



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DO STRESS OXIDATIVO EM  
SERES VIVOS, ESTADO DA ARTE 2015**

Trabalho submetido por  
**Mariana Ferreira Toste**  
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

**Março de 2016**





**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DO STRESS OXIDATIVO EM  
SERES VIVOS, ESTADO DA ARTE 2015**

Trabalho submetido por  
**Mariana Ferreira Toste**  
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por:  
**Prof. Doutora Zilda Braga Morais**

**Março de 2016**

## **Agradecimentos**

A elaboração desta dissertação não teria sido possível sem o apoio e orientação de diversas individualidades intervenientes na minha vida académica. Demonstro, desde já, o desejo em expressar a minha profunda gratidão e reconhecimento a todos aqueles que contribuíram, decisivamente, na minha formação, quer a nível académico e profissional, quer a nível pessoal.

Um agradecimento especial à minha orientadora Prof. Doutora Zilda Morais pela oportunidade, compreensão, apoio e disponibilidade.

Aos meus pais, António e Fátima, pelo apoio, compreensão e carinho prestados ao longo destes anos.

Esta dissertação estaria, indubitavelmente, incompleta se não reconhecesse o apoio, amizade e o entusiasmo prestados pelas minhas amigas, as Binas. Agradeço-vos pelo alento, amabilidade, ajuda, momentos de riso e descontração, adoro-vos de todo o meu coração.

Um agradecimento muito sentido, especial e apaixonante, ao meu namorado Gustavo Silva. Agradeço-te por suportares os meus defeitos, tolerares os meus humores e, principalmente, por entenderes-me.

Grata a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, na minha formação académica.

## Resumo

A determinação do *stress* oxidativo tem sido alvo de intensos estudos nos últimos anos, devido ao seu elevado potencial de impacto na saúde humana.

No presente trabalho realizou-se uma revisão bibliográfica sobre os principais métodos de medição do *stress* oxidativo em seres vivos entre 2010 e 2015.

De modo a situar o tema, descreveu-se inicialmente o conceito de *stress* oxidativo e as principais doenças associadas. A seguir apresentaram-se as principais espécies de radicais responsáveis por oxidação, os principais agentes antioxidantes, enzimáticos e não enzimáticos, e os principais biomarcadores de avaliação do *stress* oxidativo.

Em relação aos métodos analíticos, procedeu-se ao seu agrupamento de acordo com o analito em causa. No âmbito das espécies reativas de oxigénio (ROS) e azoto (RNS), apresentam-se as principais sondas fluorescentes e quimioluminescentes, nomeadamente lucigenina, hidroetidina (DHE) e MitoSOX, características da medição de radical superóxido, assim como as relativas à determinação do peróxido de hidrogénio, nomeadamente diclorofluoresceína (DCFH-DA), *HyPer*, boronato e Amplex red (AmR). Ainda no âmbito de ROS abordou-se a ressonância de spin electrónico (ESR), que se destaca por detetar os radicais livres envolvidos na auto-oxidação. A propósito de RNS, são comentadas a diaminofluoresceína (DAF2-DA) e a dihidrorodamina (DHR), como meios de determinação dos níveis de monóxido de azoto e peroxinitrito, respectivamente. Relativamente aos biomarcadores, apresentam-se os métodos de análise dedicados à detecção dos F2-isoprostanos, hidroperóxidos de lípidos, e malondialdeído (MDA), associados à peroxidação lipídica, e aqueles referentes aos derivados hidroxilados da guanosina, utilizados na determinação do dano oxidativo no DNA e RNA. Os métodos cromatográficos, hifenados com espectroscopia de quimioluminescência, de fluorescência, e espectrometria de massa (MS/MS), além de detectores electroquímicos (ECD), são os mais frequentemente utilizados, juntamente com os imunoenaios enzimáticos (ELISA). No que respeita aos antioxidantes, a diversidade de metodologias é mais evidente, embora prevaleçam os métodos por cromatografia líquida.

**Palavras-chave:** *stress* oxidativo, determinação de espécies reativas de oxigénio e de azoto, peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e ácidos nucleicos, antioxidantes.

## **Abstract**

The determination of oxidative stress has been the main target of interest in studies during the last years, because of its high potential impact in human health.

In the present work was made a bibliographic revision about the principal methods of measuring the oxidative stress in human beings between 2010 and 2015.

To situate the theme, initially was described the concept of oxidative stress and the main diseases associated with it. Afterwards was presented the principal species of free radicals responsible for the oxidation, the antioxidant agents, enzymatic and non enzymatic, and the main bio marker of evaluation of oxidative stress.

Regarding the analytical methods, it was proceeded by its grouping according with the analyte in cause. In this regard of the reactive species of oxygen (ROS) and nitrogen (RNS), are presented the principal fluorescent and chemiluminescent probes, more concretely lucigenin, dihydroethidium DHE, and MitoSox, all characterized of the measurement of the superoxide, just like the relative to the determination of hydrogen peroxide as 2', 7'- dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA), boronate and Amplex Red. Still in the regard of the ROS, was approached the electron spin resonance (ESP), that appears by the detection of the free radicals involved in the auto oxidation.

About the RNS, are shown the 4,5-diaminofluorescein (DAF2-DA) and the dihydroethidium fluorescent probes as a method of determination of the level of NO and peroxynitrite, respectively.

For biomarkers, the current work, presents the analysis methods dedicated to the detection of F2-isoprostanes, lipid hydroperoxides and malondialdehyde (MDA) associated with lipid peroxidation, and those relating to the hydroxylated derivatives of guanosine, used to determine the oxidative damage DNA and RNA. Chromatographic methods, hyphenated with chemiluminescence spectroscopy, fluorescence, and mass spectrometry (MS/MS), and electrochemical detection (ECD) is the most frequently used along with the enzymatic immunoassays (ELISA).

With regard to antioxidants, diversity methodologies is most evident, although the methods overridden by liquid chromatography.

**Keyword:** oxidative stress, determination of reactive oxygen species and nitrogen, lipid peroxidation, protein oxidation, and nucleic acids, antioxidants.

## Índice

Agradecimentos .....	2
Resumo .....	3
Abstract .....	4
Capítulo I - Introdução teórica.....	9
1. Objetivo e âmbito .....	9
1.1. <i>Stress</i> Oxidativo .....	9
1.2. Peroxidação Lipídica.....	10
1.3. <i>Stress</i> oxidativo e a doença.....	12
1.4. Radicais livres .....	13
1.4.1. Espécies reativas de oxigénio .....	15
1.4.2. Espécies reativas de azoto .....	25
1.5. Antioxidantes .....	27
1.5.1 Antioxidantes enzimáticos .....	29
1.5.2. Antioxidantes não enzimáticos .....	31
1.7. Biomarcadores .....	34
Produtos oxidativos de DNA, lípidos, e proteínas .....	36
Capitulo II - Revisão dos métodos de determinação do <i>stress</i> oxidativo .....	41
2. Métodos para determinação de espécies reativas de oxigénio e azoto .....	41
2.1 Sondas Fluorescentes e quimioluminescentes para determinação ROS .....	42
2.2 Sondas Fluorescentes e quimioluminescentes para determinação RNS.....	49
2.3 Ressonância paramagnética electrónica com a técnica de ‘ <i>spin trapping</i> ’ ....	51
3. Métodos de determinação de biomarcadores.....	55
3.1. Determinação de marcadores de peroxidação lipídica .....	57
3.2. Determinação F2-isoprostanos .....	59
3.3 Determinação Hidroperóxidos .....	63
3.4. Determinação Malondialdeído .....	65
4. Determinação de danos no DNA .....	68
5. Determinação de danos no RNA .....	71
6. Determinação de antioxidantes .....	73
6.1. Determinação Ácido ascórbico .....	75
6.2. Determinação $\alpha$ -Tocoferol.....	79
6.3 Determinação Glutationa e Dissulfureto de Glutationa.....	81
Capítulo III – Considerações finais.....	85
Bibliografia.....	86
Anexos.....	98

## Índice de Figuras

Figura 1 – Esquema da formação de subprodutos ligados à decomposição de hidroperóxidos lipídicos. Adaptado (Bradley-Whitman & Lovell, 2015).....	12
Figura 2 – Reação que traduz a dismutação. Adaptado de (Barreiros et al., 2006).....	18
Figura 3 – Reação que traduz a formação de radical hidroxilo (OH <sup>•</sup> ), devido à reação entre metais de transição e peróxido de hidrogénio. Adaptado (Barreiros et al., 2006).....	19
Figura 4 – Formação de radical hidroxilo por exposição da água a radiação ionizante. Adaptado (Barreiros et al., 2006).....	20
Figura 5 – Exemplo de uma reação de decomposição de peroxinitrito. Adaptado (Pisoschi & Pop, 2015).....	27
Figura 6 – Reação que traduz a conversão de peróxido de hidrogénio em água e oxigénio, pela ação da catalase. (adaptado de K. Rahman, 2007).....	30
Figura 7 – Reações que traduzem a decomposição do peróxido de hidrogénio e do hidroperóxido, pela ação de enzimas glutathiona peroxidase (adaptado de Flora, 2009).....	31
Figura 8 - Estrutura de 7,8-oxo-2'-deoxyguanosine e 8-oxo-guanosina. A oxidação do DNA e do RNA ocorre comumente na porção de guanosina, levando a 8-oxo-2'-deoxyguanosine e 8-oxo-guanosina, respetivamente. Adaptado (Frijhoff et al., 2015).....	37
Figura 9 – Mecanismo de formação de F <sub>2</sub> -IsoPs e IsoFs.....	39

## Índice de Tabelas

Tabela 1 - Espécies reativas de oxigénio agrupadas em espécies radicais e não radicais.....	17
Tabela 2 – Exemplos de fontes exógenas e endógenas de ROS (Nathan & Cunningham-Bussel, 2013).....	22
Tabela 3 - Espécies Reativas de azoto (adaptado de (Adly, 2010)).....	25
Tabela 4 – Principais grupos de antioxidantes. Adaptado (Flora, 2009).....	29
Tabela 5 - Resumo de sondas fluorescentes e quimioluminescentes para determinação ROS.....	43
Tabela 6 – Resumo das sondas fluorescentes e quimioluminescentes para determinação RNS.....	50
Tabela 7 – Resumo sobre as principais técnicas aplicadas na determinação de biomarcadores.....	56
Tabela 8 - Resumo dos métodos de determinação de ácido ascórbico.....	73
Tabela 9 - Resumo dos métodos de determinação $\alpha$ -tocoferol.....	74
Tabela 10 - Resumo dos métodos de determinação de GSH e GSSG.....	75

## Lista de Abreviaturas e Acrónimos

<b>A</b>	ARA	Ácido araquidónico	DTT	<i>Dithiothreitol</i>	
	ACR	Acroleína	ELISA	Ensaio imunoenzimático	
<b>B</b>	BEH	Sílica híbrida com pontes de etileno	ETDA	Ácido etilendiamino tetra-ácido	
	BMPO	<i>5-tert-butoxycarbonyl-5-methyl-1-pyrroline-N-oxide</i>	ESR	Ressonância de <i>spin</i> electrónico	
<b>C</b>	CC	Cromatografia capilar	<b>E</b>	ESCODD	<i>The European Standards Committee on Oxidative DNA Damage</i>
	CuZnSOD	Superóxido dismutase com cobre e zinco		EPR	Ressonância paramagnética electrónica
<b>C</b>	CMH	<i>1-hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine</i>	G	Guanina	
	CPH	<i>1-hydroxy-3-carboxy-2,2,5-tetramethylpyrrolidine hydrochloride</i>	GS-EI-MS	Cromatografia gasosa acoplada a um espectrómetro de massa com ionização por impacto electrónico	
<b>D</b>	DCF	Diclorofluoresceína	GC	Cromatografia gasosa	
	DCFH-DA	Diclorofluoresceína diacetato	<b>G</b>	GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada ao espectrómetro de massa
DCFH <sub>2</sub>	Dihidrocliclorofluoresceína	GC-MS/MS		Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa tandem	
<b>D</b>	DEPMPO	<i>Diethoxyphosphoryl</i>	<b>G</b>	GC-NICI-MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa por ionização química de iões negativos
	dG	Desoxiguanosina		4-HNE	4-hidroxi-2-nonenal
<b>D</b>	DHA	Ácido docosa-hexaenóico	<b>H</b>	HPLC	Cromatografia líquida alta eficiência
	DHAA	Ácido dehidroascórbico		HPLC-ECD	Cromatografia líquida de alta eficiência associada com electroquímica
<b>D</b>	DHE	Hidroetidina			
	DEPP	<i>Diphenylpyrenylphosphine</i>			
<b>D</b>	DMPO	<i>5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide</i>			
	DNA	Ácido desoxirribonucleico			
<b>D</b>	DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina			
	DTE	<i>Dithioerythritol</i>			

	HPLC-ESI-MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectrómetro de massa com ionização por Electrospray	8-OHdG	8-hidroxi-2-desoxiguanosina	
			8-OHGua	8-hidroxi-2-guanosina	
			PGs	Prostaglandinas	
			PLE	Extração líquida pressurizada	
	HPLC-FLR	Cromatografia líquida alta eficiência combinada com detetor de fluorescência	<b>P</b>	PP	Precipitação de proteínas
				PSA	Antigénio específico da próstata
	HPLC-MS/MS	Cromatografia líquida		PUFA	Ácido gordo polinsaturado
	HPLC-PDA	Cromatografia líquida alta eficiência combinada com detetor de fotodiodos		RNA	Ácido ribonucleico
<b>I</b>	IsoFs	Isofluranos	<b>R</b>	ROS	Espécies reativas de oxigénio
	IsoPs	Isoprostanos		RNS	Espécies reativas de azoto
	LC	Cromatografia líquida		ROMs	Metabólitos de oxigénio reativos
	LC-MS	Cromatografia líquida acoplada ao espectrómetro de massa		SIM	Monitorização iónica selecionada
<b>L</b>	LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria da massa tandem	<b>S</b>	SOD	Superóxido dismutase
	LLE	Extração líquido-líquido		SPE	Extração de fase sólida
	LLME	Micro extração líquido-líquido		TCEP	<i>tris(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride</i>
<b>M</b>	MDA	Maloaldeído	<b>T</b>	TBA	Ácido tio barbitúrico
	MS	Espectrómetro de massa		TBARS	Espécies reativas do ácido tio barbitúrico
	NADP	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphatase		UAc	Ácido úrico
<b>N</b>	NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphatase hydrogenase	<b>U</b>	UHPLC	Cromatografia de ultra alta pressão líquida
<b>O</b>	OGG1	8-Oxoguanina glicolase 1			

## Capítulo I - Introdução teórica

### 1. Objetivo e âmbito

A presente dissertação de mestrado tem como desígnio a elaboração de uma revisão bibliográfica sobre os principais métodos de determinação do *stress* oxidativo em seres vivos, estado da arte 2015.

De forma a cumprir os objetivos da presente dissertação realizou-se, em primeiro lugar, uma pesquisa exaustiva do estado de arte, restrito ao intervalo entre 2010 e 2015, recorrendo às principais bases de dados deste domínio da investigação, nomeadamente o Pubmed, Google Académico e Scielo, e consultando, de forma pontual, artigos relevantes ao tema, publicados fora do intervalo temporal supramencionado, para o devido enquadramento do objeto de estudo. Para a revisão de literatura utilizaram-se os termos ‘*stress* oxidativo’, ‘espécies reativas de oxigénio’, ‘antioxidantes’, ‘métodos de *stress* oxidativo’, bem como seus correspondentes em inglês. A variedade dos termos utilizados permitiu uma abrangência significativa, pois era intuito realizar uma ampla busca sobre o tema.

Nos critérios de seleção de artigos científicos, relativamente aos métodos de determinação, foram selecionadas publicações a partir do ano de 2010, embora, tendo sido utilizados alguns artigos anteriores a essa data na caracterização introdutória do *stress* oxidativo. Foram incluídos, sobretudo, artigos de revisão na realização da introdução, de determinação do *stress* oxidativo.

Atualmente, ao introduzirmos o termo ‘*stress* oxidativo’ no Google académico, aparece um total de 27.300 resultados. No Pubmed um total de 151.861 resultados, e cerca de 32.000 artigos o *stress* oxidativo é nomeado no título, sendo artigos de revisão cerca de 3500. Por último, Scielo com 827 resultados, dos quais apenas 4 artigos são de autoria Portuguesa, dos quais 3 são artigos de revisão.

#### 1.1. *Stress* Oxidativo

‘*Stress*’ pode ser definido como um processo de alteração da homeostase bioquímica com origem fisiológica, psicológica ou em fatores externos, como o *stress* ambiental. A presença de um fator de *stress* conduz à ativação de mecanismos de regulação neuro-hormonais do organismo, através dos quais se mantém a homeostase (Rahal et al., 2014). O termo "*stress*" foi usado pela primeira vez na literatura biomédica como uma descrição

da hiperatividade no sistema hormonal, em particular sobre os corticosteroides do córtex adrenal (Breitenbach & Eckl, 2015). Mais importante ainda, o *stress* é um dos fatores etiológicos básicos de várias doenças, podendo este ter variadas origens, como por exemplo: os extremos ambientais, frio ou calor, hipóxia, o exercício físico ou desnutrição (Rahal et al., 2014).

O '*stress oxidativo*', definido em 1985, é um conceito na área de investigação da biologia e medicina redox. Segundo Sies, pioneiro no assunto, "consiste num distúrbio pró oxidante ao equilíbrio antioxidante em favor das espécies oxidantes, que pode ser causa de potenciais efeitos prejudiciais" (Sies, 2015).

De acordo com a definição, desequilíbrio redox é outra designação para o *stress oxidativo*, é baseado na equação de Nernst, tendo em consideração todos os pares redox presentes na célula ou nos diferentes sub-compartimentos celulares (Breitenbach & Eckl, 2015). Segundo Lushchak, "O *stress oxidativo* ocorre quando a concentração de espécies reativas de oxigénio, em estado constante ou invariável, é transitoriamente ou permanentemente aumentada, perturbando o metabolismo celular e sua regulação, e lesando constituintes celulares" (Lushchak, 2014). Por outro lado, este conceito é, por conseguinte, impreciso, porque diferentes situações biológicas criam diferentes misturas destas espécies moleculares, conseqüentemente, cada uma com seu próprio espectro de reatividade com diferentes biomoléculas (Lambeth & Neish, 2014).

Assim, o *stress oxidativo* pode ser visto como um desequilíbrio entre os pro-oxidantes e antioxidantes no organismo (Rahal et al., 2014), com predomínio da ação oxidante e dano conseqüente. Este promove alterações como peroxidação lipídica, fragmentação de DNA e oxidação de diferentes moléculas, levando à apoptose (França et al., 2013). Contudo, dado que o processo oxidativo ocorre regularmente na célula, é crucial à vida e morte desta (Noori, 2012).

## **1.2. Peroxidação Lipídica**

É uma sequência de reações bioquímicas resultantes da ação de radicais livres sobre os lípidos insaturados das membranas celulares, que, conseqüentemente, podem causar deteriorações nessas membranas, por meio duma perturbação da organização da membrana, geralmente manifestadas pela alteração de fluidez, integridade e permeabilidade (Milne, Yin, Hardy, Davies, & Ii, 2012; França et al., 2013).

Em contraste com o metabolismo lipídico enzimático controlado, peroxidação lipídica é um processo não enzimático que prossegue de uma forma não específica, caracterizado por três fases distintas: a iniciação, propagação e terminação (Bradley-Whitman & Lovell, 2015).

O mecanismo da peroxidação lipídica começa normalmente com a extração de um átomo de hidrogénio de uma cadeia polinsaturada de um lípido, por intermédio da ação de uma espécie reativa como o HO<sup>•</sup> ou o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, formando-se um radical lipídico (L<sup>•</sup>). Citando Ferreira & Abreu (2007), este ataque é seguido pela adição de uma molécula de O<sub>2</sub> formando-se um radical peróxilo (LOO<sup>•</sup>). Se este radical não for neutralizado pelas defesas antioxidantes, vai rapidamente desencadear um fenómeno de propagação da peroxidação lipídica reagindo com outros lípidos adjacentes e formando lípidos hidroperóxidos (LOOH). Estes compostos podem facilmente ser decompostos para formar novamente radicais L<sup>•</sup> (I. Ferreira & Abreu, 2007).

Por sua vez, os subprodutos secundários da peroxidação em apreço, ou em consideração, podem ser categorizados como produtos dum rearranjo lipídico oxigenado ou subprodutos da decomposição de hidroperóxido (Bradley-Whitman & Lovell, 2015).

Os produtos de rearranjo de lípidos oxigenados incluem: isómeros isoprostano (ISOP), que derivam de ácidos gordos polinsaturado (PUFAs) e de ácido araquidónico (ARA); e isómeros neuroprostano (NeuroP) (Bradley-Whitman & Lovell, 2015).

Embora os ARA e DHA derivem da decomposição de hidroperóxido, esta produz, ainda, uma considerável variedade de subprodutos secundários. Os subprodutos da decomposição de hidroperóxido que são estudados com maior frequência incluem, nomeadamente malondialdeído (MDA), acroleína (ACR), 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE), e 4-hidroxi-2-hexenal (HHE) como está representado na Figura 1 (Bradley-Whitman & Lovell, 2015).

Atualmente, os mecanismos e produtos de peroxidação de lípidos têm sido extensivamente estudados e são agora razoavelmente bem compreendidos. Uma das características da peroxidação lipídica é que esta prossegue de forma não específica. A produção excessiva de produtos de peroxidação lipídica tem sido implicada na patogénese de uma série de patologias (Niki, 2013).

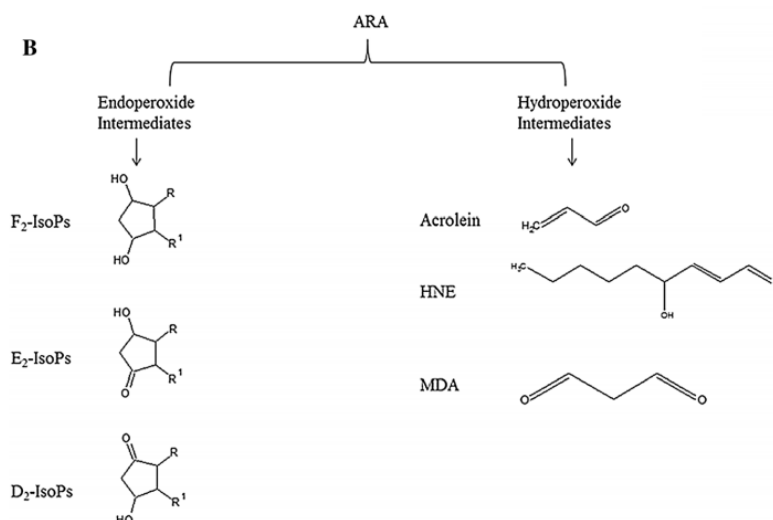


Figura 1 – Esquema da formação de subprodutos ligados à decomposição de hidroperóxidos lipídicos.  
Adaptado (Bradley-Whitman & Lovell, 2015)

### 1.3. Stress oxidativo e a doença

A ligação entre o *stress* oxidativo e doença tem sido reconhecida há várias décadas (Lambeth & Neish, 2014).

Esta relação envolve uma gama de patologias e desordens no organismo (Gaman, Buga, Gaman, & Popa-Wagner, 2014). Do mesmo modo, está fortemente associado à fisiopatologia de numerosas patologias e doenças de carácter crónico/degenerativo, assim como às alterações degenerativas teciduais que caracterizam o envelhecimento orgânico (F. Ferreira, Ferreira, & Duarte, 2007). Consequentemente, a sobreprodução de ROS tem sido inclusivamente relacionada com o processo de envelhecimento (F. Ferreira et al., 2007; Jacob, Noren Hooten, Trzeciak, & Evans, 2013).

O *stress* oxidativo e os radicais livres, contribuem consecutivamente para envelhecimento e desenvolvimento de patologias, nomeadamente, cardiovasculares, doenças inflamatórias crónicas, pulmonares, diabetes, depressão, cataratas, doenças neurodegenerativas, como o Alzheimer, Parkinson, Doença de Huntington, esclerose lateral amiotrófica e, por fim, cancro (Jones, 2006; Jacob et al., 2013; Rahal et al., 2014; Van'T Erve et al., 2015; Lichtenberg & Pinchuk, 2015; Breitenbach & Eckl, 2015; Pisoschi & Pop, 2015; Black, Bot, Scheffer, Cuijpers, & Penninx, 2015; Pérez-Rodríguez et al., 2015; Bar-Or, Bar-Or, Rael, & Brody, 2015). Entre os diferentes órgãos do corpo, o cérebro é particularmente vulnerável ao *stress* oxidativo (Rahal et al., 2014), devido à sua elevada taxa de utilização de oxigénio, às enzimas antioxidantes mais fracas, ao alto

teor de ácidos gordos poli-insaturados facilmente oxidados, e à característica de terminal-diferenciação de neurónios (Li, O, Jiang, & Ghanbari, 2013).

Os radicais livres de oxigénio, em especial o anião radical superóxido, radical hidroxilo, são iniciadores potentes da peroxidação de lípidos, que, por sua vez, é causa fatal e estabelecida na patogénese de uma vasta gama de doenças (Rahal et al., 2014).

O *stress* oxidativo está correlacionado com mais de 100 doenças, quer seja como fonte ou como resultado (Pisoschi & Pop, 2015; Pérez-Rodríguez et al., 2015). Atualmente, é universalmente aceite que o *stress* oxidativo faz mesmo parte, não está apenas associado, do grande processo de envelhecimento celular (Rahal et al., 2014; Breitenbach & Eckl, 2015), e é reconhecido como um factor etiológico de diversas patologias (Rocha, 2008).

Assim, tendo em conta o suposto envolvimento do *stress* oxidativo numa ampla gama de patologias (Bar-Or et al., 2015), os antioxidantes tornaram-se muitos populares como prevenção, melhoria ou cura de um grande número de situações patológicas (Lichtenberg & Pinchuk, 2015; Raposo, Morais, & Morais, 2015). Algumas das estratégias de controlo de patologias, nomeadamente das neurodegenerativas, têm sido focadas pelo desenvolvimento de antioxidantes como moléculas terapêuticas e preventivas. Estes incluem a vitamina C, vitamina E, glutathione, coenzima Q (CoQ), carotenóides, melatonina, e entre outros (Li et al., 2013).

Até à data, a medição do grau de *stress* oxidativo não está implementado na prática clínica, devido ao facto de não existir nenhum método padronizado aceite, para medir o estado de *stress* oxidativo e peroxidação lipídica em seres humanos (Kurutas, Gumusalan, Cetinkaya, & Dogan, 2015).

#### **1.4. Radicais livres**

Um átomo é composto por um núcleo central com pares de eletrões na sua órbita (Yoshikawa & Naito, 2002).

Os radicais livres são átomos, moléculas ou iões com eletrões não emparelhados que são altamente instáveis e ativos para reações químicas com outras moléculas (Carocho & Ferreira, 2013).

Os radicais são definidos pela presença de um único eletrão não emparelhado na orbital exterior (Lambeth & Neish, 2014; Weidinger & Kozlov, 2015), ou como moléculas ou fragmentos moleculares que contenham um ou mais eletrões não emparelhados nas

orbitais atômicas ou moleculares (Fonseca, 2013; Milne et al., 2012), tornando-os altamente reativos (Zakkar, Guida, Suleiman, & Angelini, 2015), capazes de iniciar reações em cadeia, que por sua vez, produzem novos radicais livres (Rocha, 2008).

O que define a instabilidade e elevada reatividade é o elétron desemparelhado (Lichtenberg & Pinchuk, 2015), porque estes tendem a formar pares com outros elétrons (Yoshikawa & Naito, 2002). Porém, alguns dos radicais não apresentam elétrons desemparelhados na orbital externa, contudo participam em reações de oxidação/redução (Cavalcante & Bruin, 2009).

Os radicais livres tendem, assim, a reagir com determinados compostos, sejam eles lípidos, proteínas e/ou DNA, consoante, a maior ou menor, suscetibilidade dos mesmos para o efeito. Estas reações tendem a levar à formação de novos radicais livres, no entanto, é importante referir que as reações em cadeia de radicais livres tendem a cessar com a extinção de um determinado tipo de radicais, os bi radicais. Adicionalmente, as reações com os outros componentes são muito rápidas e os produtos oriundos desta causam danos oxidativos, embora tais danos possam resultar de diferentes interações com os radicais livres. (Lichtenberg & Pinchuk, 2015).

Os radicais livres, em organismos aeróbios, são constantemente produzidos durante o funcionamento normal da célula, na maior parte sob a forma de espécies reativas de oxigénio (ROS) (I. Ferreira & Abreu, 2007). Os mecanismos de produção de radicais livres ocorrem, normalmente, nas mitocôndrias, membranas celulares e no citoplasma, e estes processos são favorecidos, especialmente, pelos íões de ferro e cobre.

Mais precisamente, a principal fonte de produção de radicais livres, por meio da cadeia transportadora de elétrons, é a mitocôndria. Adicionalmente, cerca de 2% a 5% do oxigénio metabolizado nas mitocôndrias, são desviados para outra via metabólica, e reduzidos de forma univalente, dando origem aos radicais livres. Além disso, outra fonte importante de radicais livres são as enzimas NADPH oxidases (Barbosa et al., 2010).

Nos processos aeróbicos, como a respiração celular, a exposição a infeções microbianas (que envolvem a ativação de fagócitos), durante a atividade física intensa ou a ação de poluentes/toxinas, tais como fumo de cigarro, álcool, ionizantes e radiações UV, pesticidas e ozono, formam-se os radicais livres (Pisoschi & Pop, 2015).

Porém, a produção de radicais livres constitui um processo contínuo e fisiológico, cumprindo funções biológicas relevantes (Barbosa et al., 2010). Estima-se que uma

pessoa em média tem cerca de 10.000 a 20.000 radicais livres, consecutivamente, a atacarem cada célula do corpo todos os dias (Fonseca, 2013).

São necessários para funções como a sinalização celular e a defesa contra microrganismos. Durante os processos metabólicos, esses radicais atuam como mediadores para a transferência de elétrons nas várias reações bioquímicas (França et al., 2013).

Uma vez produzidos, a maior parte dos radicais livres são removidos pelas defesas antioxidantes da célula. A manutenção do equilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes é uma condição essencial para o funcionamento normal do organismo (I. Ferreira & Abreu, 2007).

Aos radicais livres cujo elétron desemparelhado se encontra centrado nos átomos de oxigênio ou azoto, são denominados espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de azoto (RNS), respetivamente (França et al., 2013).

Por outras palavras, os radicais livres derivam de três elementos: oxigênio, azoto e enxofre. Assim, há lugar à criação de espécies reativas de oxigênio (ROS), espécies reativas de azoto (RNS) e espécies reativas de enxofre (RSS) (Carocho & Ferreira, 2013).

Ambos ROS e RNS são radicais livres ou compostos que produzem radicais livres por interação com vários componentes do corpo (Lichtenberg & Pinchuk, 2015). Os radicais derivados de oxigênio, tais como superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) representam a classe mais importante de espécies de radicais gerados em sistemas vivos (Fonseca, 2013).

A quantificação de radicais livres produzidos *in vivo* é difícil, devido à elevada reatividade e tempo de semi-vida muito curto. Por esta razão, os compostos relacionados com os lípidos e peroxidação de proteínas tem sido utilizados para avaliar o *stress* oxidativo (Garcez et al., 2014).

Ao longo deste trabalho é dada mais ênfase às espécies derivadas do oxigênio, uma vez que, são os que se encontram em maior número e influenciam inúmeros processos biológicos, com consequências diversas a nível orgânico.

#### **1.4.1. Espécies reativas de oxigênio**

A maioria dos radicais livres que prejudicam os sistemas biológicos são radicais livres de oxigênio, e estes são geralmente conhecidos como "espécies reativas de oxigênio" (ROS)

(K. Rahman, 2007). Representam a classe mais importante de radicais livres geradas pelo organismo (I. Ferreira & Abreu, 2007). A molécula de oxigénio é essencialmente não reativa, contudo, durante o metabolismo aeróbio as células produzem radicais livres de oxigénio (Rocha, 2008). Assim, podemos observar que apesar do oxigénio molecular ( $O_2$ ) ser essencial para a vida aeróbia, pode ser tóxico em determinadas condições. A este fenómeno chamamos o “paradoxo do oxigénio” (I. Ferreira & Abreu, 2007).

