

Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do sistema quelante de metais para extratos de algas

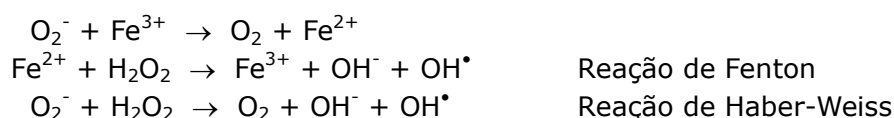
Talissa B. Harb¹, Priscila B. Torres², Janaína S. Pires³,
Déborah Y.A.C. dos Santos⁴, Fungyi Chow⁵

Setembro 2016

Introdução

A ação do poder redutor de alguns metais, como o ferro, em diversas reações celulares está estreitamente ligada à produção *in vivo* de espécies reativas. Em condições de estresse oxidativo, o excesso de ânions superóxido (O_2^-) pode reagir com os íons Fe^{3+} que estão coligados a algumas proteínas reduzindo-os a íons Fe^{2+} . Os íons livres de

Fe^{2+} podem participar da reação de Fenton e reagir com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), gerando radicais hidroxilas (OH^*), que são moléculas altamente reativas. Além disso, o O_2^- ainda pode participar da reação de Haber-Weiss, reagindo com o H_2O_2 e gerando mais OH^* , segundo as seguintes equações (Jomova et al., 2010):



O H_2O_2 , apesar de não ser um radical livre, é um metabólito de oxigênio extremamente deletério, pois participa das reações de Fenton e de Haber-Weiss que produzem vários radicais hidroxila (Ferreira & Matsubara, 1997). Estes radicais formam a classe de radical mais reativa dentre os radicais, sendo, por isso, extremamente danosos às moléculas de DNA, proteínas, membranas lipídicas e outras moléculas.

Na literatura existem vários métodos *in vitro* para estimar o potencial antioxidante, sendo um deles relacionado à medida da capacidade de uma amostra de quelar metais. O ensaio antioxidante quelante de metais é um método simples para avaliar o potencial de uma amostra de reduzir a

peroxidação lipídica ou a formação de radicais livres, produtos das reações de Fenton e de Haber-Weiss. Esse método é baseado na utilização do reagente ferrozina que, na presença do íon Fe^{2+} , forma um complexo de cor rósea, cuja absorbância pode ser medida no comprimento de onda de 562 nm. O potencial antioxidante é monitorado pela diminuição da absorbância, visível pela descoloração da reação. O método determina a quantidade remanescente de íons ferro não quelados na mistura de reação (Min et al., 2011). Assim, quanto menor a absorbância, ou menor intensidade da coloração rosa (Fig. 1), maior será o potencial antioxidante e, portanto, maior a capacidade de quelar os íons ferro.

¹Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade de São Paulo, talissaharb@ib.usp.br

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

³Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade de São Paulo, jana.pires1@gmail.com

⁴Professora Associada, dyacsan@ib.usp.br

⁵Professora Doutora, fchow@ib.usp.br

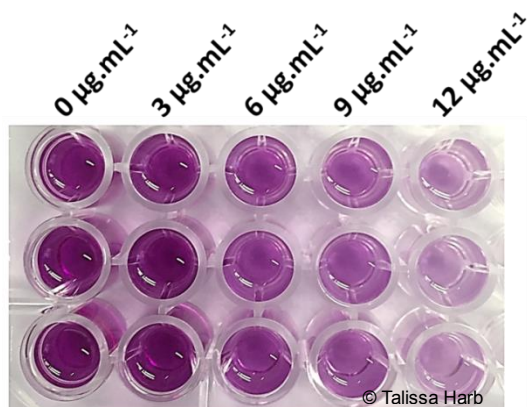


Figura 1. Microplaca com a reação da curva padrão para ácido gálico (0 - 12 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Note que a perda da cor rósea representa menor absorvância da amostra e, portanto, maior potencial quelante. Para cada ponto da curva de ácido gálico são apresentadas três repetições.

O protocolo original para determinação do potencial antioxidante através do ensaio do sistema quelante de metais foi descrito por Min et al. (2011) com extratos obtidos de arroz, utilizando grandes volumes de reagentes e quantidade de biomassa. Santos (2014), em um estudo realizado com *Croton sphaerogynus*, adaptou o protocolo para ser desenvolvido em microplacas de 96 poços, diminuindo consideravelmente o volume de

reagentes e a quantidade de amostra necessária.

