

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE ARAÇATUBA

MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DA CAPACIDADE
ANTIOXIDANTE TOTAL SÉRICA:
PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO PARA ESPÉCIE
OVINA

Jucilene Conceição de Souza
Farmacêutica-Bioquímica

ARAÇATUBA – SP
2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA

MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DA CAPACIDADE
ANTIOXIDANTE TOTAL SÉRICA:
PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO PARA ESPÉCIE
OVINA

Jucilene Conceição de Souza

Orientador: Prof. Adjunto Mário Jefferson Quirino Louzada

Co-orientador: Prof. Adjunto Paulo César Ciarlini

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – Unesp, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica).

ARAÇATUBA – SP

2014

Catálogo na Publicação(CIP)
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FMVA/UNESP

Souza, Jucilene Conceição de

S729m

Método de quantificação da capacidade antioxidante total sérica: padronização e validação para espécie ovina/ Jucilene Conceição de Souza. -- Araçatuba: [s.n], 2014.

48 f. il.; + CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária, 2014.

Orientador: Prof. Adjunto Mário Jefferson Quirino Louzada

Co-orientador: Prof. Adjunto Paulo César Ciarlini

1. Antioxidante. 2. Espectrofotometria. 3. Estudos de validação. 4. Ovinos I. T.

CDD 599.649

unesp



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba
Seção Técnica de Graduação e Pós-Graduação



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Método de quantificação da capacidade antioxidante total sérica: padronização e validação para espécie ovina.

AUTORA: JUCILENE CONCEIÇÃO DE SOUZA

COORIENTADOR: Dr. PAULO CÉSAR CIARLINI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRA em CIÊNCIA ANIMAL (FISIOPATOLOGIA MÉDICA E CIRÚRGICA) pela Comissão Examinadora.

Tatiana de Sousa Barbosa
Dra. TATIANA DE SOUSA BARBOSA

Suely Regina Mogami Bomfim
Dra. SUELY REGINA MOGAMI BOMFIM

Paulo César Ciarlino
Dr. PAULO CÉSAR CIARLINI

DATA DA REALIZAÇÃO: 9 de junho de 2014.

Paulo César Ciarlino
Presidente da Comissão Examinadora
Dr. PAULO CÉSAR CIARLINI
- Coorientador -

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

JUCILENE CONCEIÇÃO DE SOUZA – Natural de Osvaldo Cruz, São Paulo, nascida em 17 de agosto de 1978, filha de Doralice Paulo da Conceição e José Baptista de Souza. Em 2004, ingressou no curso de Farmácia-Bioquímica da Universidade Paulista (UNIP), onde se graduou como Farmacêutica-Bioquímica em julho de 2009. Em fevereiro de 2010 assumiu cargo público como Assistente de Suporte Acadêmico I da Faculdade de Medicina Veterinária, Unesp, Campus de Araçatuba, lotada no Laboratório Clínico Veterinário do Hospital Veterinário “Luiz Quintiliano de Oliveira”. Ingressou no curso de Pós-graduação em Ciência Animal, área de concentração Fisiopatologia Médica e Cirúrgica, na Faculdade de Medicina Veterinária, Unesp, Campus de Araçatuba – SP, em março de 2012, sob orientação de Prof. Adj. Mário Jefferson Quirino Louzada e Prof. Adj. Paulo César Ciarlini. Atualmente desempenha a função de Assistente de Suporte Acadêmico II no Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Unesp, Campus de São José do Rio Preto – SP, lotada no Departamento de Química e Ciências Ambientais.

Aqueles que saíram chorando, levando a semente para semear, voltarão cantando, cheios de alegria, trazendo nos braços os feixes da colheita.

Salmo 126:6

*Dedico este trabalho à minha família
pelo apoio, amor incondicional e por
acreditar nos meus sonhos.*

AGRADECIMENTOS

A realização desta dissertação marca o fim de uma importante etapa da minha vida. Gostaria de agradecer a todos aqueles que contribuíram de forma decisiva para a sua concretização.

À Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba manifesto apreço pela possibilidade de realização do presente trabalho e por todos os meios colocados à minha disposição. Agradeço igualmente a excelência da formação prestada e conhecimentos transmitidos.

Ao meu orientador Prof. Adj. Mário Jefferson Quirino Louzada por ter acreditado em mim.

Ao meu Co-orientador Prof. Adj. Paulo César Ciarlini pela disponibilidade, colaboração, ensinamentos e capacidade de estímulo, e principalmente pela amizade, não apenas durante a elaboração deste trabalho, mas também durante minha formação pessoal e profissional.

A minha querida Prof^a Dr^a Suely Regina M. Bomfim pelo constante apoio e amizade sincera.

Ao grande amigo Breno Fernando Martins de Almeida, que nunca aceitou meu suborno como prova de sua amizade. Finalmente compreendi. Sem você este trabalho não seria possível.

Aos companheiros do Laboratório Clínico Veterinário do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, em especial Priscila Preve Pereira e Marinês Castro pela amizade e ajuda durante a colheita das amostras, Laine Gabas pelo auxílio no processamento das amostras e que além de grande amiga, muitas vezes agiu como mãe.

Aos meus amigos Luis Gustavo Narciso e Renata Nogueira Figueiredo que iniciou comigo esta “caminhada” agradeço a força, a amizade e confiança depositada em mim.

Aos antigos e atuais residentes do Laboratório Clínico do Hospital Veterinário “Luiz Quintiliano de Oliveira” pela convivência diária.

Ao meu companheiro Luís Carlos Magri por suportar e compreender minha ansiedade e mau humor neste período.

A minha família, em especial Doralice (minha mãe), meu padrasto, meus irmãos e cunhadas pelo incentivo e apoio que sempre me deram, não medindo esforços para que eu pudesse alcançar meu objetivo.

Aos ovinos, objeto de estudo deste trabalho.

A todos que me ajudaram a ser quem sou, que depositam confiança em mim e para os quais sou uma esperança, resta-me apenas não desiludi-los.

Meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

	Página
Capítulo 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	13
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
1.1 Estresse Oxidativo.....	14
1.2 Defesa Antioxidante.....	14
1.3 Métodos para determinação da capacidade antioxidante total (TAC).....	14
1.4 Estresse oxidativo na espécie ovina.....	16
1.5 Validação de método analítico.....	18
REFERÊNCIAS.....	19
Capítulo 2 – CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL SÉRICA: PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO PARA ESPÉCIE OVINA.....	28
1 Introdução.....	31
2 Material e métodos.....	33
2.1 Reagentes.....	33
2.3 Antioxidantes.....	33
2.3 Seleção dos animais e obtenção das amostras.....	34
2.4 Conservação e acondicionamento das amostras.....	35
2.5 Preparação dos reagentes para a determinação da capacidade antioxidante total (TAC).....	35
2.6 Validação do método.....	36
2.7 Análises estatística.....	37
3 Resultados e discussão.....	38
3.1 Seleção do espectro de absorção.....	38
3.2 A linearidade da reação.....	38
3.3 Sensibilidade, limite de detecção e limite de quantificação.....	39
3.4 Exatidão e precisão do método.....	39
3.5 Robustez.....	40
3.6 Recuperação analítica.....	40

3.7 Estabilidade das amostras.....	41
3.8 Comparação entre diferentes soluções puras de antioxidantes exógenos e endógenos.....	41
3.9 Correlação entre TAC e concentração sérica de antioxidantes endógenos.....	43
3.9.1 Comparação entre metodologias para determinação da TAC em soro de ovinos.....	44
4 Conclusão.....	46
REFERÊNCIAS.....	46

MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL SÉRICA: PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO PARA ESPÉCIE OVINA

RESUMO - A determinação da capacidade antioxidante total (TAC) tem importância fundamental na avaliação do estresse oxidativo, tanto em humanos como em animais. Cada vez mais tem se tornado relevante o estudo de metodologias para determinar a TAC em várias áreas como em tecnologia e ciência de alimentos, laboratórios clínicos, nutrição animal e humana. Na espécie ovina esta determinação ainda não foi validada. Antes de iniciar qualquer tipo de análise da TAC, o método utilizado deve ser validado, pois a validação de métodos é um aspecto primordial da garantia da qualidade analítica. A validação é um processo dinâmico e constante, que se inicia na fase de seleção, desenvolvimento e otimização do método, qualidade dos instrumentos, materiais e analistas, permanecendo na fase de experimentos. Um processo de validação bem definido deve obedecer às características investigadas no processo de validação a fim de demonstrar o desempenho do método como: linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão, recuperação analítica e robustez. O método mais comumente utilizado para determinar a TAC é o método espectrofotométrico-colorimétrico que usa (ABTS^{•+}) 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato). Apesar da existência de muitas técnicas modernas, o método espectrofotométrico tem demonstrado ser eficaz, além do baixo custo e de fácil manuseio. O método foi desenvolvido, padronizado e validado.