O termo "espécies reativas de oxigénio" inclui superóxido, peróxido de hidrogénio, oxigénio molecular, ozono, e peróxidos orgânicos (Milne et al., 2012; Nathan & Cunningham-Bussel, 2013).

As espécies reativas de oxigénio, derivadas dos radicais livres de oxigénio (Zakkar et al., 2015), são moléculas de vida curta, geradas pela redução parcial do oxigénio ( $O_2$ ) para formar superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), e radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ), bem como metabolitos secundários, incluindo peróxidos lipídicos (LOOH), peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), e ácido hipocloroso (HOCl) (Lambeth & Neish, 2014) (Tabela 1).

Em condições fisiológicas, ROS são produzidos especificamente para servir funções biológicas essenciais. Nestas condições, as taxas de produção de radicais livres e eliminação são iguais, o que leva a um estado estacionário que é presumivelmente tolerável pela célula (Fonseca, 2013).

Durante períodos de *stress*, os níveis de ROS podem aumentar drasticamente causando danos substanciais a muitas moléculas celulares, tais como lípidos, hidratos de carbono, proteínas, e DNA (Zakkar et al., 2015). Por outras palavras, estas espécies tem a capacidade de alterar macromoléculas biológicas (Gaman et al., 2014). Estudos *in vitro* comprovam que as ROS podem danificar o DNA, induzindo modificações pré-mutagénicas de nucleótidos e promovendo a oxidação de proteínas e peroxidação lipídica (Salganik, 2001). O DNA é um alvo altamente suscetível de radicais livres, o que conduz à oxidação de bases de DNA e do anel de açúcar ribose, que por consequência leva a cenários onde se verificam perdas de base e quebras de cadeia. A taxa de deterioração do DNA pelos radicais livres é estimada em 1000 a 1.000.000 de interações por dia numa única célula (Jacob et al., 2013).

Incluem formas radicais (superóxido) e formas não radicais de peróxido (peróxido de hidrogénio). Considerando que algumas espécies são altamente oxidantes e/ou podem produzir reações em cadeia de radicais livres, outras são oxidantes suaves, e algumas

podem até mesmo agir como redutores. Espécies como o radical hidroxilo, ácido hipocloroso, e o peroxinitrito, são altamente reativas com muitas biomoléculas, enquanto o peróxido de hidrogénio é um oxidante relativamente fraco (Lambeth & Neish, 2014). Em suma, as entidades mais agressivas de espécies reativas de oxigénio são os superóxidos (Salganik, 2001) e os radicais de hidroxilo (Breitenbach & Eckl, 2015).

Tabela 1 - Espécies reativas de oxigénio agrupadas em espécies radicais e não radicais

<b>Espécies Reativas de Oxigénio</b>	
<b>Radicais</b>	<b>Não Radicais</b>
Superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ )	Oxigénio singleto ( $^1O_2$ )
Hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ )	Ozono ( $O_3$ )
Peróxido ( $RO_2^{\cdot}$ )	Peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ )
Alcoxilo ( $RO^{\cdot}$ )	Ácido hipocloroso (HOCL)
Carbonato ( $CO_3^{\cdot-}$ )	Peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot}$ )

### ***Superóxido***

O radical superóxido é formado quando um eletrão entra na orbital  $\Pi^* 2p$  do oxigénio. Resulta de uma redução de eletrões de oxigénio devido a oxidases, como dihidro nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase, xantina oxidase, ciclooxigenase (Pisoschi & Pop, 2015).

Os aniões superóxidos também podem ser formados na cadeia de transporte mitocondrial de eletrões, no decorrer da fosforilação oxidativa que produz ATP (Pisoschi & Pop, 2015). O complexo I, NADH-ubiquinona oxidorreductase, e complexo III, ubiquinol-citocromo e oxidorreductase, são os dois locais para produção deste composto (Li et al., 2013). É enzimaticamente produzido por oxigenações dependentes de citocromo P450 no retículo endoplasmático do fígado, pulmão e intestino delgado e, na NADPH-oxidase localizada na membrana de células de fagócitos (Li et al., 2013).

O  $O_2^{\cdot-}$  pode atuar tanto como um oxidante suave e um redutor (Winterbourn, 2014), dependendo do potencial de oxidação-redução da biomolécula com o qual reage (Lambeth & Neish, 2014). É distinguido como um nucleófilo ativo, capaz de atacar centros carregados positivamente, e como um agente oxidante que pode reagir com os doadores de hidrogénio, como por exemplo, ascorbato e tocoferol. Adicionalmente, pode

dismutar, produzindo peróxido de hidrogénio e oxigénio molecular (Pisoschi & Pop, 2015). Em meio aquoso, a sua reação principal é a dismutação, na qual se produz uma molécula de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e uma molécula de O<sub>2</sub>, como é representado na equação da Figura 2 (Barreiros, David, & David, 2006). De facto, em solução aquosa é um forte agente redutor (França et al., 2013).

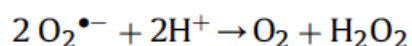


Figura 2 – Reação que traduz a dismutação. Adaptado de (Barreiros et al., 2006)

Apesar do anião superóxido não ser um radical muito ativo, pode interagir com outras moléculas e formar outros radicais normalmente designados ROS “secundários”, entre os quais o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e o radical OH<sup>•</sup> (I. Ferreira & Abreu, 2007). Contudo, é o precursor da maior parte das ROS e é mediador nas reações em cadeia de oxidação (Li et al., 2013).

### ***Peróxido de hidrogénio***

O peróxido de hidrogénio, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pode ser produzido por qualquer sistema que produz superóxido, enquanto o radical anião se desproporciona prontamente. Na presença de oxidases, como o urato oxidase, glucose oxidase, D-aminoácido oxidase, pode resultar numa síntese direta de peróxido de hidrogénio, por transferência de dois eletrões para o oxigénio molecular. Como resultado da sua interação com iões metálicos, é capaz de produzir radicais altamente reativos. A ação direta do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> envolve o ataque à estrutura de proteínas heme com a liberação de ferro, a inativação da enzima e oxidação do DNA, lípidios, grupos -SH, e cetoácidos (Pisoschi & Pop, 2015).

Contrariamente aos radicais livres, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tem uma vida longa e é capaz de atravessar as membranas celulares, sendo potencialmente tóxico para as células. Do mesmo modo, a toxicidade é aumentada pela presença de ferro (Barbosa et al., 2010).

Isoladamente é praticamente inócuo, porém pode-se difundir facilmente através das membranas celulares como, por exemplo, a membrana do núcleo. Devido ao fato da célula possuir metais de transição, ocorre produção do radical OH<sup>•</sup> no seu interior, como é representado na equação da Figura 3. No organismo, os metais de transição mais importantes para a ocorrência desta reação são Cu<sup>1+</sup> e Fe<sup>2+</sup> (Barreiros et al., 2006).



Figura 3 – Reação que traduz a formação de radical hidroxilo (OH<sup>•</sup>), devido à reação entre metais de transição e peróxido de hidrogénio. Adaptado (Barreiros et al., 2006).

Na ausência de metais de transição, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é pouco reativo frente às moléculas orgânicas. No entanto, por ser capaz de transpor as membranas celulares e gerar o radical OH<sup>•</sup>, exerce um papel importante no *stress* oxidativo. Este radical somente oxida proteínas que apresentam resíduos de metionina ou grupos tiol muito reativos, como é o caso de GSH (Barreiros et al., 2006).

Embora o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em sentido restrito não seja um verdadeiro radical, é considerado uma espécie reativa de oxigénio devido à sua natureza altamente reativa (Zakkar et al., 2015).

### **Radical hidroxilo**

Os radicais hidroxilo (OH<sup>•</sup>) foram descobertos pela primeira vez em 1934 por *Haber e Weiss*, no que é conhecido hoje como a reação de Fenton (Fenton, 1894).

Estes radicais, são compostos por um átomo de hidrogénio ligado a um átomo de oxigénio o que os torna altamente reativos, prontamente a captar átomos de hidrogénio a partir de outras moléculas, para formar moléculas de água (Gligorovski, Strekowski, Barbati, & Vione, 2015).

Efetivamente, é uma espécie altamente agressiva, responsável pela maioria dos danos oxidativos em biomoléculas. Resulta de reações do tipo Fenton, contudo, também podem surgir a partir da radiólise de água (Pisoschi & Pop, 2015). É um dos agentes oxidantes mais poderosos, capaz de reagir seletivamente e instantaneamente com os produtos químicos envolventes, incluindo os poluentes orgânicos e inibidores. Os radicais OH<sup>•</sup> estão omnipresentes no ambiente, incluindo em sistemas biológicos, onde tem um papel importante no metabolismo da imunidade (Gligorovski et al., 2015).

É formado no organismo principalmente por dois mecanismos: reação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com metais de transição e homólise da água por exposição à radiação ionizante, como é descrito na equação da Figura 4 (Barreiros et al., 2006).



Figura 4 – Formação de radical hidroxilo por exposição da água a radiação ionizante. Adaptado (Barreiros et al., 2006).

O  $\text{OH}^\bullet$  foi classificado como o oxidante radical mais poderoso (Gligorovski et al., 2015), devido a este conseguir interagir no local da sua produção com a maioria das moléculas orgânicas e inorgânicas, tais como: DNA, proteínas, aminoácidos, lípidos, açúcares, e metais (Pisoschi & Pop, 2015). No DNA, este radical ataca tanto as bases nitrogenadas quanto a desoxirribose, danificando tanto purinas como pirimidinas (I. Ferreira & Abreu, 2007). Em consequência deste ataque, pode gerar danos como clivagens de ligações com ou sem geração de fragmentos e ligações cruzadas, o que pode ter como resultado a perda de atividade enzimática, dificuldades no transporte ativo através das membranas celulares, citólise e apoptose (Barreiros et al., 2006).

Em laboratório, o  $\text{OH}^\bullet$  pode facilmente ser sequestrado *in vitro* por inúmeras moléculas, devido a sua alta reatividade. No entanto, para que os resultados *in vitro* se reproduzam *in vivo*, é necessário administrar uma concentração elevada de antioxidantes para que este alcance o local onde o radical  $\text{OH}^\bullet$  está presente em concentrações suficientes para suprimi-lo. Existem duas maneiras de controlar a presença do radical  $\text{OH}^\bullet$ , ou reparar os danos causados por este, ou inibir sua formação (Barreiros et al., 2006).

### ***Formação Espécies Reativas de Oxigénio***

As espécies reativas de oxigénio (ROS) podem ser formadas como subprodutos naturais do metabolismo normal do oxigénio, enquanto o metabolismo aeróbio resulta na produção de ROS na mitocôndria, durante a formação de ATP (Zakkar et al., 2015). No metabolismo celular há formação destas espécies reativas, durante o processo de conversão energética mitocondrial, que são maioritariamente eliminadas pelo sistema de defesa antioxidante da célula (Teixeira, Feio, & Figueira, 2014).

ROS podem ser produzidos durante a exposição à irradiação de luz UV, raios-X e raios gama (Gaman et al., 2014), durante reações catalisadas por metais, poluentes presentes na atmosfera, são produzidos por neutrófilos e macrófagos durante a inflamação, e por último são subprodutos de reações catalisadas por mitocôndrias no transporte de eletrões, e vários outros mecanismos (K. Rahman, 2007).

O  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ , ou  $OH^{\cdot}$ , são produzidos de forma contínua durante o metabolismo celular basal, frequentemente nas mitocôndrias ou em outros compartimentos celulares, devido à ação de oxidases (Gaman et al., 2014). Contudo, a principal fonte fisiológica é a cadeia respiratória mitocondrial (Milne et al., 2012), embora haja outras fontes fisiológicas de radicais de oxigênio, nomeadamente, os sistemas enzimáticos, como o da (hipo)xantina-xantina oxidase (Noori, 2012), o sistema citocromo p450, a oxidação do ácido araquidónico e de catecolaminas (Rocha, 2008).

O Citocromo P450 também tem sido proposto como uma fonte de ROS, pois a produção do anião de superóxido e de peróxido de hidrogénio tem lugar após o colapso ou desacoplamento do ciclo P450. Além disso, os microsomas e peroxissomas são fontes de ROS, sendo que os microsomas são responsáveis por grande parte do peróxido de hidrogénio produzido *in vivo* nos locais de hiperoxia (K. Rahman, 2007).

Os peroxissomas são, do mesmo modo, uma importante fonte de ROS celular. Estão presentes na maioria das células de plantas e animais, e são os principais locais de consumo de oxigênio. Estes organitos realizam importantes funções metabólicas, incluindo  $\beta$ -oxidação de ácidos gordos de cadeia longa e cadeia muito longa, a degradação do ácido úrico, e síntese de lípidos ligados a éteres (Milne et al., 2012).

Estas espécies estão constantemente a ser produzidos tanto em células animais como humanas. Em excesso estas espécies podem induzir, nos constituintes celulares, lesões oxidativas e promover um grande número de patologias degenerativas (Li et al., 2013) e envelhecimento (Rahal et al., 2014), embora, sejam cruciais em concentrações moderadas para proteger variadas reações naturais do organismo (Salganik, 2001).

Em situações de deficiência de antioxidantes como a disfunção mitocondrial, inflamação, fagocitose, *stress* exógeno (oxidantes exógenos, radiação UV, produtos químicos, endotoxinas, e hiperoxia), há uma condução à formação ROS (Gaman et al., 2014). No entanto, as células são normalmente capazes de se protegerem contra ROS através de diferentes mecanismos de defesa, para uma eficaz neutralização de radicais e, como consequência, levar a um equilíbrio natural (Zakkar et al., 2015).

Este equilíbrio, usualmente designado por estado redox, é um equilíbrio entre a produção de ROS e capacidade que as células possuem para desintoxicar ROS ou para reparar qualquer dano subsequente da eliminação de radicais livres (Zakkar et al., 2015).

A quantidade de produção de radicais livres é determinada pelo equilíbrio de muitos

fatores, e as ROS são produzidas tanto de forma endógena e exógena, como está exemplificado na tabela 2 (K. Rahman, 2007; Noori, 2012; Czerska et al., 2016).

A diversidade das suas fontes enzimáticas só recentemente se tornou aparente, e os mecanismos para a identificação da localização subcelular destes, somente, agora, estão emergindo (Nathan & Cunningham-Bussel, 2013).

As fontes enzimáticas de ROS sob níveis subcelulares são, nomeadamente, xantina oxidase, ciclooxigenases (COX) e lipoxigenase (LOX), monóxido de azoto sintase (ONS) e oxidases mitocondriais (Noori, 2012).

As fontes não enzimáticas são descritas através da reação *Fenton's & Haber's*. Esta equação descreve a redução molecular do oxigénio para formar os aniões de superóxido, sendo que esses aniões de superóxido tem a habilidade de formar mais espécies reativas de oxigénio (Noori, 2012).

Tabela 2 – Exemplos de fontes exógenas e endógenas de ROS (Nathan & Cunningham-Bussel, 2013)

<b>Fontes de espécies reativas de oxigénio</b>	
<b>Exógenas</b>	<b>Endógenas</b>
Fumo	Oxidases NADPH
Poluentes do ar	Mitocôndrias
Radiação UV	Xantina oxidase
Irradiação	Lipooxigenases
Fármacos	Ciclooxigenases
	Enzimas do citocromo P450
	Monóxido de azoto sintases
	Iões ferro ou cobre
	Grupos heme
	Proteínas de armazenamento de metal

### ***Produção espécies reativas de oxigénio na mitocôndria***

As mitocôndrias tornaram-se a objeto de estudo da biologia celular mais recorrente, nos últimos anos, abrindo novas fronteiras na saúde e na doença (Aon & Camara, 2015).

São organitos das células eucariotas com uma forma de bastão. Desempenham um papel fundamental em vários processos metabólicos celulares, como a produção de energia e sua conversão, a  $\beta$ -oxidação dos ácidos gordos, o ciclo da ureia e a morte programada,

designadamente apoptose (Teixeira et al., 2014). Do mesmo modo, está envolvida na regulação da concentração do cálcio intracelular, a termogénese e biossíntese de heme (Ramis, Esteban, Miralles, Tan, & Reiter, 2015). Estes processos são dinâmicos e complexos, e no processo de conversão energética há utilização de oxigénio (Teixeira et al., 2014).

As proteínas transmembranares, existentes na membrana mitocondrial interna, compõem a cadeia respiratória, assim, a formação de ROS ocorre perto da membrana. Deste modo, os ROS têm fácil acesso aos lípidos da membrana, especialmente sensíveis a fenómenos de ataques de radicais livres. A este ataque chamamos peroxidação lipídica e promove a formação de vários tipos de ROS (I. Ferreira & Abreu, 2007).

Estes organitos têm um papel fundamental na fosforilação oxidativa e na manutenção de produção de energia. No entanto, durante a respiração aeróbica, são produzidas espécies reativas de oxigénio e espécies reativas de azoto (Ramis et al., 2015).

Acredita-se que as mitocôndrias são a fonte principal de produção de ROS, porém, são um dos primeiros alvos de ataque destes radicais (I. Ferreira & Abreu, 2007). Algumas estimativas sugerem que, 2 a 5% do oxigénio consumido é, em última análise, desviado para a produção de ROS (Barbosa et al., 2010). Pensa-se que os Complexos I e III da cadeia de transporte de eletrões são os principais locais de produção de ROS (Weidinger & Kozlov, 2015), embora outros complexos de eletrões, bem como outras enzimas mitocondriais, podem gerar ROS (Finkel, 2012).

Uma vez que as mitocôndrias são o local principal de produção de radicais livres, estas contêm uma variedade de antioxidantes que estão presentes em ambos os lados das suas membranas, a fim de minimizar o *stress* induzido por ROS (K. Rahman, 2007). Adicionalmente, é considerada como um dos locais da célula onde existe um maior número de defesas antioxidantes (I. Ferreira & Abreu, 2007).

O estado metabólico da célula tem um grande impacto na produção de ROS nas mitocôndrias. A natureza química dos substratos que abastecem a cadeia respiratória, a amplitude do potencial de membrana das mitocôndrias ( $\Delta\Psi_m$ ), o pH da matriz, e a tensão de oxigénio no ambiente, são fatores importantes na formação de ROS na mitocôndria (Görlach, Bertram, Hudecova, & Krizanová, 2015).

Adicionalmente, em diversas patologias e no processo do envelhecimento, o *stress* oxidativo pode alterar profundamente os parâmetros mitocondriais, como o rácio P/O ou

rácio de controlo respiratório (Breitenbach & Eckl, 2015).

Embora o papel de ROS mitocondrial não seja totalmente compreendido, é pressuposto que a disfunção mitocondrial cause a produção excessiva de ROS, que possivelmente, é uma característica proeminente de várias doenças (Görlach et al., 2015).

A disfunção mitocondrial e o *stress* oxidativo estão envolvidos em diversas condições patológicas incluindo cardiovasculares e doenças neurodegenerativas, obesidade, diabetes e o envelhecimento. Por conseguinte, a proteção da mitocôndria contra danos oxidativos ou manipulação da função mitocondrial pode ser uma estratégia potencial para a redução de várias patologias humanas (Ramis et al., 2015).

As ROS gerados pelas mitocôndrias, foram considerados durante muito tempo como sendo apenas um subproduto do metabolismo oxidativo, no decurso da formação de ATP. No entanto, existem evidências, que as ROS mitocondriais podem ter uma função na sinalização dentro da mitocôndria ou entre mitocôndrias, e outros organitos celulares. No caso do superóxido, sob condições normais, até 1% de os eletrões que fluem para o oxigénio molecular através da cadeia de transporte de eletrões, podem ser desviados para o formar, sendo que, este também pode ser produzido em locais diferentes dentro da mitocôndria (Görlach et al., 2015).

### ***Função das espécies reativas de oxigénio nas células***

As ROS desempenham funções benéficas e cruciais no organismo (Raposo et al., 2015). Tem sido estabelecido que as ROS tanto podem ser prejudiciais e benéficas em sistemas biológicos, dependendo do ambiente (K. Rahman, 2007).

Em concentrações baixas ou moderadas, as ROS podem ser benéficas para a célula (Raposo et al., 2015), estando envolvidos em vários processos fisiológicos de sinalização e de regulação (I. Ferreira & Abreu, 2007). Funcionam como mediadores, pois desencadeiam ou executam mecanismos de proteção essenciais, tais como a apoptose, fagocitose e desintoxicação (Noori, 2012). Do mesmo modo, combatem contra a invasão de organismos e inflamação por agentes patogénicos, ou mesmo induzem as células a adaptar e proteger-se de outros danos oxidativos graves (Raposo et al., 2015).

Estas baixas concentrações, assumem, ainda, reações de desintoxicação levadas a cabo pelo complexo citocromo P-450, verdugo de células pré-cancerosas e infeções, e estão ainda relacionadas beneficemente com as vias de sinalização, para manter a homeostase celular no corpo. Estão envolvidas na regulação de muitos processos metabólicos e

celulares, incluindo a proliferação, a migração, a expressão do gene, a imunidade e a cura de feridas (Salganik, 2001). Nas reações bioquímicas estão envolvidas na síntese de prostaglandinas, hidroxilação de prolina e lisina, a oxidação da xantina e outros processos oxidativos (Noori, 2012).

### 1.4.2. Espécies reativas de azoto

Dentro das espécies reativas de azoto destacam-se o radical monóxido de azoto ( $\text{NO}^{\bullet}$ ), trióxido de diazoto ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ), ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ), radical dióxido de azoto ( $\text{NO}_2^{\bullet}$ ), nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) e peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) (Barreiros et al., 2006). Estas espécies estão em consonância com o apresentado na Tabela 3. Uma vez que os intermediários reativos de azoto estão envolvidos na regulação da morte celular apoptótica ou necrótica, estes também são reconhecidos como radicais importantes. Pois, incluem diferentes formas de monóxido de azoto ( $\text{NO}^{\bullet}$ ), peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) e, entre outras (Li et al., 2013).

Tabela 3 - Espécies Reativas de azoto (adaptado de (Adly, 2010))

<b>Espécies Reativas de Azoto</b>	
<b>Radicais</b>	<b>Não Radicais</b>
Monóxido de azoto ( $\text{NO}^{\bullet}$ )	Dióxido de azoto ( $\text{NO}_2^{\bullet}$ )
Ácido Nitroso ( $\text{HNO}_2$ )	Tetróxido de azoto ( $\text{N}_2\text{O}_4$ )
	Trióxido de diazoto ( $\text{N}_2\text{O}_3$ )
	Peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ )
	Ácido peroxinitroso ( $\text{ONOOH}$ )
	Alquilo peroxinitritos ( $\text{ROONO}$ )

#### ***Monóxido de azoto***

A principal RNS é o monóxido de azoto ( $\text{NO}^{\bullet}$ ). Este radical é produzido em tecidos biológicos por sintases de monóxido de azoto ao metabolizar arginina e citrulina (I. Ferreira & Abreu, 2007). Adicionalmente, algumas RNS podem ser altamente reativas no organismo atacando lípidos, proteínas e DNA, enquanto outras são reativas apenas com os lípidos (Barreiros et al., 2006).

O monóxido de azoto ( $\text{NO}^{\bullet}$ ), é muito abundante, e está implicado numa grande variedade de processos fisiológicos, como a regulação da pressão sanguínea, que é um potente vasodilatador (França et al., 2013), mecanismos de defesa, regulação da resposta imunitária, e processos de que envolvem neurotransmissores (Pisoschi & Pop, 2015). Nestes processos, o monóxido de azoto funciona como molécula de sinalização (I. Ferreira & Abreu, 2007).

Durante processos inflamatórios, é produzido o anião superóxido conjuntamente com o monóxido de azoto. Estes dois radicais reagem com a formação de um agente oxidante, o peroxinitrito ( $\text{ONOO}^{-}$ ), levando à fragmentação de DNA e oxidação lipídica (I. Ferreira & Abreu, 2007). Por outras palavras, o monóxido de azoto em combinação com o superóxido, forma o tóxico peroxinitrito (Rocha, 2008).

A sintase de monóxido de azoto pode produzir ROS quando as concentrações do seu cofator tetrahidrobiopterina ou seu co-substrato L-arginina são limitantes. Por exemplo, após a depleção de L-arginina por L-arginase, a sintase de monóxido de azoto doa alguns eletrões dos seus derivados de NADPH para  $\text{O}_2$  em vez de passar todos os eletrões para os azotos de guanidino de arginina, produzindo tanto  $\text{O}_2^{\bullet-}$  e  $\text{NO}^{\bullet}$ . Estas espécies reagem umas com as outras para produzir  $\text{OONO}^{-}$ , que se decompõe para gerar os oxidantes fortes  $\text{NO}_2^{\bullet}$  e  $\text{OH}^{\bullet}$ , e pode oxidar cisteínas sensíveis a redox mais rápido do que peróxido, cerca de  $10^3$  vezes (Nathan & Cunningham-Bussell, 2013).

O  $\text{NO}^{\bullet}$  pode ser oxidado ou reduzido dependendo de dois fatores, a sua concentração, bem como a presença de outros agentes oxidantes (Rocha, 2008). A sobre expressão de RNS é designada *stress* nitrosamínico e pode conduzir à nitrosilação de proteínas, inibindo a sua função (I. Ferreira & Abreu, 2007).

Reações bioquímicas essenciais envolvendo o  $\text{NO}^{\bullet}$  são, nomeadamente a S-nitrosação de tióis e nitrosilação de íões de metais de transição. A estrutura de hemoglobina pode ser alterada pela ação de  $\text{NO}^{\bullet}$ , que se liga diretamente ao heme na reação nitrosilação, ou por S-nitrosação das unidades tiol, obtendo-se S-nitrosotióis (Pisoschi & Pop, 2015).

### ***Peroxinitrito***

O peroxinitrito ( $\text{OONO}^{-}$ ) é instável, tem um tempo de semi-vida curto (França et al., 2013) e, é um potente oxidante que pode reagir posteriormente, decompondo-se para originar radicais hidroxilo (Winterbourn, 2014), sendo capaz de oxidar moléculas como proteínas, lípidos e DNA (Rocha, 2008), independentemente da presença de metais de

transição (Pisoschi & Pop, 2015). A Figura 5 representa a reação de decomposição de peroxinitrito, a título de exemplo.

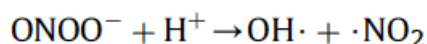


Figura 5 – Exemplo de uma reação de decomposição de peroxinitrito. Adaptado (Pisoschi & Pop, 2015).

A forma protonada de peroxinitrito é classificada como um agente oxidante forte que determina a depleção dos grupos sulfidrilo e os danos oxidativos na maioria das biomoléculas, agindo de modo semelhante aos radicais hidroxilo (Pisoschi & Pop, 2015). É igualmente responsável por danos no DNA, causando, quebras, oxidação de proteínas e, entre outras (Pisoschi & Pop, 2015).

### 1.5. Antioxidantes

A exposição do organismo a radicais livres, levou ao desenvolvimento de mecanismos de defesa para eliminar estes radicais livres. Estas defesas foram a resposta da evolução à inevitável existência de radicais de oxigénio em condições de vida aeróbia (I. Ferreira & Abreu, 2007).

Um antioxidante é uma substância capaz de prevenir ou retardar a oxidação de outras moléculas (Flora, 2009; Rácz, Papp, Balogh, Fodor, & Héberger, 2015). Por outras palavras, são compostos ou sistemas que podem interagir com segurança com os radicais livres e finalizam a reação em cadeia antes que as moléculas vitais sejam danificadas (Oroian & Escriche, 2015). Estas espécies são capazes de diminuir a concentração de radicais livres ou inibir a sua formação (Rácz et al., 2015) e, sob condições fisiológicas, os efeitos de espécies reativas de oxigénio são neutralizados por antioxidantes (Zakkar et al., 2015).

O mecanismo dos antioxidantes consiste na neutralização dos radicais livres, por receção ou doação de eletrões, eliminando deste modo a condição de radical desemparelhado. Assim, as moléculas antioxidantes podem reagir diretamente com os radicais reativos e destruí-los, podendo as mesmas transformar-se em novos radicais livres. Contudo, estes novos radicais são menos reativos, possuem uma vida mais longa, e são menos perigosos do que os radicais que já foram neutralizados (Zakkar et al., 2015).

Por outras palavras, o sistema antioxidante atua como um género de captador de ROS. Por exemplo, o SOD e CAT convertem o  $\text{H}_2\text{O}_2$  para  $\text{O}_2^{\cdot-}$  e em seguida para o  $\text{O}_2$ . Vários

compostos de peróxido, incluindo peróxido de hidrogénio, podem ser inativados pelos sistemas compostos de glutathione peroxidase, glutathione-reductase, e glucose-6-fosfato desidrogenase (Gaman et al., 2014).

Em suma, a principal intervenção dos antioxidantes consiste em quebrar a cadeia radical através da doação de hidrogénio, extinguindo o oxigénio atómico, decompor o peróxido, e inibir a enzima oxidativa ou absorção de radiação UV (Pisoschi & Pop, 2015).

Devido à ação de antioxidantes, alguns dos quais são enzimas presentes no organismo, os efeitos nocivos de ROS são equilibrados. Apesar da presença do sistema de defesa antioxidante da célula para neutralizar danos oxidativos de ROS, o dano oxidativo acumulado durante o ciclo de vida tem sido implicado no envelhecimento e, dependente da idade, em doenças cardiovasculares, cancro, doenças neurodegenerativas e outras doenças crónicas (K. Rahman, 2007).

Os antioxidantes podem atuar em diferentes etapas num processo de radicais oxidativos, efeito que pode ser verificado na peroxidação de lípidos em membranas celulares, com uma inevitável atuação nas sucessivas fases, nomeadamente de iniciação, propagação e terminação da cadeia (Pisoschi & Pop, 2015).

Uma diminuição dos níveis de antioxidantes gera metabolitos reativos (Noori, 2012), e a capacidade antioxidante do organismo diminui com a idade (Gaman et al., 2014), o que poderá tornar o mesmo débil e suscetível a efeitos prejudiciais, caracterizado por uma fraca proteção. Porém, apesar dos antioxidantes protegem as células de efeitos nocivos, em demasia, estes podem, de forma paradoxal, interferir ou, mesmo, suprimir a função de proteção (Salganik, 2001).

As células com metabolismo aeróbio desenvolveram sistemas de defesa antioxidante, que podem ser enzimáticos ou não enzimáticos, sendo estes últimos de síntese enxógena ou provenientes da dieta (Rocha, 2008). Além de enzimas antioxidantes, os efeitos nocivos das espécies reativas de oxigénio, são equilibrados pela ação de antioxidantes não enzimáticos (Flora, 2009).

Os antioxidantes podem ser divididos em dois grupos principais (Gaman et al., 2014): endógenos (antioxidantes enzimáticos), principalmente enzimas, tais como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione reductase (GPH-R) e glutathione peroxidase (GPH-Px), entre outras; o segundo grupo, são as moléculas pequenas, principalmente exógenos (antioxidantes não enzimáticos), que atuam como um género de captador de

radicais livres (Fonseca, 2013), das quais se destacam compostos como a glutatona (GSH), vitaminas A, C (ácido ascórbico), e E ( $\alpha$ -tocoferol), antioxidantes tiol (glutatona, tioredoxina e ácido lipóico) (Gaman et al., 2014), melatonina, os carotenóides, os flavonóides naturais e polifenóis (K. Rahman, 2007; Fonseca, 2013).

A Tabela 4, apresentada de seguida, faz referência aos principais grupos de antioxidantes

Tabela 4 – Principais grupos de antioxidantes. Adaptado (Flora, 2009)

<b>Antioxidantes</b>	
<b>Endógenos (enzimáticos)</b>	<b>Exógenos (não enzimáticos)</b>
SOD	Vitamina C
Catalase	Vitamina E
GPH-x	Carotenóides
	Antioxidantes Tiol
	Flavonoides e Melatonina

O sistema de defesa antioxidante endógeno é complementado pela intervenção de antioxidantes exógenos presentes na dieta ou em suplementos nutricionais, tais como o ácido ascórbico, tocoferóis, fenólicos e carotenóides, flavonóides e não flavonóides (Pisoschi & Pop, 2015). Alguns componentes da dieta não neutralizam os radicais livres, contudo, aumentam a atividade endógena, podendo ser classificados e designados como antioxidantes (K. Rahman, 2007).

