

## ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E DE NITROGÊNIO, ANTIOXIDANTES E MARCADORES DE DANO OXIDATIVO EM SANGUE HUMANO: PRINCIPAIS MÉTODOS ANALÍTICOS PARA SUA DETERMINAÇÃO

**Sandra Mary Lima Vasconcelos**

Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Alagoas, Tabuleiro do Martins, 57072-970 Maceió - AL, Brasil

**Marília Oliveira Fonseca Goulart\***

Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Tabuleiro do Martins, 57072-970 Maceió - AL, Brasil

**José Benedito de França Moura**

Hospital Universitário, Universidade Federal de Alagoas, Tabuleiro do Martins, 57072-900 Maceió - AL, Brasil

**Vanusa Manfredini e Mara da Silveira Benfato**

Departamento de Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, 91501-970

Porto Alegre - RS, Brasil

**Lauro Tatsuo Kubota**

Departamento de Química Analítica, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, CP 6154, 13084-971

Campinas - SP, Brasil

Recebido em 1/2/06; aceito em 9/1/07; publicado na web em 2/7/07

REACTIVE OXYGEN AND NITROGEN SPECIES, ANTIOXIDANTS AND MARKERS OF OXIDATIVE DAMAGE IN HUMAN BLOOD: MAIN ANALYTICAL METHODS FOR THEIR DETERMINATION. We review here the chemistry of reactive oxygen and nitrogen species, their biological sources and targets; particularly, biomolecules implicated in the redox balance of the human blood, and appraise the analytical methods available for their detection and quantification. Those biomolecules are represented by the enzymatic antioxidant defense machinery, whereas coadjutant reducing protection is provided by several low molecular weight molecules. Biomolecules can be injured by RONS yielding a large repertoire of oxidized products, some of which can be taken as biomarkers of oxidative damage. Their reliable determination is of utmost interest for their potentiality in diagnosis, prevention and treatment of maladies.

Keywords: biomarkers of oxidative stress; oxidative and nitrosative stress; antioxidants.

### INTRODUÇÃO

O balanço redox em líquidos biológicos, organelas, células ou tecidos é determinado pela presença de pares redox responsáveis pelo fluxo de elétrons. Esses sofrem freqüentes interconversões entre o estado reduzido e o oxidado. Alguns desses pares redox são interligados ("redox cycling"), outros constituem sistemas redox independentes. O balanço redox, na célula, relaciona-se à soma dos produtos do potencial de redução e da capacidade redutora de uma série de pares redox, acoplados, presentes. A capacidade redutora pode ser estimada pela determinação da concentração de espécies reduzidas em um par redox e, o potencial de redução, pelo emprego da Equação de Nernst<sup>1</sup>. Em termos matemáticos, isto pode ser representado por:

$$\text{Balanço redox} = \sum_{i=1}^{n(\text{acoplados})} E_i \times [\text{espécies reduzidas}]_i$$

onde  $E_i$  é o potencial de redução da semi-célula para um dado par redox e  $[\text{espécie reduzida}]_i$  é a concentração das espécies reduzidas em um par redox.

Mudanças no balanço redox de sistemas biológicos podem causar o estresse oxidativo<sup>1</sup>. A intensidade e patogenicidade destes desequilíbrios vão depender, naturalmente, das concentrações locais de espécies pró e antioxidantes, das constantes de velocidade

de reação com moléculas-alvo e da compartimentalização celular destes processos, em que fatores de solubilidade e difusibilidade são determinantes<sup>2</sup>.

### ESTRESSE OXIDATIVO

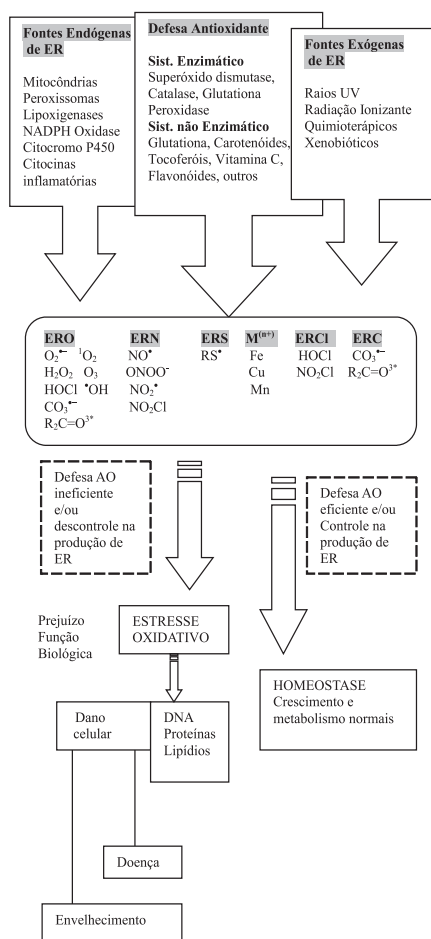
A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), de nitrogênio (ERN), entre outras espécies reativas, é parte integrante do metabolismo humano e é observada em diversas condições fisiológicas. ERO e ERN têm importante função biológica, como na fagocitose, fenômeno em que essas espécies são produzidas para eliminar o agente agressor. Por outro lado, quando sua produção é exacerbada, o organismo dispõe de um eficiente sistema antioxidante que consegue controlar e restabelecer o equilíbrio. O estresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante<sup>1,3</sup>, com predomínio dos oxidantes, com dano conseqüente (Figura 1). A célula, unidade da vida, é uma verdadeira usina de pró e antioxidantes (Figura 2).

A Tabela 1 traz um resumo da natureza das principais espécies, de sua geração e destino.

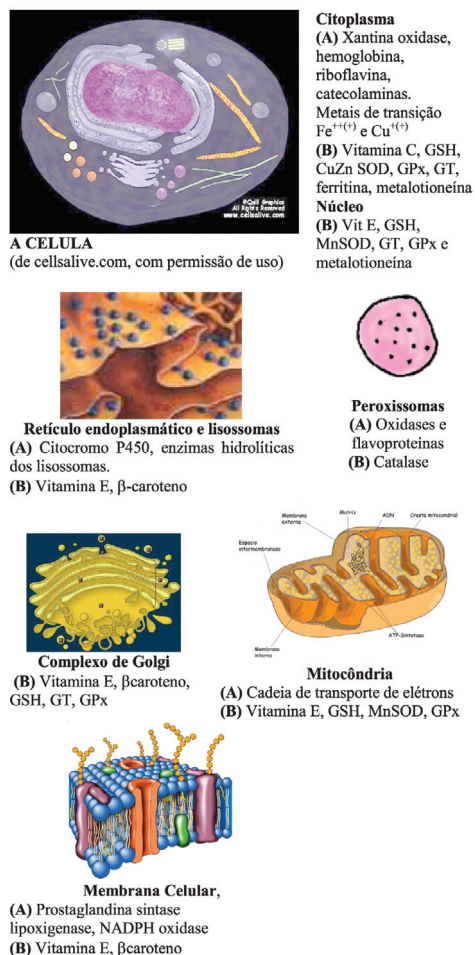
### AÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS SOBRE MACROMOLÉCULAS

Em sistemas biológicos, a membrana celular constitui um dos focos de atuação de ERO, de ERN e de outras espécies reativas (Figura 1, Tabela 1) e sua função é vital para a célula (Figura 2). Além da membrana que envolve a célula, as membranas das

\*e-mail: mofg@qui.ufal.br



**Figura 1.** Fontes e respostas celulares às Espécies Reativas (ER) de Oxigênio (ERO), de Nitrogênio (ERN), derivados de Enxofre (ERS), de Cloro (ERCl), de carbono (ERC) e metais de transição [M<sup>n+</sup>]. Oxidantes são gerados do metabolismo normal como na mitocôndria, em peroxissomas e em uma variedade de enzimas citosólicas. Existem diversas fontes exógenas de produção de ER. Os sistemas de defesa antioxidante enzimático e não enzimático, quando eficientes, mantêm a homeostase fisiológica e quando estão ineficientes, permitem a instalação do estresse oxidativo, representado pelo dano celular em macromoléculas como o DNA, proteínas e lipídios, que se expressam clinicamente como envelhecimento ou doença. Adaptado da ref. 3



**Figura 2.** A célula como fonte de espécies reativas (ER). (A) Fontes celulares de ERO, ERN e outras, por ação de várias enzimas. A capacidade de uma via específica produzir ER varia com o tipo de célula e com o dano em curso; p. ex., na fagocitose, as NADPH oxidases da membrana de neutrófilos e macrófagos são particularmente ativadas e reduzem O<sub>2</sub> a O<sub>2</sub><sup>·-</sup>; a partir de um “burst” respiratório necessário para eliminar o agente agressor. (B) Distribuição dos antioxidantes, enzimas de desintoxicação e proteínas de ligação a metais de transição que compreendem o sistema de defesa dentro das membranas e organelas celulares

**Tabela 1.** Natureza, geração e destino de espécies radicalares (ou seus intermediários) biologicamente importantes

Espécies derivadas do oxigênio	
Ânion-radical superóxido O <sub>2</sub> <sup>·-</sup>	Gerado continuamente por diversos processos celulares (cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, no microsomo, através enzimas como xantina oxidase e NADPH oxidase), ou pela redução monoelétrica de O <sub>2</sub> . Rapidamente desaparece em solução aquosa por reação de dismutação: $O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$ Em solução aquosa é um forte agente redutor. Sua habilidade em reduzir Fe <sup>3+</sup> a Fe <sup>2+</sup> pode acelerar a reação de Fenton: $O_2^{\cdot-} + Fe^{3+} \longrightarrow Fe^{2+} + O_2$ Em solução aquosa é um oxidante fraco, porém pode formar ERN: $O_2^{\cdot-} + NO \longrightarrow ONOO^{\cdot-}$ É permeável a membranas. Em fagócitos, como neutrófilos e macrófagos, é um dos microbicidas mais importantes.
Peróxido de hidrogênio H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Intermediário formado pela reação de dismutação de O <sub>2</sub> <sup>·-</sup> catalisada pela enzima SOD, pela redução de 2 e <sup>-</sup> na molécula de O <sub>2</sub> e pela ação de diversas enzimas oxidases <i>in vivo</i> , localizadas nos peroxissomas. É muito difusível dentro e entre as células <i>in vivo</i> . É um fraco agente oxidante e um fraco agente redutor, reage lentamente com tióis, com sais de ferro e cobre reduzidos, com proteínas heme e peroxidases para iniciar reações radicalares e peroxidações lipídicas. Em presença de metal de transição gera $^{\cdot}OH$ , através da reação de Fenton $Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + ^{\cdot}OH + ^{\cdot}OH$

**Tabela 1.** continuação

Radical hidroxila $\cdot\text{OH}$	É o mais reativo e mais lesivo radical conhecido e para o qual, uma vez formado, o organismo humano não dispõe de mecanismo de defesa, reage com uma série de endobióticos, causa modificação no DNA (com modificação das bases e quebras das fitas), danos nas proteínas e inativação enzimática, peroxidação lipídica. Âmbito limitado de ação (poucos diâmetros moleculares).
Radicais peroxila ( $\text{RO}_2\cdot$ ) alcoxila( $\text{RO}\cdot$ )	Formados durante a decomposição de peróxidos orgânicos e reações de carbono radicalar com oxigênio, como na peroxidação lipídica.
Oxigênio singlete $^1\text{O}_2^*$	Estado eletronicamente excitado do oxigênio, produzido por reações fotoquímicas ou por outras radiações; reage com um grande número de moléculas biológicas, incluindo lipídeos da membrana, iniciando processos de peroxidação. $^1\text{O}_2^*$ pode ser gerado, entre outras reações, por transferência de energia a partir de um sensibilizador S, no estado excitado tripleto ( $^3\text{S}^*$ ) (porfirinas, clorofila e riboflavina) para o oxigênio. O sensibilizador S absorve energia e deixa o estado fundamental singlete (S), passando para o estado excitado singlete ( $^1\text{S}^*$ ), a partir do qual é convertido, por cruzamento intersistema, para o estado excitado tripleto. ( $^3\text{S}^*$ ): $\text{S} \longrightarrow ^1\text{S}^* \longrightarrow ^3\text{S}^*$ ; $^3\text{S}^* + ^3\text{O}_2^* \longrightarrow \text{S} + ^1\text{O}_2^*$
Ozônio $\text{O}_3$	Produzido no ar atmosférico poluído e por fonte de luz intensa de algumas fotocopiadoras e outros equipamentos. É extremamente danoso ao pulmão, oxidando rapidamente proteínas, DNA e lipídeos.
Espécies derivadas do nitrogênio e cloro	
Ácido hipocloroso $\text{HOCl}$	Espécie não radicalar, membrana-permeável, oxida um grande número de compostos biológicos, como tióis e tioéteres, amins, fenóis e ligações insaturadas, mais seletivo que o radical hidroxila, oxida ferro e proteínas. Produzido por fagócitos ativados, reage com $\text{O}_2^{\cdot-}$ para formar $\cdot\text{OH}$ $\text{HOCl} + \text{O}_2^{\cdot-} \longrightarrow \cdot\text{OH} + \cdot\text{OH} + \text{O}_2$ É produzido no miocárdio, como resultado de invasão de células inflamatórias.
Óxido nítrico ou monóxido de nitrogênio $\text{NO}\cdot$	Sintetizado nos organismos vivos pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), que converte o aminoácido L-arginina a $\text{NO}\cdot + \text{L-citrulina}$ (outro aminoácido). É um radical abundante que age em uma variedade de processos biológicos, incluindo relaxação muscular, neurotransmissão e regulação imune. Originalmente identificado como fator relaxante derivado do endotélio (“endothelium-derived relaxing factor”: EDRF) é um potente vasodilatador, envolvido na regulação da pressão arterial. Difunde-se rapidamente entre e dentro das células. Quando exposto ao ar, reage com oxigênio para formar $\text{NO}_2\cdot$ . $2\text{NO}\cdot + \text{O}_2 \longrightarrow 2\text{NO}_2\cdot$ . Reage rapidamente com $\text{O}_2^{\cdot-}$ e produz o intermediário $\text{ONOO}^-$ $\text{O}_2^{\cdot-} + \text{NO}\cdot \longrightarrow \text{ONOO}^-$
Dióxido de nitrogênio $\text{NO}_2\cdot$	Formado a partir da exposição de $\text{NO}\cdot$ ao ar ou da protonação de peroxinitrito $2\text{NO}\cdot + \text{O}_2 \longrightarrow 2\text{NO}_2\cdot$ Potente iniciador da peroxidação lipídica em fluidos biológicos.
Cloreto de nitrila $\text{NO}_2\text{Cl}$	Formado a partir de misturas de $\text{NO}_2\cdot$ e $\text{HOCl}$ . Oxidante, agente de cloração e de nitratação, pode inibir fosforilação dependente de quinase de resíduos de tirosina, provoca a cloração de resíduos de tirosina (3-clorotirosina é considerada biomarcador).
Peroxinitrito $\text{ONOO}^-$	Intermediário formado pela reação $\text{O}_2^{\cdot-} + \text{NO}\cdot \longrightarrow \text{ONOO}^-$ Instável, tempo de vida curto, oxidante potente, propriedades semelhantes ao radical hidroxila, causa danos a muitas moléculas biológicas, inclusive a grupos S-H das proteínas, provoca hidroxilação e nitratação de compostos aromáticos. Forma $\cdot\text{OH}$ independente da presença de metal de transição $\text{ONOO}^- + \text{H}^+ \longrightarrow \cdot\text{OH} + \text{NO}_2$ Após protonação, rearranja-se para nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e interage com bicarbonato ( $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ ), com alteração de sua reatividade. $\text{ONOOH} \rightleftharpoons [\cdot\text{NO}_2 \cdot\text{OH}] \longrightarrow \text{NO}_3^-$ Em presença de $\text{CO}_2$ , o peroxinitrito forma o peroxycarboxilato nitroso, que rapidamente se decompõe, segundo as etapas 1 e 2. O $\text{CO}_2$ está presente em elevada concentração no compartimento intra e extracelular, o que favorece a formação do $\text{CO}_3^{\cdot-}$ , em presença de $\text{ONOO}^-$ . $\text{ONOO}^- + \text{CO}_2 \longrightarrow \text{ONOOCO}_2^- \longrightarrow \text{NO}_2\text{OCO}_2^-$ (1) $\text{NO}_2\text{OCO}_2^- \longrightarrow \text{NO}_3^- + \text{CO}_2$ (65%) (2) $\text{NO}_2\text{OCO}_2^- \longrightarrow \text{NO}_2 + \text{CO}_3^{\cdot-}$ (35%) O ânion radical carbonato formado é mediador de diversas reações de oxidação e nitratação
Cloraminas	Oxidantes mais suaves e de vida mais longa que $\text{HOCl}$ , reagem com tióis, tioéteres e centros metálicos de ferro. Toxicidade variável, dependendo da polaridade e da permeabilidade da membrana. Cloraminas de $\alpha$ -aminoácidos sofrem degradação para aldeídos potencialmente tóxicos

