

Procedimento simples para a determinação da capacidade antioxidante de amostras de líquido folicular utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu

Carolina B. Aquino (IC), Aline A. dos Santos (PG), Caio P. Barbosa (PQ) e Horacio D. Moya (PQ)*.

Faculdade de Medicina da Fundação do ABC – CEPES (Centro de Estudos, Pesquisa, Prevenção e Tratamento em Saúde) – CEP – 09060-650 – Santo André – SP. horacio.moya@fmabc.br

Palavras Chave: líquido folicular, capacidade antioxidante, espectrofotometria, Folin-Ciocalteu.

Introdução

Há poucos métodos colorimétricos para a quantificação da capacidade antioxidante total (CAT) de amostras de líquido folicular (LF) humano, o qual envolve e nutre o oócito. Entre estes destacam-se o uso da reação do complexo Fe^{2+} /o-dianisidina com H_2O_2 ¹, e da redução Fe^{3+} em meio de TPTZ, originalmente desenvolvido para plasma².

O Reagente de Folin Ciocalteu (RFC) é uma mistura de Na_2WO_4 e $H_3PMO_{12}O_{40}$ utilizado em meio alcalino (Na_2CO_3 a 10%) e foi inicialmente usado para quantificar aminoácidos em proteínas³.

No presente trabalho avaliaram-se dois métodos de cálculo para um procedimento simples para a quantificação da CAT em amostras de LF utilizando o RFC, ainda não utilizado para essa finalidade.

Resultados e Discussão

As amostras de LF foram fornecidas pelo Instituto Idéia Fértil da FMABC com estradiol quantificado por imunoensaio (Vidas Estradiol II - Biomerieux®)⁴.

RFC foi preparado conforme a Farmacopéia Brasileira (FB)⁵. Solução de ácido ascórbico (AA) 176 mg/dL foi utilizado como padrão e os resultados expressos em mg AA/dL LF.

Primeiramente usou-se o método de adição de padrão (AP). Curvas de calibração (CC) de AA foram obtidas transferindo-se alíquotas (100-450 μ L) da solução diluída de AA 17,6 mg/dL para 7 balões volumétricos de 5,0 mL contendo 200 μ L de RFC e completados com Na_2CO_3 (10%). Medições de absorbância em 715 nm (A_{715nm}) foram efetuadas após 30 min usando água como referência. Nas análises das amostras, 100 μ L de LF foram transferidos para outros 4 para balões e a partir do 2º balão adicionaram-se 100, 150 e 200 μ L da solução de AA 17,6 mg/dL. Para construção da curva de AP, após adição de 200 μ L de RFC e Na_2CO_3 (10%), foi efetuado o mesmo procedimento descrito na obtenção da CC de AA. Valores de CAT foram obtidos com a equação $(a \times \sqrt{b} \times 100) / (b \times \sqrt{a})$, onde a e b são os coeficientes linear e angular da curva de AP, \sqrt{b} e \sqrt{a} são os volumes (em mL) do balão volumétrico e da amostra, respectivamente.

No 2º método de cálculo, mais simples, usou-se a interpolação gráfica (IG) dos valores de A_{715nm} das

amostras de LF na equação da reta ($A_{715nm} = 0,0343 + 0,529.x$; $n=8$, $r=0,998$) de uma típica CC de AA para uma faixa linear de 0,35 -1,59 mg/dL.

Apesar do número de amostras analisadas ($n=10$) verifica-se correlação positiva (Pearson's $r=0,918$) entre os valores obtidos com o método de AP e IG (Tabela I), indicando que último também pode ser usado para calcular a CAT. Demonstrou-se que níveis elevados de estradiol estão relacionados à infertilidade, mas nas amostras analisadas a CAT não apresentou relação com o teor de estradiol.

Tabela I. CAT com RFC de amostras de LF.

AP	IG	Estradiol
23.1 ± 1.1	22.3	884
22.2 ± 2.1	21.0	514
18.1 ± 0.5	19,5	506
23.4 ± 1.2	20.9	373
21.5 ± 1.5	21.4	310
26.8 ± 4.8	23.0	598
20.5 ± 3,8	22.3	708
25.3 ± 1.0	23.2	371
28.9 ± 3.7	26.0	545
26.3 ± 1.4	22.4	176

AP (adição de padrão; média e desvio padrão de três amostras) e IG (interpolação gráfica) expressos em mg AA/dL. Estradiol (valor médio de três folículos) expresso em pg/mL.

Conclusões

Os procedimentos e os métodos de cálculo aqui sugeridos podem ser uma alternativa simples para quantificar a CAT de amostras de LF.

Agradecimentos

FAPESP e PIBIC/CNPq.

¹ Velthut, A. *et al.* Elevated blood plasma antioxidant status is favourable for achieving IVF/ICSI pregnancy. *Reproductive BioMedicine Online*, 26, 345- 352, 2013.

² Oyawoye, O. *et al.* Antioxidants and reactive oxygen species in follicular fluid of women undergoing IVF: relationship to outcome. *Human Reproduction*. 18 (11), 2270-2274, 2003.

³ Folin, O.; Ciocalteu, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *J. Biol. Chem.*, 627-649, 1927.

⁴ Anckaert, Ellen *et al.* Clinical validation of a fully automated 17 β -estradiol and progesterone assay (VIDAS) for use in monitoring assisted reproduction treatment. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 40, (8), 824-831, 2002.

⁵ Farmacopéia Brasileira, 5ª. ed., V.II, Brasília, ANVISA, 355-7, 2010.