Palavras-Chave: antioxidantes, espectrofotometria, estudos de validação, ovinos

METHOD OF MEASUREMENT OF SERUM TOTAL ANTIOXIDANT CAPACITY: STANDARDIZATION AND VALIDATION FOR OVINE SPECIES

SUMMARY - The determination of total antioxidant capacity (TAC) is important to evaluation of oxidative stress, in both humans and animals. The study of methodologies to the determination of TAC has become relevant in several areas such as technology and food science, clinical laboratory, animal and human nutrition. In sheep, this determination has not yet been validated. Before starting any type of analysis, the method used for TAC measurement must be validated, since method validation is a key aspect of analytical quality assurance. Validation is a dynamic and ongoing process that begins at the stage of selection, development and optimization of the method, the quality of the tools, materials and analysts, remaining in the experimental phase. A well defined process of validation must have the characteristics investigated in the validation process to demonstrate the performance of the method as: linearity, limit of detection, limit of quantification, accuracy, precision, analytical recovery and robustness. The most commonly used method used to determine the TAC is the spectrophotometric-colorimetry assay using the (ABTS^{•+}) 2,2'-azinobis (3- ethylbenzthiazoline-6-sulfonate). Despite the existence of many modern techniques, the spectrophotometric method has shown to be effective, in addition to lower cost and easy handling. The method was developed, validated and standardized.

Keywords: antioxidants, spectrophotometry, validation studies, sheep

Capítulo 1

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é definido como o excesso de formação e/ou remoção insuficiente de moléculas reativas (radicais livres), tais como: espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) (CAROCHO; FERREIRA, 2013).

Por definição, radicais livres podem ser qualquer átomo, molécula ou fragmento de molécula contendo um ou mais elétrons desemparelhados na sua última camada de valência. Estes elétrons desemparelhados fazem com que essas espécies sejam altamente reativas, instáveis e de meia-vida curtíssima (HALLIWELL, 1994). O desequilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes determina a instalação e o grau de estresse oxidativo. Consequências deste estresse incluem a modificação de proteínas celulares, lípidos e ácidos nucleicos (FINKEL; HOLBROOK, 2000), ocasionando lesões e modificações irreversíveis dos componentes celulares (GARREL et al., 2010).

O sistema de defesa antioxidante tem como objetivo essencial manter o processo oxidativo dentro dos limites fisiológicos, impedindo que os danos oxidativos se multipliquem e gerem danos sistêmicos irreparáveis (BARBOSA, 2010) os quais são responsáveis por muitos processos patológicos (SOCHOR et al., 2010). Algumas patologias associadas ao aumento dos radicais livres já foram reconhecidas em mais de 100 doenças em humanos e em animais, dentre estas destacam-se câncer, catarata, diabetes, doenças inflamatórias, periodontais, neurológicas, cardiovasculares e renais (NEMEC et al., 2000). Em ruminantes doenças respiratórias e articulares, septicemia, mastite, acidose, cetose, enterite e pneumonia parece estar associada ao estresse oxidativo, o que implica na produção e à saúde dos mesmos (CELLI, 2011).

1.2 Defesas Antioxidantes

Os radicais livres são produzidos no metabolismo e nos processos fisiológicos, porém reações oxidativas prejudiciais podem ocorrer nos organismos e serem controladas por mecanismos antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos (EREL, 2004). De acordo com o modo de ação podemos dividi-los em três grupos. O primeiro são antioxidantes preventivos, pois impedem a formação de radicais livres, sendo estes a ceruloplasmina, metalotioneína, mioglobina, albumina, ferritina e transferrina. O segundo é classificado como antioxidantes removedores, pois removem os radicais livres quando são formados evitando o ataque destas, neste inclui a glutathione reduzida, vitamina E, vitamina C, β -caroteno, ácido úrico e bilirrubina. O terceiro grupo pertence às enzimas antioxidantes que eliminam os radicais livres formados de outras moléculas, no qual são o superóxido dismutase, glutathione peroxidase, catalase e metaloenzima (NEMEC et al., 2000).

A quantidade dos diferentes antioxidantes presentes no plasma, soro, urina ou outras amostras biológicas é difícil de ser determinada separadamente, pois existe a possibilidade de ocorrer interação entre eles no organismo *in vivo*, o que poderia representar menor quantidade em relação ao estado antioxidante geral (PRIOR; CAO, 1999). Portanto a capacidade antioxidante é uma das maneiras de como o organismo pode se proteger contra os radicais livres prevenindo ou inibindo reações oxidativas nas biomoléculas (EREL, 2004) como exemplo, evitando a peroxidação dos lípidos. (SOCHOR et al., 2010).

1.3 Métodos para determinação da capacidade antioxidante total (TAC)

É de grande importância a dosagem da TAC tanto em alimentos, como em medicamentos alopáticos e fitoterápicos para utilização em prevenção ou tratamento de doenças associadas ao estresse oxidativo. Outra linha promissora é a utilização da TAC como biomarcadora do estresse oxidativo em diversas doenças (FERRARI, 2010).

A literatura propõe diferentes métodos para determinação da TAC, estes variam quanto ao tipo de radicais gerados, ao indicador de oxidação escolhido e ao método usado para sua detecção e quantificação. Em todos esses ensaios, um radical é gerado e reage com moléculas-alvo, para produzir cor, fluorescência, quimioluminescência, perda ou ganho de sinais de *Electron Spin Ressonance* (Ressonância do Spin Eletrônico) ou outra mudança que possa ser mensurável. A presença de antioxidantes altera esses sinais, permitindo sua análise quantitativa (VASCONCELOS et al., 2007).

Atualmente quatro testes têm sido empregados para quantificar a capacidade antioxidante total (TAC): (1) TRAP (*Total Radical - Trapping Antioxidant Parameter*), o primeiro ensaio desenvolvido para determinar a TAC em plasma sanguíneo (WAYNER et al., 1985); (2) ORAC (*Oxygen - Radical Absorbancy Capacity*), método que usa a proteína *Phycoerythrin* (Ficoeritrina), fotossintética, marcadora de fluorescência, como alvo dos radicais (GLAZER et al., 1990; GHISELLI et al., 1995) foi validado por Prior et al. (2003) como método para quantificação da TAC em amostras sanguíneas; (3) FRAP (*Ferric - Reducing Antioxidant Power*), método em que um complexo *ferrictripirydyltriazine* (Fe^{III} -TPTZ) é reduzida para a forma ferrosa (Fe^{II}) na presença de um antioxidante e em condições ácidas. (BENZIE; STRAIN, 1996); (4) TEAC (*Trolox - Equivalent Antioxidant Capacity*) criado por Miller et al. (1993) e comercializado pela “Randox Laboratories Ltda” como *kit* diagnóstico *TAS - Status Antioxidant Total*, que se baseia na formação do radical cátion ABTS associado à medição da capacidade da amostra ao inibir esta produção (FERRARI, 2010). O TEAC é um dos mais amplamente aplicados para esta determinação (EREL, 2004; GIROTTI et al., 2002), tanto de substâncias puras e heterogêneas (EREL, 2004; RE et al., 1999) como também bebidas (VILLANO et al., 2004). O método colorimétrico que usa o $\text{ABTS}^{\cdot+}$ (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)), na forma oxidada (Figura 1) apresenta intensa coloração esverdeada, e a capacidade antioxidante em reduzir a cor do ABTS é medida e expressa em relação ao Trolox (PRIOR et al., 2005).

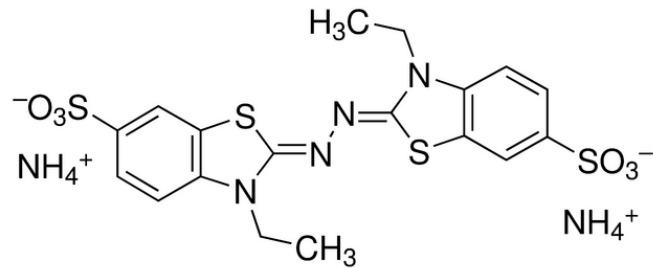


FIGURA 1- Estrutura do 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)(ABTS^{•+})

1.4 Estresse oxidativo na espécie ovina

Com o aumento da produção de ovinos nos últimos anos, várias trabalhos sobre estresse oxidativo têm sido desenvolvido em torno desta espécie (Tabela 1). Os antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos são comumente utilizados para avaliar a TAC como um sistema de defesa do organismo contra a ação dos radicais livres e os possíveis danos às estruturas celulares decorrentes de sua atuação.

Lightbody et al. (2001) relataram a falta de exploração na etiologia das manifestações parasitária em ruminantes relacionadas ao papel do estresse oxidativo e a atividade antioxidante. Neste estudo foi comparada a capacidade antioxidante do plasma entre ovinos e caprinos infectados experimentalmente por *Teladorsagia circumcincta* na qual concluíram que os cabritos por serem mais suscetíveis àquela infecção, apresentam alta capacidade antioxidante total em resposta ao potencial número de eosinófilos circulantes.

