

**Avaliação do Perfil Urinário de Biomarcadores do
Stress Oxidativo e a Sua Correlação com as
Doenças Cardiovasculares**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Berta Rodrigues Mendes
MESTRADO EM BIOQUÍMICA APLICADA



UNIVERSIDADE da MADEIRA

A Nossa Universidade

www.uma.pt

setembro | 2012

M UMa
7
EN Ava
.1

T/M UMa
577
MEN AVAL
EX.1

Avaliação do Perfil Urinário de Biomarcadores do Stress Oxidativo e a Sua Correlação com as Doenças Cardiovasculares

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Berta Rodrigues Mendes

MESTRADO EM BIOQUÍMICA APLICADA

UNIVERSIDADE DA MADEIRA
SECTOR DE DOCUMENTAÇÃO
E ARQUIVO

ORIENTAÇÃO
José de Sousa Câmara

Avaliação do perfil urinário de biomarcadores do stress oxidativo e a sua correlação com as doenças cardiovasculares

**Tese submetida à UNIVERSIDADE DA MADEIRA
com vista à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica Aplicada**

Berta Rodrigues Mendes

**Trabalho efetuado sob a orientação de:
Professor Doutor José de Sousa Câmara**

FUNCHAL - PORTUGAL

*“Todo o conhecimento que possuo, qualquer outra
pessoa pode adquirir, mas meu coração é só meu.”*

Johann Wolfgang Von Goethe

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 ao meu orientador Prof. Doutor José Sousa Câmara pela oportunidade, experiência, compreensão, apoio e disponibilidade.

Gostaria também de agradecer a colaboração da Dra. Isabel Mendonça e a unidade de investigação do centro hospitalar Dr. Nélio Mendonça, pela disponibilidade e colaboração na recolha das amostras.

Esta dissertação estaria, indubitavelmente, incompleta se não reconhecesse o apoio, a colaboração, amizade e o entusiasmo prestados pelos meus colegas e amigos, Catarina Luís Silva, João Gonçalves, Pedro da Silva, Camila Câmara, Rita Castro e Vítor Spínola. Agradeço-vos pelo alento, amabilidade, ajuda, momentos de risota e descontração, particularmente nos dias de menor ânimo.

Gostaria também de agradecer o apoio do Centro de Química (CQM), pelas condições possíveis que proporcionaram os meios necessários para a realização desta dissertação.

Não posso deixar de reconhecer o apoio da FEDER (Transnational cooperation MAC 2007-2013 Program) através do projeto VinSaudeMAC (MAC/1/M105), à Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) pelo financiamento do projeto PEst-OE/QUI/UI0674/2011 (CQM, fundos do Governo Português) e da Rede Portuguesa de RMN (PTNMR-REDE/1517/RMN/2005-POCI2010/FEDER).

Agradeço profundamente à minha família, nomeadamente ao meu marido João Pedro Marques Mendes, que amo muito, pelo apoio prestado, carinho, amor e sacrifícios a que submeteram para que pudesse progredir na minha formação.

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

Trabalhos científicos

Esta tese de mestrado correspondeu ao primeiro trabalho de investigação realizado no CQM, ao abrigo do projeto VinSaudeMAC (MAC/1/M105) – “Avaliação dos efeitos biológicos de vinhos tintos na prevenção de patologias ateroscleróticas, oncológicas e neurológicas- implementação de processos tecnológicos de vinificação que maximizem o teor de antioxidantes nos vinhos”, co-financiado pelo programa MAC 2007-2013 Cooperação Transnacional, tendo como coordenador científico o Prof. Doutor José de Sousa Câmara.

Para a aluna, foi uma excelente oportunidade de aprender a forma de aceder e analisar a informação científica, programar trabalho de investigação, interpretar dados experimentais e também, comunicar ciência. Além do mais aperfeiçoou as suas competências a nível das técnicas extrativas e cromatográficas.

No decorrer dos anos letivos foi possível participar em diversos trabalhos de investigação que estavam a decorrer no laboratório, e em congressos internacionais e nacionais com apresentação de comunicações em poster, publicar alguns resultados.

Poster

1. **Mendes B.**, Gonçalves J., Câmara J.S., “Effectiveness of two extraction methods to determine the volatile signature of Madeira wines”; ExTech 2010; Poznan, Poland; 20-22 September, 2010.
2. Spinola V., **Mendes B.**, Pereira J., Câmara J.S., Castilho P., “Rapid analytical approach for quantification the total L-ascorbic acid content in fruits and vegetables by ultra-performance liquid chromatography”. HPLC2011, Budapeste, Hungary; 19-23 June 2011
3. **Mendes B.**, Gonçalves J., Câmara J.S., “Effectiveness of miniaturised sorbent techniques to characterize wines global volatile signature”; XXXIV World Congress of Vine and Wine “The Wine Construction”; Porto, Portugal; 20-27 June 2011.
4. Gonçalves J., **Mendes B.**, Silva C.L.; Câmara J.S.; “Microextraction in packed sorbents (MEPS) combined with ultra-performance liquid chromatography for the determination of significant bioactive metabolites in wines”; XXXIV World Congress of Vine and Wine “The Wine Construction”; Porto, Portugal; 20-27 June 2011.
5. Gonçalves J., **Mendes B.**, Silva C.L., Câmara J.S., “A novel microextraction by packed sorbent-based methodology combined with ultra-high performance liquid chromatography for the determination of significant bioactive metabolites in wines”; EUROanalysis 2011;Belgrade, Serbia; 11-15 September, 2011
6. Caldeira R., Camacho C., Sousa M., Gouveia M., **Mendes B.**, Câmara J.S., “Solid phase microextraction as a powerful tool to establish the volatile metabolomic profile of *lycopersicon esculentum*”; EUROanalysis 2011;Belgrade, Serbia; 11-15 September, 2011

7. **Mendes B.**, Gonçalves J., Câmara J.S., “Simultaneous determination of creatinine, uric acid and MDA in human urine using ultra-performance liquid chromatography (UPLC)”; EUROanalysis 2011;Belgrade, Serbia; 11-15 September, 2011.
8. **Mendes B.**, Gonçalves J., Câmara J.S., “A sensitive method coupling ultra-high performance liquid chromatography to photodiode array detection as useful tool for quantification stress oxidative biomarkers in human plasma and urine”; 7th National Meeting on Chromatography; Porto, Portugal; 9-11 January 2012
9. **Mendes B.**, Gonçalves J., Câmara J.S., “Effectiveness of high-throughput miniaturized sorbent- and solid phase microextraction techniques for a rapid screening of volatile composition of wines – a comparative study”; 7th National Meeting on Chromatography; Porto, Portugal; 9-11 January 2012
10. **Mendes B.**, Silva P., Pereira J., Silva C.L., Câmara J.S., “A powerful and sensitive MEPS/UHPLC-PDA-based methodology for assessment of urinary biomarkers of oxidative DNA damage”; 36th International Symposium on Capillary Chromatography; Riva del Garda, Italy; May 27 – 1 June 2012
11. Silva P., **Mendes B.**, Pereira J., Aveiro F., Silva C.L., Câmara J.S., “A powerful and sensitive MEPS/UHPLC-PDA-based methodology for assessment of urinary biomarkers of oxidative stress in oncologic pathologies”; 36th International Symposium on Capillary Chromatography; Riva del Garda, Italy; May 27 – 1 June 2012
12. Pereira J., **Mendes B.**, Silva P., Silva C.L., Câmara J.S., “Semi-automatic micro-extraction in packed syringe combined with ultrahigh pressure liquid chromatography as a fast and simplified methodology to assess oxidative damage through quantification of 8-iso-prostaglandin F2 α biomarker in urine”; 36th International Symposium on Capillary Chromatography; Riva del Garda, Italy; May 27 – 1 June 2012
13. **Mendes B.**, Silva P., Pereira J.,Câmara J.S., “Ultrafast and powerful strategy based on microextraction by packed sorbent and UHPLC-PDA methodology for simultaneous determination of oxidative stress biomarkers”; HPLC2012 ; Anaheim, USA; 16-21 June 2012
14. Spinola V., **Mendes B.**, Pereira J., Câmara J.S., Castilho P., “A powerful UHPLC-PDA methodology for determination of L-Ascorbic acid content in fresh foodstuffs: A comparative evaluation with iodometric titration”; HPLC2012; Anaheim, USA; 16-21 June 2012

Revistas científicas

- **Aceites**

1. **Mendes B.**, Gonçalves J., Câmara J.S., "Effectiveness of high-throughput miniaturised sorbent- and solid phase microextraction techniques combined with gas chromatography-mass spectrometry analysis for a rapid screening of volatile and semi-volatile composition of wines - a comparative study"; Talanta 2011; DOI: 10.1016/j.talanta.2011.10.010; Impact factor: 3.794

2. Gonçalves J., **Mendes B.**, Silva C.L., Câmara J.S., "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; DOI: 10.1016/j.chroma.2012.023; Impact factor: 4.531

3. Spinola V., **Mendes B.**, Pereira J., Câmara J.S., Castilho P; "An improved and fast UHPLC-PDA methodology for determination of L-ascorbic and dehydroascorbic acids in fruits and vegetables. Evaluation of degradation rate during storage" Analytical and Bioanalytical Chemistry 2011; DOI 10.1007/s00216-011-5668-x; Impact factor: 3.778

4. Spínola, V., **Mendes, B.**, Câmara, J., & Castilho, P.. "Effect of time and temperature on vitamin C stability in horticultural extracts. UHPLC-PDA vs iodometric titration as analytical methods." LWT - Food Science and Technology. DOI:10.1016/j.lwt.2012.08.020

- **Submetidos:**

- **Mendes B.**, Silva P., Pereira J., Câmara J.S., "A Powerful Micro-Extraction Technique Using a New Digitally Controlled eVol[®] Syringe, Combined with Ultrahigh Pressure Liquid Chromatography for Assessment of Urinary Biomarkers of Oxidative DNA Damage"; submetido á: Plos One - PONE-D-12-25716

- **Mendes B.**, Silva P., Pereira J., Silva C.L., Câmara J.S., "Ultrafast and powerful methodology based on semi-automatic microextraction by packed sorbent combined with UHPLC-PDA for simultaneous determination of potential oxidative stress biomarkers" Submetido à: Journal of Chromatography A

Participações em congressos científicos

1. EUROanalysis 2011;Belgrade, Serbia; 11-15 September, 2011.

2. 7th National Meeting on Chromatography; Porto, Portugal; 9-11 January 2012

Resumo

Com a realização deste trabalho pretendeu-se estabelecer o perfil urinário de níveis de biomarcadores do *stress* oxidativo (5-HMU; UAc; MDA; 8-OHdG) em indivíduos saudáveis (grupo controlo) comparando com o de doenças cardiovasculares (grupo CVD) de modo a avaliar o seu potencial como possíveis biomarcadores da possibilidade de ocorrência de CVD. A extração dos compostos alvos foi realizada por recurso a uma nova técnica extrativa - microextração com adsorvente empacotado em seringa (MEPS) controlada digitalmente (eVol). A análise dos biomarcadores foi efetuada por cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC) utilizando como coluna analítica a HSS T3 (100 mm × 2,1 mm, 1,7 µm de tamanho da partícula) e com um sistema deteção de fotodiodos (PDA).

Otimizaram-se os parâmetros experimentais com influência no processo extrativo, nomeadamente no que se refere ao tipo de adsorvente, á influência do pH, ao volume de amostra, ao número de ciclos extrativos, lavagem e ao volume de eluição. Foram ensaiadas diferentes condições experimentais e selecionadas as que corresponderam a uma maior eficiência extrativa, expressa pela área total relativa dos analitos e reprodutibilidade. Os melhores resultados foram obtidos usando como adsorvente C8, o pH da amostra ajustado a 6, o adsorvente foi carregado com 5x50 µL de amostra e a eluição com 1x50 µL de 0,01% ácido fórmico e 3x50 µL de 20% metanol. Para a separação cromatográfica dos analitos usou-se uma fase móvel binária (0,01% ácido fórmico:20% metanol), em modo isocrático e um fluxo de 250 µL min⁻¹.

O método analítico foi validado em termos de seletividade, linearidade, limite de deteção (LOD), limite de quantificação (LOQ), efeito matriz, exatidão e precisão (intra e inter-dias) e aplicada a determinação de biomarcadores alvo nos dois grupos estudados, obtiveram-se bons resultados em termos seletividade e linearidade ($R^2 > 0,9906$), os valores de LOD e LOQ obtidos foram baixos, variando entre 0,00005 - 0,72 µg mL⁻¹ e 0,00023 - 2,31 µg mL⁻¹ respetivamente. Os resultados da percentagem de recuperação (91,06 - 123,02 %), precisão intra-dia (0,95 - 8,34 %), precisão inter-dia (4,58 -6,33 %) e o efeito de matriz (60,11 - 110,29 %) deste método foram satisfatórios.

A aplicação da metodologia validada aos dois grupos em estudo permitiu concluir que as concentrações de UAc e MDA entre os dois grupos, contrariamente ao 5-HMU e ao 8-OHdG cujas concentrações são estatisticamente diferentes entre o grupo controlo e o grupo CVD.

Palavras – chave: Biomarcadores *Stress* oxidativo; Microextração por sorvente empacotado; Validação; Doenças cardiovasculares; Cromatografia Líquida de Ultra-eficiência

Abstract

The aim of this work was to establish the urinary profile levels of the biomarkers of oxidative stress (5-HMU; UAc, MDA, 8-OHdG) in healthy subjects (control group) compared with cardiovascular disease patients (CVD group) in order to evaluate its potential as possible biomarkers of the possibility of CVD. The extraction of target compounds was performed using a new extraction technique - microextraction by packed sorbent (MEPS) digitally controlled (eVol). The analysis of biomarkers was performed by liquid chromatography ultra efficiency (UHPLC) using as analytical column the HSS T3 (100 mm × 2.1 mm, 1.7 mm in particle size) and with a system of detection photodiodes (PDA).

It was optimized experimental parameters which influence the extraction process, particularly as regards the type of adsorbent, the influence of pH, volume of sample, the number of cycles extractives, washing and elution volume. Different experimental conditions were tested and selected those that corresponded to greater extraction efficiency, expressed as the total area on the analytes and reproducibility. The best results were obtained using as adsorbent C8, the sample pH adjusted to 6, the adsorbent was loaded with 5x50 µL of sample and elution with 1x50 µL of 0.01% formic acid and 3x50 µL of 20% methanol. For the chromatographic separation of the analytes used is a binary mobile phase (0.01% formic acid: 20% methanol) and isocratic mode at a flow of 250 min⁻¹.

The analytical method was validated in terms of selectivity, linearity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), matrix effect, accuracy and precision (intra-and inter-day) and applied to the determination of target biomarkers in both groups, we obtained good results in terms of selectivity and linearity ($R^2 > 0.9906$), the values of LOD and LOQ values were low, ranging from 0.00005 to 0.72 µg mL⁻¹ and 0.00023 to 2.31 µg mL⁻¹ respectively. The results of the recovery (91.06 to 123.02%), intra-day (0.95 to 8.34%), inter-day precision (4.58 - 6.33%) and the matrix effect (60.11 to 110.29%) of this method were satisfactory.

The methodology validated the two groups under study concluded that concentrations of MDA and UAc between the two groups, unlike the 5-HMU and 8-OHdG whose concentrations are statistically different between the control group and the group CVD.

Keywords: Oxidative stress biomarkers; Microextraction by packed sorbent; Validation; Cardiovascular disease; Ultra Performance Liquid Chromatography

Índice

Agradecimentos	4
Trabalhos científicos.....	5
Poster.....	5
Revistas científicas.....	7
Participações em congressos científicos.....	7
Resumo	9
Abstract.....	10
Índice	12
Lista de Abreviaturas	18
Capítulo I- Introdução teórica.....	23
1. Introdução.....	25
1.1. <i>Stress</i> Oxidativo	25
1.2. Peroxidação lipídica	28
1.3. Oxidação do DNA.....	31
1.4. Influência do dano oxidativo nas CVDs	32
1.4.1. Aterosclerose.....	34
1.4.2. <i>Stress</i> oxidativo e Aterosclerose.....	37
1.4.3. Antioxidantes e CVDs.....	38
1.5. Biomarcadores	40
1.6. Biomarcadores do <i>Stress</i> Oxidativo	42
1.6.1. Creatinina.....	42
i) Relação entre a Creatinina e as CVDs	43
1.6.2. Ácido Úrico.....	44
i) Relação entre o Ácido Úrico e as CVDs	45
1.6.3. Malondialdeído.....	46
i) Relação entre o Malonaldeído e as CVDs	48
1.6.4. 5- Hidroximetiluracilo.....	49
i) Relação entre o 5-hidroximetiluracilo e as CVDs.....	50
1.6.5. 8- Hidroxi-2-desoxiguanosina.....	50
i) Relação entre 8-OHdG e as CVDs	51
1.7. Técnicas de extração para biomarcadores do <i>stress</i> oxidativo.....	52
1.7.1. Microextração por sorvente empacotado em seringa (MEPS).....	54
1.8. Cromatografia Líquida.....	56

Capítulo II- Parte experimental	58
2. Seção Experimental.....	60
2.1. Material e reagentes.....	60
2.2. Preparação das soluções padrão	61
2.3. Amostragem.....	61
2.4. Procedimento para a quantificação de MDA e 4-HNE	62
i. Com derivatização.....	62
ii. Sem derivatização.....	62
2.5. Preparação das amostras de urina.....	63
2.6. Otimização do procedimento extrativo dos biomarcadores do <i>stress</i> oxidativo na urina por eVol®MEPS	63
2.7. Validação do método analítico.....	64
2.8. Condições cromatográficas.....	65
2.9. Análise estatística	66
Capítulo III- Resultados e discussão	67
3. Resultados e discussão	69
3.1. Determinação de MDA e 4-HNE no plasma.....	69
3.2. Otimização das condições cromatográficas para a determinação dos biomarcadores do <i>stress</i> oxidativo na Urina.....	70
3.3. Otimização da metodologia MEPS por recurso à eVol	72
3.3.1. Seleção do adsorvente.....	72
3.3.2. Estudo do pH da amostra.....	73
3.3.3. Seleção do volume de amostra.....	74
3.3.4. Seleção do número de ciclos de extração	74
3.3.5. Lavagem.....	76
3.3.6. Seleção do volume de eluição	76
3.4. Validação da metodologia analítica para a determinação dos biomarcadores alvo na urina 77	
i) Seletividade	77
ii) Linearidade.....	78
iii) Limites de detecção de limites de quantificação.....	80
iv) Efeito matriz	81
v) Exatidão	81
vi) Precisão	82
3.5. Quantificação dos biomarcadores do <i>stress</i> oxidativo.....	82
3.6. Análise estatística	87
3.6.1. Teste de Kolmogorov-Smirnov Z	87

3.6.2. Teste One way ANOVA	87
3.6.3. Análise Multivariável Aplicada as concentrações obtidas.....	88
4. Conclusão	91
5. Referências	94
6. Anexos.....	101
Anexo I- Composição da SU	101
Anexo II- Curvas de calibração para os diferentes biomarcadores	101
Anexo III- Teste estatístico One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test	103

Índice de Figuras:

Figura 1- Principais etapas inerentes à peroxidação lipídica	29
Figura 2- Formação de alguns produtos resultantes da peroxidação lipídica.....	30
Figura 3- Interação celular na formação da placa aterosclerótica no interior do vaso sanguíneo	35
Figura 4- Progressão da placa aterosclerótica e correspondentes manifestações clínicas.....	36
Figura 5-Relação entre as espécies radicalares de oxígeno (ROS) e aterosclerose	38
Figura 6- Relação dos biomarcadores com outras tecnologias e a saúde.....	41
Figura 7- Fórmula de estrutura da creatinina	42
Figura 8- Síntese da creatinina no músculo	43
Figura 9- Fórmula de estrutura do Ácido Úrico.....	44
Figura 10- Biossíntese do Ácido Úrico.....	44
Figura 11- Fórmula de estrutura do MDA	46
Figura 12- Mecanismos propostos por Esterbauer <i>et. al</i> baseado nas sucessivas formações de hidroperóxidos e cisões β da cadeia de ácidos gordo poliinsaturados.	47
Figura 13- Reação de formação do 5-HMU a partir da hidroxilação da timina.....	49
Figura 14- Formação do 8-hidroxi-2-deoxiguanosina a partir da deoxiguanosina.....	50
Figura 15- Diferentes etapas da extração por eVol MEPS.....	56
Figura 16-Diagrama representativo dos diferentes constituintes da cromatografia líquida	57
Figura 17-Cromatograma representativo dos padrões a diferentes comprimentos de onda. (1-Creat; 2-5HMU; 3-MDA; 4-UAc; 5- 8-OHdG; IS- cimitidina).....	71
Figura 18- Comparação da eficiência dos adsorventes para cada biomarcador.....	72
Figura 19- Comparação da eficiência de extração dos diferentes adsorventes	73
Figura 20- Estudo do efeito do pH na eficiência de extração.....	74
Figura 21- Influência do número de ciclos de extração e do volume da amostra na eficancia de extração dos para cada um dos biomarcadores	75
Figura 22-Influência do número de ciclos de extração e do volume de amostra para os biomarcadores do <i>stress</i> oxidativo	75
Figura 23- Comparação de diferentes volumes de eluição.....	76
Figura 24- cromatograma representaivo da SU vs urina de um individuo do grupo controlo para avaliação da seletividade (aquisição $\lambda=245$ nm)	78
Figura 25- Cromatograma representativo de uma urina de um individuo do grupo CVD e de individuo do grupo Cont (aquisição 245nm) (1-Creat; 2-5HMU; 3-MDA; 4-UAc; 5- 8-OHdG; IS- padrão interno)	83
Figura 26- Perfil comparativo da concentração média dos biomarcadores do <i>stress</i> oxidativo no grupo CONT e no grupo de pacientes CVDs. (a) Concentração média do UAc/creat e MDA/creat (b) concentração média dos biomarcadores do dano oxidativo 5-HMU/creat e 8-OHdG.	84
Figura 27- Análise por componentes principais (PCA) aplicadas aos dois grupos em estudo	89

