

# Estresse oxidativo: avaliação de marcadores

## *Oxidative stress: assessment of biomarkers*

### ABSTRACT

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; PAULA, S. O.; MININ, V. P. R.; BRESSAN, J. Oxidative stress: assessment of biomarkers. *Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.* = J. Brazilian Soc. Food Nutr., São Paulo, SP, v. 33, n. 2, p. 111-128, ago. 2008.

*The onset of oxidative stress is caused by an imbalance between the production of reactive species and antioxidant defense. In essence, it was defined as a disturbance in the pro-oxidant/antioxidant balance in favor of the former, leading to the oxidation of biomolecules and a consequent loss of their biological functions and/or homeostatic imbalance, manifested through potential oxidative damage to cells and tissues. Oxidative damage involves the attack of free radicals and reactive species against various substrates, including lipids, nucleic acids and proteins. Oxidative stress has been suggested to be involved in the etiology of a host of chronic diseases including cardiovascular disease, diabetes, cancer and neurodegenerative processes. The assessment of biomarkers of oxidative stress has acquired importance as a tool in diagnosis and control of the associated process. In this review, the present study will examine the major biomarkers and the methods available to measure oxidative stress.*

**Keywords: Oxidative stress. Biomarkers.  
Free radicals. Reactive species. Antioxidants.**

**KIRIAQUE BARRA  
FERREIRA BARBOSA<sup>1</sup>;  
NEUZA MARIA BRUNORO  
COSTA<sup>2</sup>; RITA DE CÁSSIA  
GONÇALVES ALFENAS<sup>2</sup>;  
SÉRGIO OLIVEIRA DE  
PAULA<sup>3</sup>; VALÉRIA PAULA  
RODRIGUES MININ<sup>4</sup>;  
JOSEFINA BRESSAN<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Doutoranda do Programa  
de Pós Graduação em  
Ciência e Tecnologia de  
Alimentos/UFV

<sup>2</sup>Professora do  
Departamento de  
Nutrição e Saúde/UFV

<sup>3</sup>Professor do  
Departamento de  
Biologia Geral/UFV

<sup>4</sup>Professora do  
Departamento  
de Tecnologia de  
Alimentos/UFV  
Universidade Federal  
de Viçosa,  
Campus Universitário,  
CEP 36570-000  
Viçosa – MG

**Departamento onde o  
trabalho foi realizado:**  
Departamento de  
Ciência e Tecnologia de  
Alimentos, Universidade  
Federal de Viçosa

**Endereço para  
correspondência:**

Kiriaque Barra  
Ferreira Barbosa  
Universidade Federal de  
Viçosa, Departamento  
de Ciências e Tecnologia  
de Alimentos, Campus  
Universitário,  
CEP 36570-000  
Viçosa - MG  
e-mail:

kiribarra@yahoo.com.br

## RESUMEN

*Este trabajo tiene por objetivo revisar los principales marcadores del estrés oxidativo, así como sus técnicas de evaluación. La instalación del proceso de estrés oxidativo ocurre por la existencia de un desequilibrio entre los sistemas oxidativo y antioxidante que favorece al primero. Ese proceso conduce a la oxidación de biomoléculas que pierden sus funciones biológicas y/o el desequilibrio homeostático. Su manifestación es el daño oxidativo potencial contra células y tejidos. La cronicidad de este proceso tiene importantes implicaciones en el desarrollo de las enfermedades crónicas no transmisibles: obesidad, aterogénesis, diabetes, trastornos neurodegenerativos y cáncer. Es importante identificar marcadores para evaluar el estrés oxidativo y sistematizar su utilización en el diagnóstico y control de los efectos adversos del proceso. Esos esfuerzos se concentran en los productos de la oxidación de lípidos, proteínas y ácido desoxirribonucleico. Otra forma de abordar la evaluación del estrés oxidativo es a través de métodos indirectos, basados en la capacidad antioxidante.*

**Palabras clave: Estrés oxidativo.  
Biomarcadores. Radicales libres.  
Especies reactivas. Antioxidantes.**

## RESUMO

*A instalação do processo de estresse oxidativo decorre da existência de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor dos primeiros. Tal processo conduz à oxidação de biomoléculas com conseqüente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos. A cronicidade de tal processo demonstra importantes implicações sobre a etiologia de enfermidades crônicas transmissíveis, entre elas: aterosclerose, diabetes, obesidade, transtornos neurodegenerativos e câncer. É de extrema importância a identificação de marcadores para a avaliação do estresse oxidativo, no sentido de sistematizar o emprego destes no diagnóstico e controle dos efeitos adversos de tal processo. Os marcadores em questão se baseiam nos produtos da oxidação de lipídios, proteínas e DNA, ou ainda na aferição da capacidade antioxidante. O presente estudo visa revisar os principais marcadores, bem como as técnicas de análise para a avaliação do estresse oxidativo.*

**Palavras-chave: Estresse oxidativo.  
Biomarcadores. Radicais livres.  
Espécies reativas. Antioxidantes.**

## INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre os sistemas oxidantes e antioxidantes em favor dos primeiros. São geradas inúmeras espécies reativas: os radicais livres (têm um elétron desemparelhado na sua camada eletrônica) e as espécies reativas, não radicais (Tabela 1), favorecendo a ocorrência de danos oxidativos (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004). Por outro lado, são desenvolvidos os mecanismos protetores, que por sua vez, têm a função de neutralizar os compostos reativos e, conseqüentemente prevenir os efeitos adversos do estresse oxidativo (MAYNE, 2003).

**Tabela 1 – Classificação e nomenclatura das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio**

Espécies Reativas	
Radicais Livres	Não Radicais
<b>Espécies Reativas de Oxigênio (ERO's)</b>	
Superóxido ( $O_2^{\bullet}$ )	Peróxido de Hidrogênio ( $H_2O_2$ )
Hidroxila ( $OH^{\bullet}$ )	Ácido Hipobromoso (HOBr)
Hidroperoxila ( $HO_2^{\bullet}$ )	Ácido hipocloroso (HOCl)
Peroxila ( $RO_2^{\bullet}$ )	Ozônio ( $O_3$ )
Alcoxila ( $RO^{\bullet}$ )	Oxigênio <i>Singlet</i> ( $^1O_2$ )
Carbonato ( $CO_3^{\bullet}$ )	Peróxidos Orgânicos (ROOH)
Dióxido de Carbono ( $CO_2^{\bullet}$ )	Peroxinitrito (ONOO)
	Ácido Peroxinitroso (ONOOH)
<b>Espécies Reativas de Óxidos de Nitrogênio (ERON's)</b>	
Óxido Nítrico ( $NO^{\bullet}$ )	Ácido Nitroso ( $HNO_2$ )
Dióxido de Nitrogênio ( $NO_2^{\bullet}$ )	Cátion Nitroxil ( $NO^+$ )
	Anion Nitroxil ( $NO^-$ )
	Trióxido de Dinitrogênio ( $N_2O_3$ )
	Tetróxido de Dinitrogênio ( $N_2O_4$ )
	Peroxinitrito (ONOO)
	Ácido Peroxinitroso (ONOOH)
	Cátion Nitril ( $NO_2^+$ )
	Peroxinitritos Alxil (ROONO)

Espécies reativas é um termo que engloba qualquer composto que seja potencialmente reativo. Entre as EROs estão incluídos as espécies reativas radicais (radicais livres) e não radicais. Da mesma forma as ERONs. Radical livre refere-se a um átomo ou molécula altamente reativa que tenha um elétron desemparelhado em sua última camada eletrônica. As espécies não radicais são agentes oxidantes e podem se converter em radicais livres. Todo radical livre é uma espécie reativa, mas nem toda espécie reativa é um radical livre (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004).