**Tabela 1.** continuação

Espécies derivadas do enxofre	
Radical tiíla RS <sup>•</sup>	Denominação genérica para um grupo de radicais com o elétron desemparelhado residindo no enxofre. Formado quando um grupo tiol (RSH) reage com uma espécie radicalar ( <sup>•</sup> C, <sup>•</sup> OH, RO <sup>•</sup> , RO <sub>2</sub> <sup>•</sup> , O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> , NO <sub>2</sub> <sup>•</sup> ou com metais de transição).
Miscelâneos e metais	
Fe, Cu, Mn, etc	Catalisam reações de radicais livres. Fe <sup>2+</sup> em presença de O <sub>2</sub> gera O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> que, por sua vez, pode reduzir Fe <sup>3+</sup> a Fe <sup>2+</sup> Fe <sup>2+</sup> + O <sub>2</sub> → Fe <sup>3+</sup> + O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> Fe <sup>2+</sup> em presença de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> gera <sup>•</sup> OH (reação de Fenton) Fe <sup>2+</sup> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> → Fe <sup>3+</sup> + OH <sup>-</sup> + <sup>•</sup> OH Fe <sup>3+</sup> em presença de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> gera O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>

organelas intracelulares, tais como mitocôndria, retículo endoplasmático, núcleo etc., apresentam uma estrutura bilipídica e uma variedade de proteínas e açúcares<sup>4,5</sup> (Figura 2). O dano celular resulta basicamente de ataque de ERO e ERN sobre as macromoléculas, tais como açúcares (CHOH)<sub>n</sub>, DNA, proteínas e lipídios, conforme mostrado na Tabela 2.

Há fortes evidências de que o estresse oxidativo tem importância capital nos processos de envelhecimento, transformação e morte celular, com conseqüências diretas em muitos processos patológicos, entre eles, a indução do câncer e a propagação de AIDS em pacientes soropositivos (HIV<sup>+</sup>), bem como na fisiopatologia de muitas doenças crônicas, entre elas, doenças auto-imunes, cardiopatias, câncer, doenças do pulmão, intoxicação por xenobióticos e muitas outras (Tabela 3)<sup>6-10</sup>. Por outro lado, é também fato reconhecido que ERO e ERN desempenham papéis fisiológicos importantes como o controle da pressão sanguínea, na sinalização celular, na apoptose, na fagocitose de agentes patogênicos, na fertilização de ovos e no amadurecimento de frutos. Esse tópico será reavaliado no final deste artigo.

O reconhecimento dessa relação estimulou o desenvolvimento

de estudos de marcadores de dano oxidativo e de substâncias antioxidantes em sistemas biológicos.

## BIOMARCADORES

Segundo Zwart e colaboradores<sup>8</sup> e LaBaer<sup>11</sup>, os biomarcadores têm características passíveis de avaliação e mensuração, como indicadoras de processos biológicos normais, processos patogênicos ou de resposta farmacológica a uma intervenção terapêutica. Como tal, refletiriam mudanças em sistemas biológicos relacionadas à exposição ou aos efeitos de xenobióticos, ou outros tipos de fatores (aqui incluímos aqueles relacionados a doenças). Eles podem ser classificados, segundo os mesmos autores<sup>8,11</sup>, como biomarcadores: de exposição, de efeito e de susceptibilidade. O biomarcador ideal deve reunir as seguintes características: mostrar alta especificidade para o efeito de interesse; refletir o efeito desde o início; ser passível de determinação e análise fáceis e de baixo custo; ser analisado por técnica não invasiva, de alta sensibilidade, no fluido biológico escolhido. Deve existir uma relação bem estabelecida entre a concentração do biomarcador e a exposição ao agen-

**Tabela 2.** Atuação das principais espécies radicalares (ou seus intermediários) sobre endobióticos

Endobiótico	Sumário das reações mais importantes
Açúcares (CHOH) <sub>n</sub>	<sup>•</sup> OH reage com (CHOH) <sub>n</sub> por abstração randomizada de um átomo de H de um dos átomos de C, produzindo um radical centrado no carbono. Isto leva à quebra da cadeia de importantes moléculas, tais como o ácido hialurônico.
Ácidos nucleicos	ERO, principalmente <sup>•</sup> OH, ataca o açúcar desoxirribose (principalmente em 4' e/ou 5') e as bases purínicas (adenina e guanina) e pirimidínicas (timina, citosina e uracila), com ataque preferencial à guanina, gerando 8-hidroxi- ou 8-oxoguanina <sup>5</sup> , mutagênicas. Como resultado, ocorre a quebra da cadeia do DNA, a ligação cruzada entre as fitas e modificações nas suas bases levando a mutações e apoptose.
Proteínas	As proteínas têm muitos sítios reativos <sup>5</sup> . Durante o estresse oxidativo, o primeiro evento é a formação de um radical centrado no carbono, por extração de H <sup>•</sup> do carbono α, em uma ligação peptídica, daí, ocorre fragmentação das cadeias e oxidação de quase todos os tipos de aminoácidos, com produção freqüente de compostos carbonilados, particularmente a partir de prolina, arginina e lisina (Figura 8). Essa modificação (conteúdo em proteínas carboniladas) é facilmente mensurável. Adicionalmente, proteínas podem conter sítios de ligação com metais que são especialmente susceptíveis a reações reversíveis de oxidação e redução, as quais podem produzir uma seqüência de sinais que podem ser reconhecidos por proteases celulares específicas que degradam tais proteínas. Muitas proteínas intracelulares têm grupos sulfidríla reativos em resíduos de cisteína, que podem ser oxidados a dissulfeto ou ácidos cistéicos, que podem ser novamente reduzidos metabolicamente. Similarmente, muitas proteínas têm um aminoácido metionina que pode sofrer modificação reversível a sulfóxido ou sulfona. Os aminoácidos aromáticos formam quinurenina, grupos catecólicos e polímeros. Há formação de produtos de adição com peróxidos lipídicos e com hidroxialdeídos derivados de lipídeos insaturados.

**Tabela 2.** continuação

Endobiótico	Sumário das reações mais importantes
Lipídeos	A peroxidação lipídica é causada pelo ataque de uma ER (geralmente $\cdot\text{OH}$ ), que abstrai um átomo de hidrogênio ( $\text{H}^{\cdot}$ ) de um grupo metileno alílico, normalmente, de um ácido graxo poli-insaturado, deixando um elétron desemparelhado no carbono, caracterizando a etapa de iniciação. Este radical é usualmente estabilizado por rearranjo molecular, formando um dieno conjugado. Sob condições aeróbicas, o carbono radicalar do dieno conjugado reage com $\text{O}_2$ (que é uma molécula hidrofóbica e, portanto, se concentra no interior das membranas) e forma o radical peroxila. Este radical peroxila é capaz de abstrair $\text{H}^{\cdot}$ de moléculas de lipídeos adjacentes, cujo carbono radicalar sofre novo rearranjo, reage com $\text{O}_2$ e forma outro radical peroxila e assim sucessivamente, caracterizando a reação em cadeia da etapa de propagação. O radical peroxila combina-se com o $\text{H}^{\cdot}$ abstraído, gerando o lipídeo hidroperóxido (LOOH) que ao sofrer quebra, forma aldeídos como malonaldeído e 4-hidroxinonaldeído, entre outros. Na decomposição dos hidroperóxidos lipídicos são gerados radicais peroxila e alcóxila através da reação de Fenton. A terceira e última etapa da peroxidação lipídica, a etapa de terminação instala-se com a neutralização dos radicais formados por ação de antioxidantes lipossolúveis ( $\alpha$ -tocoferol, $\beta$ -caroteno, $\text{NO}^{\cdot}$ ) ou pela reação de dois radicais lipídicos formando produtos não radicalares. Nos sistemas biológicos, a peroxidação lipídica pode ocorrer por via enzimática (ciclooxigenases e peroxidases) e por via não enzimática (auto-oxidação) cujo mecanismo supracitado envolve a participação de espécies reativas de oxigênio, metais e outros radicais livres. Pode ocorrer peroxidação de estruturas supramoleculares, como em fosfolipídeos e em agregados de lipoproteínas <sup>5</sup> . Todas estas modificações oxidativas causam mudanças nas propriedades físicas e químicas das membranas, alterando sua fluidez e permeabilidade, com expansão do líquido intracelular e risco de ruptura das membranas da célula e das organelas, com conseqüente morte celular. Reações envolvendo os vários intermediários entre si levam a novos produtos, por ex., malondialdeído (MDA) reage com o grupo amina de purinas e HNE reage com guanosina, entre outras reações.

**Tabela 3.** Doenças selecionadas, relacionadas ao estresse oxidativo

Doença	Natureza do envolvimento com ER
Aterosclerose, Síndrome de Bloom, Síndrome de Down, Kwa-shiorkor, Doença de Keshan	Falha ou consumo excessivo de defesas antioxidantes.
Doença de Parkinson, estados tóxicos causados por álcool, fumo, $\text{CCl}_4$ etc.	Uso de drogas e toxinas. Na doença de Parkinson as toxinas produzidas estariam envolvidas com a produção de radicais livres.
Doença de Alzheimer, Asma, Artrite reumatóide, asbestose, Síndrome de Insuficiência Respiratória do Adulto	Produção de $\text{O}_2^{\cdot-}$ , $\text{H}_2\text{O}_2$ e $\text{HClO}$ por células fagocíticas ativadas.
Esclerose múltipla	Perturbação estrutural da célula. As hemácias tornam-se mais susceptíveis à ação dos radicais livres.
Doença granulomatosa crônica	Defeito genético no sistema antioxidante.
<i>Diabetes mellitus</i> , anoxia, injúria da reperfusão, pré-eclâmpsia	Oxidação anormal de substratos ou mudanças na concentração de oxigênio.
Hipertensão arterial sistêmica	Produção de $\text{O}_2^{\cdot-}$ por NADPH/NADP oxidase.
Hemocromatose idiopática, talassemia, anemia falciforme, doença de Wilson	Transferência de elétrons ao oxigênio por metais de transição.
Doença granulomatosa crônica, Deficiência de enzimas antioxidantes (Acatlassemia, por ex.)	Defeito genético no sistema antioxidante, especificamente o sistema NADPH oxidase.

te, ao dano induzido e à susceptibilidade pesquisada. A Tabela 4 exemplifica alguns biomarcadores para doenças selecionadas<sup>12</sup>.

É útil ressaltar que a área de biomarcadores se encontra em desenvolvimento exponencial e não há qualquer pretensão, no presente artigo, de esgotá-la em profundidade.

#### ANÁLISE DE BALANÇO REDOX DE UM ORGANISMO EM AMOSTRAS DE SANGUE

No caso de estresse oxidativo, os marcadores de balanço redox, não invasivos, refletiriam o dano causado pelas ERO e ERN sobre o sistema biológico e a eficiência da defesa antioxidante de contrapartida. Tratando-se desses biomarcadores, há um esforço mundial para sua validação multilaboratorial. Trabalhos de colaboração internacional, em andamento, liderados por Kadiiska<sup>13,14</sup>, utilizaram um modelo murino, após injeção intraperitoneal de  $\text{CCl}_4$ , com pes-

quisa de marcadores de balanço redox em sangue, plasma e urina de ratos tratados com esse xenobiótico, segundo protocolos bem estabelecidos<sup>13</sup>.

Neste trabalho, dar-se-á ênfase à caracterização de alguns biomarcadores quantificáveis em sangue humano e às técnicas mais empregadas para sua análise. Vale salientar que outros fluidos biológicos, como urina, saliva, suor e até mesmo o ar expirado, que trariam informações de produtos voláteis de peroxidação lipídica<sup>8</sup>, são também utilizados para análise de biomarcadores de balanço redox; contudo, não fazem parte do escopo dessa revisão.

O sangue total é constituído de elementos figurados que são eritrócitos e leucócitos, soro e plaquetas ou elementos da coagulação. O plasma compõe-se da parte líquida do sangue, separada das células sanguíneas e o soro constitui-se do plasma sem os fatores de coagulação, tais como fibrina<sup>15</sup>.