Os antioxidantes endógenos desempenham um papel crucial na manutenção de funções celulares normais e, assim, contribuir para um estado de saúde e bem-estar sistemático. No entanto, em condições que promovem o *stress* oxidativo, os antioxidantes endógenos podem não ser suficientes e ser necessário recorrer aos antioxidantes dietéticos para manter as funções celulares normalizadas (K. Rahman, 2007).

### **1.5.1 Antioxidantes enzimáticos**

O principal sistema de defesa antioxidante é o intracelular, pois este, inclui os sistemas enzimáticos superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPH-Px) e, glutatona redutase (GPH-R) (Rocha, 2008; Fonseca, 2013). Estas enzimas são responsáveis pela remoção do anião superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroperóxidos orgânicos e peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), respectivamente (França et al., 2013).

#### ***Superóxido dismutase***

Este é um dos antioxidantes enzimáticos intracelulares mais eficazes (K. Rahman, 2007).

A superóxido dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1), converte o anião superóxido em peróxido de hidrogénio que é de seguida transformado em água pela CAT nos lisossomas, ou pela GSH-Px nas mitocôndrias (I. Ferreira & Abreu, 2007). Ou seja, catalisa a conversão de superóxido em oxigénio e peróxido de hidrogénio (K. Rahman, 2007).

A SOD existe em várias isoformas, que diferem na natureza no centro do metal ativo, amino composição de ácido, cofatores e outros recursos. Existem três formas de SOD presente nos seres humanos, nomeadamente, Cu/Zn-SOD, localizada no citosol, além de lisossomas, núcleo e espaço entre as membranas interna e externa da mitocôndria, Mn-SOD, encontra-se na mitocôndria, por fim, e SOD extra-celular (K. Rahman, 2007).

### ***Catalase***

A catalase (CAT) (EC1.11.1.6) é um enzima presente nas células de plantas, animais e bactérias aeróbias (Flora, 2009). Está localizada no organito celular designado peroxissoma (Ramis et al., 2015).

Este enzima promove muito eficientemente a conversão de peróxido de hidrogénio em água e oxigénio molecular (Ramis et al., 2015). A catalase tem uma das maiores taxas de evasão para todas as enzimas, pois uma molécula de catalase pode converter, a cada minuto, aproximadamente 6 milhões de moléculas de peróxido de hidrogénio em água e oxigénio (K. Rahman, 2007), a Figura 6 apresenta a reação responsável pela referida conversão.



Figura 6 – Reação que traduz a conversão de peróxido de hidrogénio em água e oxigénio, pela ação da catalase. (adaptado de K. Rahman, 2007)

### ***Glutathiona peroxidase***

As enzimas glutathiona peroxidase (GSH-Px) atuam em associação com tripeptídeo glutathiona (GSH), que está presente em concentrações elevadas nas células (K. Rahman, 2007). Estes últimos catalisam a conversão de peróxido de hidrogénio (ou peróxido orgânico), decompondo-o em a água (ou álcool) e oxidando simultaneamente GSH (Flora, 2009). Os lípidos hidroperóxidos podem ser transformados em alcoóis (LOH) também pela GSH-Px (I. Ferreira & Abreu, 2007).

As propriedades antioxidantes desta enzima permitem eliminar os peróxidos como potenciais substratos para a reação de *Fenton* (Flora, 2009), a Figura 7 representa as reações de decomposição referidas.

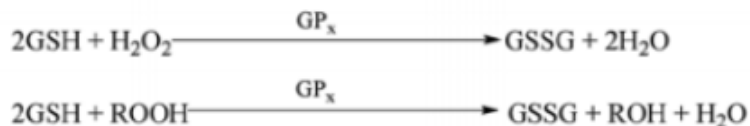


Figura 7 – Reações que traduzem a decomposição do peróxido de hidrogénio e do hidroperóxido, pela ação de enzimas glutatona peroxidase (adaptado de Flora, 2009)

Glutationa peroxidase e redutase são duas enzimas que localizam-se no citoplasma, mitocôndria e núcleo. Glutationa peroxidase metaboliza peróxido de hidrogénio em água usando glutatona reduzida como um doador de hidrogénio (Maritim, Sanders, & Watkins, 2003).

Existem duas formas deste enzima, glutatona peroxidase, um que é dependente de selénio (GP<sub>x</sub>, EC1.11.1.19) e a outra, que é independente de selénio (glutatona-S-transferase, GST, EC2.5.1.18). As diferenças são devidas ao número de subunidades, o mecanismo catalítico, e a ligação do selénio no centro ativo, resultando assim o metabolismo da glutatona, que é um dos mecanismos de defesa antioxidantes mais importante presente nas célula (K. Rahman, 2007).

Existem quatro peroxidases glutatona Se-dependentes diferentes presentes no homem e estes são conhecidos para adicionar dois eletrões para reduzir os peróxidos através da formação de selenoles (SE-OH) e as propriedades antioxidantes destes seleno-enzimas lhes permite eliminar os peróxidos como potenciais substratos para a reação de *Fenton* (K. Rahman, 2007).

### 1.5.2. Antioxidantes não enzimáticos

O sistema de antioxidantes não-enzimáticos incluem vitaminas A, C e E, polifenóis, glutatona (GSH), melatonina e coenzima Q10 (Ramis et al., 2015).

#### *Vitamina C*

É um antioxidante importante e solúvel em água e, portanto, funciona em ambientes aquosos do corpo (K. Rahman, 2007). É constituída, a nível estrutural, por 4 grupos -OH que podem doar hidrogénio para um sistema oxidante (Oroian & Escriche, 2015).

A vitamina C tem uma estrutura de  $\gamma$ -lactona, e representa o enantiómero L do ácido ascórbico, a sua forma ativa, fisiologicamente e bioquimicamente. O ácido ascórbico é conhecido pelas suas propriedades redutoras (Roman Kand'ár, 2016), sendo facilmente oxidado em ácido dehidroascórbico (DHAA). Além disso, atua como um poderoso antioxidante no combate contra as doenças induzidas por radicais livres (Pisoschi, Pop, Serban, & Fafaneata, 2014).

A vitamina C é um eficaz captador de ROS, que se encontra abundantemente na mitocôndria (Ramis et al., 2015). Cooperar com a vitamina E para regenerar  $\alpha$ -tocopherol (Flora, 2009), a partir de radicais  $\alpha$ -tocoferol em membranas e lipoproteínas e também aumenta os níveis intracelulares de glutathione, desempenhando assim, um papel imprescindível de proteção contra a oxidação em proteínas do grupo tiol (K. Rahman, 2007).

Em suma, a vitamina C é um potente antioxidante que neutraliza os radicais livres doando um eletrão (Li et al., 2013). Acredita-se que a Vitamina C é o antioxidante hidrófilo mais importante. É eficaz na eliminação de radicais superóxido, radicais hidroxilo, peróxido de hidrogénio, espécies reativas de azoto e oxigénio molecular (Oroian & Escriche, 2015).

### ***Vitamina E***

A vitamina E foi descoberta em de 1922 por *Evans* e *Bishop*, que demonstraram que era essencial para a reprodução normal em ratos (Cimadevilla et al., 2014).

O termo vitamina E refere-se a um grupo de compostos químicos, tocoferóis e tocotrienóis, e é geralmente aceite como sendo o antioxidante lipossolúvel primário em humanos e atua como um antioxidante através de dois mecanismos principais: um em que se verifica a doação de eletrões que quebram a cadeia; e outro onde há quebra da cadeia aceitador (Oroian & Escriche, 2015).

A vitamina E existe em oito formas diferentes, com quatro tocoferóis ( $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -tocoferol, o  $\gamma$ -tocoferol e  $\delta$ -tocoferol) e quatro tocotrienóis ( $\alpha$ -tocotrienol,  $\beta$ -tocotrienol,  $\gamma$ -tocotrienol e  $\delta$ -tocotrienol), e nos seres humanos,  $\alpha$ -tocoferol é a forma mais ativa, potente e mais abundante (Carocho & Ferreira, 2013).

Devido ao facto de situar-se nas membranas, previne a peroxidação lipídica (I. Ferreira & Abreu, 2007), permitindo assim a proteção e a integridade das estruturas de lípidos, principalmente membranas (Carocho & Ferreira, 2013).

Em suma, o seu papel principal é a proteção antioxidante contra peroxidação lipídica (K. Rahman, 2007), proporcionando um efeito antioxidante de alta eficiência, parando a formação de ROS em membranas submetidas a esse processo (Li et al., 2013).

### ***Antioxidantes tiol***

A capacidade antioxidante dos compostos tiol é devido ao átomo de enxofre, o que pode facilmente acomodar a perda de um único electrão (K. Rahman, 2007).

GSH ( $\gamma$ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina) é o tripéptido de mais baixo peso molecular na natureza (Roman Kand'ár, 2016), composto por glutamato, cisteína e glicina (I. Ferreira & Abreu, 2007). É o principal antioxidante tiol, é um antioxidante intracelular multifuncional e é considerado o principal tampão redox intracelular (K. Rahman, 2007).

A forma reduzida da glutathione é GSH, glutathione, ao passo que a forma oxidada é GSSG, dissulfureto de glutathione (Roman Kand'ár, 2016).

É abundante no citosol, núcleo, e na mitocôndria, além disso, é considerado o antioxidante solúvel predominante nestes compartimentos celulares (K. Rahman, 2007). A GSH, está presente em quase todas as células em concentrações milimolares (Roman Kand'ár, 2016). Quase 90% da GSH encontra-se no citosol (K. Rahman, 2007), cerca de 10% em mitocôndrias, do mesmo modo, pequenas quantidades no retículo endoplasmático (Roman Kand'ár, 2016; R. Kand'ár & Hájková, 2014).

Mais de 98% de GSH intracelular apresenta-se sua forma reduzida; o resto é dissulfeto de glutathione (GSSG), dissulfetos mistos (principalmente proteínas GSSG) e tioéteres (R. Kand'ár & Hájková, 2014). Adicionalmente, a síntese de GSH ocorre no citosol (Roman Kand'ár, 2016).

As funções cruciais de proteção da glutathione contra o *stress* oxidativo são inúmeras, entre as quais: pode agir como cofator para várias enzimas desintoxicantes, participar no transporte de aminoácidos através da membrana plasmática, e sequestrar diretamente o radical hidroxilo e singlete de oxigénio (K. Rahman, 2007). Adicionalmente, é um quelante de radicais livres ( $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{LOO}^\bullet$  e  $\text{ONOO}^-$ ), diretamente ou indiretamente, como cofator de enzimas antioxidantes como a GSH-Px e a GSH-T, e entre outras (I. Ferreira & Abreu, 2007).

Uma das principais finalidades da GSH é para proteger as células contra os danos oxidativos, além disso, a diminuição dos níveis de GSH em células representa um dos sintomas de *stress* oxidativo (Roman Kand'ár, 2016).

A GSSG é potencialmente tóxica para as células, pelo que é imediatamente reduzida GSH, catalisada por glutathione reductase dependente de NADPH, ou é transportada para fora das células (Roman Kand'ár, 2016). A glutathione oxidada (GSSG) acumula-se, essencialmente, no interior das células (K. Rahman, 2007) e, a proporção de GSH/GSSG é uma boa medida do *stress* oxidativo do organismo (Squellerio et al., 2012).

Outros antioxidantes tiol, que são do mesmo modo importantes, nomeadamente, o sistema de tioredoxina (TRX), e o composto natural ácido  $\alpha$ -lipóico (ALA), que é um derivado dissulfureto de ácido octanóico e é por vezes referido como ácido tióctico (K. Rahman, 2007).

Os antioxidantes, flavonóides e ácidos fenólicos, taninos, vitamina C, vitamina E, têm diversas propriedades biológicas, tais como efeitos anti-inflamatórios, anticancerígenos e anti-ateroscleróticos, reduzem a incidência de doenças coronárias e contribuem para a manutenção intestino pela modulação do equilíbrio microbiano intestinal (Oroian & Escriche, 2015).

Em suma, os seres humanos desenvolveram sistemas altamente complexos de antioxidantes, enzimáticos e não enzimáticos, que atuam em sinergia e em combinação uns com os outros, isto de forma a proteger as células e os sistemas orgânicos dos efeitos nocivos produzidos por radicais livres (K. Rahman, 2007).

### **1.7. Biomarcadores**

Biomarcador é um termo muito amplo que pode ser utilizado para descrever qualquer indicador de um estado biológico. O termo biomarcador, ou marcador biológico, foi introduzido em 1989 como um termo do sistema *Medical Subject Heading* (MeSH), sendo definido como um "parâmetro biológico suscetível a, ou objeto de, medição e quantificação (por exemplo, concentração específica de enzima, concentração específica de hormona, distribuição de fenótipo de gene específica numa população, presença de substâncias biológicas), que serve como um indicador para as avaliações de saúde e as relacionadas com fisiologia." (Fonseca, 2013).

Mais recentemente, em 2001, a definição foi padronizada pela entidade *Biomaker Definitions Working Group*, como "*uma característica que é objetivamente medida e*

*avaliada como um indicador de processos normais biológicos, processos patogénicos, ou respostas farmacológicas a uma intervenção terapêutica"* (Fonseca, 2013).

Idealmente, mas nem sempre é possível, um biomarcador deverá conter várias características, nomeadamente: específico e sensível; estável, não suscetível a indução de artefactos ou perda durante o armazenamento; representativo do equilíbrio entre a produção de danos oxidativos e a depuração; determinado por um método específico, sensível e reprodutível; apresentar uma relação bem estabelecida entre a resposta do biomarcador e os danos induzidos, e ser um produto maioritário da alteração oxidativa que poderá estar implícito no desenvolvimento da doença (Mendes, 2012).

Os biomarcadores podem ser classificados em três tipos, nomeadamente de: exposição, efeito, e suscetibilidade (Vasconcelos et al., 2007).

A função de um biomarcador de exposição, é de identificar substâncias exógenas no sistema e é produto da interação entre compostos xenobióticos e componentes endógenos relacionados com a exposição. Em contrapartida, um biomarcador de efeito poderá ser um indicador de um componente endógeno do sistema biológico, uma medida da capacidade funcional do sistema, ou um estado alterado do sistema que é reconhecido como doença. Por fim, um biomarcador de suscetibilidade é definido como um indicador da saúde do sistema/organismo sensível à exposição de compostos xenobióticos (proveniente do exterior) (Vasconcelos et al., 2007; Mendes, 2012).

Estudos experimentais, clínicos e epidemiológicos, estão a cada vez mais a avaliar os biomarcadores do *stress* oxidativo, tais como CAT, CuZnSOD e de malondialdeído (MDA) (Rahal et al., 2014), devido ao envolvimento destes na patogénese de numerosas doenças incluindo aterosclerose, cancro, diabetes, patologias respiratórias e entre outras. Na verdade, estes biomarcadores, desempenham um papel importante na patogénese ou na progressão de muitas doenças (Kurutas et al., 2015).

Entre os diferentes marcadores, o MDA e os antioxidantes naturais, metaloenzimas, CuZnSOD, GPx, são atualmente considerados os biomarcadores significativos de *stress* oxidativo (Rahal et al., 2014).

Porém, a quantificação destes compostos não é simples, devido principalmente à complexidade das matrizes biológicas, nomeadamente, soro, sangue e urina, usadas e a inexistência de técnicas extrativas suficientemente seletivas e eficientes que permitam a extração simultânea de um vasto grupo de biomarcadores (Mendes, 2012).

Na prática, os biomarcadores podem melhorar a compreensão sobre a doença e proporcionar novos conhecimentos sobre os mecanismos patológicos, possibilitando o diagnóstico precoce e a aplicação de terapêuticas mais eficazes e mais seguras (Fonseca, 2013).

### **Produtos oxidativos de DNA, lípidos, e proteínas**

Vários produtos oxidativos de lípidos, proteínas e DNA, assim denominados por produtos finais oxidativos, tais como o hidroperóxido de lípido, MDA, 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE), 8-iso-prostaglandina F<sub>2</sub>α, sulfóxido de metionina, 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8-OHdG), e entre outros, são detectados em vários tecidos e fluidos biológicos, logo, considerados biomarcadores do *stress* oxidativo em sistemas vivos (Sato, Yagi, & Yonei, 2015; Roman Kand'ár, 2016).

De facto, os produtos finais da peroxidação de lípidos, nomeadamente, o MDA, 4-HNE, e F2-isoprostanos (Bradley-Whitman & Lovell, 2015), tem uma grande tendência a acumular-se nos sistemas biológicos (Rahal et al., 2014) e, são especialmente vulneráveis ao dano oxidativo (Bastani, Gundersen, & Blomhoff, 2012). Além disso, as bases de DNA são muito susceptíveis à oxidação de ROS, e o produto de oxidação detectável, predominantemente, em bases de DNA *in vivo* é o 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (Rahal et al., 2014).

#### ***8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8-OHdG)***

Uma das lesões de base do DNA mais abundante é a 7,8-di-hidro-8-oxoguanina (8-oxoG), ou 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8-OHdG). Localiza-se na posição C-8 e, é formado por exposição oxidante no ambiente a ROS por vários oxidorreduções celulares (Aguilera-Aguirre et al., 2015), especificamente, a partir de um radical hidroxilo e um resíduo de desoxiguanosina. O 8-OHdG emparelha com a adenina durante a replicação do DNA, provocando uma transição de G para T, que pode dar origem a uma má interpretação das bases adjacentes (Mendes, 2012).

Entre os produtos de oxidação de guanina, 7,8-di-hidro-8-oxoguanina (8-oxoG) é o mais abundante em ambos RNA e DNA, e devido à sua acumulação no DNA é considerado um dos melhores biomarcadores do *stress* oxidativo (Sato et al., 2015). O 8-OxoG não induz alterações na estrutura do DNA e não é um obstáculo para a DNA ou RNA polimerases. No entanto, é capaz de emparelhar-se com adenina na sua conformação "syn" e, posto isto, é considerado uma das lesões de base mais mutagénicas. Para manter

a integridade genómica, este composto deve ser removido e, isso ocorre principalmente através da glicosilase de DNA de 8-Oxoguanina glicolase 1 (OGG1) que inicia a reparação por excisão de bases via OGG1-BER (Aguilera-Aguirre et al., 2015).

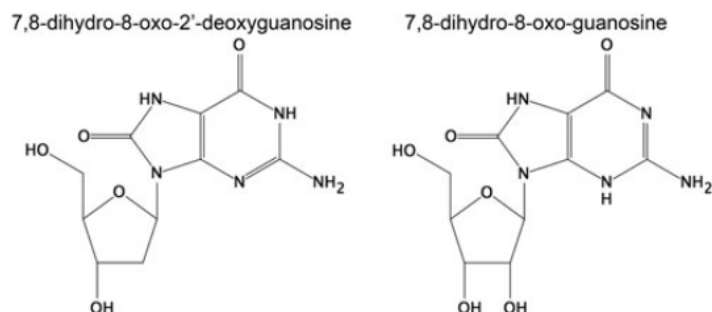


Figura 8 - Estrutura de 7,8-oxo-2'-deoxyguanosine e 8-oxo-guanosina. A oxidação do DNA e do RNA ocorre comumente na porção de guanosina, levando a 8-oxo-2'-deoxyguanosine e 8-oxo-guanosina, respetivamente. Adaptado (Frijhoff et al., 2015).

Este composto foi o primeiro a ser identificado como produto do dano oxidativo de DNA e é considerado responsável pelas mutações no gene *p53* que conduzem à carcinogénese (Mendes, 2012).

### ***Prostaglandinas e os isoprostanos***

As prostaglandinas (PGs) e os isoprostanos (IsoPs) são compostos biologicamente ativos formados *in vivo* a partir de ácido araquidónico, através dos enzimas ciclooxygenase (COX-1 e COX-2) e/ou peroxidação de radical livre catalisado (Bastani et al., 2012).

Uma importante distinção estrutural entre IsoP e PGs, é que o IsoP contém cadeias laterais que são predominantemente *cis* orientados para o anel de prostano, enquanto as PGs possuem exclusivamente cadeia lateral *trans* (Czerska et al., 2016). Outra diferença, entre IsoPs e PGs, é que os primeiros são principalmente formados *in situ*, esterificado para fosfolípidos e posteriormente libertado por uma fosfolipases, ao passo que os segundos são gerados somente a partir do ácido araquidónico livre (Niki, 2013)

As prostaglandinas são classificadas em seis diferentes séries (denotado D, E, F, G, H, e I) de acordo com a oxidação do anel de ciclopentano, enquanto os isómeros de série F2-prostaglandina, produzidos de forma não enzimática, são chamados F2-isoprostanos. A abreviatura 'IsoP' é usada para distinguir isoprostanos de prostaglandinas (Bastani et al., 2012).

Em 1990 foi descoberto a primeira classe de IsoP, os F<sub>2</sub>-isoprostanos. Desde então, outras classes tem sido descritos, nomeadamente, D2- isoP, E2-Isop, A2-Isop e J2-Isop e denominadas de acordo com o tipo de anel ciclopentano (Czerska et al., 2016).

Os isoprostanos pertencem à família dos eicosanoides, de origem não enzimática e são produzidos pela oxidação do ácido araquidónico. Inicialmente, são formados nos fosfolípidios da membrana celular e posteriormente, libertados para os fluidos biológicos pela ação da enzima fosfolipase. Ao contrário do que acontece com os hidroperóxidos lipídicos, que se decompõem rapidamente nos fluidos e tecidos humanos, os F<sub>2</sub>-isoprostanos são produtos secundários da peroxidação lipídica quimicamente estáveis podendo, inclusive, ser dosados na urina (França et al., 2013). Outra classe de compostos formados a partir da peroxidação de ácido araquidónico são os isoflurano (IsoFs) (Milnea, Gaoa, Terry, Zackert, & Sanchez, 2013).

Como é explanado, IsoPs e IsoFs são produzidos através de mecanismos semelhantes e, de facto, partilham como intermediário um radical centrado em carbono. Para produzir IsoPs o radical centrado em carbono passa por 5-exo-ciclos para formar anel ciclo pentano, enquanto os IsoFs são formados por uma reação do radical em apreço com o oxigénio molecular, como está representado na imagem 23. Consistente com este mecanismo, os IsoFs apresentam-se como um melhor biomarcador do *stress* oxidativo sob condições de tensão de oxigénio crescentes (Milnea et al., 2013).

Quatro grupos de F<sub>2</sub>-isoprostanos (5, 8, 12, e 15) são formadas a partir de ARA com base na localização do grupo hidroxilo na cadeia lateral. Cada um destes quatro grupos, teoricamente, tem oito diastereômeros, por isso podem existir 64 possíveis isômeros F<sub>2</sub>-isoprostano (Milnea et al., 2013).

A aplicação de isoprostanos como marcadores de *stress* oxidativo tem várias vantagens comparativamente a outros marcadores de *stress* oxidativo. Os isoprostanos são quimicamente estáveis, são produtos específicos de peroxidação, são formados *in vivo*, estão presentes em quantidades detectáveis em tecidos e fluidos biológicos e, não são afetados pelo teor de lípidios em uma dieta. Além disso são muito estáveis na urina, logo, os seus níveis são geralmente determinados neste líquido biológico (Czerska et al., 2016). Entre os vários biomarcadores, o 8-epi-PGF<sub>2α</sub> da família de F<sub>2</sub>-isoprostanos é considerado um biomarcador válido do *stress* oxidativo *in vivo* (Bastani et al., 2012; França et al., 2013).

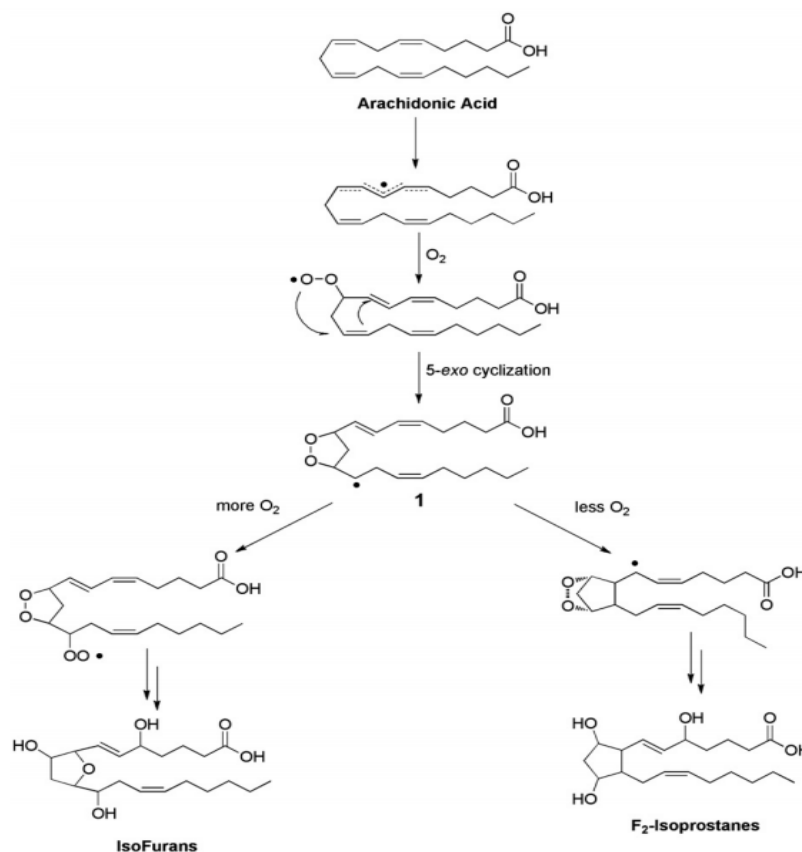


Figura 9 – Mecanismo de formação de F<sub>2</sub>-IsoPs e IsoFs

### Malondialdeído

O MDA é um aldeído de baixo peso molecular, produzido pelas reações em cadeia mediadas por radicais livres, e é amplamente utilizado como marcador de peroxidação lipídica (Spirlandeli, Deminice, & Jordao, 2014). É formado a partir de ácidos gordos poli-insaturados previamente oxidados, principalmente o ácido araquidônico e, é considerado um dos produtos finais da peroxidação lipídica da membrana (Rahal et al., 2014). É tóxico, possui uma reatividade elevada e, é potencialmente mutagénico e aterogénico devido às suas reações com biomoléculas tais como proteínas e ácidos nucleicos (Chen et al., 2015).

Os aldeídos reativos, tais como MDA, 4-HNE e acroleína (ACR), e hidroperóxidos lipídicos parecem desempenhar um papel duplo dependente da concentração no metabolismo celular. Por um lado, estes compostos podem exibir funções protetoras, funcionando como moléculas de sinalização e estimulam a expressão de genes ou neutralizam o dano peroxidativo, reduzindo-se durante a recepção de dois eletrões. Por outro lado, uma vez que são altamente reativos e tóxicos, estas espécies reativas podem

ser reduzidas, recebendo um eletrão, e iniciam a cascata de peroxidação lipídica, que causa danos consideráveis nas células, por vezes, leva à morte destas (Raposo et al., 2015).

Em comparação com os radicais livres, esses aldeídos são relativamente estáveis, contudo podem ser mais perigosos do que ROS. Estes compostos podem exercer a sua acção a uma grande distância do lugar onde foram produzidos, enquanto que os radicais de oxigénio são espécies, com um tempo de semi-vida curto, que atacam nos arredores do local de produção (Raposo et al., 2015).

### ***Hidróxidos Lipídicos***

Os hidróxidos lipídicos são produtos de oxidação de lípidos encontrados em amostras biológicas. São formados como o principal produto primário da peroxidação lipídica de ácidos gordos poli-insaturados e colesterol. Os hidroperóxidos são produzidos na oxidação por  $^1\text{O}_2$  e lipooxigenase, bem como a peroxidação lipídica é mediada por radicais livres (Niki, 2013).

Os hidróxidos de lípidos derivados de oxidação enzimática e oxidação do singlete de oxigénio são *cis*, *trans*-hidróxidos, enquanto a peroxidação lipídica de radicais livres origina tanto *cis*, *trans* e *trans, trans*-hidróxidos. Portanto, *trans, trans*-hidróxidos servem de biomarcadores específicos para a peroxidação lipídica dos radicais livres (Niki, 2013).

## Capítulo II - Revisão dos métodos de determinação do *stress* oxidativo

Para se cumprirem, adequada e eficazmente, os objetivos deste trabalho, no âmbito do *stress* oxidativo, procedeu-se a uma extensiva pesquisa bibliográfica, de forma concreta e progressiva mediante cada tema em análise, ao longo da respetivo trabalho, com recurso às principais bases de dados da área científica em causa, nomeadamente o Pubmed, Google Académico e Scielo. Como objetos de pesquisa mais utilizados, destacam-se, particularmente, os termos *determination methods of oxidative stress*, *oxidative stress biomarkers*, *biomarkers of oxidative damage*.

A medição do *stress* oxidativo está longe de ser um processo, de avaliação e medição, simples e acessível, pois os métodos para o efeito apresentam fortes condicionalismos transversais à instrumentação e à fiabilidade de resultados, por dificuldades de incidência direta ao objeto alvo de estudo e por limitação de aplicabilidade respetivamente. A análise direta às espécies reativas de oxigénio, em materiais biológicos, são extremamente difíceis de obter-se devido à elevada reatividade intrínseca e tempo semi-vida muito curto destas espécies (Lambeth & Neish, 2014).

Atualmente, os métodos disponíveis tem uma aplicabilidade limitada a estudos desta natureza (Pérez-Rodríguez et al., 2015).

### 2. Métodos para determinação de espécies reativas de oxigénio e azoto

A estratégia para a deteção de oxidantes reativos difere no simples facto se estes estão dentro ou fora da célula (Winterbourn, 2014).

A deteção intracelular, normalmente, envolve a citometria de fluxo ou microscopia de fluorescência, enquanto os oxidantes libertados podem ser monitorizados em tempo real, por fluorescência ou espectrometria de UV/visível, ou por amostragem do meio em intervalos, por exemplo, por HPLC ou espectrometria de massa (Winterbourn, 2014).

Apesar de existirem algumas complicações com sondas, consoante as condições, a deteção extracelular é uma estratégia mais simples à medida que as condições se tornam muito mais amenas à manipulação destinada a otimizar a deteção em causa (Winterbourn, 2014).

Inúmeros métodos podem ser aplicados para quantificar as espécies reativas de oxigénio, tanto como as de azoto. Neste trabalho serão abordados várias metodologias, com foco nas espécies superóxido, peróxido de hidrogénio, monóxido de azoto e peroxinitrito.

## **2.1 Sondas Fluorescentes e quimioluminescentes para determinação ROS**

Segundo Li et al., (2013), a maneira mais conveniente de determinar intracelularmente ou a acumulação de ROS intramitocondrial é a utilização de sondas fluorescentes ou quimioluminescentes. As sondas utilizadas para este fim são células permeáveis e as medições são geralmente baseadas na atividade oxidativa de ROS (Li et al., 2013). Adicionalmente, as sondas fluorescentes também são frequentemente designadas de corantes (Dikalov & Harrison, 2012).

Devido a determinadas características como a elevada sensibilidade e facilidade de detecção de pequenos números de células, os ensaios de quimioluminescência são amplamente utilizados para detetar as espécies reativas de oxigénio. As reações, associadas a ROS, envolvem mecanismos de radicais com várias etapas, e apresentam as mesmas limitações que os ensaios de fluorescência (Winterbourn, 2014).

O termo ‘quimioluminescência’ descreve o fenómeno de emissão de luz, como resultado de uma reação química. Isto ocorre devido à presença de eletrões excitados em um dos produtos da reação, o que conduz à emissão de um fóton no momento em que se verifica o retorno dos eletrões a um estado fundamental estável (Lee, Margaritis, Channon, & Antoniadis, 2012).

Este distingue-se fundamentalmente da fluorescência, devido ao facto que, a radiação electromagnética tem de ser absorvida pela forma fluorescente, na ordem para que os eletrões atinjam um estado animado. Uma sonda quimioluminescente é empregue mediante a reação com um radical livre biológico, pois, liberta um fóton que pode ser detectado por um luminómetro ou um contador de cintilação. Isto permite a quantificação da produção de radicais livres em amostras biológicas (Lee et al., 2012).

Na seguinte Tabela 5, está apresentado, resumidamente, as técnicas empregues para a determinação de ROS, revistas neste trabalho.

