

Ensaio antioxidante em microplaca do poder de redução do ferro (FRAP) para extratos de algas

Vanessa Urrea-Victoria¹, Janaína Pires², Priscila Bezerra Torres³,
 Déborah Yara Alves Cursino dos Santos⁴, Fungyi Chow⁵
 Setembro 2016

Introdução

Os radicais altamente reativos como as espécies reativas de oxigênio (EROs), potencialmente prejudiciais, são produzidas como consequência do metabolismo celular (Benzie & Strain, 1996). Normalmente, estes radicais livres podem ser removidos ou inativados por diversos antioxidantes (Antolovich et al., 2002), mediante mecanismos baseados na transferência de elétrons ou hidrogênios (Ou et al., 2002). O ensaio antioxidante de determinação do poder de redução do íon ferro, FRAP (do inglês *Ferric Reducing Antioxidant Power*),

está baseado na produção do íon Fe^{2+} (forma ferrosa) a partir da redução do íon Fe^{3+} (forma férrica) presente no complexo 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) (Fig. 1). Quando a redução ocorre, há uma alteração na tonalidade da mistura de reação, passando de roxo claro a um roxo intenso (Fig. 2), cuja absorbância pode ser medida no comprimento de onda de 595 nm (Benzie & Strain, 1999; Antolovich et al., 2002). Quanto maior a absorbância ou intensidade da coloração, maior será o potencial antioxidante.

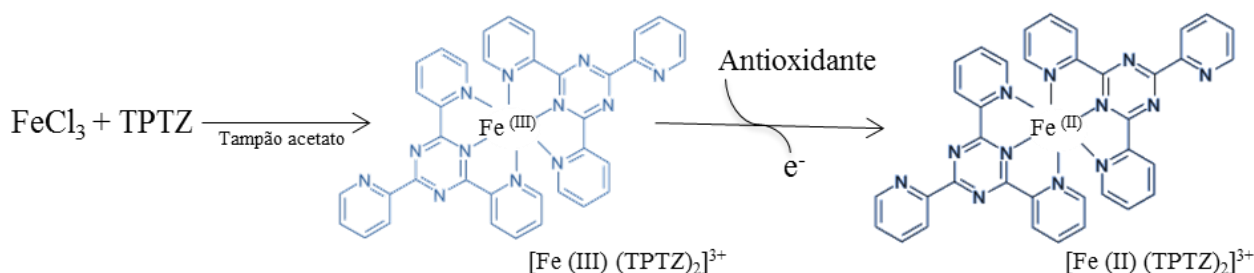


Figura 1. Reação química que descreve a produção de Fe^{2+} (forma ferrosa) a partir da redução de Fe^{3+} (forma férrica) presente no complexo com TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina).

¹Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade de São Paulo, vaneuv@ib.usp.br

²Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade de São Paulo, jana.pires1@gmail.com

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

⁴Professora Associada, dyacsan@ib.usp.br

⁵Professora Doutora, fchow@ib.usp.br

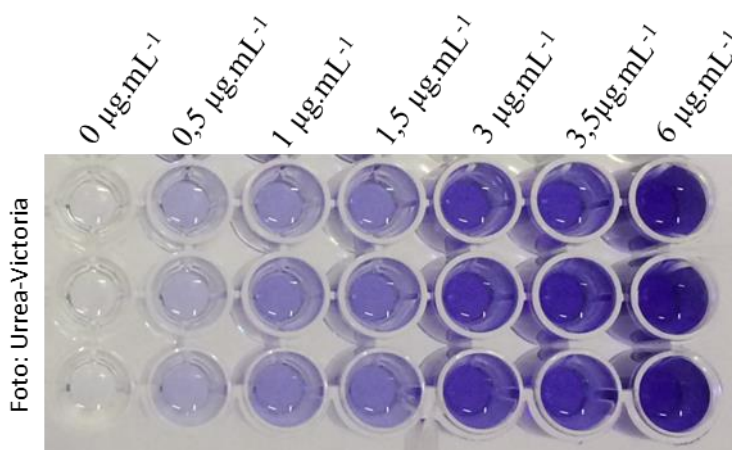


Figura 2. Microplaca com a reação da curva padrão para ácido gálico (0 - 6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Note que a maior tonalidade da reação representa maior absorbância da amostra e, portanto, maior potencial antioxidante. Para cada ponto da curva de ácido gálico são apresentadas três repetições.