O sangue humano é uma excelente fonte de marcadores *in vivo*

**Tabela 4.** Biomarcadores de dano oxidativo associado com algumas doenças humanas

Doenças	Biomarcadores de dano
Câncer	MDA, razão GSH/GSSG, NO <sub>2</sub> -Tyr, 8-OH-dG
Doença cardiovascular	HNE, razão GSH/GSSG, acroleína, NO <sub>2</sub> -Tyr, F <sub>2</sub> -isoprostano
Artrite reumatóide	razão GSH/GSSG, F <sub>2</sub> -isoprostano
Doença de Alzheimer	MDA, HNE, razão GSH/GSSG, acroleína, NO <sub>2</sub> -Tyr, F <sub>2</sub> -isoprostano, AGE
Doença de Parkinson	HNE, razão GSH/GSSG, proteínas carboniladas, nível de ferro
Isquemia reperfusão	razão GSH/GSSG, F <sub>2</sub> -isoprostano
Aterosclerose	MDA, HNE, acroleína, NO <sub>2</sub> -Tyr, F <sub>2</sub> -isoprostano, NO <sub>2</sub> -Tyr
Diabetes mellitus	MDA, razão GSH/GSSG, proteínas S-glutationadas, NO <sub>2</sub> -Tyr, F <sub>2</sub> -isoprostano, AGE.

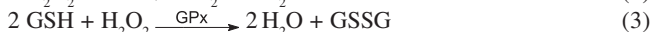
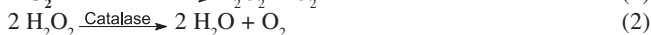
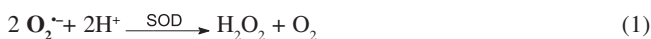
Fonte: Adaptada da ref. 90

de estresse oxidativo, uma vez que nele são transportados e redistribuídos antioxidantes e endobióticos modificados por ação de ERO e ERN. É considerado uma amostra biológica única, potencialmente mais informativa, já que, obtida de um indivíduo, pode descrever seu estado de saúde no momento da coleta<sup>16</sup>. Pode ser obtido em larga escala, com uma quantidade relativamente grande de proteínas (em mg), disponível para estudo de numerosas condições e estados de saúde<sup>17</sup>.

A análise do balanço redox pode ser feita em soro, e/ou plasma e/ou eritrócitos.

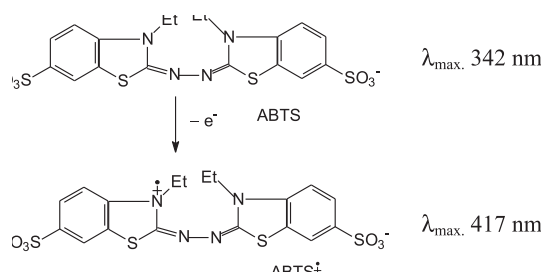
O sistema antioxidante sanguíneo é classificado em enzimático e não enzimático. O enzimático é representado, principalmente, pelas enzimas antioxidantes: a superóxido dismutase (SOD) que catalisa a dismutação do ânion radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) a peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e O<sub>2</sub> (Equação 1), a catalase (CAT) que atua na decomposição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O (Equação 2) e a glutatona peroxidase (GPx), que atua sobre peróxidos em geral, com utilização de glutatona como co-fator (Equação 3).

O sistema antioxidante não enzimático é formado por muitas substâncias, com destaque para a glutatona (GSH), principal composto antioxidante intracelular, tocoferóis, ascorbato, ácido úrico e β-caroteno, além de proteínas de transporte de metais de transição, como a transferrina (transporte do ferro) e ceruloplasmina (transporte do cobre e oxidação do ferro para ser captado pela transferrina)<sup>18</sup>. Os metais de transição são potenciais formadores de espécies reativas através da reação com outros compostos, uma vez que sofrem reações redox. Decorre, daí, a necessidade de serem transportados associados a proteínas, impedindo que essas reações ocorram.



O sistema antioxidante enzimático e a glutatona estão presentes, predominantemente, no meio intracelular (Figura 2), daí a utilização do eritrócito para sua análise. Por outro lado, o sistema antioxidante não enzimático localiza-se, principalmente, no meio extracelular, sendo por isso analisado em plasma e soro. No sangue circulam importantes antioxidantes, a exemplo das vitaminas C, E, β-caroteno etc., bem como biomarcadores do dano causado por ERO e ERN e outros, como malondialdeído (MDA), isopros-

tanos, lipoperóxidos e outros derivados da peroxidação lipídica das membranas celulares.



**Figura 3.** Reação utilizada no ensaio TEAC ou Teste do ABTS. A capacidade antioxidante é determinada a partir da leitura da inibição do cátion radical 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolona-6-sulfonato, sal de diamônio) - ABTS<sup>•+</sup>, produzido nesta reação

As substâncias envolvidas no binômio antioxidante – pró-oxidante caracterizam o ambiente redox biológico (Tabela 5) e podem ser quantificadas associando as técnicas bioquímicas tradicionais de amostragem e determinação espectrofotométrica, técnicas cromatográficas, eletroanalíticas, de ressonância magnética e espectrometria de massas<sup>18-20</sup>. Tal combinação possibilita relacionar o balanço redox avaliado em indivíduos com diferentes aspectos ambientais (poluição urbana, por ex.), demográficos, étnicos, culturais, clínicos e nutricionais, surgindo assim uma importante ferramenta no estudo de fenômenos biológicos vinculados ao estresse oxidativo.

**Tabela 5.** Exemplos de biomarcadores de doenças

Doenças	Exemplos de biomarcadores
Diabetes mellitus	Glicemia, frutosaminas, hemoglobina A1c, avaliação da retina, neuropatia periférica e nefropatia
Hipertensão arterial sistêmica	Níveis pressóricos, angiotensina I e II, aldosterona, renina plasmática, atividade da ECA (Enzima Conversora da Angiotensina)
Artrite reumatóide	Citocinas, leucotrienos
Asma, DPOC (doença pulmonar obstrutiva crônica)	Testes de função pulmonar, citocinas, leucotrienos
Injúria cardiovascular	cTroponina I e T
Doença hepática	ALT (alanina amino-transferase) e γGT (γ-glutamyl-transpeptidase)

Fonte: Adaptada da ref.12

No que se refere aos antioxidantes, alguns autores defendem o estudo da capacidade antioxidante total (CAOT), ao invés de análise de antioxidantes isolados, principalmente devido à interação que existe entre eles no plasma ou soro<sup>20</sup>. Na análise da CAOT, leva-se em conta a ação acumulativa de todos os antioxidantes presentes; obtém-se um parâmetro integrado, capaz de revelar nuances acerca do delicado equilíbrio redox existente *in vivo*. A medida de CAOT auxilia na avaliação dos fatores nutricionais, fisiológicos e ambientais do balanço redox em seres humanos<sup>20</sup>. Por outro lado, a análise de antioxidantes ou marcadores de dano isolados, adequadamente escolhidos, pode facilitar a compreensão de situações específicas como, por ex., a análise de peroxinitrito (ONOO<sup>•</sup>) em doença vascular ou em inflamação associada à leishmaniose. Outro aspecto é a dualidade das informações obtidas: um aumento da CAOT não é, necessariamente, uma condição desejável (p. ex., verificado em pacientes com insuficiência renal crônica), nem indesejável, uma vez que pode ocorrer

rer quando há uma diminuição na produção de ERO e ERN (p. ex., em ratos submetidos à restrição calórica)<sup>21</sup>. O mesmo raciocínio aplica-se a um marcador isolado.

### CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (CAOT)

Os diversos testes propostos na literatura variam quanto ao tipo de radicais gerados, ao indicador de oxidação escolhido e ao método usado para sua detecção e quantificação. São chamados ensaios de capturação (“trap assays”). Em todos esses ensaios, um radical é gerado e reage com moléculas-alvo, para produzir cor, fluorescência, quimioluminescência, perda ou ganho de sinais de ESR (“Electron Spin Resonance” ou Ressonância do Spin Eletrônico) ou outra mudança mensurável. A presença de antioxidantes altera esses sinais, o que permite sua análise quantitativa<sup>18</sup>.

Dentre os testes utilizados, citam-se aqueles conhecidos pelas siglas TRAP, ORAC, FRAP e TEAC<sup>18, 20-33</sup> (Tabela 6). TRAP e ORAC são métodos cuja determinação analítica envolve reações de transferência de átomos de hidrogênio e FRAP e TEAC, transferência de elétrons<sup>27</sup>.

É útil registrar que o decréscimo da CAOT não significa necessariamente que o dano oxidativo ocorreu; pode significar simplesmente que o mecanismo de defesa cumpriu sua função habitual<sup>18</sup>.

### TRAP (“Total Radical - Trapping Antioxidant Parameter”)

O TRAP foi o primeiro ensaio desenvolvido para determinar a CAOT do plasma sanguíneo. O método foi desenvolvido por Wayner *et al.*<sup>25</sup>. Consiste na geração de radicais peroxila (RO<sub>2</sub>·), por decomposição térmica, a uma velocidade controlada, de azoiniciadores (Equações 4 e 5). O dicloridrato do 2,2'-azobis-(2-metilpropanoamida) (AAPH ou ABAP, C<sub>8</sub>H<sub>18</sub>N<sub>6</sub>·2HCl, M.M 271,20 g/mol)<sup>18,28,29</sup> é exemplo de azoiniciador hidrossolúvel. Existem outros azocompostos, que se distinguem por serem lipossolúveis, como, por exemplo, o AMVN (2,2'-azobis-2,4-pentanonitrila). Estes reagem rapidamente com o oxigênio originando radicais peroxila (Equações 4 e 5).

Após adicionar AAPH ao plasma sanguíneo, a oxidação é monitorada, a partir, por exemplo, de medidas de oxigênio consumido, durante a reação, em eletrodo de oxigênio. O período no qual a oxidação é inibida pelos antioxidantes plasmáticos é comparado ao do trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico, C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub>, M.M 250,3 g/mol), o análogo hidrossolúvel da vitamina E, usado como antioxidante de referência e quantitativamente relacionado à CAOT do plasma.

Os valores de TRAP são expressos em μmol de radical peroxila capturado por molécula de trolox/L de plasma. Cada molécula de

trolox captura duas moléculas de RO<sub>2</sub>·. O RO<sub>2</sub>· gerado para reagir com os antioxidantes do fluido biológico pode também ser detectado diretamente através de métodos de quimioluminescência. No plasma humano, o valor normal de TRAP é de 1 mM de RO<sub>2</sub>· capturado por litro; as maiores contribuições são do urato (35-65%), das proteínas plasmáticas (10-50%), do ascorbato (acima de 24%) e da vitamina E (5-10%).



### ORAC (“Oxygen-Radical Absorbancy Capacity”)

Este método usa a proteína Phycoerythrin (PE) (Ficoeritrina), fotossintética, marcador de fluorescência, como alvo dos radicais. O ORAC mede a diminuição da emissão de fluorescência de PE adicionada ao plasma em presença de um composto azo, gerador de radicais (Equação 4). A habilidade antioxidante do plasma é calculada a partir da medida da área sob a curva de decaimento da fluorescência (“Area Under the Fluorescence Decay Curve” – AUC, com emissão a 565 nm) comparada ao padrão que, na maioria das vezes, é o trolox. A PE pode ser oxidada por AAPH para gerar radical peroxila (Teste ORAC<sub>RO2</sub>·) ou por Cu<sup>2+</sup>-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para gerar radical hidroxila (Teste ORAC<sub>HO</sub>·) ou ainda, adicionando-se íons Cu<sup>+</sup> como redutores (Teste ORAC<sub>Cu+</sub>).

O ORAC combina o tempo de inibição e a percentagem (%) de inibição da ação do radical pelo antioxidante e usa a área sob a curva para a quantificação. O teste expressa os resultados como unidades de ORAC ou equivalentes do trolox, que corresponde à quantidade de trolox em μmol que tem a mesma atividade antioxidante para o radical peroxila em 1 L de plasma. Porém, se o gerador de radicais for o Cu<sup>2+</sup>, o trolox não pode ser usado como padrão, pois o mesmo pode atuar como pró-oxidante na presença de Cu<sup>2+</sup>. Neste caso, a ação antioxidante será expressa em unidade antioxidante: uma unidade equivale à atividade antioxidante que causa o aumento da área sob a curva de decaimento de fluorescência de PE em 100%<sup>22</sup>.

Esse é o único método que permite a medida total dos radicais gerados e usa a técnica de AUC ao invés da “lag fase” (fase de retardo), utilizada pelos outros métodos para quantificação dos radicais. A AUC combina o percentual de inibição ao tempo de inibição da ação do radical (“lag fase”) pelo antioxidante<sup>22</sup>.

Mais recentemente, Prior e colaboradores<sup>31</sup> sistematizaram e validaram o uso do ORAC<sub>FL</sub>, próprio para a quantificação da CAOT em plasma ou soro. A separação das frações antioxidantes lipofílicas e hidrofílicas do plasma, foi obtida por extração com hexano, após adi-

**Tabela 6.** Grupo de biomarcadores em sangue e principais métodos de análise

Grupos de biomarcadores	Sub-grupos	Principais substâncias e métodos de análise
Antioxidantes	Capacidade antioxidante total	TRAP, ORAC, FRAP, TEAC, por espectrofotometria.
	Enzimas antioxidantes	SOD, GPx e CAT são avaliadas espectrofotometricamente. Sua atividade antioxidante e técnica de análise estão descritas no texto.
	Antioxidantes não enzimáticos	Vitaminas E, C e β-caroteno avaliadas por HPLC; glutatona avaliada por espectrofotometria; ceruloplasmina e transferrina, por turbidimetria e ácido úrico pelo método enzimático.
Marcadores de dano oxidativo	Proteínas oxidadas	Detecção de grupos carbonila por espectrofotometria.
	Lípídeos oxidados	Detecção de malondialdeído por HPLC com detecção no ultravioleta.
	Proteínas nitradas	3-Nitrotirosina (3-NO <sub>2</sub> -Tyr) por HPLC, com detecção eletroquímica.
	Oxidação das bases do DNA	Detecção de 8-oxo-2'-desoxiguanosina (8-oxodG) em linfócitos por HPLC
	Quebra de DNA	Teste do cometa (“comet assay”) em leucócitos

ção de água e etanol ao plasma. As duas frações sofrem partição eficiente entre o hexano e os solventes aquosos. Esse método pode ser empregado em outros fluidos biológicos ou amostras de alimentos<sup>31</sup>.

### FRAP (“Ferric-Reducing Ability of Plasma”)

Testa a força antioxidante do plasma, via avaliação da redução do complexo Fe<sup>3+</sup>-TPTZ (ferritripiridiltriázina) [2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina, C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>N<sub>6</sub>, M.M. 312,33 g/mol] a ferroso-tripiridiltriázina (Fe<sup>2+</sup>-TPTZ) por redutores, no caso, os antioxidantes plasmáticos, em valor de pH baixo. Baseia-se no fato de que a habilidade de um composto em produzir Fe<sup>2+</sup> a partir de Fe<sup>3+</sup> define sua força antioxidante. O complexo Fe<sup>2+</sup>-TPTZ tem uma cor azul intensa e pode ser monitorado, a 593 nm, em espectrofotômetro. A vitamina C e o ácido úrico, por ex., reduzem Fe<sup>3+</sup> a Fe<sup>2+</sup>. Por outro lado, um antioxidante que reduz efetivamente um pró-oxidante, não reduz, necessariamente, Fe<sup>3+</sup> a Fe<sup>2+</sup>.