A avaliação da TAC em ovinos também foi realizada por Hohenboken et al. (2004) na qual avaliaram a resistência e a sensibilidade ao eczema facial e observaram que, os animais do grupo resistente tiveram maior atividade de enzimas antioxidantes, porém a diferença entre os grupos foram muito estreitas para serem consideradas como um indicador confiável de resistência.

Dimri et al. (2010) avaliaram o estado antioxidante e os índices de estresse oxidativo em sangue, pele e tecidos cerebrais de ovinos durante a infestação de sarna *Psoroptica* e investigaram alguns parâmetros de estresse oxidativo e a mudança da defesas antioxidantes. Concluíram que durante esta

patologia ocorre o aumento do estresse oxidativo e diminuição do estado antioxidante, porém não realizaram o ensaio para a capacidade antioxidante total. Apenas alguns antioxidantes foram analisados individualmente como o ácido ascórbico, α -tocoferol, cobre, zinco, ceruloplasmina e peróxidos lipídicos.

A Tabela 1 resume os biomarcadores utilizados para avaliar diferentes causas de estresse oxidativo na espécie ovina, sendo que apenas Heidarpour et al. (2013) quantificaram a capacidade o TAS-Randox e nenhum quantificou a capacidade antioxidante total do soro pelo método de Erel (2004).

Tabela 1 - Resumo dos estudos recentes em ovinos que investigaram o estresse oxidativo associado ao estado fisiológico

Estado fisiológico	Biomarcador	Referências
Infecção parasitária	Vit. C, Vit. E, TEAC	Lightbody et al. (2001)
Eczema facial	SOD, CAT, GPx, Gr	Hohenboken et al. (2004)
Lesão Pulmonar	FRAP	Park et al. (2004)
Envelhecimento	FRAP	Salar-Amoli;Baghbanzadeh (2010)
Intoxicação por cobre	FRAP, Ác.Úrico	Weigel et al. (2010)
Sarna <i>Psoroptis</i>	Ác. Ascórbico, α -tocoferol, cobre zinco, ceruloplasmina, SOD, CAT, Glutaciona	Dimri et al. (2010)
Toxemia da gestação	Glutaciona, SOD, CAT, Gr	Al-Qudah (2011)
Gestação	Vit. C, Vit. E	Parraguez et al. (2011)
PPR	Vit. A, C, E, Glutaciona, CAT, SOD, Gr, Xantina oxidase	Kataria; Kataria (2012)
Infecção por <i>Babesia ovis</i>	GPx, CAT, TEAC	Esmailnejada et al. (2012)
Efeito Temperatura/Reprodução	FRAP, SOD, Óxido nítrico	Nezhad et al. (2013)
Lesão hepática	TAS-Randox, GPx	Heidarpour et al. (2013)

Vit. C: Vitamina C; Vit. E: Vitamina E; TEAC: *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*; SOD: Superóxido Dismutase, CAT: Catalase; GPx: Glutaciona Peroxidase; Gr: Glutaciona Redutase; FRAP: *Ferric - Reducing Antioxidant Power*, PPR: Peste dos Pequenos Ruminantes; TAS: *Status Antioxidant Total*.

1.5 Validação de método analítico

Segundo o INMETRO (2003), validação é a comprovação, pelo fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou uso pretendido foram atendidos.

O bom desempenho de uma técnica depende da análise de alguns parâmetros do processo de validação analítica. Representantes da comunidade científica, indústrias e agências reguladoras como ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e INMETRO (Instituto de Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Instrumental) do Brasil, FDA (Food and Drug Agency) e IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) dos Estados Unidos, MHLW (Ministry of Health, Labour and Welfare) do Japão, EMEA (European Medicine Agency) da União Européia, definiram parâmetros de validação, que posteriormente foram uniformizados pela ICH (International Conference on Harmonisation) estabelecendo critérios de validação de métodos analíticos.

O objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida (ANVISA, 2003), sendo obtida por meio da comprovação, através do fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou uso específicos pretendidos foram atendidos (INMETRO, 2007).

Com o objetivo de confirmar que os métodos são apropriados para o uso pretendido, o laboratório deve validar: métodos não normalizados; métodos criados/desenvolvidos pelo próprio laboratório; métodos normalizados usados fora dos escopos para os quais foram concebidos; ampliações e modificações de métodos normalizados. O processo de validação de um método deve estar descrito em um procedimento, e os estudos para determinar os parâmetros de validação devem ser realizados com equipamentos e instrumentos dentro das especificações, funcionando corretamente e adequadamente calibrados (INMETRO, 2003).

A curva de calibração/linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente

proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. A exatidão é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. O limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. O limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. E a robustez é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal (ANVISA, 2003).

Com o objetivo de validar e padronizar um método espectrofotométrico Ultra Violeta-Visível (UV-Vis) utilizando reagentes estáveis para determinar a TAC em amostras séricas de ovinos sadios e observar a estabilidade dos reagentes, este estudo foi caracterizado por produzir um ambiente mais estável de ABTS^{•+} com uma vida útil mais longa, demonstrando ser um método de fácil execução quando comparado a outros métodos.

REFERÊNCIAS

AL-QUDAH, K. M. Oxidant and antioxidant profile of hyperketonemic ewes affected by pregnancy toxemia. **Vet. Clin. Pathol.**, v. 40, n. 1, p. 60-95, 2011.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde, Brasil, **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**, Resolução RE 899 de 29 de maio de 2003 - Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, D.F., Poder Executivo, 2 de jun. 2003.

BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.C.G.; PAULA, S.O, MININ, V.P.R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr.**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BENZIE, I.F.F.; STRAIN J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the frap assay. **Analyt. Biochem.**, v. 239, p. 70-76, 1996.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I.C.F.R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food Chem. Toxicol.**, v. 51, p. 15-25, 2013.

CELI, P. Biomarkers of oxidative stress in ruminant medicine. **Immunopharmacol. Immunotoxicol.**, v. 33, n. 2, p. 233–240, 2011.

DIMRI,U.; SHARMA, M.C.; YAMDAGNI, A.; RANIAN, R.; ZAMA, M. M. Psoroptic mange infestation increases oxidative stress and decreases antioxidant status in sheep. **Vet. Parasitol.**, v. 168, p. 318–322, 2010.

ESMAEILNEJADA, B.; TAVASSOLIA, M.; ASRI-REZAEIB,S.; DALIR-NAGHADEHB, B. Evaluation of antioxidant status and oxidative stress in sheep naturally infected with *Babesia ovis*. **Vet. Parasitol.**, v. 185, p. 124–130, 2012.

EREL, O., A novel direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. **Clin Biochem.**, v. 37, n. 4, p. 277-285, 2004.

FERRARI, C.K.B. Capacidade antioxidante total (CAT) em estudos clínicos, experimentais e nutricionais. **Rev. Inst. Ciênc. Saúde.** v. 28, n. 4, p. 307-310, 2010.

FINKEL T., HOLBROOK N.J., Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing, **Nature**, v. 408, p. 239-47, 2000.

GARREL, C.; FOWLER, P.A.; AL-GUBORY, K.H. Developmental changes in antioxidant enzymatic defences against oxidative stress in sheep placentomes. **J. Endocrinol.**, v. 205, p. 107–116, 2010.

GHISELLI, A.; SERAFINI, M.; MAIANI, G.; AZZINI, E.; FERRO-LUZZI, A. A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. **Free Radical Biol. Med**, v.18, p. 29-36, 1995.

GIROTTI, S.; FERRI, E.; MACCAGNANI, L.; BUDINI, R.; BIANCHI, G. Plasma antioxidant capacity determination: comparative evaluation of chemiluminescent and spectrophotometric assays. **Talanta** **56**, p. 407- 414, 2002.

GLAZER, A.N. Phycoerythrin fluorescence-based assay for reactive oxygen species, **Methods Enzymol.**, v. 186, p. 161-168, 1990.

HALLIWELL. B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrit. Rev.**, v. 52, p. 253-65, 1994.

HEIDARPOUR, M.; MOHRI, M.; BORJI, H.; MOGHADDAS, E.; Oxidant/antioxidant balance and trace elements status in sheep with liver cystic echinococcosis. **Comp. Clin. Pathol.**, v. 22, p. 1043-1049, 2013.

HOHENBOKEN, W.D.; MORRIS, C.A.; MUNDAY, R.; NICOLO, G.; AMYES, N.C.; TOWERS, N.R.; Antioxidants in blood from sheep lines divergently selected for facial eczema resistance. **New Zealand J. Agricult. Res.**, v. 47, p. 119-127, 2004.

INMETRO- Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial, **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos**, DOQ-CGCRE-008 Revisão 02 – junho/2007. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/sidoq/arquivos/cgcre/doq/doq-cgcre-8_02.pdf>.

Acesso em 05 fev. 2014.

INMETRO- Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial, **Orientação sobre validação de métodos analíticos**, DOQ-CGCRE-008, Revisão 03 - fevereiro/2010. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/sidoq/arquivos/cgcre/doq/doq-cgcre-8_03.pdf>.

Acesso em 12 fev. 2014.