Figura 28- Representação gráfica dos <i>loadings</i> dos dois primeiros componentes (PC1 e PC2).....	90
Figura 29- Curva de calibração referente a creatinina	101
Figura 30-Curva de calibração referente ao 5-HMU	102
Figura 31-Curva de calibração referente ao UAc	102
Figura 32- Curva de calibração referente ao MDA	102
Figura 33-Curva de calibração referente ao 8-OHdG.....	103

Índice de Tabelas:

Tabela 1- Natureza, formação e destino das espécies radicalares (ou seus intermediários) biologicamente importantes.....	26
Tabela 2- Doenças associadas ao <i>stress</i> oxidativo	28
Tabela 3- Fatores de risco associado as CVDs e a sua ação.....	34
Tabela 4- Exemplos de diversos biomarcadores	40
Tabela 5- Características físico-químicas dos adsorventes da MEPS.....	55
Tabela 6- Resumo da amostragem por grupo (CONT e CVD) por género e por idade.	62
Tabela 7- Parâmetros otimizados para o processo extrativo MEPS e as respetivas condições cromatográficas.....	77
Tabela 8- Dados da validação do processo analítico onde demonstra a gama de concentrações utilizadas, tempos de retenção, comprimento de onda adquirido e o performance analítico dos biomarcadores do stress oxidativo em SU determinada pela metodologia eVol®MEPS/UHPLC-PDA.....	79
Tabela 9- Comparação dos LODs e LOQs obtidos no presente trabalho e noutros trabalhos.	80
Tabela 10- Concentração dos biomarcadores do <i>stress</i> oxidativo para os diferentes indivíduos dos diferentes grupos	85
Tabela 11- Comparação das concentrações dos biomarcadores do <i>stress</i> oxidativo no grupo controlo do presente trabalho com as obtidas outros trabalhos desenvolvidos.	86
Tabela 12- Resultados da ANOVA para os biomarcadores alvo do <i>stress</i> oxidativo nas amostras de urina dos grupos controlo e CVD.....	88
Tabela 13- Percentagem cumulativa da variância total explicada pelas duas componentes principais, para os grupos controlo e CVD com as 2 variáveis e 20 casos	89
Tabela 14- Constituintes da urina sintética.....	101
Tabela 15- Resultados referente ao teste estatístico One Sample Kolmogorov –Smirnov	103

Lista de Abreviaturas

	%	Porcentagem	
	°C	Graus Celsius	
	v/v	Volume-Volume	
	λ	Comprimento de Onda	
	β	Beta	
	M Ω	Mega-ohms	
	<i>psi</i>	Unidade de pressão	
	kPa	kilo pascal	
	h	Hora	
	min	Minuto	
Símbolos	s	Segundo	
	cm	Centímetro	
	mm	Milímetro	
	nm	Nanómetro	
	Å	Ångström	
	mg	Miligrama	
	μ g	Micrograma	
	L	Litro	
	mL	Mililitro	
	μ L	Microlitro	
	M	Molar	
	mmol	Milimole	
	nmol	Nanomole	
	A	AVC	Cerebrovascular Accident/ Vascular Cerebral Acidente
	B	BEH	Bridged ethylene hybrid/ pontes de etileno sílica híbrida com
		BIN	Barrel Inserted Needle/ da seringa Corpo de inserção
C	CC	Capilar chromatography/ capilar Cromatografia	
	Cr	Creatinine/ Creatinina	

	CVD	C ardiovascular d isease/ cardiovasculares	Doenças
	dG	D esoxiguanosine/desoxiguanosina	
	DMSO	D imethyl sulfoxide/ dimetil sulfóxido	
D	DNA	D eoxyribonucleic acid/ Ácido desoxirribonucleico	
	DNPH	2,4- d initrophenylhydrazine/2,4- dinitrofenilhidrazina	
	ELISA	E nzyme-Linked I mmunosorbent A ssay/ Ensaio imunoenzimático	
E	ETDA	E thylenediamine tetraacetic acid/ ácido etilenodiamino tetra-ácido	
	G	G uanine/ guanina	
	GC	G as chromatography/ cromatografia gasosa	
	GC-MS	G as chromatography coupled with m ass spectrometer/ cromatográfica gasosa acoplada ao espectrômetro de massa.	
G	GC-NICI-MS	G as chromatography-negative-ion chemical ionization mass spectrometry/ cromatográfica gasosa acoplada a espectrometria de massa por ionização química em modo negativo	
	HDL	H igh- d ensity lipoprotein/ lipoproteína de alta densidade	
	HILIC	H ydrophilic interaction chromatography/ cromatografia de interação hidrofílica	
	4-HNE	4- h ydroxy-2- n onenal/ 4-hidroxi-2-nonenal	
H	HPLC	H igh p ressure liquid chromatography/ cromatografia líquida alta eficiência	
	HPLC-FLR	H igh p ressure liquid chromatography coupled with f luorescence detector/ cromatografia líquida alta eficiência combinada com detector de fluorescência.	
	HPLC-PDA	H igh p ressure liquid chromatography	

		coupled with photo diódo array detector/ cromatografia líquida alta eficiência combinada com detector de fotodiodos
	HSS T3	H igh S trength S ilica T rifuncional
I	IS	I nternal S tandard/ padrão interno
	LC	L iquid C hromatography/ cromatografia líquida
	LC-MS	L iquid C hromatography acopled with M ass S pectrometry/ cromatografia líquida acoplada ao espectrometro de massa
L	LDL	L ow- D ensity L ipoprotein/ lipoproteína de baixa densidade
	LLE	L iquid- L iquid E xtraction/extração líquido- líquido
	LLME	L iquid- L iquid M icroextraction/ microextração líquido-líquido
	MDA	M alondialdehyde / malonaldeído
	MEPS	M icroextraction by P acked S orbent/ microextração de sorvente empacotado
M	MIPs	M olecular I mprinted P olymers/ polímeros molecularmente impressos
	MS	M ass S pectrometer/ espectrometria de massa
	NADP	N icotinamide A denine D inucleotide P hosphatase
N	NADPH	N icotinamide A denine D inucleotide P hosphatase H ydrogenase
	OGG1	8- O xoguanine glicolase 1/8-Oxoguanina glicolase 1
	8-OHdG	8- H ydroxy-2- D esoxyguanosine/8-hidroxi- 2-desosxiguanosina
O	8-OHGua	8- H ydroxy-2- G uanosine/8-hidroxi-2- guanosina
	OMS	O rganização M undial de S aúde

P	PC1	First P rincipal C omponent/ primeiro componente principal
	PC2	Second P rincipal C omponent/segundo componente principal
	PCA	P rincipal C omponent A nalysis/ análise do componente principal
	PDMS	P oly d imethylsiloxane/ Polidimetil siloxano
	PLE	P ressured L iquid E xtraction/extração líquida pressurizada
	PP	P rotein P recipitation/ precipitação de proteínas
	PSA	P rostate- S pecific A ntigen/antigénio específico da prostata
	PS-DVB	P olystyrene- d ivinylbenzene/poliestireno-divinilbenzeno
	PTFE	P olytetrafluoroethylene/ politetrafluoretileno
R	PUFA	P olyunsaturated F atty A cid/ ácido gordo poliinsaturado
	RAM	R aw restricted M aterials/ materiais de acesso restrito
	RNA	R ibonucleic A cid/ ácido ribinucleico
S	ROS	R eactive O xygen S pecies/ espécies reativas de oxigenio
	SBSE	S tir B ar S orptive E xtraction/ extração sorptiva em barra de agitação
	SOD	S uperoxide D ismutase/ superóxido dismutase
	SPE	S olid P hase E xtraction/ extração de fase solida
	SPME	S olid P hase M icro e xtraction/ microextração de fase solida
T	SU	S intetic U rine/ urina sintética
	T	T imine/ timina

	TBA	Thio barbituric Acid / ácido tiobarbitúrico
	TBARS	Thio barbituric Acid Reactive Species / espécies reativas do ácido tiobarbitúrico
	TEP	1,1,3,3-tetraetoxipropane/ tetraetoxipropano
	UAc	Uric Acid / ácido úrico
U	UHPLC	Ultra High Pressure Liquid chromatography / cromatografia de ultra eficiência

Capítulo I- Introdução teórica

1. Introdução

Ao longo deste capítulo iremos abordar alguns temas importantes para uma melhor compreensão do projeto desenvolvido.

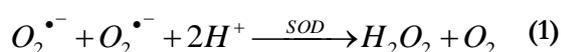
Têm sido realizados inúmeros estudos em torno dos biomarcadores do *stress* oxidativo, no entanto, apenas alguns desses estudos serão destacados por serem mais relevantes para o futuro da investigação em diversas áreas.

1.1. *Stress* Oxidativo

As reações de oxidação e redução em sistemas biológicos constituem a base para diversos mecanismos bioquímicos e alterações metabólicas [1].

As células estão continuamente expostas a diferentes agentes provenientes de processos metabólicos como a respiração mitocondrial e condições fisiopatológicas diferenciadas como a inflamação, a exposição à radiação, entre outros [2, 3], provocando à oxidação dos seus componentes celulares, o que poderá originar um aumento significativo de espécies reativas de oxigénio (ROS) com o conseqüente desencadeamento do *stress* oxidativo. As ROS são uma família de espécies reativas comuns em qualquer tipo de vida aeróbia e constantemente formados nos organismos durante os diferentes processos metabólicos. Nestes estão incluídos o oxigénio (O_2), superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e o radical hidroxilo ($\bullet OH$), todos capazes de iniciar a peroxidação lipídica nas células. Quando presentes em excesso e na ausência de mecanismos de defesa adequados, estão muitas vezes associados a danos celulares em diversas vias de sinalização, de forma direta ou através de intermediários. Os danos podem ser causados no DNA, nas proteínas e nos lípidos membranares. No entanto, a sua presença pode também ser benéfica, como comprovada no mecanismo de combate do sistema imunitário contra agentes patogénicos [1, 2, 4, 5].

Os efeitos nocivos dos ROS sobre componentes biológicos já eram conhecidos no final do século XIX, tornando-se objeto de intensa investigação científica nos últimos anos. McCord e Fridovich [6] estudaram a enzima superóxido dismutase (SOD), uma enzima que elimina os radicais superóxido através da catálise da reação de ROS ($O_2^{\bullet-}$) a peróxido de hidrogénio (H_2O_2) de acordo com a seguinte reação (1):



A quantidade de enzima SOD remanescente da reação (1) vai determinar a extensão da reação (2). Na presença de uma quantidade suficiente de SOD, o peróxido de oxigénio será convertido em água e oxigénio. Na sua ausência, o H_2O_2 será convertido nos radicais livres $O_2^{\bullet-}$ e HO^{\bullet} (reação 3) [2, 7].

O óxido nítrico (NO, com propriedades vasodilatadoras e anti-proliferativas) e o peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$, com a capacidade de aumentar a concentração de ROS) [1, 3] são outros radicais com importância biológica (tabela 1).

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

Tabela 1- Natureza, formação e destino das espécies radicalares (ou seus intermediários) biologicamente importantes.

Espécies derivadas do oxigénio	
<p>Anião radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Formados em diversos processos celulares: - cadeia de transporte de eletrões na mitocôndria, no microssoma, (através enzimas como xantina oxidase e NADPH oxidase) - Redução monoelétrica de O_2. • Converte-se em H_2O_2 e O_2 em solução aquosa por reação de dismutação: $O_2^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ • Em solução aquosa atua como forte agente redutor. A sua habilidade em reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} pode acelerar a reação de Fenton: $O_2^{\bullet-} + Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+} + O_2$ • Em solução aquosa pode formar espécies reativas de azoto: $O_2^{\bullet-} + NO^{\bullet} \rightarrow ONOO^{\bullet}$ • É permeável a membranas. Em fagócitos, como neutrófilos e macrófagos, é um dos microbicidas mais importantes.

<p>Peróxido de Hidrogénio (H₂O₂)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Apesar de não ser um radical livre, (ausência de eletrões desemparelhados) é um intermediário formado na reação de dismutação do O₂^{•-} é produzido por enzimas oxidases localizadas nos peroxissomas. • É facilmente difundível dentro e fora das células <i>in vivo</i>. • É um forte agente oxidante e um fraco agente redutor reagindo, por isso, lentamente com os tióis, sais de ferro e cobre reduzidos, proteínas com grupo <i>heme</i> e peroxidases, para iniciar reações radicalares e peroxidações lipídicas. • Na presença de metal de transição forma HO[•], através da reação de Fenton e também de Haber-Weiss: $O_2^{\bullet-} + Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+} + O_2$ (Fenton) $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + HO^- + HO^{\bullet}$ (Haber-Weiss)
<p>Radical hidroxilo (OH)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • É o radical mais reativo para qual, o organismo humano não dispõe de mecanismo de defesa. • Provoca modificações no DNA (modificação das bases e quebra da dupla cadeia), danos nas proteínas, inativação enzimática e peroxidação lipídica.
<p>Radicais peroxilo (RO₂[•]) e alcoxilo (ROO[•])</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Formados durante a decomposição de peróxidos orgânicos e reações de carbono radicalar com oxigénio, como na peroxidação lipídica.
<p>Oxigénio singlete (¹O₂[*])</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Estado eletronicamente excitado do oxigénio, produzido por reações fotoquímicas ou por outras radiações. • Reage com um grande número de moléculas biológicas, incluindo lípidos membranares, iniciando processos de peroxidação. • Pode ser formado por transferência de energia a partir de um sensibilizador S, no estado excitado tripleto (³S[*]) (porfirinas, clorofilas e riboflavina) para o oxigénio. O sensibilizador S absorve energia e deixa o estado fundamental singlete (S), passando para o estado excitado singlete (¹S[*]), a partir do qual é convertido, para o estado excitado tripleto. $({}^3S^*): S \rightarrow {}^1S^* \rightarrow {}^3S^*; {}^3S^* + {}^3O_2 \rightarrow S + {}^1O_2^*$
<p>Ozono (O₃)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Produzido no ar atmosférico poluído e por fonte de luz intensa de algumas fotocopiadoras e outros equipamentos. • É extremamente prejudicial para os pulmões, oxidando rapidamente proteínas, DNA e lípidos.

(Adaptada de Vasconcelos *et. al* [8])

Os efeitos do *stress* oxidativo podem ser evidenciados através da acumulação celular de peróxidos, por exemplo peróxidos lipídicos, ou subprodutos tais como o malonaldeído

(MDA) e glutathiona oxidada, podendo ser usado como marcadores da extensão do *stress* oxidativo.

O ataque dos radicais livres às moléculas de DNA pode ocorrer tanto na ligação desoxirribose-grupo fosfato como nas bases nitrogenadas (purinas e pirimidicas). As modificações nas bases do DNA resultam em mutações e na oxidação de desoxirribose, provocando a libertação das bases ou rutura das cadeias de DNA [9].

Os radicais livres e o *stress* oxidativo estão associados ao aparecimento de uma grande variedade de patologias como o cancro, doenças hepáticas, cardiovasculares (CVDs), neurodegenerativas, até mesmo o envelhecimento, entre outros (Tabela 2).

Tabela 2- Doenças associadas ao *stress* oxidativo

Doenças	Origem	Referências
Cardiovasculares		
Hipertensão	Produção de O_2^- por NADPH/NADP oxidase	[10, 11]
Aterosclerose	Falha ou consumo excessivo de defesas antioxidantes	[12-14]
Neurodegenerativas		
Parkinson	Uso de drogas e toxinas (estão envolvidas com a produção de radicais livres)	[15-17]
Alzheimer	Produção de O_2^- , H_2O_2 e HClO por células fagocíticas	[15, 18, 19]
Esclerose Múltipla	Perturbação estrutural da célula. As hemácias tornam-se mais suscetíveis à ação dos radicais livres.	[20, 21]
Crónicas		
<i>Diabetes mellitus</i>	Oxidação anormal de substratos ou mudanças na concentração de oxigénio.	[22-24]
Inflamatórias		
Artrite reumatóide e Asma	Produção excessiva de O_2^- , H_2O_2 e HClO por células fagocíticas	[1, 25]

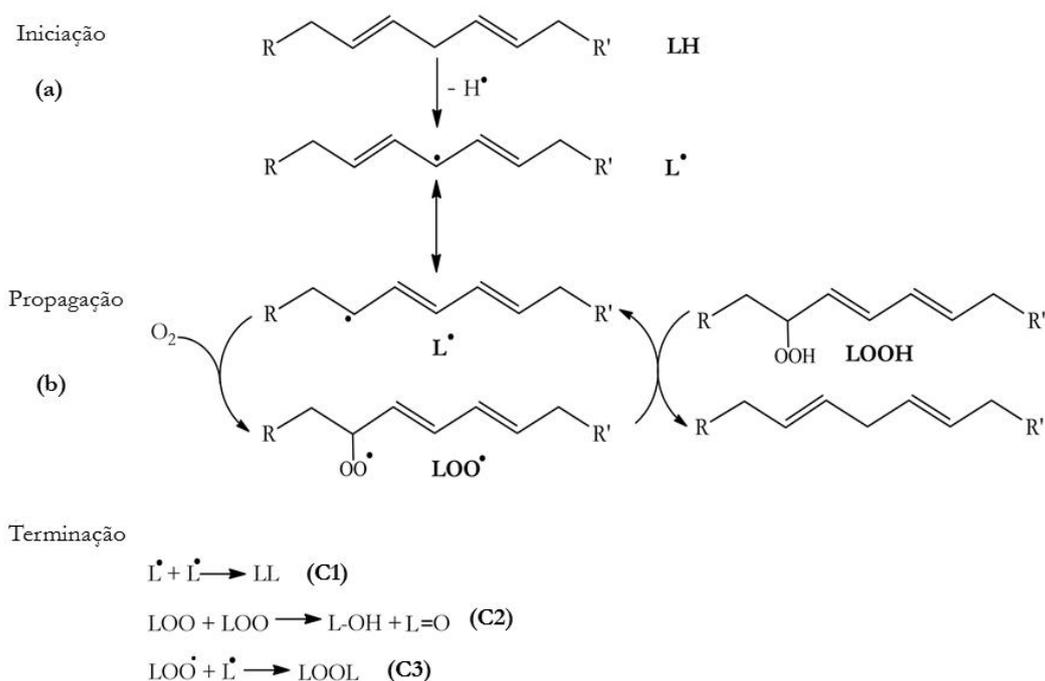
1.2. Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica é uma sequência de reações bioquímicas resultante da ação de radicais livres sobre os lípidos insaturados das membranas celulares que poderá provocar à destruição das membranas e posteriormente a morte celular. As transformações que ocorrem nas membranas levam à alteração da fluidez, integridade e permeabilidade,

perda da seletividade para a troca de nutrientes e substâncias tóxicas à célula, alterações no DNA, oxidação da proteína de baixa densidade (LDL-*low density lipoprotein*), entre outros [26].

De acordo com Niki *et. al* [27], a peroxidação lipídica pode ocorrer de formas distintas: (i) oxidação mediada por radicais livres (a qual vamos nos debruçar), (ii) oxidação não radicalar e não enzimática e (iii) oxidação enzimática (mediada por enzimas como as peroxidases, dioxigenases, citocromo P-450, cicloxigenases, lipoxigenases).

A peroxidação lipídica mediada por radicais livres ocorre em três fases sequenciais: iniciação, propagação e terminação [28] (figura 1).



(adaptada de Lima *et. al*)

Figura 1- Principais etapas inerentes à peroxidação lipídica

Na iniciação (reação a), os ácidos gordos insaturados perdem um H metilénico para uma espécie suficientemente reativa formando uma espécie radicalar (L') que por rearranjo molecular para originar um dieno conjugado.

Na propagação (reação b), o radical alquilo (L') inicialmente formado reage com o oxigénio formando um radical peróxido, que por sua vez possui a capacidade de abstrair um hidrogénio alílico de um ácido gordo, formando outra espécie radicalar. O processo

continua desde que a propagação de radicais livres L^{\bullet} e ácidos gordos seja suficiente promovendo deste modo a formação de radicais lipídicos.

O processo termina quando o substrato (radicais) se esgota, o que pode suceder por: (i) por combinação dos eletrões desemparelhados de duas espécies radicalares de modo a formar um produto não radicalar (reação c1). (ii) por dismutação ou clivagem β dos radicais peróxido e alcoxi formando aldeídos (reação c2). (iii) por ação de espécies antioxidantes; (iv) por formação da ligação covalente dos radicais peróxido e alcoxi com resíduos de aminoácidos; (v) por rearranjo formando produtos secundários da peroxidação lipídica; (iii) os radicais peróxido podem reagir com o substrato inicial, formando um hidroperóxido lipídico (LOOH) (reação c3).

A decomposição do hidroperóxido produz mais radicais livres como radical alcoxi e peroxi. Os radicais alcoxi podem originar aldeídos como MDA, 4-hidroxinonenal, por outro lado o radical peroxi poderá produzir isoprostanos entre outros (Figura 2 adaptada de Mateos *et. al* [29]).