Em estudos com algas envolvendo abordagens fisiológicas, ecofisiológicas e análises químicas de prospecção, a quantidade de biomassa disponível é limitante, impossibilitando, muitas vezes, a realização de estudos mais aprofundados com diferentes ensaios. O método quelante de metais, descrito neste protocolo, é um procedimento rápido que funciona com extratos de diferentes tipos de algas como 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 diversas espécies da alga parda *Sargassum*. Além disso, o presente protocolo, adaptado para microplacas de 96 poços, traz as vantagens de (a) utilizar pequena quantidade de biomassa de amostra, (b) requerer pequenos volumes de reagentes e (c) gerar pouco resíduo quando comparado ao protocolo original descrito em Min et al. (2011).

Metodologia

1. Preparo das soluções

1.1. Solução de sulfato de amônio ferroso 2 mM ($(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; MM = 392,14 g.mol^{-1}): em béquer, dissolver 2,4 mg de sulfato de amônio ferroso ou sulfato ferroso amoniacal em 3 mL de água ultrapura. Este volume permite a preparação de 2 placas de 96 poços. Preparar e usar no dia da análise.

1.2. Solução estoque de acetato de amônio 10% (MM = 77,08 g.mol^{-1}): em balão volumétrico, dissolver 5 g de acetato de amônio em 30 mL de água ultrapura e, em seguida, completar o volume para 50 mL com água ultrapura. Este volume permite a preparação de 2 placas de 96 poços. Validade de 1 mês. Armazenar em frasco de vidro à temperatura ambiente.

1.3. Solução de ferrozina 6,1 mM (3-(2-piridil)-5,6-bis-(4-ácido fenil sulfônico)-1,2,4-triazina; MM = 492,46 g.mol^{-1}): em béquer, dissolver 9 mg de ferrozina em 3 mL de água ultrapura. Este volume permite a preparação de 2 placas de 96 poços. Preparar e usar no dia da análise.

1.4. Solução estoque de ácido gálico 0,5 mg.mL^{-1} (ácido 3,4,5-triidroxibenzoico; MM = 170,12 g.mol^{-1}): em microtubo, dissolver 0,5 mg de ácido gálico em 1 mL de metanol P.A. A solução estoque pode ser armazenada por, pelo menos, seis meses em freezer -20°C .

1.5. Solução estoque de quercetina 0,5 mg.mL⁻¹ (3,5,7,3'-4'-pentahidroxiflavona; MM = 302,2 g.mol⁻¹): em microtubo, dissolver 0,5 mg de quercetina em 1 mL de metanol P.A. A solução pode ser armazenada por, pelo menos, seis meses a -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 em local protegido da luz. Centrifugar a 12.000 rpm por 15 min a temperatura ambiente e recolher o sobrenadante (extrato bruto) em um tubo novo. **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 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%, preparando soluções iniciais com 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.

Tabela 1. Listagem de padrões com conhecida atividade antioxidante para o ensaio do potencial quelante de metais e faixas de concentrações testadas para a curva padrão.

Padrão	Faixa de concentração final na mistura de reação (no poço)
Ácido gálico	0 - 12 µg.mL ⁻¹
Quercetina	0 - 20 µg.mL ⁻¹

Tomando como exemplo o ácido gálico, em uma microplaca de 96 poços, preparar a curva padrão, em penumbra, seguindo os volumes de reagentes da Tabela 2. Após 5 min de reação da mistura descrita na Tabela 2, adicionar 15 µL da solução de ferrozina e homogeneizar em cada pipetagem. Incubar a microplaca por 10 min, protegida da luz, e agitação a 100 rpm. Ler as absorbâncias em espectrofotômetro de microplacas UV/vis a 562 nm. Construir uma curva de regressão linear relacionando a concentração do padrão (µg.mL⁻¹) e os valores de absorbância (Fig. 2).

