

Ensaio do potencial antioxidante de extratos de algas através do sequestro do $ABTS^{\bullet+}$ em microplaca

Priscila Bezerra Torres¹, Janaína S. Pires², Déborah Y.A.C. dos Santos³, Fungyi Chow⁴

Setembro 2017

Introdução

A busca por diferentes substâncias de origem natural com propriedades antioxidantes vem crescendo nos últimos anos, principalmente devido à importância destas substâncias do ponto de vista econômico e médico, aliado a uma crescente valorização dos produtos naturais. O estudo do potencial antioxidante também é de grande importância ecológica e fisiológica, pois, diante de uma condição de estresse oxidativo, organismos tais como algas, animais e plantas terrestres utilizam esses antioxidantes como uma das principais frentes de defesa (Sies, 1996; Mittler, 2002).

Dessa forma, estão disponíveis diversos ensaios *in vitro* para estimar o potencial antioxidante de diferentes extratos e substâncias. Dentre eles, existem: (a) ensaios que usam radicais normalmente encontrados nos seres vivos e (b) ensaios que usam radicais sintéticos como no ensaio que usa o ABTS [2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)] (Fig. 1).

O ABTS é uma substância utilizada em vários ensaios enzimáticos como marcador de reação. No entanto, recentemente vem sendo empregado em ensaios colorimétricos para estimar o potencial antioxidante de substâncias ou misturas. Nessa aplicação, o ABTS, de cor verde clara, reage com o persulfato de potássio e forma o radical catiônico $ABTS^{\bullet+}$ de coloração verde/azulada.

A absorção do radical catiônico $ABTS^{\bullet+}$ é comparada com a absorção após a estabilização do $ABTS^{\bullet+}$ por antioxidantes, indicada pela mudança de coloração para o verde claro (Re et al., 1999). Essa diminuição na absorbância é detectada utilizando um espectrofotômetro na faixa de 734 nm. Assim, quanto menor é a absorbância após a reação, ou mais clara a coloração da reação, maior é o potencial antioxidante.

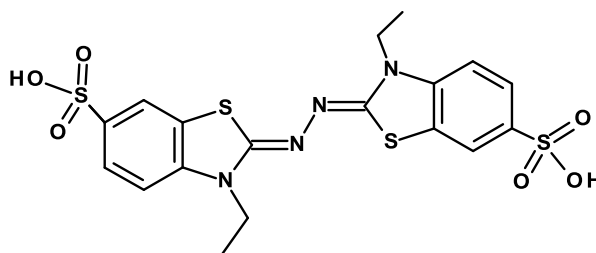


Figura 1. Estrutura molecular do ABTS [2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)].

O presente protocolo de ensaio do potencial antioxidante usando o $ABTS^{\bullet+}$ foi adaptado para ser realizado em microplacas de 96 poços, a fim de reduzir a quantidade de biomassa ou extrato necessário para os ensaios, o uso de insumos químicos e a produção de resíduos.

¹Doutora pelo Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade de São Paulo, cromossomo@gmail.com

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

³Professora Associada, dyacsan@ib.usp.br

⁴Professora Doutora, fchow@ib.usp.br

Metodologia

1. Preparo das soluções

1.1. Solução de ABTS: dissolver 3,84 mg de ABTS (Massa molar: 548,7 g.mol⁻¹) em 1 mL de água ultrapura (concentração final: 7 mM). A solução de ABTS pode ser mantida sob abrigo da luz e em freezer (-20°C) por pelo menos 1 mês.

1.2. Solução de persulfato de potássio (K₂S₂O₈) (Massa molar: 270,322 g.mol⁻¹): dissolver 37,84 mg de persulfato de potássio em 1 mL de água ultrapura (concentração final: 140 mM). A solução de persulfato de potássio pode ser armazenada por pelo menos 1 mês a temperatura ambiente.

1.3. Solução do radical catiônico ABTS^{•+}: A cada 1 mL da solução de ABTS adicionar 17,6 µL da solução de persulfato de potássio. Manter a mistura no escuro por 16 horas a temperatura ambiente. Diluir esta mistura em álcool metílico até obter absorvância entre 0,8-1 a 734 nm. **Observação:** fazer a primeira diluição de 1:40. A solução resultante pode ser usada por pelo menos 8 h ou até manter absorvância entre 0,8-1.

1.4. Solução estoque de Trolox 0,5 mg.mL⁻¹ (Massa molar: 610,51 g.mol⁻¹): dissolver 1 mg de Trolox em 1 mL de metanol P.A. Fazer diluição da solução estoque para 0,5 mg.mL⁻¹. A solução estoque pode ser armazenada por, pelo menos, seis meses em freezer -20°C.

1.5. Solução estoque de ácido gálico 0,2 mg.mL⁻¹ (Massa molar: 170,12 g.mol⁻¹): dissolver 1 mg de ácido gálico em 1 mL de metanol P.A. Fazer diluição da solução estoque para 0,2 mg.mL⁻¹. 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⁻¹) e deixar macerando por 3 h a temperatura ambiente em penumbra. Centrifugar a 12.000 rpm por 15 min a temperatura ambiente e recolher o sobrenadante (extrato bruto) em um microtubo 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 amostragem, pois isso facilitará a posterior trituração do material, que poderá ser realizada no próprio microtubo.