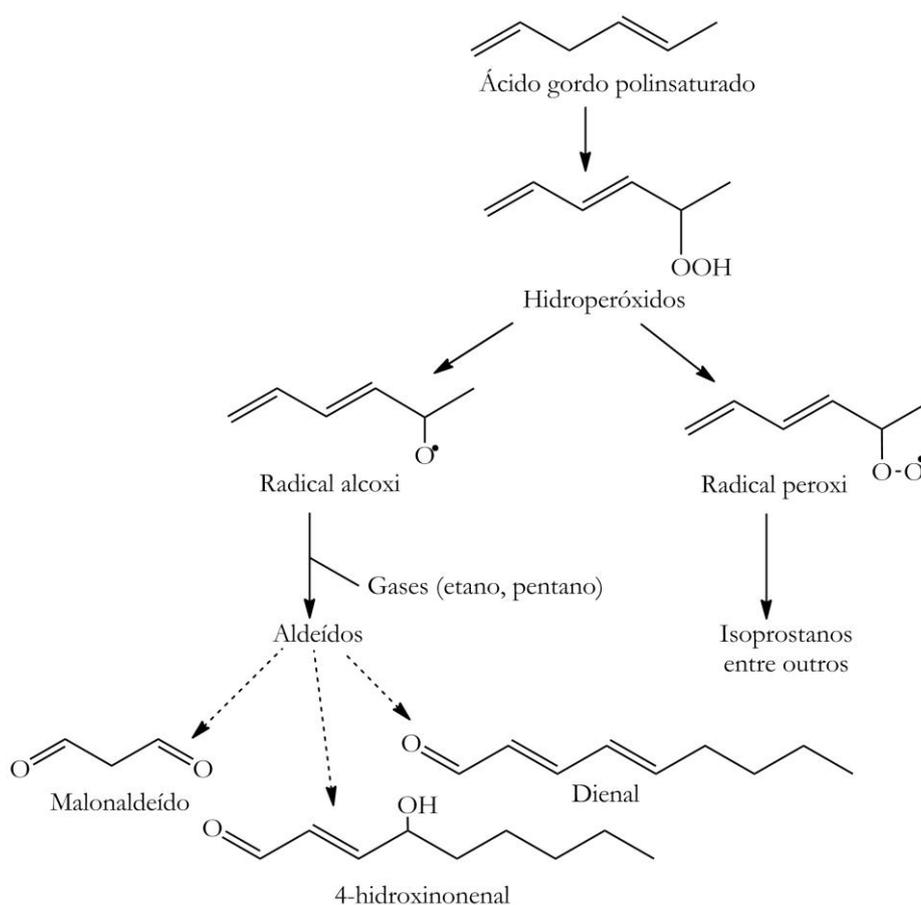


Figura 2- Formação de alguns produtos resultantes da peroxidação lipídica.

Diversos estudos têm demonstrado que a peroxidação lipídica está envolvida na patogênese de doenças humanas, como o cancro, a aterosclerose, as doenças pulmonares, a

doença de Alzheimer, a artrite reumatóide, a insuficiência renal e a diabetes *metillus* [29]. Esta nocividade faz com que o nosso sistema imunitário evolua no sentido de minimizar estes efeitos.

Nem sempre os produtos da peroxidação lipídica são prejudiciais, pois são importantes na reação em cascata a partir do ácido araquidônico (formação das prostaglandinas) e portanto na resposta inflamatória [29].

Diversas técnicas analíticas estão agora disponíveis para o estudo e quantificação dos produtos formados durante as diferentes fases deste processo com o intuito de estabelecer uma correlação que permita associar ou não o conteúdo de certos produtos da peroxidação lipídica com diferentes tipos de patologias.

1.3. Oxidação do DNA

Embora as células estejam sujeitas a danos por ação dos ROS, as consequências primárias deletérias do *stress* oxidativo surgem a partir dos danos do DNA, onde os radicais livres induzem alterações nas bases purínicas e pirimidínicas que poderão danificar a integridade do genoma [30, 31]. Os danos no DNA incluem modificações de bases, quebras das cadeias e ligações cruzadas de DNA-proteína. Estes resultam do ataque do DNA por parte de ROS, oxidando-o de forma direta ou interferindo em mecanismos de reparação.

Apesar das lesões que ocorrem no DNA, existe a capacidade de regeneração através de enzimas como a 8-oxoguanina DNA glicosilase 1 (OGG1). Sabe-se que a diminuição da expressão da OGG1 poderá conduzir a uma elevada frequência de mutações, aumentando o risco de cancro e outras patologias em indivíduos sob *stress* oxidativo [32]. A reparação dessas lesões, forma produtos, como por exemplo nucleósidos e bases oxidadas, que são muito solúveis em água e serão excretadas na urina sem serem metabolizadas. Outros produtos como 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8-OHdG), 8-hidroxi-2-guanosina (8-OHGua), timina-glicol, e 5-hidroximetiluracil (5-HMU), provenientes do dano oxidativo, são também hidrossolúveis e têm sido encontrados na urina. Estes produtos urinários incluem bases livres, ribonucleótidos de RNA e de desoxinucleótido de DNA [31]. Atualmente são conhecidos cerca de 20 produtos primários da oxidação do DNA, dos quais o 8-OHdG é um dos mais utilizados para indicar a existência de danos oxidativos no DNA humano.

A ação do *stress* oxidativo e da oxidação do DNA, pode ser minimizado através da ação dos antioxidantes que segundo Beierl *et. al* [33], é uma substância que, quando presente em baixas concentrações, comparativamente ao substrato oxidável nomeadamente

lipídios, DNA, hidratos de carbono, entre outros, previne significativamente a oxidação desse substrato.

As defesas antioxidantes, que podem ser de origem endógena e exógena, têm como função prevenir ou retardar a formação de radicais livres e anular/eliminar os radicais formados, protegendo o organismo contra os efeitos nocivos dessas espécies reativas. A prevenção pode ser conseguida através da transferência eficiente de elétrons e remoção e metais de transição como o ferro, elemento que se encontra ligado a proteínas como a transferrina e ferrina. Outra forma de prevenção é conseguida através da remoção radical hidropéroxido por reação com iões metálicos e através da ação dos antioxidantes endógenos com as enzimas catalase, glutathione peroxidase e SOD e antioxidantes exógenos como os polifenóis e vitaminas C, E, nomeadamente e outros de origem sintética tais como os derivados dos tióis (N-Acetilcisteína)[34, 35].

A vitamina E é um antioxidante lipofílico que confere proteção à membrana celular por atuar como quelante dos oxidantes produzidos durante a peroxidação. Devido ao seu caráter lipofílico a sua função poderá estar limitada em situações de sobrecarga de ferro. A vitamina C, por sua vez, é um antioxidante hidrossolúvel que pode neutralizar diretamente os ROS. No entanto, pode funcionar como pró-oxidante quando em dose elevada ou quando exposta a um metal.

Os ácidos nucleicos danificados oxidativamente são reparados por enzimas específicas, as proteínas oxidadas são removidas por sistemas proteolíticos, e os lipídios oxidados da membrana celular são processados por lipases, peroxidases e acil transferases [35].

1.4. Influência do dano oxidativo nas CVDs

Atualmente as CVDs são a maior causa de morte entre os seres humanos, é uma verdadeira epidemia global, para a qual tem contribuído a globalização, o desenvolvimento tecno-industrial e o envelhecimento da população. As CVDs deixaram de ser uma doença de idosos nos países desenvolvidos passando a atingir todos os estratos sociais e faixas etárias com maior incidência na população adulta.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS)[36], cerca de 17,3 milhões de pessoas morreram em 2008, representando cerca de 30% do total de mortes por CVD, dessas mortes, 7,3 milhões foram devido a patologias coronárias 6,2 milhões a acidentes vasculares cerebrais (AVCs). Cerca de 80% destas mortes ocorreram em pessoas de países desenvolvidos e sub-desenvolvidos, apesar dos dados disponíveis confirmarem aumentos significativos na ocorrência dos fatores de risco (por exemplo: obesidade e sedentarismo)

nos países mais desenvolvidos. Se não forem tomadas medidas de prevenção adequadas, estima-se que em 2030 cerca de 23,6 milhões irão morrer devido a esta patologia [36]. Em Portugal, as CVDs são também a maior causa de morte, perfazendo cerca de 40% das mortes totais [36]. Cerca de 42% dos portugueses tem hipertensão arterial, 8,6% dos adultos portugueses têm diabetes, 44,2% dos homens e 19,7% das mulheres fumam regularmente. A prevalência da obesidade está estimada em 15% no sexo masculino e 16% no sexo feminino. As jovens portuguesas adolescentes têm a taxa de obesidade mais elevada, 7,6 %, de um grupo de treze nações europeias [36, 37]. As CVDs têm origem em alterações patológicas no coração e vasos sanguíneos, e abrange um vasto leque de condições como a doença cardíaca coronária, a cerebrovascular, a arterial periférica, a cardíaca reumática, a cardíaca, a hipertensão arterial, a trombose venosa profunda e a embolia pulmonar. Sendo uma patologia multifatorial os fatores associados (tabela 3) categorizam-se em: intrínsecos, também conhecidos como não modificáveis, internos ou biológicos (ex: sexo, idade, etnia, história familiar e predisposição genética) e extrínsecos, modificáveis (ex: atividade física, a dieta, o peso, o tabaco, e o álcool).

Existem ainda alguns fatores de risco que podem ser considerados mistos, pois podem ter origem biológica (intrínseca) e ambiental tais como a hipertensão arterial, hipercolesteremia, hiperglicemia e a diabetes *mellitus*. Estes fatores, por serem silenciosos, são perigosos afetando indivíduos de ambos os sexos, sendo que as mulheres são afetadas uma década mais tarde devido a proteção hormonal associada, resultando numa maior taxa de mortalidade a partir da menopausa [37],[38]. Na Tabela 3, encontram-se descritos os fatores de risco associados as CVDs [37].

Os fatores de risco das CVDs estão associados ao estilo de vida do indivíduo, daí haver uma maior incidência na população de países desenvolvidos. Os problemas cardíacos têm custos económicos graves, quer no tratamento quer no número de baixas por doença, pelo que as medidas de prevenção devem começar cedo, e passam por atitudes que incluem por exemplo o controlo do peso, da diabetes e da pressão arterial, pelo aumento da atividade física, diminuição do *stress*, e pela adoção de uma alimentação saudável e equilibrada.

Tabela 3- Fatores de risco associado as CVDs e a sua ação

Fatores de risco	“Ação”
Intrínsecos	
Idade	O envelhecimento favorece a evolução da aterosclerose
Hereditariedade	Ter familiar próximo que já tenha desenvolvido aterosclerose numa idade jovem
Sexo	É maior no sexo masculino, contudo, após a menopausa esta discrepância entre os géneros diminui, já que se verifica um aumento da incidência de aterosclerose nas mulheres (a diminuição de estrogénios aumenta os recetores de LDL no fígado)
Extrínsecos	
Tabagismo	Ação lesiva do monóxido de carbono sobre o endotélio
Obesidade	Sobretudo abdominal, por associação com a diabetes tipo 2, a hipertrigliceridemia, a hipercolesterolemia e a hipertensão
<i>Stress</i>	Contribui para o desenvolvimento da aterosclerose
Sedentarismo	Promove a obesidade
Mistos	
Hiperlipidemia primária ou secundária	Deficiências enzimáticas hereditárias
Hipertensão	Por lesão endotelial
Diabetes <i>metillus</i> tipo 1 ou 2	Por diminuição da remoção das LDL
Síndrome nefrótica	Estimula a produção hepática de lípidos e lipoproteínas
Hipertiroidismo	Produz a formação de recetores LDL no fígado
Aumento de lipoproteínas plasmáticas e da homocisteína plasmática	Por produção de radicais livres de oxigénio que promovem a formação de LDL

(adaptada de Gradiz *et. al* [37])

1.4.1. Aterosclerose

A CVD mais comum é a patologia das artérias coronárias, mais conhecida por aterosclerose (acumulação de gordura nas paredes das artérias) que afeta primeiramente artérias como aorta, as carótidas e as ilíacas, podendo também comprometer as coronárias e as poplíteas. Consequentemente, os órgãos mais afetados são o coração, o cérebro, os rins, e o intestino delgado. Como consequência da aterosclerose podem surgir patologias cardíacas como o enfarte do miocárdio ou a angina de peito que resultam da formação do ateroma numa artéria coronária, levando à diminuição do transporte sanguíneo ao músculo cardíaco. De modo semelhante, as patologias cerebrovasculares como o AVC, e a patologia vascular periférica, resultam de processos aterogénicos que provocam o estreitamento de outras artérias [39].

A lesão aterosclerótica resulta inicialmente de dois processos básicos: a acumulação de colesterol e a proliferação de células do tecido muscular liso na *intima*. A lesão forma-se

sobre um substrato constituído por essas células, leucócitos e ainda por uma quantidade variável de tecido conjuntivo. O resultado é a formação de uma placa fibrosa (ateroma) que passa para o interior do lúmen, culminando numa série de complicações circulatórias [3, 38]. Na figura 3 é possível observar a sequência provável de interações celulares que ocorrem na aterosclerose.

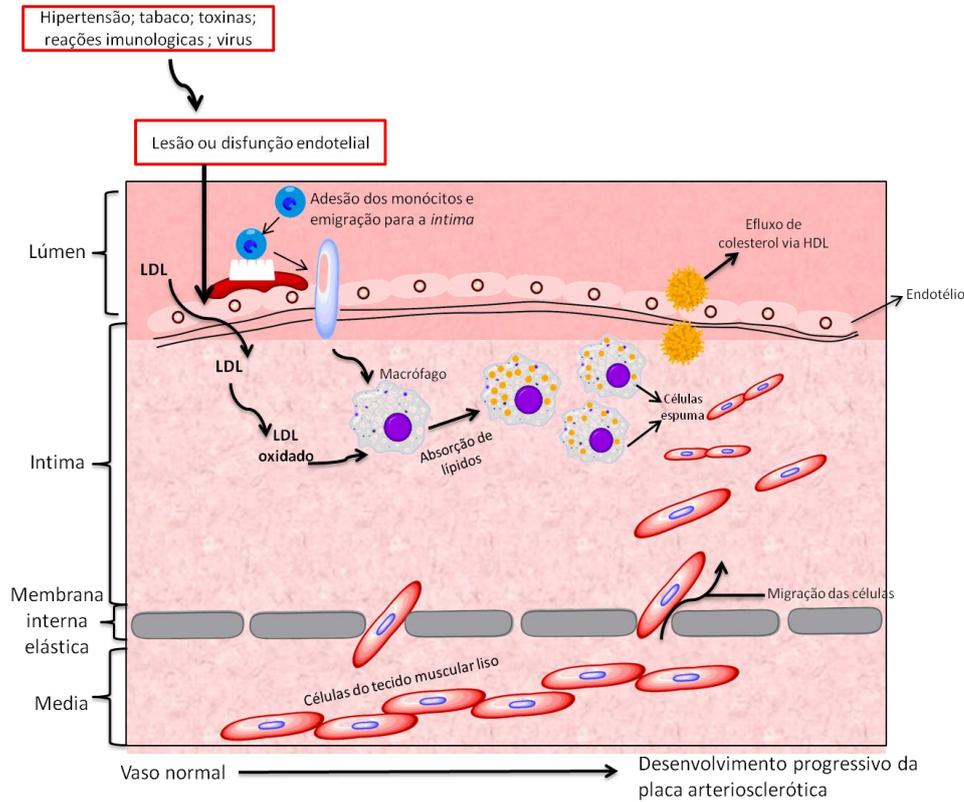


Figura 3- Interação celular na formação da placa aterosclerótica no interior do vaso sanguíneo

A hiperlipidemia e outros fatores de risco promovem à lesão endotelial, resultando na adesão de plaquetas e monócitos, assim como na libertação de fatores de crescimento, que por sua vez levam à migração e proliferação do músculo liso. As células espumosas são derivadas dos macrófagos ricos em vacúolos, enquanto os lipídios extracelulares resultam da sua entrada direta na célula ou da degeneração das células espumosas. A acumulação de colesterol na placa reflete um desequilíbrio no seu metabolismo e as HDL ajudam a eliminar estas acumulações. As células musculares lisas migram para a íntima, proliferam e produzem matriz extracelular, incluindo colagénio e proteoglicanos [37, 40]. Desde a década de 50 que se realizam estudos epidemiológicos de modo a perceber o processo de formação das placas ateroscleróticas. Os estudos realizados por Stary [41, 42] em adultos e crianças permitiram estudar a estrutura microscópica, a composição histoquímica das lesões, e aspetos morfológicos na formação da placa aterosclerótica ao longo das diversas

etapas na nossa vida, classificando-as em diversos tipos de lesões ateroscleróticas representados na figura 4 (adaptada de Stary [42]).

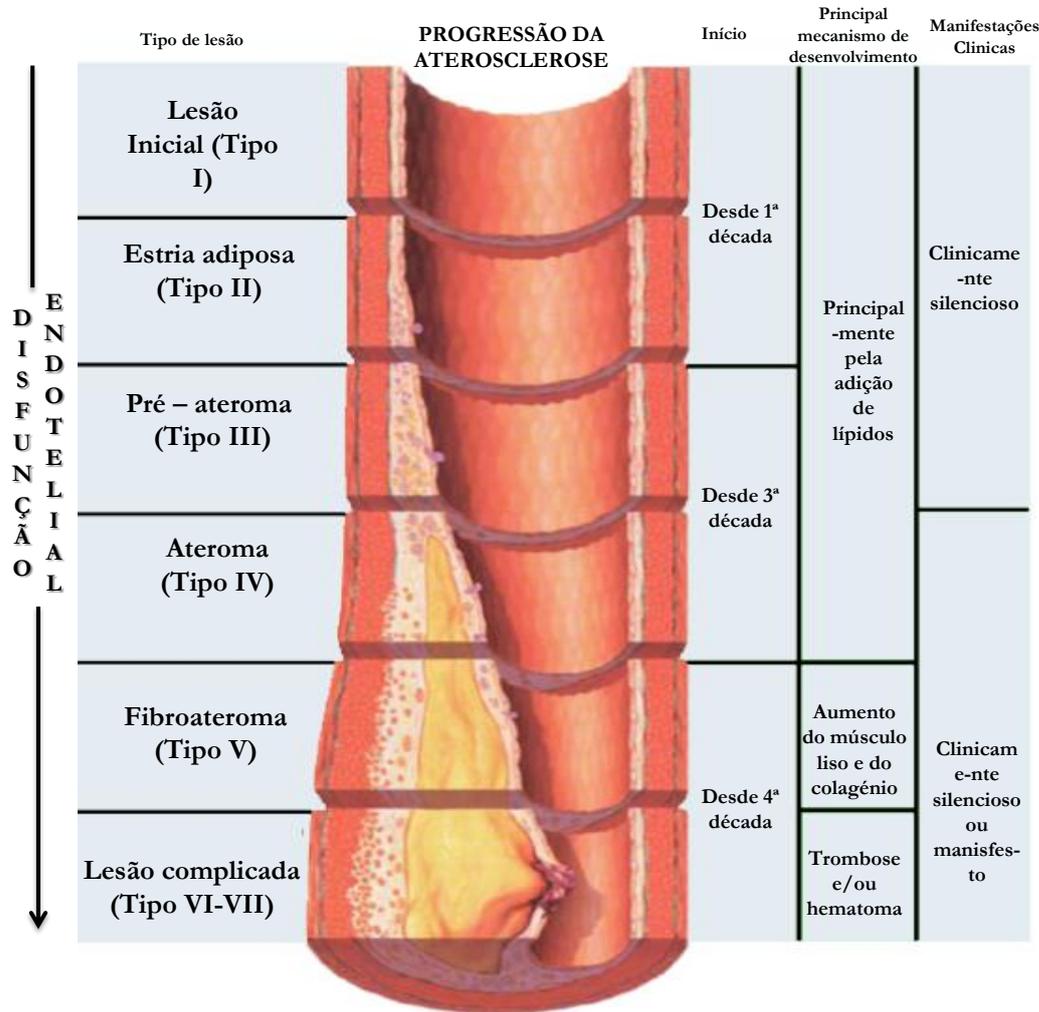


Figura 4- Progressão da placa aterosclerótica e correspondentes manifestações clínicas

Na lesão inicial (tipo I) ocorre a acumulação de lipoproteínas na *intima* e de lipídios em macrófagos sendo que estes últimos passam a ser designados de células espumosas. Estas modificações não provocam dano tecidual visível, mas podem ser detetadas através de microscópio ou quimicamente. Em relação à fase estria adiposa (tipo II), os eventos da fase anterior prosseguem conduzindo à acumulação de células musculares lisas, formando lesões visíveis, mas sem dano tecidual. Podem considerar-se duas subfases: a IIa, potencialmente capazes de evoluir, observando-se espessamento adaptativo; e IIb, menos suscetíveis a transformações, sendo resistentes à progressão e passíveis de regressão. Na formação do pré-ateroma (tipo III) persistem todas as características do tipo II, acrescentando-se depósitos extracelulares de lipídios, havendo já evidências de dano e desordem tecidual. Na fase do ateroma (tipo IV) ocorrem alterações do tipo IIa, acrescidas

de massa de lípidos extracelulares formando um núcleo de lípidos “*lipid core*”, com acentuado dano estrutural da *íntima*. Relativamente à fase fibroateroma (tipo V) sucede o mesmo tipo de alterações encontradas no tipo IV, associadas ao desenvolvimento de camadas de colagénio e de células musculares lisas, que se colocam sobre o núcleo de lípidos. Nas lesões complicadas (tipo VI), além das alterações do tipo V, ocorre o aparecimento de material trombótico, hematoma, erosão ou fissura. Considera-se tipo VIa, a ocorrência de fissura ou erosão; tipo VIb, a presença de hematoma ou hemorragia; e tipo VIc, a constatação de trombo. Existem mais dois estádios (não representados na figura 4), a lesão calcificada (tipo VII) que corresponde a lesão avançada com predomínio de elevado teor de cálcio e com acentuada deformação estrutural, e a lesão fibrótica (tipo VIII), com composição predominante de colagénio e ausência ou pequena quantidade de lípidos [3, 43]. A placa aterosclerótica fica assim, composta por gordura (colesterol), fibrina, colagénio e células mortas.

A aterosclerose é assintomática até uma placa estreitar gravemente a artéria ou causar uma obstrução súbita. É um processo que poderá persistir por muitos anos antes das manifestações clínicas se tornarem evidentes. Isto deve-se ao fato dos processos envolvidos na aterogénese exigirem uma exposição prolongada a fatores promotores e as manifestações clínicas apenas ocorrerem nos últimos estádios da doença onde o progresso é mais rápido. Devido a esta distinção, sabe-se que as terapias são mais eficientes para a prevenção do desenvolvimento de lesões e não tão eficazes quando já surgem manifestações clínicas da patologia [40].