Os danos oxidativos se dão por meio da oxidação de biomoléculas, especialmente, lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, induzindo efeitos deletérios e alterando-as em relação a sua estrutura e/ou função biológica (HICKS; TORRES-RAMOS; SIERRA-VARGAS, 2006). Todas as células do organismo humano se encontram constantemente expostas à oxidação.

Os oxidantes são de origem interna e externa, a magnitude de tal processo apresenta ampla variação em função da presença de vários fatores intervenientes (MAYNE, 2003). A cronicidade do processo em questão tem como conseqüência o desenvolvimento de enfermidades crônicas não transmissíveis (MAYNE, 2003; GREEN; BRAND; MURPHY, 2004; OLIVARES-CORICHI et al., 2006; GALILI et al., 2007; MAIESE; MORHAN; CHONG, 2007).

Cada vez há mais evidências científicas de que o estresse oxidativo desempenha importante papel na etiologia de tais enfermidades. Entre elas a aterosclerose, diabetes, obesidade, transtornos neurodegenerativos e câncer. Dessa forma, deriva-se a importância de se conhecer melhor os mecanismos implicados na etiologia de tal processo (KEANEY et al., 2003; MAYNE, 2003; GREEN; BRAND; MURPHY, 2004; GALILI et al., 2007; MAIESE; MORHAN; CHONG, 2007).

Esforços têm sido realizados no sentido de se identificar marcadores para a avaliação do estresse oxidativo, com o objetivo de sistematizar sua utilização no diagnóstico e controle dos efeitos adversos de tal processo. Tais marcadores se baseiam na análise do processo de oxidação de lipídios, proteínas e DNA, sendo que os relacionados aos lipídios são mais amplamente estudados tendo maior expressão (MAYNE, 2003; VINCENT; INNES; VINCENT, 2007).

O presente estudo visa revisar as técnicas de análise para avaliação do estresse oxidativo, por meio da mensuração das espécies reativas, bem como dos danos decorrentes, ressaltando os principais biomarcadores e suas implicações na saúde humana.

## **AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO**

Os estudos acerca da avaliação do estresse oxidativo vêm adquirindo relevância significativa. Os marcadores oxidativos desempenham importante papel na gênese de processos metabólicos que culminam na ocorrência de enfermidades crônicas degenerativas. Tal capacidade os tornam importantes ferramentas na elucidação de mecanismos e implicações biológicas do dano oxidativo, com o objetivo de possibilitar o planejamento de ações eficazes no controle e prevenção de tais processos (MAYNE, 2003; REYES et al., 2006).

As implicações biológicas do estresse oxidativo sobre os processos degenerativos são confirmadas mediante alguns pressupostos: as espécies reativas ou danos decorrentes têm sua presença demonstrada nos sítios lesionados; a magnitude da lesão é proporcional à geração de espécies reativas; a administração *in vitro* de espécies reativas é capaz de reproduzir os danos oxidativos e suas lesões decorrentes e por outro lado, a inibição das espécies reativas diminui a extensão das lesões (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004).

A avaliação do estresse oxidativo depende da habilidade de aferição da presença de espécies reativas. Estas podem ser medidas diretamente, por meio de sua concentração em fluidos biológicos e tecidos, ou indiretamente, mediante a avaliação do dano que causam. A detecção direta das espécies reativas em sistemas biológicos é dificultada por suas concentrações extremamente baixas (da ordem de  $10^{-11}$ M) e altas velocidades de reação

(HALLIWELL; WHITEMAN, 2004; REYES et al., 2006).

As técnicas de análise podem ser empregadas mediante, pelo menos, três abordagens: pela medida da concentração de moléculas resultantes da reação com as espécies reativas, pela quantificação da magnitude do dano produzido por meio das espécies reativas ou, pela quantificação da capacidade antioxidante (REYES et al., 2006).

## AFERIÇÃO DE MOLÉCULAS RESULTANTES

A técnica de ressonância magnética de *spin* eletrônico (RMSE) é sensível à presença de elétrons desemparelhados, o que possibilita sua aplicação para medir diretamente os radicais livres. No entanto, tem viabilidade limitada, pois além de ser dispendiosa e ter alto custo, a curta vida média dos radicais livres limita sua medição direta (UTSUMI; YAMADA, 2003; HALLIWELL; WHITEMAN, 2004; REYES et al., 2006).

As espécies reativas, especialmente os radicais livres, têm vida média extremamente curta, no entanto mediante reações biológicas podem tornar-se estáveis, por meio da produção de compostos resultantes que se constituem de uma segunda geração de produtos de oxidação (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004; HICKS; TORRES-RAMOS; SIERRA-VARGAS, 2006; OLIVARES-CORICHI et al., 2006).

A adição de compostos que funcionam como substratos (*traps*) sobre os quais os radicais livres agem, permitem a geração de produtos estáveis, capazes de serem detectados pela técnica de RMSE. Tal alternativa implica em solucionar o fato da vida média extremamente curta das espécies reativas ser uma relevante limitação para sua medição direta (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004).

Considerando a alternativa em questão, a técnica de RMSE vem sendo empregada em estudos com animais (BERLINER et al., 2001; UTSUMI; YAMADA, 2003). Em humanos, sua aplicação, *in vivo*, é ainda limitada, em função de não existirem evidências científicas que respaldem a segurança toxicológica da utilização dos referidos. No entanto, pode ser empregada para detecção de radicais livres em amostras de tecidos ou fluidos biológicos (*ex vivo*) (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004). O substrato 5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido (*5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide* - DMPO) foi utilizado na detecção de radicais livres em biópsia de pele (HAYWOOD et al., 1999). Utilizou-se a hidroxilamina em biópsias de fígado (VALGIMIGLI et al., 2002).

A aplicação, *ex vivo*, da técnica de RMSE se concerne à aferição de radicais livres secundários, resultantes da reação *in vivo* dos radicais livres com as biomoléculas. Estes radicais livres secundários são, então, submetidos às reações com os substratos adicionados à amostra em questão, formando produtos mais estáveis e possíveis de serem medidos. Tais produtos, por meio da presença de elétrons desemparelhados na sua última camada eletrônica, induzem à sensibilização da técnica para sua detecção. No entanto, tal sinal tem curta duração, devido ao fato destes produtos

serem suscetíveis à ação enzimática e/ou de agentes antioxidantes (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004).

Dessa forma, o substrato DMPO, quando utilizado para a detecção do radical hidroxila ( $\text{OH}^\bullet$ ), forma o produto DMPO- $\text{OH}^\bullet$ , sensível à detecção pela técnica de RMSE. No entanto, o ascorbato (forma ionizada do ácido ascórbico) presente reduz o produto DMPO- $\text{OH}^\bullet$ , gerando espécies reativas não detectáveis. No mesmo sentido, o ácido ascórbico, por meio da reação com radicais livres é capaz de gerar diferentes produtos. O semi-deidroascorbato é detectável, já os demais produtos (ascorbato e deidroascorbato) não o são. Assim, a detecção de radicais livres pela técnica em questão, ainda demonstra capacidade limitada (UTSUMI; YAMADA, 2003; HALLIWELL; WHITEMAN, 2004).