O extrato bruto (concentração: 300 mg.mL⁻¹) terá a concentração final de reação de 20 mg.mL⁻¹, pois será adicionado no poço da microplaca 20 µL deste extrato (equivalente a 6 mg de amostra), em um volume total de 300 µL. Para fazer o cálculo de EC50 (concentração efetiva que causa 50% do efeito máximo) é recomendado usar pelo menos mais três concentrações finais (ex. 5, 10 e 15 mg.mL⁻¹), incluindo a concentração zero.

3. Preparo de amostras a partir de extratos secos

No caso de extratos já secos, solubilizar os extratos em solventes adequados como metanol ou DMSO 10%. As concentrações sugeridas são de 2,5 mg.mL⁻¹ para algas pardas e 3 mg.mL⁻¹ para algas vermelhas e verdes. É importante avaliar mais três diluições do extrato para o cálculo de EC50.

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. Lista de padrões com conhecida atividade antioxidante para o ensaio de ABTS e faixas de concentrações testadas para a curva padrão.

Padrão	Faixa de concentração final na mistura de reação (no poço)
Ácido gálico	0 - 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
Trolox	0 - 12 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

Tabela 2. Volumes de reagentes para a preparação da curva padrão de Trolox, a partir de uma solução estoque de Trolox de 0,5 mg.mL^{-1}

Concentração final no poço ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Solução do radical catiônico ABTS ^{•+} (μL)	Solução estoque de Trolox (μL)	Metanol (μL)	Volume total (μL)
0	280	0	20	300
2	280	1,2	18,2	300
4	280	2,4	16,4	300
6	280	3,6	14,6	300
8	280	4,8	12,8	300
10	280	6	11	300
12	280	7,2	9,2	300

Construir uma curva de regressão linear relacionando a concentração do padrão ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) e os valores de absorbância (Fig. 2).

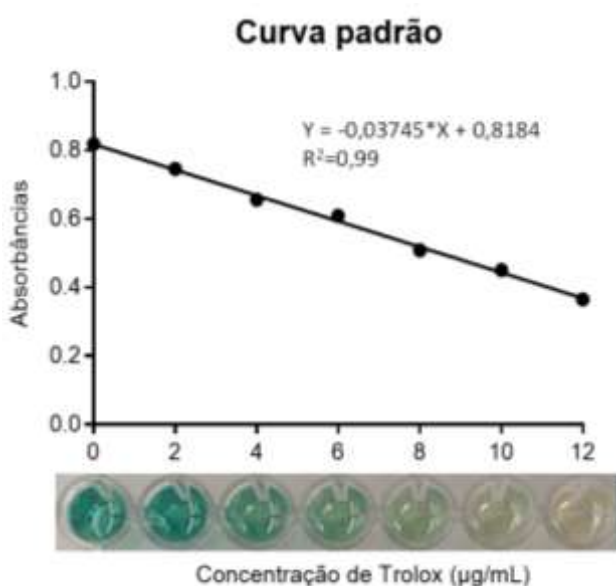


Figura 2. Curva de calibração para o padrão Trolox, incluindo a equação da reta ($y = ax + b$), o coeficiente de regressão (R^2) e coloração da reação (Foto: Janaína Pires).

Tomando como exemplo o Trolox, em uma microplaca de 96 poços, preparar a curva padrão, em penumbra, seguindo os volumes de reagentes da Tabela 2. Após adicionar 280 μL da solução do radical catiônico ABTS^{•+} e homogeneizar a mistura. Incubar a microplaca por 20 min, protegida da luz e fazer a leitura em 734 nm em espectrofotômetro para microplaca.

5. Ensaio das amostras

Em uma microplaca de 96 poços, em penumbra, adicionar 20 μL de amostra e 280 μL da solução do radical ABTS^{•+} e homogeneizar a mistura. Incubar a microplaca por 20 min, protegida da luz e registrar a absorbância em 734 nm.

Observação: Verificar se os extratos das amostras absorvem em 734 nm misturando 20 μL de amostra e 280 μL de metanol. Se isso acontecer, é importante fazer um branco-amostra para cada amostra e realizar a leitura. O valor obtido deverá ser descontado da absorbância de cada amostra após a reação, servindo este como branco.

6. Cálculo do potencial antioxidante

O potencial antioxidante pelo radical catiônico ABTS^{•+} é comumente expresso em μM de equivalentes em Trolox por g de extrato (ou amostra) ou mg de equivalentes

em Trolox por g do extrato (ou amostra). Para tal, a concentração de Trolox da curva padrão (Fig. 2) é transformada em concentração (μM) ou quantidade (mg).

Outras formas de calcular o potencial antioxidante pelo radical catiônico ABTS^{•+} são mediante o percentual de inibição (Chakraborty & Paulraj, 2010) ou pelo EC50 (Li et al., 2009).

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

- Chakraborty K. & Paulraj R. 2010. Sesquiterpenoids with free-radical-scavenging properties from marine macroalga *Ulva fasciata* Delile. Food Chemistry 122(1): 31–41.
- Li X., Wu X. & Huang L. 2009. Correlation between antioxidant activities and phenolic contents of radix *Angelicae sinensis* (Danggui). Molecules 14(12): 5349–5361.
- Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in Plant Science 7(9): 405–410.
- Re R. et al. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine 26(9-10): 1231–1237.
- Sies H., 1996. Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants. Physiological Society Symposium: Impaired Endothelial and Smooth Muscle Cell Function in Oxidative Stress (82), pp. 291–295.