Tabela 5 - Resumo de sondas fluorescentes e quimioluminescentes para determinação ROS

<b>Espécie Reativa de Oxigênio</b>	<b>Sonda</b>	<b>Referência</b>
<b>Superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>)</b>	Lucigenina	(Lee et al., 2012);(Winterbourn, 2014);(Dikalov & Harrison, 2012)
	Hidroetidina (DHE)	Dikalov & Harrison, 2012)(Kalyanaraman,2011);(Kalyanaraman et al., 2012)
	<i>MitoSOX</i>	Dikalov & Harrison, 2012);(Kalyanaraman et al., 2012);(Kalyanaraman, Dranka, Hardy, Michalski, & Zielonka, 2014)
	DHE acoplado com HPLC	(Lee et al., 2012)
	Dihidroclorofluoresceína (DCFH <sub>2</sub> )	(Winterbourn, 2014); (Guo, Aleyasin, Dickinson, Haskew-layton, & Ratan, 2014); (Noctor, Lelarge-Trouverie, & Mhamdi, 2015)
	2',7'-Diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA)	(Dikalov & Harrison, 2012);(Li et al., 2013); (Winterbourn, 2014);(Noctor et al., 2015);
<b>Peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)</b>	<i>HyPer</i>	(Kalyanaraman et al., 2012); (Dikalov & Harrison, 2012)
	<i>Boronato</i>	(Cochemé et al., 2011) (Kalyanaraman et al., 2012); (Winterbourn, 2014)
	<i>MitoB</i>	(Cochemé et al., 2011)
	<i>Amplex® Red</i>	(Kalyanaraman et al., 2012)(Dikalov & Harrison, 2012); (Noctor et al., 2015);

### ***Lucigenina***

Segundo a literatura científica, a sonda quimioluminescente mais frequentemente aplicada para detetar o radical O<sub>2</sub><sup>•-</sup> é Lucigenina (*bis-N-methylacridinium nitrate*) pois esta, tem a característica de ser permeável à célula e, é particularmente específica (Lee et al., 2012; Winterbourn, 2014). Do mesmo modo, esta sonda pode ter outra nomenclatura, nomeadamente Lucigenina-reforçada quimioluminescente (Dikalov & Harrison, 2012).

Esta reação é caracterizada por uma série de etapas. O primeiro passo é a redução de Lucigenina por um radical O<sub>2</sub><sup>•-</sup> para o cátion radical lucigenina, que por sua vez reage com um segundo radical O<sub>2</sub><sup>•-</sup> para formar o lucigenina dioxetano instável. Por conseguinte, esta molécula decompõe-se em duas moléculas de *N-metilyacridone*, uma das quais é electronicamente excitada e emite um fotão no momento de decomposição para o estado fundamental estável. Deste modo, é extremamente sensível para a deteção

de  $O_2^{\bullet-}$ , com a constante de velocidade de primeira reação, sendo  $\approx 10^8$  mol/L por segundo, muito maior do que outros ensaios, tais como a redução do citocromo C (Lee et al., 2012).

Resumidamente, a sonda lucigenina também é considerada um quimioluminescente, por meio de um mecanismo de radicais, apesar do composto original ser reduzido a um radical que reage com o  $O_2^{\bullet-}$  para produzir um intermediário que se decompõe com a emissão de luz. Ou seja, esta reação é efetivamente dependente do  $O_2^{\bullet-}$  (Winterbourn, 2014). Porém, a validade desta técnica tem sido questionada (Dikalov & Harrison, 2012), com o argumento de que a produção  $O_2^{\bullet-}$  pode ser artificialmente sobrestimado devido a um fenómeno conhecido como *redox cycling*, em que os radicais da Lucigenina reagem com oxigénio para gerar  $O_2^{\bullet-}$  (Lee et al., 2012). Provavelmente reagem com uma variedade de ROS, e são, por conseguinte, muito pouco específicos (Dikalov & Harrison, 2012).

Além de lucigenina, um amplo número de sondas de quimiluminescência foram desenvolvidas para a deteção de outras ROS em amostras biológicas (Dikalov & Harrison, 2012). Uma destas é o luminol ( $C_8H_7N_3O_2$ ), que para além de não ser específico, exige o uso de captadores de radicais livres, tais como ebseleno, SOD, CAT ou UAc, a fim de atribuir um sinal obtido a um radical livre em particular (Lee et al., 2012).

Os análogos de luciferina, tais como coelenterazina ou MCLA (*luciferin analogue, 2-Methyl-6-(4-methoxyphenyl)imidazo[1,2-a]pyrazin-3(7H)-one*), são promissores para a deteção quimioluminescente de  $O_2^{\bullet-}$ . Os mecanismos de oxidação destes também envolvem uma etapa inicial de oxidação e uma reação radical subsequente com o superóxido (Winterbourn, 2014).

Todavia, estes compostos reagem com outros radicais, como é o caso da sonda quimioluminescente coelenterazina *luminophore* (Dikalov & Harrison, 2012), que reage tanto com o  $O_2^{\bullet-}$  como com o  $ONOO^-$  (Lee et al., 2012), por isso ainda há questões de especificidade e interferência a determinar. Adicionalmente, o MCLA somente detecta a dismutase extracelular (Winterbourn, 2014).

No geral, os ensaios de quimiluminescência são de produção fácil e de baixo custo, e destacam-se por serem altamente sensíveis para a deteção da produção de ROS em amostras biológicas. A repetibilidade e especificidade de lucigenina-reforçada quimioluminescente é alta, por conseguinte, não requer a duplicação dos resultados

experimentais, especialmente após o tratamento com SOD, em contraste com muitas outras técnicas (Lee et al., 2012).

### ***Hidroetidina e MitoSOX,***

Diferentemente das sondas anteriormente descritas, mas porém com a mesma finalidade, foram desenvolvidas as sondas fluorescentes, nomeadamente, o hidroetidina (DHE) e o seu derivado *MitoSOX*. Estas sondas caracterizam-se por detetarem o radical  $O_2^{\bullet-}$  nas células e mitocôndrias, respectivamente (Kalyanaraman, 2011; Kalyanaraman et al., 2012). O DHE é modificado para permitir a deteção de  $O_2^{\bullet-}$  na mitocôndria por adição de um grupo de trifenilfosfónio, que promove a sua acumulação na mitocôndria. Este análogo modificado de DHE é referido como *MitoSOX*, e tornou-se comumente aplicado para a deteção de  $O_2^{\bullet-}$  no interior da mitocôndria (Dikalov & Harrison, 2012).

Basicamente, o mecanismo DHE expressa-se do seguinte modo: na célula o  $O_2^{\bullet-}$  reage com DHE para formar *2-hydroxyethidium* (2-OH-E<sup>+</sup>), o que mostra a fluorescência azul em 420 nm quando a amostra é excitada a 370 nm (Kalyanaraman et al., 2014).

Uma vez na mitocôndria, o *MitoSOX* é oxidado pelo  $O_2^{\bullet-}$  e exibe fluorescência vermelha a 580 nm quando a amostra é excitada a 510 nm (Kalyanaraman et al., 2014). Sendo uma molécula carregada positivamente, *MitoSOX* reage ligeiramente mais rápido com  $O_2^{\bullet-}$  em comparação com DHE (Kalyanaraman et al., 2012).

De forma análoga ao DHE, o *MitoSOX* ao reagir com  $O_2^{\bullet-}$  forma um produto vermelho fluorescente, *2-hydroxymitoethidium* (2-OH-Mito-E<sup>+</sup>), e não Mito-E<sup>+</sup>. Consequentemente, 2-OH-Mito-E<sup>+</sup>, que é o produto da reação específica de  $O_2^{\bullet-}$  com *MitoSOX*, e o Mito-E<sup>+</sup>, que por sua vez é produto da oxidação não específica de *MitoSOX*, têm espectros de fluorescência de que sobrepõem-se. Assim, a fluorescência vermelha formada a partir de *MitoSOX* localizada nas mitocôndrias não é um indicador fiável de formação de  $O_2^{\bullet-}$  mitocondrial (Kalyanaraman et al., 2012).

A abordagem do DHE é limitada, devido ao facto deste consequentemente formar dois produtos fluorescentes (Dikalov & Harrison, 2012). A limitação deste método é que um outro produto de oxidação de étidio fluorescente (E<sup>+</sup>) contribui significativamente para a intensidade total de fluorescência, e espectros de fluorescência entre 2-OH-E<sup>+</sup> e E<sup>+</sup> são sobrepostas. Assim, a utilização de técnicas baseadas em fluorescência para medir, somente o  $O_2^{\bullet-}$ , pode induzir em erro (Kalyanaraman et al., 2014).

Adicionalmente, é necessário a confirmação da formação de 2-OH-E<sup>+</sup> utilizando outras técnicas analíticas tais como: HPLC (Dikalov & Harrison, 2012), por fluorescência ou detecção electroquímica, ou LC-MS (Kalyanaraman et al., 2012). O mesmo acontece com *MitoSOX*, também é necessário separar e identificar 2-OH-Mito-E<sup>+</sup> recorrendo à tecnologia por HPLC (Dikalov & Harrison, 2012; Kalyanaraman et al., 2012).

Denota-se que para além da medição E<sup>+</sup> e de outros dímeros de HE (HE-HE, HE-E<sup>+</sup>, E<sup>+</sup>-E<sup>+</sup>), estes podem ser utilizados como indicadores para a formação de um eletrão oxidante nas células (Kalyanaraman et al., 2012).

Outra técnica para a detecção de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> intracelular é o DHE acoplado com HPLC. Esta metodologia permite detectar quantidades tão baixas de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> como de 1 pmol /mg de proteína. Apresenta inúmeras vantagens, tais como; é uma técnica relativamente barata e de fácil execução, tem uma reação cruzada mínima com outros radicais livres biológicos, tais como OH<sup>•</sup>, e efetivamente, permite a quantificação precisa de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> intracelular, com excelente sensibilidade e especificidade. Foi demonstrado que o pico de HPLC correspondente a 2-OH-E<sup>+</sup> é em grande parte, embora, por vezes, não completamente, abolido pela SOD, cuja utilização dá uma estimativa mais precisa da produção de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Mesmo sem HPLC, a microscopia confocal de DHE em amostras de tecido manchado de DHE permite uma representação visual da produção e quantificação parcial da localização do O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (Lee et al., 2012).

Uma desvantagem importante é a incapacidade de detetar outra ROS biológica, tais como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e ONOO<sup>-</sup>. Além disso, a DHE é susceptível de auto-oxidação após a exposição à luz, por conseguinte, o ensaio deve ser realizado com pouca luz e o DHE armazenado em recipientes escuros (Lee et al., 2012).

### ***2',7'-Diclorodihidrofluoresceína diacetato***

A sonda 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA) é comumente aplicada para medir o nível de ROS intracelular, particularmente, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Dikalov & Harrison, 2012). No mesmo modo, a aplicabilidade desta sonda abrange algumas RNS, especialmente NO intracelular e ONOO<sup>-</sup> (Li et al., 2013).

Esta metodologia caracteriza-se pelo DCFH-DA entrar nas células e acumular-se principalmente no citosol. Posteriormente, as esterasas celulares clivam o DCFH-DA em 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH<sub>2</sub>), que é adicionalmente oxidado, na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peroxidases, por citocromo c e Fe<sup>2+</sup>, em 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) (Li et al.,

2013). Neste caso, a força de fluorescência de DCF no citosol pode ser medida a 530 nm utilizando um leitor de placas fluorescente quando a amostra é excitada a 485 nm. A fluorescência a 530 nm pode, mesmo modo, ser medida por um citómetro de fluxo (Lee et al., 2012; Li et al., 2013).

Uma vez que, o NO e o ONOO<sup>-</sup> também oxidam DCFH<sub>2</sub>, a fluorescência a partir DCF reflete não apenas o nível de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no citosol. Além disso, DCF é uma membrana permeável e pode vaziar para fora das células; a fim de evitar isso, outras sondas têm sido desenvolvidas. Por exemplo, dihidrocalceína pode passar livremente as membranas celulares, sendo oxidado para se obter uma calceína verde fluorescente, que demonstra ter excelentes propriedades de retenção (Li et al., 2013).

Apesar da popularidade deste ensaio, contudo, não pode ser usado com fiabilidade para medir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracelular e outros ROS pelas seguintes razões: primeiro o DCFH não reage diretamente com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Noctor et al., 2015); segundo, várias espécies de eletrões oxidantes oxidam DCFH a DCF; do mesmo modo, o DCF pode realmente produzir O<sub>2</sub><sup>•-</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por meio da reação do radical DCF com o O<sub>2</sub>, o que pode aumentar artificialmente as quantidades de ROS que se está a tentar quantificar (Winterbourn, 2014). Por último, e não menos importante, os metais de transição, citocromo C, e as heme peroxidases podem catalisar a oxidação DCFH (Dikalov & Harrison, 2012).

Nos últimos anos, o DCFH<sub>2</sub> tornou-se amplamente utilizado como uma sonda *in vivo* (Noctor et al., 2015), embora não seja específico para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, na verdade, não reage com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diretamente, e potencialmente sofre de vários artefactos (Winterbourn, 2014). Sobretudo, consegue detectar pequenas moléculas reativas, tais como o O<sub>2</sub><sup>•-</sup> e o <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, portanto, não é o método ideal para determinar a localização da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Guo et al., 2014)

### ***Hy-Per***

Outra abordagem para a monitorização dos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracelulares incluem o uso de um biossensor redox ativo, *Hy-Per*, cujo design é baseado em OxyR, um sensor bacteriano natural de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Kalyanaraman et al., 2012).

Recentemente, esta metodologia revolucionária tem sido empregue para a deteção de ROS e estado redox, envolvendo a introdução de plasmídeos ou adenovírus nas células. As células, em seguida, produzem proteínas quiméricas que são capazes de detectar ROS ou alterações no estado redox. Uma das sondas é *Hy-Per*, a qual consiste em permutar

circularmente a proteína fluorescente amarela (cpYFP), inserida no domínio de regulação da proteína procariótica de detecção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, OxyR. Por recombinação molecular, esta sonda, por vários sinais de péptidos ou sequências de retenção com *Hy-Per*, tem obtido sucesso para vários organitos intracelulares, incluindo o núcleo, citoplasma, peroxissomas, o espaço mitocondrial entre membranas e, a matriz mitocondrial (Dikalov & Harrison, 2012).

Denota-se que a potencialidade desta sonda, é que a sua fluorescência é reversível. Assim, uma vez que é carregada em células, pode ser utilizada para seguir os diferentes fluxos de peróxido ao longo do tempo. Isto em contraste com muitos corantes fluorescentes, amplamente utilizados, tais como DCF, que são permanentemente ativados por um impulso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Dikalov & Harrison, 2012).

Desenvolvimentos recentes incluem *Hy-Per* direcionados para vários compartimentos celulares. Este ensaio para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é potencialmente promissor, embora a sua gama de aplicações em biologia ainda não foi examinada de forma crítica (Kalyanaraman et al., 2012).

### ***Boronatos***

Muito poucas moléculas orgânicas pequenas reagem estequiometricamente com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para formar um produto fluorescente intracelular detectável. No entanto, os boronatos aromáticos, nomeadamente ácidos borónicos e seus ésteres, reagem com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para formar um único produto principal, o correspondente fenol, sendo que o rendimento desta reação é cerca de 100% (Kalyanaraman et al., 2012).

Uma porção de boronato ligado a um fluoróforo, por exemplo, fluoresceína, que, mediante a reação com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, forma uma molécula altamente fluorescente. Os ésteres boronato ligados a um fluoróforo são células permeáveis e interagem diretamente com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracelular para formar produtos fluorescentes nas células (Winterbourn, 2014).

O boronato como alvo mitocondrial, boronato aromático conjugado a um grupo alquila de trifenilfosfónio, foi recentemente utilizado *in vivo* para quantificar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em mitocôndrias. Neste estudo, Cochemé et al., (2011), descreveram uma sonda para avaliar os níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> numa matriz mitocondrial *in vivo*. A sonda, *MitoB*, compreende um catião trifenilfosfónio que aciona a sua acumulação dentro da mitocôndria, conjugado com um ácido arilborónico que reage com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para formar um fenol, *MitoP*. A quantificação da proporção *MitoP/MitoB* foi realizada por HPLC-MS/MS. Em suma, este

trabalho demonstra que é possível medir os níveis de  $H_2O_2$  dentro de mitocôndrias em organismos vivos e, assim, para testar diretamente hipóteses sobre o papel de  $H_2O_2$  mitocondrial nos processos biológicos. Os investigadores afirmam que esta abordagem não é limitada ao  $H_2O_2$ , muitos outros ROS podem ser medidos recorrendo a esta técnica, ajustando a química do grupo ligado à porção TPP (Cochemé et al., 2011).

Em contrapartida, os boronatos aromáticos também reagem estequiometricamente com  $ONOO^-$  quase um milhão de vezes mais rápido do que com  $H_2O_2$ , devem ser tidos em consideração (Kalyanaraman et al., 2012).

### ***Amplex® Red***

Outra sonda que é frequentemente utilizada para medir  $H_2O_2$  é *Amplex® Red*, *N-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine* (Dikalov & Harrison, 2012; Noctor et al., 2015). O *Amplex® Red* é oxidado pela peroxidase de rábano (HRP) e  $H_2O_2$  a um produto fluorescente, a resorufina (Kalyanaraman et al., 2012).

Embora outros oxidantes de um eletrão sejam capazes de oxidar o *Amplex® Red* a resorufina, a oxidação catalisada por HRP na presença de  $H_2O_2$  é altamente eficiente e aumenta muito o rendimento da resorufina (Kalyanaraman et al., 2012).

Por conseguinte, este ensaio é um método viável para medir continuamente a formação extracelular de  $H_2O_2$  (Noctor et al., 2015). Um importante factor de complicação, é a luz mediada pela oxidação fotoquímica de resorufina na presença de redutores biológicos, tais como a glutatona e NADH, que induzem a formação de radicais mediados por resorufina de e  $H_2O_2$  (Kalyanaraman et al., 2012). No entanto esta técnica pode representar alguns inconvenientes, devido às reações de radicais induzidos pela resorufina (Dikalov & Harrison, 2012)(Noctor et al., 2015).

Em suma, sob condições em que o  $H_2O_2$  é libertado a partir da célula ou em preparações mitocondriais isoladas, a sonda *Amplex® Red* pode ser aplicada para medir o  $H_2O_2$  na presença de HRP (Kalyanaraman et al., 2012).

## **2.2 Sondas Fluorescentes e quimioluminescentes para determinação RNS**

Na literatura científica, existem inúmeras sondas para a deteção de ROS e, do mesmo modo, variados estudos descreveram a aplicação de sondas fluorescentes e quimioluminescentes para a determinação de RNS. Neste trabalho iremos dar mais ênfase

às sondas 4,5-Diaminofluoresceína diacetato (DAF2-DA) e Dihidrorodamina (DHR), para a determinação de  $\text{NO}^{\bullet}$  e  $\text{ONOO}^{-}$ , respectivamente.

De momento, existem vários métodos baseados em fluorescência para a deteção de  $\text{ONOO}^{-}$ , dos quais foram desenvolvidos por diversos estudos. Porém, não são amplamente utilizados na atualidade. É muito recente para julgar as suas vantagens e desvantagens. Estes incluem sondas *NiSPY* (Li et al., 2013) e sondas de boronato (Zielonka, Sikora, Joseph, & Kalyanaraman, 2010; Kalyanaraman et al., 2012).

Tabela 6 – Resumo das sondas fluorescentes e quimioluminescentes para determinação RNS

Nome	Método	Referência
Monóxido de azoto ( $\text{NO}^{\bullet}$ )	4,5-Diaminofluoresceína diacetate (DAF2-DA)	(Li et al., 2013)
Peroxinitrito ( $\text{ONOO}^{-}$ )	Dihidrorodamina fluorescência	(Dikalov & Harrison, 2012); (Kalyanaraman et al., 2012) (Li et al., 2013)

#### ***4,5-Diaminofluoresceína diacetato***

A sonda 4,5-Diaminofluoresceína diacetato (DAF2-DA) é um método fluorescente, amplamente aplicado para a determinação de NO (Li et al., 2013).

Nas células, DAF2-DA reage com NO na presença de  $\text{O}_2$ , para se obter o triazolo fluoresceína altamente fluorescente (DAF-2T), que pode ser fluorometricamente medido a 538 nm, exibindo uma cor verde, quando uma amostra é excitada a 485 nm. Devido à alta permeabilidade celular, o método DAF2-DA permite a monitorização das alterações dinâmicas de fluorescência nas células, uma característica comum de sondas fluorescentes (Li et al., 2013).

#### ***Dihidrorodamina fluorescência***

A Dihidrorodamina fluorescência ou Dihidrorodamina 123 (DHR), é a sonda mais frequentemente aplicada para a medição da espécie reativa de azoto, nomeadamente o  $\text{ONOO}^{-}$  (Kalyanaraman et al., 2012). Caracteriza-se por ser um corante vermelho fluorescente (Dikalov & Harrison, 2012).

Primeiramente, o DHR é oxidado a rodamina 123, que é lipofílico e carregado positivamente, seguidamente é retido na mitocôndria pelo potencial de membrana. Desta forma, a rodamina 123 acumulada, é medida em torno de 536 nm, quando a amostra é excitada a 500 nm (Li et al., 2013).

A conversão oxidativa de DHR a rodamina é mediada por um radical intermediário de DHR que, no entanto, pode ser reduzido por tióis e ácido ascórbico. Consequentemente, conduz a resultados falsos-negativos (Dikalov & Harrison, 2012).

Deste modo, o perfil da reação geral de DHR a rodamina, na presença de cogeração  $\text{NO}^{\bullet}$  e  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , é influenciado pela química de radicais livres do radical DHR, que mostra uma resposta em forma de sino. A oxidação de DHR, co gerada por  $\text{NO}^{\bullet}$  e  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , é mediada por oxidantes ( $\text{NO}_2^{\bullet}$  e  $\text{OH}^{\bullet}$ ) formados a partir da decomposição rápida e espontânea de  $\text{ONOO}^-$  e, a oxidação DHR não é induzida diretamente por  $\text{ONOO}^-$ . O intermediário radical,  $\text{DHR}^{\bullet}$ , formado a partir da oxidação de um eletrão de DHR, também reage rapidamente com o oxigénio ( $k = 7 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), criando assim o mecanismo *redox cycling* e levando à amplificação da intensidade do sinal de fluorescência (Kalyanaraman et al., 2012).

Por conseguinte, o DHR só pode ser aplicado como um indicador intracelular, não específico, da formação de  $\text{ONOO}^-$  e  $\text{HOCl}$  (Ácido hipocloroso) (Dikalov & Harrison, 2012).

### **2.3 Ressonância paramagnética electrónica com a técnica de ‘*spin trapping*’**

Ressonância de *spin* electrónico (ESR), também designada por espectroscopia de ressonância paramagnética electrónica (EPR), é definida como uma técnica analítica com a finalidade para detectar e quantificar espécies químicas que possuem eletrões desemparelhados (Lee et al., 2012). Dentro destas espécies, destacam-se os radicais livres (Uchiyama et al., 2015) e compostos que contêm iões de metais de transição (Lee et al., 2012).

Os princípios básicos subjacentes a esta técnica podem ser comparados com os de ressonância magnética nuclear (RMN), com a principal diferença, a deteção de mudanças nos spins de eletrões, em vez de spins nucleares (Lee et al., 2012).

Mais especificamente, um eletrão colocado num campo magnético externo com a força  $B_0$ , irá alinhar o seu inerente momento magnético ao campo paralelo ou antiparalelo. Um alinhamento paralelo corresponde ao estado de menor energia do eletrão e um antiparalelo ao mais alto. Esta diferença de energia é expressa pela equação  $\Delta E = g_e \mu_B B_0$  em que  $g_e$  é o factor g-electrão, que é igual a 2,002 para amostras biológicas, e  $\mu_B$  é a constante Bohr magnetão. Um eletrão não emparelhado pode mudar a partir do menor para o estado de

energia mais elevado, depois de absorver a radiação eletromagnética de energia igual a  $e = hf = \Delta E$ , onde  $f$  é a frequência da radiação e  $h$  é a constante de Planck (Lee et al., 2012).

Um típico espectrómetro de ESR é formado por uma cavidade de ressonância rodeado por um par de magnetos eléctricos e um gerador de microondas que emite radiação em direção da cavidade. Ao manter uma frequência de microondas constante, um aumento de  $B_0$  vai proporcionalmente aumentar a diferença de energia entre os dois estados de eletrões até que a condição  $e = \Delta E$  seja cumprida, no qual, os eletrões do estado mais baixo de energia saltam para o mais alto, alcançando assim a ressonância de *spin* electrónico. Isto leva a uma absorção de energia electromagnética que pode ser detetada, visualizada num espectro e quantificada (Lee et al., 2012).

Com base neste princípio, a aplicação desta técnica a amostras biológicas, produziria resultados pobres (Lee et al., 2012), devido ao facto, de a maioria dos radicais livres, de relevância biológica, tem um tempo de vida muito curto e são, praticamente, impossíveis de detetar (Uchiyama et al., 2015). Para resolver este problema, o método de "*spin trapping*" foi desenvolvido (Lee et al., 2012).

Os '*spin traps*' são moléculas que ligam-se a radicais livres (Dikalov & Harrison, 2012), formando adutos mais estáveis que exibem espectros em ESR. As primeiras moléculas a serem utilizadas foram nitroso e compostos de azoto, que exibem excelente especificidade para vários radicais livres, tais como  $O_2^{\cdot-}$  e  $OH^{\cdot}$ . No entanto, em tecidos inteiros, esta técnica, '*spin trap*', não é eficaz para a medição, específica, dos radicais à base de oxigénio. Isto é devido a susceptibilidade de o aducto de nitrona para a degradação por mecanismos antioxidantes endógenos (Lee et al., 2012).

A deteção de ROS em sistemas biológicos, por conseguinte, requer sondas que reagem muito rapidamente com estas espécies para competir com os antioxidantes e produzir produtos estáveis, que podem ser quantificados (Dikalov & Harrison, 2012). Diferentes compostos têm sido empregues, contudo, não atuam como '*spin trap*' diretos, mas sim como 'sondas de *spin*' (Lee et al., 2012). É importante distinguir estes dois conceitos, '*spin traps*' de 'sondas de *spin*', pois a técnica '*spin trap*' forma uma ligação covalente com o radical por reação de adição, enquanto que na técnica 'sondas de *spin*', estas são oxidadas por ROS sem qualquer ligação (Dikalov & Harrison, 2012).

A classe mais eficaz de tais compostos são os hidroxilaminas cíclicos (Dikalov & Harrison, 2012), que compreendem um número de substâncias diferentes que podem ser

utilizados para a deteção e quantificação de ROS em uma variedade de amostras biológicas (Lee et al., 2012). Por exemplo, a *1-hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine* (CMH) penetra as membranas celulares e pode ser usado para quantificar a produção de ROS intracelular em amostras de tecido inteiro, enquanto, *1-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-yl-trimethylammonium* é impermeável à célula e é aplicado para quantificação de ROS extracelular em amostras de tecido.

Adicionalmente, o *1-hydroxy-3-carboxy-2,2,5-tetramethyl-pyrrolidine hydrochloride* (CPH) foi aplicado para a deteção de ROS *in vivo* e, tem sido empregue para a quantificação da produção de  $O_2^{\bullet-}$  extracelular em células intactas (Lee et al., 2012).

No geral, os hidroxilaminas cíclicos são extremamente sensíveis para a deteção de uma variedade de ROS, formando radicais estáveis que não se submetem a degradação biológica significativa e têm uma meia-vida mais longa (Lee et al., 2012).

Uma das diferentes aplicabilidades desta técnica, é para a determinação do singlete oxigénio. Basicamente, este método, inclui a aplicação do ‘*spin trap*’ que vai reagir com o  $^1O_2$  para produzir radicais que podem ser medidos por ressonância paramagnética electrónica (EPR), bem como, sondas cujas propriedades de absorção ou de fluorescência são caracteristicamente alteradas por reação com o  $^1O_2$  (Noctor et al., 2015). A medição de  $^1O_2$  *in vivo*, por meio desta abordagem, tem de ser manuseada com precaução, devido às suas limitações tais como: estabilidade, sensibilidade ou especificidade, ou devido a possíveis artefactos ligados à distribuição da própria sonda dentro do tecido (Fischer et al., 2013).

A técnica ‘*Spin trapping*’ acoplada de ressonância de *spin* electrónico (ESR), é uma técnica para detetar diretamente os radicais livres (Li et al., 2013). Segundo Oroian & Escriche (2015) é a técnica mais abrangente para detectar e monitorizar processos que envolvem radicais (Oroian & Escriche, 2015).

Devido ao tempo de vida muito curto dos radicais livres, torna-se difícil a deteção direta, através da ressonância de *spin* electrónico de (ESR) em temperatura ambiente. O ‘*spin trapping*’ proporciona um meio, que em princípio, que ultrapassa este problema. Nesta abordagem, a adição de radicais para uma nitrona de ‘*spin trap*’ resulta na formação de um aducto *spin* estável do radical, com uma semi-vida mais longa, e o aducto de *spin* produz um espectro característico por medição ESR (Li et al., 2013; Uchiyama et al., 2015).

Dependendo do radical, cada aduto *spin* geralmente reproduz um espectro de EPR característico do radical. O aduto *spin* é, assim, geralmente identificado mediante as bases de medição das constantes de acoplamento hiperfina de núcleos relevantes (Uchiyama et al., 2015).

Esta técnica foi empregue em estudos *in vivo* (Han, Takeshita, & Utsumi, 2001; Utsumi & Yamada, 2003), contudo, a principal limitação é a rapidez de remoção do aduto do radical *in vitro* e *in vivo* pelo metabolismo enzimático e por redução direta com antioxidantes (Halliwell & Whiteman, 2004). Além disso, instalação ESR não está disponível para maioria dos laboratórios (Li et al., 2013).

No entanto, oferece tanto informação qualitativa como quantitativa sobre as espécies paramagnéticas que possuem um ou mais eletrões desemparelhados. É o único método que detecta os radicais livres envolvidos na auto-oxidação. Além disso, a identidade do radical pode ser deduzida a partir do espectro obtido de ESR e, a intensidade do sinal de ESR, fornece uma estimativa da quantidade de radicais formados sob várias condições (Oroian & Escriche, 2015).

Um dos primeiros métodos para a deteção de  $O_2^{\cdot-}$  foi de '*spin trapping*' com 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO) (Finkelstein, Rosen, & Rauckman, 1980).

Durante muitos anos o DMPO foi a escolha de eleição para a determinação de biológica de  $O_2^{\cdot-}$  e  $OH^{\cdot}$  (Dikalov & Harrison, 2012; Berczyński et al., 2013), por causa dos espectros característicos dos adutos DMPO-OOH e DMPO-OH (Biller et al., 2015). Uma vez que os  $OH^{\cdot}$  tem um tempo de vida muito curto, as técnicas '*spin-trapping*' com DMPO estão aptas para a sua determinação (Oroian & Escriche, 2015).

Enquanto que DMPO e '*spin-trap*' nitrosones são muito úteis em estudos de enzimas isoladas e em soluções químicas, estes reagem com  $O_2^{\cdot-}$ , em constantes de velocidade muito lentas, entre 30 e 70  $M^{-1}s^{-1}$ , apresentando dificuldades em detetar  $O_2^{\cdot-}$  na maioria dos sistemas biológicos, devido à concorrência com a SOD e o ascorbato. Estas constantes de velocidade lenta, requerem que o DMPO e '*spin-trap*' tenham que ser utilizados em concentrações que variam de 20 a 100 mM (Dikalov & Harrison, 2012).

Devido a estas limitações, outras abordagens tem sido desenvolvidos para determinar ROS em células intactas e nas mitocôndrias. Estes incluem métodos de quimiluminescência, sondas fluorescentes, como já foi referido previamente, e, mais recentemente, métodos baseados em anticorpos, (Dikalov & Harrison, 2012).

Durante a última década, um novo método de ‘*immunospin-trapping*’ foi desenvolvido com base no conceito de que o DMPO reage com os radicais de proteínas, formando epitopos que podem ser, especificamente, imunologicamente identificados (Dikalov & Harrison, 2012).

As técnicas imunológicas podem ser altamente sensíveis e, portanto, este método expande a utilidade do ‘*spin trapping*’ (Dikalov & Harrison, 2012). Além disso, esta abordagem faz uso de DMPO e potencialmente outros ‘*spin trap*’ possíveis sem ESR (Dikalov & Harrison, 2012). Porém, é de disponibilidade limitada, muitas vezes não tem a sensibilidade pretendida e, particularmente, tem pouca aplicabilidade (Oroian & Escriche, 2015).