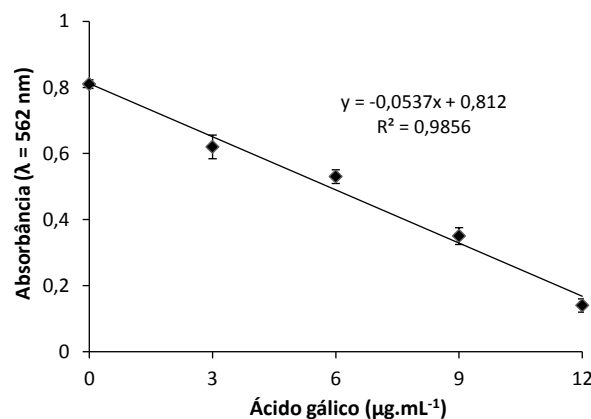


Figura 2. Curva padrão de ácido gálico nas concentrações de 0 a 12 µg.mL⁻¹. O gráfico foi plotado em função da concentração de ácido gálico (µg.mL⁻¹) e as respectivas absorbâncias dos padrões lidas em 562 nm.

5. Ensaio das amostras

Em uma microplaca de 96 poços preparar, em penumbra, a mistura do ensaio para cada amostra seguindo os volumes indicados na Tabela 3. Após 5 min de reação da mistura,

adicionar 15 µL da solução de ferrozina e homogeneizar em cada pipetagem. Incubar a microplaca por 10 min, protegida da luz, e

agitação a 100 rpm. Ler as absorbâncias em espectrofotômetro de microplacas UV/vis a 562 nm.

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

Concentração final no poço (µg.mL ⁻¹)	Acetato de amônio (µL)	Sulfato de amônio (µL)	Ácido gálico 0,5 mg.mL ⁻¹ (µL)	¹ Metanol (µL)	² Ferrozina (µL)	Volume total (µL)
Branco*	250	15	---	35	---	300
0**	250	15	---	20	15	300
3	250	15	1,8	18,2	15	300
6	250	15	3,6	16,4	15	300
9	250	15	5,4	14,6	15	300
12	250	15	7,2	12,8	15	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 quelante.

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

² Adicionar a ferrozina após 5 min de reação da mistura (ver detalhes na descrição acima).

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

Amostra	Acetato de amônio (µL)	Sulfato de amônio (µL)	Amostra (µL)	¹ Metanol (µL)	² Ferrozina (µL)	Volume total (µL)
Controle quelante	250	15	---	20	15	300
Branco*	250	15	---	35	---	300
Amostra	250	15	20	---	15	300
Branco amostra**	250	15	20	15	---	300

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

**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 quelante.

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

² Adicionar a ferrozina após 5 min de reação da mistura (ver detalhes na descrição acima).

Considerando a concentração do extrato bruto de amostras frescas e congeladas (300 mg.mL⁻¹; ver item 2) ou de amostras secas (3 mg.mL⁻¹; ver item 3) e os volumes utilizados na mistura de reação do ensaio (Tabela 3), as concentrações máximas que poderão ser atingidas a partir desses extratos serão 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 a 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 EC_{50} , ou seja, a concentração efetiva à qual o extrato induz metade do efeito máximo. Os valores de absorvância usados nos cálculos devem ser já descontados com o seu respectivo Branco.

6.1. Porcentagem de atividade antioxidante (%AAO)

O ensaio baseia-se na descoloração da mistura de reação, por conseguinte, uma menor absorvância representa maior %AAO. Portanto, ele descreve uma curva descendente (Fig. 2). Assim, para o cálculo da %AAO substituir os valores obtidos nos ensaios na fórmula abaixo:

$$\% \text{ AAO} = [(\text{Abs Controle quelante} - \text{Abs amostra}) \times 100] / \text{Abs Controle quelante}$$

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, transformar a curva padrão de ácido gálico construída em $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Fig. 2), para μg de ácido gálico. Utilizando essa curva em μg

de ácido gálico, 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).

6.3. Cálculo de EC_{50}

Para calcular a EC_{50} 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

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

Referências

- Chen Z, Bertin R, Frolidi G. 2013. EC_{50} estimation of antioxidant activity in DPPH* assay using several statistical programs. *Food Chemistry* 138: 414-420.
- Ferreira ALA, Matsubara LS. 1997. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira* 43: 61-68.
- Jomova K, Vondrakova D, Lawson M, Valko M. 2010. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Molecular and Cellular Biochemistry* 345: 91-104.
- Mensor LL, Menezes FS, Leitão GG, Reis AS, Santos TC, Coube CS, Leitão SG. 2001. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy Research* 15: 127-130.
- Min B, McClung AM, Chen MH. 2011. Phytochemicals and antioxidant capacities in rice brans of different color. *Journal of Food Science* 76: 117-126.
- Santos KP. 2014. *Croton sphaerogynus* Baill.: substâncias fenólicas e atividades biológicas. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo 70p.