Existem outros substratos que podem ser utilizados para intermediar a reação com radicais livres, gerando como compostos resultantes espécies reativas não radicais. Por este motivo são utilizadas outras técnicas, que não a de RMSE, para sua aferição. Entre os substratos referidos destacam-se o salicilato e a fenilalanina, que podem ser utilizados *in vivo*, pois, diferentemente dos substratos utilizados na técnica de RMSE, não demonstram toxicidade (LIU et al., 1997a; HALLIWELL; WHITEMAN, 2004).

O salicilato reage com o radical hidroxila ( $\text{OH}^\bullet$ ) gerando entre os compostos resultantes, o ácido 2,3-di-hidroxibenzoico (*2,3-dihydroxybenzoic acid* – 2,3-DHBA) (LIU et al., 1997a). A fenilalanina, em presença de  $\text{OH}^\bullet$ , reage formando orto-tirosina e meta-tirosina. Os compostos resultantes da hidroxilação de ambos os substratos não são produzidos enzimaticamente. Assim, sua presença reflete a produção de radicais  $\text{OH}^\bullet$ . No entanto, o fato dos radicais  $\text{OH}^\bullet$  serem potencialmente reativos consiste em uma limitação, uma vez que pode ocorrer competição entre os referidos substratos e outras substâncias que também reagem com os radicais  $\text{OH}^\bullet$ . Dessa forma, a eficácia da metodologia em questão, depende da concentração dos substratos (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004).

Entre outras técnicas utilizadas para a detecção dos compostos resultantes da hidroxilação, destacam-se a cromatografia líquida de alto desempenho (*high-performance liquid chromatography* - HPLC) e a espectrometria de massa (*mass spectrometry* - MS) (LIU et al., 1997a; REDDY et al., 1999; PENNATHUR et al., 2001; HALLIWELL; WHITEMAN, 2004). A detecção de meta-tirosina por HPLC, usualmente tem precisão limitada, pela presença de picos que se referem a compostos interferentes. Tal limitação implica em superestimar a detecção das dosagens de meta-tirosina. No entanto, a hidroxilação da fenilalanina resulta em dosagens de meta e orto-tirosina nas mesmas proporções, o que indica a ocorrência de tal viés (REDDY et al., 1999). Sugere-se que o uso da MS contorna tal problema (PENNATHUR et al., 2001).

Outra opção consiste em utilizar biomoléculas como substratos, nesta classe destacam-se o ascorbato e o urato. Este último pode ser oxidado por uma série de espécies reativas, entre elas o peroxinitrito (ONOO). Um dos compostos resultantes da oxidação do urato, a alantóina, pode ser detectado nos fluidos biológicos, principalmente plasma e

urina. Outro composto, o radical amino-cabonil não é detectável. A alantoína é detectada por HPLC e MS (SANTOS; ANJOS; AUGUSTO, 1999; HALLIWELL; WHITEMAN, 2004).

## MAGNITUDE DO DANO OXIDATIVO

Diante das limitações para se medir diretamente a concentração de espécies reativas, a aferição indireta, mediante avaliação do dano que causam, vem sendo considerada uma alternativa promissora no monitoramento, *in vivo*, do estresse oxidativo. Tal alternativa caracteriza-se por significativa eficiência e aplicabilidade, uma vez que o conhecimento da magnitude do dano oxidativo causado pelas espécies reativas é de maior relevância que a mera aferição de suas concentrações (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004).

A ação deletéria das espécies reativas sobre biomoléculas tem como conseqüência a manifestação de danos oxidativos potenciais. Dessa forma, os biomarcadores do dano oxidativo são classificados de acordo com a biomolécula sobre a qual as espécies reativas atuam: lipídios, proteína ou DNA (MAYNE, 2003; HALLIWELL; WHITEMAN, 2004; REYES et al., 2006).

## LIPÍDIO

Uma das técnicas de maior relevância na quantificação de danos oxidativos em lipídios, consiste em medir, por meio de métodos colorimétricos, as substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (*thiobarbituric acid* – TBA) (LIU et al., 1997b). A quantificação de isoprostanos, também vem sendo proposta como uma técnica promissora (LAWSON; ROKACH; FITZGERALD, 1999; KEANEY et al., 2003; MAYNE, 2003).

Os aldeídos são substâncias que se destacam como metabólitos secundários da oxidação de lipídios. Dentre estes compostos, o malondialdeído é um dos mais abundantes, resultante da peroxidação lipídica tecidual, principalmente dos ácidos graxos araquidônico (AA, C20:4), eicosapentaenóico (EPA, C20:5) e docosahexaenóico (DHA, C22:6). Para a sua dosagem são empregados métodos colorimétricos, como no teste do TBA. Em tal teste uma molécula de malondialdeído reage com duas de TBA, formando-se um complexo de cor vermelha que é lido em um comprimento de onda específico (532-535nm). A concentração plasmática de malondialdeído é expressa em nmol/mL de plasma (MAYNE, 2003; DOTAN; LICHTENBERG; PINCHUK, 2004; HALLIWELL; WHITEMAN, 2004).

Apesar de sua simplicidade e facilidade de execução, o teste do TBA não é específico para o malondialdeído, reagindo com uma ampla variedade de compostos, entre eles, outros aldeídos que não o malondialdeído e ainda, açúcares, aminoácidos, proteína, aminas e bilirrubina. Por este motivo é também denominado teste das substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (*Thiobarbituric Acid-Reactive Substances* – TBARS) (MAYNE, 2003; GROTTTO et al., 2007).

O teste de TBARS, apesar de sabidamente inespecífico, ainda apresenta ampla

aplicação, devido especialmente, à sua facilidade de execução e baixo custo. A possibilidade de reação do TBA com substâncias intervenientes tem como consequência superestimar a extensão do processo de peroxidação lipídica, decorrente da detecção não só do malondialdeído, mas também de compostos interferentes. Assim, uma adaptação relevante de tal técnica consiste em associá-la com a separação do composto malondialdeído-TBA (MDA-TBA), por meio de técnicas cromatográficas, destacando-se a de HPLC (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004; REYES et al., 2006; GROTTTO et al., 2007).

Foram comparados os métodos TBARS e cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa (*gás chromatography-mass spectrometry*-GC-MS) na aferição da peroxidação lipídica em plasma de ratos, tendo o malondialdeído como biomarcador. O teste do TBARS detectou maiores níveis de malondialdeído, refletindo a inespecificidade de tal método. Os autores sugerem a aplicação da técnica de GC-MS como a escolha mais adequada para a aferição da magnitude da peroxidação lipídica (LIU et al., 1997b).

Compostos resultantes da oxidação de lipídios, lipoperóxidos e aldeídos, podem ser absorvidos pela dieta. O malondialdeído pode estar presente em alimentos, ligado a aminoácidos, especialmente resíduos de lisina, e quando absorvido é excretado na urina. Dessa forma, a aferição de malondialdeído na urina pode não refletir de forma fidedigna a peroxidação lipídica. Para evitar tais interferências sugere-se controle da dieta. A excreção de aldeídos ainda pode ser influenciada por fatores que modulam a produção de lipoperóxidos: ingestão calórica, atividade física e temperatura (DRAPER; CSALLANY; HADLEY, 2000; WILSON et al., 2002).