O diagnóstico pode ser realizado através de métodos invasivos e não invasivos como o eletrocardiograma e o ecocardiograma e a angiografia (permite a visualização por ressonância a artéria do coração e vasos sanguíneos depois da introdução intravascular de meio de contraste) considerado um método invasivo.

No caso de pacientes considerados de risco estes devem tomar medicação adequada de modo a baixarem os níveis de colesterol, pressão arterial e controlar a diabetes. Em casos mais graves, a cirurgia de *bypass* coronário ou a endoarterectomia (de uma placa localizada na artéria bloqueada) são os tratamentos preferenciais dependente da localização.

1.4.2. *Stress* oxidativo e Aterosclerose

O *stress* oxidativo encontra-se associado a várias patologias, e existem evidências convincentes que apontam as ROS como fatores promotores no desenvolvimento da aterosclerose. O *stress* oxidativo está envolvido na formação da aterosclerose (figura 5 adaptada de Rodrigo [3]) [3] através da oxidação da LDL e da diminuição da

biodisponibilidade do NO contribuindo para a produção de ROS, que irão provocar a disfunção endotelial. Estes comprometem a vasodilatação, a expressão de moléculas de adesão e proteínas, a adesão de monócitos, a acumulação de lipoproteínas oxidadas, a formação de células de espumas, a proliferação das células do tecido muscular liso e dos fibroblastos, e promovem o desencadeamento de uma resposta inflamatória [39, 40].

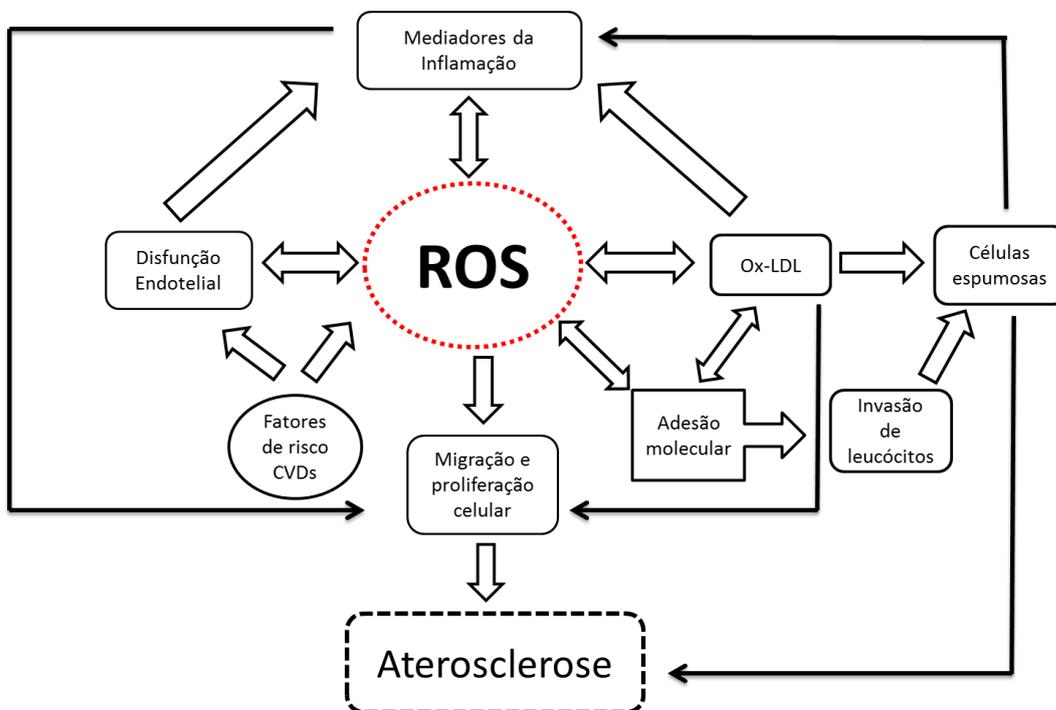


Figura 5-Relação entre as espécies radicalares de oxigênio (ROS) e aterosclerose

Existem várias fontes de ROS na parede vascular, incluindo enzimas como a NADPH-oxidase e a xantina-oxidase e que podem ser potencialmente reguladas em intervenções terapêuticas. Todas essas evidências sugerem que as intervenções de suplementação de antioxidantes devem ter um efeito protetor contra o desenvolvimento da aterosclerose (efeitos anti-aterogênicos) [3]. O aumento do *stress* oxidativo nas CVDs tem sido alvo de estudos e diversos estudos têm sido realizados de modo a analisar o efeito dos antioxidantes sob a disfunção endotelial em pacientes com doença coronária ou pacientes de risco cardiovascular [44].

1.4.3. Antioxidantes e CVDs

Os antioxidantes contribuem para a proteção dos sistemas biológicos contra os efeitos deletérios dos processos ou das reações que levam à oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares, prolongando a fase de iniciação (formação dos ROS) ou então inibindo a fase de propagação da peroxidação lipídica. Contudo não podem prevenir completamente a oxidação.

Nos últimos anos inúmeros trabalhos, relacionados com a ação dos antioxidantes na saúde, têm sido desenvolvidos avaliando o efeito de diferentes antioxidantes, como a vitamina E, vitamina C, procubol e β -caroteno na fisiopatologia da arterosclerose, quer *in vivo* quer *in vitro* [45] [46].

A redução do *stress* oxidativo e inibição da oxidação das LDL através da vitamina E tem recebido uma atenção considerável, como um benefício para a saúde na redução do risco de CVDs. Atua como um antioxidante que rompe as cadeias e impede a peroxidação lipídica de ácidos gordos polinsaturados e a modificação das LDL por ação dos ROS [47]. Estudos [46, 48] demonstram que *in vivo*, os radicais livres produzidos pelas células endoteliais da parede arterial e os macrófagos ativados são destinados a oxidar as moléculas de LDL tornando-os quimiotáxicos (atração de monócitos). Estes por sua vez são reconhecidos pelos recetores do removedor (*scavenger*) de macrófagos e absorvidos pelos macrófagos, formando células espumosas nas lesões das estrias adiposas. Estudos *in vitro* [46, 48] mostraram que o aumento do teor de vitamina E nas moléculas de LDL aumenta a resistência à oxidação de LDL e diminui a sua absorção pelos macrófagos.

A vitamina C (ou ácido ascórbico) tem igualmente uma ação protetora contra a oxidação das LDL [49]. Estudos *in vitro* demonstraram que as concentrações fisiológicas de ácido ascórbico inibem fortemente a oxidação de LDL por células endoteliais vasculares, além disso os derivados lipofílicos do ácido ascórbico mostraram efeito protetor na peroxidação lipídica induzida pela lesão endotelial [49]. Adesão de leucócitos ao endotélio é um passo importante na iniciação da aterosclerose. Existem também evidências da importância do ácido ascórbico na vasodilatação, prevenindo assim a disfunção endotelial [3].

Embora já tenham sido realizados muitos ensaios clínicos relacionados com ação dos antioxidantes nas CVDs, as comparações são difíceis devido a uma grande heterogeneidade entre as populações estudadas, a duração dos esperados e as metodologias analíticas usadas. É possível que os antioxidantes possam ter um forte efeito protetor e atenuante nos estágios iniciais da disfunção endotelial na fase inicial da aterogénese, antes que os processos que perpetuam a formação da lesão aterosclerótica sejam estabelecidos. De acordo com Sugamura *et. al* [13](#) e Nikki *et. al* é difícil demonstrar que o uso de suplementos com potenciais antioxidantes (vitamina C, vitamina E, e β -caroteno) tenha impacto na prevenção de CVDs, sendo necessários mais estudos de modo a esclarecer o papel dos mesmos na ação contra a aterosclerose [11, 50].

1.5. Biomarcadores

Os efeitos dos antioxidantes podem ser avaliados pelo comportamento de biomarcadores associados às CVDs. Biomarcador é “*um analito que pode ser medido e avaliado como indicador de uma resposta fisiológica, processo patológico ou resposta farmacológica a uma intervenção terapêutica.*” [9, 51, 52]. Os biomarcadores mais comuns são medidos no sangue, plasma e urina [53]. **Erro! A origem da referência não foi encontrada.** apresenta vários exemplos de biomarcadores usados para a detecção de diferentes patologias.

Tabela 4- Exemplos de diversos biomarcadores

Doenças	Exemplos de biomarcadores
Diabetes <i>mellitus</i>	Glicemia, frutossaminas, Hemoglobina A1c, avaliação da retina, neuropatia periférica e nefropatia
Hipertensão arterial	Pressão arterial, angiotensina I e II, aldosterona, renina plásmatica, atividade da enzima conservadora da angiotensina.
Artrite reumatóide	Citocinas, leucotrienos
Asma	Testes de função pulmonar, citocinas, leucotrienos
Dano cardiovascular	cTroponina I e T
Doença hepática	Alanina aminotransferases e γ -glutamyl-transpeptidase

(adaptada de Vasconcelos *et. al* [54])

Os biomarcadores podem ser moléculas simples, como por exemplo os produtos resultantes do metabolismo, os hidratos de carbono (ex: glicose), os esteróides e os lipídeos, ou mais complexos como os péptidos e proteínas caso da insulina, da hemoglobina A e C, do antígeno específico da próstata (PSA) e da proteína C reativa. Biomarcadores mais complexos como as células T e os anticorpos [55] são também de extrema utilidade. Segundo Zwart *et. al* [9] e La Baer *et. al* [56], os biomarcadores podem ser classificados em três tipos: biomarcadores de exposição, de efeito e de suscetibilidade.

Um biomarcador de exposição tem a função identificar substâncias exógenas no sistema e é produto da interação entre compostos xenobióticos e componentes endógenos relacionados com a exposição. 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).

É de salientar a importância que existe na correlação dos biomarcadores de exposição com potenciais ou atuais problemas de saúde. Mesmo antes da exposição, existem diferenças entre os indivíduos fazendo com que uns sejam mais suscetíveis do que

outros nas doenças induzidas pelo ambiente. Existem diversos fatores tais como o sexo, idade, historial clínico, entre outros, que influenciam a suscetibilidade dos indivíduos.

Idealmente um biomarcador deverá ser: (i) específico e sensível; (ii) um produto maioritário da alteração oxidativa que poderá estar implícito no desenvolvimento da doença; (iii) estável, não suscetível a indução de artefactos, ou perda durante o armazenamento; (iv) representativo do equilíbrio entre a produção de danos oxidativos e a depuração; (v) refletir o efeito desde do início; (vi) apresentar uma boa relação bem estabelecida entre a resposta do biomarcador e os danos induzidos; (vii) determinado por um método específico, sensível e reprodutível [9, 51, 52].

Na determinação dos biomarcadores encontram-se envolvidas várias tecnologias “ômicas” que investigam a evolução das doenças (figura 6, adaptada de Jain [51]), o que faz com que nas diversas áreas de estudo, os biomarcadores sejam abordados de diversas formas. Por exemplo, na medicina o biomarcador indica uma mudança de expressão ou estado de uma proteína que se correlaciona com o risco ou progressão de uma patologia, ou com a suscetibilidade à doença. No entanto, na biologia celular um biomarcador é uma molécula que permite a deteção e o isolamento de um tipo de células. Já na genética é uma sequência de DNA ou RNA que causa doença ou está associada a suscetibilidade à doença [51].

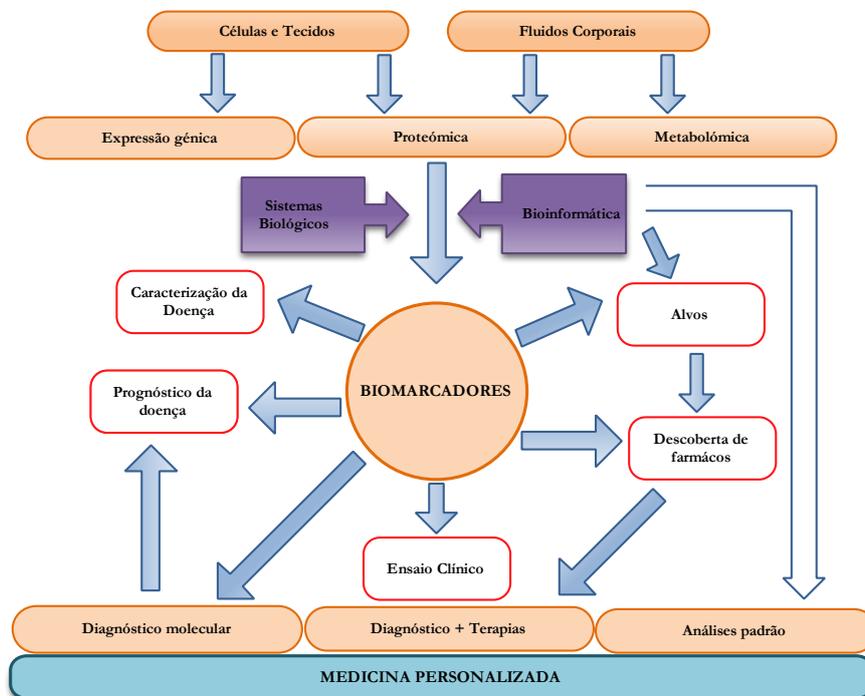


Figura 6- Relação dos biomarcadores com outras tecnologias e a saúde

O uso de biomarcadores tem sido utilizado há várias décadas quer na assistência ao paciente, quer na avaliação da segurança de novos químicos/fármacos. Ao longo dos

estudos desenvolvidos para a descoberta ou validação de biomarcadores, alguns desafios têm surgido como por exemplo a história clínica do indivíduo, os mecanismos heterogêneos das diferentes patologias, a inespecificidade de marcadores, a variabilidade inter- e intra- indivíduo e as diversas respostas ao tratamento [57].

Os biomarcadores têm sido utilizados para avaliar a eficácia de muitos antioxidantes *in vitro*, *ex-vivo* e *in vivo* com resultados nem sempre coincidentes[51]. Estes resultados poderão refletir expectativas que temos em relação às informações que os biomarcadores do *stress* oxidativo nos podem fornecer.

1.6. Biomarcadores do Stress Oxidativo

Nos últimos anos tem havido um aumento crescente no interesse científico e clínico no *stress* oxidativo e em muitos parâmetros utilizados para quantificar a sua extensão. Vários biomarcadores, incluindo o 5-hidroximetil uracilo (5-HMU), o ácido úrico (UAc), o malondialdeído (MDA) e a 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) têm sido sugeridos como potenciais biomarcadores desta condição fisiológica. A creatinina (Creat) tem sido utilizada como fator normalizante. A quantificação destes compostos não é tarefa fácil devido principalmente a complexidade das matrizes biológicas (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.

1.6.1. Creatinina

A creatinina (Creat), também conhecida como 2-amino-1-metil-5H-imidazol-4-ona (Figura 7), é produzida através da creatina (sintetizada no fígado e no pâncreas a partir da arginina, da lisina e da metionina), e acumula-se nas células de todos os tecidos, particularmente nos músculos.

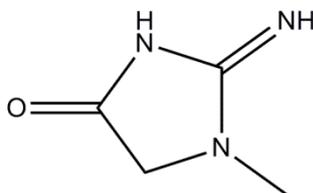


Figura 7- Fórmula de estrutura da creatinina

A Creat é formada no músculo a partir do fosfato de creatina (acumulador de energia metabólica) e da creatina, por desfosforilação e desidratação respetivamente (Figura 8). A conversão diária de Creat a partir da creatina e do fosfato de creatina é de cerca de

2%, e a sua eliminação é realizada principalmente nos rins por filtração glomerular [58-61]. A Creat pode ser designada como plasmática/sérica e urinária.

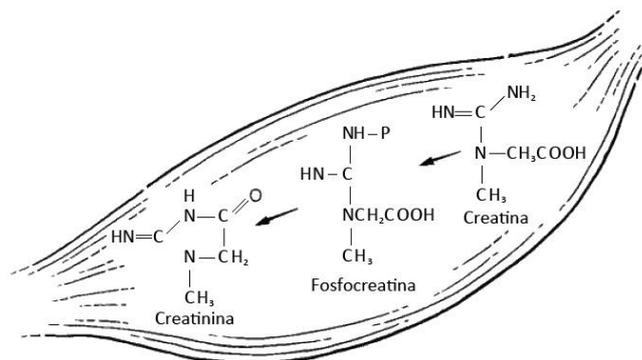


Figura 8- Síntese da creatinina no músculo
Fonte adaptada

Segundo, Barr *et. al* [62] 15 a 20% da Creat na urina pode ocorrer por secreção ativa a partir do sangue através dos túbulos renais e a taxa de secreção pode variar substancialmente devido a diversos fatores genéticos e biológicos. Nas décadas de 70 e 80 investigadores [63, 64] encontraram uma correlação entre as concentrações de Creat urinária e massa muscular, tendo observado que a concentração de Creat nos homens é superiores à das mulheres. Também foi observado que existe uma diminuição de Creat urinária com o aumento da idade (provavelmente devido à taxa de filtração glomerar e uma variação sazonal na concentração de Creat em crianças). Além disso, indivíduos que consomem muita carne vermelha têm uma maior concentração de Creat urinária do que os que seguem uma dieta vegetariana[58].

A quantidade da creatina é constante no músculo e a formação da Creat na urina de 24h é relativamente constante e característica em cada indivíduo, apesar da eliminação variar de indivíduo para indivíduo [58]. A Creat é um marcador fiável da função renal, ao contrário da ureia, cuja produção apenas depende do metabolismo celular muscular e é eliminada por filtração glomerular [65-67].

O ajuste de Creat tem sido usado para normalizar as concentrações de analito em amostras pontuais de monitorização da exposição ocupacional e ambiental [62, 68].

O doseamento da Creat sérica é um teste bioquímico simples de avaliação da taxa de filtração glomerular [60].

i) Relação entre a Creatinina e as CVDs

Apesar da Creat ser utilizada na maior parte das vezes como fator normalizante, procurou-se relacionar a Creat com as CVDs. Desde década de 90 que têm sido realizados uma série de estudos relacionados com o aumento da concentração de Creat sérica, pois

tem sido associada ao aumento da mortalidade em adultos hipertensos, onde a doença cardiovascular é a principal causa da morte.

Em 2006, Irie *et. al* [69] realizou estudos na população japonesa e verificou que o aumento da Creat sérica e taxa de filtração glomerular reduzida estão associados ao aumento da mortalidade por CVDs. A mesma constatação foi observada em estudos realizados em países ocidentais. Assim sendo, a concentração de Creat sérica e taxa de filtração glomerular poderão atuar como parâmetros indicadores de CVDs.

Nos trabalhos de Oterdoom *et. al* [70], a Creat excretada em 24h foi utilizada como medida do índice de massa muscular, de forma a determinar se a massa muscular está associada às CVD,

Tendo em conta estes trabalhos podemos especular que há uma relação indireta entre a Creat e as CVDs.

1.6.2. Ácido Úrico

O ácido úrico (UAc) é um composto orgânico (Figura 9) que se encontra nos sistemas biológicos na sua forma ionizada, o urato de sódio (no plasma humano e no líquido extracelular) [71].

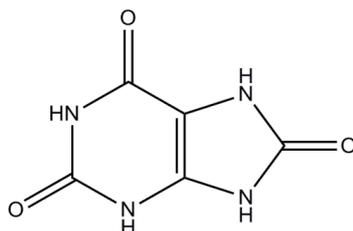


Figura 9- Fórmula de estrutura do Ácido Úrico

É o produto final do metabolismo das bases púricas (adenina e guanina) constituintes dos respetivos nucleótidos. As purinas sofrem um processo de degradação em hipoxantina que depois se transforma em xantina. Esta última através da ação irreversível da enzima xantina oxidase, converte-se em UAc e este em urato (Figura 10). A quantidade de UAc produzido depende da concentração de enzima existente [71, 72].

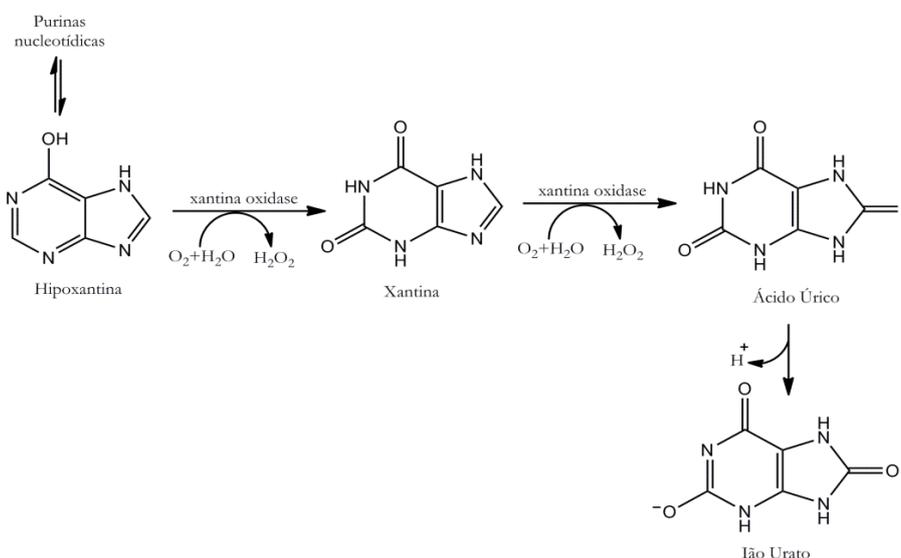


Figura 10- Biosíntese do Ácido Úrico

Existem diversos fatores que influenciam os níveis orgânicos de UAc tais como sexo, idade, alimentação, estilo de vida e etnia. A maioria do urato encontra-se presente no sangue, sendo que 70% é de origem endógena e os restantes 30% provêm da alimentação

O nosso organismo não é capaz de metabolizar os uratos, pelo que, para que se possa manter o equilíbrio é necessário que estes sejam eliminados pelo rim e/ou intestino. Por serem hidrossolúveis, estes podem ser eliminados através da urina [71].