As limitações do método são, portanto: nem todo redutor que é hábil para reduzir Fe<sup>3+</sup> a Fe<sup>2+</sup> é antioxidante; nem todo antioxidante tem a habilidade específica para reduzir Fe<sup>3+</sup> a Fe<sup>2+</sup>, como por ex., a glutathione. O resultado final pode ser convertido a mmol de equivalentes de trolox por litro de plasma. A atividade relativa do trolox em FRAP é de 2,0 mmol/L, ou seja, a reação direta de Fe<sup>2+</sup> proporciona uma mudança de absorvância que é a metade de 1 equivalente molar para o trolox<sup>31</sup>.

### TEAC (“Trolox Equivalent Antioxidant Capacity”) ou Teste do ABTS

O TEAC baseia-se na inibição por antioxidantes do cátion radical 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolína-6-sulfonato, sal de diamônio) (C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>S<sub>4</sub>, M.M. 548,7 g/mol, ABTS<sup>•+</sup>), que apresenta absorvância característica primária em 415 nm e absorções secundárias em 660, 734 e 820 nm.

O método original baseia-se na ativação de metamioglobina como peroxidase, em presença de ABTS. O complexo perferril da hemoproteína produziria o cátion radical ABTS<sup>•+</sup> de cor azul esverdeada. A adição desse radical a um meio contendo antioxidantes, permite avaliar, através do grau de descoloração, a capacidade antioxidante do mesmo. Alguns autores sugerem o uso de oxidação química de ABTS, com utilização de reagentes como dióxido de manganês ou persulfato de potássio, uma vez que outros antioxidantes podem contribuir para reduzir o radical ferrimioglobina formado durante a reação. O percentual de inibição de ABTS<sup>•+</sup> é determinado em função da concentração e do tempo. Quando a medida é relativa à reatividade do trolox, como padrão, sob as mesmas condições, o teste é denominado TEAC, expresso como unidades equivalentes de trolox que correspondem a 1,0 mmol/L<sup>18,33</sup>.

Esse método é aplicável para o estudo de antioxidantes lipossolúveis e hidrossolúveis.

A Tabela 7 ilustra valores de CAOT, obtidos em plasma e soro

humanos, com o emprego dos ensaios supracitados.

Caio e Prior<sup>22</sup> compararam TEAC e FRAP com ORAC na determinação *in vivo* da CAOT em soro humano e concluíram que o ORAC apresenta maior especificidade. No ORAC, a razão molar de AAPH/antioxidante é > 2000 e para a quantificação utiliza uma combinação do percentual de inibição com o tempo de inibição da ação do radical pelo antioxidante. No FRAP, a maior limitação diz respeito à menor sensibilidade e especificidade do método. No TEAC, a razão molar entre os reagentes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/metamioglobina/ABTS/trolox é somente 10,2/0,25/25/1, o que pode reduzir ou equilibrar o aumento na produção de espécies radiculares. Além disso, a quantificação da atividade antioxidante é feita através do percentual de inibição em um tempo fixo, sem considerar o tempo de duração da inibição<sup>22,23</sup>.

É preciso destacar que esses métodos se baseiam estritamente em reações químicas *in vitro* e não têm qualquer similaridade com sistemas biológicos. A validade de seus dados limita-se a um contexto de interpretação estritamente químico. Assim, Niki e Yoshida<sup>34</sup> discriminam o que denominam potencial antioxidante químico daquele biológico (determinado *in vivo* ou em modelos biomiméticos), onde a compartimentalização e a partição dos protagonistas redox (agente oxidante e alvo) entre fase aquosa e fase lipídica são consideradas<sup>35</sup>.

O uso de tais testes para determinar a bioatividade de uma amostra biológica deve ser visto com cautela, uma vez que eles não medem biodisponibilidade, estabilidade *in vivo*, retenção de antioxidantes pelos tecidos, nem reatividade *in situ*<sup>25</sup>.

Uma série de novos métodos, ainda não padronizados, foi e continua a ser relatada, o que mostra o vigor da área de pesquisa. Em vista da necessidade de métodos cada vez mais sensíveis, de pesquisa *in situ*, da mimetização do ambiente biológico, há forte interesse nesse desenvolvimento. Como exemplo, podem-se citar alguns métodos eletroquímicos, no caso, a coulometria em corrente constante, para análise de CAOT em plasma humano<sup>32</sup>. O método utiliza bromo eletrogerado (eletrólise à corrente constante a partir de brometo de tetraetilamônio, em HClO<sub>4</sub> 0,1 mol/L) e o ponto final da titulação é detectado amperometricamente<sup>32</sup>.

## CAPACIDADE ANTIOXIDANTE ESPECÍFICA

### Enzimas antioxidantes

#### *Superóxido dismutase (SOD)*

As principais formas de superóxido dismutases (EC 1.15.1.1), encontradas em humanos são a Cu/ZnSOD localizada no citosol (dimérica), além de lisossomas, núcleo e espaço entre as membranas interna e externa da mitocôndria (tetramérica) e a MnSOD localizada na mitocôndria (Figura 2).

A maioria das análises de SOD é realizada verificando-se a atividade de SOD indiretamente, geralmente por adição ao eritrócito do sistema xantina - xantina oxidase como fonte de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> e um composto

**Tabela 7.** Capacidade antioxidante total em plasma/soro humanos por vários ensaios

Método	Resultados típicos (µM) e referências	Comentários
TRAP	~1000 <i>Free Radical Biol. Med.</i> <b>1994</b> , 21, 211.	Uso de azoiniciadores na geração de radicais, que reagem com O <sub>2</sub> , dando radical peroxila.
Ensaio da Ficoeritrina (PE) ou ORAC	1162 ± 265 <i>Free Radical. Biol. Med.</i> <b>1995</b> , 18, 29.	Mede a diminuição da emissão de fluorescência de PE, adicionada ao plasma, em presença de um composto azo, gerador de radicais.
Ensaio ABTS	1320-1580 <i>Redox Rep.</i> <b>1996</b> , 2, 161	Ver Figura 3.
FRAP	612-1634 <i>Anal. Biochem.</i> <b>1996</b> , 239, 70.	A redução de Fe <sup>3+</sup> a Fe <sup>2+</sup> define a capacidade antioxidante.

Fonte: Adaptada da ref. 18



que seja reduzido pelo  $O_2^{\cdot-}$ <sup>18,26</sup> como, por ex., o 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-cloroeto de feniltetrazol (INT,  $C_{19}H_{13}ClIN_5O_2 \cdot x H_2O$ , M.M. 505,7 g/mol). O  $O_2^{\cdot-}$  transfere um elétron ao INT e produz formazana, detectada em espectrofotômetro a 505 nm. A atividade da enzima é medida a partir do grau de inibição da reação a que o eritrócito foi submetido e os valores são expressos em unidades por grama de hemoglobina (Hb) (U/g Hb). A inibição da formação do cromógeno é proporcional à atividade de SOD presente na amostra. Nessa técnica, uma inibição de 50% é definida como uma unidade de SOD<sup>36-39</sup>.

#### Catalase (CAT)

A catalase (EC 1.11.1.6), cujo sítio ativo contém o grupo heme, está enclausurada no peroxissoma, a principal organela responsável pela desintoxicação celular e pela oxidação de ácidos graxos de cadeia longa, fonte inesgotável de peróxidos orgânicos, produtos carbonílicos e oxigênio singlete. A catalase é, também, encontrada nas mitocôndrias das células do tecido cardíaco.

Os dois caminhos mais utilizados para estudo de sua atividade referem-se à medida do decaimento na concentração de  $H_2O_2$  e da geração do oxigênio<sup>18,26</sup>. A leitura do decaimento de  $H_2O_2$  é feita por espectrofotometria no ultravioleta a 240 nm. Os valores de CAT também são expressos em unidades por g de hemoglobina (U/g Hb). Uma unidade de CAT corresponde à atividade da enzima necessária para o consumo de 1  $\mu$ mol de  $H_2O_2$  em 1 min<sup>40</sup>.

#### Glutathione Peroxidase (GPx)

A família de GPx (EC 1.11.1.9) reduz  $H_2O_2$  e outros peróxidos a água ou álcool. Apresenta-se sob 4 formas: GPx 1 ou clássica, encontrada no citosol de todas as células do corpo; GPx 2 ou gastrointestinal, específica do trato gastrointestinal; GPx 3 ou plasmática ou extracelular, encontrada no fluido do revestimento interno do pulmão e no leite materno, além do plasma em mamíferos, e a GPx 4, que atua sobre peróxidos de resíduos de ácidos graxos nas membranas e lipoproteínas, reduzindo, também, o hidroperóxido da timina, formado como consequência do ataque dos radicais à base timina do DNA<sup>41,42</sup>. A família de GPx integra o grupo de selenoproteínas, que têm, em seu sítio ativo, o selênio (Se), obtido da dieta ligado à metionina, em alimentos de origem vegetal (selenometionina) e, ligado à cisteína, em alimentos de origem animal (selenocisteína). O Se é reconhecidamente um nutriente antioxidante, com recomendações de obtenção na dieta considerando sua atividade antioxidante e nutricional<sup>43,44</sup>.

No organismo humano, a selenometionina ocupa o lugar da metionina nas proteínas e a selenocisteína é constituinte das selenoproteínas (selenocisteína é a forma na estrutura primária de todas as selenoproteínas, inclusive GPx)<sup>41,44</sup>. Uma unidade de GPx corresponde à atividade de enzima necessária para converter 1  $\mu$ mol de NADPH a  $NADP^+$  em 1 min. Como as demais enzimas antioxidantes, os valores de GPx são expressos em unidades por g de hemoglobina (U/g Hb).

Um método muito utilizado para avaliar a atividade de GPx em eritrócitos consiste em adicionar ao lisado de hemácias uma mistura contendo NADPH, GSH, GR, EDTA (agente quelante que tem também a função de impedir a oxidação de GSH a GSSG) e tampão fosfato. Uma alíquota da mistura é adicionada ao hemolisado, mantido em banho-maria a 37 °C durante 1 min, adicionando-se, em seguida,  $H_2O_2$  ou hidroperóxido orgânico, para iniciar a reação, que é acompanhada em espectrofotômetro.

O método é similar àquele tradicional de Mills<sup>45,46</sup>, que mede a velocidade de oxidação de GSH por  $H_2O_2$  catalisada por GPx presente no hemolisado. O consumo de GSH é medido, mantendo em concentrações constantes a GR e o NADPH que converte imediatamente a GSSG produzida em GSH. Portanto, a análise de GPx

pode ser feita adicionando-se GSH, GR, NADPH e um peróxido para dar início à reação (*t*-BOOH, por ex.), sendo monitorada a 340 nm quando o NADPH é convertido a  $NADP^+$ .

#### Glutathione reductase (GR)

A glutathione reductase (EC 1.6.4.2) é uma flavoproteína dependente de NADPH e da integridade da via das pentoses. É a enzima necessária para manter a glutathione em sua forma reduzida e, possivelmente, para controlar o estado redox de NADP em tecidos onde GSSG está disponível<sup>48</sup>. A recuperação de GSH por GR é uma etapa essencial para manter íntegro o sistema de proteção celular, pois, baixas concentrações de GSH estão associadas ao estresse oxidativo<sup>1</sup>.

A análise de GR em eritrócitos é feita utilizando-se técnicas espectrofotométricas, em valores de absorbância de 340 nm, quando o NADPH é convertido a  $NADP^+$ . Uma unidade de GR é definida como 1  $\mu$ mol de GSSG reduzida por min a 30 °C, em pH 7,4<sup>48,49</sup>.

Conforme citado acima, a análise de enzimas antioxidantes é comumente realizada em eritrócitos<sup>49</sup>, o que requer o hemograma ou eritrograma dos indivíduos estudados e aponta para a adoção da unidade de enzima expressa em “unidade de enzima por grama de hemoglobina”, cujos valores de referência estão dispostos na Tabela 7.

#### Sistema antioxidante não enzimático

Relaciona-se a um grupo de antioxidantes que podem ser agrupados em compostos produzidos *in vivo*, como é o caso da glutathione, da ubiquinona e do ácido úrico, e em compostos obtidos diretamente da dieta tais como vitaminas E, C,  $\beta$ -caroteno e outros.

#### Glutathione

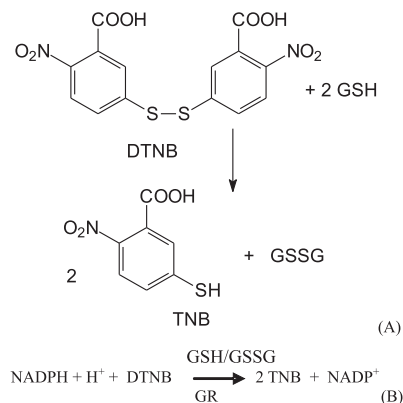
A glutathione (GSH) ( $C_{10}H_{17}N_3O_6S$ , M.M 307 g mol<sup>-1</sup>) é um tripeptídeo (*L*- $\gamma$ -glutamil-*L*-cisteinilglicina) que exerce funções essenciais na célula, destacando-se sua função como cofator da família de enzimas glutathione peroxidases (GPx), em que desempenha papel protetor contra o estresse oxidativo, com sua oxidação a dissulfeto da glutathione (GSSG) ( $C_{20}H_{32}N_6O_{12}S_2$ , Mr 612,6 g/mol). É um tampão redox sulfidrílico que mantém os resíduos cisteinila da hemoglobina e de outras proteínas do eritrócito, no estado reduzido. A GSH é o único tiol não protéico presente em espécies aeróbias e seu papel intracelular antioxidante inclui a desintoxicação de xenobióticos e de ERO. A falha nesta função resulta na formação de meta-hemoglobina e consequente incapacidade do eritrócito em transportar oxigênio, além de causar uma variação na forma do eritrócito, impedindo sua passagem para órgãos vitais<sup>50-52</sup>.

O preparo das amostras é muito importante para minimizar a atividade de  $\gamma$ -glutamyl-transpeptidase, que quebra ligações  $\gamma$ -glutamylpeptídeo de GSH; a redução de GSSG por GR ou a oxidação de GSH. Muitos procedimentos são desenvolvidos para inibir estas reações enzimáticas e não enzimáticas: acidificação, utilizando, por ex., ácido perclórico, capaz de inibir tanto a  $\gamma$ -glutamyl-transpeptidase quanto a GR, e o uso de quelantes como o ácido etilenediaminotetracético (EDTA), que limita a oxidação de GSH<sup>53</sup>.