KATARIA, A.K.; KATARIA, N. Evaluation of oxidative stress in sheep affected with Peste des petits ruminants. **J. Stress Physiol. Biochem.**, v. 8, n. 4, p. 72-77, 2012.

LIGHTBODY, J.H.; STEVENSON, L.M.; JACKSON, F.; DONALDSON, K.; JONES, D.G. Comparative aspects of plasma antioxidant status in sheep and goats, and the influence of experimental abomasal nematode infection, **J. Comp. Pathol.**, v. 124, p. 192-199, 2001.

LIGHTBODY, J.H.; STEVENSON, L.M.; JACKSON, F.; JONES, D.G.; DONALDSON, K.; Standardization of a spectrophotometric assay for plasma total antioxidant capacity. **Analyt. Biochem.**, v. 258, p. 369-372, 1998.

MILLER, N.J.; RICE-EVANS, C.; DAVIES, M.J.; GOPINATHAN, V.; MILNER, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clin. Sci.**, v. 84, p. 407-412, 1993.

MUTINATI, M., PICCINNO, M., RONCETTI, M., CAMPANILE, D. RIZZO, A., SCIORSCI, R.L., Oxidative Stress During Pregnancy in the Sheep, **Reprod. Dom. Anim.**, v. 48, p. 353–357, 2013.

NEMEC, A.; DROBNI-KOSOROK, M.; SKITEK, M.; PAVLICA, Z.; GALAC, S.; BUTINAR, J. Total antioxidant capacity (TAC) values and their correlation with individual antioxidants in serum of healthy beagles. **Acta Vet.**, v. 69, p. 297-303, 2000.

NEZHAD, F.S.; LAVVAF, A.; KARIMI, S. Effect of heat stress on oxidative reactions in the sheep sertoli cells. **Int. J. Agricult. Crop Sci.**, v. 6, n. 12, p. 833-839, 2013.

PARK, M.S.; CANCIO, L.C.; JORDAN, B.S.; BRINKLEY, W.W.; RIVERA, V.R.; DUBICK, M.A., Assessment of oxidative stress in lungs from sheep after inhalation of wood smoke, **Toxicology**, v. 195, p. 97–11, 2004.

PARRAGUEZ, V.H.; ATLAGICH, M.; ARANEDA, O.; GARCIA, C.; MUÑOZ, A.; REYES, M. de los; URQUIETA, B. Effects of antioxidant vitamins on newborn and placental traits in gestations at high altitude: comparative study in high and low altitude native sheep-*Reproduction*, **Fertil. Devel.**, v. 23, p. 285–296, 2011.

PRIOR, R.L.; CAO, G. In vivo total antioxidant capacity: Comparison of different analytical methods. **Free Rad. Biol. Med. Forum: Oxidative Stress Status**. v. 27, p. 1173-1181, 1999.

PRIOR, R.L.; HOANG, H.A.; GU, L.; WU, X.; BACCHIOCCA, M.; HOWARD, L.; HAMPSCH-WOODILL, M.; HUANG, D.; OU, B.; JACOB, R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC_{FL})) of plasma and other biological and food samples. **J. Agricult. Food Chem.**, v. 51, p. 3273-3279, 2003.

PRIOR, R.L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in food and dietary supplements. **J. Agricult. Food Chem.**, v. 53, p. 4290-4302, 2005.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YAG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N.J. Total antioxidant status in plasma and body fluids. **Methods Enzymol.**, v. 234, p. 279-293, 1994

SALAR-AMOLI, J.; BAGHBANZADEH, A., Oxidative stress in Shaal sheep of different age groups. **Turk J. Vet. Anim. Sci.**, v. 34, n. 4, p. 379-383, 2010.

SOCHOR, J.; RYVOLOVA, M.; KRYSTOFOVA, O.; SALAS, P.; HUBALEK, J.; ADAM, V.; TRNKOVA, L.; HAVEL, L.; BEKLOVA, M.; ZEHNALÉK, J.; PROVAZNIK, I.; KIZEK, R. Fully automated spectrometric protocols for determination of antioxidant activity: advantages and disadvantages. **Molecules**, p. 8618-8640, 2010.

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M.S.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: Principais métodos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VILLAÑO, D; FERNÁNDEZ-PACHÓN, M.S.; TRONCOSO, A.M.; PARRILLA, G. The antioxidant activity of wines determined by the ABTS^{•+} method: influence of sample dilution and time. **Talanta** **64**, p. 501-509, 2004.

WAYNER, D.D.M.; BURTON, G.W.; INGOLD, K.U.; LOCKE, S. Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. The important contribution made by plasma proteins. **FEBS 2700**, v. 187, n. 1, p. 33-37, 1985.

WEIGEL, R.A.; ORTOLANI E.L.; SUCUPIRA, M.C.A. Avaliação do metabolismo oxidativo de ovinos intoxicados por cobre e tratados com tetratiomolibdato associado ou não a vitaminas antioxidantes. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci., São Paulo**, v. 47, n. 6, p. 421-428, 2010.

Capítulo 2

Capacidade antioxidante total sérica: padronização e validação de métodos para espécie ovina

Souza, J.C., Almeida, B.F.M., Narciso, L.G., Pereira, P.P., Louzada, M.J.Q., Ciarlini, P.C.

RESUMO - Avaliar o estresse oxidativo é fundamental para entender várias condições que afetam a produção e saúde dos ovinos. Neste sentido, diversas metodologias foram desenvolvidas para quantificar a capacidade antioxidante total (TAC) no sangue, porém a maioria não foi devidamente validada para espécie ovina. O presente estudo objetivou padronizar e validar um método para quantificar a TAC no soro de ovinos que tem como característica ser de simples execução e de baixo custo. A validação do método foi realizada conforme critérios exigidos para métodos analíticos, incluindo a determinação da linearidade, sensibilidade, exatidão, precisão, robustez, recuperação analítica, limite de detecção e limite de quantificação. Os indicadores de validação indicaram um bom desempenho do método que foi padronizado para determinação da TAC no soro dos ovinos. Após a comprovação da validade do método, os resultados da TAC sérica de 25 ovinos sadios foram comparados com os obtidos com um kit comercial (TAS-Randox) de referência. Os valores da TAC dos dois métodos diferiram significativamente e não apresentaram boa correlação entre si ($r=0,22$), assim como ocorreu em relação a alguns antioxidantes endógenos (ácido úrico e albumina) e exógenos (Trolox e Vitamina C) testados. O método padronizado revelou a qualidade de ser de baixo custo, de rápida execução e seus reagentes apresentaram boa estabilidade (4 meses), sensibilidade e precisão. Concluiu-se que é possível quantificar valores confiáveis da TAC no soro de ovinos com o método padronizado e que este possui características vantajosas que permitem o seu emprego em laboratórios veterinários de rotina.

Palavras-Chave: ABTS, antioxidante sérico, método colorimétrico, *status* antioxidante

Serum total antioxidant capacity: standardization and validation for ovine species

ABSTRACT - The assessment of oxidative stress is an essential tool to understand several conditions that affect the production and health of ovine species. Therefore, several methodologies have been developed to quantify the total antioxidant capacity (TAC) in blood, even though most of them have not been adequately validated for sheep. This study aimed to standardize and validate a method to quantify the TAC in serum of sheep, which is simple to implement and have low cost. The method validation was performed according to criteria for analytical methods including the determination of linearity, sensitivity, accuracy, precision, robustness, analytical recovery, limit of detection and limit of quantification. The validation indicated a good performance of the standardized method used to determine the TAC in serum of sheep. After confirming the validation of the method, the results of serum TAC of 25 healthy sheep were compared with those obtained from a commercial kit (TAS-Randox). The TAC values of the two methods differ significantly and did not present good correlation with each other ($r=0,22$), as occurred with some tested endogenous antioxidants (uric, acid, albumin) and exogenous (Trolox and Vitamin C). The standardized method revealed the quality of being low cost and having rapid implementation. In addition, its reagents showed good stability (4 months), good sensitivity and accuracy. It was concluded that it is possible to quantify reliable values of TAC in serum of sheep with the standardized method and that this method possesses advantageous characteristics that allow its use in routine veterinary laboratories.

Keywords: ABTS, Serum antioxidant, colorimetric method, antioxidant status

1 Introdução

Radicais livres podem ser definidos como qualquer átomo, molécula ou fragmento de molécula contendo um ou mais elétrons desemparelhados na sua última camada de valência. Estes elétrons desemparelhados fazem com que essas espécies sejam altamente reativas, instáveis e de meia-vida curta (HALLIWELL, 1994). O desequilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes determina o grau de estresse oxidativo. Consequências deste estresse incluem a modificação de proteínas celulares, lípidos e ácidos nucleicos (FINKEL; HOLBROOK, 2000).