Os níveis de urato de sódio no sangue e na urina estão associados a diversas patologias como as CVDs, a disfunção renal, a diabetes, a hipertensão, a artrite gotosa e a acidose metabólica. Estudos recentes[73] sugerem que baixos níveis de urato de sódio no plasma (hipouricemia) são indicadores de desenvolvimento da doença de Parkinson. Pelo contrário níveis elevados de urato retardam a progressão da doença

O urato de sódio é o antioxidante maioritário presente no plasma humano, encontrando-se em concentrações mais elevadas do que o ascorbato. Cerca de 60% dos radicais livres presentes no plasma são eliminados pelo urato de sódio. Este também é importante na eliminação dos radicais livres formados pelo *stress* metabólico, como os radicais NO, peróxido e hidroxilo [74].

Quando presente em concentrações elevadas o urato de sódio presente no plasma humano pode atuar como pró-oxidante [73] portanto, poderá ser designado como um indicador de *stress* oxidativo. Por outro lado, também possui propriedades antioxidantes com efeito protetor contra o envelhecimento, dano oxidativo das células cardíacas, vasculares e neurológicas. No entanto existem estudos que revelam que os compostos antioxidantes podem se tornar compostos pró-oxidantes em determinadas situações, especialmente quando estão presentes no sangue em níveis anormais [73, 75].

Os métodos convencionais para a determinação de UAc são baseados na conversão enzimática do urato a alantoina por ação do urato oxidase seguida de uma medição colorimétrica. No entanto estes métodos apresentam custos elevados e são pouco específicos, sofrem interferências de outros compostos como o ácido ascórbico e da dopamina presentes nos fluidos biológicos. Ao longo desta década, os métodos cromatográficos têm sido utilizados na determinação do UAc e Cr quer na urina quer no plasma [76].

i) Relação entre o Ácido Úrico e as CVDs

Ao longo dos anos têm sido realizados estudos epidemiológicos que correlacionam o UAc com a aterosclerose, a inflamação, a disfunção endotelial, a gota, a diabetes *metillus* e as CVDs.

Os estudos de Gagliardi *et. al* [77], demonstraram claramente uma correlação entre o aumento das concentrações de UAc e o *stress* oxidativo, a inflamação e a aterosclerose, aumentando conseqüentemente a ocorrência de acidentes.

De acordo com Lippi *et. al* [73], os níveis elevados de UAc sérico estão associados à morbidade cardiovascular. Há a possibilidade do UAc presente no plasma ser um fator de risco das CVDs ou então representar apenas um reforço dos fatores de risco típicos.

Segundo Alderman [71], existe uma relação independente entre os níveis séricos de UAc e as CVDs, embora esta relação esteja presente na população em geral e também num subgrupo de alto risco. Há dificuldade em traçar uma relação entre níveis séricos de UAc e as CVDs em todas as populações em geral, podendo refletir o grande número de variáveis que são frequentemente correlacionadas com as CVDs e a hiperuricemia.

É mais apropriado considerar o aumento dos níveis de UAc como um fator de risco das CVDs na população em geral, e entre os pacientes já considerados como “pacientes de risco” CVD.

1.6.3. Malondialdeído

O MDA (Figura 11) é um produto secundário da peroxidação lipídica, derivado da cissão β da cadeia de ácidos gordos poliinsaturados como o ácido linoleico e o araquidônico. O MDA possui uma ação citotóxica e genotóxica, encontrando-se em níveis elevados em algumas patologias associadas ao *stress* oxidativo como o cancro [78], a diabetes *metillus* [79], a aterosclerose [80], a alzheimer [81], entre outros.



Figura 11- Fórmula de estrutura do MDA

Foram propostas diversas hipóteses para a formação do MDA *in vivo*. Nos trabalhos desenvolvidos por Pryor e Stanley [82] que mais tarde foram confirmados por Frankel e Neff [83], os lípidos oxidados são capazes de produzir MDA como produto da sua decomposição.

Outra hipótese proposta por Esterbauer e os seus colaboradores [84] (Figura 12) baseia-se em sucessivas formações de hidroperóxidos e cissões β da cadeia de ácidos gordos poliinsaturados.

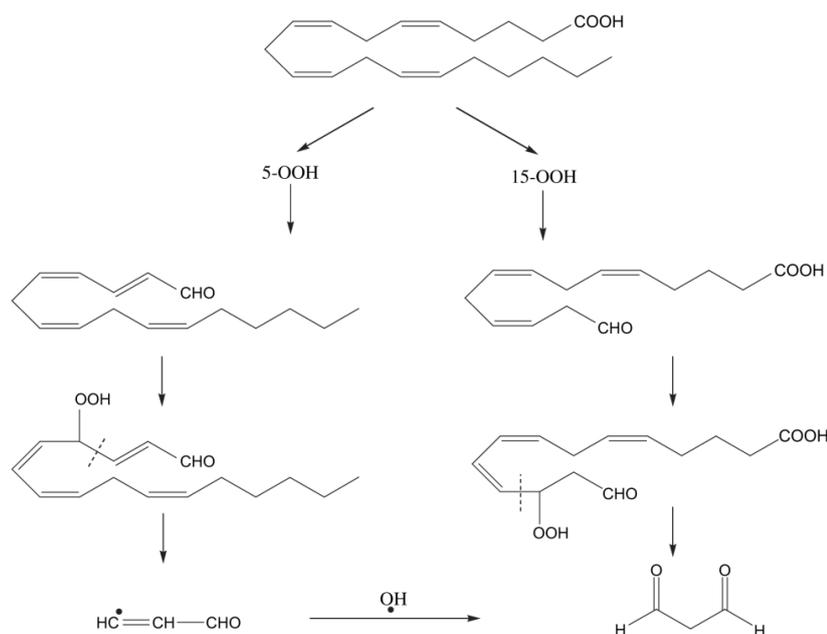


Figura 12- Mecanismos propostos por Esterbauer *et. al* baseado nas sucessivas formações de hidropéroxidos e cisões β da cadeia de ácidos gordo poliinsaturados.

De acordo com a hipótese de Esterbauer *et.al* o MDA resulta da cisão β do 3-hidroperoxialdeído ou através da reação entre a acroleína e os radicais desidrohidroxilo. Além da oxidação dos ácidos gordos polinsaturados a radiação ionizante e a biossíntese das prostoglandinas[85], são outras possíveis fontes de MDA.

O MDA pode ser usado como medida padrão para determinar o grau de oxidação que ocorre nas células do nosso organismo. Em solução aquosa, o MDA pode existir em diversas formas dependentes do pH do meio: em meios ácidos encontram-se maioritariamente como β -hidroxiacroleína em equilíbrio com a forma dicarbonil, enquanto em meios neutros e alcalinos encontra-se na forma de ião enolato, logo pouco reativo [86].O MDA reage rapidamente com os grupos amino das proteínas e das bases de DNA, como a guanina e adenina, formando adutos. Os adutos formados podem levar a erros transcricionais alterando assim a expressão génica. Para a deteção dos adutos formados recorre-se à cromatografia líquida (HPLC) e gasosa (GC) acoplada à espectroscopia de massa [87].

O MDA é considerado um biomarcador eficiente no envolvimento dos danos provocados pelos radicais livres em patologias associadas ao *stress* oxidativo, podendo este ser quantificado em diferentes matrizes como o ar exalado[88], a urina [89] e o soro [78].

Nas amostras biológicas o MDA existe na forma livre e ligado a grupos tiol (-SH) e amino (-NH₂) de macromoléculas, como proteínas e ácidos nucleicos. Apenas uma

pequena quantidade de MDA livre encontra-se presente em amostras biológicas e o seu ensaio é muitas vezes dificultado devido à baixa sensibilidade do método utilizado.

O método mais comum para a quantificação do MDA é através da reação com ácido tiobarbitúrico (TBA), sendo o produto obtido detetado através da leitura espectrofotométrica na região do visível [90]. Este método foi introduzido por Yagi et. *al* [91] e desde então tem sido amplamente utilizado para o estudos *in vivo* e *in vitro* da evolução do *stress* oxidativo [92].

Este método não é específico para deteção dos produtos de peroxidação lipídica (ex: MDA), uma vez que quantifica a soma das diferentes substâncias reativas do TBA, como por exemplo hidratos de carbono, aminoácidos, desoxirribose, pigmentos biliares, ácidos siálicos e outros produtos de decomposição tais como alcanos, alcenos e alcadienos [90, 93].

O uso de reagentes derivatizantes tais como 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) e 9-fluorenilmetoxi-carbonilhidrazina apresentam diversas vantagens na sua quantificação, como por exemplo a melhoria das características de absorvidade molar, o uso de condições experimentais “brandas” e reação rápida com os aldeídos. Por outro lado o DNPH reage com um aldeído específico à temperatura ambiente e em meio ácido, formando a hidrazina. A reação do derivatizante 9-fluorenilmetoxi-carbonilhidrazina, origina um produto detetável por fluorescência [94]. O produto resultante é facilmente separado por HPLC ou GC. No entanto, a contrariar a tendência de derivatização Karatas et. *al* [95] quantificaram o MDA em plasma humano por HPLC sem recorrer ao uso de derivatizantes. Uma vez que a quantificação deste biomarcador é amplamente utilizada como um marcador do dano oxidativo em moléculas lipídicas, é importante o desenvolvimento de metodologias que forneçam resultados com adequada sensibilidade e especificidade.

i) Relação entre o Malonaldeído e as CVDs

Além da peroxidação lipídica alguns metabolismos fisiológicos, que provocam alterações na bicamada lipídica da membrana dos eritrócitos, induzem a formação do MDA. Tendo isto em conta, o MDA não é apenas um biomarcador do *stress* oxidativo mas também um indicador de risco mutagénico.

Um outro aspeto do MDA é a sua nocividade no que se refere ao sistema cardiovascular. Haberland e Palinski e seus colaboradores [96, 97] propuseram a hipótese de que a formação de MDA e a modificação de resíduos de lisina proteica da apolipoproteína B-100 na partícula de LDL ocorre *in vivo* como um pré-requisito para a

formação de células espumosas e contribuindo para o desenvolvimento de aterosclerose. A participação de aldeídos na aterosclerose é também sugerida por uma série de análises imunohistoquímicas de lesões ateroscleróticas a partir da aorta humana utilizando anticorpos “contra” vários adutos de aldeídos. Estes estudos proporcionaram evidências da presença de LDL oxidada em lesões arteriais em concentrações significativas.

Boaz *et. al* [98] estudaram os efeitos da hemodiálise nos níveis séricos de MDA como biomarcador do *stress* oxidativo em pacientes com e sem CVDs. Ao longo do estudo verificaram que os ensaios realizados com MDA, e outros produtos resultantes da peroxidação lipídica, mostram fortes associações entre os fatores de risco cardiovascular e a doença arterial coronária e periférica. Esta associação demonstra que a peroxidação lipídica pode ser um mecanismo através do qual os fatores de risco conhecidos podem promover a doença cardiovascular aterotrombótica (doença coronária, doença arterial periférica e acidente vascular cerebral). Os resultados demonstram ainda que o MDA sérico encontra-se associado às CVDs em pacientes de hemodiálise e que quanto maior o *stress* oxidativo maior o risco de CVDs.

Outros trabalhos realizados por Duryee *et. al* [99] e Viigimaa *et. al* [100] demonstram que a modificação de lipoproteínas tem sido associada com o desenvolvimento e/ou progressão da doença aterosclerótica. No entanto os dados obtidos não são suficientes para comprovar se a presença desta molécula em certos níveis podem prever ou não o risco de doenças vasculares.

1.6.4. 5- Hidroximetiluracilo

De acordo com Baker *et. al* e Chen *et. al* [101, 102], o 5-hidroximetiluracilo (5-HMU), é um metabolito do dano oxidativo do DNA formado por hidroxilação da timina na posição 5 (Figura 13).

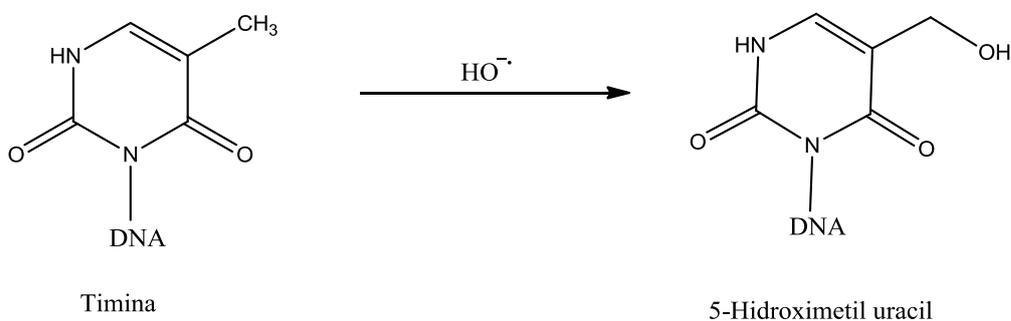


Figura 13- Reação de formação do 5-HMU a partir da hidroxilação da timina.

O 5-HMU, um dos adutos mais abundantes do DNA, tem sido encontrado no DNA após a exposição à radiação ionizante, bem como após a exposição a

$\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}/\text{EDTA}$. A presença deste aduto não provoca erros no código genético, não perturba a forma β da estrutura do DNA, nem constitui uma lesão que bloqueie a polimerase, apenas substitui completamente as timinas no DNA de alguns bacteriófagos [103]. Embora as consequências biológicas do 5-HMU em humanos não estejam completamente estabelecidas, as atividades específicas da glicosilase têm sido reconhecidas por possuir mecanismos de reparação que removem o 5-HMU do DNA, indicando que a sua presença no DNA é prejudicial para a célula [101, 102].

O aumento dos teores de 5-HMU no DNA em tecidos tem sido relacionada com doenças humanas, e por isso mesmo, este tem sido considerado um biomarcador de dano oxidativo ao DNA e de cancro da mama entre outras [104].

Chen *et. al* [104] desenvolveram um método específico para a análise de níveis vestigiais de 5-HMU na urina.

i) Relação entre o 5-hidroximetiluracilo e as CVDs

Após uma extensa pesquisa, não foram encontrados na literatura científica dados que estabeleçam uma relação específica entre o 5-HMU e as CVDs. No entanto, de acordo com Wu o 5-HMU possui diversos efeitos sobre diversas patologias, como a carcinogénese e CVDs [105].

1.6.5. 8-Hidroxi-2-desoxiguanosina

O 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8-OHdG) é formado a partir de um radical hidroxilo e um resíduo de desoxiguanosina (Figura 14) e é um dos produtos mais abundantes da oxidação do DNA [106].

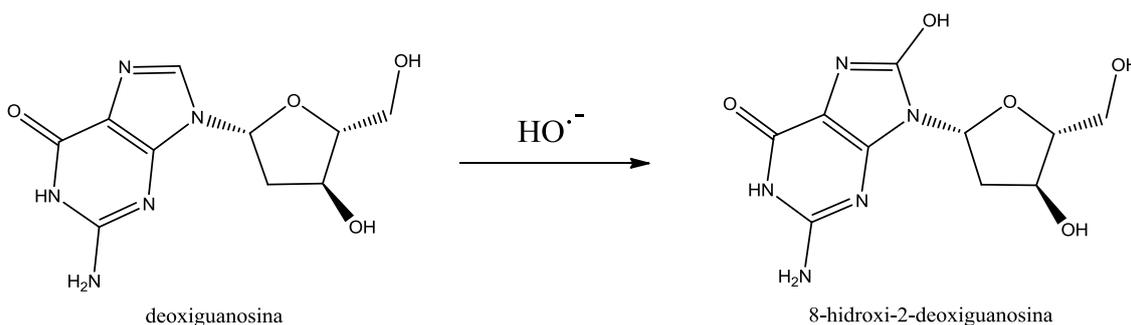


Figura 14- Formação do 8-hidroxi-2-desoxiguanosina a partir da deoxiguanosina.

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 [32, 107]. Este tem vindo a ser utilizado como um biomarcador comum na avaliação do *stress* oxidativo e de muitas patologias (como o cancro, a diabetes e neurológicas). O 8-OHdG foi o primeiro composto a ser identificado como produto do

dano oxidativo de DNA e é considerado responsável pelas mutações no gene *p53* que conduzem à carcinogénese [108].

A quantificação de 8-OHdG em amostras de urina 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 (dG) 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 [106].

É importante salientar que a excreção dos produtos provenientes da reparação de DNA na urina representa uma taxa média dos danos totais no corpo. São necessários mais estudos referentes à dieta, à morte celular e à reparação, de modo a esclarecer a cinética da formação da lesão e a depuração *in vivo* [30, 109]. Assim sendo as concentrações até agora determinadas podem não refletir verdadeiramente as taxas de dano oxidativo ao DNA.

O 8-OHdG urinário também tem sido utilizado para avaliar a eficácia dos suplementos dietéticos no que diz respeito a sua capacidade antioxidante. Por exemplo, da medição da taxa de excreção urinária do 8-OHdG foi utilizada para demonstrar o efeito protetor da suplementação dietética com antioxidantes sobre a prevenção da carcinogénese. Os níveis de 8-OHdG no soro e na urina foram utilizados para estudar o efeito do uso diário de suplementos como a vitamina C. Indivíduos que utilizaram suplementos antioxidantes na sua dieta apresentaram diminuições significativas nos níveis de 8-OHdG [31, 110].

O método mais comum e mais usado para a quantificação do 8-OHdG urinário é através do ensaio imuno enzimático (ELISA) [105, 111, 112], no entanto mais recentemente a cromatografia líquida têm sido aplicada com sucesso na sua determinação [106, 113, 114].

i) Relação entre 8-OHdG e as CVDs

A oxidação do DNA tem diferentes efeitos sobre várias patologias. Como sabemos, o *stress* oxidativo pode provocar diretamente modificações covalentes no DNA e isto acontece devido à ação dos ROS. Em relação às CVDs, os ROS formados pelos macrófagos, quer na aterogénese quer na aterosclerose avançada, promovem a proliferação celular na aterosclerose, a apoptose e a oxidação de LDL. A extensão do dano oxidativo do DNA contribui para o aumento do risco de desenvolver cancro, e várias doenças crónicas degenerativas, incluindo a doença arterial coronária [108].

Martinet et. *al* [115], verificaram a existência de uma forte imunoreactividade referente ao 8-OHdG em todos os tipos de células da placa aterosclerótica incluindo macrófagos, células musculares lisas e células endoteliais. Através do estudo realizado foi também possível observar que havia sobreexpressão de enzimas de reparação do DNA que estão associadas aos níveis elevados do antígeno nuclear de proliferação celular. Os seus estudos sugerem que o dano oxidativo do DNA e a sua reparação aumenta significativamente as placas ateroscleróticas.

1.7. Técnicas de extração para biomarcadores do *stress* oxidativo

O desenvolvimento de métodos bioanalíticos possui diversas finalidades que vai desde a avaliação da farmacocinética e do metabolismo de novas drogas, à monitorização do fármaco, com o objetivo de estabelecer a dosagem apropriada, à determinação de drogas de abuso e dos seus metabolitos com aplicação nas ciências forenses, a identificação de potenciais biomarcadores [116], entre outros.

Devido á natureza complexa das matrizes biológicas, a etapa de preparação da amostra é uma etapa extremamente importante do método bioanalíticos, influenciando todos os outros passos e mais tarde, a identificação, a confirmação e a quantificação dos analitos. Um dos principais problemas na análise de amostras biológicas está relacionado com a sua estabilidade dos analitos neste tipo de amostras. Esta pode ser afetada pela temperatura de armazenamento, enzimas, pelo pH da matriz, anticoagulantes e ciclos de congelamento-descongelamento. Além disso, a instabilidade pode ocorrer durante qualquer uma das diferentes etapas, tanto na matriz biológica, na alíquotagem das amostras para a análise, no passo de extração, durante a evaporação até à secagem ou na reconstituição do extratoe, no caso de espectrometria de massa, na fonte de iões [117].

Normalmente a preparação das amostras requiere tipicamente 80% do tempo de análise total, recorrendo a técnicas de extração, como a extração líquido-líquido (LLE) e a extração em fase sólida (SPE) contrariamente às análises cromatográficas ultra rápidas, as abordagens convencionais de preparação de amostra ainda exigem um trabalho intensivo e moroso, repartido por várias etapas [116]. De acordo com Nováková [118], os métodos de preparação de amostras podem ser divididas em três grandes grupos: (i) a LLE, (ii) a SPE baseada em abordagens e (iii) a SPE baseadas em abordagens seletivas. Em relação ao primeiro grupo, a técnica mais comum é a extração LLE que continua a ser amplamente utilizada para a análise de amostras biológicas. Dentro deste grupo existe ainda a microextração líquido-líquido (LLME), que é de certa forma a miniaturização da LLE

(utilizando menos solvente extrator) sendo comumente utilizada na preparação da amostra de fluidos biológicos. Outra técnica é a extração por líquido pressurizado (PLE), que consiste numa extração rápida de matrizes sólidas e é realizada utilizando solventes orgânicos mediante a aplicação de temperaturas elevadas (até 200 °C), bem como a aplicação de pressões elevadas (até 20.000 kPa) de modo a manter o solvente no estado líquido. Por fim, a precipitação de proteínas (PP), é uma técnica utilizada tradicionalmente no tratamento de plasma, utilizando solventes orgânicos miscíveis (metanol, acetonitrilo)[118]. A PP é considerada uma abordagem de extração mais rápida e mais simples aplicável para os compostos hidrofílicos e hidrofóbicos.

Relativamente ao grupo das extrações em fase sólida baseada em abordagens, a mais conhecida é a extração em fase sólida (SPE) sendo atualmente a técnica mais comum para extração/purificação tratamento de amostras. A microextração por sorvente empacotado (MEPS) é a versão mais recente, desenvolvida na área de preparação de amostras. É uma miniaturização do SPE e, como tal, os volumes de solventes e de amostra usados são substancialmente menores. Uma outra técnica é a microextração de fase sólida (SPME), que utiliza uma fibra SPME e uma seringa modificada com um microtubo de aço inoxidável dentro da agulha. No qual se encontra uma ponta de fibra de sílica fundida que é revestida com um polímero orgânico. Esta técnica não necessita da aplicação de solventes orgânicos para a extração o que se traduz numa mais-valia. Normalmente esta técnica encontra-se associada à extração de compostos voláteis que são analisados por cromatografia gasosa (GC), no entanto já houve a tentativa de análise em cromatografia líquida (HPLC) [119].