O método do FRAP foi originalmente desenvolvido como uma alternativa para determinar a redução do ferro em fluidos biológicos e soluções aquosas de compostos isolados (Benzie & Strain, 1996). Posteriormente, este método foi adaptado por diversos autores (Pulido et al., 2000; Prior et al., 2005; Rufino et al., 2006). No entanto, a maioria dos protocolos descritos na literatura utiliza volumes elevados de reagentes e extratos, o que torna por vezes o método inviável para amostras ou extratos que são de mais difícil obtenção ou de baixo rendimento. 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.

Com o exposto, este trabalho traz um protocolo para avaliar o potencial de redução do íon ferro ou potencial antioxidante de metais adaptado para microplaca de 96 poços, adequado para a análise de extratos de diferentes tipos de algas como as algas verdes *Chaetomorpha* sp., *Cladophora* sp., *Ulva fasciata* e *Desmodemus* sp., as algas vermelhas *Pterocladia capillacea*, *Pyropia spiralis*, *Bostrychia radicans*, *Gracilariopsis tenuifrons*, *Gracilaria* spp. e *Palisada*

flagellifera e a alga parda *Sargassum* spp. Adicionalmente, o presente protocolo 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 em Benzie & Strain (1996).

Metodologia

1. Preparo das soluções

1.1. Solução de ácido clorídrico 40 mM (HCl; MM = 36,46 g.mL^{-1} ; $\delta = 1,19 \text{ g.mL}^{-1}$): em balão volumétrico, adicionar 50 mL de água ultrapura e 122 μL de HCl concentrado. Completar o volume para 100 mL com água ultrapura. A validade da solução é indefinida. Armazenar em temperatura ambiente.

1.2. Solução de TPTZ 10 mM (2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina; MM = 312,33 g.mol^{-1}): dissolver 15,61 mg de TPTZ em 1 mL de HCl 40 mM e completar o volume para 5 mL com HCl 40 mM. Este volume permite a preparação de 2 placas de 96 poços. Preparar e usar no dia da análise.

1.3. Solução de cloreto férrico 20 mM ($\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$; MM = 270,30 g.mol^{-1}):

dissolver 27,03 mg de cloreto férrico hexahidratado em 5 mL de água ultrapura. Este volume permite a preparação de 2 placas de 96 poços. Preparar e usar no dia da análise.

1.4. Tampão acetato de sódio 0,3 M com pH 3,6 (CH_3COONa ; $\text{MM} = 82,03 \text{ g.mol}^{-1}$): dissolver 0,775 g de acetato de sódio em 230 mL de água ultrapura em balão volumétrico. Ajustar o pH para 3,6 com ácido acético glacial, adicionando aos poucos, aproximadamente 3 mL do ácido. Ajustar o volume para 250 mL com água ultrapura e verificar o pH da solução. A validade da solução é indefinida. Armazenar em temperatura ambiente.

1.5. Solução do reagente FRAP: misturar 50 mL de tampão acetato de sódio 0,3 M, 5 mL da solução TPTZ 10 mM e 5 mL da solução de cloreto férrico 20 mM. Este volume permite a preparação de 2 placas de 96 poços. Preparar e usar no dia da análise.

1.6. Solução estoque de ácido gálico 0,25 mg.mL^{-1} (ácido 3,4,5-triidroxibenzoico; $\text{MM} = 170,12 \text{ g.mol}^{-1}$): em microtubo, dissolver 0,5 mg de ácido gálico em 1 mL de metanol P.A. Diluir esta solução em 50%. A solução estoque pode ser armazenada em -20°C por pelo menos seis meses.

1.7. Solução estoque de Trolox 0,25 mg.mL^{-1} (ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico; $\text{MM} = 250,29 \text{ g.mol}^{-1}$): em microtubo, dissolver 0,5 mg de Trolox em 1 mL de metanol P.A. Diluir esta solução em 50%. A solução estoque pode ser armazenada em freezer -20°C , por pelo menos seis meses.