Outro marcador do estresse oxidativo baseado na oxidação lipídica, consiste na aferição dos isoprostanos, compostos derivados da ação de radicais livres sobre os ácidos graxos polinsaturados (LAWSON; ROKACH; FITZGERALD, 1999; KEANEY et al., 2003; MAYNE, 2003). A subclasse denominada F2-isoprostanos é derivada do ácido araquidônico, outros isoprostanos (F4-isoprostanos) são derivados dos ácidos eicosapentaenóico e docosahexaenóico, EPA e DHA, respectivamente (ROBERTS; MORROW, 2002). Entre os F2-isoprostanos o mais abundante é o PGF<sub>2α</sub>-8-iso-PGF<sub>2α</sub> (*8-isoprostaglandin F<sub>2α</sub>* - 8-iso-PGF<sub>2α</sub>), que vem sendo proposto como um promissor marcador do dano oxidativo de lipídios (CRACOWSKI; DURAND; BESSARD, 2002; MAYNE, 2003).

Entre as técnicas empregadas para detecção de isoprostanos, destacam-se os radioimunoensaios (*radioimmunoassays* – RIA), os imunoensaios enzimáticos (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* – ELISA) e as técnicas cromatográficas (separação) associadas à espectrometria de massa (detecção) (GC-MS). A aplicação de técnicas imunológicas, na aferição de 8-iso-PGF<sub>2α</sub> tem limitada especificidade, decorrente das possíveis reações cruzadas com outros prostanóides. A GC-MS tem boa especificidade, no entanto consiste em uma técnica onerosa e, conseqüentemente de difícil execução em estudos populacionais (BOHNSTEDT et al., 2003; MAYNE, 2003; HALLIWELL; WHITEMAN, 2004).

A aferição de isoprostanos pode ser realizada em fluidos biológicos, soro e plasma sanguíneo e urina, sendo que a utilização de urina tem maior aplicabilidade. O ácido

acetilsalicílico (aspirina) interfere nos níveis séricos de 8-iso-PGF<sub>2α</sub>, o mesmo não ocorre em amostras urinárias, que podem ainda ser armazenadas por períodos mais longos sem prejuízo de suas características. Sugere-se que após a coleta, as amostras de plasma e soro devam ser armazenadas sob congelamento. As amostras de urina, preferencialmente, devem ser coletadas em 24 horas (MAYNE, 2003). A concentração de PGF2-alfa-8-isoprostano é dada em mg/mL (KEANEY et al., 2003).

Apesar da presença de isoprostanos em alimentos, estes não são absorvidos no intestino em quantidades suficientes para alterar seus níveis urinários e/ou plasmáticos. Assim, a aferição de isoprostanos não é influenciada pela dieta (RICHELLE et al., 1999). No entanto, a sua produção pode ser influenciada por fatores como: concentração de O<sub>2</sub> e velocidade de metabolização (ROBERTS; MORROW, 2002).

A quantificação de compostos voláteis constitui em outra técnica de aferição da oxidação lipídica. Entre tais compostos destacam-se, além dos isoprostanos e aldeídos, os hidrocarbonetos: etano e pentano. Estes dois últimos são formados mediante peroxidação lipídica dos ácidos graxos polinsaturados da série ômega 3 e 6, respectivamente. Os hidrocarbonetos são os mais voláteis e dessa forma são os mais, freqüentemente, utilizados (MILLER; APPEL; RISBY, 1998; KNUTSON; LIM; VITERI, 1999; KNUTSON; HANDELMAN; VITTERI, 2000; MAYNE, 2003).

A aferição baseia-se na concentração de hidrocarbonetos exalados no ar expirado. Existe uma grande variedade de técnicas para tal propósito, estas variam em relação à forma de coleta, armazenamento e processamento das amostras. Como decorrência desta falta de padronização, ocorre relevante variação entre os resultados provenientes de diferentes estudos. A análise das amostras, usualmente, se dá por meio de GC. Apesar da grande variedade de técnicas, as limitações são comuns e convergem para o fato da contaminação das amostras com a presença de etano e pentano no ambiente (KNUTSON; LIM; VITERI, 1999; KNUTSON; HANDELMAN; VITTERI, 2000).

Sugere-se que a aferição do etano tenha maior viabilidade em prever a peroxidação lipídica, entre as causas destaca-se o fato do etano ser metabolizado em menor extensão que o pentano, ser menos solúvel em tecidos, exibir menor coeficiente de variação diária na sua taxa de exalação e ainda, sofrer menor influência de fatores intervenientes na sua taxa de exalação (KNUTSON; HANDELMAN; VITERI, 2000).

## **PROTEÍNA**

Os biomarcadores baseados no dano oxidativo das proteínas têm grande relevância em função de suas implicações: alteração funcional de enzimas, receptores, proteínas transportadoras, resposta imune, entre outros. Por meio de tais alterações, os produtos decorrentes do dano oxidativo sobre as proteínas podem contribuir para a geração de danos secundários a outras biomoléculas. O dano ao DNA pode ser irreversível em decorrência da alteração funcional das enzimas reparadoras (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004).

O dano oxidativo das proteínas constitui um processo complexo, pois se trata de 20 aminoácidos diferentes que podem ser oxidados, de diferentes formas, por uma grande variedade de espécies reativas. Os compostos gerados podem reagir entre si ou com o oxigênio. No último caso, são geradas espécies reativas de oxigênio, os radicais peróxilas ( $RO_2^{\bullet}$ ) que por sua vez, se convertem em radicais superóxidos ( $O_2^{\bullet-}$ ), os quais, por meio de reações em cadeia geram mais radicais livres, propagando e amplificando o processo (REYES; SÁNCHEZ; CALZADA-MENDONZA, 2006).

Em relação aos biomarcadores do dano oxidativo da proteína, os grupos carbonila consistem no de maior relevância (VINCENT; INNES; VINCENT, 2007). Estes são gerados como resultado da ação direta das espécies reativas sobre as cadeias laterais dos aminoácidos ou indiretamente, mediante a ligação de glicose (processo de glicoxidação) ou aldeídos (inclusive àqueles formados durante a peroxidação lipídica). Dessa forma, os grupos carbonila não são biomarcadores específicos do dano oxidativo das proteínas (LEVINE, 2002; DALLE-DONNE et al., 2003; HALLIWELL; WHITEMAN, 2004). Por meio dos processos diretos (oxidativo) ou indiretos, os grupos carbonilas são introduzidos à estrutura da proteína, tendo como decorrência a perda de sua função biológica. Tal alteração muitas vezes é irreversível (ZITNANOVA et al., 2007).

Entre as técnicas de aferição dos grupos carbonilas, as colorimétricas se destacam como as mais convencionais (BUSS et al., 1997; MAYNE, 2003; HALLIWELL; WHITEMAN, 2004). Os grupos carbonilas podem ser aferidos em tecidos e fluidos biológicos (BUSS et al., 1997; CHEVION; BERENSHTEIN; STADTMAN, 2000; MARGONIS et al., 2007; ZITNANOVA et al., 2007).

Os grupos carbonilas reagem com um substrato específico, a 2,4 dinitrofenil hidrazina (*2,4-dinitrophenylhydrazine* – 2,4-DNPH), gerando compostos hidrazonas (2,4-dinitrofenil hidrazona) (MARANGON; DEVARAJ; JIALAL, 1999; CHEVION; BERENSHTEIN; STADTMAN, 2000), cuja absorbância pode ser medida em um comprimento de onda de 370-375nm (MARGONIS et al., 2007; ZITNANOVA et al., 2007).