O aumento na produção dos radicais livres além da capacidade de proteção antioxidante pode gerar modificações irreversíveis dos componentes celulares (GARREL et al., 2010) e são responsáveis por muitos processos patológicos (SOCHOR et al., 2010). Algumas patologias associadas ao aumento dos radicais livres já foram reconhecidas em mais de 100 doenças em humanos e em animais, dentre as patologias destacam-se câncer, catarata, diabetes, doenças inflamatórias, periodontais, neurológicas, cardiovasculares e renais (NEMEC et al., 2000). Em ruminantes doenças respiratórias e articulares, septicemia, mastite, acidose, cetose, enterite e pneumonia parece estar associada ao estresse oxidativo, o que implica na produção e à saúde dos mesmos (CELI, 2011). Não obstante a importância do tema, em relação à espécie ovina ainda são escassos os estudos sobre estresse oxidativo (ANDRÈS et al., 1997; ANDRÈS et al., 1999; LIGHTBODY et al., 2001; RIZZO et al., 2008).

Muitas moléculas antioxidantes previnem e inibem reações prejudiciais em biomoléculas (YOUNG, 2001) e podem ser mensuradas no soro ou plasma, porém a mensuração de diferentes antioxidantes separadamente é difícil, pois a maioria das metodologias empregadas envolvem técnicas complicadas, equipamentos e reagentes de alto custo. Diante da necessidade de melhor avaliar o complexo mecanismo que envolve o estresse oxidativo, considerando que o efeito dos antioxidantes são aditivos, foram desenvolvidas várias

metodologias que permitissem quantificar a capacidade antioxidante total (TAC) de uma amostra.

Os métodos colorimétricos mais utilizados que quantificam a TAC têm como base o 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolino-6-sulfonato) (ABTS^+), uma molécula que é incolor na sua forma reduzida e que se torna azul-esverdeada quando oxidada ($\text{ABTS}^{\cdot+}$). O princípio básico desses métodos é que a cor azul-esverdeada do $\text{ABTS}^{\cdot+}$ oxidado, sob o efeito redutor dos antioxidantes, torna-se novamente incolor. Diferentes oxidantes têm sido utilizados para oxidar o $\text{ABTS}^{\cdot+}$ (CAMPOS et al., 1996; LAIGHT et al., 1999; MILLER et al., 1993; RE et al., 1999), entretanto o reagente oxidado é instável (EREL, 2004). O reagente comercial disponível para determinação da TAC utiliza a metamioglobina (MILLER et al., 1993) como oxidante, porém seu custo é alto e a vida útil do reagente é muito curta (48 horas sob refrigeração). Erel (2004) desenvolveu uma metodologia de baixo custo para quantificar TAC, com as vantagens de utilizar um reagente $\text{ABTS}^{\cdot+}$ oxidado apenas com o peróxido de hidrogênio, tornando-o estável por vários meses.

A TAC em sangue de ovinos tem sido quantificada utilizando-se metodologias que inicialmente foram desenvolvidas para frutas, bebidas e espécie humana (DIMRI et al., 2010; HOHENBOKEN et al., 2004; LIGHTBODY et al., 1998; LIGHTBODY et al., 2001; PARRAGUEZ et al., 2011). A maioria das metodologias que empregam o $\text{ABTS}^{\cdot+}$ não foram adequadamente validadas para quantificar TAC no soro ou plasma (EREL, 2004). Algumas dessas metodologias falham em quantificar a TAC em ovinos provavelmente porque a concentração de antioxidantes no plasma de ovinos seja menor do que a humana (LIGHTBODY et al., 1998) e caprina (LIGHTBODY et al., 2001).

O estudo do complexo mecanismo do estresse oxidativo exige o emprego de métodos sensíveis e confiáveis que permitam quantificar a TAC. Métodos analíticos devem ser validados para diferentes espécies, determinando-se a linearidade da reação, sua exatidão, precisão, robustez, limite de detecção e quantificação (ANVISA, 2003). A fim de contribuir para a melhor compreensão do estresse oxidativo que afeta a saúde e a produtividade

ovina, no presente estudo foi padronizado e validado um método estável para a quantificação da TAC sérica nesta espécie.

2 Material e métodos

Esta pesquisa foi realizada conforme aprovação da Comissão de Ética no uso de animais da UNESP, Campus de Araçatuba (protocolo FOA-00433-13) de acordo com os princípios éticos na experimentação animal da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus Araçatuba segundo as resoluções brasileiras (Lei nº. 6.638, de 08 de maio de 1979 e Decreto nº. 26.645 de 10 e julho de 1934).

2.1 Reagentes

Ácido acético glacial (Massa Molar (MM) 60,04 g/mol) (Vetec Química Fina, RJ, Brasil), peróxido de hidrogênio (MM 34,01 g/mol a 35%) (Dinâmica, SP, Brasil), acetato de sódio (MM 82,03 g/mol), hidróxido de sódio (MM 39,9 g/mol a 10 mmol/L), ácido úrico (MM 168,11 g/mol), ácido ascórbico (MM 176,12 g/mol), 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato, sal de diamônio) (M.M. 548,7 g/mol, ABTS⁺), análogo hidrossolúvel da vitamina E (Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico, MM 250,29) e tampão salina-fosfato (PBS) pH 7,4 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). Foi utilizado água ultrapurificada pelo equipamento Milli-Q Millipore (Milli-Q System, New Bedford, Massachusetts, USA) para o preparo de todas as soluções.

2.2 Antioxidantes

A solução estoque padrão de Trolox (2,0 mmol/L) foi preparada com tampão PBS, a de ácido ascórbico (2,0 mmol/L) com água deionizada e a de ácido úrico (2,0 mmol/L) com NaOH 10 mmol/L, todas mantidas à temperatura ambiente e protegidas da luz. Todas as soluções estoques de antioxidantes foram diluídas nas seguintes concentrações 0,1; 0,25; 0,5; 1,0 e 1,5 mmol/L.

2.3 Seleção dos animais e obtenção das amostras

Foram selecionados 25 ovinos machos da raça Santa Inês, peso médio de 26,6 kg e idade variando entre 4 a 5 meses, criados em uma propriedade particular na cidade de Birigui, São Paulo, Brasil. Foram excluídos do estudo animais tratados com qualquer medicamento nos últimos 14 dias ou com qualquer alteração no exame clínico geral, hemograma e perfil bioquímico sérico (alanina aminotransaminase, aspartato aminotransaminase, ureia, creatinina, colesterol total, triglicerídeos, glicemia, proteína total, albumina e ácido úrico). Para tal, de cada animal foram colhidos 20 mL de sangue venoso por flebocentese da jugular, sendo 1 mL transferido para um microtubo (Life Technologies) contendo ácido diaminoetilenotetracético (EDTA MM 292,24 g/mol a 10%) para realização do hemograma e o restante acondicionado em tubos de ensaios (sem anticoagulante) (Becton, Dickinson and Company-BD) para obtenção do soro e posteriormente realização do perfil bioquímico sérico e determinação da TAC sérica. As amostras de fezes para os exames parasitológicos foram colhidas diretamente da ampola retal e armazenadas sob refrigeração até o momento do exame. Todas as análises laboratoriais foram realizadas dentro de 24 horas.

As análises bioquímicas foram realizadas em espectrofotômetro automatizado (BS 200, Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Nanshan, China) previamente calibrado com calibrador e soros controles níveis I e II e utilizando reagentes comerciais (Biosystems, Barcelona, Spain). Para determinar o teor de ureia (método enzimático UV urease/glutamato desidrogenase); glicose (método enzimático glicose oxidase/peroxidase); triglicerídeos (método enzimático triglicerides-glicerol fosfato); creatinina (método cinético do picrato alcalino); albumina (método do verde de bromocresol); colesterol (método enzimático oxidase/peroxidase); proteína total (método do biureto); ácido úrico (método enzimático uricase/peroxidase); aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase (ambas pelo método cinético UV segundo IFCC). Todas as reações bioquímicas foram processadas a 37°C conforme orientações dos fabricantes.

O hemograma foi realizado a partir de um contador veterinário automatizado de células (BC-2800Vet, Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Nanshan, China) e a contagem diferencial de leucócitos foi realizada em esfregaços sanguíneos corados (método panótico rápido) e examinados ao microscópio óptico, com objetiva de imersão e aumento de mil vezes. A contagem de ovos por grama de fezes (OPG) foi realizada conforme a técnica descrita por Gordon e Whitlock modificada (1939).

2.4 Conservação e acondicionamento das amostras

Após separação do soro, as amostras foram fracionadas em 17 lotes para cada animal e acondicionadas em microtubos protegidos da luz, na qual um lote foi mantido sob refrigeração (2 a 8°C) para posteriores análises num período de 24 horas e os demais lotes foram mantidos congelados a -20°C, protegidos da luz e sob controle de temperatura. A repetição das análises da TAC ocorreram a cada 7 dias no primeiro mês, e a cada 15 dias durante um período de 6 meses para avaliar a estabilidade.