O ‘*immunospin-trapping*’ é aplicado para detectar a formação de adutos de radicais livres na mitocôndria, células, e amostras de tecido. É provável que esta abordagem possa ser amplamente empregue para analisar alvos específicos do ataque oxidativo no interior das células e organitos subcelulares (Dikalov & Harrison, 2012).

A limitação desta abordagem é que esta não deteta os radicais livres, tais como  $O_2^{\bullet-}$  ou o radical  $OH^{\bullet}$ . Em contrapartida, identifica adutos de proteínas modificados. De momento, é pouco claro se detetará todos os adutos de proteínas radicais e, futuramente, anticorpos adicionais terão de ser produzidos, para proporcionar uma maior sensibilidade (Dikalov & Harrison, 2012).

Mais recentemente, uma nova geração de ‘*spin trap*’ foi desenvolvido, tais como: *diethoxyphosphoryl* (DEPMPO) ou *5-tert-butoxycarbonyl-5-methyl-1-pyrroline-N-oxide* (BMPO), permitindo a identificação de  $O_2^{\bullet-}$  e  $OH^{\bullet}$ , em meio biológico, sem artefatos que são frequentemente associados com metodologias utilizando o DMPO (Biller et al., 2015). Embora existam várias abordagens para a detecção de ROS *ex vivo*, o grande desafio tem sido o de detectar estas espécies *in vivo*.

As metodologias para determinar a produção de  $O_2^{\bullet-}$ , *in vivo*, são, nomeadamente, ‘*spin-trapping*’ nitrona ou hidroxilaminas cíclicos (Dikalov & Harrison, 2012).

### **3. Métodos de determinação de biomarcadores**

Existe uma vasta gama de biomarcadores de *stress* oxidativo e técnicas laboratoriais disponíveis, cada um dos quais tem suas próprias vantagens e limitações (Niki, 2013).

Os biomarcadores são necessários para avaliar o estado de *stress* oxidativo *in vivo*, para o diagnóstico precoce de patologias, ou progressão destas, e, particularmente, para avaliar a eficácia do tratamento com medicamentos ou antioxidantes (Niki, 2013). A quantificação de radicais livres produzidos *in vivo* é um procedimento difícil, devido às suas características intrínsecas destes. Por esta razão, os compostos relacionados com os lípidos e peroxidação de proteínas tem sido amplamente aplicados para avaliar o *stress* oxidativo (Garcez et al., 2014). Entre os diferentes marcadores existentes, os F<sub>2</sub>-IsoPs, 8-iso-prostaglandina F<sub>2</sub> $\alpha$ , os hidroperóxidos de lípidos, MDA, 8-OHdG, 8-OHG/8oxoGuo, são na atualidade imprescindíveis para a determinação do *stress* oxidativo, dos quais serão abordados nos seguintes tópicos.

Contudo, até à data, não há consenso sobre os biomarcadores mais adequados de *stress* oxidativo em geral (Black et al., 2015).

Tabela 7 – Resumo sobre as principais técnicas aplicadas na determinação de biomarcadores

Nome	Método	Referência
<b>F2-IsoPs</b>	GC-MS	(Chafer-Pericas et al., 2015); (Milnea et al., 2013) (Frijhoff et al., 2015),
	GC-MS/MS	(Milnea et al., 2013)
	GC-NICI-MS	(Milnea et al., 2013) (Spickett, et al., 2010 2010)
	LC-MS/MS	(Chafer-Pericas et al., 2015) (Frijhoff et al., 2015)
	UHPLC-MS/MS	(Chafer-Pericas et al., 2015)
	ELISA	(Spickett et al., 2010) (Il'yasova, et al., 2012);(Niki,2013);(Milnea et al., 2013)
	Radioimunoensaios	(França et al., 2013)
<b>8-epi-prostaglandina2<math>\alpha</math></b>	GC/MS	(Bastani et al., 2012)
	LC/MS/MS	
<b>Hidroperóxidos</b>	HPLC-CL	(Spickett et al., 2010);(Niki, 2013); (França et al., 2013)
	HPLC-MS	(Niki, 2013)
	LC-MS/MS	(Niki, 2013)
	LC-CL	(Niki, 2013)
	LC-FL	(Niki, 2013)
	Ensaio iodométrico	(Spickett et al., 2010)
	Xilenol-orange	(Jiang, Hunt, & Wolff, 1992); (França et al., 2013)

Continuação da tabela da página anterior

<b>Malondialdeído (MDA)</b>	TBARS	(Frijhoff et al., 2015); (França et al., 2013); (Niki, 2013); (Spirlandeli et al., 2014); (Il'yasova et al., 2012)
-----------------------------	-------	---

	MDA-MP	(Spirlandeli et al., 2014)
	HPLC	(Spirlandeli et al., 2014)
	HPLC-UV	(Niki, 2013)
	HPLC-FL	(Pérez-Rodríguez et al., 2015)
	GC-MS	(Niki, 2013)

### 3.1. Determinação de marcadores de peroxidação lipídica

A peroxidação dos lípidos é uma das reações induzidas por radicais livres mais, extensivamente, estudadas no organismo (Bar-Or et al., 2015).

Os produtos de peroxidação lipídica são amplamente utilizados como marcadores de dano oxidativo no organismo (Noctor et al., 2015; Pérez-Rodríguez et al., 2015). Vários biomarcadores da peroxidação lipídica foram desenvolvidos e aplicados em amostras biológicas (Niki, 2013), sendo que a quantificação dos níveis de MDA é a abordagem mais comum (Pérez-Rodríguez et al., 2015).

Os primeiros métodos para a determinação de produtos da peroxidação de lípidos dependiam largamente de ensaios colorimétricos que, envolviam a reação dos produtos da peroxidação de lípidos com os reagentes químicos que geravam cromóforos. Por exemplo, o ensaio iodométrico é um dos métodos mais antigos aplicados para a medição de produtos de peroxidação lipídica (Niki, 2013).

Este é um método simples e conveniente, mas devido à falta de especificidade e sensibilidade, atualmente, não tem uso clínico. Com o advento das tecnologias modernas, tais como a cromatografia, espectrometria de massa, imunquímica e, técnica de imagem, métodos muito mais sofisticados, já estão disponíveis e são aplicados para a identificação, determinação da estrutura e quantificação dos produtos de peroxidação lipídica em amostras biológicas (Niki, 2013).

Várias amostras são utilizadas para a medição de biomarcadores *in vivo*, incluindo o plasma, o soro, eritrócitos, urina, saliva, lágrimas, o gás expirado, suor, bÍlis, fluido cerebrospinal, fluido sinovial, fluido de lavagem broncoalveolar, e tecidos. Além disso, o plasma ou soro, urina e saliva, apesar de serem colheitas por métodos não invasivos, são muito variáveis o que torna difícil a avaliação quantitativa. No entanto, foi descrito que a urina é constituída por uma matriz melhor do que o sangue, porque tem um teor de metal orgânico, bem como inorgânico, muito mais baixo. Assim, a urina tem menos

tendência para o aumento artificial de marcadores de oxidação durante a colheita, armazenamento, preparação, e análise da amostra (Niki, 2013).

Das técnicas disponíveis, a HPLC oferece a melhor sensibilidade e especificidade. A abordagem baseia-se na separação de HPLC de vários produtos. Diferentes sistemas de detecção pós-coluna podem ser aplicados, incluindo espectrometria de UV/visível, HPLC-CL, HPLC-FL, HPLC-ECD, LC-MS/MS (Niki, 2013).

A metodologia HPLC-MS forneceu uma nova abordagem para a quantificação, que minimiza a dimensão da amostra e a preparação necessária. As vantagens deste método incluem o mínimo de preparação da amostra, sensibilidade elevada e eliminação da questão relacionada com a instabilidade térmica na análise de cromatografia em fase gasosa (Niki, 2013).

Os métodos baseados em espectrometria de massa (MS) são muito sensíveis e específicos, mas necessitam de material técnico qualificado e trabalho de laboratório dispendioso. Além disso, a falta de análogos marcados com isótopos estáveis disponíveis comercialmente, é um factor limitante em métodos baseados em espectrometria de massa (Niki, 2013).

Os imunoenaios, embora menos específicos e quantitativos do que os métodos de LC-MS e GC-MS, foram definidos como ferramentas úteis com uma enorme capacidade de amostra/análise de custo relativamente baixo. Assim, a técnica de imunoenensaio, adequadamente validada, poderia constituir um instrumento importante para a avaliação de reações de radicais livres em pesquisa clínica, onde um grande número de amostras poderiam ser analisadas a um custo acessível (Niki, 2013).

Denota-se que os métodos específicos, tais como LC-MS ou GC-MS e o método ELISA aplicado a amostras biológicas, usualmente, não costumam conceder resultados satisfatórios. A geração de anticorpos específicos contra os produtos de peroxidação lipídica com elevada especificidade e afinidade são extremamente necessários (Niki, 2013).

Em suma, ainda não existe um método que seja específico, preciso e sensível, e suficientemente quantitativo para medir os produtos de peroxidação lipídica em amostras biológicas. As amostras humanas contêm baixos níveis de produtos de peroxidação lipídica e a sua medição pode ser interferida por outros materiais biológicos e também por oxidação artifactual durante a amostragem, armazenamento e análise (Niki, 2013).

### 3.2. Determinação F2-isoprostanos

Desde a descoberta destas moléculas, em 1990, uma classe de IsoPs, F2-isoprostanos, tornaram-se nos biomarcadores de escolha para avaliar o *stress* oxidativo endógeno (Niki, 2013), uma vez que, estas moléculas são quimicamente e metabolicamente estáveis e facilmente detectáveis nos fluídos biológicos e tecidos e, particularmente, não reativas (Jacob et al., 2013).

Após a sua descoberta, variados estudos foram realizados e atualmente é aceite que F2-isoprostanos são os biomarcadores mais confiáveis do *stress* oxidativo *in vivo* (Spickett, Wiswedel, Siems, Zarkovic, & Zarkovic, 2010; França et al., 2013; Jacob et al., 2013), em particular, da peroxidação lipídica (Black et al., 2015).

Estes compostos são geralmente medidos em amostras de urina (Il'yasova et al., 2012), plasma e soro. Uma vez que, os isoprostanos no plasma e no soro são geralmente esterificados, estas amostras necessitam de hidrólise alcalina a fim de quebrar os adutos de proteína-isoPs e determinar IsoPs totais (Chafer-Pericas et al., 2015).

Vários métodos têm sido desenvolvidos para quantificar os F2-isoprostanos. Dentro das principais técnicas aplicadas, em amostras biológicas, destacam-se a GC-MS (Chafer-Pericas et al., 2015), GC-MS/MS (Milnea et al., 2013), LC-MS/MS (Chafer-Pericas et al., 2015; Frijhoff et al., 2015), os imunoensaios enzimáticos, ELISA (Spickett et al., 2010; Niki, 2013; Milnea et al., 2013) e, os radioimunoensaios (França et al., 2013). Adicionalmente, cada um destes ensaios varia na mistura em particular dos regioisómeros F<sub>2</sub>-Isop que são medidos (Milne et al., 2012).

A quantificação de F2-isoprostanos por MS tem vantagens distintas em relação à análise por metodologias de imunoensaio, como ELISA. Embora a medição de ELISA ofereça uma análise de alto rendimento e não requere instrumentação dispendiosa, os anticorpos policlonais aplicados para ligar F2-isoprostanos exibem reatividade cruzada com outras moléculas semelhantes em estrutura, incluindo o derivado COX-PGF<sub>2α</sub>. Esta reatividade cruzada resulta na quantificação de concentrações de insuflação do F2-isoprostanos. Além disso, impurezas biológicas podem interferir com a ligação do anticorpo (Milnea et al., 2013). Adicionalmente, cada kit de ensaio pode medir apenas um isómero de F2-isoprostanos, e os resultados obtidos não são comparáveis aos resultados cromatográficos (Chafer-Pericas et al., 2015). A metodologia MS oferece alta sensibilidade e especificidade produzindo resultados quantitativos (Milnea et al., 2013).

Uma das metodologias utilizadas para quantificar simultaneamente IsoPs e IsoFs é a GC-MS (Milnea et al., 2013). No entanto, esta metodologia apresenta algumas desvantagens, tais como tempo de derivatização consumido para obter compostos voláteis, bem como baixa capacidade de identificar diferentes isómeros F2-isoprostanos. Do mesmo modo, necessitam de extração em fase sólida (SPE), extração líquido-líquido (LLE), bem como cromatografia de camada fina para a purificação das amostras e para conseguir alcançar uma determinação altamente específica de isoprostanos. Além disso, requerem grandes volumes de amostras (Chafer-Pericas et al., 2015).

A quantificação de F2-isoprostanos e IsoFs em uma amostra de tecido ou em um fluido específico, representa o *stress* oxidativo local, específico do órgão. Em tecidos de produtos de oxidação de ácido araquidónico são tipicamente esterificados nos glicerofosfolípidos, onde são formados. Do mesmo modo, os F2-isoprostanos e IsoFs esterificados em glicerofosfolípidos, estão presentes no plasma. No entanto, F2-isoprostanos e IsoFs só podem ser quantificados na forma de ácido livre (Milnea et al., 2013).

Os glicerofosfolípidos devem, primeiramente, ser extraídos a partir da amostra e, em seguida, submetidos à hidrólise alcalina para libertar os compostos, sob a forma de ácidos gordos livres. Importante, os ácidos gordos livres IsoF e F<sub>2</sub>-Isop devem ser submetidos à transformação química com o éster de pentafluorobenzilo, trimetilsililo, quer os análogos, antes da injeção no GC/MS, a fim de otimizar a ionização e manter a integridade estrutural durante a análise (Milnea et al., 2013).

No artigo científico Milnea et al 2013, para a quantificação de F2-isoprostanos utilizaram o método GC-NICI-MS e coluna capilar de cromatografia em fase gasosa (DB-1701, a Agilent 5973; Cat. No. 21.512.067). Os F2-isoprostanos foram cromatografados numa coluna capilar DB-1701 de sílica fundida de 15 m, pois verificaram que com esta coluna obtém-se uma excelente separação de regioisómeros individuais e separação de PG de confusão e metabolitos PG, incluindo derivado de ciclo-oxigenase PGF<sub>2</sub> $\alpha$  e o metabolito PGD<sub>2</sub> 9 $\alpha$ , 11 $\beta$ -PGF<sub>2</sub>, comparado com outras colunas. A temperatura da coluna é programada 190-300°C a 20°C por minuto. O metano é utilizado como gás reagente e o hélio é utilizado como gás transportador para o NICI. A temperatura da fonte iónica é de 200°C. O ião monitorizado, para endógenos F2-isoprostanos, é o anião carboxilato *m/z* 569 (M-181, perda de CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>F<sub>5</sub>, deixando o grupo pentafluorobenzilo). O anião carboxilato correspondente para o padrão interno deuterado é *m/z* 573. Cada dia a

sensibilidade do espectrómetro de massa é verificada através da injeção de um padrão consistindo em 40 pg cada  $\text{PGF}_{2\alpha}$  e  $[\text{}^2\text{H}_4]\text{-15-F}_{2t}$  IsoP. É importante realçar que os padrões sintéticos de IsoFs não estão disponíveis; assim IsoFs gerados a partir da oxidação de ácido araquidónico são usados como padrões de tempo de retenção (Milnea et al., 2013). As amostras recolhidas para este ensaio foram as seguintes: urina, tecidos e plasma. É importante destacar que este método oferece o menor limite de quantificação de qualquer metodologia de espectrometria de massa descrita para F2-isoprostanos. Isto é particularmente importante na quantificação destas moléculas no plasma, e outros fluidos biológicos em que os níveis baixos de F2-isoprostanos são encontrados. Além disso, de acordo com autor, esta é a única metodologia descrita para a quantificação do IsoFs (Milnea et al., 2013).

Spickett e colaboradores (2010), corroboram no seu artigo que a técnica de análise GC-NICI-MS, de momento, é o método mais sensível e consistente para a quantificação de F2-isoprostanos em fluidos e tecidos biológicos.

Apesar da forte evidência da sua utilidade como biomarcadores, é um desafio a adaptação generalizada de F2-isoprostanos em ensaios clínicos. Os métodos mais confiáveis para a sua quantificação, segundo Frijhoff et al., (2015), incluem, GC-MS e LC-MS/MS. Além disso, o método LC-MS/MS proporciona uma elevada sensibilidade e especificidade, e permite a medição simultânea de diferentes isómeros de F2-isoprostanos (Chafer-Pericas et al., 2015). Estes métodos para além exigirem um trabalho intensivo e rigoroso, requerem instrumentação especializada e dispendiosa. Enquanto os imunoensaios comerciais foram desenvolvidos como uma alternativa mais barata e mais fácil de MS, os resultados obtidos com estes imunoensaios muitas vezes não se correlacionam bem com os obtidos com GC-MS (Frijhoff et al., 2015; Chafer-Pericas et al., 2015).

Num estudo mais recente, descreveram um método fiável e sensível para determinação de um grande número de F2-isoprostanos e outros sub-produtos de peroxidação total em amostras de soro de recém-nascidos. Para este fim, os investigadores Chafer-Pericas et al., (2015), aplicaram a metodologia UHPLC-MS/MS.

Esta técnica, segundo Chafer-Pericas et al., (2015), fornece precisão adequada, sensibilidade e de alto rendimento para ser aplicada a amostras de soro de recém-nascidos. Além disso, o UHPLC-MS/MS descrito pode ser considerado uma alternativa simples aos métodos previamente descritos, nomeadamente, GC-MS e LC-MS/MS, que empregam a derivatização química e cromatografia em fase gasosa.

Na verdade, a utilidade deste método foi demonstrado pela análise de diversas amostras de soro para a obtenção de elevadas concentrações de alguns analitos, tais como  $\text{PGF}_{2\alpha}$  e 8-iso-15(R)- $\text{PGF}_{2\alpha}$  (Chafer-Pericas et al., 2015).

Diversas classes diferentes de IsoPs foram identificados em seres humanos, apesar de, F2-isoprostanos e IsoPs serem as mais bem estudadas, em certas condições biológicas, a quantificação de outras espécies podem ser mais relevantes. Por exemplo,  $\text{E}_2/\text{D}_2$ -IsoPs, que são formados competitivamente com F2-isoprostanos por isomerização em vez da redução do endoperóxido, são favorecidas de modo a formar *in vitro* quando os agentes redutores celulares, tais como a glutathiona (GSH) ou  $\alpha$ -tocoferol, estão esgotados. Assim, a razão de  $\text{E}_2/\text{D}_2$ -IsoPs para F2-isoprostanos fornece informações não só sobre a peroxidação lipídica em um determinado órgão, mas também sobre o ambiente redox nesse tecido (Milne et al., 2013).

Vários F2-isoprostanos, como referido anteriormente, tem sido os biomarcadores de escolha para avaliar o *stress* oxidativo, contudo, em particular, os 8-epi- $\text{PGF}_{2\alpha}$ , são, do mesmo modo, amplamente aplicados (Bastani et al., 2012).

### **8-epi-prostaglandina $2\alpha$ , 8-epi- $\text{PGF}_{2\alpha}$**

Atualmente os F2-isoprostanos, especificamente, 8-iso-prostaglandina  $\text{F}_{2\alpha}$  (8-iso- $\text{PGF}_{2\alpha}$ ), também é um recorrente indicador de *stress* oxidativo O 8-iso- $\text{PGF}_{2\alpha}$  é distinguido do seu análogo de peroxidação lipídica enzimática (prostaglandina  $\text{F}_{2\alpha}$ ;  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ) devido à estereoquímica em torno do carbono na posição 8 (Van'T Erve et al., 2015).

Tipicamente, 15- $\text{F}_{2t}$ -Isop, também designado por 8-iso- $\text{PGF}_{2\alpha}$  (Spickett et al., 2010), é um dos isómeros IsoP mais abundantes formados *in vivo* (Milne et al., 2012).

Bastani e colaboradores (2012) publicaram no seu estudo a análise de 8-epi- $\text{PGF}_{2\alpha}$ . A metodologia recorrida foi LC/MS/MS para a deteção de 8-epi- $\text{PGF}_{2\alpha}$  em amostras de sangue seco e a estabilidade deste marcador nestas amostras foi estudada e analisada.

A determinação exata e precisa deste composto em amostras biológicas pode ser difícil, devido à fraca estabilidade causada pela auto-oxidação do ARA, degradação e isomerização do isoprostano. Uma vez que os biomarcadores e metabolitos estão presentes em baixas concentrações em matrizes biológicas, e os volumes de amostra são muitas vezes limitados, as técnicas, mais sensíveis e específicos, utilizadas para medições de 8-epi- $\text{PGF}_{2\alpha}$  são: LC-MS/MS ou GC-MS (Bastani et al., 2012).

Em suma, o método é sensível, específico, robusto e eficiente. Pode medir com precisão as concentrações endógenas de 8-epi-PGF<sub>2α</sub>, portanto, oferece uma abordagem de diagnóstico por uma técnica que é menos invasiva do que os métodos convencionais e podem ser utilizados no futuro, para avaliar quantitativamente o *stress* oxidativo (Bastani et al., 2012).

### 3.3 Determinação Hidroperóxidos

Os marcadores de peroxidação lipídica são classificados em primários, os hidroperóxidos lipídicos, e secundários, que derivam da β-ruptura dos hidroperóxidos lipídicos (França et al., 2013).

Hidroperóxidos não são considerados produtos finais estáveis (Pérez-Rodríguez et al., 2015). Estes compostos reagem com os íons de metais de transição, tais como: ferro e cobre, para produzir radicais de oxigénio, que são decompostos termicamente e, conseqüentemente, não podem ser analisados diretamente por cromatografia de gás (GC) (Niki, 2013).

Um dos métodos mais antigos, adoptado como um padrão pela *American Oil Chemists Association* (AOCS), é o ensaio iodométrico, envolvendo a oxidação de iodeto a iodo por hidroperóxidos (Spickett et al., 2010). Neste método, o iodo pode ser quantificado de várias maneiras, tais como por titulação com solução de tiosulfato ou por reação com iodeto para formar tri-iodeto (I<sub>3</sub><sup>-</sup>). Porém, não é específico, devido ao facto que o peróxido de hidrogénio também reage de modo semelhante com o iodeto para formar iodo, assim como hidroperóxidos de proteína, e, além disso, qualquer composto que reage com iodo, iodeto ou tri-iodeto, interfere com o ensaio, incluindo ácidos gordos insaturados ou os compostos contendo anéis benzeno, ascorbato e oxigénio. O ensaio iodométrico só é válido em sistemas bem definidos, após a extração apropriada, para separar hidroperóxidos lipídicos de outros hidroperóxidos. Contudo, apresenta uma baixa sensibilidade em ~ 1 nmol (Spickett et al., 2010).

Diferentes tipos de hidroperóxidos de lípidos são separados recorrendo à metodologia por HPLC e, em seguida quantificados por quimioluminescência (CL) (Spickett et al., 2010), fluorescência (FL) ou espectrometria de massa (MS) (Niki, 2013).

A metodologia de HPLC-CL, destaca-se pela vantagem de que as classes de lípidos podem ser separadas utilizando um sistema de cromatografia de fase normal (Spickett et al., 2010). O HPLC-CL é muito específico e sensível, mas deve-se ter em conta a

intensidade quimiluminescência, porque depende do tipo de hidroperóxidos lipídicos e das condições de análise, incluindo o aparelho a configurar. Os níveis observados de hidroperóxidos no plasma humano, num indivíduo saudável, medidos por HPLC-CL variaram consideravelmente, variando de zero a várias centenas nM, sendo que, os mais recentes níveis relatados são muitas vezes abaixo de 100 nM (Niki, 2013).

Este método tem demonstrado alta sensibilidade, podendo-se detectar níveis abaixo de 10 nmol/L, dependendo da qualidade do detetor (França et al., 2013), além disso, têm sido amplamente aplicado na medição específica de hidroperóxidos lipídicos (França et al., 2013; Niki, 2013). Com a aplicação deste método é possível a quantificação de hidroperóxidos presentes em amostras biológicas, sem interferências de outras biomoléculas (França et al., 2013).

Este método também pode ser combinado com HPLC de fase reversa, como um passo de purificação ou, no âmbito do método de deteção, para separar os lípidos oxidados e hidroperóxidos lipídicos de estruturas diferentes. O eluente da coluna é misturado com luminol ou isoluminol, que pode ser oxidado por hidroperóxidos na presença do catalisador microperoxidase, com concomitante emissão de luz. Estas abordagens têm sido utilizadas para analisar os níveis de hidroperóxidos de fosfolípidos, hidroperóxidos de triacilgliceróis (Spickett et al., 2010) e ésteres colesterol (Hui et al., 2005), em amostras de plasma de voluntários saudáveis

Recentes avanços, tornaram possível identificar e caracterizar diversas espécies moleculares de fosfolípidos e hidroperóxidos de ésteres de colesterol em formas intactas por LC-MS/MS (Niki, 2013).

Segundo Niki (2013) os métodos LC-CL, LC-FL, e LC-MS/MS são métodos específicos e capazes de medir diferentes hidroperóxidos separadamente, todavia, não são nem simples nem rápidos e exigem técnicas qualificadas e equipamentos dispendiosos (Niki, 2013).

Métodos mais simples, que meçam hidroperóxidos totais, foram desenvolvidos do mesmo modo. O método que determina a concentração de hidroperóxidos em amostras biológicas, designa-se por xilenol-orange (França et al., 2013).

Este ensaio desenvolvido por Jiang e colaboradores (1992), baseia-se no princípio que o ião férrico  $Fe^{3+}$  formado pela reação de hidroperóxidos e ião ferroso de  $Fe^{2+}$  é medido espectrofotometricamente a 560 nm, após reação com laranja de xilenol. É um método

simples e sensível para a medição de peroxidação lipídica em lipoproteínas e lipossomas (Jiang et al., 1992). Os resultados deste método são relativamente reprodutíveis e pode ser aplicado para a determinação de hidropéroxidos tanto em fase aquosa como em lipídica. Porém, apresenta pouca especificidade pois pode sofrer interferências de diversas substâncias presentes no plasma sanguíneo (França et al., 2013).

Como método alternativo, usa-se o *Diphenylpyrenylphosphine* (DEPP) para medir os hidroperóxidos lipídicos totais em amostras biológicas (Takahashi et al., 2001). A reação de hidroperóxidos de lípidos e DPPE origina hidróxidos de lípidos e óxido de DPPP estequiometricamente e, o óxido de DPPP resultante pode ser medido com HPLC-FL ou GC-MS. O nível de hidroperóxidos de ésteres de colesterol, em plasma humano, determinado por este método foi descrito com 24,5 nM. Efetivamente, o método com grande sensibilidade e especificidade para hidroperóxidos é o método HPLC-CL (Niki, 2013).

Considerando a estabilidade química e a consistência dos níveis descritos em fluidos e tecidos humanos, os hidróxidos de lípidos são considerados mais adequados do que os hidroperóxidos. Especificamente, HODE e, HETE podem ser recomendados como biomarcadores confiáveis. Notavelmente, os quatro HODEs, *9-cis,trans*, *9-trans,trans*, *13-cis,trans*, e *13-trans,trans*-HODE, podem ser medidos separadamente por LC-MS/MS, pelas formas *trans,trans* e são produtos específicos de peroxidação lipídica mediada por radicais livres (Niki, 2013).

### **3.4. Determinação Malondialdeído**

Similares aos F2-isoprostanos, vários aldeídos altamente reativos e tóxicos, são formados como resultado da peroxidação de ácidos gordos poli-insaturados. Alguns destes aldeídos são utilizados como biomarcadores de danos oxidativos, incluindo o MDA, 4-HNE, 4-ONE, e acroleína. Um dos principais problemas em quantificar estes compostos em matrizes biológicas está seu metabolismo *in vivo* (Il'yasova et al., 2012).

Por muitos anos, o MDA e TBARS foram adotados, diversamente, como biomarcadores padrão de peroxidação lipídica *in vivo*, devido à simplicidade e baixo custo (Niki, 2013). Quando o SOD e outras oxidoredutases são insuficientes, a degradação da membrana gera peróxidos lipídicos altamente reativos e instáveis, cuja decomposição resulta na formação de substâncias denominadas ácido tiobarbitúrico (TBARS), incluindo MDA (Neri et al., 2015).

O MDA é um biomarcador frequentemente utilizado e é medido no plasma, urina, em espécies reativas do ácido tio barbitúrico (TBAR) (Il'yasova et al., 2012).

O método introduzido por Yagi (1976) tem sido amplamente utilizado (França et al., 2013). O princípio deste método consiste na reação do MDA com o ácido tiobarbitúrico (TBA), sob forte condição ácida e de aquecimento, que conduz à formação de produtos cor-de-rosa, que posteriormente, podem ser medidos por métodos colorimétricos ou fluorométricos (Niki, 2013). Ou seja, o TBA reage com MDA, quando aquecido a um pH ácido, e o complexo TBA-MDA é então medido através de leitura espectrofotométrica e cuja absorção ocorre em absorvância de 532nm e fluorescência em 553nm (Spirlandeli et al., 2014).

Apesar de sua simplicidade e facilidade de execução, o teste do TBA não é específico para o MDA, reagindo com uma ampla variedade de compostos como açúcares, aminoácidos, proteína, aminas e bilirrubina. Por este motivo é também denominado teste das substâncias que reagem com espécies reativas do ácido tio barbitúrico (TBARS) (França et al., 2013). Originalmente, foi aceite que TBARS aferia MDA, porém, atualmente, TBARS realmente mede outros aldeídos e produtos de decomposição de hidroperóxidos, o que, conseqüentemente o torna pouco específico (Niki, 2013).

No ensaio do ácido tiobarbitúrico (TBARS), até 98% do MDA medido, pode ser formado pelas condições de alta temperatura durante o próprio processo. Quando combinado com HPLC, adutos de MDA-TBA *in vitro* em plasma humano oxidado podem ser determinados reprodutivelmente e fiavelmente, embora este método requiera o processamento de amostras individuais e a sua validade como marcador de *stress oxidativo in vivo* permanece incerto, tornando-o menos aplicável para a rotina de uso clínico (Frijhoff et al., 2015).

Outro método alternativo para a medição de MDA, envolve a aplicação de *1-methyl-2-phenylindole* (MDA-MP), que é usado apenas como reagente cromómeros que não requer aquecimento prolongado. No entanto, uma desvantagem deste método é que os produtos formados nesta reação são instáveis e não mostram estabilidade a forte absorvância (Spirlandeli et al., 2014).

De modo a melhorar a especificidade, uma variedade de métodos de HPLC tem sido desenvolvidos. A medição direta do MDA por absorção de UV com HPLC é possível, mas sofre de sensibilidade inferior ao aduto MDA-TBA. Para superar este problema, GC-

MS e métodos de electroforese em capilar de alta resolução foram desenvolvidos (Niki, 2013).

No artigo de Il'yasova et al., (2012), afirmam que os ensaios com melhor especificidade para medir este composto incluem HPLC/GC-baseado no isolamento do produto (MDA)-TBAR e deteção espectrofotométrica de um pigmento colorido produzido por MDA e *N-methyl-2-phenylindole* (Il'yasova et al., 2012).

No estudo mais recente, Pérez-Rodríguez et al., 2015, analisaram a relação entre os dois marcadores amplamente utilizados na determinação da peroxidação lipídica, MDA-ROMs, e concentração de lípidos no sangue. Utilizaram amostras de sangue de quatro espécies de aves e indivíduos de diferentes idades.

As amostras e padrões foram injetados num sistema Agilent 1100 da série HPLC (Agilent, Waldbronn, Alemanha) equipado com um detetor de fluorescência e definido a 5 milímetros ODS-2 C-18 4,0 x 250-mm coluna mantida a 37°C. A fase móvel foi MeOH:KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (50 mM; 40:60 v/v), executando isocraticamente durante 10 min a um caudal de 1 mL/min. Os dados foram recolhidos aos 515 nm (excitação) e 553 nm (emissão) (Pérez-Rodríguez et al., 2015).

Pérez-Rodríguez et al., 2015, corroboram que ROMs são sub-produtos de peroxidação lipídica, mas também exibem uma forte atividade pro-oxidante no organismo, e a sua concentração absoluta pode, portanto, ser biologicamente significativa para obter um quadro mais completo dos processos redox em decurso no organismo. O mesmo se aplica ao MDA, que pode exercer efeitos citotóxicos e pró-oxidantes, embora a sua reatividade parece muito mais baixa do que a de ROMs.