A extração sorptiva em barra de agitação (SBSE) é uma técnica baseada nos mesmos princípios que a SPME. A fase extratora mais amplamente utilizada é PDMS. A extração do analito a partir da fase aquosa para um meio de extração é controlada pelo coeficiente de partição do analito entre a fase estacionária e da fase aquosa [120]. Outra técnica utilizada é a das materiais de acesso restritos (RAM) que, são constituídas por suportes de preparação de amostras biocompatíveis que permitem a injeção direta de fluidos biológicos num sistema cromatográfico. Os sorventes RAM representam uma classe especial de materiais que são capazes de fracionar uma amostra biológica numa matriz de proteínas e numa fração do analito, com base no *cut-off* do peso molecular. Finalmente, a extração em fase sólida baseada em abordagens seletivas utiliza como recurso polímeros molecularmente impressos (MIPs). São polímeros sintéticos com capacidade de reconhecimento altamente específico para moléculas-alvo. São materiais seletivos utilizados

para extração em fase sólida que, não só concentram, mas também isolam seletivamente os analitos-alvo a partir de amostras. O principal benefício do MIPs é a possibilidade de preparar adsorventes seletivos pré-determinados para uma determinada substância ou para um grupo de moléculas estruturalmente análogas. Uma outra técnica, mas não muito utilizada são os aptâmeros. São oligonucleótidos (DNA ou RNA) que se ligam com elevada afinidade e especificidade para uma vasta gama de moléculas alvo, tais como drogas, proteínas e outras moléculas orgânicas ou inorgânicas [118].

1.7.1. Microextração por sorvente empacotado em seringa (MEPS)

A extração de analitos em matrizes complexas como amostras biológicas, urina e plasma é muitas vezes um impasse para novas descobertas.

Os procedimentos descritos anteriormente são morosos e necessitam de volumes relativamente elevados de amostra/solvente que é impraticável para as análises de rotina de muitas amostras [118, 121].

A MEPS corresponde a miniaturização da SPE, e é uma extensão lógica de SPE para o tratamento de fluidos biológicos, pois os volumes utilizados são menores (10 µL – 1000 µL) reduzindo assim também o volume de amostragem necessário. Ao contrário das colunas SPE convencionais, a “camada” do adsorvente da MEPS está integrado numa seringa de manuseamento de líquidos que permite manipular baixos volumes de amostra, quem manualmente quer através de uma seringa semiautomática eVol® [122].

Os adsorventes disponíveis para a MEPS são os mesmos que na SPE. Além disso, a seringa empacotada pode ser utilizada múltiplas vezes, com plasma ou amostras de urina, enquanto no caso SPE o adsorvente é utilizado apenas uma vez quer na análise de padrões puros quer na análise amostras. A MEPS tem possibilidade de operar *online* por combinação com GC ou HPLC [121]. O desempenho da MEPS foi recentemente demonstrado por LC-MS e GC-MS utilizando ensaios de drogas e metabolitos na urina, no plasma, e em amostras de sangue [116, 123].

Quando a amostra passa pelo adsorvente, os analitos são adsorvidos à fase sólida empacotada num suporte de inserção da seringa (BIN). A aplicação das amostras tem lugar sobre a camada empacotada [121].

A abordagem da MEPS para a preparação das amostras é adequada para as fases normais, as fases reversas, de modo misto e de troca iónica. Os adsorventes mais comuns são baseados em sílica, (C2, C8, C18), adsorvente de troca catiónica (SCX), utilizando ácido sulfónico ligado a sílica, RAM, poliestireno-divinilbenzeno (PS-DVB) e MIPs [124].

Na tabela 5 encontra-se descrito o tipo de adsorvente, a natureza da interação, estabilidade do revestimento e o mecanismo de retenção associado a cada uma das resinas.

Os adsorventes C2-C8 são mais adequados a analitos lipofílicos (não polares) enquanto adsorventes como M1 (C8-SCX) são indicados para analitos polares [124].

Tabela 5- Características físico-químicas dos adsorventes da MEPS

Resinas	Tipo	Interações	Hidrofobicidade	Estabilidade do revestimento	Mecanismo de retenção
Octadecilo (C ₁₈)	Polímero	Apolar	Analitos lipofílicos (não polares)	Parcialmente reticulada	Adsorção e partição
Octilo (C ₈)	Polímero	Apolar			
Etilo (C ₂)	Polímero	Apolar			
M ₁ (C ₈ -SCX)	Polímero	Bipolar	Analitos polares		
Sílica (SIL)	Partícula porosa	Polar			

(adaptada de Mendes et. *al* [124])

A Figura 15 exemplifica as diferentes etapas do processo de extração por MEPS com uma seringa semiautomática (eVol). Inicialmente o adsorvente é condicionado, normalmente com um solvente orgânico (metanol) e água (geralmente acidificada), seguida do *load* da amostra semiautomático (eVol) (20-500µL) por um amostrador automático que bombeia a amostra o número de vezes pretendido. Quando a amostra passa através do adsorvente, os analitos são retidos. As substâncias interferentes (ex: açúcares) são removidas do adsorvente por lavagem com água geralmente acidificada (ex: 1x 50 µL), sendo os analitos posteriormente eluídos com um solvente orgânico ou mistura de solventes adequado como metanol ou fase móvel de entrada (20-50 µL), sendo o eluato injetado no equipamento adequado [121].

A técnica MEPS tem sido utilizada para extrair uma ampla gama de analitos em diferentes matrizes biológicas (urina, plasma), como por exemplo drogas anti-epilépticas, pravastatina, anestésicos locais e seus metabólitos, drogas anticancerígenas, dopamina, serotonina [121, 123]. Recentemente drogas psicotrópicas como a metadona, cocaína e metabólitos de cocaína foram extraídos de diferentes amostras biológicas (sangue, plasma e urina) utilizando a técnica MEPS [121, 123]

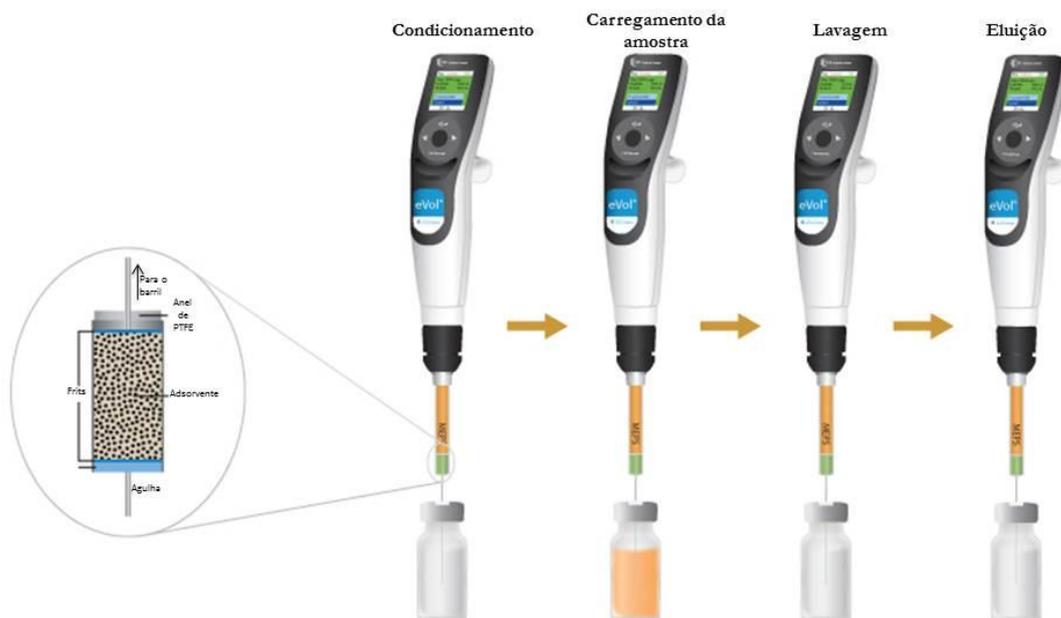


Figura 15- Diferentes etapas da extração por eVol MEPS

1.8. Cromatografia Líquida

Nos dias de hoje, um dos principais objetivos dos laboratórios consiste em desenvolver procedimentos confiáveis, rápidos e eficientes para a realização de análises qualitativas e quantitativas. A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) continua a ser um método de escolha, uma vez que é capaz de separar misturas complexas e compostos de baixo e alto peso molecular, com diferentes polaridades e propriedades ácido-base em diversas matrizes. Infelizmente, os métodos convencionais de HPLC são morosos e muitas vezes é difícil obter uma boa resolução, tornando-se importante o uso de equipamentos e metodologias que permitam aliar a rapidez da análise ao elevado poder de resolução e de sensibilidade. Na figura 16 encontra-se ilustrado um diagrama representativo dos diferentes constituintes da cromatografia líquida.

A cromatografia líquida de ultra-eficiência (UHPLC) é um “upgrade” recente das técnicas de separação. Embora os seus princípios básicos sejam os mesmos do HPLC (Figura 16), apresenta 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 μm) e a aplicação de pressões elevadas (>15000 psi) [122].

A WatersTM 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. Este sistema permite trabalhar com maior eficiência, numa gama muito maior de

velocidades lineares, taxas de fluxo, e *backpressures* [118, 122]. Ao nível das colunas cromatográficas foram simultaneamente desenvolvidas novas fases estacionárias híbridas (ex: BEH C18), que apresentam uma maior resistência às condições de pressão aplicadas e uma separação cromatográfica superior às partículas de sílica pura [125]. Uma vantagem do uso 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 [118].

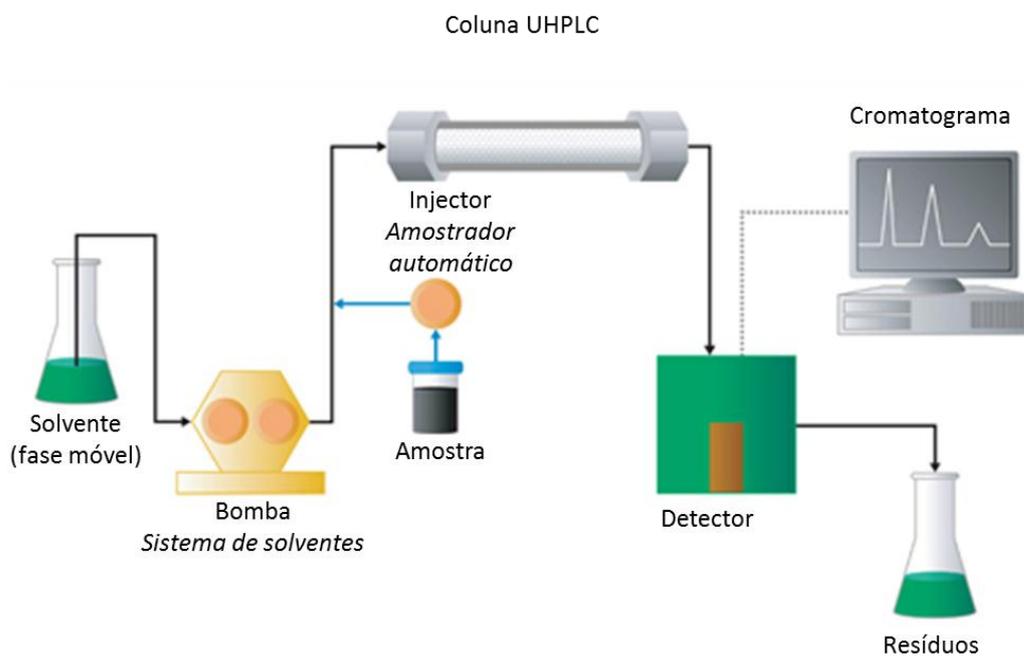


Figura 16-Diagrama representativo dos diferentes constituintes da cromatografia líquida

Capítulo II- Parte experimental

2. Seção Experimental

Ao longo deste capítulo iremos descrever toda informação referente à parte experimental realizada ao longo desta atividade experimental.

Este trabalho experimental foi desenvolvido com o objetivo de identificar e quantificar de diversos biomarcadores do *stress* oxidativo, nomeadamente o 5-HMU, o UAc, o MDA, o 8-OHdG e o 4-HNE em amostras biológicas (urina e plasma), de forma a avaliar se os mesmos podem ser usados como potenciais biomarcadores de CVDs. Para tal, recorreu-se à técnica MEPS, para extrair os compostos da matriz, combinada com a cromatografia líquida de ultra eficiência (em modo fase reversa) acoplada a um sistema de fotodiodos (UHPLC-PDA) para a separação, identificação e quantificação dos compostos alvos.

2.1. Material e reagentes

No decorrer deste trabalho experimental todos os produtos químicos foram de grau analítico com um grau de pureza superior a 95% e foram utilizados sem purificação adicional. O ácido fórmico (CH_2O_2) e o hidróxido de sódio (NaOH) foram adquiridos à Panreac Química, (Barcelona, Espanha). O ácido sulfúrico (H_2SO_4) (97%) e o ácido perclórico (HClO_4) (70%) da Riedel-deHaën, (München, Alemanha). O metanol (MetOH) grau HPLC (99.9%) da Fisher Scientific (Lisboa, Portugal), e o dimetilsulfóxido (DMSO) foi adquirido à Lab-Scan Analyticalsciences (Dublin, Irlanda) e a 2,4- dinitrofenilhidrazina (DNPH) (99%) à Sigma – Aldrich (Madrid, Espanha). Os biomarcadores utilizados foram a creatinina anidra (Creat) (como fator normalizante), 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) (precursor do MDA), 5-hidroximetiluracilo (5-HMU) e 8-hidroxi-2-deoxiguanosina (8-OHdG) adquiridos à Sigma – Aldrich, (Madrid, Espanha), o ácido úrico (UAc) grau HPLC à Fluka, (Madrid, Espanha) e o 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) à Cayman Chemical Company (Tallin, Estónia), a cimitidina (padrão interno (IS)), foi adquirido à Sigma – Aldrich (Madrid, Espanha). O grau de pureza dos biomarcadores e do padrão interno é superior a 95%. A água ultra pura (18 M Ω cm, 23°C) foi obtida através do sistema de purificação de água Milli – Q (Millipore Corporation (Bedford, MA, EUA)). Todas as soluções foram filtradas através de filtros de membrana PTFE 0.22 μm (Millipore, Milford, MA, EUA). A seringa semiautomática eVol[®] e o adsorvente, suporte de inserção e agulha (BIN) utilizados na microextração por sorvente empacotado em seringa (MEPS) foi adquirido à SGE AnalyticalScience (Melbourne, VIC, Austrália). A coluna analítica WatersAcquity UPLC HSS T3 (100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μm tamanho da partícula) foi

adquirida à Waters (Milford, MA, EUA). O medidor de pH foi adquirido à HANNA instruments (pH209) (Woonsocket, EUA), e a centrífuga refrigerada Sigma 3K30 Bioblock Scientific à Sigma – Aldrich (Madrid, Espanha).

2.2. Preparação das soluções padrão

Foram preparadas individualmente soluções *stock* de Creat, 5-HMU e cimitidina em água ultrapura na concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, como descrito por Zuo *et. al* [76]. O UAC foi preparado em solução aquosa de NaOH 0,1 M (pH a 10,35). A solução *stock* de MDA foi preparada de acordo com Sim [126] através da hidrólise ácida de 25 μL de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) em 100 mL de ácido sulfúrico 1 % (v/v) durante 2h à temperatura ambiente, na ausência de luz, sendo posteriormente armazenada em alíquotas de 8 mL a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. A solução *stock* de 8-OHdG ($400 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi preparada em DMSO. Em relação ao 4-HNE foi adquirida em solução com a concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ em etanol. As soluções foram armazenadas em *vials* escuros de 4 mL, a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, permanecendo estáveis durante cerca de 4 meses (ensaios realizados em UHPLC).

As soluções de calibração contendo os biomarcadores alvo foram preparadas em urina sintética (SU) a partir de sucessivas diluições das soluções *stock*.

As gamas de concentrações usadas foram selecionadas de acordo com a sensibilidade do UHPLC-PDA para cada biomarcador (as características físico-químicas de cada composto afetam o sinal analítico, pelo que houve necessidade de preparar soluções mais concentradas para alguns compostos a fim de ser possível a sua deteção). A cimitidina foi utilizada como padrão interno (IS). Todas as soluções foram analisadas em triplicado ($n = 3$).

2.3. Amostragem

Neste estudo foram utilizadas amostras de urina de indivíduos normais dadores de sangue do Hospital Dr. Nélio Mendonça (grupo de controlo (Cont)), colhidas no banco de sangue do Hospital referido e amostras de urina de indivíduos com problemas cardiovasculares (grupo CVD) colhidas no laboratório de patologia clínica do mesmo Hospital num total de 12 e 10 amostras, respetivamente, e distribuídas de acordo com o descrito na tabela 6. As amostras foram colhidas em recipientes de plástico apropriado e armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até análise.

Tabela 6- Resumo da amostragem por grupo (CONT e CVD) por género e por idade.

		CONT	CVD
Idade	21-40	3	1
	41-60	6	5
	61-80	3	4
Género	Masculino	5	7
	Feminino	7	3

Todos os indivíduos participantes do estudo foram selecionados de forma casual e voluntária. Consentiram a sua participação após informação sobre o estudo a desenvolver.

As amostras de sangue foram recolhidas pelo gabinete de enfermagem da Universidade da Madeira com consentimento informado de um voluntário.

2.4. Procedimento para a quantificação de MDA e 4-HNE

As amostras de sangue humano foram colhidas em tubos de 3mL revestidos com anticoagulante EDTA sendo imediatamente centrifugadas (4°C, 14500 g, 10 min) promovendo a separação do plasma e armazenadas em alíquotas de 1mL a -80 °C. Para a quantificação do MDA testaram-se dois procedimentos:

i. Com derivatização

Utilizou-se uma alíquota de 100 µL de plasma humano, na qual foi hidrolisada com 200 µL de NaOH (1,5M) de modo a obter quer o MDA e o 4-HNE livre das proteínas plasmáticas. Incubou-se a mistura durante 30 min a 60°C. Após o período de incubação adicionou-se cerca de 200 µL HClO₄ (10%) seguida de agitação no vortex (1min). Centrifugou-se a mistura durante 10 min, a 4°C e 14 500g, transferindo cerca de 250 µL de sobrenadante para um eppendorf, onde adicionou-se 25 µL de derivatizante (DNPH). A reação ocorreu ao abrigo da luz durante 30 min, filtraram-se as amostras em filtros de membrana 0,22 µm e analisou-se no sistema cromatográfico (UHPLC-PDA). Este procedimento foi realizado de acordo com Antunes *et. al* [94].

ii. Sem derivatização

A 100 µL de plasma humano adicionaram-se 200 µL de HClO₄ (10%) com objetivo de precipitar as proteínas e perfez-se o volume com água ultra pura até 1 mL. Logo de seguida centrifugaram-se as amostras durante 10 min, a 4 °C e 14500 g, recolheram-se os sobrenadantes, filtraram-se as amostras em filtros de membrana 0,22 µm e analisou-se no sistema cromatográfico (UHPLC-PDA). O procedimento aplicado nesta etapa foi realizado de acordo com Karatas *et. al* [95].

2.5. Preparação das amostras de urina

As amostras de urina e de SU (preparada de acordo com Uppuluri *et. al* [127] Anexo I), foram diluídas 1:10 com água ultra pura, seguida de um ajuste do pH=6 com NaOH (0,1M), sendo posteriormente filtradas em filtros de membrana PTFE 0,22 µm. Às amostras foi adicionado a cimitidina a 10 µg mL⁻¹ como padrão interno (IS)

2.6. Otimização do procedimento extrativo dos biomarcadores do stress oxidativo na urina por eVol[®]MEPS

A extração dos biomarcadores foi realizada através de uma seringa semiautomática eVol[®], consistindo numa seringa de 500 µL equipada com uma agulha removível. A seringa encontra-se incorporada num suporte sólido contendo BIN com 4 mg de adsorvente através da qual se fazem passar as soluções e as amostras.

Existem diversos fatores que influenciam a eficiência extração por MEPS, nomeadamente o tipo de adsorvente, o pH, o volume da amostra, o número de ciclos de extração, a lavagem e o volume de eluição que devem ser otimizadas de modo a maximizar a eficácia do processo extrativo[116]. Sendo assim foram avaliados os diferentes adsorventes C2 (etilo-sílica), C8 (octil-sílica), C18 (octadecilo-sílica), SIL (sílica não modificada) e M1 (adsorvente misto contendo 80 % de C8 e 20 % de adsorvente de troca catiónica forte (SCX)), de modo a selecionar o melhor adsorvente para a extração simultânea dos diferentes biomarcadores. A influência do pH foi avaliada através da extração dos biomarcadores de uma SU fortificada e ajustada três diferentes gamas de pH, nomeadamente 2, 6, 8. O número de ciclos de extração (extrair e descartar) e volume de amostra, foram otimizados testando um, cinco e dez ciclos em alíquotas de 50 µL, 100 µL, 250 µL e 500 µL de SU fortificada. Em relação a lavagem, testaram-se dois volumes (50 µL, 100 µL) de 0,01% ácido fórmico de modo remover os interferentes. Diferentes volumes de eluição (30 e 50 µL) também foram testados através da passagem de uma, duas, três e quatro vezes esses volumes. A velocidade durante a aspiração/carregamento foi limitada a 20 µL s⁻¹ de forma a prevenir a cavitação. Por sua vez também irá aumentar o tempo de interação do analito com o adsorvente e a eficiência de extração. Todos os procedimentos otimizados foram realizados em triplicado ($n = 3$) usando SU fortificada com cada biomarcador alvo. Antes de cada utilização, foi necessário condicionar o adsorvente com 100 µL de metanol seguido de uma solução aquosa de ácido fórmico 0,01%. Esta etapa ativa o adsorvente e garante a reprodutibilidade na retenção dos analitos entre extrações[116]. Após a otimização dos parâmetros experimentais, os melhores resultados foram obtidos com 250 µL(5x50 µL) de amostra cujo pH ajustado a 6, a qual se fez passar

cinco vezes pelo adsorvente C8 a velocidade de $20 \mu\text{L s}^{-1}$. Juntou-se a alíquota resultante da lavagem juntamente com a eluição que foi efetuada em triplicado com $30 \mu\text{L}$ de solução metanólica a 20 % acidificada com 0,01 % ácido fórmico.