1.8. Solução estoque de BHA 0,25 mg.mL^{-1} (3-terc-butil-4-hidroxianisol; $\text{MM} = 180,24 \text{ g.mol}^{-1}$): em microtubo, dissolver 0,5 mg de BHA em 1 mL de metanol P.A. Diluir esta solução em 50%. A solução estoque pode ser armazenada em freezer -20°C , por pelo menos seis meses.

1.9. Solução estoque de quercetina 0,25 mg.mL^{-1} ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$; $\text{MM} = 302,24 \text{ g.mol}^{-1}$): em microtubo, dissolver 0,5 mg de quercetina em 1 mL de metanol P.A. Diluir esta solução em 50%. A solução estoque pode ser armazenada em freezer -20°C , por pelo menos seis meses.

1.10. Solução estoque de rutina 2,5 mg.mL^{-1} ($\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$; $\text{MM} = 610,52 \text{ g.mol}^{-1}$): em microtubo, dissolver 2,5 mg de rutina em 1 mL de metanol P.A. A solução estoque pode ser armazenada em freezer -20°C , por pelo menos seis meses.

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 horas a temperatura ambiente em local protegido da luz. Centrifugar a 12.000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente e recolher o sobrenadante em um microtubo novo. **Atenção:** recomenda-se que as amostras sejam acondicionadas em microtubo de 2 mL no momento da amostragem, pois isso facilitará a posterior trituração 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 de FRAP e faixas de concentrações testadas para a curva padrão.

Padrão	Faixa de concentração final na mistura de reação (no poço)
Ácido gálico	0 - 6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
Trolox	0 - 7,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
BHA	0 - 7,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
Quercetina	0 - 3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
Rutina	0 - 160 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

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. Incubar a microplaca a 37°C durante 30 minutos protegida da luz. Ler as absorbâncias em espectrofotômetro de microplacas UV/vis a 595 nm. Construir uma curva de regressão linear relacionando a concentração do padrão ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) e os valores de absorbância (Fig. 3)

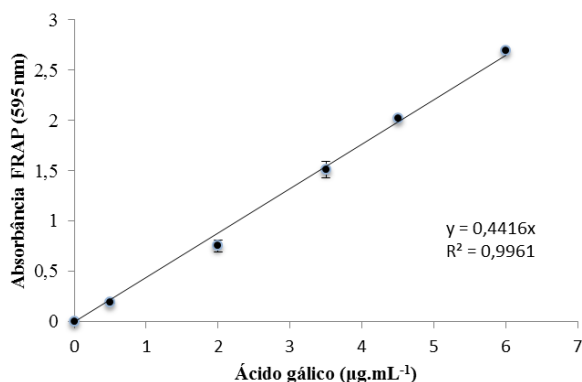


Figura 3. Curva padrão de ácido gálico nas concentrações de 0 a 6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O gráfico foi plotado em função das respectivas absorbâncias lidas em 595 nm.

5. Ensaio das amostras

Em uma microplaca de 96 poços misturar para cada amostra, em penumbra, os

volumes indicados na Tabela 3. Incubar a microplaca a 37°C durante 30 minutos protegida da luz. Ler as absorbâncias em espectrofotômetro de microplacas UV/vis a 595 nm.

Considerando as concentrações do extrato bruto de amostras frescas e congeladas (300 mg.mL^{-1} ; ver item 2) ou das amostras de extratos previamente secos (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 nas misturas de reação a partir desses extratos serão 20 mg.mL^{-1} ou 0,2 mg.mL^{-1} , 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^{-1} no caso de amostras frescas e congeladas, além da concentração 0 mg.mL^{-1} . O ensaio com diferentes concentrações de extrato bruto pode servir para estimar a concentração de extrato com melhor potencial antioxidante e calcular o EC_{50} , concentração efetiva à qual o extrato induz metade do efeito máximo.