Os resultados indicam que os níveis de peroxidação lipídica e os marcadores MDA-ROMs, comumente utilizados para medir os danos oxidativos, podem ser alterados pelo teor de lípidos da amostra, o que pode afectar as conclusões finais (Pérez-Rodríguez et al., 2015).

As técnicas recentemente desenvolvidas, tais como a CL, electroforese, GS e espectroscopia Raman, apresentam, todas, um inconveniente. Estes métodos sofrem de derivatização química geralmente sob condições adversas, tais como, forte acidez e/ou temperaturas elevadas, portanto, são apenas aplicáveis apenas em amostras de fluidos corporais tais como urina e soro (Chen et al., 2015).

Atualmente, existem variadas técnicas para detectar e quantificar esta molécula. Efetivamente, a determinação de MDA por HPLC é considerada uma técnica analítica de grande sensibilidade e especificidade. No entanto, esta técnica requer equipamento específico, assim como uma quantidade considerável de reagentes, instrumentação dispendiosa e técnicos de laboratório qualificados (Spirlandeli et al., 2014).

No geral, o método TBARS é conveniente, simples e de baixo custo, mas o inerente problema de especificidade (Spirlandeli et al., 2014) e, a variabilidade de dados torna difícil considerar-se como um biomarcador quantitativo e fiável de peroxidação lipídica *in vivo*, embora possa ser usado como uma ferramenta de rastreio (Niki, 2013). Segundo Il'yasova et al., 2012), embora este ensaio tenha sido extensivamente criticado como sendo não específico para MDA, porém, continua a ser amplamente usado.

#### **4. Determinação de danos no DNA**

Medir os danos no DNA em células é um problema analítico uma vez que o nível de danos a ser medido é relativamente baixo e representa geralmente menos do que uma modificação por milhão de bases normais (Nikitaki et al., 2015). Além disso, a medição tem que ser realizada com uma quantidade limitada de material biológico (Cadet & Poulsen, 2011).

Os métodos diretos para a determinação do dano oxidativo no DNA, são baseados em química analítica. O princípio da medição direta de lesões do DNA envolve, primeiramente, a extração do DNA genómico a partir das células, seguindo-se a hidrólise completa de unidades monoméricas, quer se trate de nucleótidos, nucleósidos ou bases. Além disso, a medição específica das lesões do DNA, no nucleótido, ou nucleósido, aplica-se um detetor específico, acoplado a uma separação cromatográfica (Ravanat, 2012). Os métodos de análise são usados para separar os produtos hidrolisados e um método de deteção específico é utilizado para detectar e quantificar as lesões (Nikitaki et al., 2015).

Os métodos para medir o grau de lesão do DNA, predominantemente, consistem em: GC-EI-MS, HPLC-ECD, HPLC-ESI-MS. Outro requisito para os métodos cromatográficos é a divisão de DNA em pequenos componentes que normalmente são nucleobases libertados mediante hidrólise ácida para a medição GC-MS ou, após digestão enzimática para a análise HPLC-MS (Cadet & Poulsen, 2011).

Atualmente, o método de HPLC-MS/MS, através de ionização por electropulverização, é o método de escolha (Cadet & Poulsen, 2010; Cadet & Poulsen, 2011; Nikitaki et al., 2015), para a medição de níveis baixos de danos de DNA (Ravanat, 2012).

Este método, devido a uma técnica de ionização macia, é muito sensível, pelo menos no modo de chamada de monitorização de reação múltipla que requer a técnica MS/MS. Adicionalmente, adopção de técnicas como HPLC-ECD e HPLC-MS/MS e protocolos adequados para a extração de DNA e hidrólise, podem ser medidas variadas lesões do DNA em células expostas a doses crescentes de radiação gama (Nikitaki et al., 2015).

A determinação pelo método HPLC-ECD explora alguns nucleósidos e nucleobases oxidados que apresentam um baixo potencial de oxidação, permitindo assim, a medição específica, de uma maneira sensível, no modo de oxidação de um eletrão. Contudo, este método é restrito a apenas algumas lesões altamente oxidáveis, porém, é robusto e preciso, uma vez aplicados os métodos de extração de DNA adequados (Cadet & Poulsen, 2011).

Presentemente, o método de escolha para a medição de nucleósidos e nucleobases oxidados, sob condições de *stress* oxidativo, é a técnica HPLC-ESI-MS/MS (Cadet & Poulsen, 2010).

Outros métodos alternativos são os ensaios enzimáticos, que foram inicialmente baseados na utilização de reparação de excisão de bases de enzimas bacterianas, incluindo *formamidopyrimidine DNA N-glycosylase (Fpg)* e endonuclease III (endo III), que permitem a conversão da pirimidina oxidado e a modificação de bases de purina em quebras da cadeia de DNA. A deteção das quebras de cadeia simples produzidos enzimaticamente, é subsequentemente feita de uma forma muito sensível, utilizando a técnica de eluição alcalina, o método de desenrolamento alcalino ou o ensaio de electroforese de célula única, o chamado ‘ensaio cometa’ (Cadet & Poulsen, 2011).

Por fim, existem outros métodos, incluindo imunoensaios, que apesar dos pontos fracos recorrentes, são ainda utilizados para monitorizar a formação de danos oxidativos no DNA celular (Cadet & Poulsen, 2011).

No mesmo seguimento, métodos bioquímicos indiretos também foram desenvolvidos. Estes ensaios medem geralmente as quebras de cadeia por acoplamento de enzimas de reparação de DNA, que convertem lesões em quebras da cadeia, ou através da utilização

de anticorpos específicos produzidos contra lesões do DNA. Deste modo, várias modificações podem ser quantificados (Nikitaki et al., 2015).

### **8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8-OHdG)**

A metodologia HPLC-ECD foi um dos primeiros métodos desenvolvidos, no início dos anos 80, para a deteção de 8-oxodGuo. Como esta lesão tem um potencial de ionização inferior à das bases normais, pode ser detetada de forma seletiva e quantitativa (Nikitaki et al., 2015).

Esta abordagem foi também estendida a algumas outras modificações de DNA, incluindo *5-hydroxy-2'-deoxycytidine (5-HO-dCyd)* e 8-oxodAdo. Este sistema também está, normalmente, equipado com um detetor de UV, menos sensível, que monitoriza as bases normais e, assim, os resultados podem ser diretamente expressos como o número de modificação por milhão de nucleósidos normais, em amostras de DNA enzimaticamente hidrolisadas (Nikitaki et al., 2015).

O método GC-MS é aplicado a amostras de DNA hidrolisadas em ácido que libertam bases livres. Este método requer também um passo de derivação adicional, uma vez que as bases do DNA não são suficientemente voláteis para ser separados por GC. Os produtos derivados podem então ser detetados pela espectrometria de massa, segundo o modo de monitorização iónica seleccionada (SIM). Esta abordagem é, portanto, mais versátil do que o método de HPLC-ECD que é limitado à deteção de apenas um pequeno número de lesões de DNA (Nikitaki et al., 2015).

Os compostos 8-oxoguanina e 8-oxodG são a maior consequência mutagénica do *stress* oxidativo, e podem ser, especificamente, detetados em separado. Foram desenvolvidos ensaios para medir quantitativamente bases de 8-oxoGua e 8-oxodG em amostras de DNA humano, tais como HPLC, GC/MS, imuno-histoquímico, e ELISA (Jacob et al., 2013).

Em relação ao método ELISA, a especificidade deste tem sido questionada, e confirmou-se que a utilização deste ensaio conduz a uma sobreavaliação do rendimento de 8-oxodGuo no que diz respeito às medições de HPLC-MS/MS (Cooke, Olinski, & Loft, 2008). Do mesmo modo, foi demonstrado que a ureia pode interferir com a imunodeteção de 8-oxodGuo na urina (Song et al., 2009), levando à recomendação de HPLC-MS/MS (Garratt et al., 2010), como método de escolha, apesar da sua complexidade e custo elevado para a medição 8-oxodGuo em fluidos humanos (R Andreoli et al., 2010).

A utilização de amostras de urina para a quantificação de 8-OHdG na maior parte das

vezes é problemática devido às baixas concentrações dos analitos, à complexidade da matriz e à facilidade com que se formam artefactos de 8-OHdG a partir da desoxiguanosina durante a preparação da amostra. No entanto, a oxidação dos artefactos é muito maior em amostras de DNA, onde a relação de dG para 8-OHdG é maior do que a encontrada na urina (Mendes, 2012).

A definição duma metodologia adequada para avaliar os níveis de 8-oxodG, constitui uma área de preocupação imprescindível para o campo de *stress* oxidativo. No final do ano 1990 foi formado *The European Standards Committee on Oxidative DNA Damage* (ESCODD) com a finalidade de estabelecer protocolos padrão para avaliar os níveis de 8-oxodG em amostras de DNA, de voluntários saudáveis, isoladas de linfócitos (Lunec, 1998). Este grupo, de laboratórios de pesquisa, avalia os vários métodos disponíveis para preparar e medir amostras de 8-oxodG, assim como define unidades padrão que descrevem os diferentes níveis de danos. Os laboratórios ESCODD definiram um nível de referência de dano oxidativo, segundo o intervalo de 0,3 a 4,2 8-oxodG por 106 guaninas, e estão atualmente a trabalhar na definição de um nível de referência absoluto para o dano oxidativo (Jacob et al., 2013).

Até à data, ainda não foi identificado um método perfeito para determinar os níveis de 8-oxodG. Com base em ensaios de laboratórios, concluiu-se que tanto o método de cromatografia GC-MS como o HPLC-MS/MS não são, suficientemente, fiáveis para avaliar baixos níveis de dano oxidativo (Jacob et al., 2013).

## **5. Determinação de danos no RNA**

Um grande número e tipos de RNAs no organismo são considerados potenciais alvos para ROS (Jacob et al., 2013). Há muitas razões para que o RNA seja mais propenso a danos oxidativos do que o DNA, incluindo: o RNA é principalmente de cadeia simples, deixando-o facilmente alcançável para ROS; não existe um mecanismo de reparação ativa identificado para o RNA oxidado; o RNA é menos protegido em comparação com as proteínas de DNA e por último os RNAs citoplasmáticos estão perto das mitocôndrias, onde muitas ROS são produzidas (Hofer et al., 2005).

De facto, tem sido demonstrado que o dano oxidativo no RNA é mais prevalente do que o dano oxidativo no DNA em humanos (Hofer et al., 2005; Henriksen, Hillestrøm, Poulsen, & Weimann, 2009; Jacob et al., 2013), e que a oxidação no RNA é influenciada pelo meio

ambiente e não pela genética, como é mostrado através de estudos twins (Roberta Andreoli et al., 2011).

### **7,8-Dihidro-8-oxo-guanosine (8-OHG/8oxoGuo)**

A similaridade entre as moléculas humanas de DNA e RNA conduz à ideia de que as lesões oxidativas do DNA poderiam também ser observadas nas bases correspondentes em RNA (Jacob et al., 2013).

Atualmente, apenas o produto oxidado de guanosina, 7,8-di-hidro-8-oxo-guanosina (8-OHG), tem sido investigado. O 8-OHG é um dos mais examinados produtos de oxidação de RNA devido à sua semelhança com a lesão 8-oxoG em DNA, e sua capacidade de usar muitas das mesmas metodologias verificadas em substratos de DNA para a análise de produtos de oxidação de RNA (Jacob et al., 2013).

A cromatografia e imunoenaios, são os dois métodos de detecção mais frequentemente aplicados, extensão do iniciador e transcrição reversa, sondas reativas aldeído (Tanaka, Han, Küpfer, Leumann, & Sonntag, 2011), e Southern blotting (Jacob et al., 2013).

Os vários métodos de cromatografia empregues para detectar produtos de RNA oxidados são altamente específicos e incluem métodos de HPLC acoplados com UV, EC (Jacob et al., 2013), ou MS (Henriksen et al., 2009; Roberta Andreoli et al., 2011), bem como a técnica UPLC-MS/MS (Henriksen et al., 2009). Destes, o método de HPLC-EC está apto para detectar bases de 8-OHG a 20 fmol e o método de HPLC-MS pode detectar bases de 8-OHG a 12,5 fmol (Jacob et al., 2013). Porém, o método HPLC-EC, atualmente, é raramente aplicado na determinação desta lesão (Frijhoff et al., 2015).

As metodologias imunológicas utilizadas para identificar produtos de oxidação de RNA utilizam dois anticorpos monoclonais, 15A3 e 1F7, que detectam lesões 8-OHG. Os ensaios utilizados com esses anticorpos para detectar 8-OHG, demonstraram um aumento dos níveis de produtos de oxidação de RNA. Além disso, a especificidade do anticorpo é ainda muitas vezes questionado. Note-se que muitos dos ensaios utilizando os métodos imunológicos requerem validação por outros métodos mais específicos (Jacob et al., 2013).

Aplicando os protocolos de cromatografia, no estudo de coorte de Henriksen e colaboradores (2009) afirmam que existem níveis mais elevados de oxidação 8-OHG no RNA que oxidação 8-oxodG no DNA (Henriksen et al., 2009).

## 6. Determinação de antioxidantes

As defesas antioxidantes compreendem uma grande variedade de compostos de natureza química diferente, o que o torna impraticável quantificação simultaneamente destes. Mais importante, os níveis de antioxidantes por si só não refletem a resistência das defesas antioxidantes (Pérez-Rodríguez et al., 2015).

Os níveis de antioxidantes, as vitaminas ou enzimas antioxidantes são meramente informativos, apenas refletem o lado da homeostase redox, deixando a questão não respondida se uma diminuição dos níveis são, na verdade, também indicativo de maior dano oxidativo (Black et al., 2015). As seguintes tabelas, 8, 9 e 10 demonstram resumidamente as técnicas aplicadas para a determinação do ácido ascórbico,  $\alpha$ -Tocoferol e GSH e GSSG, respetivamente.

Tabela 8 - Resumo dos métodos de determinação de ácido ascórbico

Antioxidante	Método	Referência
Ácido Ascórbico	Titulação	(Pisoschi et al., 2014). (Skrovankova et al., 2015)
	Fluorimétrico	(Skrovankova et al., 2015) (Xia Wu et al., 2003) (Roman Kand'ár, 2016)
	Espectrofotométrico	(Güçlü et al., 2005) (Pisoschi et al., 2014)
	Enzimático	(Roman Kand'ár, 2016)
	HPLC	(Khan et al., 2011); (Mazurek & Jamroz, 2015); (Skrovankova et al., 2015); (Roman Kand'ár, 2016)
	HPLC-UV	(Iglesias, González, & Medina, 2006); (Roman Kand'ár, 2016)
	HPLC-UV/DAD	(Gazdik et al., 2008); (Shintani, 2013); (Pisoschi et al., 2014); (Rodríguez-Comesaa, et al., 2002); (Mazurek & Jamroz, 2015); (Khan et al., 2011); (Skrovankova et al., 2015).
	HPLC-ECD	(Gazdik et al., 2008; Shintani, 2013); (Pisoschi et al., 2014)
Sistemas coulométricos e amperométricos	(Skrovankova et al., 2015);	

Tabela 9 - Resumo dos métodos de determinação  $\alpha$ -tocoferol

<b>Antioxidante</b>	<b>Método</b>	<b>Referência</b>
<b><math>\alpha</math>-Tocoferol</b>	HPLC de fase reversa	(Nirungsan & Thongnopnua, 2006); (Grebenstein & Frank, 2012),
	HPLC	(Nagy, Courtet-Compondu, Holst, & Kusmann, 2007)
	Fluorométricos	(Taibi & Nicotra, 2002)
	MS	(Nagy et al., 2007)
	HPLC-UV	(Ortega, Coperías, Castilla, Gómez-Coronado, & Lasunción, 2004); (Paliakov et al., 2009); (Cimadevilla et al., 2014).
	HPLC-UV	(Iglesias et al., 2006); (Roman Kand'ár, 2016)
	HPLC-PDA	(Cimadevilla et al., 2014)
	UPLC	(Bell et al., 2013); (Citová et al., 2007); (Chauveau-Duriot, Doreau, Nozière, & Graulet, 2010); (Granado-Lorencio, Herrero- Barbudo, Blanco-Navarro, & Pérez-Sacristán, 2010).

Tabela 10 - Resumo dos métodos de determinação de GSH e GSSG

Antioxidante	Método	Referência
Glutathiona (GSH) e Dissulfureto de Glutathiona (GSSG)	Espectrofotométrico	(I. Rahman, Kode, & Biswas, 2006)(Araujo, Saraiva, & Lima, 2008)
	Fluorimétrico	(Wang et al., 2005)(Widengren et al., 2006)
	ECD	(Rivas et al., 2007)(Timur, Odaci, Dincer, Zihnioglu, & Telefoncu, 2008)
	Quimioluminescente	(Roman Kand'ár, 2016)
	Ressonância Magnética Nuclear	(Terpstra, Marjanska, Henry, Tkáč, & Gruetter, 2006)(Mali'n, Lindberg, & Åstot, 2014)
	HPLC	(Kand'ár, Stramová, Drábková, & Brandtnerová, 2014)(R. Kand'ár & Hájková, 2014)
	HPLC/MS	(R. Kand'ár & Hájková, 2014)(Zhang et al., 2008) (Squellerio et al., 2012).
	HPLC-ECD	(Squellerio et al., 2012) (Christophe Bayle, Caussé, & Couderc, 2004).
	LC-MS/MS	(Squellerio et al., 2012)(Guček, Makuc, Mlakar, Beričnik-Vrbovšek, & Marsel, 2002)
	LC/ESI-MS/MS	(Zhang et al., 2008)
	UPLC/ESI/MS	(Mali'n et al., 2014)
	GS	(Tea, Ferchaud-Roucher, Kuster, Darmaun, & Robins, 2007)
	Electroforese capilar	(C. Bayle, Issac, Salvayre, Couderc, & Caussé, 2002)(Christophe Bayle et al., 2004)(Kowalska, Zalewska, & Milnerowicz, 2014)(Xue Wu et al., 2016)
Sondas <i>Monochlorobimances</i> e <i>Monobromobimane</i> Sonda Ortho-ftaldialdeído <i>5,5-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid)</i> ,	(Spickett et al., 2010)	

### 6.1. Determinação Ácido ascórbico

Existem muitos métodos para a determinação de ácido ascórbico em várias amostras biológicas (Roman Kand'ár, 2016).

Os métodos tradicionais de avaliação de ácido ascórbico envolvem titulação com uma

solução oxidante *dichlorophenol indophenol* (DCPIP), iodato de potássio ou de bromato (Pisoschi et al., 2014).

Os métodos analíticos tais como: métodos convencionais de titulação, fluorimétrico, espectrometria, quimioluminescência, electroforese capilar, métodos electroquímicos, métodos amperométricos (Pisoschi et al., 2014; Skrovankova et al., 2015), métodos enzimáticos, e métodos HPLC (Khan et al., 2011) são os mais comuns, para determinação de ácido ascórbico.

As técnicas mais simples para a determinação de ácido ascórbico são considerados os métodos de titulação clássicos. A solução oxidante mais aplicada nestas determinações pertence *2,6-dichlorophenol indophenol* (DCPIP), brometo de potássio, *N-bromosuccinimide* ou iodeto de potássio. Porém, o principal problema da utilização dos métodos volumétricos é a falta de especificidade (Skrovankova et al., 2015).

O método fluorimétrico para a determinação de ácido ascórbico é baseado na reação de condensação entre ácido ascórbico e *o-phenylenediamine* (OPDA). Para a oxidação de ácido ascórbico a DHA e reação com OPDA, o oxidante *N-bromosuccinimide and iodone* (DCPIP) é aplicado. A sensibilidade do método comum OPDA é baixa devido ao efeito de branco do oxidante (Skrovankova et al., 2015).

Alguns dos métodos recorrem às propriedades redutoras do grupo 1,2-enediol do ácido ascórbico, com o qual monitorizam as alterações nas absorvância de um indicador de cor, tal como *2,6-dichlorophenolindolphenol*. Um outro procedimento possível é a oxidação de ácido ascórbico para DHAA e depois derivatização do grupo oxo-de DHAA com DNPH ou *ortho-phenylenediamine* (Roman Kand'ár, 2016).

Em relação ao método fluorimétrico com *2,3-diaminonaphthalene* (DAN), a um pH com valores compreendidos entre 10,2-10,5, e 2-cianoacetamida a pH 12,9-13,3, também pode ser utilizado para a análise de ácido ascórbico (Skrovankova et al., 2015).

O método espectrofotométrico, desenvolvido por Güçlü e colaboradores (2005), mede os valores de absorvância a 450 nm da redução do complexo Cu(II)-neocuproine a Cu (I)-bis(neocuproína), e, assim como, a oxidação de ácido ascórbico a DHA. Do mesmo modo, o ácido ascórbico pode ser avaliado espectrofotometricamente baseado na sua reação com o *hexacyanoferrate* (III), na sua oxidação usando o complexo Cu(II)-neocuproine, ou na determinação de iodo que reage com ácido ascórbico (Pisoschi et al., 2014; Skrovankova et al., 2015). Outros métodos ópticos para a estimativa de vitamina C incluem

quimiluminescência (Pisoschi et al., 2014). Neste seguimento, um método enzimático usando um ascorbato oxidase altamente específica (CE 1.10.3.3) também pode ser utilizado na determinação de ácido ascórbico (Roman Kand'ár, 2016)

Os métodos de espectrofotometria, métodos enzimáticos e análise quimiluminescência, consistem em metodologias demoradas devido à duração de análise e, em consequência da degradação do ácido ascórbico, logo, os resultados determinados são então sobrestimados (Skrovankova et al., 2015).

Todavia, todos os métodos referidos anteriormente, ou são inespecíficos ou insensíveis (Roman Kand'ár, 2016) Por esta razão, foram desenvolvidos diversos métodos de HPLC (Khan et al., 2011; Mazurek & Jamroz, 2015; Skrovankova et al., 2015; Roman Kand'ár, 2016), acoplado de UV-Vis (Iglesias et al., 2006), UV/DAD (Rodríguez-Comesaa, García-Falcón, & Simal-Gándara, 2002; Mazurek & Jamroz, 2015), deteção electroquímica (Gazdik et al., 2008; Shintani, 2013; Pisoschi et al., 2014) e, MS (Roman Kand'ár, 2016).

Os níveis exatos desta molécula em diferentes amostras podem ser determinados através da técnica de HPLC, que demonstra uma boa seletividade e especificidade (Mazurek & Jamroz, 2015), acoplado espectroscopia UV/DAD (Rodríguez-Comesaa et al., 2002; Mazurek & Jamroz, 2015), electroquímicos (Gazdik et al., 2008; Shintani, 2013; Pisoschi et al., 2014; Mazurek & Jamroz, 2015) ou por deteção de fluorescência de (Iglesias et al., 2006).

Relativamente aos métodos cromatográficos, particularmente HPLC-UV/DAD tem sido aplicados na avaliação de ácido ascórbico em produtos alimentares (Mazurek & Jamroz, 2015) e, de fluidos biológicos. Recorrendo à técnica HPLC com deteção por UV é, provavelmente, a abordagem mais simples e mais económica para a medição de ácido ascórbico em materiais biológicos (Roman Kand'ár, 2016).

Para determinar o *status* da vitamina C em diferentes amostras, o ácido ascórbico e o seu produto de oxidação DHA devem ser medidos simultaneamente. O ácido ascórbico é uma molécula polar com um tempo de baixa retenção em sistemas de fase reversa convencionais de HPLC e, portanto, de difícil resolução com outras moléculas semelhantes (Barros, Silva, Gonçalves, & Nunes, 2010; Mazurek & Jamroz, 2015). Esta molécula absorve fortemente no comprimento de onda 245 ou 265 nm, logo, o DHA é

medido após derivatização, com *4,5-dimethyl-o-phenylenediamine* (DMPD) como agente derivado, por monitorização da absorvância de UV a 360 nm (Skrovankova et al., 2015).

O principal problema na determinação do ácido ascórbico consiste na preparação da amostra, devido ao processo natural da oxidação deste. A oxidação de ácido ascórbico é influenciada principalmente pela temperatura, a luz, o pH, a quantidade de oxigénio dissolvido na amostra, o solvente utilizado, a força iónica e a presença de enzimas oxidantes e certos catiões divalentes. No mesmo seguimento, para a análise por HPLC, em que a amostra pode ser exposta à luz do dia, durante várias horas, é recomendado o uso de frascos de âmbar (Roman Kand'ár, 2016).

Em amostras de plasma em que o EDTA seja o anticoagulante, o ácido ascórbico demonstrou ser estável. Isto é provavelmente devido à capacidade de EDTA para captar os catiões bivalentes tais como  $Fe^{3+}$  e  $Cu^{2+}$ , que são a causa do aumento da oxidação de ácido ascórbico (Kand'ár, 2016).

Neste seguimento, por ser susceptível à oxidação em solução aquosa, por conseguinte, a sua estabilidade nas amostras devem ser melhorada por adição de compostos adequados, tais como ácido metafosfórico (MPA). Este ácido, fornece uma extração eficiente das amostras, uma vez que impede a oxidação de ácido ascórbico melhor do que outros ácidos (por exemplo, ácido tricloro acético (TCA) (Skrovankova et al., 2015).

A redução de DHA pode ser realizada por agentes de redução incluindo alguns compostos de sulfidriolo tais como *dithiothreitol* (DTT), *dithioerythritol* (DTE), homocisteína (Kand'ár, 2016), a cisteína, a glutathiona, *mercaptoethanol*, ou *tris(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride* (TCEP) (Chebrolu, Jayaprakasha, Yoo, Jifon, & Patil, 2012; Tarrago-Trani, Phillips, & Cotty, 2012).

Quando aplica-se o DTE como um agente de redutor, o ácido ascórbico fica estável durante muitas horas à temperatura ambiente, até várias semanas a 4°C e durante vários meses ou anos até 80 °C. O problema quando se utiliza DTE ou DTT é que eles absorvem fortemente a 245 nm e eluem perto de ácido ascórbico. Contudo, em condições de HPLC adequadas, o DTT não interfere com a determinação desta molécula (Roman Kand'ár, 2016). Segundo Kand'ar (2016), o ácido ascórbico e DHAA são mais estáveis no plasma contendo EDTA ou EDTA com DTT.

A metodologia de HPLC com deteção electroquímica é uma técnica eficiente para medição de ácido ascórbico nos produtos alimentares (Mazurek & Jamroz, 2015) e,

fluidos biológicos, devido à sua simplicidade, baixo custo, seletividade e sensibilidade (Khan et al., 2011; Skrovankova et al., 2015).

O ácido ascórbico é relativamente reativo e fácil de detectar em sistemas coulométricos e amperométricos. Como detetor amperométrico *Coulochem III* pode ser aplicado (Gazdik et al., 2008), o detetor coulométrico, tais como *CoulArray*, foi concebido para a deteção de espécies electroativos no eluente de modo que meça o ácido ascórbico antes e depois da redução (Skrovankova et al., 2015).

Embora a deteção electroquímica ofereça as vantagens de baixos limites de deteção com alta seletividade, o produto de oxidação de ácido ascórbico não pode ser detectado no modo oxidativo (Skrovankova et al., 2015).

## **6.2. Determinação $\alpha$ -Tocoferol**

O primeiro ensaio utilizando HPLC para separação de vitaminas solúveis em gordura foi relatado por Vecchi e Oesterhelt (1973). Desde então, vários métodos analíticos foram desenvolvidos para analisar  $\alpha$ -tocoferol ( $\alpha$ T) em amostras biológicas (Cimadevilla et al., 2014).

Em estudos anteriores (Nirungsan & Thongnopnua, 2006; Grebenstein & Frank, 2012), a técnica preferencial é HPLC de fase reversa com base na fase estacionária C<sub>18</sub> para atingir análise  $\alpha$ T em vez de utilizar a fase normal (Nagy et al., 2007). Os métodos fluorométricos (Taibi & Nicotra, 2002), electroquímica (Hermans, Cos, Berghe, Vlietinck, & De Bruyne, 2005), por espectrometria de massa (Nagy et al., 2007) ou detetores de UV (Ortega, Coperías, Castilla, Gómez-Coronado, & Lasunción, 2004; Paliakov et al., 2009) tem sido, do mesmo modo, aplicados.

Porém, diferentes tipos de matrizes biológicas exigem métodos específicos de análise de  $\alpha$ T. Em regra geral, a análise da concentração de  $\alpha$ T no plasma é normalmente analisada por HPLC de fase reversa utilizando uma ampla variedade de composições de fase móvel (Cimadevilla et al., 2014).

Os protocolos para a purificação e deteção de cromatografia são diferentes para cada tipo de amostra biológica e, por isso, é muito difícil seleccionar um único método para detectar  $\alpha$ T em amostras de natureza diferente, tal como o plasma, eritrócitos, células de cultura ou tecidos (Cimadevilla et al., 2014). Posto isto, Cimadevilla e colaboradores (2014)

desenvolveram um ensaio de HPLC-UV comum, simples, robusto para a análise e quantificação de  $\alpha$ T em uma ampla variedade de amostras biológicas.

No estudo de Cimadevilla e colaboradores (2014), o método de HPLC de fase reversa-PDA foi desenvolvido para determinar a quantidade de  $\alpha$ T em diferentes matrizes biológicas. Dada a complexidade das amostras biológicas, foram necessários passos de purificação, incluindo a precipitação da proteína e desnaturalização. O método de Cromatografia líquida alta eficiência combinada com detetor de fotodiodos (HPLC-PDA) descrito por Cimadevilla e colaboradores (2014) é simples, sensível, preciso, linear, preciso, reprodutível e repetível e específico e tem estabilidade.

A principal vantagem deste método cromatográfico é a aplicação do mesmo protocolo para diferentes amostras biológicas. Este método foi aplicado com sucesso no plasma de humano e murganhos, tecidos e linhas de células diferentes. Além disso, no presente estudo, Cimadevilla e colaboradores (2014) demonstram que o método é adequado para a determinação de  $\alpha$ T em tecidos murinos, tornando-o adequado para aplicação em experiências com animais envolvendo estudos de vitamina E.

Bell e colaboradores 2013, desenvolveram um método de cromatografia líquida de desempenho ultra-rápido (UPLC), seletivo e sensível para a detecção e quantificação de tocoferóis e retinol, em simultâneo, no plasma humano.

A UPLC permite uma maior velocidade e resolução em cromatografia líquida. A coluna sílica híbrida com pontes de etileno (BEH) é capaz de suportar até 15.000 psi de pressão de retorno e, é aplicada em muitos sistemas de UPLC Waters<sup>TM</sup>. Esta tecnologia determina tamanhos de partículas muito pequenas em leitos de coluna para aumentar a eficiência da coluna e, tem excelente aplicabilidade na caracterização de vitaminas lipossolúveis em matrizes complexas (Bell, John, Hughes, & Pham, 2013).

Para a análise de  $\alpha$ -tocoferol,  $\gamma$ -tocoferol e o retinol, os investigadores, aplicaram a detecção de fluorescência, com comprimentos de onda de excitação/emissão de 295/330 nm e 325/470 nm, respectivamente (Bell et al., 2013).

O método de fase reversa incorpora eluição de gradiente com uma fase móvel que consiste de metanol e acetonitrilo. A separação dos compostos de vitamina é conseguida através de uma coluna ponte de acetato C18 híbrido. O tempo de retenção para o retinol foi de 1.6 min, acetato de retinol 1.8 min,  $\gamma$ -tocoferol 3.9 min e,  $\alpha$ -tocoferol 4.3 min. Os limites

de quantificação para o retinol,  $\gamma$ -tocoferol e  $\alpha$ -tocoferol e foram 0,02, 0,02 e 0,1 mg/mL, respectivamente.

Os investigadores concluíram que este método de ensaio UPLC, é adequado para a análise, em simultâneo, de tocoferóis e retinol no plasma humano (Bell et al., 2013).

Estudos de retinol e/ou tocoferol têm sido desenvolvidos com o método UPLC, porém estes métodos apresentam a deteção ultravioleta destes compostos durante o decurso do ensaio (Citová et al., 2007; Chauveau-Duriot, Doreau, Nozière, & Graulet, 2010; Granado-Lorencio, Herrero-Barbudo, Blanco-Navarro, & Pérez-Sacristán, 2010).

### **6.3 Determinação Glutaciona e Dissulfureto de Glutaciona**

O interesse na determinação da GSH e GSSG tem continuamente crescido, devido ao papel fundamental da GSH no mecanismo de proteção contra o *stress* oxidativo (Roman Kand'ár, 2016).