2.7. Validação do método analítico

O método eVol[®]MEPS/UHPLC-PDA, foi validado em termos da seletividade, linearidade, dos limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ), da precisão inter- e intra-dia, da exatidão e do efeito de matriz.

A seletividade foi avaliada pela ausência de interferentes no tempo de retenção dos compostos alvos em amostras de SU a pH 6.

A linearidade foi avaliada através da determinação do coeficiente de correlação. Foram realizadas três curvas de calibração para cada um dos biomarcadores, com sete níveis de concentração diferentes preparados em SU. Cada nível de concentração foi preparado em triplicado e injetado três vezes, perfazendo um total de nove réplicas ($n = 9$). A curva de calibração foi construída através da representação gráfica da área média relativa (A_C/A_{IS}) obtida para o pico cromatográfico do analito (y) e a correspondente concentração do analito em solução (x), onde A_C corresponde a área do analito e A_{IS} a área obtida pelo padrão interno.

A sensibilidade do método foi avaliada através determinação do LOD (a menor concentração do analito que produz uma resposta detetável acima do nível de ruído de fundo do sistema) e do LOQ (o menor concentração de analito que pode ser medido com precisão e exatidão) para cada composto. O LOD e o LOQ foram calculados com dados obtidos nos estudos da linearidade, através das seguintes expressões sendo o LOD $a + 3S_{a/b}$ e o LOQ como $a + 10S_{a/b}$, onde “ a ” representa a ordenada na origem, “ S_a ” o desvio padrão da ordenada na origem e “ b ” o declive [128]. Estes parâmetros foram determinados para cada um dos analitos a partir das soluções padrão utilizadas para obter as curvas de calibração correspondentes, utilizando o método desenvolvido no UHPLC-PDA.

A precisão, expressa pela percentagem do desvio padrão relativo (RSD) foi avaliada através da injeção extratos de MEPS de três níveis de concentração diferentes correspondendo ao nível baixo (LL), médio (ML) e alto (HL) da curva de calibração (concentrações definidas na tabela 7 da seção 3). Foram analisadas seis réplicas ($n = 6$) no mesmo dia para obter a repetibilidade (precisão intra-dia), e para a reprodutibilidade (precisão inter-dias), analisaram-se seis réplicas de cada nível durante três dias não consecutivos ($n = 18$).

A exatidão do método, foi avaliada pela determinação da percentagem de recuperação para os diferentes biomarcadores. Foi realizada fortificando a SU a três níveis de concentrações diferentes (em triplicado) correspondendo a LL, ML, HL e submetida a extração por eVol[®]MEPS como descrito anteriormente. Os valores referentes a percentagem de recuperação foram calculados de acordo com a seguinte fórmula: percentagem de recuperação = $100 \times ([\text{biomarcador}]_{\text{SUfortificado}} - [\text{biomarcador}]_{\text{SU}}) / [\text{biomarcador}]_{\text{adicionado}}$; onde $[\text{biomarcador}]_{\text{SUfortificado}}$ é a concentração do analito na SU fortificada; $[\text{biomarcador}]_{\text{SU}}$ é a concentração do analito determinada numa urina não fortificada, e $[\text{biomarcador}]_{\text{adicionado}}$ é a concentração do analito conhecida, que foi previamente adicionada à urina.

O efeito de matriz também foi avaliado, através da percentagem obtida entre o quociente dos declives obtidos da reta de calibração para os biomarcadores em matriz branca (SU) e os obtidos para a urina fortificada (método de adição de padrão).

2.8. Condições cromatográficas

As análises dos biomarcadores do *stress* oxidativo foram efetuadas num cromatógrafo líquido de ultra eficiência, UHPLC Acquity system da Waters (Milford, MA, EUA) equipado com um sistema de bombas quaternário (QSM), um amostrador automático (SM), forno de coluna, desgaseificador e um detetor de fotodiodos (PDA 2996). Toda a configuração foi conduzida pelo *software* Empower[®] v2.0 (Waters corporation). A separação processou-se numa coluna analítica C18 com revestimento de sílica (HSS T3Acquity UPLC[™] 100 mm × 2,1 mm; 1,8 μm de diâmetro da partícula) (Waters, Milford, MA, EUA) protegida com uma pré-coluna Acquity UPLC[™] HSS T3 Van Guard[™], (Milford, MA, EUA). A temperatura da coluna foi programada para 30 °C e as amostras encontravam-se a 25 °C no amostrador automático. Foram injetados alíquotas de 2 μL de amostra usando-se uma fase móvel binária constituída por 20 % de metanol com 0,01% de ácido fórmico, com um fluxo constante de 250 μL min⁻¹, durante 3,50 min, atingindo a pressão máxima de 6000 psi.

Todos os solventes do sistema de eluentes foram previamente filtrados através de um sistema de filtração com filtro de membrana PTFE 0,22 μm. A deteção procedeu-se através de quatro canais distintos (215, 246, 285, 295 nm) correspondendo ao comprimento de onda máximo de cada biomarcador. A identificação dos biomarcadores realizou-se por comparação do tempo de retenção dos biomarcadores obtidos em solução padrão nas mesmas condições instrumentais e por comparação com espectro UV dos padrões puros.

2.9. Análise estatística

Os métodos estatísticos utilizados no tratamento dos resultados obtidos ao longo do trabalho, tal como a análise de variância (ANOVA) e análise por componentes principais foram efetuados com software SPSS (*Statistical Package for the Social Science*) versão 19.0; 2011. As figuras e tabelas foram realizadas utilizando Microsoft Office 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, EUA).

Capítulo III- Resultados e discussão

3. Resultados e discussão

Nesta seção proceder-se-á à apresentação, interpretação e discussão dos resultados experimentais obtidos ao longo do desenvolvimento deste trabalho, nomeadamente os referentes à otimização e validação da metodologia utilizada para a quantificação dos biomarcadores do *stress* oxidativo na urina, em indivíduos do grupo de controlo e grupo CVDs, tentando sempre relacioná-los com resultados de trabalhos já publicados. Nesta seção também iremos abordar os testes realizados com o plasma.

Ao longo das últimas décadas o interesse científico e clínico nos potenciais biomarcadores do *stress* oxidativo tem vindo a aumentar significativamente. Múltiplos biomarcadores do *stress* oxidativo têm sido sugeridos, mas à sua quantificação depara-se com diversas dificuldades analíticas, principalmente em amostras biológicas complexas como a urina e o plasma. Por este motivo é importante desenvolver métodos analíticos que nos permitam quantificar simultaneamente e com elevado grau de confiança os compostos alvo.

3.1. Determinação de MDA e 4-HNE no plasma

Para o plasma apenas foram feitos testes com o MDA e 4-HNE, visto serem os únicos disponíveis no laboratório na altura em que foi desenvolvido o trabalho com plasma.

Relativamente ao MDA, a sua síntese foi efetuada por hidrólise ácida do TEP. Para a sua quantificação é usual recorrer ao uso de derivatizantes, como o DNPH e o TBA. No entanto, apesar do produto do TBA ser detetado através da leitura espectrofotométrica na região do visível, este não é específico para a deteção dos produtos da peroxidação lipídica uma vez que quantifica a soma das diferentes espécies reativas do TBA, denominadas de TBARS. Desta forma, inclui interferentes provenientes de reações com hidratos de carbono e proteínas não possuindo muita sensibilidade. Além disso, as condições experimentais, são “agressivas” (meio fortemente ácido e temperaturas elevadas) [94]. Neste trabalho, optou-se primeiro por utilizar o DNPH como agente derivatizante (de acordo com o procedimento de Antunes *et. al* [94]) visto que as condições experimentais são mais brandas, e a reação é mais rápida o que minimiza a formação de artefactos indesejados. Este processo não foi bem sucedido visto que não foi possível verificar a formação do complexo MDA-DNPH na amostra de plasma. Pensa-se que o DNPH terá reagido com alguns dos interferentes no plasma absorvendo a um comprimento de onda diferente do obtido pela reação realizada com o padrão.

. Como não foi possível quantificar o MDA pelo recurso à reação de derivatização. Após várias tentativas, não foi possível quantificar o MDA livre aplicando a metodologia descrita por Karatas *et. al* [95], devido à baixa resolução observada.

Em relação ao 4-HNE, também não foi possível obter um cromatograma com uma boa resolução, optando-se assim por não quantificar os biomarcadores do *stress* oxidativo no plasma.

3.2. Otimização das condições cromatográficas para a determinação dos biomarcadores do *stress* oxidativo na Urina

No desenvolvimento de um método analítico a escolha da fase estacionária desempenha um papel importante na seletividade, e eficácia do método. No laboratório encontravam-se disponíveis duas colunas, uma cuja fase estacionária revestida com partículas de sílica híbrida com pontes de etileno (BEH) de tamanho 1,7 μm , com fase estacionária C18, diâmetro de 2,1 mm e 50 mm de comprimento e com uma ampla gama de pH (1 – 12) [125], e outra coluna a ACQUITY UPLC HSS T3, constituída por partículas de sílica de alta resistência (HSS) cujo tamanho de partícula é de 1,8 μm , com mesmo diâmetro (2,1 mm), e 10 mm de comprimento. Esta apresenta uma fase ligada de alquilo trifuncional (T3) inovadora, que promove a separação de compostos orgânicos polares via fase reversa e é compatível com fases móveis aquosas [129]. A fase estacionária que obteve melhores resultados foi a ACQUITY UPLC HSS T3, permitindo separar os analitos de interesse com uma melhor resolução, como tal, constituí uma boa alternativa às tradicionais colunas de fase reversa C18.

Um dos parâmetros importantes para controlar a retenção do analito e obter uma resolução adequada é a seleção da fase móvel. Ao longo deste trabalho, testaram-se duas fases móveis, uma de acordo com Antunes *et. al* [94] (0,2 % ácido acético: 38 % de acetonitrilo), quer em modo isocrático quer em modo gradiente, e outra de acordo com Gonçalves *et. al* [122] (0,1 % ácido fórmico e 20 % metanol). A separação processou-se utilizando uma fase móvel composta por 0,01 % de ácido fórmico e 20 % de metanol em modo isocrático, sendo simples, fácil de preparar e proporcionou resultados reprodutíveis (condições adaptadas de Gonçalves *et. al* [122]). O fluxo da fase móvel influenciou os tempos de retenção dos biomarcadores com os fluxos mais baixos (200 $\mu\text{L min}^{-1}$) fornecem maiores tempos de retenção. Os melhores resultados foram obtidos com um fluxo de 250 $\mu\text{L min}^{-1}$ com níveis de pressões aceitáveis (aproximadamente 6000 psi), com estas condições pôde-se obter uma corrida cerca de 3,5 min. A temperatura da coluna foi de 30 °C, e o volume de injeção de 2 μL . Algumas variáveis físico-químicas (fluxo, temperatura da

coluna e do amostrador automático e volume de injeção) foram otimizadas para reduzir o tempo de análise, mantendo uma boa resolução entre os picos dos biomarcadores e outros compostos presentes nas amostras. Os cromatogramas obtidos apresentaram uma boa resolução com picos simétricos e uma linha de base estável (Figura 17).

Para a seleção do comprimento de onda de absorção, analisou-se uma solução padrão com os biomarcadores, utilizando o PDA, onde se obteve um espectro de absorção através do varrimento entre 200 a 400 nm. Os comprimentos de onda máximo e com os quais se processou a aquisição e quantificação dos biomarcadores foram 215, 246, 285, 295 nm, para a Cr, 5-HMU, IS, MDA, UAc, 8-OHdG, respetivamente.

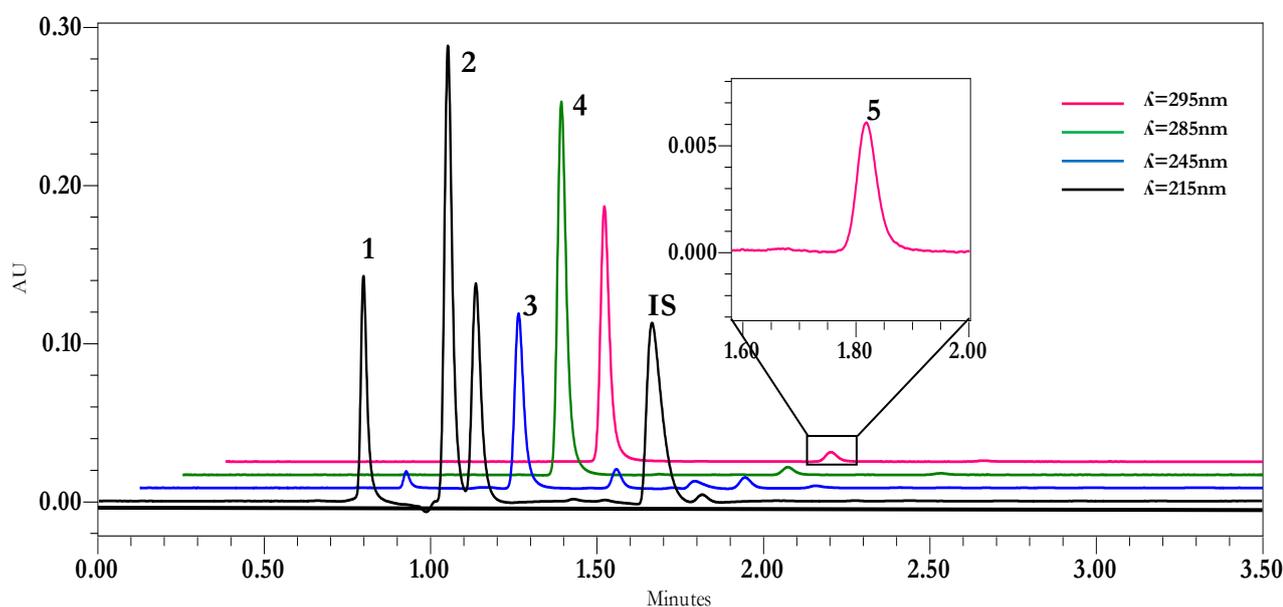


Figura 17-Cromatograma representativo dos padrões a diferentes comprimentos de onda. (1-Creat; 2-5HMU; 3-MDA; 4-UAc; 5- 8-OHdG; IS- cimitidina)

O método UHPLC desenvolvido para quantificação dos biomarcadores do *stress* oxidativo, foi capaz de fornecer uma análise rápida e com boa resolução, podendo atingir pressões altas (15 000 psi) quando comparado com métodos HPLC [130] [118] convencionais. Além disso, o processo extrativo não exige etapas morosas, é económico, apresenta um baixo consumo de solventes e de amostras.

Após a otimização das condições cromatográficas, procedeu-se ao processo de otimização do procedimento extrativo e à validação da metodologia analítica, eVol[®]MEPS/UHPLC-PDA.

3.3. Otimização da metodologia MEPS por recurso à eVol

Como técnica recente que é, ainda não existem trabalhos realizados para a quantificação de biomarcadores do *stress* oxidativo por utilização da MEPS.

Para a otimização da extração por MEPS dos biomarcadores do *stress* oxidativo presentes nas amostras de urina, diversos parâmetros como a seleção da resina, o pH da amostra, o volume da amostra, as condições de lavagem e de eluição, foram cuidadosamente avaliados e otimizados de modo a maximizar a eficiência extrativa.

3.3.1. Seleção do adsorvente

A seleção do adsorvente é um passo muito importante para obtermos uma boa eficiência de extração e um extrato isento de interferentes. Foram avaliados os adsorventes C2, C8, C18 e, SIL e a M1 (C8/SCX) sendo a eficiência de extração determinada pela área total e pela repetibilidade. As Figura 18 e Figura 19 ilustram a resposta do UHPLC-PDA para os biomarcadores alvo em função dos diferentes adsorventes.

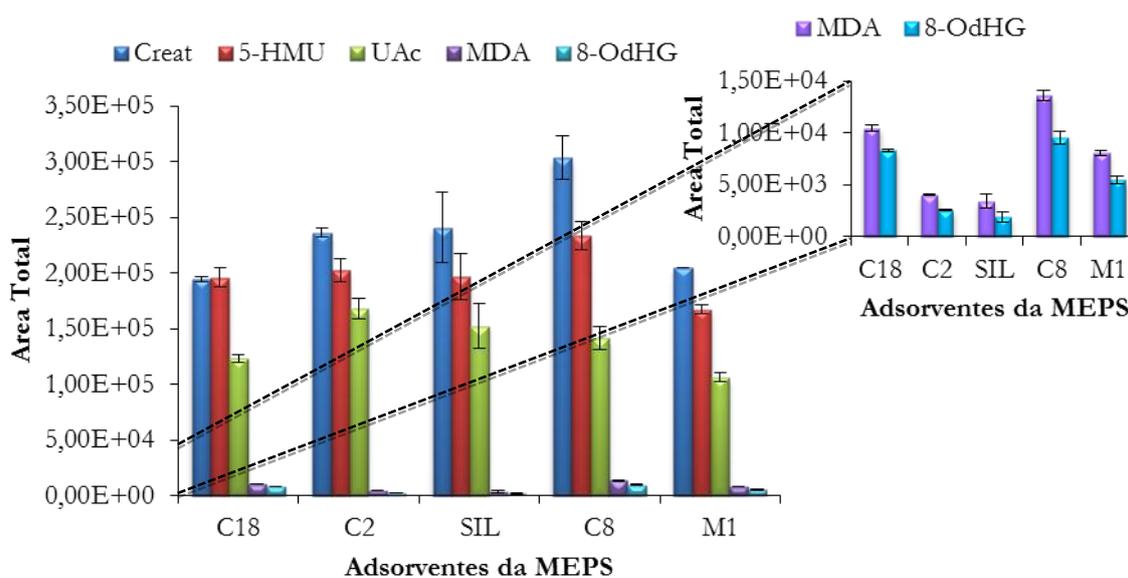


Figura 18- Comparação da eficiência dos adsorventes para cada biomarcador

Ao analisarmos a figura 18, verifica-se que para todos biomarcadores, exceto para o UAc, o adsorvente a C8 apresenta melhor eficiência de extração quando comparada as restantes. Isto deve-se ao fato destes biomarcadores (Creat, 5-HMU, MDA, 8-OHdG) não serem muito apolares e a C8 tem afinidade com analitos de polaridade intermédia. No entanto, o adsorvente que obteve menor eficiência de extração foi a M1, indicando que os grupos sulfonil da resina são poucos eficientes na retenção dos compostos alvos. Para o MDA e o 8-OHdG os adsorventes cuja interação foi menor foi a C2 e a SIL.

Relativamente ao UAc o adsorvente que apresentou melhor eficiência de extração foi a C2, isto deve-se ao fato de que o UAc tem uma natureza polar, interage melhor com a C2 que é menos apolar do que a C8 e C18.

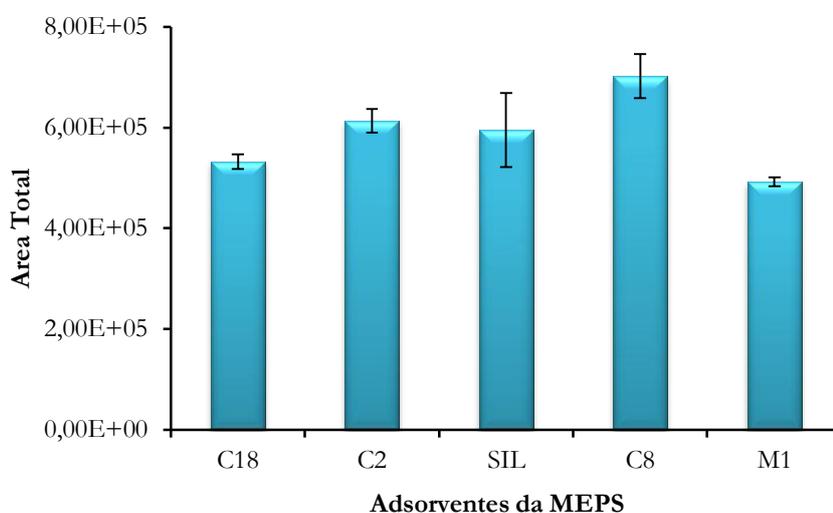


Figura 19- Comparação da eficiência de extração dos diferentes adsorventes

Tendo em conta que somente para o UAc a C8 não obteve a melhor eficiência e por uma questão de uniformização, utilizou-se a C8 no processo extrativo. Também ao analisarmos a Figura 19, que apresenta a área total dos biomarcadores para cada adsorvente, verifica-se que a C8 obteve melhor eficiência de extração e reprodutibilidade. Esta foi utilizada em mais de 100 extrações sem perda da sua eficiência (testes realizados no UHPLC-PDA). Nesta etapa não se adicionou padrão interno pois este apresenta diferentes afinidades para os diferentes adsorventes

3.3.2. Estudo do pH da amostra

A influência do pH na eficiência de extração foi avaliada através da extração de SU fortificada com pH ajustado a 2, 6 e 8 (utilizando 0,1 M de NaOH). Como podemos observar na Figura 20 não houve diferenças significativas entre os diferentes valores de pH. No entanto, a resolução dos picos era muito melhor para pH =6 e, além disso, o pH fisiológico das amostras de urina varia entre 6 e 7 [131], pelo que se escolheu o pH =6 para realizar o procedimento extrativo.