As técnicas colorimétricas são dispendiosas, visto que seu emprego requer utilização de grandes quantidades de solventes e proteína, às vezes mais do que está disponível nas amostras biológicas. São igualmente laboriosas e requerem muito tempo. Outra limitação diz respeito à sua grande variabilidade de resultados (BUSS et al., 1997; MARANGON; DEVARAJ; JIALAL, 1999).

Diante de tais limitações, uma alternativa consiste no emprego de imunoenaios enzimáticos (ELISA). Tal técnica é mais sensível e tem maior poder discriminatório, além de poupar tempo e material. Seu emprego vem sendo recomendado, especialmente, em situações nas quais estão disponíveis pequenas quantidades de amostras e/ou pequenas concentrações de proteína (BUSS et al., 1997; MARANGON; DEVARAJ; JIALAL, 1999). Na técnica de ELISA, procede-se à reação dos grupos carbonila com o 2,4-DNPH, sendo os compostos resultantes (hidrazonas), detectados por anticorpo específico (anti-DNPH) e quantificados pela comparação com a curva padrão de albumina sérica

bovina (native bovine serum albumin - BSA) oxidada (BUSS et al., 1997; DAVIES et al., 2001). A quantificação de grupos carbonila no padrão de BSA oxidada se dá por meio de colorimetria (BUSS et al., 1997; DAVIES et al., 2001) ou espectrofotometria (MARANGON; DEVARAJ; JIALAL, 1999).

Além da ELISA, outra técnica de alta sensibilidade é a HPLC. Tal técnica procederá à separação dos compostos hidrazona, resultantes da reação entre os grupos carbonila e o 2,4-DNPH, seguido da sua quantificação por um detector espectrofotométrico acoplado (ZITNANOVA et al., 2007).

As proteínas também podem sofrer danos oxidativos pela ação de outras espécies reativas que não as de oxigênio. A ação das ERONs sobre as proteínas resulta em uma grande variedade de compostos, entre estes, a 3-nitrotirosina, vem adquirindo relevância significativa como biomarcador do dano oxidativo à proteína (MAYNE, 2003; HALLIWELL; WHITEMAN, 2004; BRYAN; GRISHAM, 2007).

As técnicas mais usuais para a quantificação da 3-nitrotirosina são a HPLC e MS. A aferição do biomarcador em questão se limita aos tecidos corporais, o que dificulta sua aplicação *in vivo* (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004; BRYAN; GRISHAM, 2007). Um composto específico, o 3-nitro-4-hidroxifenilacetato (3-nitro-4-hydroxyphenylacetate - NHPA), derivado do metabolismo da 3-nitrotirosina é excretado na urina, possibilitando sua aferição *in vivo*. No entanto, sugere-se que o NHPA pode também ser derivado de outros compostos que não a 3-nitrotirosina (MANI et al., 2003).

Estudos *in vitro* apontaram os aminoácidos ditirosina e tirosina como marcadores estáveis (resistentes à hidrólise ácida) da oxidação de proteínas. Partindo de tal pressuposto, quantificaram-se por meio de GC/MS, os níveis de tais compostos na urina e músculo esquelético de ratos *Wistar*. Os níveis dos aminoácidos oxidados na urina refletiram as alterações nos níveis destes aminoácidos no músculo esquelético de ratos submetidos ao treinamento físico (corrida em rodas de 11,2cm). Diante de tais resultados, os autores sugeriram que a quantificação de aminoácidos oxidados na urina consiste em uma possibilidade para aferição, *in vivo*, do dano oxidativo da proteína (LEEUWENBURGH et al., 1999).

## DNA

A ação dos radicais livres sobre o DNA, sobretudo o radical hidroxila (OH<sup>•</sup>), resulta na ocorrência de danos oxidativos decorrentes de alterações estruturais, compreendendo as bases nitrogenadas, purínicas e pirimidínicas; açúcar desoxirribose e ligações cruzadas DNA-proteína. Os produtos resultantes de tais alterações são vários, constituindo os biomarcadores do dano oxidativo ao DNA (DIZDAROGLU et al., 2002). Diante de tal variedade de produtos resultantes, a aferição de um único não expressaria adequadamente os danos ao DNA. No entanto, a aferição do composto 8-hidroxil-2'-deoxiguanosina (*8-hydroxy-2'-deoxyguanosine* – 8-OHdG) vem sendo comumente realizada e este tem sido apontado como o

biomarcador de maior relevância na avaliação do dano oxidativo ao DNA (YU, 1994; HALLIWELL, 2000; DIZDAROGLU et al., 2002; MAYNE, 2003; HALLIWELL; WHITEMAN, 2004).

As técnicas usualmente empregadas para a aferição do 8-OHdG são as cromatográficas e imunoenaios (ELISA). Entre as cromatográficas destacam-se a HPLC (separação) associada à detecção eletroquímica (*electrochemical detection* – HPLC/ECD) e a GC/MS. Apesar da forte correlação existente entre as referidas técnicas, sugere-se que os níveis de 8-OHdG obtidos pela ELISA são maiores, o que possivelmente ocorre em decorrência das ligações cruzadas entre os anticorpos e outros compostos que não o 8-OHdG (HALLIWELL, 2000; DIZDAROGLU et al., 2002; MAYNE, 2003; HALLIWELL; WHITEMAN, 2004).

A urina é o fluido biológico comumente empregado na quantificação dos níveis de 8-OHdG. Os níveis urinários do biomarcador em questão não são influenciados pela dieta, ao passo que os compostos resultantes de outras bases nitrogenadas possivelmente o são. No entanto, existem algumas limitações: os níveis urinários de 8-OHdG são influenciados pela taxa metabólica (consumo de oxigênio); não refletem especificamente o dano oxidativo ao DNA, mas também a atividade das enzimas reparadoras e não distinguem o tecido de origem do dano oxidativo (COOKE; LUNEC; EVANS, 2002; MAYNE, 2003; HALLIWELL; WHITEMAN, 2004).

A quantificação de anticorpos (no soro) que reconhecem o composto, 5- hidroximetil-2'-desoxiuridina (*5-hydroxymethyl-2'-deoxyuridine* - HMdU), resultante da oxidação da base nitrogenada timina, consiste em outro biomarcador para a avaliação do dano oxidativo ao DNA (MAYNE, 2003).

Além das espécies reativas de oxigênio, o DNA pode também ser suscetível à ação das ERON's, resultando na geração de compostos decorrentes das modificações das bases nitrogenadas. O composto 8-nitroguanina foi sugerido como um biomarcador para avaliação dos danos causados pela ação da ERONs. No entanto, as técnicas para sua quantificação ainda carecem de aprimoramentos que possibilitem seu uso rotineiro (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004).

## **CAPACIDADE ANTIOXIDANTE**

A quantificação da atividade antioxidante se constitui em empregar métodos indiretos, baseados na capacidade alterada dos sistemas biológicos em modular a concentração de espécies reativas (REYES et al., 2006). As técnicas de análise são empregadas para medir a capacidade antioxidante de fluidos biológicos ou eritrócitos (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004; REYES et al., 2006).