A medição GSH, geralmente, é realizada em sangue total, plasma e hemolisado de eritrócitos ou diretamente no tecido (R. Kand'ár & Hájková, 2014).

Até à data, são descritos na literatura científica, vários métodos para a determinação de GSH. Dentro dos vários métodos, destacam-se: os métodos de espectrofotométricos (I. Rahman, Kode, & Biswas, 2006; Araujo, Saraiva, & Lima, 2008), fluorimétrico (Wang et al., 2005; Widengren et al., 2006), electroquímicos (Kizek, Vacek, Trnková, & Jelen, 2004; Rivas et al., 2007; Timur, Odaci, Dincer, Zihnioglu, & Telefoncu, 2008), quimioluminescente (Roman Kand'ár, 2016) e, ressonância magnética nuclear (Terpstra, Marjanska, Henry, Tkáč, & Gruetter, 2006; Mali'n, Lindberg, & Åstot, 2014). Do mesmo modo, métodos de separação, tais como: cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Kand'ár, Stramová, Drábková, & Brandtnerová, 2014; R. Kand'ár & Hájková, 2014), cromatografia gasosa (GS) (Tea et al., 2007) e electroforese capilar (C. Bayle, Issac, Salvayre, Couderc, & Caussé, 2002; Christophe Bayle, Caussé, & Couderc, 2004; Kowalska, Zalewska, & Milnerowicz, 2014; Xue Wu et al., 2016), tem sido desenvolvidos.

Os métodos cromatográficos utilizando diferentes tipos de detetores, tais como UV-Vis, a fluorescência, eletroforese capilar e, espectrometria de massa MS, de momento, são os mais adequados, segundo Kand'ár (2016).

No entanto, estes métodos frequentemente apresentam falta de sensibilidade e de seletividade e podem exigir um pré-tratamento demorado da amostra, tais como a derivatização com reagentes fluorescentes (Zhang et al., 2008).

A escolha do agente de redução deve ser escolhida com precaução, devido ao facto de muitas vezes reagir com os reagentes de derivatização, e podem, portanto, interferir com o ensaio. Nem a GSH ou GSSG contêm qualquer cromóforo ou fluoróforo forte nas suas moléculas, logo, é necessário uma derivação apropriada por HPLC com deteção de UV, ou de fluorescência e/ou deteção de MS, para aumentar a sua sensibilidade (Roman Kand'ár, 2016).

Os agentes redutores, tais como DTT, *2-mercaptoethanol* (2-ME), *sodium borohydride*, *trialkylphosphines* e ditionito de sódio, são empregues para a determinação de TGSH (Roman Kand'ár, 2016).

Para a análise espectrofotométricas os agentes de derivatização empregues são, nomeadamente, *N-ethylmaleimide* (NEM), ácido iodoacético e reagente de Ellman [*5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)*], enquanto que, *o*-ftalaldeído (OPA), derivados de maleimida são para a análise fluorimétrica (R. Kand'ár & Hájková, 2014; Kandár et al., 2014; Roman Kand'ár, 2016).

A metodologia HPLC com deteção eletroquímica, usando eletrodos quer amperométricos ou coulométricos, tem a vantagem de medir diretamente a GSH e GSSG. Essas técnicas, juntamente com ensaios de espectrometria de HPLC/MS, evitam os problemas típicos associados aos procedimentos de derivação (R. Kand'ár & Hájková, 2014).

O método HPLC-ECD evita a necessidade de derivatização e permite a determinação simultânea de ambos os compostos com tempos de análise relativamente curtos. No entanto, a grande limitação dessa abordagem inclui a perda de sinal de deteção eletroquímica após análise repetida (Squellerio et al., 2012). Além disso, apenas alguns estudos tentaram medir simultaneamente GSH e GSSG, sem adição de qualquer reagente de derivatização (Guček, Makuc, Mlakar, Beričnik-Vrbovšek, & Marsel, 2002; Zhang et al., 2008).

Diferentes tipos de métodos de deteção electroquímica tem sido aplicados para a análise de GSH e compostos relacionados, mas a fluorescência induzida por deteção de laser (LIF) é melhor devido aos baixos limites de deteção de GSH (Christophe Bayle et al., 2004).

Para a determinação da GSH e da GSSG, a metodologia por HPLC com detecção de fluorescência é a preferida. Não apenas por ser um método simples, sensível e robusto, também porque a derivação pode estabilizar tanto GSH e GSSG. A detecção CE é muito sensível e permite a determinação simultânea de GSH e GSSG, além disso, este método evita a oxidação de GSH e a hidrólise de GSSG (Roman Kand'ár, 2016).

Desenvolvimentos recentes na tecnologia espectrometria de massa (MS), acoplada com cromatografia líquida (LC) forneceram novas ferramentas para a quantificação, mais sensível e seletiva, de glutathiona (Zhang et al., 2008; Squellerio et al., 2012).

Squellerio e investigadores (2012), no seu artigo, aplicaram a metodologia LC-MS/MS para medir com precisão a GSH no sangue e conteúdo GSSG, sem qualquer etapa de derivação. Para além disso, compararam ao novo método com o doseamento por HPLC-ECD. Ambos os ensaios analíticos são caracterizados com a precisão adequada, e sensibilidade e, as concentrações sanguíneas obtidas pelos dois métodos analíticos estão de acordo. No entanto, descreveram que o método de LC-MS/MS apresenta vantagens significativas para a determinação da GSH e da GSSG, comparativamente ao método HPLC-ECD. Em conclusão, embora ambos os métodos sejam de confiança e de rápida execução, os principais benefícios da metodologia LC-MS/MS estão relacionados com a sua melhor seletividade, precisão e exatidão e a menor variabilidade em comparação com o ensaio de HPLC-ECD, permitindo, assim, a quantificação de ambos os analitos, em amostras de baixa concentração (Squellerio et al., 2012).

A razão GSSG/GSH é considerado um importante indicador de *stress* oxidativo nas células. Sob condições normais, a concentração da GSSG é muito menor do que a da GSH, o que requer a determinação altamente exata e precisa da GSSG na presença de tais concentrações elevadas de GSH (Roman Kand'ár, 2016). Adicionalmente, o esgotamento de GSH é muitas vezes tomado como um marcador de *stress* oxidativo (Li et al., 2013).

Outro método alternativo para determinar os níveis de GSH é através de sondas fluorescentes para glutathiona. Sob certas circunstâncias, tais como no início da apoptose, a glutathiona pode efluir a partir das células, o que reduz a capacidade de redução das células e, por conseguinte, pode resultar em *stress* oxidativo, sem interferência na produção de ROS (Li et al., 2013).

As sondas *Monochlorobimances* e *Monobromobimane* são permeáveis na membrana, podem ligar-se aos grupos sulfidrilo e gerar fluorescência, o que pode ser medido em torno de 461-490 nm, quando a amostra é excitada entre 380-395 nm (Li et al., 2013).

Segundo (Li et al., 2013), Ortho-ftaldialdeído é outra sonda fluorescente que avalia os níveis totais de glutathione. O aducto tiol é fluorometricamente medido a 455 nm quando a amostra é excitada a 334 nm. O *5,5-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid)* é a sonda fluorescente que determina o nível de glutathione, ao qual é medida a 420 nm quando a amostra é excitada a 350 nm (Li et al., 2013).

Uma vez que todas as sondas para a determinação do glutathione reagem aos resíduos sulfidrilo das proteínas, é recomendado determinar o nível de GSH em condições sem a presença de proteínas (Li et al., 2013).

### Capítulo III – Considerações finais

A medição das espécies reativas de oxigénio e azoto e a determinação do correspondente dano oxidativo nos seres vivos é um processo complexo, uma vez que o nível de danos a ser medido é relativamente baixo. Atualmente, da gama de tecnologias propostas para quantificar estas lesões, salienta-se o método de HPLC-MS/MS, através de ionização por electropulverização, como sendo o preferencial, devido à sua maior sensibilidade.

Por outro lado, as defesas antioxidantes compreendem uma grande variedade de compostos de natureza; ao longo da presente monografia foram enfatizadas o ácido ascórbico, vitamina E e glutathione (GSH), dissulfureto de glutathione (GSSG). Na determinação do ácido ascórbico, a técnica HPLC-ECD é a mais indicada para fluidos biológicos. Quanto à medição do  $\alpha$ -tocoferol o método de HPLC-PDA, contrariamente à dificuldade exibida por outras técnicas, foi aplicado com sucesso em diferentes amostras biológicas. Por fim, na determinação de GSH e GSSG, recomendam-se HPLC-FL ou LC-MS/MS.

A propósito do *stress* oxidativo, todos os anos são referenciadas novas metodologias, ou aperfeiçoamentos de metodologia conhecidas. A continuação das pesquisas permite supor que, num futuro próximo, serão ultrapassadas as principais limitações, em especial as relativas à distinção entre o processo oxidativo normal e o *stress* oxidativo, nomeadamente quanto aos biomarcadores típicos de cada processo e a sensibilidade da sua deteção.

## Bibliografia

- Adly, A. A. M. (2010). Oxidative Stress and Disease - An Updated Review. *Research Journal of Immunology*, 3(2), 129 – 145. Retrieved from [https://www.researchgate.net/publication/47554291\\_Oxidative\\_Stress\\_and\\_Disease\\_An\\_Updated\\_Review](https://www.researchgate.net/publication/47554291_Oxidative_Stress_and_Disease_An_Updated_Review)
- Aguilera-Aguirre, L., Hosoki, K., Bacsi, A., Radák, Z., Sur, S., Hegde, M. L., Boldogh, I. (2015). Whole transcriptome analysis reveals a role for OGG1-initiated DNA repair signaling in airway remodeling. *Free Radical Biology and Medicine*, 89, 20–33. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.07.007
- Amirav, A., Gordin, A., Poliak, M., & Fialkov, A. B. (2008). Gas chromatography-mass spectrometry with supersonic molecular beams. *Journal of Mass Spectrometry: JMS*, 43, 141–163. doi:10.1002/jms
- Andreoli, R., Manini, P., De Palma, G., Alinovi, R., Goldoni, M., Niessen, W. M., & Mutti, A. (2010). Quantitative determination of urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine, 8-oxo-7,8-dihydroguanine, 8-oxo-7,8-dihydroguanosine, and their non-oxidized forms: daily concentration profile in healthy volunteers. *Biomarkers*, 15(3), 221–231. doi:10.3109/13547500903434501
- Andreoli, R., Mutti, A., Goldoni, M., Manini, P., Apostoli, P., & De Palma, G. (2011). Reference ranges of urinary biomarkers of oxidized guanine in (2'-deoxy)ribonucleotides and nucleic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 50(2), 254–261. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.11.009
- Aon, M. a., & Camara, A. K. S. (2015). Mitochondria: hubs of cellular signaling, energetics and redox balance. A rich, vibrant, and diverse landscape of mitochondrial research. *Frontiers in Physiology*, 6(March), 2014–2016. doi:10.3389/fphys.2015.00094
- Araujo, A. R. T. S., Saraiva, M. L. M. F. S., & Lima, J. L. F. C. (2008). Determination of total and oxidized glutathione in human whole blood with a sequential injection analysis system. *Talanta*, 74(5), 1511–1519. doi:10.1016/j.talanta.2007.09.028
- Araújo, R. M. dos S. C. G. de. (2008). *Validação de metodologia de análise de pesticidas agrícolas em águas por LC/MS*. Faculdade de Engenharia Universidade do Porto. Retrieved from <http://hdl.handle.net/10216/60435>
- Aubry, A.-F., & Shen, J. X. (2013). Bioanalysis for Service Users. *Future Science*. Retrieved from [www.future-science.com](http://www.future-science.com)
- Bar-Or, D., Bar-Or, R., Rael, L. T., & Brody, E. N. (2015). Oxidative stress in severe acute illness. *Redox Biology*, 4, 340–345. doi:10.1016/j.redox.2015.01.006
- Barbosa, K. B. F., Costa, N. M. B., Alfenas, R. de C. G., De Paula, S. O., Minim, V. P. R., & Bressan, J. (2010). Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. *Revista de Nutricao*, 23(4), 629–643. doi:10.1590/S1415-52732010000400013
- Barreiros, A. L. B. S., David, J. M., & David, J. P. (2006). Oxidative Stress: Relations Between The Formation Of Reactive Species And The Organism's Defense. *Quimica Nova*, 29(1), 113–123. doi:10.1590/S0100-40422006000100021
- Barros, A. I. R. N. A., Silva, A. P., Gonçalves, B., & Nunes, F. M. (2010). A fast,

- simple, and reliable hydrophilic interaction liquid chromatography method for the determination of ascorbic and isoascorbic acids. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396(5), 1863–1875. doi:10.1007/s00216-009-3414-4
- Bastani, N. E., Gundersen, T. E., & Blomhoff, R. (2012). Dried blood spot (DBS) sample collection for determination of the oxidative stress biomarker 8-epi-PGF(2 $\alpha$ ) in humans using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM*, 26(6), 645–52. doi:10.1002/rcm.6149
- Bayle, C., Caussé, E., & Couderc, F. (2004). Determination of aminothiols in body fluids, cells, and tissues by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 25(10-11), 1457–1472. doi:10.1002/elps.200305874
- Bayle, C., Issac, C., Salvayre, R., Couderc, F., & Caussé, E. (2002). Assay of total homocysteine and other thiols by capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection: II. Pre-analytical and analytical conditions. *Journal of Chromatography A*, 979(1-2), 255–260. doi:10.1016/S0021-9673(02)01504-2
- Bell, E. C., John, M., Hughes, R. J., & Pham, T. (2013). Ultra-Performance Liquid Chromatographic Determination of Tocopherols and Retinol in Human Plasma. *Journal of Chromatography Science*, 1–6. doi:doi:10.1093/chromsci/bmt161
- Berczyński, P., Kładna, A., Kruk, I., Piechowska, T., Aboul-Enein, H. Y., Ceylan-Unlusoy, M., & Bozdağ-Dündar, O. (2013). Antioxidant Activities of Some New Chromonyl-2,4-Thiazolidinediones and Chromonyl-2,4 Imidazolidinediones Having Chromone Cores. *J Fluoresc*, 23, 1319.1327. doi:10.1007/s10895-013-1266-y
- Biller, J. R., Tseitlin, M., Mitchell, D. G., Yu, Z., Buchanan, L. A., Elajaili, H., Eaton, G. R. (2015). Improved sensitivity for imaging spin trapped hydroxyl radical at 250 MHz. *ChemPhysChem*, 16(3), 528–531. doi:10.1002/cphc.201402835
- Black, C. N., Bot, M., Scheffer, P. G., Cuijpers, P., & Penninx, B. W. J. H. (2015). Is depression associated with increased oxidative stress? A systematic review and meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology*, 51, 164–175. doi:10.1016/j.psyneuen.2014.09.025
- Bradley-Whitman, M. A., & Lovell, M. A. (2015). Biomarkers of lipid peroxidation in Alzheimer disease (AD): an update. *Archives of Toxicology*. doi:10.1007/s00204-015-1517-6
- Breitenbach, M., & Eckl, P. (2015). Introduction to oxidative stress in biomedical and biological research. *Biomolecules*, 5(2), 1169–1177. doi:10.3390/biom5021169
- Cadet, J., & Poulsen, H. (2010). Measurement of oxidatively generated base damage in cellular DNA and urine. *Free Radical Biology and Medicine*, 48(11), 1457–1459. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.03.004
- Cadet, J., & Poulsen, H. (2011). Measurement of oxidatively generated base damage in cellular DNA and urine. *Free Radical Biology and Medicine*, 48(11), 1457–1459. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.03.004
- Carapinha, H. A. Q. (2010). *Implementação e validação de uma metodologia analítica forense para a detecção / identificação de explosivos orgânicos*. Instituto Superior de Engenharia de Lisboa.
- Carocho, M., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and

- related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51(1), 15–25. doi:10.1016/j.fct.2012.09.021
- Cavalcante, A. G. D. M., & Bruin, P. F. C. De. (2009). O papel do estresse oxidativo na DPOC: conceitos atuais e perspectivas. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 35(12), 1227–1237. doi:10.1590/S1806-37132009001200011
- Chafer-Pericas, C., Rahkonen, L., Sanchez-Illana, A., Kuligowski, J., Torres-Cuevas, I., Cernada, M., ... Escobar, J. (2015). Ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry determination of lipid peroxidation biomarkers in newborn serum samples. *Anal Chim Acta*, 886, 214–220. doi:10.1016/j.aca.2015.06.028
- Chauveau-Duriot, B., Doreau, M., Nozière, P., & Graulet, B. (2010). Simultaneous quantification of carotenoids, retinol, and tocopherols in forages, bovine plasma, and milk: Validation of a novel UPLC method. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397(2), 777–790. doi:10.1007/s00216-010-3594-y
- Chebrolu, K. K., Jayaprakasha, G. K., Yoo, K. S., Jifon, J. L., & Patil, B. S. (2012). An improved sample preparation method for quantification of ascorbic acid and dehydroascorbic acid by HPLC. *LWT - Food Science and Technology*, 47(2), 443–449. doi:10.1016/j.lwt.2012.02.004
- Chen, J., Zeng, L., Xia, T., Li, S., Yan, T., Wu, S., Liu, Z. (2015). Toward a Biomarker of Oxidative Stress: A Fluorescent Probe for Exogenous and Endogenous Malondialdehyde in Living Cells. *Analytical Chemistry*, 87(16), 8052–8056. doi:10.1021/acs.analchem.5b02032
- Chiaradia, M. C., Collins, C. H., & Jardim, I. (2008). The state of the art of chromatography associated with the tandem mass spectrometry for Toxic compound analyses in food. *Quimica Nova*, 31(3), 623–636. doi:10.1590/S0100-40422008000300030
- Cimadevilla, H. M., Hevia, D., Miar, A., Mayo, J., Lombo, F., & Sainz, R. M. (2014). Development and validation of a single HPLC method for determination of  $\alpha$ -tocopherol in cell culture and in human or mouse biological samples. *Biomedical Chromatography*, 29(6), 843–852. doi:10.1002/bmc.3362
- Citová, I., Havlíková, L., Urbánek, L., Solichová, D., Nováková, L., & Solich, P. (2007). Comparison of a novel ultra-performance liquid chromatographic method for determination of retinol and  $\alpha$ -tocopherol in human serum with conventional HPLC using monolithic and particulate columns. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 388(3), 675–681. doi:10.1007/s00216-007-1237-8
- Cochemé, H. M., Quin, C., McQuaker, S. J., Cabreiro, F., Logan, A., Prime, T. A., Murphy, M. P. (2011). Measurement of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> within living drosophila during aging using a ratiometric mass spectrometry probe targeted to the mitochondrial matrix. *Cell Metabolism*, 13(3), 340–350. doi:10.1016/j.cmet.2011.02.003
- Cooke, M. S., Olinski, R., & Loft, S. (2008). Measurement and meaning of oxidatively modified DNA lesions in urine. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 17(1), 3–14. doi:10.1158/1055-9965.EPI-07-0751
- Czerska, M., Zieliński, M., & Gromadzińska, J. (2016). Isoprostanes – a novel major group of oxidative stress markers. *International Journal of Occupational Medicine*

- and *Environmental Health*, 29(2), 179–190.
- Dikalov, S. I., & Harrison, D. G. (2012). Methods for Detection of Mitochondrial and Cellular Reactive Oxygen Species. *Antioxidants & Redox Signaling*, 20(2), 121019094741000. doi:10.1089/ars.2012.4886
- Fenton, H. J. H. (1894). Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *Journal of the Chemical Society, Transactions*, 65, 899–910. doi:10.1039/ct8946500899
- Ferreira, F., Ferreira, R., & Duarte, J. A. (2007). Oxidative stress and damage in skeletal muscle: Influence of unusual acute exercise and physical conditioning. *Revista Portuguesa de Ciências Do Desporto*, 7(2), 257–275.
- Ferreira, I., & Abreu, R. (2007). Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos. *Sociedade Portuguesa de Bioanalistas Da Saúde*, 2, 32–39. Retrieved from [https://bibliotecadigital.ipb.pt/bitstream/10198/2711/1/Publicação\\_Nacional\\_Sress\\_oxidativo.pdf](https://bibliotecadigital.ipb.pt/bitstream/10198/2711/1/Publicação_Nacional_Sress_oxidativo.pdf)
- Finkel, T. (2012). Signal Transduction by Mitochondrial Oxidants. *Journal of Biological Chemistry*, 287(7), 4434–4440. doi:10.1074/jbc.R111.271999
- Finkelstein, E., Rosen, G. M., & Rauckman, E. J. (1980). Spin trapping of superoxide and hydroxyl radical: Practical aspects. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 200(1), 1–16. doi:10.1016/0003-9861(80)90323-9
- Fischer, B. B., Hideg, É., & Krieger-Liszkay, A. (2013). Production, detection, and signaling of singlet oxygen in photosynthetic organisms. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(16), 2145–62. doi:10.1089/ars.2012.5124
- Flora, S. J. S. (2009). Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(4), 191–206. doi:10.4161/oxim.2.4.9112
- Fonseca, I. (2013). Biomarkers in Kidney Transplantation: Translating to clinical practice. *Revista Portuguesa de Pneumologia*, 27(3), 143–151. Retrieved from [http://repositorio.chporto.pt/bitstream/10400.16/1537/1/Biomarkers in Kidney.pdf](http://repositorio.chporto.pt/bitstream/10400.16/1537/1/Biomarkers%20in%20Kidney.pdf)
- França, B. K., Alves, M. R. M., Souto, Fernanda Maria Silveira Tiziane, L., Boaventura, R. F., Guimarães, A., & Jr, A. A. (2013). Peroxidação lipídica e obesidade: Métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. *Jornal Português de Gastroenterologia*, 20(5), 199 – 206. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpg.2013.04.002>
- Frijhoff, J., Winyard, P. G., Zarkovic, N., Davies, S. S., Stocker, R., Cheng, D., Ghezzi, P. (2015). Clinical Relevance of Biomarkers of Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling*, 23(14), 1144–70. doi:10.1089/ars.2015.6317
- Gaman, A. M., Buga, A.-M., Gaman, M.-A., & Popa-Wagner, A. (2014). The role of oxidative stress and the effects of antioxidants on the incidence of infectious complications of chronic lymphocytic leukemia. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 158135. doi:10.1155/2014/158135
- Garcez, A. M., Frederico, J., Pacheco, R., Valmor, F., Cunha, M., Carine, M., Cunha, D. M. (2014). Hypoalbuminemia and oxidative stress in patients on renal hemodialysis program. *Nutr Hosp*, 30(4), 952–959. doi:10.3305/nh.2014.30.4.7667
- Garratt, L. W., Mistry, V., Singh, R., Sandhu, J. K., Sheil, B., Cooke, M. S., & Sly, P. D. (2010). Interpretation of urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine is

- adversely affected by methodological inaccuracies when using a commercial ELISA. *Free Radical Biology and Medicine*, 48(11), 1460–1464. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.02.017
- Gazdik, Z., Zitka, O., Petrlova, J., Adam, V., Zehnalek, J., Horna, A., Kizek, R. (2008). Determination of Vitamin C (Ascorbic Acid) Using High Performance Liquid Chromatography Coupled with Electrochemical Detection. *Sensors*, 8(11), 7097–7112. doi:10.3390/s8117097
- Gligorovski, S., Strekowski, R., Barbati, S., & Vione, D. (2015). Environmental Implications of Hydroxyl Radicals ( $\bullet$ OH). *Chemical Reviews*, 115(24), 13051–13092. doi:10.1021/cr500310b
- Gonçalves, J., Mendes, B., Silva, C. L., & Câmara, J. S. (2012). Development of a novel microextraction by packed sorbent-based approach followed by ultrahigh pressure liquid chromatography as a powerful technique for quantification phenolic constituents of biological interest in wines. *Journal of Chromatography A*, 1229, 13–23. doi:10.1016/j.chroma.2012.01.023
- Görlach, A., Bertram, K., Hudecova, S., & Krizanova, O. (2015). Calcium and ROS: A mutual interplay. *Redox Biology*, 6, 260–271. doi:10.1016/j.redox.2015.08.010
- Granado-Lorencio, F., Herrero-Barbudo, C., Blanco-Navarro, I., & Pérez-Sacristán, B. (2010). Suitability of ultra-high performance liquid chromatography for the determination of fat-soluble nutritional status (vitamins A, E, D, and individual carotenoids). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397(3), 1389–1393. doi:10.1007/s00216-010-3655-2
- Grebenstein, N., & Frank, J. (2012). Rapid baseline-separation of all eight tocopherols and tocotrienols by reversed-phase liquid-chromatography with a solid-core pentafluorophenyl column and their sensitive quantification in plasma and liver. *Journal of Chromatography A*, 1243, 39–46. doi:10.1016/j.chroma.2012.04.042
- Guček, M., Makuc, S., Mlakar, A., Beričnik-Vrbovšek, J., & Marsel, J. (2002). Determination of glutathione in spruce needles by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry : RCM*, 16(12), 1186–1191. doi:10.1002/rcm.700
- Guo, H., Aleyasin, H., Dickinson, B. C., Haskew-layton, R. E., & Ratan, R. R. (2014). Recent advances in hydrogen peroxide imaging for biological applications. *Cell & Bioscience*, 4(64). Retrieved from <http://www.celandbioscience.com/content/4/1/64>
- Halliwell, B., & Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, 142(2), 231–55. doi:10.1038/sj.bjp.0705776
- Han, J. Y., Takeshita, K., & Utsumi, H. (2001). Noninvasive detection of hydroxyl radical generation in lung by diesel exhaust particles. *Free Radical Biology & Medicine*, 30(5), 516–25. doi:10.1016/S0891-5849(00)00501-3
- Henriksen, T., Hillestrøm, P. R., Poulsen, H. E., & Weimann, A. (2009). Automated method for the direct analysis of 8-oxo-guanosine and 8-oxo-2'-deoxyguanosine in human urine using ultraperformance liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Free Radical Biology and Medicine*, 47(5), 629–635.

doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.06.002

- Hermans, N., Cos, P., Berghe, D. Vanden, Vlietinck, A. J., & De Bruyne, T. (2005). Method development and validation for monitoring in vivo oxidative stress: Evaluation of lipid peroxidation and fat-soluble vitamin status by HPLC in rat plasma. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 822(1-2), 33–39. doi:10.1016/j.jchromb.2005.05.040
- Hofer, T., Badouard, C., Bajak, E., Ravanat, J. L., Mattsson, Å., & Cotgreave, I. A. (2005). Hydrogen peroxide causes greater oxidation in cellular RNA than in DNA. *Biological Chemistry*, 386(4), 333–337. doi:10.1515/BC.2005.040
- Hui, S. P., Murai, T., Yoshimura, T., Chiba, H., Nagasaka, H., & Kurosawa, T. (2005). Improved HPLC assay for lipid peroxides in human plasma using the internal standard of hydroperoxide. *Lipids*, 40(5), 515–522. Retrieved from [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16094862](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16094862)
- Iglesias, J., González, M. J., & Medina, I. (2006). Determination of ascorbic and dehydroascorbic acid in lean and fatty fish species by high-performance liquid chromatography with fluorometric detection. *European Food Research and Technology*, 223(6), 781–786. doi:10.1007/s00217-006-0269-1
- Il'yasova, D., Scarbrough, P., & Spasojevic, I. (2012). Urinary Biomarkers of Oxidative Status. *Clin Chim Acta*, 413, 1446–1453. doi:10.1016/j.cca.2012.06.012
- Jacob, K. D., Noren Hooten, N., Trzeciak, A. R., & Evans, M. K. (2013). Markers of oxidant stress that are clinically relevant in aging and age-related disease. *Mechanisms of Ageing and Development*, 134(3-4), 139–157. doi:10.1016/j.mad.2013.02.008
- Jiang, Z. Y., Hunt, J. V., & Wolff, S. P. (1992). Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Analytical Biochemistry*, 202(2), 384–389. doi:10.1016/0003-2697(92)90122-N
- Jones, D. P. (2006). Redefining Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling*, 8, 1–16. doi:10.1089/ars.2006.8.1865
- Kalyanaraman, B. (2011). Oxidative chemistry of fluorescent dyes: implications in the detection of reactive oxygen and nitrogen species. *Biochemical Society Transactions*, 39(5), 1221–1225. doi:10.1042/BST0391221
- Kalyanaraman, B., Darley-USmar, V., Davies, K. J. A., Dennery, P. A., Forman, H. J., Grisham, M. B., ... Ischiropoulos, H. (2012). Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: Challenges and limitations. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(1), 1–6. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.030
- Kalyanaraman, B., Dranka, B. P., Hardy, M., Michalski, R., & Zielonka, J. (2014). HPLC-based monitoring of products formed from hydroethidinebased fluorogenic probes – The ultimate approach for intra-and extracellular superoxide detection. *Biochim Biophys Acta*, 1840(2), 181–204. doi:10.1016/j.bbagen.2013.05.008
- Kand'ár, R. (2016). The ratio of oxidized and reduced forms of selected antioxidants as a possible marker of oxidative stress in humans. *Biomedical Chromatography*, 30(May 2015), 13–28. doi:10.1002/bmc.3529
- Kand'ár, R., & Hájková, N. (2014). Assay of total glutathione and glutathione disulphide in seminal plasma of male partners of couples presenting for a fertility

- evaluation. *Andrologia*, 46(10), 1079–1088. doi:10.1111/and.12176
- Kandár, R., Stramová, X., Drábková, P., & Brandtnerová, M. (2014). Determination of Total Glutathione in Dried Blood Spot Samples Using a High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography Science*, 25, 1–7.
- Khan, A., Khan, M. I., Iqbal, Z., Shah, Y., Ahmad, L., Nazir, S., Ismail. (2011). A new HPLC method for the simultaneous determination of ascorbic acid and aminothiols in human plasma and erythrocytes using electrochemical detection. *Talanta*, 84(3), 789–801. doi:10.1016/j.talanta.2011.02.019
- Kizek, R., Vacek, J., Trnková, L., & Jelen, F. (2004). Cyclic voltammetric study of the redox system of glutathione using the disulfide bond reductant tris(2-carboxyethyl)phosphine. *Bioelectrochemistry*, 63(1-2), 19–24. doi:10.1016/j.bioelechem.2003.12.001
- Kowalska, K., Zalewska, M., & Milnerowicz, H. (2014). The application of capillary electrophoresis in the determination of glutathione in healthy women's blood. *Journal of Chromatographic Science*, 53(2), 353–359. doi:10.1093/chromsci/bmu035
- Kurutas, E. B., Gumusalan, Y., Cetinkaya, A., & Dogan, E. (2015). Evaluation of method performance for oxidative stress biomarkers in urine and biological variations in urine of patients with type 2 diabetes mellitus and diabetic nephropathy. *Biological Procedures Online*, 17(3), 1–7. doi:10.1186/s12575-015-0015-9
- Lambeth, J. D., & Neish, A. S. (2014). Nox Enzymes and New Thinking on Reactive Oxygen: A Double-Edged Sword Revisited. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 9(1), 119–145. doi:10.1146/annurev-pathol-012513-104651
- Lanças, F. M. (2009). A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? *Scientia Chromatographica*, 1(2), 35–61. doi:10.4322/sc.2013.005
- Lee, R., Margaritis, M., Channon, K. M., & Antoniades, C. (2012). Evaluating oxidative stress in human cardiovascular disease: methodological aspects and considerations. *Current Medicinal Chemistry*, 19(16), 2504–20. doi:10.2174/092986712800493057
- Li, J., O, W., Jiang, Z.-G., & Ghanbari, H. (2013). Oxidative Stress and Neurodegenerative Disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(6), 401–414. doi:10.3390/ijms141224438
- Lichtenberg, D., & Pinchuk, I. (2015). Oxidative stress, the term and the concept. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 461(3), 441–444. doi:10.1016/j.bbrc.2015.04.062
- Lunec, J. (1998). ESCODD: European Standards Committee on Oxidative DNA Damage. *Free Radical Research*, 29(6), 601–8. doi:10.1080/10715769800300651
- Lushchak, V. I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions*, (October), 1–12. doi:10.1016/j.cbi.2014.10.016
- Mali'n, T. J., Lindberg, S., & Åstot, C. (2014). Novel glutathione conjugates of phenyl isocyanate identified by ultra-performance liquid chromatography/electrospray

