VOLTAMETRIA CÍCLICA E DE PULSO DIFERENCIAL NA DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO ASCÓRBICO E STATUS REDOX SÉRICO DE CÃES

TÂNIA Z. MILTENBURG[1], BRUNA P. NETO[5], FERNANDO R. DE CARVALHO[4], ROSANA L. SERNAGLIA[4], GUILHERME L. Q. DA COSTA[2], EDUARDO H. ZAMPIERI[2], RICARDO S. VASCONCELLOS[3].

[1]Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, UEM; email: taniazoia@hotmail.com; [2]Alunos do curso de graduação em Química, DQI/UEM; [3]Professor do curso de Zootecnia, PPZ/UEM, Maringá – PR; [4]Professores do curso de Química, DQI/UEM, Maringá – PR; [5]Doutora em Zootecnia – Vaccinar Nutrição e Saúde.

Resumo: Objetivou-se avaliar as técnicas de voltametria cíclica (VC) e de pulso diferencial (VPD) para mensurar as concentrações de ácido ascórbico (AA) e determinar a capacidade antioxidante em soro sanguíneo canino, como possíveis técnicas no estudo com antioxidante nesta espécie. As determinações de ácido ascórbico (colorimetria) e capacidade antioxidante (kit comercial) por métodos já validados foram usadas como referência. Para tal foram submetidos soros de sete cães adultos à determinação dos voltamogramas pelo método da adição padrão. As concentrações de AA foram de 10,9 ± 2,4 µM, 12,8 ± 1,3 µM e 11,9 ± 2,5 para VC, VPD e colorimetria, respectivamente, não sendo observadas diferenças estatísticas entre os métodos, entretanto a VPD se mostrou mais sensível. O 3° pico do AA para a VPD se correlaciona com a concentração de ácido úrico e capacidade antioxidante total, demonstrando o potencial de utilização da técnica em soro sanguíneo canino.
Palavras–chave: capacidade antioxidante total; ácido ascórbico; metodologia.

Cyclic and differential pulse voltammetry to determine the ascorbic acid concentration and the redox status of the blood serum in dogs

Abstrat: The aim of this study was to evaluate the cyclic voltammetry (CV) and differential pulse (DPV) to measure the concentrations of ascorbic acid (AA) and total antioxidant capacity (TAC) in canine blood serum. Validated methods to determine AA (colorimetry) and TAC (commercial kit) were used as reference to evaluate the accuracy of voltammetry technique. Samples of blood serum from seven adult dogs were submitted to the analysis of voltammograms by standard addition method. AA concentrations were 10.9 ± 2.4 mM, 12.8 ± 1.3 and 11.9 ± 2.5 mM for CV, DPV and colorimetry, respectively. No differences between the methods were observed, however the DPV was more sensitive and therefore more suitable. The third peak AA for DPV correlates with the concentration of uric acid and TAC demonstrating the potential use of the technique in canine serum.
Keywords: antioxidant capacity; ascorbic acid; metodology.

Introdução: O ácido ascórbico e úrico são os principais antioxidantes de baixo peso molecular (ABPM) nos fluídos corporais, os quais contribuem com a manutenção do estado redox e consequentemente melhoram a capacidade antioxidante do organismo. Existem diferentes métodos descritos na literatura para medir a capacidade antioxidante, entretanto, todos apresentam limitações, sendo constante a busca por metodologias alternativas. Como os ABPM possuem eletroatividade, estes podem ser mensurados por métodos eletroquímicos como a voltametria de pulso diferencial (VPD) e a voltametria cíclica (VC), métodos amplamente usados em química analítica (Chevion et al., 1997) e já padronizados para humanos (Passos, 2009). Tendo isto em vista, objetivou-se caracterizar o comportamento voltamétrico do soro de cães, por VC e VPD e sua relação com as concentrações de ácido ascórbico e CAT.

Materiais e métodos: Primeiramente, foi caracterizado e padronizado os melhores parâmetros analíticos para a quantificação de AA em soro sanguíneo de cães. Para tal foram coletados 20 mL de sangue de sete animais, entre 1-4 anos de idade, submetidos ao jejum de 12 horas. O sangue foi centrifugado á 3500 rpm por 10 minutos e o soro armazenado à 20°C. As amostras foram descongeladas e diluídas em tampão fosfato pH 7,4 na proporção de 1:2,5 e posteriormente analisadas por VC ou VPD, empregando-se um potenciostato com três eletrodos, acoplado ao microcomputador. A faixa de potencial aplicado foi de -300mV à +1000mV, em uma taxa de leitura de 100 mV/s. Para todas as