A concentração de glutathione total (GSH + GSSG) pode ser medida usando-se 5',5'-ditiobis-(2-ácido nitrobenzóico) (DTNB,  $C_{14}H_8N_2O_8S_2$ , M.M 396,3 g/mol) e GR. A velocidade de redução de DTNB é verificada espectrofotometricamente a 412 nm, comprimento de onda relativo à absorção do produto reduzido, o ácido 5-mercapto-2-nitrobenzóico (TNB), ou sais correspondentes (Figura 4). O mesmo procedimento pode ser utilizado para a determinação de GSSG, com acompanhamento da mudança de absorbância em NADPH a 340 nm. Entretanto, para evitar a interferência de GSH, essa deve ser derivatizada com vinilpiridina<sup>26</sup> (não interfere com

GR) ou com N-etilmaleimida (NEM)<sup>49,53,54</sup>. Quando NEM é utilizada, o derivado formado deve ser eliminado antes da análise, pois o mesmo inibe a GR.

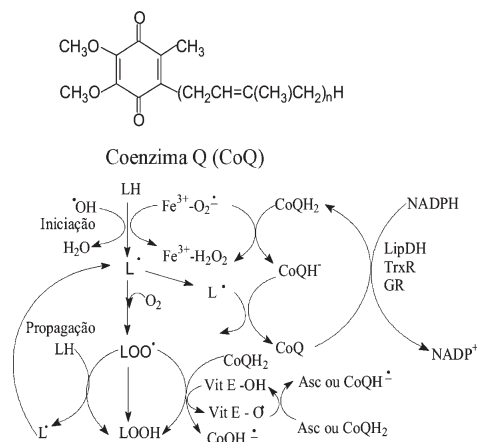
Outra forma de determinar a concentração de glutatona nas hemácias é descrita no trabalho de Calvo-Marzal e colaboradores<sup>55</sup>, onde se utilizam eletrodos de pasta de carbono modificados com Tetratiofulvaleno – Tetracianoquinodimetano (TTF-TCNQ).



**Figura 4.** Reações usadas para detecção de glutatona. (A) Reação enzimática DTNB e do produto da sua redução, TNB (ácido 5-tio-2-nitrobenzóico), sob ação de GSH, observado em  $\lambda$  412 nm. (B) Reação não enzimática para detecção de NADP a 340 nm

#### Coenzima Q (CoQ)

A coenzima Q<sub>10</sub> (Figura 5) ou ubiquinona é o único lipídio endogenamente sintetizado através da via do mevalonato, que apresenta função redox<sup>56</sup>. É um AO que desempenha papel central na cadeia respiratória mitocondrial, na cadeia de transporte de elétrons extra-mitocondrial, participa da regulação da permeabilidade, diminui a oxidação de proteínas de membrana, previne a oxidação do DNA e impede a disfunção endotelial, provavelmente por aumentar a disponibilidade de NO. Sua forma antioxidante, o ubiquinol (CoQH<sub>2</sub>), produto da redução de CoQ, inibe a iniciação e propagação da peroxidação lipídica, com conseqüente impedimento da formação de ROO<sup>•</sup> (radical peroxila). Além disso, a coenzima Q regenera a vitamina E do radical tocoferila<sup>57,58</sup>.



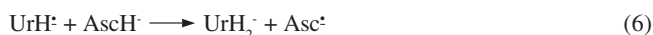
**Figura 5.** Sítios de ação de coenzima Q, vitamina E e ascorbato na peroxidação lipídica. LH: ácido graxo poliinsaturado; <sup>•</sup>OH; radical hidroxila; Fe<sup>3+</sup>-O<sub>2</sub><sup>•-</sup>: radical perferrila; CoQH<sub>2</sub>: coenzima Q reduzida; CoQH<sup>•</sup>: semiubiquinona; L<sup>•</sup>: carbono central radicalar do ácido graxo; LOO<sup>•</sup>: radical lipídico peroxila; vitE-OH: vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol); vitE-O<sup>•</sup>: vitamina E (radical  $\alpha$ -tocoferila); Asc: Ascorbato; Asc<sup>•-</sup>: radical ascorbila. Adaptado da ref. 57

A CoQ é transportada na circulação ligada a lipoproteínas, sendo 60% associada com LDL, 25% com HDL e 15% com outras lipoproteínas. A atividade antioxidante de CoQH<sub>2</sub> depende, não somente da sua concentração total, mas também do seu estado redox, ou seja, da proporção de CoQH<sub>2</sub> em relação à CoQ total.

A ubiquinona, tanto na forma reduzida (CoQH<sub>2</sub>), como na forma oxidada (CoQ), pode ser quantificada em plasma humano obtido de sangue coletado em heparina, centrifugado e armazenado a -70 °C, 30 min após a coleta. A análise é feita em HPLC, com o plasma tratado com 1-propanol para dissociação de CoQ, e  $\alpha$ -tocoferol da lipoproteína e com a adição do análogo dietoxílico da CoQ, como padrão interno. O sobrenadante é injetado diretamente na câmara de injeção do HPLC e CoQH<sub>2</sub> e CoQ são determinadas<sup>26,49</sup>.

#### Ácido úrico

O ácido úrico (URH<sub>3</sub>) deriva do metabolismo das purinas e é produzido pela oxidação de hipoxantina e xantina pela xantina oxidase (XO) e xantina desidrogenase (XD). Na maioria das espécies, a enzima peroxissomal urato-oxidase converte urato a alantóina, que, por sua vez, é convertida a alantoato e depois a glioxilato e uréia, todos produtos mais solúveis em água que o urato. Seres humanos e outros primatas não contêm a urato-oxidase, daí, o urato acumula-se no plasma e é excretado na urina. Em pH fisiológico, o ácido úrico é dissociado a urato (UrH<sub>2</sub><sup>-</sup>) (pKa 5,4)<sup>5</sup>. O urato tem solubilidade menor em água e sua concentração encontra-se muito próxima de seu limite de solubilidade (300  $\mu$ M)<sup>5</sup>; por isso, o excesso de produção de urato leva à formação de cristais, o que ocorre na gota, tratada com alopurinol, inibidor de XO/XD. Oxidantes fortes, tais como <sup>•</sup>OH, podem oxidar o ânion urato (UrH<sub>2</sub><sup>-</sup>) ao radical urato, que é dissociado (pKa 3,1), ao ânion radical urato (UrH<sup>•</sup>). Esse é estável graças à ressonância que permite a dispersão da carga negativa. O urato também reage com radicais ROO<sup>•</sup> antes de este penetrar a membrana celular e iniciar o dano e, com o dióxido de nitrogênio (NO<sub>2</sub><sup>•</sup>), para formar o ânion nitroxila NO<sub>2</sub><sup>-</sup> e por fim, atua como antioxidante, por sua capacidade de quelar metais de transição. O ânion radical urato (UrH<sup>•</sup>) pode reagir com ascorbato (AscH<sup>-</sup>), regenerando o urato<sup>5</sup> (Equação 6)<sup>18</sup>.



O ácido úrico apresenta atividade antioxidante significativa e sua concentração no plasma é maior que a de outros antioxidantes, como vitaminas C e E<sup>20</sup>.

A análise de urato pode ser feita em soro ou em plasma (obtido em heparina ou EDTA), de preferência frescos, pelo método enzimático automatizado, utilizando kits para dosagem, através da diminuição da absorbância, após tratamento com uricase. O ácido úrico, que absorve em 293 nm, ao ser convertido a alantóina pela uricase, apresenta diminuição na sua absorbância<sup>15</sup>.

#### Vitamina E ou tocoferol

O termo vitamina E é a designação comum de duas diferentes famílias de compostos que ocorrem na natureza: os tocoferóis e os tocotrienóis, que exibem, qualitativamente, a atividade biológica do  $\alpha$ -tocoferol, que é o composto mais potente e, geralmente, a forma predominante. Estruturalmente, tocoferóis e tocotrienóis diferem apenas na cadeia lateral e ambos se subdividem em  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ , dependendo do número e posição do grupo metila no anel cromanol<sup>59</sup>.

O tocoferol é o antioxidante lipossolúvel que atua bloqueando a etapa de propagação da peroxidação lipídica dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas e lipoproteínas. Intercepta o radical peroxila (RO<sub>2</sub><sup>•</sup>), resultante com formação do radical tocoferila, que será regenerado por ascorbato, glutatona ou ubiquinol a tocoferol<sup>59,60</sup>. O tocoferol pode ser medido em plasma, soro, plaquetas e eritrócitos

por técnicas cromatográficas, sendo a HPLC em fase reversa, a técnica de escolha, com detecção por espectrofotometria no UV (cujo comprimento de onda dependerá do solvente), por espectrofluorimetria ou ainda por métodos eletroquímicos<sup>26</sup>. Por ser lipofílico, o tocoferol requer uma etapa pré-analítica de extração com hexano, que é realizada ao abrigo da luz e sob refrigeração.

#### *Vitamina C ou ascorbato*

O ácido ascórbico é essencial ao homem, pois não pode ser sintetizado a partir da glicose que é seu precursor, como ocorre em plantas e na maioria dos animais. Em sistemas biológicos, em pH fisiológico (7,4), 99,95% da vitamina C ( $\text{AsCH}_2$ ) encontra-se na forma de ascorbato ( $\text{Asc}^-$ ), que é a forma que atua como antioxidante, ao doar um  $\text{H}^+$  ou  $[\text{H}^+ + \text{e}^-]$  para um radical. O ascorbato ( $\text{AscH}^+$ ) atua como antioxidante sobre ERO e ERN, em ambiente biológico aquoso, resultando na formação do ânion radical semidesidroascorbato ( $\text{Asc}^\bullet$ ), ou ascorbila, pouco reativo. Atua eficientemente sobre o ânion-radical superóxido ( $\text{O}_2^\bullet$ ), o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), o hipoclorito ( $\text{ClO}^-$ ) e os radicais hidroxila ( $^{\bullet}\text{OH}$ ) e peroxila ( $^{\bullet}\text{OOH}$ ). O ascorbato pode atuar diretamente nas membranas celulares, por impedir a iniciação da peroxidação lipídica ou indiretamente por regenerar a vitamina E, que atua como antioxidante na face lipofílica da membrana<sup>5</sup>. Além disso, pode regenerar o ânion radical urato a partir de urato, fechando o ciclo de atuação antioxidante do mesmo, como discutido anteriormente (Equação 6)<sup>18</sup>.

A detecção de vitamina C em plasma ou em soro requer precaução, uma vez que é um composto facilmente oxidável. Devido a sua facilidade de oxidação, em pH neutro (fisiológico) ou alcalino, é recomendável a acidificação do plasma, preferencialmente após sua separação por centrifugação, adicionando-se ácido tricloroacético, ácido metafosfórico, ou ácido oxálico, isolado ou em associação com ácido tricloroacético. HPLC é a técnica mais comumente usada na sua separação e análise. Recentemente, Katepe<sup>61</sup> desenvolveu uma técnica para detecção simultânea de ascorbato e malondialdeído em soro humano, utilizando HPLC com detecção no UV.

#### *$\beta$ -caroteno*

Os carotenóides são pigmentos intensamente coloridos, lipossolúveis, sintetizados por plantas e microrganismos, presentes em muitos alimentos, particularmente frutas, vegetais e peixes. Existem mais de 600 tipos de carotenóides e apenas 10% têm atividade pró-vitamina A, que é a capacidade de conversão dos carotenóides em retinol<sup>62</sup>.

As propriedades antioxidantes dos carotenóides estão associadas com sua capacidade de capturar radicais e outras espécies, como oxigênio singlete, em baixas concentrações e em baixa pressão parcial de oxigênio, tais como aquelas da maioria dos tecidos sob condições fisiológicas<sup>62</sup>. No entanto, as funções de carotenóides na dieta, na prevenção de doenças não estão definitivamente estabelecidas, havendo muita controvérsia na literatura. Neste aspecto, é importante citar dois estudos de associação da suplementação de  $\beta$ -caroteno e prevenção de câncer de pulmão e doença arterial coronariana (DAC) em fumantes, onde se verificou, inclusive, um aumento da mortalidade: o CARET (“Carotene and Retinol Efficacy Trial”)<sup>63</sup>, com 18.314 fumantes acompanhados durante 4 anos revelou aumento de 46% na mortalidade por CA de pulmão, de 26% na mortalidade por DAC e de 17% na mortalidade geral e, o ATBC (“Alpha-Tocopherol and Beta-Carotene Lung Cancer Prevention Study”)<sup>64</sup>, de prevenção secundária, com 29.133 fumantes acompanhados durante 6 anos revelou aumento de 18% na mortalidade por CA de pulmão, de 12% na mortalidade por DAC e de 8% na mortalidade total.

O método mais comumente adotado para analisar carotenóides em soro humano é HPLC em fase reversa. A amostra de sangue deve ser coletada sem anticoagulante, uma vez que o EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), o oxalato e o citrato reduzem a concentração de  $\beta$ -caroteno, porque catalisam as reações de isomerização ou de oxidação do mesmo. Além disso, todas as etapas requerem proteção contra a luz<sup>26</sup>. As proteínas devem ser previamente desnaturadas por exposição ao ácido perclórico; o  $\beta$ -caroteno é subsequentemente extraído com mistura de acetato de etila – tetraidrofurano (1:1) e nenhuma etapa de evaporação é requerida. A separação é obtida usando-se eluição isocrática em coluna  $\text{C}_{18}$  com detecção em ultravioleta a 436 nm<sup>65</sup>. A análise pode ser realizada com cada um dos tipos de carotenóides ou em termos da concentração de carotenóides total, que podem ser extraídos também com solvente orgânico, geralmente hexano, e detectados medindo-se a absorvância a 453 nm<sup>26</sup>.

#### *Proteínas de transporte de metais de transição*

Os metais de transição Fe e Cu são essenciais ao organismo humano para a síntese de muitas enzimas e proteínas envolvidas na respiração, transporte de  $\text{O}_2$ , formação de óxido nítrico e outras reações redox (por ex., oxidação de adrenalina, noradrenalina e ascorbato). Sua habilidade na transferência de elétrons os caracteriza como potentes pró-oxidantes, uma vez que têm o poder de converter  $\text{H}_2\text{O}_2$  em  $^{\bullet}\text{OH}$  (Tabela 1). Além disso, são potentes catalisadores de reações de auto-oxidação e decompõem peróxidos lipídicos a radicais peroxila e alcóxila, muito reativos.

Estes cátions podem ser dosados sob a forma livre, ou ligados a sua proteína de transporte. Essa última forma é a mais adequada, uma vez que os mesmos circulam no plasma, em sua quase totalidade, ligados às proteínas transferrina e ceruloplasmina, respectivamente.