Em relação aos fluidos biológicos, compara-se a atividade antioxidante da amostra de interesse (urina, soro ou plasma) com uma amostra de referência, cuja atividade antioxidante foi previamente determinada. Dessa forma, se avalia a capacidade antioxidante total da amostra de interesse, determinando, inespecificamente, a atividade

de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidase e ainda compostos com atividade antioxidante como o ácido ascórbico,  $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -caroteno e ácido úrico (REYES et al., 2006).

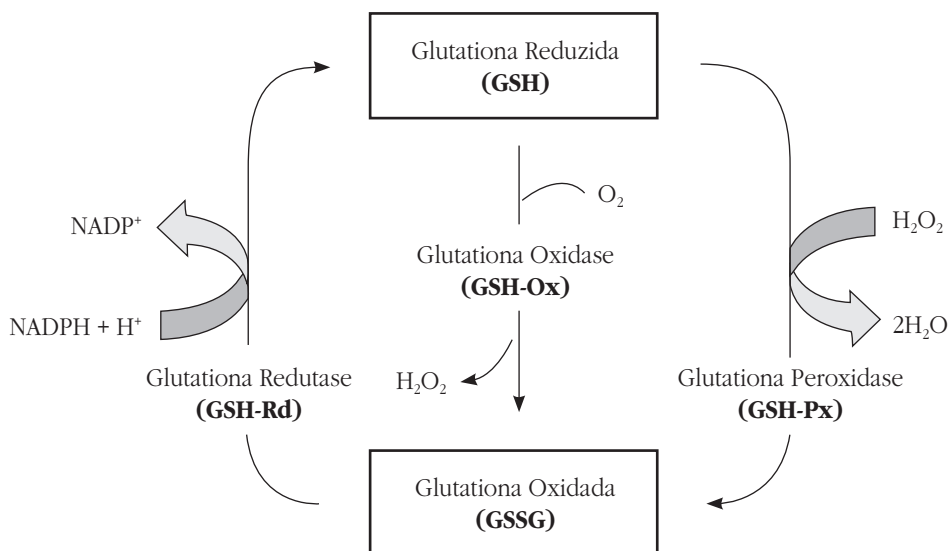
Entre os ensaios por meio dos quais se afere a capacidade antioxidante total de fluidos biológicos, destacam-se o *Total Antioxidant Status - TAS e Trolox Equivalent Antioxidant Capacity - TEAC* (VINCENT; INNES; VINCENT, 2007). O TAS permite estimar, *in vitro*, a capacidade de todos os antioxidantes presentes no soro ou plasma em inibir a geração de radicais livres (CREWS et al., 2001). Da mesma forma, o TEAC é empregado para avaliar, *in vitro*, a capacidade antioxidante total do soro ou plasma, medindo-se a capacidade dos antioxidantes presentes na amostra de interesse em inibir a oxidação do composto ABTS (*2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulphonate]*) (MILLER; RICE-EVANS, 1997; VINCENT; INNES; VINCENT, 2007). A quantidade de ABTS oxidado (ABTS<sup>•+</sup>) é monitorada por leitura espectrofotométrica, cuja absorbância pode ser medida em um comprimento de onda de 405nm ou 750nm. Assim, a supressão de tal absorbância é diretamente proporcional à quantidade de antioxidante presente na amostra. A capacidade antioxidante da amostra de interesse é expressa em relação a um composto solúvel em água, análogo ao tocoferol (trolox), amostra de referência. O resultado é expresso como equivalente de *trolox* por litro de amostra (MILLER; RICE-EVANS, 1997). Outro ensaio, *Oxygen Radical Absorbance Capacity - ORAC*, emprega provas de fosforescência para a aferição da capacidade antioxidante total (VINCENT; INNES; VINCENT, 2007).

Além da capacidade antioxidante total, é possível aferir a capacidade de antioxidantes específicos. O ensaio Ferric-Reducing Antioxidant Power (FRAP), por meio da reação de redução dos íons férricos a ferrosos, detecta, especificamente, a capacidade de antioxidantes que não contém ligações S-H (BENZIE; STRAIN, 1996).

O nível de enzimas antioxidantes nos eritrócitos diminui em proporção ao seu tempo de vida média na circulação. Assim, o *turnover* das células vermelhas reflete as alterações nos níveis de enzimas antioxidantes. Se este é baixo, os eritrócitos são em média mais “velhos”, e, por consequência, seus níveis enzimáticos são menores. Por meio de intervenção que acelere o *turnover* e/ou aumente a eritropoiese consegue-se aumentar o nível de enzimas antioxidantes (FERREIRA; MACHADO; MATSUBARA, 1999; HALLIWELL; WHITEMAN, 2004).

A glutatona, um tripeptídeo (L-glutamil-L-cisteinil-glicina), existe no organismo em duas formas: reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), essenciais à manutenção da integridade do ciclo catalítico da glutatona (Figura 1). Existe uma importante correlação entre os níveis de GSSG e os mecanismos enzimáticos de defesa. Em condições de desequilíbrio entre agentes oxidantes e antioxidantes (estresse oxidativo), haverá mudanças no estado redox da glutatona, caracterizando-se um desequilíbrio entre a produção de GSSG e o consumo GHS. Assim, a magnitude do estresse oxidativo pode ser monitorada pelas dosagens de GSSH e/ou pela razão GSSG/GSH (ROVER; HOEHR; VELLASCO, 2004). Outra opção seria a avaliação, em eritrócitos, da atividade das enzimas constituintes do ciclo catalítico da

glutaciona, bem como de outras enzimas antioxidantes: superóxido dismutase e catalase (ROUSSEL et al., 2003; ELANGO; SAMUEL; CHINNAKKANNU, 2006; RAJDL et al., 2007).



**Figura 1 – Ciclo catalítico da glutatona.** Após exposição da GSH às espécies reativas, ocorre sua oxidação a GSSG, via glutatona oxidase (GSH-Ox), gerando peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). A GSH-Px catalisa a redução do  $H_2O_2$ , no entanto, à custa da conversão da GSH a GSSG. A atividade enzimática da GSH-Px é um dos meios de controle dos níveis de  $H_2O_2$ , bem como de hidroperóxidos lipídicos, decorrentes da ação dos radicais livres. Assim, a GSH-Px é um importante integrante do sistema de defesa enzimático contra o aumento de radicais livres. O excesso de GSSG resulta em ambiente oxidante, favorecendo a formação de pontes dissulfeto (-SS), estas oxidam as proteínas com prejuízo de suas funções. Esta oxidação pode ser revertida pela ação antioxidante da GSH. A GSH-Rd não age diretamente na remoção de radicais livres, porém é responsável pela recuperação da GSH, na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH). Tal recuperação tem o objetivo de impedir a paralisação do ciclo da glutatona. Na inativação de um agente oxidante ocorre produção de GSSG e depleção de GSH. Em situações em que o sistema de óxido-redução está íntegro, haverá recuperação da GSH. Em condições de excesso de agentes oxidante e/ou deficiência do sistema protetor, haverá desequilíbrio entre o consumo de GSH e a produção de GSSG, o que caracteriza o estresse oxidativo (ROVER; HOEHR; VELLASCO, 2004)

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conforme exposto, há uma série de marcadores do estresse oxidativo, alguns mais consolidados, outros necessitando de mais estudos para elucidação completa de seus

mecanismos e implicações biológicas. Diante da estreita relação existente entre estresse oxidativo e o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis, ressalta-se a extrema importância da avaliação de tal processo, com a finalidade de monitoramento do dano oxidativo.