6. Cálculo do potencial antioxidante

O potencial antioxidante de FRAP pode ser expresso em equivalente de padrão por grama de extrato (mg.g^{-1}). Tomando-se o ácido gálico como exemplo, inicialmente, transformar a curva padrão de ácido gálico, construída em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para μg de ácido gálico (Tabela 2). Utilizando os valores de μg de ácido gálico, calcular a respectiva equação da reta, substituir o valor de Y na equação da reta da curva padrão pela absorbância da amostra e calcular o valor de X, que corresponderá à equivalência em μg de ácido gálico na amostra analisada. 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).

Adicionalmente, os resultados podem ser

expressos com base no cálculo do EC_{50} , concentração efetiva à qual o extrato induz metade do efeito máximo. Para tal, se recomenda testar o extrato em, pelo menos, cinco concentrações. 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).

Tabela 2. Volumes das soluções para construção de curva padrão de ácido gálico para o ensaio de FRAP.

Concentração final no poço ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Equivalência da concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) para μg	Água ultrapura (μL)	Ácido gálico $0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$ (μL)	¹ Metanol (μL)	Reagente FRAP (μL)	Volume total (μL)
0*	0	15	---	20	265	300
0,5	0,15	15	0,6	19,4	265	300
1	0,30	15	1,2	18,8	265	300
1,5	0,45	15	1,8	18,2	265	300
3	0,90	15	3,6	16,4	265	300
3,5	1,05	15	4,2	15,8	265	300
6	1,80	15	7,2	12,8	265	300

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

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

Tabela 3. Volumes das soluções para o ensaio de FRAP com os extratos das algas.

Amostra	Água ultrapura (μL)	Amostra (μL)	¹ Metanol (μL)	Reagente FRAP (μL)	Volume total (μL)
Branco*	15	---	20	265	300
Amostra	15	20	---	265	300
Branco amostra**	280	20	---	---	300

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

**Amostras ou extratos ricos em pigmentos podem interferir na leitura da absorvância. 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 leitura da mesma forma que o Branco na curva padrão e para o Controle quelante.

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

Agradecimentos

Os autores agradecem à FAPESP (2013/07543-0) e Biota/Fapesp (2013/50731-1) pelo suporte financeiro. VU-V foi bolsista de doutorado CAPES e atualmente é bolsista de doutorado FAPESP 2014/25073-3, JPS é bolsista de doutorado CAPES e PBT é bolsista de doutorado CNPq. DYACS e FC são bolsistas de produtividade PQ-CNPq.

Referências

- Antolovich M, Prenzler P, Patsalides E, McDonald S, Robards K. 2002. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst* 127: 183-198.
- Benzie I, Strain J. 1996. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry* 239:70-76.
- Benzie I, Strain J. 1999. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology*, Academic Press 299: 15-27.
- Berker K, Glucu K, Demirata B, Apak, R. 2010. A novel antioxidant assay of ferric reducing capacity measurement using ferrozine as the colour forming complexation reagent. *Analytical Methods* 2: 1770-1778.
- Chen Z, Bertin R, Frolidi G. 2013. EC₅₀ estimation of antioxidant activity in DPPH* assay using several statistical programs. *Food Chemistry* 138: 414-420.
- Furlan CM, Santos KP, Sedano-Partida MD, Motta LB, Santos DYAC, Salatino MLF, Negri G, Berry PE, van Ee BW, Salatino A. 2015. Flavonoids and antioxidant potential of nine Argentinian species of *Croton* (Euphorbiaceae). *Brazilian Journal of Botany* 38: 693-702.
- 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.
- Ou B, Huang D, Hampsch-Woodill M, Flanagan J, Deemer, E. 2002. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays: A Comparative Study. *Journal of Agriculture, Food and Chemistry* 50: 3122-3128.
- Prior R, Wu X, Schaich K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 4290-4302.
- Pulido R, Bravo L, Saura-Calixto F. 2000. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 3396-3402.
- Rufino M, Alves R, Sousa E, De Moraes S, De Goes C, Pérez-Jiménez J, Saura-Calixto F. 2006. Metodologia científica: Determinação de atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). *Comunicação Técnica online* 125, Embrapa.
- Wong C, Cheung W, Lau Y, Bolanos de la Torre A, Owusu-Apeten R. 2015. A FRAP assay at pH 7 unveils extra antioxidant activity from green, black, white and rooibos tea but not apple tea. *Food and nutrition report*. 1:16-23.