#### *Transferrina*

A transferrina é uma betaglobulina sintetizada pelo fígado, responsável pelo transporte de ferro no plasma. O Fe obtido da dieta pode ser o  $\text{Fe}^{3+}$  (férico) ou  $\text{Fe}^{2+}$  (ferroso). Para entrar na célula duodenal é necessário que o Fe esteja na forma reduzida. No interior do eritrócito é oxidado a  $\text{Fe}^{3+}$  e, em seguida, reduzido a  $\text{Fe}^{2+}$ , para circular no plasma inicialmente ligado à ceruloplasmina, que novamente o oxida, para que seja captado pela transferrina e daí transportado para o fígado, onde é armazenado e distribuído para as células<sup>66</sup>.

A transferrina pode ser medida diretamente em soro ou plasma (coletado em heparina ou EDTA), fresco ou refrigerado (de 2 a 8 °C) por até 7 dias ou congelado a -20 °C, por até 3 meses. A análise é feita por turbidimetria, utilizando-se kits comerciais, em espectrofotômetro cuja leitura é feita a 37 °C em comprimento de onda de 340 nm. A transferrina pode também ser medida indiretamente pelo cálculo que utiliza a Capacidade Total de Ligação do Ferro – CTLF (ou “TIBC” – “Total Iron Binding Capacity”), que se refere à quantidade total de ferro que a transferrina é capaz de ligar. A CTLF é determinada medindo-se o excesso de ferro no sobrenadante de uma quantidade conhecida de ferro adicionado ao soro para saturar a transferrina, o qual é separado após precipitação da proteína. De posse de tal valor, calcula-se a transferrina sérica (TS) a partir da fórmula<sup>67</sup>

$$\text{TS (mg/100 mL)} = (0,8 \times \text{CTLF}) - 43$$

#### *Ceruloplasmina*

A ceruloplasmina ou ferroxidase I é uma  $\alpha_2$ -glicoproteína que transporta cerca de 90 a 95% do cobre total no plasma<sup>66</sup>. O  $\text{Cu}^{2+}$ , obtido da dieta, é quelado pelo aminoácido histidina e absorvido no

duodeno. É transportado ao fígado ligado à albumina e lá é incorporado na proteína ceruloplasmina. O  $\text{Cu}^{2+}$  ligado à ceruloplasmina é, então, distribuído para as células. Além do transporte de  $\text{Cu}^{2+}$ , a ceruloplasmina oxida  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  para sua subsequente transferência para a transferrina, daí a sinonímia de ferroxidase, e catalisa a S-nitrosação de biomoléculas tiólicas<sup>66,68,69</sup>.

A determinação de ceruloplasmina humana baseia-se na reação entre essa enzima como antígeno e o anti-soro específico obtido em kits disponíveis no mercado. O princípio do método é a reação antígeno (a enzima presente no soro) com o anticorpo contido no kit. A reação dá lugar a um complexo insolúvel, produzindo uma turbidez que pode ser lida espectrofotometricamente. Portanto, sua análise é feita por imunoturbidimetria, a 37 °C, utilizando-se espectrofotômetro, em 340 nm. A ceruloplasmina pode ser medida diretamente em soro fresco ou refrigerado entre 2 a 8 °C por até 2 dias ou congelado a -20 °C por até 3 meses.

Os valores de referência para os antioxidantes não enzimáticos citados estão ilustrados na Tabela 8.

**Tabela 8.** Valores de referência para enzimas antioxidantes em eritrócito humano

Enzimas antioxidantes	Valores de Referência (U/g Hb)
Superóxido Dismutase (SOD)	6.500 – 14.500
Catalase (CAT)	16.500 – 26.500
Glutaciona Peroxidase (GPx)	30 – 44
Glutaciona Redutase (GR)	5,4 – 8,8

Obs: Se for adotado protocolo de kit, considerar o valor referência do kit. p.ex., kit RANSOD, RANDOX para SOD, VR = 1102 -- 1601 U/g Hb. Fonte: Adaptado da ref. 49

### Avaliação de dano oxidativo em componentes celulares

As macromoléculas reagem com ERO e ERN com a produção de diversos marcadores de dano oxidativo (Tabela 2), que podem ser identificados em sangue humano, entre outros fluidos biológicos. A presente revisão dará ênfase à análise de marcadores da peroxidação lipídica com atenção particular à MDA, marcadores de oxidação de proteínas, especificamente os derivados contendo grupos carbonila e se fará um breve comentário de marcadores de espécies reativas de nitrogênio.

Conforme mencionado<sup>13,14</sup>, há um esforço mundial para validação de biomarcadores de estresse oxidativo. No momento, no entanto, não há consenso sobre qual o método mais útil, mais confiável, mais acurado, ou específico para os diferentes tipos de dano oxidativo. Não há possibilidade de se fazer a comparação direta entre os métodos, usando amostras idênticas, daí, a extrema dificuldade de obtenção de valores de referência absolutos para marcadores específicos em sistemas vivos<sup>13,14</sup>. É mister anotar que o balanço redox de uma dada população “normal” sofre influências genéticas (características étnicas), ambientais (ex., poluição atmosférica), nutricionais (consumo de carnes e vegetais) e culturais (ex., hábitos de exercício físico intenso, alcoolismo, ou tabagismo), o que é um complicador adicional. Enquanto os trabalhos de sistematização prosseguem, é útil conhecer os principais marcadores e os métodos mais utilizados para sua quantificação.

### Marcadores de peroxidação lipídica

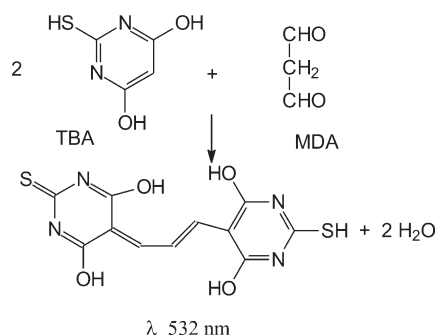
A importância do dano oxidativo causado por ERO e ERN em lipídios é motivo de discussões na busca do melhor marcador em fluidos biológicos, uma vez que produtos numerosos e complexos

derivam da peroxidação lipídica. Eles são classificados em primários (os hidroperóxidos lipídicos) e secundários, que derivam da  $\beta$ -ruptura dos hidroperóxidos lipídicos.

### Malondialdeído (MDA)

O malondialdeído é um produto secundário da peroxidação lipídica, derivado da  $\beta$ -ruptura de endociclicação de ácidos graxos polinsaturados com mais de duas duplas ligações, tais como ácido linoléico, araquidônico e docosaexanóico<sup>18,70-72</sup>. Atualmente, o MDA é considerado um candidato potencial para ser escolhido como um biomarcador geral de dano oxidativo em plasma<sup>14</sup>.

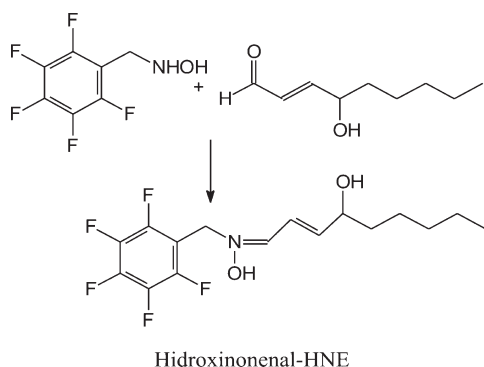
O MDA foi o foco de atenção da peroxidação lipídica durante muitos anos, pelo fato de poder ser medido livre, utilizando-se o ácido tiobarbitúrico (TBA). O MDA reage com TBA e forma um cromógeno de cor rosa fluorescente, cuja absorção ocorre em  $\lambda$  de 532 nm e fluorescência em 553 nm<sup>26</sup> (Figura 6). Considerando-se que o teste não é específico para MDA, pois outros aldeídos participam da mesma reação, a técnica utilizando HPLC com detecção no UV, recentemente desenvolvida por Katepe<sup>61</sup>, em soro humano, revela-se mais específica. Na técnica de Katepe, o soro é acidificado para liberar o MDA ligado ao grupo amino de proteínas.



**Figura 6.** Reação utilizada para detecção de malondialdeído (MDA) em plasma humano. Ao plasma é adicionado ácido tiobarbitúrico (TBA), que reage com MDA e forma um cromógeno que absorve a 532 nm

### Hidroxinonenal (HNE)

O HNE é o produto majoritário da oxidação de ácidos graxos polinsaturados. Várias técnicas foram desenvolvidas para sua determinação em amostras biológicas, em sua forma livre, pois a recuperação de HNE do plasma é muito baixa e, como acontece com todos os aldeídos, há necessidade de sua derivatização para análise em HPLC<sup>18,26,70-72</sup>. A derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNFH), seguida de cromatografia em camada delgada e HPLC, com detecção por espectrofotometria no UV, consome um tempo considerável. Neste sentido, foi proposto um método utilizando-se 1,3-cicloexanodiona, que forma um derivado que pode ser detectado por fluorescência<sup>73</sup>. A seletividade do método pode ser aumentada por utilização de tetraidrofurano ao invés de cinco outros solventes, porém a recuperação de HNE é muito baixa (cerca de 8%)<sup>74</sup>. Mais recentemente, a quantificação de HNE em plasma passou a ser realizada com pentafluorobenzil-hidroxilamina para formar o derivado pentafluorobenziloxima (Figura 7), que é analisado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas com ionização química negativa (GC/NICI-MS) usando HNE deuterado como padrão interno<sup>26</sup>. Nesse método, apesar de haver um aumento significativo na recuperação de HNE do plasma (60 a 80% versus 8%), sua concentração permanece, ainda, mais baixa do que a de outros aldeídos marcadores de peroxidação lipídica, devido, provavelmente, à ligação aos grupos sulfidril ou amina de proteínas<sup>26</sup>.



**Figura 7.** Esquema reacional para a determinação de hidroxinonenal (HNE)

#### Isoprostano (8-*epi*-prostaglandina 2 $\alpha$ ,8-*epi*-PGF<sub>2 $\alpha$</sub> )

Os isoprostanos pertencem à família dos eicosanóides, de origem não enzimática e são produzidos pela oxidação do ácido araquidônico. Inicialmente, são formados nos fosfolipídios da membrana celular e depois liberados para os fluidos biológicos pela fosfolipase<sup>26,72</sup>. Ao contrário do que ocorre com os hidroperóxidos lipídicos (produtos primários da peroxidação lipídica - PL), que se decompõem rapidamente nos fluidos e tecidos humanos, F<sub>2</sub>-isoprostanos são produtos secundários da peroxidação lipídica quimicamente estáveis podendo, inclusive, ser dosados na urina. Essa estabilidade é a razão pela qual a sua quantificação desperta interesse, com o aparecimento de muitos protocolos para sua análise. Além disso, são produtos específicos da PL, estão presentes em quantidades detectáveis em todos os fluidos biológicos e tecidos, sua formação aumenta drasticamente em modelos animais de dano oxidativo e é modulada pelo estado antioxidante e seus níveis não são afetados pelo conteúdo de lipídios da dieta<sup>75</sup>. Como MDA, ele é, também, considerado um candidato potencial para ser escolhido como um biomarcador geral de dano oxidativo em plasma<sup>14</sup>.

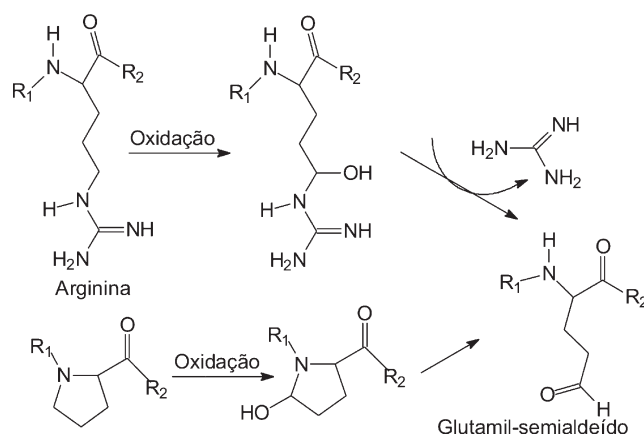
O método mais adequado para análise de isoprostanos é a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas com ionização química negativa (GC/NICI-MS), contudo, devido aos altos custos financeiro e operacional, os métodos radiométricos e imunológicos são mais utilizados<sup>26,71,72</sup>.

### Marcadores de oxidação de proteínas

#### Grupos carbonila em proteínas

A modificação de proteínas pode ser induzida por ERO, por cátions metálicos (Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>+</sup>), por endobióticos (GSH), por HOCl e HOBr, no processo da fagocitose, por irradiação, por peróxidos lipídicos, por oxidoredutases, por fármacos etc. (Tabela 2). Todos os aminoácidos são susceptíveis à oxidação, principalmente os aromáticos, que são os alvos preferidos de ataque. Existem, portanto, muitos mecanismos para oxidação de proteínas e, ao mesmo tempo, muitas substâncias passíveis de tal modificação<sup>26,76</sup>. A oxidação direta de lisina, arginina, prolina e treonina fornece derivados carbonílicos (Figura 8). Além disso, grupos carbonila podem ser introduzidos em proteínas via reação com aldeídos derivados da peroxidação lipídica (MDA, HNE) ou gerados a partir da reação de redução de açúcar (p.ex., glicose) ou produtos de sua oxidação com resíduos de lisina (reações de glicação e de glicoxidação formando carboximetil-lisina)<sup>69,76,77</sup>. Vale salientar que, segundo o “Joint Commission on Biochemical Nomenclature”, o termo glicação difere de glicosilação. Esta última constitui o processo pós-traducional catalisado enzimaticamente. A glicação é um processo não enzimático a que estão sujeitas todas as proteínas e consiste de 2 etapas: a glicose e o grupo amino de lisina reagem e formam frutose-lisina (FL); FL sofre desidratação, rearranjo e ciclização, seguida

de reação que forma os AGEs (“Advanced Glycation End products”), denominada reação de Maillard<sup>72,78</sup>.



**Figura 8.** Exemplos de processos de formação de grupos carbonila por oxidação de aminoácidos. Adaptado da ref. 18

O conteúdo carbonílico de proteínas é amplamente utilizado como marcador de dano oxidativo em proteínas, sob condições de estresse oxidativo. É necessário, porém, identificar a natureza do grupo carbonila, i.e., qual dos resíduos de aminoácido sofreu o dano. A ligação de certos aldeídos a proteínas (ex. MDA e HNE) pode gerar carbonilas por glicoxidação, de modo que a presença de grupo carbonila não é, necessariamente, indicativa de oxidação de aminoácidos.