As técnicas de aferição dos marcadores do estresse oxidativo, têm sua qualidade dependente de alguns critérios, entre eles: capacidade de refletir o dano oxidativo *in vivo*; mostrar adequada variabilidade tanto entre aferições em uma mesma amostra em diferentes tempos, quanto entre amostras distintas; seus níveis não devem ser influenciados pela dieta e deve ter estabilidade relevante. Tais critérios são referentes a marcadores ideais. No entanto, na prática, alguns destes são inviáveis. Ainda cabe ressaltar que tais técnicas são carentes de valores de referência ou faixas de normalidade, tanto para humanos quanto para animais, dessa forma, tais métodos têm sua aplicação limitada à comparação entre os valores obtidos nos diferentes grupos de estudo.

Em função das dificuldades metodológicas e das lacunas de conhecimentos existentes em torno dos marcadores do estresse oxidativo e de seus métodos de aferição, justifica-se a importância de estudos nesta área, com o objetivo de traçar considerações sólidas que contribuam para uma melhor padronização dos métodos de aferição, com vistas a possibilitar sua aplicação rotineira no diagnóstico e controle do estresse oxidativo e suas implicações sobre a saúde humana.

## REFERÊNCIAS/REFERENCES

- BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal. Biochem.*, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.
- BERLINER, L. J.; KHRAMTSOV, V.; FUJII, H.; CLANTON, T. L. Unique in vivo applications of spin traps. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 30, n. 5, p. 489-499, 2001.
- BOHNSTEDT, K. C.; KARLBERG, B.; WAHLUND, L. O.; JONHAGEN, M. E.; BASUN, H.; SCHMIDT, S. Determination of isoprostanes in urine samples from Alzheimer patients using porous graphitic carbon liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, v. 796, n. 1, p. 11-19, 2003.
- BRYAN, N. S.; GRISHAM, M. B. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 43, n. 5, p. 645-657, 2007.
- BUSS, H.; CHAN, T. P.; SLUIS, K. B.; DOMIGAN, N. M.; WINTERBOURN, C. C. Protein carbonyl measurement by a sensitive ELISA method. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 23, n. 3, p. 361-366, 1997.
- CHEVION, M.; BERENSHTEIN, E.; STADTMAN, E. R. Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage. *Free Radic. Res.*, v. 33, p. S99-S108, 2000. Supplement.
- COOKE, M. S.; LUNEC, J.; EVANS, M. D. Progress in the analysis of urinary oxidative DNA damage. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 33, n. 12, p. 1601-1614, 2002.
- CRACOWSKI, J. L.; DURAND, T.; BESSARD, G. Isoprostanes as a biomarker of lipid peroxidation in humans: physiology, pharmacology and clinical implications. *Trends Pharmacol. Sci.*, v. 23, n. 8, p. 360-366, 2002.

- CREWS, H.; ALINK, G.; ANDERSEN, R.; BRAESCO, V.; HOLST, B.; MAIANI, G.; OVESEN, L.; SCOTTER, M.; SOLFRIZZO, M.; VAN DEN BERG, R.; VERHAGEN, H.; WILLIAMSON, G. A critical assessment of some biomarker approaches linked with dietary intake. *Br. J. Nutr.*, v. 86, p. S5-S35, 2001. Supplement 1.
- DALLE-DONNE, I.; GIUSTARINI, D.; COLOMBO, R.; ROSSI, R.; MILZANI, A. Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol. Med.*, v. 9, n. 4, p. 169-176, 2003.
- DAVIES, S. M.; POLJAK, A.; DUNCAN, M. W.; SMYTHE, G. A.; MURPHY, M. P. Measurements of protein carbonyls, ortho- and meta-tyrosine and oxidative phosphorylation complex activity in mitochondria from young and old rats. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 31, n. 2, p. 181-190, 2001.
- DIZDAROGLU, M.; JARUGA, P.; BIRINCIOLU, M.; RODRIGUEZ, H. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 32, n. 11, p. 1102-1115, 2002.
- DOTAN, Y.; LICHTENBERG, D.; PINCHUK, I. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Prog. Lipid. Res.*, v. 43, n. 3, p. 200-227, 2004.
- DRAPER, H. H.; CSALLANY, A. S.; HADLEY, M. Urinary aldehydes as indicators of lipid peroxidation in vivo. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 29, n. 11, p. 1071-1077, 2000.
- ELANGO, N.; SAMUEL, S.; CHINNAKKANNU, P. Enzymatic and non-enzymatic antioxidant status in stage (III) human oral squamous cell carcinoma and treated with radical radio therapy: influence of selenium supplementation. *Clin. Chim. Acta*, v. 373, n. 1-2, p. 92-98, 2006.
- FERREIRA, A. L.; MACHADO, P. E.; MATSUBARA, L. S. Lipid peroxidation, antioxidant enzymes and glutathione levels in human erythrocytes exposed to colloidal iron hydroxide in vitro. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 32, n. 6, p. 689-694, 1999.
- GALILI, O.; VERSARI, D.; SATTLER, K. J.; OLSON, M. L.; MANNHEIM, D.; MCCONNELL, J. P.; CHADE, A. R.; LERMAN, L. O.; LERMAN, A. Early experimental obesity is associated with coronary endothelial dysfunction and oxidative stress. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, v. 292, n. 2, p. H904-H911, 2007.
- GREEN, K.; BRAND, M. D.; MURPHY, M. P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes*, v. 53, p. S110-S118, 2004. Supplement 1.
- GROTTO, D.; SANTA MARIA, L. D.; BOEIRA, S.; VALENTINI, J.; CHARAO, M. F.; MORO, A. M.; NASCIMENTO, P. C.; POMBLUM, V. J.; GARCIA, S. C. Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography-visible detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 43, n. 2, p. 619-624, 2007.
- HALLIWELL, B. Why and how should we measure oxidative DNA damage in nutritional studies? How far have we come? *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 72, n. 5, p. 1082-1087, 2000.
- HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br. J. Pharmacol.*, v. 142, n. 2, p. 231-255, 2004.
- HAYWOOD, R. M.; WARDMAN, P.; GAULT, D. T.; LINGE, C. Ruby laser irradiation (694 nm) of human skin biopsies: assessment by electron spin resonance spectroscopy of free radical production and oxidative stress during laser depilation. *Photochem Photobiol.*, v. 70, n. 3, p. 348-352, 1999.
- HICKS, J. J.; TORRES-RAMOS, Y. D.; SIERRA-VARGAS, M. P. Estrés oxidante, concepto y clasificación. *Rev. Endocrinol. Nutr.*, v. 14, n. 4, p. 223-226, 2006.
- KEANEY, J. F. J.; LARSON, M. G.; VASAN, R. S.; WILSON, P. W.; LIPINSKA, I.; COREY, D.; MASSARO, J. M.; SUTHERLAND, P.; VITA, J. A.; BENJAMIN, E. J. Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.*, v. 23, n. 3, p. 434-439, 2003.