2.5 Preparação dos reagentes para a determinação da capacidade antioxidante total (TAC)

A determinação da TAC foi realizada conforme Erel (2004), com algumas modificações. Para obter o reagente 1 (R1) uma solução “A” tampão de acetato 0,4 mol/L foi preparada com 16,4004 g de acetato de sódio dissolvidos em quantidade suficiente para (q.s.p.) 500 mL de solução, com água pura. Para o preparo da solução “B”, usou-se 11,4 mL de ácido acético glacial diluído em q.s.p. 500 mL de solução, com água pura. Um volume de 470 mL da solução “A” foi misturada com 30 mL da solução “B” e o pH 5,5 foi posteriormente confirmado.

Para obter o reagente 2 (R2) uma solução tampão de acetato de sódio 30 mmol/L denominada solução “A” foi preparada com 1,2305 g de acetato de sódio dissolvido em q.s.p. 500 mL de solução, com água pura. Para o preparo da solução “B”, 0,8530 mL de ácido acético glacial foi diluído em q.s.p. 500 mL

de solução, com água deionizada. Uma solução “C” foi preparada misturando 37,5 mL da solução “A” a 462,5 mL da solução “B”. Para o preparo da solução “D”, 140 µL peróxido de hidrogênio a 35% foi diluído em q.s.p. 500 mL de solução “C”, obtendo-se uma concentração final de 2 mmol/L. Em seguida, 1,098 g de ABTS foi dissolvido em q.s.p. 200 mL da solução “D”, obtendo-se uma concentração final de 10 mmol/L (pH 3,7). Após 1 hora de incubação à temperatura ambiente, foi observada o início da cor verde escuro característica de $ABTS^{\cdot+}$, conservado sob refrigeração por 24 horas para início das análises.

A mensuração da TAC foi realizada em analisador bioquímico Ultra Violeta-Visível semi-automático Labquest (Labtest, MG, Brasil) calibrado conforme recomendações do fabricante. Uma curva de calibração foi obtida com uso de solução aquosa padrão de Trolox (2,0 mmol/L) em diferentes concentrações (0,1; 0,25; 0,5; 1,0 e 1,5 mmol/L). Alíquotas de 20 µL de cada solução padrão Trolox foram acrescidas a 800 µL do R1. Após 3 minutos de estabilização em temperatura ambiente (TA), foram adicionados 80 µL do R2. Após 5 minutos de incubação em TA, foi realizada a leitura da absorbância utilizando-se 620 nm de comprimento de onda. A partir dos valores obtidos das absorbâncias das diferentes concentrações de padrão Trolox foi criada uma curva de reação para TAC e o valores expressos em mmol Trolox equivalente/L.

2.6 Validação do método

O processo de validação da metodologia descrita por Erel (2004) para quantificar a TAC no soro ovino foi realizado de acordo com alguns critérios definidos para métodos analíticos, incluindo a determinação da linearidade, sensibilidade, exatidão, precisão, robustez, recuperação analítica, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ). Previamente, determinou-se o espectro de absorção máxima da solução padrão de Trolox (2,0 mmol/L) com filtros em comprimentos de onda de 340, 405, 450, 505, 546, 620 e 670 nm, utilizando a solução tampão de PBS como branco e cubetas de vidro de 1 cm de diâmetro. A linearidade foi determinada em triplicada, sendo considerado o

valor médio da absorbância de cinco concentrações diferentes da solução padrão de Trolox. Para determinação da sensibilidade do método considerou-se o coeficiente angular da reta da curva de regressão linear obtida na calibração. A exatidão foi determinada em triplicada a partir da determinação da TAC em três concentrações de Trolox (0,5, 1,0 e 2,0 mmol/L). A partir de 12 repetições de três diferentes concentrações de Trolox (0,5, 1,0 e 2,0 mmol/L), foi calculada a precisão (DPR) e exatidão (E). Para tal, foram empregadas as seguintes fórmulas: $DPR(\%) = DP/CMD \times 100$ e $E(\%) = CME/CT \times 100$, sendo DP o desvio-padrão, a CMD concentração média determinada, CME a concentração média experimental e CT a concentração teórica. Para o cálculo do LD e do LQ, o uso das fórmulas preconizadas para validação ((LD= Desvio Padrão Relativo x 3/Inclinação da curva) e (LQ= Desvio Padrão x 3/Inclinação da curva)) foram testadas e avaliadas. A robustez do método foi determinada pela análise das absorbâncias obtidas entre 10 repetições de uma amostra com alteração provocada no pH do R2. A porcentagem de recuperação do método foi estimada em triplicada, adicionando-se 20 µL da solução de ácido úrico nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mmol/L num volume de 40 µL de uma mesma amostra de soro de ovino. As características dos antioxidantes exógenos, Trolox (vitamina E) e ácido ascórbico (vitamina C) e endógeno (ácido úrico) e respectivas doses-resposta em soluções pura foram determinadas. Por fim, usando Trolox como calibrador, os resultados da TAC obtidos pelo método de Erel (2004) foram comparados aos obtidos com o *kit* comercial *Total Antioxidante Status* (TAS) (Randox Laboratories LTDA, United Kingdom).

2.7 Análise estatística

Os cálculos para os testes *T de Student*, de correlação (Spearman) e de regressão linear foram realizadas com auxílio do programa GraphPad InStat, versão 3.05, 2000. Considerou-se significativo $p < 0,05$.

3 Resultados e discussão

Todos os animais estavam clínico-laboratorialmente sadios, confirmados pelos exames hematológicos, bioquímicos e OPGs. A validação da metodologia de quantificação da TAC em soro de ovinos segundo o método proposto por Erel (2004) foi realizada seguindo critérios estabelecidos para validação de métodos analíticos.

3.1 Seleção do espectro de absorção

Após a leitura da solução padrão de Trolox (2,0 mmol/L) em diferentes comprimentos de onda (340, 405, 450, 505, 546, 620 e 670 nm), foi selecionado o filtro de 620 nm por apresentar a absorbância máxima. Estes resultados estão coerentes com as observações de Erel (2004) que obteve a absorbância máxima no comprimento de onda de 660 nm.

3.2 A linearidade da reação

A boa linearidade do método foi confirmada com base na análise de regressão da leitura de absorbância de 06 concentrações diferentes da solução padrão de Trolox (Figura 1), sendo similar ao obtido por Erel (2004).

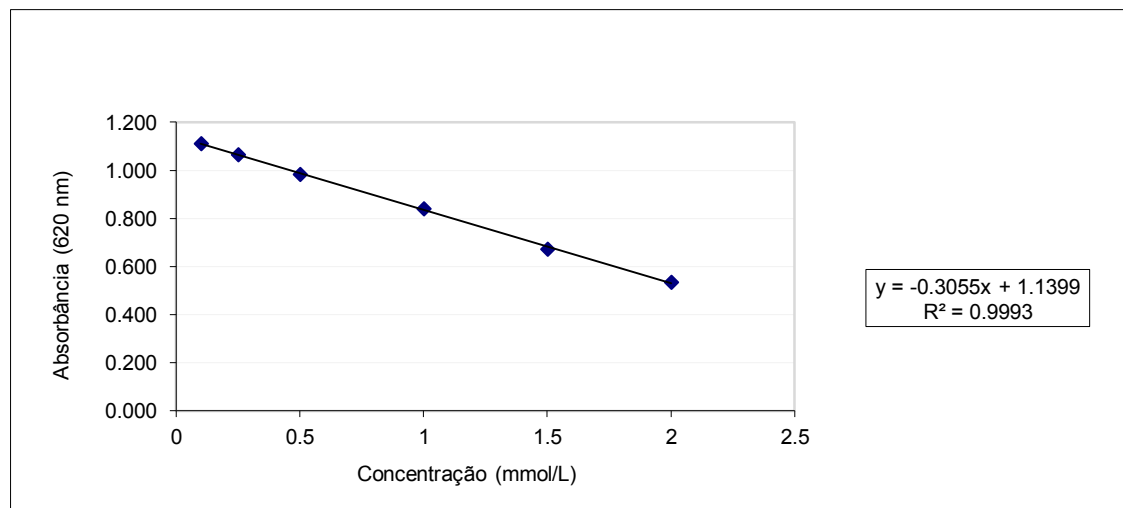


FIGURA 1 - Curva de calibração. Análise de regressão dos valores de absorbância de seis diferentes concentrações de padrão Trolox obtida com uso do método de quantificação de TAC (EREL, 2004).

3.3 Sensibilidade, limite de detecção e limite de quantificação

A sensibilidade do método estimada pelo coeficiente angular da reta da curva de calibração 0,3055 (Figura 1) foi maior que os 0,207 descrito por Erel (2004). A reta de calibração apresentou coeficiente de correlação de 0,9993 (Figura 1), portanto um coeficiente de correlação acima do valor mínimo aceito pela ANVISA (2003). No presente estudo amostras com quantidades menores que 0,1 mmol/L equivalente Trolox não apresentavam repetitividade, estabelecendo-se assim este limite como mínimo confiável para quantificação. Este valor limite de quantificação foi superior ao 0,04 mmol/L relatado por Erel (2004).

3.3 Exatidão e precisão do método

A exatidão e precisão do método variou com a concentração de equivalente Trolox, sendo tanto melhor quanto maior a concentração da TAC (Tabela 1).