Há diversas técnicas para se medir a presença de grupo carbonila em proteínas, sendo imprescindível uma preparação adequada da amostra<sup>79</sup>. Por isso, tal análise em plasma humano requer uma exaustiva seqüência de procedimentos para separar as proteínas. O método mais conveniente é o espectrofotométrico, baseado na reação de DTNB com o grupo carbonila, que forma a hidrazona da proteína, cuja leitura de absorvância é feita a 370 nm<sup>72,76,79,80</sup>. A unidade mais utilizada para carbonila é nmol/g de proteína, por isso é preciso quantificar a proteína total da amostra utilizando-se o método de Bradford<sup>81</sup> ou outros.

A Tabela 9 mostra valores de referência de alguns marcadores de dano oxidativo em macromoléculas analisados em sangue humano, embora haja muita controvérsia na literatura<sup>13,14</sup>.

**Tabela 9.** Valores de referência para antioxidantes não enzimáticos em sangue humano

Antioxidantes	Valores de referência
Glutathione – GSH (plasma)	1 – 3 $\mu$ M
Glutathione – GSH (eritrócito)	1 – 3 $\mu$ M
Coenzima Q – CoQ (plasma)	0,4 – 1,0 $\mu$ M
Ácido úrico ou Urato (soro)	0,2 – 0,4 mM
Vit. E ou Tocoferol (plasma)	20 $\mu$ M
Vit. C ou Ascorbato (plasma)	30 – 100 $\mu$ M
$\beta$ -Caroteno (plasma)	0,3 – 0,6 $\mu$ M
Transferrina (soro)	200 – 360 mg/dL
Ceruloplasmina (soro)	15 – 60 mg/dL

Fonte: Adaptada das refs. 18 e 98 e kit analítico Spinreact.

### Marcadores de espécies reativas de nitrogênio (ERN)

O óxido nítrico (NO<sup>•</sup>) é rapidamente metabolizado a produtos estáveis, ou seja, nitrito e nitrato, na maioria dos fluidos do corpo, inclusive no plasma. Quando em presença de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> forma ONOO<sup>-</sup>,

que promove diferentes efeitos biológicos a partir de três reações: reação redox direta<sup>82</sup>, reação com CO<sub>2</sub> formando CO<sub>3</sub><sup>82, 83, 84</sup> e homólise de ácido peroxinitroso<sup>82</sup> (Tabela 1).

O método de determinação mais comumente utilizado baseia-se na reação de diazotização (método de Griess), específico para nitrito e que não detecta nitrato. O tratamento da amostra com agentes redutores ou enzimas gera o total de produtos em termos de nitrito e nitrato, com detecção espectrofotométrica<sup>26</sup>. Outros métodos foram desenvolvidos, incluindo-se HPLC, eletroforese capilar e cromatografia de troca iônica com detecção no ultravioleta, desde que em soro ou plasma frescos.

Existem diversas limitações para a determinação de nitrato e nitrito em sangue, destacando-se: sua meia vida no plasma é de cerca de 1 h e 30 min sendo, a seguir, excretados pela urina; seus valores plasmáticos são dependentes da integridade renal. Assim, o real valor de sua determinação precisa ainda ser estabelecido<sup>26</sup>. A combinação de NO<sup>•</sup> com outras ERO gera reagentes (Tabela 1) que promovem a nitração das biomoléculas, incluindo resíduos de tirosina e tocoferol localizados nas membranas. A 3-nitrotirosina (3-NO<sub>2</sub>-Tyr) e o 5-γ-nitrotocoferol constituem os biomarcadores de oxidação NO-dependentes de tecidos biológicos. Para ambos, HPLC com detecção eletroquímica é a técnica de escolha, pela sensibilidade e seletividade, pois é necessário separá-los de outros produtos de oxidação: 3,4-DOPA, 3-clorotirosina, 3,3'-ditirosina, *m*-tirosina e *o*-tirosina, no caso de 3-NO<sub>2</sub>-Tyr e de outras formas de tocoferol (γ, α, β) no caso de 5-γ-nitrotocoferol<sup>26, 85</sup>.

#### Outros marcadores de dano em macromoléculas

Em sangue, o dano ao DNA é detectado através do teste do cometa em leucócitos, ("comet assay")<sup>86-89</sup>. Idealmente, a avaliação do dano em DNA deve reunir os marcadores excretados na urina, 8-hidroxi-desoxinucleotídeos (8-OH-dG) e suas bases livres (8-hidroxi guanina) e os marcadores medidos em sangue<sup>26, 71, 72</sup>.

#### Associação de marcadores de balanço redox a doenças

A Tabela 3 ilustra exemplos de doenças cujo mecanismo fisiopatológico tem a participação do estresse oxidativo, a Tabela 4 lista os marcadores de dano oxidativo associado com algumas doenças humanas e a Tabela 5 apresenta exemplos de biomarcadores utilizados para o diagnóstico e/ou monitoramento de doenças<sup>7-10, 12, 90</sup>. A determinação de antioxidantes e marcadores de dano oxidativo com aplicação clínica para diagnóstico, com exceções, como é o caso da ceruloplasmina na doença de Wilson, permanece em nível de pesquisa, uma vez não foi possível ainda sequer determinar se o fenômeno oxidativo observado é causa ou consequência da doença.

Muitos estudos permitiram verificar o fenômeno do estresse oxidativo em doenças. Em pacientes com hemocromatose, diminuição dos níveis de α-tocoferol, ascorbato e retinol foram encontrados e positivamente correlacionados com o aumento de TBARS (substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico) no plasma<sup>91</sup>. Em pacientes com doença de Alzheimer, foram encontrados níveis eleva-

dos de GPx, CAT e SOD e positivamente correlacionados com o aumento de TBARS no tecido cerebral<sup>92</sup>. Diabéticos não dependentes de insulina (tipo II) apresentaram queda significativa nos níveis de SOD, CAT, GSH, ascorbato e α-tocoferol no plasma e eritrócitos, nos 2 primeiros anos de diagnóstico, o que foi positivamente correlacionado com a duração da doença e com o desenvolvimento de complicações<sup>93</sup>. Estudos recentes com hipertensos revelaram níveis mais baixos de SOD, CAT e GPx em eritrócitos<sup>94-97</sup> e níveis elevados de MDA<sup>92</sup>. Esses são alguns dos muitos exemplos de estudos de estresse oxidativo em doenças já instaladas, utilizando marcadores obtidos em fluidos biológicos, principalmente em sangue humano.

#### CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como visto, muitos processos celulares são governados pelo balanço redox. As substâncias envolvidas no binômio antioxidante – pró-oxidante e que configuram o ambiente redox biológico podem ser quantificadas associando às técnicas bioquímicas tradicionais, técnicas cromatográficas, espectrofotométricas e eletroanalíticas, selecionadas pela observação de critérios de sensibilidade, especificidade, acuracidade, facilidade de manipulação, rapidez, robustez, objetivo, tipo de amostra, preço, repetibilidade, eficiência, entre outros. A determinação dessas substâncias revela-se de grande importância, com perspectivas de aplicação clínica para diagnóstico de doenças e do estado geral de saúde do indivíduo. Além disso, o entendimento dos mecanismos utilizados pelas células para a manutenção do balanço redox do meio é fundamental na identificação de biomarcadores representativos para a avaliação do nível de estresse oxidativo de diferentes indivíduos. Há interesse dos especialistas em ciências da saúde, em ciências química e bioquímica, em nutrição, e, principalmente, do público em geral.

Há muita complexidade nas diversas áreas envolvidas, muita informação e discussão. O número de artigos publicados quadruplicou na última década<sup>26</sup>. O presente trabalho procurou citar os métodos de determinação analítica mais conhecidos e utilizados, aplicados em sangue/ou plasma/ou soro humano. A natureza única do plasma humano, enquanto fonte não só de proteínas clássicas já utilizadas no diagnóstico de doenças (em concentrações de mg/mL), mas em nível de proteômica (pg/mL até ng/mL), torna esse biofluido um desafiante meio de investigação e aponta para o desenvolvimento de técnicas capazes de identificar biomarcadores mais específicos<sup>16</sup>, inclusive do ambiente redox. Apesar de reconhecido que os testes de diagnóstico *in vitro* contribuem em 94% com os registros de dados clínicos e influenciam em 60 a 70% das decisões clínicas<sup>97</sup>, o seu uso em nível de proteômica não está estabelecido e encontra-se em franco desenvolvimento.

Há enormes desafios que impedem ou pelo menos dificultam a sua aplicação para descobrir biomarcadores de maior sensibilidade e especificidade, entre outras características importantes<sup>11</sup> para o fenômeno que está sendo investigado e, conseqüentemente, a utilização destes dados para inferir estado redox de indivíduos e para auxiliar em terapia antioxidante. Não há consenso. No momento, a

**Tabela 10.** Valores de referência para alguns marcadores de dano oxidativo em macromoléculas analisados em soro e plasma humanos

Marcador de dano oxidativo	Valores de referência	Método analítico
Malondialdeído – MDA (plasma)	1 – 3 μM	Separação por HPLC de MDA de adutos TBA ou detecção fluorimétrica de TBARS
Isoprostano	35 ± 6 pg/mL	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
Carbonila em proteínas	0,4 – 1,0 nmol/g ptna	Espectrofotometria (Figura 8)

Fonte: Adaptada das refs. 18, 76 e 99

despite do forte interesse, desenvolvimento e plausibilidade biológica, a hipótese de ligação direta entre estresse oxidativo e doenças é ainda de difícil comprovação, uma vez que há inúmeros fatores limitantes, tais como procedimentos de coleta e armazenamento; a técnica analítica em si, em muitos casos, de elevado custo e de difícil operacionalização, a falta de uniformidade nas unidades em que se exprimem os resultados, bem como os valores de referência; a quantidade de fatores interferentes e, principalmente, questões ligadas à variabilidade genética. Apesar da existência de vários biomarcadores de balanço redox em sangue (Tabela 6) e da listagem dos valores considerados normais ou de referência<sup>18,49,76,98,99</sup> (Tabelas 7 a 10), é útil salientar que não existem ainda valores de referência universalmente aceitos/adotados, uma vez que os próprios métodos de análise e quantificação, além de envolverem diferentes técnicas, estão em processo de desenvolvimento e aperfeiçoamento. A validação dos métodos encontra-se em curso<sup>13,14</sup>, com utilização do modelo murino, tratado com injeção intra-peritoneal de CCl<sub>4</sub><sup>13,14</sup>. O desenvolvimento de outros modelos faz-se ainda necessário para comparação.

Nessa perspectiva, pesquisas aliando esses marcadores e novos desenvolvimentos de ferramentas e métodos analíticos que possibilitem uma avaliação de forma menos invasiva, sensível, rápida e simples, com janelas de detecção cada vez menores, vêm assumindo um papel relevante no avanço da investigação. Estaremos, provavelmente, em condições de relacionar o ambiente redox avaliado em indivíduos com diferentes aspectos demográficos, clínicos e nutricionais, de entender os mecanismos do estresse oxidativo, bem como de prevenir ou minimizar os efeitos das doenças oriundas dos mesmos, realizando diagnósticos antecipados.

## AGRADECIMENTOS

Aos órgãos financiadores PADCT/CNPq/CTINFRA, MCT, MS, Fundação de Amparo à Pesquisa de Alagoas (FAPEAL), Banco do Nordeste do Brasil (BNB), PPSUS/CNPq/SESAU/FAPEAL, CAPES/COFECUB, Instituto do Milênio-INOFAR e RENORBIO/CNPq. Ao Prof. N. A. Soares, pela revisão da linguagem, ao Prof. E. J. H. Bechara pela cuidadosa revisão e constantes discussões na área e aos revisores do presente artigo pelos valiosos comentários.

## LISTA DE ABREVIÇÕES

AAPH:	2,2'-Azobis(2-metilpropanoamida)
ABAP:	Dicloridrato do 2,2'-azobis-(2-metilpropanoamida)
ABTS:	2,2-Azinobis-(3-etilbenzotiazolona-6-sulfonato, sal de diamônio)
AGEs:	"Advanced Glycation End products". Produtos finais de glicação avançada.
AIDS:	Síndrome de deficiência imunológica adquirida
AMVN:	2,2'-Azobis-2,4-pentanonitrila
AO:	Antioxidante
ATBC:	"Alpha-Tocopherol and Beta-Carotene Lung Cancer Prevention Study"
AUC:	"Area-under-curve". Área sob a curva
CAT:	Catalase
CAOT:	Capacidade Antioxidante Total
CARET:	"Carotene and Retinol Efficacy Trial"
CCl <sub>4</sub> :	Tetracloro de carbono
(CHOH)n:	Hidrocarboneto
DAC:	Doença Arterial Coronariana
8-OH-dG:	8-hidroxi-desoxiguanosina
DNFH:	Dinitrofenilidrazina
DPOC:	Doença pulmonar obstrutiva crônica

DTNB:	5,5'-Ditiobis (2-nitro-5-ácido tiobenzóico)
EDTA:	Ácido etilenediaminotetra-acético
ER:	Espécies Reativas
ERO:	Espécies Reativas de Oxigênio
ERN:	Espécies Reativas de Nitrogênio
ESR:	"Electron Spin Resonance". Ressonância de spin de elétron
Fe <sup>3+</sup> -TPTZ:	Ferri-tripiridiltriazina
Fe <sup>2+</sup> -TPTZ:	Ferroso-tripiridiltriazina
FL:	Frutose-lisina
FRAP:	"Ferric-Reducing Ability of Plasma" – Habilidade plasmática de reduzir o sal férrico
GC/NICI-MS:	"Gas chromatography/negative ion chemical ionization – mass spectrometry": cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas com ionização química negativa
GPx:	Glutaciona Peroxidase
GR:	Glutaciona Redutase
GSH:	Glutaciona reduzida
GSSG:	Glutaciona oxidada
GT:	Glutaciona Transferase
Hb:	Hemoglobina
HIV+:	Pacientes soropositivos em relação ao HIV ("Human Immunodeficiency Virus")
HNE:	Hidroxinonenal
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	Peróxido de hidrogênio
HPLC:	"High Performance Liquid Chromatography" - Cromatografia líquida de alta eficiência
INT:	2-(4-Iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-cloreto de feniltetrazol
LH:	Ácido graxo poli-insaturado
MDA:	Malondialdeído
NEM:	N-Etilmaleimidina
ORAC:	"Oxygen Radical Absorbance Capacity" – Capacidade de absorvância do radical oxigênio
PE:	"Phycocerythrin"- Ficoeritrina
PhGPx:	Fosfolipídica glutaciona peroxidase
Ptna:	Proteína
R:	Radical
RONS:	"Reactive oxygen and nitrogen species"- Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio
SOD:	Superóxido dismutase
TBA:	Ácido tiobarbitúrico
TBARS:	"Thiobarbituric Reactive Substances" - Substâncias Reativas do Ácido Tiobarbitúrico.
t-BOOH:	terc-Butil-hidroperóxido
TCNQ:	Tetracianoquinodimetano
TEAC:	"Trolox Equivalent Antioxidant Capacity" – Capacidade antioxidante equivalente ao trolox
TS:	Transferrina sérica
TRAP:	"Total Radical - Trapping Antioxidant Parameter". Parâmetro antioxidante relacionado à captura total de radicais
TROLOX:	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
TTF:	Tetratiofulvaleno
XD:	Xantina desidrogenase
XO:	Xantina oxidase

## REFERÊNCIAS

- Schafer, F. Q.; Buettner, G. R.; *Free Radical Biol. Med.* **2001**, *30*, 1191.
- Grow, A. J.; Ischiropoulos, H. J.; *J. Cell. Physiol.* **2001**, *187*, 277.