análises voltamétricas foram determinados o potencial de pico anódico e o valor da corrente de pico anódica, calculados conforme Chevion et al. (1997) e Passos (2009). Com base nos resultados obtidos nesta etapa, para VC ou VPD, foram realizadas as adições de AA (100µM, 200µM, 400µM, 600µM e 800µM) por meio da técnica de adição do padrão. Para o cálculo das concentrações de AA pelo método da adição do padrão, procedeu-se a análise de regressão linear da corrente anódica (Ia) em função das concentrações adicionadas de AA, corrigindo-se o pico pela subtração do Ia da amostra de soro inicialmente na célula voltamétrica. Posteriormente o valor de Ia da amostra de soro foi substituído na equação gerada para se obter a concentração de AA no soro. Para avaliar-se os resultados obtidos pela VC e VPD, amostras de soro dos animais também foram analisadas pelo método colorimétrico convencional e capacidade antioxidante total (Antioxidant Assay Kit, CS0790, Sigma, São Paulo, Brasil), os quais serviram como referência.

Resultados e Discussão: Para as análises de VC e VPD foi possível verificar dois e três picos de oxidação de componentes séricos, respectivamente. O segundo pico para a VC (662 ± 49 mV) e o terceiro da VPD (661 ± 131 mV) representam a concentração de AA. As concentrações de AA no soro sanguíneo foram de 10,9 ± 2,4 µM, 12,8 ± 1,3 µM e 11,9 ± 2,5 para VC, VPD e colorimetria, respectivamente. Não foi observada diferença estatística (P>0,05) entre os métodos utilizados, indicando que a voltametria pode ser empregada para análise de AA em soro sanguíneo de cães. Contudo, a VPD (Figura 1a) apresentou resultados mais consistentes e picos mais elevados comparativamente à VC (Figura 1b), demonstrando ser uma técnica mais sensível. As concentrações de AA verificadas neste estudo em cães correspondem aos valores descritos na literatura, próximos de 15 µM (Scott et al., 2002).

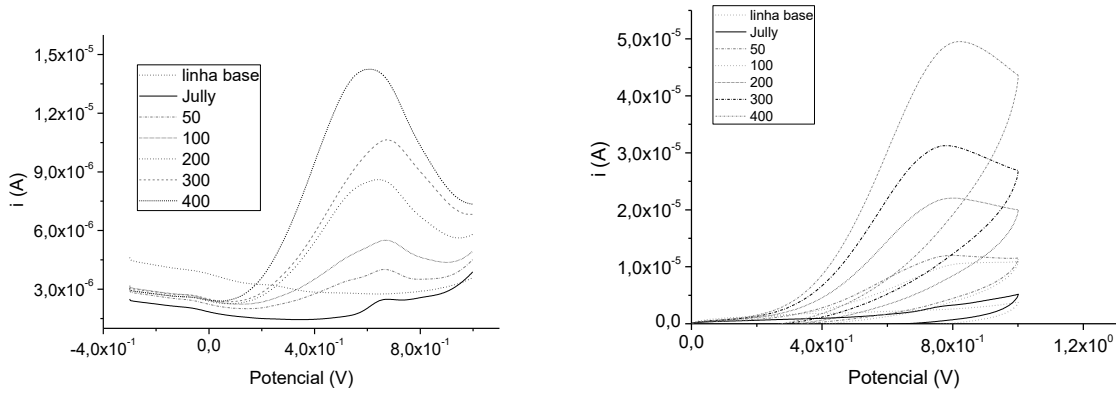


Figura 1. Voltamograma de pulso diferencial (a) e cíclico (b) de soro de cão mediante adições de diferentes concentrações de ácido ascórbico (método da adição do padrão).

Apesar dos resultados favoráveis é conhecido que o ácido úrico é outro composto ABPM que pode interferir nesta análise, por apresentar potencial de pico semelhante. O terceiro pico da VPD apresentou coeficiente de correlação de 0,96 e 0,84 para as concentrações de AA e ácido úrico, respectivamente, dificultando a análise separada destes compostos pelas técnicas voltamétricas em fluidos biológicos. Diferente do esperado, neste estudo não houve boa correlação entre os picos de VPD e VC com a capacidade antioxidante dos animais, determinada pelo kit comercial de referência.

Conclusões: A VC e VPD são técnicas rápidas e de baixo custo, que podem ser utilizadas para determinar as concentrações de ácido ascórbico no soro sanguíneo de cães, porém, ainda necessitam validação.

Referências Bibliográficas: CHEVION, S.; BERRY, E.M.; KITROSSKI, N.; et al. Free Radical Biology & Medicine v.22, p.411-21, 1997.
PASSOS, M.A. Dissertação..., Universidade de Campinas (UNICAMP), Campinas-SP, 2009, 77p.
SCOTT, K.C.; HILL, R. C.; LEWIS, D. D.; et al. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition. v.8, p.222-228, 2002.