Tabela 1 - Valores médios da precisão (DPR) e exatidão (E) do método Erel (2004) para determinação da TAC estimadas a partir da concentração média experimental (CME) e determinada (CMD), desvios-padrão (DP) de três diferentes concentrações de padrão Trolox (mmol/L)

CME (mmol/L)	CMD n=3	DP	DPR (%)	E (%)
0,5	0,525	0,04	7,61	105
1,0	0,915	0,04	4,37	91,5
2,0	1,957	0,04	2,04	97,8

Nota-se que o método apresentou uma boa exatidão para as diferentes concentrações testadas, porém a precisão para concentração de 0,5 mmol/L equivalente Trolox (Tabela 1) ficou acima dos 5% considerável aceitável pela ANVISA (2013).

3.5 Robustez

O método apresentou uma boa robustez diante de variações do pH acidificado com ácido acético (pH $3,7 \pm 0,2$) do reagente R2 (Tabela 2), comparado com os valores obtidos por Erel (2004).

Tabela 2 - Avaliação da robustez do método de Erel (2004) para determinação da TAC estimada a partir da variação do pH do reagente 2 (R2)

Número	Absorbância		
	pH 3,5	pH 3,7	pH 3,9
1	0,884	0,886	0,882
2	0,883	0,885	0,883
3	0,885	0,886	0,881
4	0,887	0,887	0,885
5	0,888	0,884	0,884
6	0,885	0,886	0,882
7	0,882	0,888	0,885
8	0,886	0,883	0,883
9	0,884	0,885	0,884
10	0,888	0,886	0,885
Média	0,8852	0,8856	0,8834

3.6 Recuperação analítica

Uma boa recuperação analítica do método Erel (2004) foi obtida quando foram adicionadas diferentes concentrações de ácido úrico em soro ovino (Tabela 3).

Tabela 3 - Estimativa da recuperação analítica do método Erel (2004) para determinação da TAC após adição de diferentes concentrações de ácido úrico em soro ovino

Ensaio	Concentração (mmol/L)	Absorbância	Concentração encontrada (mmol) (média \pm desvio-padrão) n=9	Exatidão
Exatidão	0,5	0,847	0,57 \pm 0,05	114%
	1,0	0,683	1,05 \pm 0,04	105%
	2,0	0,384	1,91 \pm 0,04	95,5%

3.7 Estabilidade das amostras

As amostras mantidas congeladas a -20°C mantiveram uma estabilidade apenas por 15 dias, não apresentando diferenças estatísticas entre estes resultados e os obtidos em 24 horas após a coleta ($p=0,28$), considerando viável a dosagem da TAC dentro deste período.

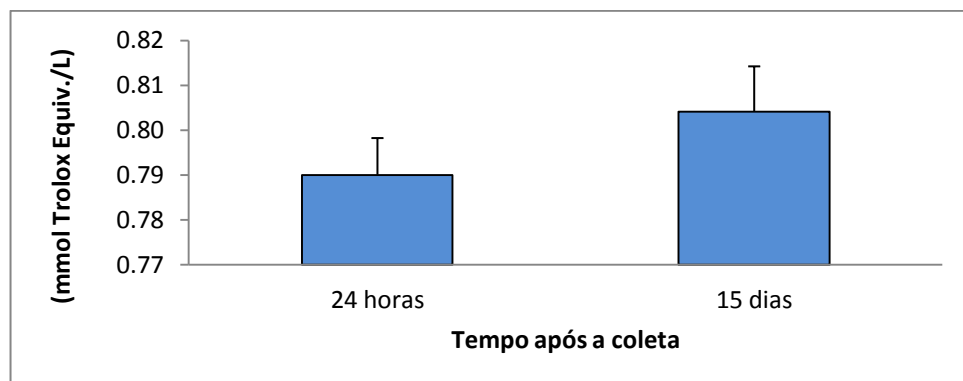


FIGURA 2 – Comparação da média e erro padrão da média da capacidade antioxidante total do soro de 25 ovinos obtidas dentro 24 horas e 15 dias de congelamento a -20°C .

3.8 Comparação entre diferentes soluções puras de antioxidantes exógenos e endógenos

A concentração plasmática de ácido úrico é de quase 10 vezes mais elevada do que a de outros antioxidantes (GHISELLI et al., 2000; SEVANION et al., 1991) e constitui cerca de 33,1% da TAC no soro humano. Já o papel antioxidante do ácido ascórbico (vitamina C) é bem conhecido, sendo esta vitamina responsável por cerca de 4,7% da TAC do soro humano (EREL, 2004). Os resultados obtidos no presente estudo confirmam que o poder antioxidante do ácido úrico é maior quando comparado ao equivalente da vitamina E (Trolox) e vitamina C (Figura 3).

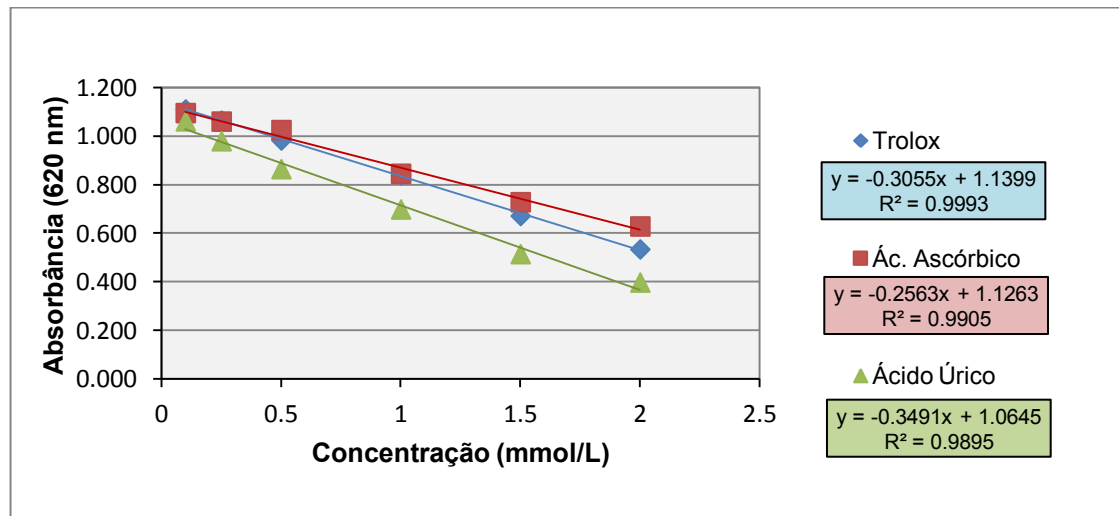


FIGURA 3 - Comparação da dose resposta do método Erel (2004) para determinação da TAC para diferentes soluções puras de antioxidantes endógeno e exógeno.

O método Erel (2004) tem sido considerado mais sensível para determinar os efeitos antioxidantes de ácido úrico, vitamina C, polifenóis, e proteínas. A dose-resposta da solução pura de vitamina C foi mais rápida quando comparada com o Trolox e este mais rápido que do ácido úrico (Figura 3). Resposta mais lenta do ácido úrico também foi observado por Erel (2004), porém este autor observou uma resposta mais rápida do Trolox em relação à vitamina C.

O intervalo de referência da TAC no soro muda de acordo com o método utilizado e também a molécula padrão utilizada na calibração dos ensaios. Os resultados obtidos no presente estudo confirmam que os valores da TAC variam com o antioxidante utilizado na calibração da reação. Por apresentar valores intermediários, no presente estudo o Trolox foi considerado como o padrão mais adequado, até mesmo por que este antioxidante é o mais usado tradicionalmente (EREL, 2004; MILLER et al., 1993; PRIOR; CAO, 1999; RE et al., 1999;).

3.9 Correlação entre TAC e concentração sérica de antioxidantes endógenos

Embora a solução pura de ácido úrico tenha dado uma boa resposta ao método testado (Figura 3) não foi observado uma correlação entre este e outros antioxidantes endógenos presentes no soro de ovinos e a TAC (Tabela 4).

Tabela 4 - Coeficiente de correlação Pearson entre a TAC e alguns antioxidantes endógenos no soro de ovinos (n=25) obtidos por duas diferentes metodologias

Antioxidante	TAC Erel (2004)	TAS-RANDOX
Ácido úrico	r=0,106	r=0,15
	p=0,61	p=0,45
Proteína total	r=0,17	r=0,14
	p=0,41	p=0,48
Albumina	r=0,23	r=0,15
	p=0,24	p=0,46

Grupos sulfidril livres de proteínas são os principais responsáveis por seus efeitos antioxidantes, e calcula-se que a proteína total contribui em 52,9% da TAC no soro medido em indivíduos saudáveis (EREL, 2004). Por ser o principal componente antioxidante do soro (KAMPA et al., 2002; KORACEVIC et al., 2001), Erel (2004) considera este mais vantajoso que o TAS-Randox por ser mais sensível para proteína, fato este não confirmado em nossos resultados. Ao comparar TAS-Randox e a correlação entre a TAC do soro ovino com a proteína total e albumina foram maiores no método de Erel (2004), porém esta não foi significativa.