3. Finkel, T.; Holbrook, N. J.; *Nature (London, U. K.)* **2000**, *408*, 239.
4. Wiseman, H.; *J. Nutr. Biochem.* **1996**, *7*, 2.
5. Barreiros, A. L. B. S.; David, J. M.; David, J. P.; *Quim. Nova* **2006**, *29*, 113.
6. Halliwell, B.; Murcia, M. A.; Chirico, S.; Aruoma, O. I.; *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1995**, *35*, 7.
7. Guerra, E. J. I.; *Anales Medicina Interna* **2001**, *18*, 326.
8. Zwart, L. L.; Meerman, J. H. N.; Commandeur, J. N. M.; Vermeulen, N. P. E.; *Free Radical Biol. Med.* **1999**, *26*, 202.
9. Gutteridge, J. M. C.; *Free Radical Res. Comm.* **1993**, *19*, 141.
10. Pagano, G.; Korkina, L. G.; Brunk, U. T.; Chessa, L.; Degan, P.; Del Principe, D.; Kelly, F. J.; Malorni, W.; Pallardó, F.; Pasquier, C.; Scovassi, I.; Zatteralle, A.; Franceschi, C.; *Medical Hypothesis* **1998**, *51*, 253.
11. LaBaer, J.; *J. Proteome Res.* **2005**, *4*, 1053.
12. Hill, B.; *Curr. Sep.* **2005**, *21*, 45.
13. Kadiiska, M. B.; Gladen, B. C.; Baird, D. D.; Dikalova, A.E.; Sohal, R. S.; Hatch, G. E.; Jones, D. P.; Mason, R. P.; Barrett, J. C.; *Free Radical Biol. Med.* **2000**, *28*, 838.
14. Kadiiska, M. B.; Gladen, B. C.; Baird, D. D.; Germolec, D.; Graham, L. B.; Parker, C. E.; Nyska, A.; Wachsmann, J. T.; Ames, B. N.; Basu, S.; Brot, N.; FitzGerald, G. A.; Floyd, R. A.; George, M.; Heinecke, J. W.; Hatch, G. E.; Hensley, K.; Lawson, J. A.; Marnett, L. J.; Morrow, J. D.; Murray, D. M.; Plastaras, J.; Roberts II, L. J.; Rokach, J.; Shigenaga, M. K.; Sohal, R. S.; Sun, J.; Tice, R. R.; van Thiel, D. H.; Wellner, D.; Walter, P. B.; Tomer, K. B.; Mason, R. P.; Barrett, J. C.; *Free Radical Biol. Med.* **2005**, *38*, 698.
15. Burtis, C. A.; Ashwood E. R.; *Tietz/Fundamentos de química clínica*, 4<sup>a</sup> ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2002.
16. Jacobs, J. M.; Adkins, J. N.; Qian, W.-J.; Liu, T.; Shen, Y.; Camp II, D. G.; Smith, R. D.; *J. Proteome Res.* **2005**, *4*, 1073.
17. Anderson, N. L.; Anderson, N. G.; *Mol. Cell Proteom.* **2002**, *1*, 845.
18. Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C.; *Free Radical in Biology and Medicine*, 3<sup>rd</sup> ed., Oxford University Press: Oxford, 2002; 4<sup>th</sup> ed., 2007.
19. Polidori, M. C.; Stahl, W.; Etchler, O.; Nistroj, I.; Sies, H.; *Free Radical Biol. Med.* **2001**, *30*, 456.
20. Ghiselli, A.; Serafini, M.; Natella, F.; Scaccini, C.; *Free Radical Biol. Med.* **2000**, *29*, 1106.
21. Prior, R. L.; Cao, G.; *Free Radical Biol. Med.* **1999**, *27*, 1173.
22. Cao, G.; Prior, R. L.; *Clin. Chem.(Washington, DC, U. S.)* **1998**, *44*, 1309.
23. Sánchez-Moreno, C.; *Food Sci. Tech. Int.* **2002**, *8*, 121.
24. Janaszewska, A.; Bartosz, G.; *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **2002**, *62*, 231.
25. Wayner, D. D. M.; Burton, G. W.; Ingold, K. U.; *FEBS Lett.* **1985**, *187*, 33.
26. Thérond, P.; Bonnefont-Rousselot, D.; Davit-Spraul, A.; Conti, M.; Legrand, A.; *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **2000**, *3*, 373.
27. Huang, D.; Ou, B.; Prior, R. L.; *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 1841.
28. Salvi, A.; Bbruhlmann, C.; Migliavacca, E.; Carrupt, P. A.; Hostettmann, K.; Testa, B.; *Helv. Chim. Acta* **2002**, *85*, 867.
29. Regoli, F.; Winston, G. W.; *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1999**, *156*, 96.
30. Benzie, I. F. F.; Strain, J. J.; *Anal. Biochem.* **1996**, *239*, 70.
31. Prior, R. L.; Hoang, H.; Gu, L.; Wu, X.; Bacchiocca, M.; Howard, L.; Hampsch-Woodill, M.; Huang, D.; Ou, B.; Jacob, R.; *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 3273.
32. Ziyatdinova, G. K.; Voloshin, A. V.; Gilmudtinov, A. K.; Budnikov, H. C.; Ganeev, T. S.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, *40*, 958.
33. Re, R.; Pelegrinni, N.; Protegentte, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C.; *Free Radical Biol. Med.* **1999**, *26*, 1239.
34. Niki, E.; Yoshida, Y.; *J. Med. Invest.* **2005**, *52 S.*, 228.
35. Bandy, B.; Bechara, E. J. H.; *J. Bioenerg. Biomembr.* **2001**, *33*, 269.
36. McCord, J.; Fridovich, I.; *J. Biol. Chem.* **1972**, *247*, 3170.
37. Misha, H. P.; Fridovich, I.; *J. Biol. Chem.* **1969**, *244*, 6049.
38. Netto, C. B.; Siqueira, I. R.; Portela, L. V.; Tavares, M. P.; Souza, D. O.; Giuliani, R.; Gonçalves, C. A.; *Clin. Biochem.* **2004**, *37*, 134.
39. Gaeta, L. M.; Tozzi, G.; Pastore, A.; Federici, G.; Bertini, E.; Piemonte, F.; *Clin. Chim. Acta* **2002**, *322*, 117.
40. Aebi, H.; *Meth. Enzymol.* **1984**, *105*, 121.
41. Rayman, M. P.; *Lancet* **2000**, *356*, 233.
42. Czuczajko, J.; Zachara, B. A.; Staubach-Topczewska, E.; Halota, W.; Kedziora, J.; *Acta Biochim. Pol.* **2003**, *50*, 1147.
43. Amaya-Farfan, J.; Domene, S. M. A.; Padovani, R. M.; *Rev. Nutr. Campinas* **2001**, *14*, 71.
44. Burk, R. F.; Levander, O. A. Em *Tratado de Nutrição Moderna na Saúde e na Doença*; Shils, M. E.; Olson, J. A.; Shike, M.; Ross, A. C., eds.; 9<sup>a</sup> ed., Manole: São Paulo, 2002, vol. I, cap. 14.
45. Mills, G. C.; *J. Biol. Chem.* **1957**, *229*, 189.
46. Mills, G. C.; *J. Biol. Chem.* **1958**, *589*, 189.
47. Paglia, D. E.; Valentine, W. N.; *J. Lab. Clin. Med.* **1967**, *70*, 158.
48. Pinto, R. E.; Bartley W.; *Biochem. J.* **1969**, *11*, 67.
49. Armstrong, D.; *Free Radical and Antioxidant Protocols*, Humana Press: New Jersey, 1998, vol. 108.
50. Alves, A.; Macedo, D. V.; Kubota, L. T.; *Anal. Biochem.* **2003**, *323*, 33.
51. Rover Jr., L.; Höehr, N. F.; Vellasco, A. P.; Kubota, L. T.; *Quim. Nova* **2001**, *24*, 112.
52. Sies, H.; *Free Radical Biol. Med.* **1999**, *27*, 916.
53. Arkeobom, T. P. M.; Sies H.; *Meth. Enzymol.* **1981**, *77*, 373.
54. Tietze, F.; *Anal. Biochem.* **1965**, *27*, 502.
55. Calvo-Marzal, P.; Chumbimuni-Torres, K. Y.; Hoehr, N. F.; Neto, G. D.; Kubota, L. T.; *Sens. Actuators, B* **2004**, *100*, 333.
56. Gandra, P. G.; Alves, A. A.; Macedo, D. V.; Kubota, L. T.; *Quim. Nova* **2004**, *17*, 980.
57. Turunen, M.; Olsson, J.; Dallner, G.; *Biochem. Biophys. Acta* **2004**, *1660*, 171.
58. Tang, P. H.; Miles, M. V.; De Grauw, A.; Hershey, A.; Pesce, A.; *Clin. Chem.(Washington, DC, U.S.)* **2001**, *47*, 256.
59. Theriault, A.; Chao, J.-T.; Wang, Q.; Gapor, A.; Adeli, K.; *Clin. Biochem.* **1999**, *32*, 309.
60. Buettner, G. R.; *Arch. Biochem. Biophys.* **1993**, *300*, 535.
61. Katepe, M.; *LCGC North Am.* **2004**, *22*, 362.
62. El-Gamey, A.; *Arch. Biochem. Biophys.* **2004**, *430*, 37.
63. Omenn, G. S.; Goodman, G. E.; Thornquist, M. D.; Balmes, J.; Cullen, M. R.; Glass, A.; Keogh, J. P.; Meyskens, F. L.; Valanis, B.; Williams, J. H.; Barnhart, S.; Hammar, S.; *N. Engl. J. Med.* **1996**, *334*, 1150.
64. Rapola, J. M.; Virtamo, J.; Ripatti, S.; Huttunen, J. K.; Albanes, D.; Taylor, P. R.; Heinonen, O. P.; *Lancet* **1997**, *349*, 1715.
65. Nirenberg, D. W.; *J. Chromatogr.* **1985**, *339*, 273.
66. Turnlund, J. R. Em ref. 44, vol. I, cap. 12.
67. Vasconcelos, S. M. L.; *Avaliação Nutricional de Enfermos nas Diversas Etapas da Vida*, 2<sup>a</sup> ed., EDUFAL: Maceió, 2003.
68. Fox, P. L.; Mukhopadhyay, C.; Ehrenwald, E.; *Life Sci.* **1995**, *56*, 1749.
69. Akaïke, T.; *Free Radical Res.* **2000**, *33*, 461.
70. Petersen, D. R.; Doorn, J. A.; *Free Radical Biol. Med.* **2004**, *37*, 937.
71. Giammaroli, S.; Filesi, C.; Sanzini, E.; *Ann. Ist. Super. Sanità* **1999**, *35*, 563.
72. McCall, M. R.; Balz, F.; *Free Radical Biol. Med.* **1999**, *26*, 1034.
73. Yoshina, K.; Matsuura, T.; Sano, M.; Saito, S.; Tomita, I. F.; *Chem. Pharm. Bull.* **1986**, *34*, 1694.
74. Holley, A. E.; Walker, M. K.; *Free Radical Biol. Med.* **1993**, *15*, 281.
75. Roberts, L. J.; Morrow, J. D.; *Free Radical Biol. Med.* **2000**, *28*, 505.
76. Shacter, E.; *Drug Metab. Res.* **2000**, *32*, 307.
77. Berlett, B. S.; Stadtman, E. R. E.; *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 20313.
78. Sobal, G.; Menzel, J.; Sinzinger, H.; *Prostaglandins, Leukotrienes Essent. Fatty-Acids* **2000**, *63*, 177.
79. Levine, R. L.; *Meth. Enzymol.* **1990**, *186*, 464.
80. Levine, R. L.; *Free Radical Biol. Med.* **2002**, *32*, 790.
81. Bradford, M. M.; *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248.
82. Radi, R.; Peluffo, G.; Alvarez, M. N.; Naviliat, M.; Cayota, A.; *Free Radical Biol. Med.* **2001**, *30*, 463.
83. Bonini, M. G.; Radi, R.; Ferrer-Sueta, G.; Ferreira, A. M. C.; Augusto, O.; *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 108092.
84. Trujillo, M.; Folkes, L.; Bartesaghi, S.; Kalyanaram, B.; Wardman, P.; Radi, R.; *Free Radical Biol. Med.* **2005**, *39*, 279.
85. Hensley, K.; Williamson, K. S.; Floyd, R. A.; *Free Radical Biol. Med.* **2000**, *28*, 520.
86. Rojas, E.; Lopez, M. C.; Valverde, M.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1999**, *722*, 225.
87. Fairbain, D. W.; Olive, P. L.; O'Neil, K. L.; *Mutat. Res.* **1995**, *339*, 37.
88. McKelvey-Martin, V. J.; Green, M. H. L.; Schemeyer, P.; Pool-Zobel, B. L.; De Méo, M. P.; Collins, A.; *Mutat. Res.* **1993**, *288*, 47.
89. Houtgraaf, J. H.; Vermissen, J.; Vander Giessen, W. J.; *Cardiovasc. Revasc. Med.* **2006**, *7*, 165.
90. Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M. T. D.; Mazur, M.; Telser, J.; *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2007**, *39*, 44.
91. Young, I. S.; *Free Radical Biol. Med.* **1994**, *16*, 397.
92. Lovell, M. A.; *Neurology* **1995**, *45*, 1594.
93. Sundaram, R. K.; *Clin. Sci.* **1996**, *90*, 255.
94. Pedro-Botet, J.; Covas, M. I.; Martin, S.; Rubies-Prat, J.; *Hypertension* **2000**, *14*, 343.
95. Rédon, J.; Oliva, M. R.; Tormos, C.; Giner, V.; Chaves, J.; Iradi, A.; Sáez, T.; *Hypertension* **2003**, *41*, 1096.
96. Khullar, J. Relan, V.; Sherawat, B. S.; *Hypertension* **2004**, *43*, 7.
97. Vitzthum, F.; Behrens, F.; Anderson, N. L.; Shaw, J. H.; *J. Proteome Res.* **2005**, *4*, 1086.
98. Frei, B.; *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1995**, *35*, 83.
99. Abuja, P. M.; Albertini, R.; *Clin. Chim. Acta* **2001**, *306*, 7.