e da curva de calibração**

1. Diluir cada extrato ou fração a ser analisada em DMSO 10% (Concentração: 1 mg/mL). Fazer diluições para cálculo do IC50.
2. Curva padrão: Fazer uma solução mãe para o Trolox em DMSO 10% (Concentração: 1 mg/mL). Fazer diluições em microtubos em DMSO 10% (0-200 µg/mL).

**Montagem da placa Elisa**

1. Ligar o ELISA e abrir um experimento com o protocolo: **DPPH Algas**. Parâmetros do protocolo: agitação por 20 min e leituras em 515 nm.
2. Transferir 20 µL do extrato ou DMSO 10% (para o Branco) ou ponto da curva de calibração a ser analisado para cada poço da microplaca.
3. Adicionar 280 µL da solução de DPPH.
4. Colocar a placa no leitor ELISA e realizar as leituras.

**Resumo:**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Poço:**20µL do que vai medir280 µL do reagente DPPH20 min; 515 nm | **Curva:**Trolox (0-200 µg/mL) | **Reagente DPPH**:2,8 mg de DPPH50 mL de metanolSonicar por 25 min |

# **Ensaio do radical ABTS**

Dra. Priscila Torres

**Preparo das soluções:**

1. Solução ABTS (7 mM): Dissolver 3,84 mg de ABTS em 1 mL de água destilada. Guardar sob refrigeração e protegida da luz (Validade: 1 mês).
2. Solução de persulfato de potássio (140 mM): Dissolver 37,84 mg de persulfato de potássio em 1 mL de água destilada. Guardar em temperatura ambiente (Validade: 1 mês).
3. Radical ABTS: Misturar 1 mL da solução ABTS (item 1) com 17,6 µL da solução de persulfato de potássio (item 2). Manter a mistura no escuro por 16 horas a temperatura ambiente. Diluir esta mistura em metanol (razão de 1:30) até obter absorbância em torno a 0,7 (Comprimento: 734 nm). (Validade: dia da análise).

**Preparo das amostras e da curva padrão:**

1. Diluir cada extrato ou fração a ser analisada em DMSO 10% (Concentração: 1 mg/mL). Fazer diluições para cálculo do IC50.
2. Curva padrão: Fazer uma solução mãe para o Trolox em DMSO 10% (Concentração: 1 mg/mL). Fazer diluições em microtubos em DMSO 10% (0 - 240 µg/mL).

**Preparo da placa:**

1. Ligar o ELISA e abrir um experimento com o protocolo: **ABTS Algas**. Parâmetros do protocolo: agitação por 20 min e leituras em 734 nm.
2. Transferir 20 µL do extrato ou DMSO 10% (para o Branco) ou ponto da curva de calibração a ser analisado para cada poço da microplaca.
3. Com multicanal pipetar nos poços 280 μL do radical ABTS.
4. Colocar a placa no leitor ELISA e realizar a leituras.

**Resumo:**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Poço:**20 µL água ultrapura280 µL do radical ABTS734 nm | **Curva:**Trolox (0-240 µg/mL) | **Radical ABTS**:1 mL da ABTS17,6 µL da de persulfato de potássio Diluir esta mistura em metanol (razão de 1:30) 16 h🡪 0,7 a 734 nm |

**Referências**

Rufino, M., & Alves, R. (2007). Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. *Embrapa*, 3–6. Retrieved from http://agris.fao.org/agris-search/search.do?f=2012/BR/BR2012102700027.xml;BR20071426953

Yang, H., Dong, Y., Du, H., Shi, H., Peng, Y., & Li, X. (2011). Antioxidant compounds from propolis collected in Anhui, China. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *16*(4), 3444–55.