3.9.1 Comparação entre metodologias para determinação da TAC em soro ovino.

Existem poucos estudos sobre a TAC em soro de ovinos. Provavelmente este é o primeiro estudo que quantificou a TAC sérica de ovinos empregando a metodologia usada por Erel (2004). Heidarpour et al. (2013), utilizando *kit* comercial TAS-Randox, relatam valores da TAC sérica em ovinos equivalente a $3,08 \pm 0,18$ mmol/L Trolox.

Há duas versões principais de métodos que utilizam o radical $ABTS^{\cdot+}$, a primeira utiliza metamioglobina (MILLER et al., 1993) e a segunda (RE et al., 1999) peróxido de hidrogênio. Na primeira metodologia é empregado o *kit* comercial TAS-Randox, na qual a amostra é adicionada ao reagente 1 contendo $ABTS^{\cdot+}$ e em seguida, é adicionado o reagente 2 contendo a metamioglobina. Na segunda metodologia o procedimento é o mesmo, porém o reagente 2 contém o peróxido de hidrogênio. O método de Erel (2004) difere de Re et al. (1999) e é denominada como pós-adicional porque o cation $ABTS^{\cdot+}$ é formado com acréscimo do peróxido de hidrogênio antes da amostra. No presente estudo não foi observado uma boa correlação entre os valores da TAC obtidos com TAS-Randox e a metodologia de Erel (2004), concordando com Re et al. (1999) que afirmaram não ser possível fazer comparações entre estas metodologias e o TAS-Randox. Estes resultados são coerente com o estudos de Prior e Cao (1999) que também não encontram nenhuma correlação significativa entre o método FRAP para determinação da TAC e o TAS-Randox.

técnicas e equipamentos que a maioria dos laboratórios de bioquímica de rotina não possui.

4 Conclusão

Os resultados da padronização e validação do método Erel (2004) no presente estudo foram satisfatórios, sendo este rápido, de simples execução, com reagentes de boa estabilidade e sensibilidade. O método desenvolvido tem uma alta linearidade e os resultados são altamente reprodutíveis. Com o emprego deste método foi possível obter resultados confiáveis da TAC em soro de ovinos utilizando equipamento e reagentes de baixo custo, tornando viável o uso dessa metodologia em laboratórios veterinários de rotina.

REFERÊNCIAS

ANDRÉS, S.; JIMENEZ, A.; MAÑÉ, M.C.; SÁNCHEZ, J.; BARRERA, R.; Relationships between some soil parameters and the blood glutathione peroxidase activity of grazing sheep. **Vet. Rec.**, v. 141, p. 267-268, 1997.

ANDRÉS, S.; MAÑÉ, M.C.; SÁNCHEZ, J.; BARRERA, R.; Temporal variations in blood glutathione peroxidase (GSHPx) activity in sheep at pasture in a Mediterranean area. **Vet. J.**, v. 157, p. 186-188, 1999.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde, Brasil, **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**, Resolução RE 899 de 29 maio 2003, Diário Oficial da República Federativa do Brasil; Poder Executivo, de 2 jun. 2003.

CAMPOS, A.M.; ESCOBAR, J.; LISSI, E.A.; The total reactive antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity (TAR) of *Ilex paraguayensis* extracts and red wine. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 7, p. 43–49, 1996.

CELI, P. Biomarkers of oxidative stress in ruminant medicine. **Immunopharmacol. Immunotoxicol.**, v. 33, n. 2, p.233–240, 2011.

DIMRI,U.; SHARMA, M.C.; YAMDAGNI, A.; RANIAN, R.; ZAMA, M. M. Psoroptic mange infestation increases oxidative stress and decreases antioxidant status in sheep. **Vet. Parasitol.**, v. 168, p. 318–322, 2010.

EREL, O. A novel direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. **Clin. Biochem.**, v. 37, n. 4, p. 277-285, 2004.

FINKEL T.; HOLBROOK N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, p. 239-47, 2000.

GARREL, C.; FOWLER, P.A.; AL-GUBORY, K.H. Developmental changes in antioxidant enzymatic defences against oxidative stress in sheep placentomes. **J Endocrinol.**, v. 205, p.107-116, 2010.

GHISELLI, A.; SERAFINI M.; NATELLA F.; SCACCINI, C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 29, n. 11, p.1106-1114, 2000.

HALLIWELL. B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrit. Rev.**, v. 52, p.253-65, 1994.

HEIDARPOUR, M.; MOHRI, M.; BORJI, H.; MOGHADDAS, E. Oxidant/antioxidant balance and trace elements status in sheep with liver cystic echinococcosis. **Comp. Clin. Pathol.**, v. 22, p.1043-1049, 2013.

HOHENBOKEN, W.D.; MORRIS, C.A.; MUNDAY, R.; NICOLO, G.; AMYES, N.C.; TOWERS, N.R. Antioxidants in blood from sheep lines divergently selected for facial eczema resistance. **New Zealand J. Agricult. Res.**, v. 47, p.119-127, 2004.

KAMPA, M.; NISTIKAKI, A.; TSAOUSIS-MALIARAKI, V.N.; NOTAS, G.; CASTANAS, E. A new automated method for the determination of the total

antioxidant capacity (TAC) of human plasma, based on the crocin bleaching assay. **BMC Clin. Pathol.**, v.28, n. 2, p.3, 2002.

KORACEVIC, D.; KORACEVIC, G.; DJORDJEVIC V.; ANDREJEVIC, S.; COSIC, V. Method for the measurement of antioxidant activity in human fluids. **J. Clin. Pathol.**, v. 54, n. 5, p. 356–361, 2001.

LAIGHT, D.W.; GUNNARSSON,P.T.; KAW, A.V.; ANGGARD, E.E.; CARRIER, M.J. Physiological microassay of plasma total antioxidant status in a model of endothelial dysfunction in the rat following experimental oxidant stress in vivo. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v.7, p. 27–31, 1999.

LIGHTBODY, J.H.; STEVENSON, L.M.; JACKSON, F.; JONES, D.G.; DONALDSON, K. Standardization of a spectrophotometric assay for plasma total antioxidant capacity. **Analyt. Biochem.**, v. 258, p. 369-372, 1998.

LIGHTBODY, J.H.; STEVENSON, L.M.; JACKSON, F.; JONES, D.G.; DONALDSON, K. Comparative aspects of plasma antioxidant status in sheep and goats, and the influence of experimental abomasal nematode infection. **J. Comp. Pathol.**, v. 124, p. 192-199, 2001.

MILLER, N.J.; RICE-EVANS, C.; DAVIES, M.J.; GOPINATHAN, V.; MILNER, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clin. Sci.**, v. 84, p. 407–412, 1993.

NEMEC, A.; DROBNI-KOSOROK, M.; SKITEK, M.; PAVLICA, Z.; GALAC, S.; BUTINAR, J. Total antioxidant capacity (TAC) values and their correlation with individual antioxidants in serum of healthy beagles, **Acta Vet.**, v. 69, p.297-303, 2000.

PARRAGUEZ, V.H.; ATLAGICH, M.; ARANEDA, O.; GARCIA, C.; MUÑOZ, A.; REYES, M. de los; URQUIETA, B. Effects of antioxidant vitamins on newborn

and placental traits in gestations at high altitude: comparative study in high and low altitude native sheep-Reproduction. **Fertil. Devel.** v. 23, p. 285–296, 2011.

PRIOR, R.L.; CAO, G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 27, p. 1173-1181, 1999.

RE R.; PELLEGRINI, N; PROTEGGENTE, A; PANNALA, A; YANG, M; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Rad. Biol. Med.**, v.26, p. 1231–1237, 1999.

RIZZO, A.; MUTINATI, M.; SPEDICATO, M.; MINIOIA, G; TRISOLINI, C.; JIRILO, F.; SCIORSCI, R.C. First demonstration of an increased serum level of reactive oxygen species during the peripartal period in the ewes. **Immunopharmacol. Immunotoxicol**, v. 30, n. 4, p. 741-746, 2008.

SEVANION, A.; DAVIES, K.J.; HOCHSTEIN, P. Serum urate as an antioxidant for ascorbic acid. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 54, p. 1129–1134, 1991.

SOCHOR, J.; RYVOLOVA, M.; KRYSTOFOVA, O.; SALAS, P.; HUBALEK, J.; ADAM, V.; TRNKOVA, L.; HAVEL, L.; BEKLOVA, M.; ZEHNALÉK, J.; PROVAZNIK, I.; KIZEK, R. Fully automated spectrometric protocols for determination of antioxidant activity: advantages and disadvantages. **Mol.**, v. 15, n. 12, p. 8618-8640, 2010.

YOUNG, I.S.; WOODSIDE, J.V. Antioxidants in health and disease. **J. Clin. Pathol.**, v. 54, p. 176–186, 2001.