- KNUTSON, M. D.; HANDELMAN, G. J.; VITERI, F. E. Methods for measuring ethane and pentane in expired air from rats and humans. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 28, n. 4, p. 514-519, 2000.
- KNUTSON, M. D.; LIM, A. K.; VITERI, F. E. A practical and reliable method for measuring ethane and pentane in expired air from humans. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 27, n. 5-6, p. 560-571, 1999.
- LAWSON, J. A.; ROKACH, J.; FITZGERALD, G. A. Isoprostanes: formation, analysis and use as indices of lipid peroxidation in vivo. *J. Biol. Chem.*, v. 274, n. 35, p. 24441-24444, 1999.
- LEEUWENBURGH, C.; HANSEN, P. A.; HOLLOSZY, J. O.; HEINECKE, J. W. Oxidized amino acids in the urine of aging rats: potential markers for assessing oxidative stress in vivo. *Am. J. Physiol.*, v. 276, n. 1 Pt 2, p. R128-R135, 1999.
- LEVINE, R. L. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 32, n. 9, p. 790-796, 2002.
- LIU, J.; YEO, H. C.; DONIGER, S. J.; AMES, B. N. Assay of aldehydes from lipid peroxidation: gas chromatography-mass spectrometry compared to thiobarbituric acid. *Anal. Biochem.*, v. 245, n. 2, p. 161-166, 1997b.
- LIU, L.; LEECH, J. A.; URCH, R. B.; SILVERMAN, F. S. In vivo salicylate hydroxylation: a potential biomarker for assessing acute ozone exposure and effects in humans. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, v. 156, n. 5, p. 1405-1412, 1997a.
- MAIESE, K.; MORHAN, S. D.; CHONG, Z. Z. Oxidative stress biology and cell injury during type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Curr. Neurovasc. Res.*, v. 4, n. 1, p. 63-71, 2007.
- MANI, A. R.; PANNALA, A. S.; ORIE, N. N.; OLOSSON, R.; HARRY, D.; RICE-EVANS, C. A.; MOORE, K. P. Nitration of endogenous para-hydroxyphenylacetic acid and the metabolism of nitrotyrosine. *Biochem. J.*, v. 374, n. Pt 2, p. 521-527, 2003.
- MARANGON, K.; DEVARAJ, S.; JIALAL, I. Measurement of protein carbonyls in plasma of smokers and in oxidized LDL by an ELISA. *Clin. Chem.*, v. 45, n. 4, p. 577-578, 1999.
- MARGONIS, K.; FATOUROS, I. G.; JAMURTAS, A. Z.; NIKOLAIDIS, M. G.; DOUROUDOS, I.; CHATZINIKOLAOU, A.; MITRAKOU, A.; MASTORAKOS, G.; PAPASSOTIRIOU, I.; TAXILDARIS, K.; KOURETAS, D. Oxidative stress biomarkers responses to physical overtraining: implications for diagnosis. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 43, n. 6, p. 901-910, 2007.
- MAYNE, S. T. Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. *J. Nutr.*, v. 133, p. 933S-940S, 2003. Supplement 3.
- MILLER, E. R., 3RD; APPEL, L. J.; RISBY, T. H. Effect of dietary patterns on measures of lipid peroxidation: results from a randomized clinical trial. *Circulation*, v. 98, n. 22, p. 2390-2395, 1998.
- MILLER, N. J.; RICE-EVANS, C. A. Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS+ radical cation assay. *Free Radic. Res.*, v. 26, n. 3, p. 195-199, 1997.
- OLIVARES-CORICHI, I. M.; MEDINA-NAVARRO, R.; TORRES-RAMOS, Y. D.; MONTES-CORTÉS, D. H. Daño a proteínas por estrés oxidante: lipoproteína de baja densidad e insulina. *Rev. Endocrinol. Nutr.*, v. 14, n. 4, p. 237-240, 2006.
- PENNATHUR, S.; WAGNER, J. D.; LEEUWENBURGH, C.; LITWAK, K. N.; HEINECKE, J. W. A hydroxyl radical-like species oxidizes cynomolgus monkey artery wall proteins in early diabetic vascular disease. *J. Clin. Invest.*, v. 107, n. 7, p. 853-860, 2001.
- RAJDL, D.; RACEK, J.; TREFIL, L.; SIALA, K. Effect of white wine consumption on oxidative stress markers and homocysteine levels. *Physiol. Res.*, v. 56, n. 2, p. 203-212, 2007.

- REDDY, S.; HALLIWELL, B.; JONES, A. D.; LONGHURST, J. C. The use of phenylalanine to detect hydroxyl radical production in vivo: a cautionary note. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 27, n. 11-12, p. 1465, 1999.
- REYES, G. C.; SÁNCHEZ, I. R.; CALZADA-MENDONZA, C. C.; OLIVARES-CORICHI, I. M. Disfunción endotelial y estrés oxidativo. *Rev. Endocrinol. Nutr.*, v. 14, n. 4, p. 233-236, 2006.
- RICHELLE, M.; TURINI, M. E.; GUIDOUX, R.; TAVAZZI, I.; METAIRON, S.; FAY, L. B. Urinary isoprostane excretion is not confounded by the lipid content of the diet. *FEBS Lett*, v. 459, n. 2, p. 259-262, 1999.
- ROBERTS, L. J., 2ND; MORROW, J. D. Products of the isoprostane pathway: unique bioactive compounds and markers of lipid peroxidation. *Cell. Mol. Life. Sci.*, v. 59, n. 5, p. 808-820, 2002.
- ROUSSEL, A. M.; KERKENI, A.; ZOUARI, N.; MAHJOURB, S.; MATHEAU, J. M.; ANDERSON, R.A. Antioxidant effects of zinc supplementation in Tunisians with type 2 diabetes mellitus. *J. Am. Coll. Nutr.*, v. 22, n. 4, p. 316-321, 2003.
- ROVER, J. L.; HOEHR, N. F.; VELLASCO, A. P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado à métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Química Nova*, v. 24, n. 1, p. 112-119, 2004.
- SANTOS, C. X.; ANJOS, E. I.; AUGUSTO, O. Uric acid oxidation by peroxyxynitrite: multiple reactions, free radical formation, and amplification of lipid oxidation. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 372, n. 2, p. 285-294, 1999.
- UTSUMI, H.; YAMADA, K. In vivo electron spin resonance-computed tomography/nitroxyl probe technique for non-invasive analysis of oxidative injuries. *Arch Biochem Biophys*, v. 416, n. 1, p. 1-8, 2003.
- VALGIMIGLI, M.; VALGIMIGLI, L.; TRERE, D.; GAIANI, S.; PEDULLI, G. F.; GRAMANTIERI, L.; BOLONDI, L. Oxidative stress EPR measurement in human liver by radical-probe technique. Correlation with etiology, histology and cell proliferation. *Free Radic. Res.*, v. 36, n. 9, p. 939-948, 2002.
- VINCENT, H. K.; INNES, K. E.; VINCENT, K. R. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. *Diabetes Obes. Metab.*, v. 9, n. 6, p. 813-839, 2007.
- WILSON, R.; LYALL, K.; SMYTH, L.; FERNIE, C. E.; RIEMERSMA, R. A. Dietary hydroxy fatty acids are absorbed in humans: implications for the measurement of 'oxidative stress' in vivo. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 32, n. 2, p. 162-168, 2002.
- YU, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev.*, v. 74, n. 1, p. 139-162, 1994.
- ZITNANOVA, I.; SUMEGOVA, K.; SIMKO, M.; MARUNIAKOVA, A.; CHOVAANOVA, Z.; CHAVKO, M.; DURACKOVA, Z. Protein carbonyls as a biomarker of foetal-neonatal hypoxic stress. *Clin. Biochem.*, v. 40, n. 8, p. 567-570, 2007.

Recebido para publicação em 22/05/08.

Aprovado em 15/07/08.