- ionization mass spectrometry and nuclear magnetic resonance. *Journal of Mass Spectrometry*, 49(1), 68–79. doi:10.1002/jms.3306
- Maritim, a. C., Sanders, R. a., & Watkins, J. B. (2003). Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 17(1), 24–38. doi:10.1002/jbt.10058
- Mazurek, A., & Jamroz, J. (2015). Precision of dehydroascorbic acid quantitation with the use of the subtraction method - Validation of HPLC-DAD method for determination of total vitamin C in food. *Food Chemistry*, 173, 543–550. doi:10.1016/j.foodchem.2014.10.065
- Mendes, B. R. (2012). *Avaliação do perfil urinário de biomarcadores do stress oxidativo e a sua correlação com as doenças cardiovasculares. Igarss 2014.* Universidade da Madeira. Retrieved from <http://hdl.handle.net/10400.13/625>
- Milne, G. L., Yin, H., Hardy, K. D., Davies, S. S., & Ii, L. J. R. (2012). Isoprostane Generation and Function. *Chem Rev*, 111(10), 5973–5996. doi:10.1021/cr200160h.
- Milne, G. L., Gao, B., Terry, E. S., Zackert, W. E., & Sanchez, S. C. (2013). Measurement of F2-isoprostanes and isofurans using gas chromatography–mass spectrometry. *Free Radic Biol Med.*, 59, 36–44. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.09.030.
- Nagy, K., Courtet-Compondu, M.-C., Holst, B., & Kussmann, M. (2007). Comprehensive analysis of vitamin E constituents in human plasma by liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 79(18), 7087–7096. doi:10.1021/ac0708689
- Nathan, C., & Cunningham-Bussel, A. (2013). Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. *Nature Reviews Immunology*, 13(5), 349–361. doi:10.1038/nri3423
- Neri, M., Frustaci, A., Milic, M., Valdiglesias, V., Fini, M., & Bonassi, S. (2015). A meta-analysis of biomarkers related to oxidative stress and nitric oxide pathway in migraine. *Cephalalgia*, 0(0), 1–7. doi:10.1177/0333102414564888
- Niki, E. (2013). Biomarkers of lipid peroxidation in clinical material. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1840(2), 809–817. doi:10.1016/j.bbagen.2013.03.020
- Nikitaki, Z., Hellweg, C. E., Georgakilas, A. G., & Ravanat, J.-L. (2015). Stress-induced DNA damage biomarkers: applications and limitations. *Frontiers in Chemistry*, 3(June), 35. doi:10.3389/fchem.2015.00035
- Nirungsan, K., & Thongnopnua, P. (2006). Simple and rapid high-performance liquid chromatographic method for endogenous  $\alpha$ -tocopherol determination in human plasma. *Biomedical Chromatography*, 781(October 2005), 774–781. doi:10.1002/bmc.596
- Noctor, G., Lelarge-Trouverie, C., & Mhamdi, A. (2015). The metabolomics of oxidative stress. *Phytochemistry*, 112(1), 33–53. doi:10.1016/j.phytochem.2014.09.002
- Noori, S. (2012). An Overview of Oxidative Stress and Antioxidant Defensive System. *Journal of Biotechn*, 1(1), 1–9. doi:10.4172/scientificreports.
- Nováková, L., & Vlčková, H. (2009). A review of current trends and advances in

- modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. *Analytica Chimica Acta*, 656(1-2), 8–35. doi:10.1016/j.aca.2009.10.004
- Oroian, M., & Escriche, I. (2015). Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International*, 74, 10–36. doi:10.1016/j.foodres.2015.04.018
- Ortega, H., Coperías, J. L., Castilla, P., Gómez-Coronado, D., & Lasunción, M. A. (2004). Liquid chromatographic method for the simultaneous determination of different lipid-soluble antioxidants in human plasma and low-density lipoproteins. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 803(2), 249–255. doi:10.1016/j.jchromb.2003.12.025
- Paliakov, E. M., Crow, B. S., Bishop, M. J., Norton, D., George, J., & Bralley, J. A. (2009). Rapid quantitative determination of fat-soluble vitamins and coenzyme Q-10 in human serum by reversed phase ultra-high pressure liquid chromatography with UV detection. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 877(1-2), 89–94. doi:10.1016/j.jchromb.2008.11.012
- Pérez-Rodríguez, L., Romero-Haro, A. A., Sternalski, A., Muriel, J., Mougeot, F., Gil, D., & Alonso-Alvarez, C. (2015). Measuring Oxidative Stress: The Confounding Effect of Lipid Concentration in Measures of Lipid Peroxidation. *Physiological and Biochemical Zoology*, 88(3), 000–000. doi:10.1086/680688
- Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55–74. doi:10.1016/j.ejmech.2015.04.040
- Pisoschi, A. M., Pop, A., Serban, A. I., & Fafaneata, C. (2014). Electrochemical methods for ascorbic acid determination. *Electrochimica Acta*, 121, 443–460. doi:10.1016/j.electacta.2013.12.127
- Rácz, A., Papp, N., Balogh, E., Fodor, M., & Héberger, K. (2015). Comparison of antioxidant capacity assays with chemometric methods. *Analytical Methods*, 7(10), 4216–4224. doi:10.1039/c5ay00330j
- Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S., & Dhama, K. (2014). Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. *BioMed Research International*, 1–19. doi:10.1155/2014/761264
- Rahman, I., Kode, A., & Biswas, S. K. (2006). Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nature Protocols*, 1(6), 3159–65. doi:10.1038/nprot.2006.378
- Rahman, K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical Interventions in Aging*, 2(2), 219–36. doi:http://dx.doi.org/
- Ramis, M. R., Esteban, S., Miralles, A., Tan, D.-X., & Reiter, R. J. (2015). Protective effects of melatonin and mitochondria-targeted antioxidants against oxidative stress: A review. *Current Medicinal Chemistry*, 22(2690-2711). doi:10.2174/0929867322666150619104143
- Raposo, M. F. D. J., Morais, A. M. M. B., & Morais, R. M. S. C. (2015). Carotenoids from marine microalgae: A valuable natural source for the prevention of chronic diseases. *Marine Drugs*, 13(8), 5128–5155. doi:10.3390/md13085128
- Ravanat, J.-L. (2012). Chromatographic methods for the analysis of oxidatively

- damaged DNA. *Free Radical Research*, 46(4), 479–491.  
doi:10.3109/10715762.2011.623161
- Rivas, G. A., Rubianes, M. D., Rodríguez, M. C., Ferreyra, N. F., Luque, G. L., Pedano, M. L., Parrado, C. (2007). Carbon nanotubes for electrochemical biosensing. *Talanta*, 74(3), 291–307. doi:10.1016/j.talanta.2007.10.013
- Rocha, G. (2008). Oxidative stress in the neonatal lung disease. *Revista Portuguesa de Pneumologia*, XIV(1), 113–126. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18265920>
- Rodríguez-Comesaa, M., García-Falcón, M. S., & Simal-Gándara, J. (2002). Control of nutritional labels in beverages with added vitamins: Screening of  $\beta$ -carotene and ascorbic acid contents. *Food Chemistry*, 79(2), 141–144. doi:10.1016/S0308-8146(02)00121-8
- Salganik, R. I. (2001). The benefits and hazards of antioxidants: controlling apoptosis and other protective mechanisms in cancer patients and the human population. *Journal of the American College of Nutrition*, 20(5 Suppl), 464S–472S; discussion 473S–475S. doi:10.1080/07315724.2001.10719185
- Sato, K., Yagi, M., & Yonei, Y. (2015). A new method for measuring oxidative stress using blood samples. *Glycative Stress Research*, 2(1), 15–21.
- Shintani, H. (2013). HPLC Analysis of Ascorbic Acid (Vitamin C). *Pharmaceutica Analytica Acta*, 04(05), 1000234. doi:10.4172/2153-2435.1000234
- Sies, H. (2015). Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biology*, 4, 180–183. doi:10.1016/j.redox.2015.01.002
- Skrovankova, S., Mlcek, J., Sochor, J., Baron, M., Kynicky, J., & Jurikova, T. (2015). Determination of Ascorbic Acid by Electrochemical Techniques and other Methods. *Int. J. Electrochem. Sci*, 10, 2421–2431. Retrieved from [www.electrochemsci.org](http://www.electrochemsci.org)
- Song, M. F., Li, Y. S., Ootsuyama, Y., Kasai, H., Kawai, K., Ohta, M., Ogawa, Y. (2009). Urea, the most abundant component in urine, cross-reacts with a commercial 8-OH-dG ELISA kit and contributes to overestimation of urinary 8-OH-dG. *Free Radical Biology and Medicine*, 47(1), 41–46. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.02.017
- Spickett, C. M., Wiswedel, I., Siems, W., Zarkovic, K., & Zarkovic, N. (2010). Advances in methods for the determination of biologically relevant lipid peroxidation products. *Free Radical Research*, 44(10), 1172–1202. doi:10.3109/10715762.2010.498476
- Spirlandeli, A. L., Deminice, R., & Jordao, A. A. (2014). Plasma malondialdehyde as biomarker of lipid peroxidation: Effects of acute exercise. *International Journal of Sports Medicine*, 35(1), 14–18. doi:10.1055/s-0033-1345132
- Squellerio, I., Caruso, D., Porro, B., Veglia, F., Tremoli, E., & Cavalca, V. (2012). Direct glutathione quantification in human blood by LC-MS/MS: Comparison with HPLC with electrochemical detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 71, 111–118. doi:10.1016/j.jpba.2012.08.013
- Taibi, G., & Nicotra, C. M. A. (2002). Development and validation of a fast and sensitive chromatographic assay for all-trans-retinol and tocopherols in human serum and plasma using liquid-liquid extraction. *Journal of Chromatography B*:

- Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 780(2), 261–267.  
doi:10.1016/S1570-0232(02)00529-9
- Takahashi, M., Shibata, M., & Niki, E. (2001). Estimation of lipid peroxidation of live cells using a fluorescent probe, diphenyl-1-pyrenylphosphine. *Free Radical Biology & Medicine*, 31(2), 164–174. doi:10.1016/S0891-5849(01)00575-5
- Tanaka, M., Han, S., K pfer, P. A., Leumann, C. J., & Sonntag, W. E. (2011). An assay for RNA oxidation induced abasic sites using the Aldehyde Reactive Probe. *Free Radical Research*, 45(2), 237–247. doi:10.3109/10715762.2010.535529
- Tarrago-Trani, M. T., Phillips, K. M., & Cotty, M. (2012). Matrix-specific method validation for quantitative analysis of vitamin C in diverse foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 26(1-2), 12–25. doi:10.1016/j.jfca.2012.03.004
- Tea, I., Ferchaud-Roucher, V., Kuster, A., Darmaun, D., & Robins, R. J. (2007). Determination of <sup>13</sup>C isotopic enrichment of glutathione and glycine by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry after formation of the N- or N,S-ethoxycarbonyl methyl ester derivatives. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM*, 21, 3567–3577. doi:10.1002/rcm
- Teixeira, J., Feio, M., & Figueira, M. L. (2014). The Role of Oxidative Stress in Aging and Dementia. *Revista Do Servi o de Psiquiatria Do Hospital Prof. Doutor Fernando Fonseca, EPE*, 12(1), 43 – 57. Retrieved from www.psilogos.com
- Terpstra, M., Marjanska, M., Henry, P. G., Tk c, I., & Gruetter, R. (2006). Detection of an antioxidant profile in the human brain in vivo via double editing with MEGA-PRESS. *Magnetic Resonance in Medicine*, 56(6), 1192–1199. doi:10.1002/mrm.21086
- Timur, S., Odaci, D., Dincer, A., Zihnioglu, F., & Telefoncu, A. (2008). Biosensing approach for glutathione detection using glutathione reductase and sulfhydryl oxidase bienzymatic system. *Talanta*, 74(5), 1492–1497. doi:10.1016/j.talanta.2007.09.026
- Uchiyama, H., Zhao, Q. L., Hassan, M. A., Andocs, G., Nojima, N., Takeda, K., Kondo, T. (2015). EPR-spin trapping and flow cytometric studies of free radicals generated using cold atmospheric argon plasma and X-ray irradiation in aqueous solutions and intracellular milieu. *PLoS ONE*, 10(8), 1–19. doi:10.1371/journal.pone.0136956
- Utsumi, H., & Yamada, K. I. (2003). In vivo electron spin resonance-computed tomography/nitroxyl probe technique for non-invasive analysis of oxidative injuries. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 416(1), 1–8. doi:10.1016/S0003-9861(03)00285-6
- Van’T Erve, T. J., Lih, F. B., Kadiiska, M. B., Deterding, L. J., Eling, T. E., & Mason, R. P. (2015). Reinterpreting the best biomarker of oxidative stress: The 8-iso-PGF2 /PGF2  ratio distinguishes chemical from enzymatic lipid peroxidation. *Free Radical Biology and Medicine*, 83, 245–251. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.03.004
- Vasconcelos, S. M. L., Goulart, M. O. F., Moura, J. B. D. F., Manfredini, V., Benfato, M. D. S., & Kubota, L. T. (2007). Reactive oxygen and nitrogen species, antioxidants and markers of oxidative damage in human Blood: main analytical methods for their determination. *Quimica Nova*, 30(5), 1323–1338.

doi:10.1590/S0100-40422007000500046

- Vékey, K. (2001). Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. *Journal of Chromatography A*, 921(2), 227–236. doi:10.1016/S0021-9673(01)00825-1
- Wang, L., Wang, L., Xia, T., Bian, G., Dong, L., Tang, Z., & Wang, F. (2005). A highly sensitive assay for spectrofluorimetric determination of reduced glutathione using organic nano-probes. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 61(11-12), 2533–2538. doi:10.1016/j.saa.2004.07.041
- Weidinger, A., & Kozlov, A. V. (2015). Biological Activities of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Oxidative Stress versus Signal Transduction. *Biomolecules*, 5, 472–484. doi:10.3390/biom5020472
- Widengren, J., Kudryavtsev, V., Antonik, M., Berger, S., Gerken, M., & Seidel, C. a. (2006). Single-molecule detection and identification of multiple species by multiparameter fluorescence detection 1. *Anal.Chem.*, 78(6), 2039–2050. doi:10.1021/ac0522759
- Winterbourn, C. C. (2014). The challenges of using fluorescent probes to detect and quantify specific reactive oxygen species in living cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1840(2), 730–8. doi:10.1016/j.bbagen.2013.05.004
- Wu, X., Cao, Y., Zhang, J., Lei, M., Deng, X., Zahid, K. R., Qi, C. (2016). Determination of glutathione in apoptotic SMMC-7221 cells induced by xylitol selenite using capillary electrophoresis. *Biotechnology Letters*. doi:10.1007/s10529-016-2056-9
- Wu, X., Diao, Y., Sun, C., Yang, J., Wang, Y., & Sun, S. (2003). Fluorimetric determination of ascorbic acid with o-phenylenediamine. *Talanta*, 59(1), 95–99. doi:10.1016/S0039-9140(02)00475-7
- Yoshikawa, T., & Naito, Y. (2002). What is oxidative stress? *Japan Medical Association Journal*, 45(7), 271–276. Retrieved from [http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4615-4649-8\\_1](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4615-4649-8_1)
- Zakkar, M., Guida, G., Suleiman, M., & Angelini, G. D. (2015). Cardiopulmonary Bypass and Oxidative Stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 1–8. doi:10.1155/2015/189863
- Zhang, F., Bartels, M. J., Geter, D. R., Jeong, Y.-C., Schisler, M. R., Wood, A. J., Bhaskar, G. (2008). Quantitation of glutathione by liquid chromatography/ positive electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry : RCM*, 22, 3608–3614. doi:10.1002/rcm
- Zielonka, J., Sikora, A., Joseph, J., & Kalyanaraman, B. (2010). Peroxynitrite Is the Major Species Formed from Different Flux Ratios of Co-generated Nitric Oxide and Superoxide. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 285(19), 14210–14216. doi:10.1074/jbc.M110.110080

## **Anexos**

### **1) Cromatografia**

Entre as principais técnicas de separação, estão as técnicas cromatográficas de análise, especialmente na análise de substâncias presentes em matrizes complexas, tais como fluidos biológicos, produtos naturais, entre outras. Isto deve-se, principalmente, à sua capacidade de separação dos componentes presentes nas misturas em função da eficiência e do poder de resolução das colunas modernas (Lanças, 2009).

A cromatografia pode ser combinada a diferentes sistemas de deteção, tratando-se de uma das técnicas analíticas mais utilizadas e de melhor desempenho (Carapinha, 2010).

O fundamento básico desta técnica está na existência de duas fases, uma móvel e uma estacionária. A amostra é injetada e de seguida será arrastada pela fase móvel, que pode ser líquida, no caso da cromatografia líquida (LC) ou gasosa, quando estamos a trabalhar com cromatografia gasosa (GC), até a coluna cromatográfica onde se encontra a fase estacionária. O facto dos vários constituintes da amostra terem propriedades químicas diferentes faz com que a sua afinidade à fase estacionária seja diferente, permitindo deste modo a separação dos compostos da amostra, conforme esta se desloca ao longo da coluna. Os compostos são retidos na coluna e seguidamente vão eluindo em tempos diferentes (tempo de retenção) sendo posteriormente detectados pelo detetor dando origem a um pico cromatográfico. (Vékey, 2001; Carapinha, 2010).

### **2) Espectrometria de massa**

A espectrometria de massa (MS) é uma técnica analítica de identificação, quantificação e caracterização estrutural de um átomo ou molécula com base na sua razão massa/carga ( $m/z$ ) (Aubry & Shen, 2013). Por outras palavras, é o equipamento destinado a separar iões em fase gasosa atendendo à sua razão  $m/z$  (Araújo, 2008).

A principal vantagem da espectrometria de massa (MS) é a sua elevada sensibilidade, pois permite a obtenção de espectros de massa de compostos com pequenas massas moleculares e/ou concentrações baixas (Vékey, 2001).

Existem diversos tipos de espectrómetros de massas, cada qual com suas vantagens e limitações. Na sua forma mais simples, um espectrómetro de massa é constituído por vários componentes básicos: sistema de introdução de amostra, fonte de ionização, analisador de massas, detetor e registor (Lanças, 2009).

O acoplamento de um cromatógrafo a um espectrómetro de massas permite um aumento adicional de selectividade pois combina as vantagens da cromatografia, alta seletividade e eficiência de separação, com as vantagens da espectrometria de massas, obtenção de informação estrutural e massa molecular (Vékey, 2001).

Dentro das técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas, destacam-se: a cromatografia gasosa (GC) e a cromatografia líquida (LC). A electroforese capilar, a cromatografia em camada fina e a cromatografia de permeação em gel, são também a combinação de outras técnicas de separação, porém, são aplicadas com menor frequência (Chiaradia, Collins, & Jardim, 2008).

Nas últimas décadas procedeu-se ao acoplamento do cromatógrafo gasoso ao espectrómetro de massa (GC-MS) por meio do uso de fontes de ionização, designadamente, a ionização por impacto electrões (EI) “*electron ionization*”, e a ionização química (QI), “*chemical ionization*” (Amirav, Gordin, Poliak, & Fialkov, 2008). Ambas as formas de ionização, são as mais empregues no acoplamento GC-MS (Chiaradia et al., 2008), e funcionam em baixas pressões, usualmente denominadas vácuo. Dentro destas, o impacto por electrões é o mais notório, uma vez que fornece um grande número de iões que permitem a identificação da substância em estudo. Em contrapartida, estas formas de ionização não são adequadas no caso do acoplamento de um cromatógrafo líquido ao espectrómetro de massa (LC-MS) (Lanças, 2009).

A fonte de ionização que mostra melhor desempenho por acoplamento LC-MS é a ionização em pressão atmosférica (API), “*Atmospheric Pressure Ionization*” (Lanças, 2009).

As formas de ionização mais utilizadas no acoplamento LC-MS, as quais funcionam à pressão atmosférica são: Electrospray (ESI), “*Electrospray Ionization*” (Chiaradia et al., 2008), sendo esta a forma de ionização mais aplicada no acoplamento LC-MS, seguida da Ionização Química à Pressão Atmosférica (APCI), “*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*”, e Ionização por Fotões (ou fotoionização) à Pressão Atmosférica (APPI) “*Atmospheric Pressure Photoionization*” (Lanças, 2009).

Em regra, a ESI é preferível para a análise de compostos polares ou iónicos, termolábeis ou com massa molecular elevada (superior a 1.000 Da). Para a análise de compostos não polares ou de polaridade muito baixa pode-se utilizar a APPI. O APCI pode ser usado quando os compostos são pouco polares ou tem polaridade intermediária (Lanças, 2009).

Depois de separados na coluna cromatográfica, os compostos são ionizados geralmente à pressão atmosférica (API) ou por ESI, APCI ou APPI são direccionados para o analisador de massas. O analisador é um dos componentes básicos de um espectrómetro de massa, e procede à separação dos iões de acordo com a relação existente entre suas massas e cargas, ou seja, a razão  $m/z$  (Lanças, 2009).

Este utiliza os campos eléctricos, magnéticos ou uma combinação de ambos para transferir os iões da região em que são produzidos, para o detetor, onde posteriormente, é gerado um sinal. O analisador funciona sob vácuo, de modo a que os iões possam deslocar-se para o detetor com rendimento suficiente (Araújo, 2008)

De momento, os analisadores de massas mais utilizados no acoplamento LC-MS, são os seguintes: analisador de massa do tipo quadrúpolo, o analisador do tipo 'ion trap' e o analisador do tipo 'Time-of-flight'. Enquanto os analisadores de massas quadrúpolo e 'ion trap' apresentam como principal limitação a baixa resolução o analisador do tipo 'Time-of-flight', apresenta uma resolução muito superior (Lanças, 2009).

O detetor é o último módulo de um espectrómetro de massas. Este regista a carga induzida ou a corrente produzida quando um ião atravessa uma superfície ou atinge sua superfície. Resumidamente, um espectro de massas é um registro dos iões detectados em função da razão  $m/z$  (Lanças, 2009).

Atualmente existe uma grande variedade de detetores para MS, sendo a escolha deste dependente do espectrómetro e das suas aplicações analíticas. Os mais utilizados para a detecção de iões, são os detetores baseados na multiplicação de electrões (EM), "Electron Multiplier", que podem ter várias geometrias (Lanças, 2009).

O desenvolvimento e, posterior aprimoramento das técnicas denominadas MS/MS "tandem MS", é combinação de dois espectrómetros de massa usados sequencialmente, em que o primeiro é usado para seleccionar a massa da molécula de interesse e o segundo um produto da fragmentação da mesma molécula. A finalidade desta metodologia é obter conhecimento acerca da estrutura fragmentada dos iões isolados, alcançando uma selectividade e sensibilidade superior em análises quantitativas (Araújo, 2008; Aubry & Shen, 2013).

### 3) Técnicas Cromatográficas

#### 3.1) Cromatografia Líquida

Na primeira década do século passado, foi definida a cromatografia líquida, pelos trabalhos do botânico russo, Mikhail S. Tswett. Os seus estudos eram focados na separação de pigmentos em uma coluna empacotada com partículas, usando solventes para extrair pigmentos de plantas (Lanças, 2009).

Csaba Horváth nos anos 70, propôs a sigla HPLC, inicialmente com significado de “*High Pressure Liquid Chromatography*” e, à posteriori, com a evolução da técnica, “*High Performance Liquid Chromatography*” (Lanças, 2009).

Desde a década de 1980, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) tem sido a técnica de separação mais utilizada na análise de moléculas pequenas (Aubry & Shen, 2013).

Atualmente, a HPLC é uma das principais técnicas utilizadas na análise de compostos não voláteis e/ou termicamente instáveis (Lanças, 2009).

Os módulos básicos de um equipamento de HPLC são um sistema de reservatórios de solvente, uma bomba, um injetor, uma coluna, um detetor e um sistema de aquisição de dados (Figura A1) (Carapinha, 2010).

O princípio de funcionamento é simples, a bomba empurra o eluente (a seleção deste depende do método aplicado) através da coluna a um fluxo pré estabelecido. Quando a amostra é injetada, o eluente passa através do injetor e transfere a amostra para dentro da coluna, onde os componentes desta são separados, e posteriormente detectados pelo detetor (Carapinha, 2010).

A separação cromatográfica pode ocorrer de dois modos: ser alcançada por eluição isocrática ou em gradiente. No método isocrático, a composição do solvente é constante ao longo da separação, porém, normalmente, utiliza-se um sistema de gradiente de eluição, em que a composição do eluente varia no decurso da análise, com o intuito de se obter uma melhor separação num menor tempo de análise (Carapinha, 2010).

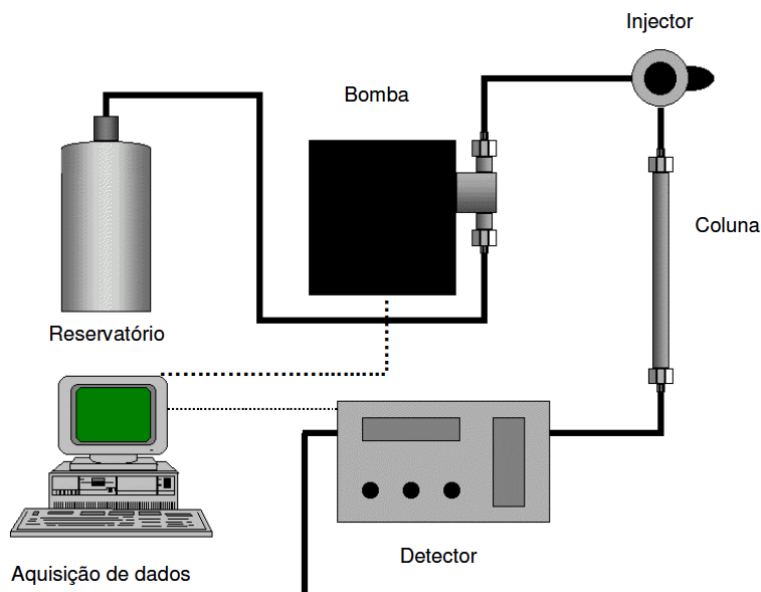


Figura A1. Estrutura de um equipamento HPLC. Adaptado (Carapinha, 2010)

Em HPLC, a função do detetor é monitorizar os analitos dissolvidos na fase móvel emergente da coluna (Carapinha, 2010). O uso de detetores como índice de refração, absorvância, fluorescência, electroquímicos e outros, aliados a softwares dedicados, permitem a análise quantitativa dos componentes das misturas em concentrações extremamente baixas (Lanças, 2009).

O detetor mais frequentemente utilizado é o de ultravioleta-visível (UV-Vis), nomeadamente o de absorvância, devido à sua grande sensibilidade. Contudo, estes detetores apenas detectam analitos que absorvem radiação a um comprimento de onda entre UV e visível. Por outro lado, os detetores *diode array* (DAD) permitem monitorizar vários comprimentos de onda no UV-Vis, porém, possuem uma sensibilidade inferior comparativamente aos detetores UV-Vis (Carapinha, 2010).

### 3.2) Cromatografia Líquida de Ultra-eficiência (UHPLC)

A cromatografia líquida de ultra-eficiência (UHPLC) é um “upgrade” recente das técnicas de separação (Mendes, 2012).

Embora os seus princípios básicos sejam os mesmos do HPLC, como está representado na Figura A2, ostenta algumas características que a distinguem e tornam a sua aplicação mais vantajosa, tais como o uso de fases estacionárias com partículas de tamanho

reduzido ( $<2\ \mu\text{m}$ ) e a aplicação de pressões elevadas ( $>15000\ \text{psi}$ ) (Gonçalves, Mendes, Silva, & Câmara, 2012).

A Waters™ cooperation foi a primeira empresa (2004) a introduzir no mercado o sistema UHPLC (AcquityUPLC®). Este permite uma redução no tempo de análise assim como dos custos por amostra, melhorando simultaneamente a qualidade dos resultados (Mendes, 2012). Este sistema permite trabalhar com maior eficiência, numa gama muito maior de velocidades lineares, taxas de fluxo, e *backpressures* (Nováková & Vlčková, 2009)(Gonçalves et al., 2012).

Ao nível das colunas cromatográficas foram simultaneamente desenvolvidas novas fases estacionárias híbridas, que dispõem uma maior resistência às condições de pressão aplicadas e uma separação cromatográfica superior às partículas de sílica pura (Mendes, 2012).

Uma vantagem da aplicação de partículas menores é o aumento da eficiência da coluna devido à maior interação dos analitos com a fase estacionária e uma melhor resolução. A possibilidade de pressões elevadas permite reduzir o tempo de análise que se reflete na redução do consumo de reagentes tornando as análises menos dispendiosas (Nováková & Vlčková, 2009)(Mendes, 2012).

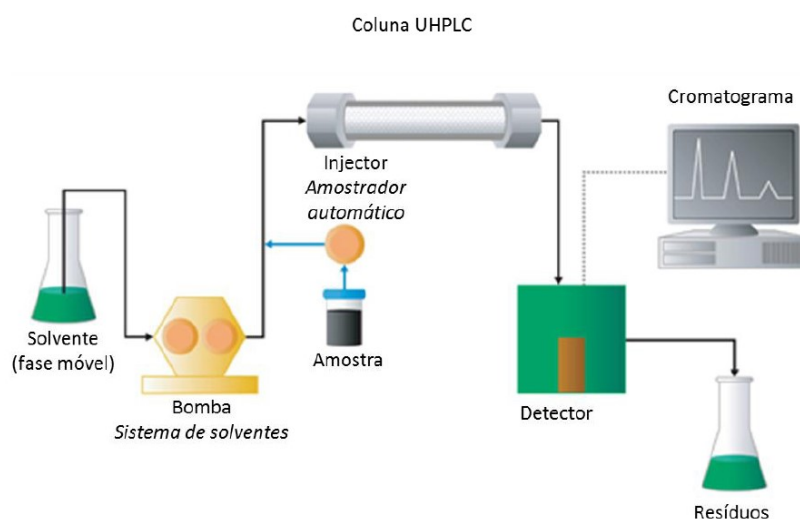


Figura A2 - Diagrama representativo dos diferentes constituintes da cromatografia líquida UHPLC.

Adaptado (Mendes, 2012)

### **3.3) Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas**

Na última década, houve um avanço importante na aplicação da técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) na análise de amostras biológicas (França et al., 2013).

Uma das vantagens a destacar é que esta técnica permite a separação, quantificação e elucidação estrutural das substâncias presentes na amostra, sem recorrer à purificação ou derivatizações prévias, permitindo uma análise muito mais eficiente e rápida. De igual modo, possibilita a análise de substâncias não voláteis, termolábeis ou com polaridade maior, o que é difícil em outras técnicas como a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (França et al., 2013; Lanças, 2009).

O LC/MS é uma técnica refinada que combina a capacidade de separação do HPLC com o poder de deteção do espectrómetro de massa. (Araújo, 2008).

### **3.4) Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria Tandem**

Desde os anos 1990, o LC-MS/MS tem sido a técnica de eleição da indústria para a bioanálise de pequenas moléculas devido à sua alta selectividade e sensibilidade. (Aubry & Shen, 2013).

A técnica de LC-MS/MS tem sido aplicada em estudos de análise de derivados lipídicos, bem como os seus produtos de oxidação. Esta metodologia inovadora representa a técnica mais desenvolvida e avançada, na deteção e caracterização qualitativa e quantitativa de biomoléculas em matrizes biológicas. Os resultados obtidos por esta técnica apresentam um elevado grau de especificidade e sensibilidade (França et al., 2013).

### **3.5) Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa**

A combinação da cromatografia gasosa (GC) com a espectrometria de massa (GC-MS) é um método relativamente simples (Vékey, 2001), uma vez que as características de funcionamento do cromatógrafo a gás são suficientemente compatíveis com a necessidade de alto vácuo do espectrómetro de massa (Chiaradia et al., 2008).

O GC-MS é um aparelho analítico muito influente, aplicado frequentemente na análise de misturas complexas de compostos em fase gasosa. Isto limita a técnica à análise de compostos voláteis e semivoláteis, de baixa polaridade e baixa massa molecular (Carapinha, 2010).

O GC-MS é constituído por dois blocos principais: o cromatógrafo gasoso e o espectrometro de massa. Segundo Vékey, o cromatógrafo de fase gasosa é constituído por uma coluna capilar que pode variar no comprimento, diâmetro, espessura bem como nas propriedades de fase estacionária. À medida que os compostos eluem da coluna vão sendo ionizados e posteriormente detados no espectrómetro de massa. O facto de estes terem tempos de retenção diferentes permite que sejam identificados separadamente (Vékey, 2001).