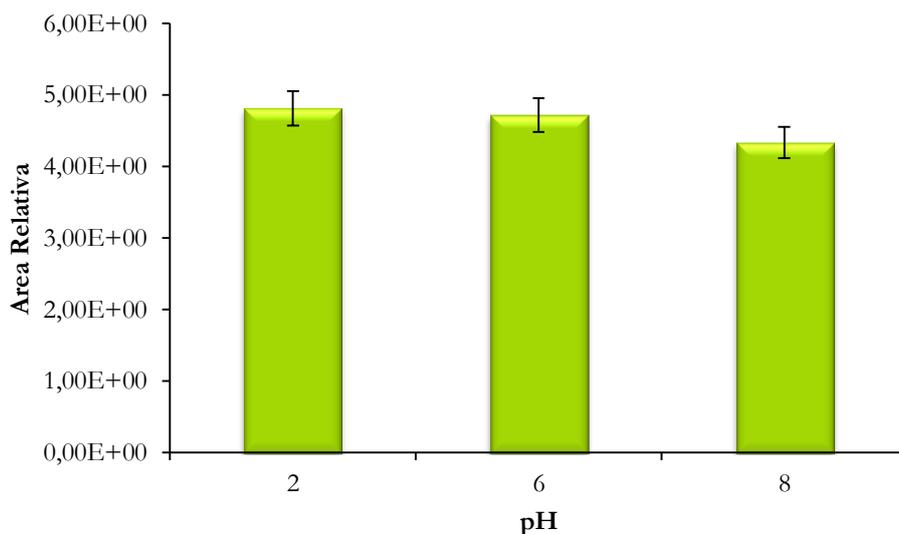


Figura 20- Estudo do efeito do pH na eficiência de extração

3.3.3. Seleção do volume de amostra

Visto a MEPS ser uma técnica que visa a diminuição do volume de amostra utilizado, é necessário otimizar este parâmetro. De modo a verificar a influência do volume de amostra na eficiência de extração testou-se os seguintes volumes: 50 μL , 100 μL , 250 μL , 500 μL , onde se pode observar que o volume de amostra não é diretamente proporcional ao aumento da área (figura 20).

3.3.4. Seleção do número de ciclos de extração

Na MEPS a retenção dos analitos no adsorvente é afetada pelo número de ciclos de extração e pela velocidade de aspiração aplicada [121]. Em termos práticos, a seringa é carregada com uma alíquota a qual se faz passar uma ou mais vezes (ciclos). Foram realizados múltiplos ciclos de extração da mesma alíquota de modo a selecionar o modo de carregamento (i) extrair - descartar no mesmo vial (ii) extrair – descartar para os resíduos. Esta última opção foi a selecionada para este estudo. De modo a otimizar o número de ciclos necessários para o aumento da eficiência de extração foram realizados (com a C8) 1, 3, 5 e 10 ciclos com SU fortificada.

A figura 21 demonstra a influência do número de ciclos de extração e volume de amostra na eficiência de extração para cada um dos biomarcadores e a figura 22 apresenta os valores da área total relativa para os biomarcadores do *stress* oxidativo em função do número de ciclos de extração. Pode-se observar que a competição pelos sítios ativos de adsorção do adsorvente C8 aumenta ligeiramente até cinco ciclos de extração com 50 μL de volume de amostra (quer para a Creat, 5-HMU, UAc), o mesmo não se verifica para o MDA e o 8-OHdG, onde se obteve maior eficácia com dez ciclos de extração de 50 μL de

amostra. Visto que o objetivo deste trabalho é quantificar em simultâneo os biomarcadores do *stress* oxidativo, optou-se por utilizar cinco ciclos de extração com 50 μL de amostra (Figura 22) nos ensaios seguintes e nas amostras.

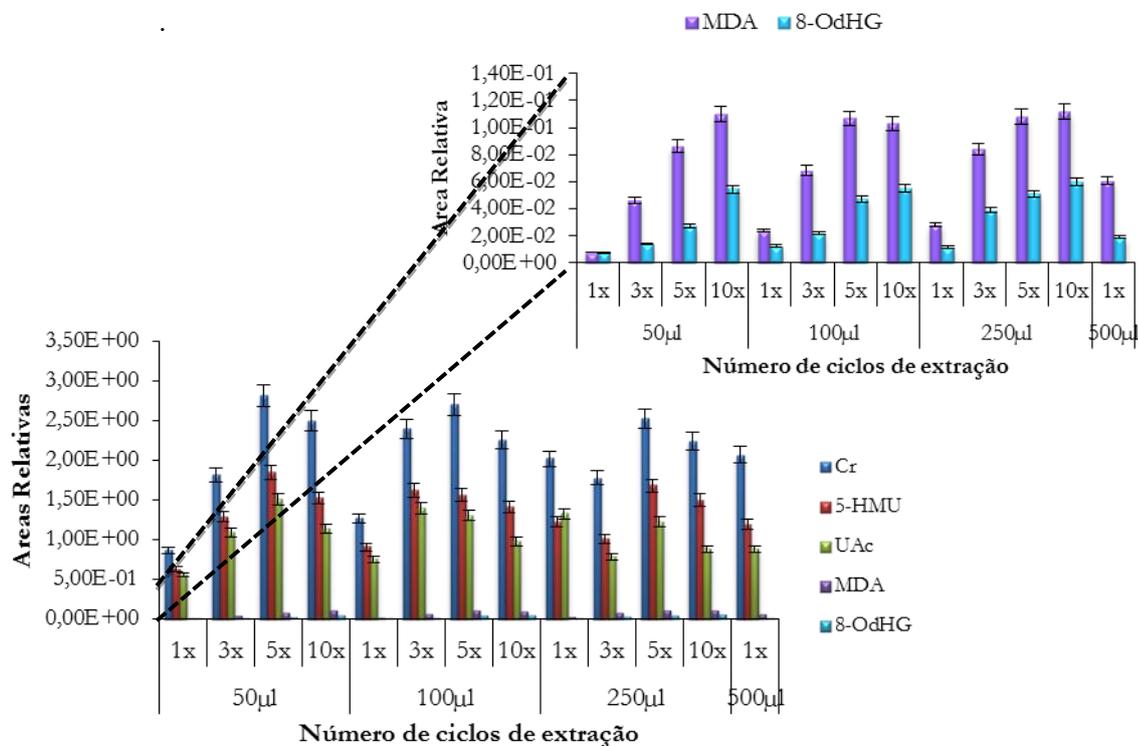


Figura 21- Influência do número de ciclos de extração e do volume da amostra na eficácia de extração dos para cada um dos biomarcadores

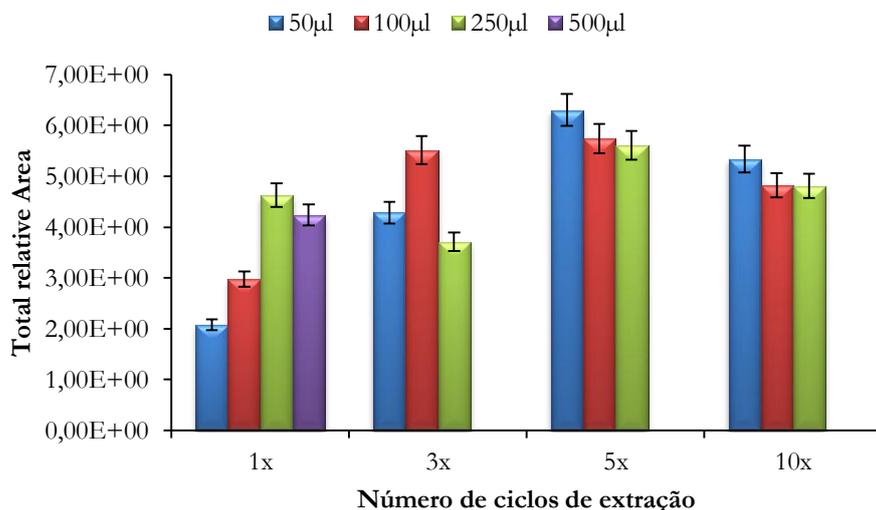


Figura 22-Influência do número de ciclos de extração e do volume de amostra para os biomarcadores do *stress* oxidativo

Ao efetuar o *load* da amostra cinco vezes com 50 μL , verificou-se uma melhor eficiência de extração, apresentando-nos diversas vantagens, tais como o aumento do

tempo de vida da resina e minimização de possíveis interferências de outros compostos presentes na urina para a quantificação dos biomarcadores alvo

3.3.5. Lavagem

A lavagem do adsorvente após a aplicação da amostra permite a remoção de interferentes, tais como por exemplo açúcares presente na urina, visto esta ser uma matriz complexa que pode provocar a saturação da resina e levar à diminuição da acessibilidade dos analitos aos sítios ativos já ocupados pelos interferentes presentes na amostra. Procedeu-se a lavagem com 50 μL , 100 μL de 0,01% de ácido fórmico. A analisarmos lavagem extrato da lavagem verificou-se que grande parte dos analitos é “eluído” nesta etapa. A lavagem do adsorvente passou a ser considerada como uma primeira eluição (dados comprovados pelo sistema UHPLC-PDA) juntando a esta etapa a eluição (Figura 23).

3.3.6. Seleção do volume de eluição

Para completar o procedimento de extração a determinação do volume de eluição é igualmente importante [121]. Face aos resultados da etapa anterior se verificou que a lavagem foi considerada uma primeira eluição, testaram-se dois volumes de eluição diferentes, 30 e 50 μL , passando várias vezes (1, 2, 3, 4 vezes) pela adsorvente após a lavagem com 50 μL e 100 μL . Os resultados apresentados na Figura 23, encontram-se normalizados. Ao analisarmos esta, verifica-se que não existem diferenças significativas entre a lavagem com 50 μL e com 100 μL , no entanto ao verificou-se que para a eluição com 30 μL a eficiência de extração não é significativamente afetada pelo aumento do número de vezes ou volume de eluição.

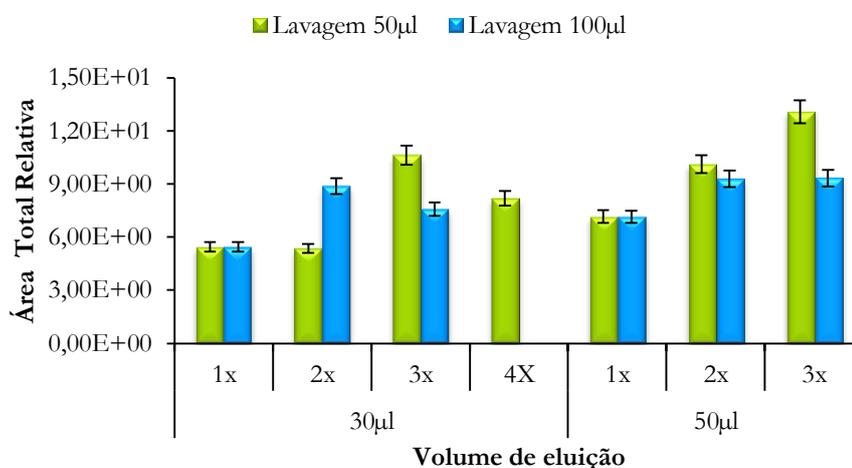


Figura 23- Comparação de diferentes volumes de eluição

De acordo com os resultados, verificou-se que o melhor procedimento constiu numa primeira eluição com 50 µL de 0,01% de ácido fórmico, seguida de uma segunda eluição de três vezes 50 µL, perfazendo um total de 200 µL, no entanto optou-se por utilizar o segundo melhor resultado (primeira eluição com 50 µL de 0,01% de ácido fórmico, seguida de uma segunda eluição de três vezes 30 µL). Isto é justificado pelo fato das diferenças entre as áreas totais relativas ser de cerca 20% e a diferença entre o volume de eluato de 70%, tendo em conta que a MEPS é uma técnica que visa a miniaturização de volumes.

Tendo em conta os valores otimizados para os diferentes parâmetros experimentais estudados, verificou-se que as melhores condições são as representadas na tabela 7.

Tabela 7- Parâmetros otimizados para o processo extrativo MEPS e as respetivas condições cromatográficas

Parâmetros	Condições Otimizadas MEPS
Adsorvente	C8
Condicionamento ^a	250 µL metanol +250 µL de 0,01% ácido fórmico
Volume da amostra	50 µL Amostra
Número de ciclos	5 ciclos
Lavagem (1 ^a eluição)	0,01% ácido fórmico
Volume de eluição	3× 30 µL 80:20 (0,01% ácido fórmico: metanol)
Lavagem Final ^b	250 µL metanol +250 µL de 0,01% ácido fórmico
Condições cromatográficas	
Fase móvel	80:20 (0,01% ácido fórmico:metanol)
Fluxo	250 µL min ⁻¹
Temperatura da coluna	30°C
Volume de injeção	2 µL
Aquisição	215, 245, 285, 295 nm

^{a)} Antes de utilizarmos qualquer resina MEPS é necessário condicionar a resina.

^{b)} A lavagem final entre extrações é muito importante evitando *carry-over* entre extrações

3.4. Validação da metodologia analítica para a determinação dos biomarcadores alvo na urina

i) Seletividade

A seletividade de um método analítico é importante para garantir que a quantificação dos analitos de interesse não é afetada pela presença de interferentes na matriz [132, 133]. Para estudo da seletividade comparou-se os cromatogramas obtidos pela

extração da SU e do solvente constituído pelo sistema de eluição de urina sintética e urina de indivíduos diferentes, verificando a ausência de interferentes no tempo de retenção dos compostos alvo. A seletividade foi também verificada pela pureza dos picos dos biomarcadores na urina de indivíduos CVDs que revela ausência de interferentes coeluídos (Figura 23).

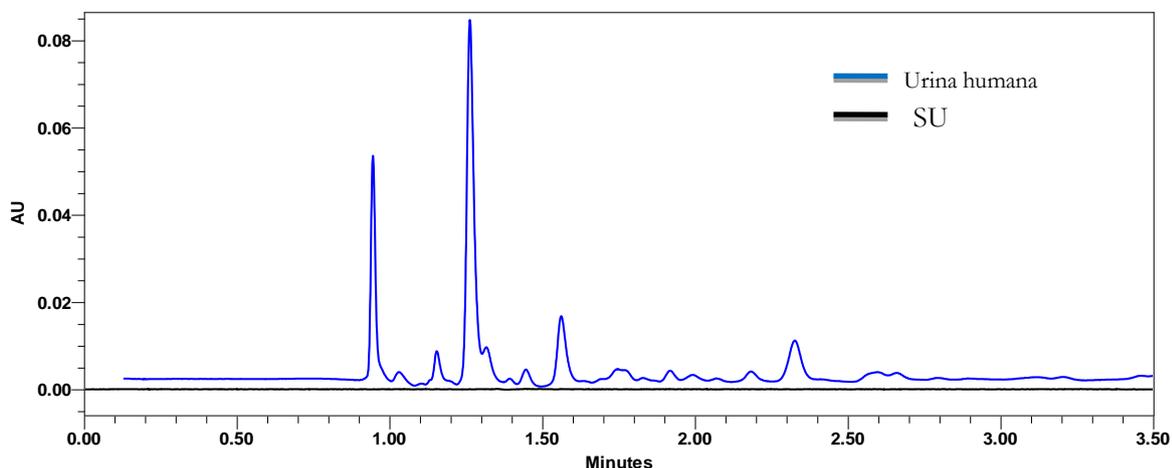


Figura 24- cromatograma representativo da SU vs urina de um individuo do grupo controlo para avaliação da seletividade (aquisição $\lambda=245$ nm)

ii) Linearidade

Um outro parâmetro avaliado foi a linearidade, que pode ser definida como a capacidade de uma metodologia analítica em fornecer resultados proporcionais à concentração de analito dentro de uma gama de concentrações [132, 133]. O padrão interno deve ter um tempo de retenção diferente dos compostos alvo e menor do que o composto que apresenta maior tempo de retenção, deve ser estável nas condições de análise, e deve ser suficientemente estável [132, 133]. A cimitidina foi também utilizada por Zuo *et. al* [76] como padrão interno na quantificação da Cr e do UAc.

A linearidade do método eVol[®]MEPS/UHPLC-PDA foi avaliada através da análise dos padrões dos biomarcadores numa gama de concentrações que contenha a concentração dos biomarcadores na urina humana. Para cada biomarcador foram realizadas três curvas de calibração construídas de acordo com as gamas de concentração referentes na tabela 8e representadas graficamente a área relativa do biomarcador ($\text{área}_{\text{analito}}/\text{area}_{\text{IS}}$) em relação a respetiva concentração, (anexo II) com três réplicas para cada concentração. As curvas de calibração foram realizadas em urina sintética fortificada com os biomarcadores na respetiva concentração.

Tabela 8- Dados da validação do processo analítico onde demonstra a gama de concentrações utilizadas, tempos de retenção, comprimento de onda adquirido e o performance analítico dos biomarcadores do stress oxidativo em SU determinada pela metodologia eVol®MEPS/UHPLC-PDA

Biomarcadores	Creat	5-HMU	UAc	MDA	8-OdHG	
Nº do pico	1	2	3	4	5	
Tr (min)	0.827	1.021	1.134	1.435	1.653	
λ_{\max}^a (nm)	215	215	285	246	295	
Performance Analítico						
Gama de conc ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	5 - 350	0.0005 - 0.01	5 - 250	1 - 60	0.1 - 5	
Equação da reta de calibração	$y = 0.0124x^b$ + 0.1324	$y = 1277.5x$ + 0.8318	$y = 0.0302x$ - 0.1681	$y = 0.0096x$ + 0.0213	$y = 0.0724x$ + 0.0052	
r^2	0.9913	0.9906	0.9951	0.9920	0.9946	
LOD ^c ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0.01	0.00005	0.29	0.72	0.04	
LOQ ^d ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	2.02	0.00023	2.31	1.57	0.13	
Efeito matriz (%)	63.50	60.11	110.29	71.54	82.21	
Nível de fortificação ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LL ^e	5	0.0005	5	1	0.1
	ML ^e	100	0.0025	100	15	1.5
	HL ^e	350	0.01	250	60	5.0
Extatidão (%)	LL	93.77	91.06	91.04	94.50	94.68
	ML	102.04	95.50	100.40	98.21	96.84
	HL	123.02	104.68	102.05	102.32	103.50
Precisão Intra-dia ($n=7$) RSD(%)	LL	5.18	5.67	4.09	5.74	8.34
	ML	5.71	4.24	5.71	2.43	4.75
	HL	3.65	0.95	1.67	5.62	2.03
Precisão Inter-dia ($n=18$) RSD(%)	LL	5.04	7.68	4.58	6.07	6.12
	ML	5.37	7.69	6.08	7.37	5.79
	HL	5.41	6.14	6.49	6.33	4.95

^a Valores de absorvância máxima obtida pelo sistema de deteção PDA

^b Coeficiente de correlação obtida através das curvas de calibração

^c Limite de deteção

^d Limite de quantificação

^e Níveis de concentração utilizados no estudo da validação do método eVol®MEPS_{C8}/UPLC-PDA : LL-nível baixo; ML- nível médio; HL- nível alto

O sistema UHPLC-PDA respondeu de forma linear em toda gama de concentrações estudadas. A análise por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados indicou a existência de uma relação linear para com os diferentes biomarcadores estudados, tendo sido obtidos coeficientes de correlação com valores $R^2 > 0,9906$.

As concentrações dos biomarcadores na amostra de urina foram calculadas através da equação da reta de calibração, obtida a partir do método dos mínimos quadrados. A Tabela 8 resume os parâmetros da validação, tais como gama de concentrações utilizada para cada biomarcador, declive, ordenada na origem, coeficientes de correlação.

iii) Limites de detecção de limites de quantificação

Os limites foram calculados de acordo com a concentração de analito capaz de gerar um sinal analítico maior que a amplitude do ruído, no LOD deve ser três vezes superior e no LOQ dez vezes [132, 133].

A Tabela 9 apresenta a comparação dos valores do LOD e do LOQ no presente trabalho e noutros trabalhos realizados em HPLC.

Tabela 9- Comparação dos LODs e LOQs obtidos no presente trabalho e noutros trabalhos.

Biomarcadores		LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Cr	Presente trabalho	0,01	2,02
	Zuo <i>et. al</i> [76]	0,04	25
	George <i>et. al</i> [134]	0,13	-
	Jen <i>et. al</i> [72]	0,16	-
5-HMU	Trabalho presente	0,00005	0,00023
	Outros trabalhos	-	-
UAc	Trabalho presente	0,29	2,31
	Zuo <i>et. al</i> [76]	0,06	25
	George <i>et. al</i> [134]	0,11	-
	Jen <i>et. al</i> [72]	0,13	-
MDA	Trabalho presente	0,72	1,57
	Costa <i>et. al</i> [135]	0,01	0,015
8-OHdG	Trabalho presente	0,04	0,13
	Harri <i>et. al</i> [106]	5×10^{-6}	$1,6 \times 10^{-4}$

Para a Creat e UAc ambos os valores do LOD e LOQ encontram-se inferiores aos outros trabalhos realizados em HPLC. Não foram encontrados trabalhos realizados em

HPLC para a quantificação do 5-HMU. Em relação ao MDA os resultados obtidos neste trabalho são superiores aos obtidos por Costa *et. al* [135], no entanto foram obtidos com um detetor de fluorescência. No caso do 8-OHdG os valores obtidos por Harri *et. al* [106] são bastante inferiores aos obtidos neste trabalho. Harri utilizou como metodologia analítica o HPLC-MS/MS pelo que se pode inferir que este será muito mais sensível que o UHPLC-PDA para a determinação do 8-OHdG. No entanto, os LOQ estão abaixo dos valores normais para os biomarcadores alvo na urina pelo que o método desenvolvido eVolMEPS/UHPLC-PDA é suficientemente sensível para o efeito.

iv) Efeito matriz

O efeito de matriz é um dos parâmetros importantes para a quantificação, pois pode acarretar sérios problemas analíticos podendo causar um aumento ou diminuição da resposta do detetor para um analito presente no extrato da amostra comparado com a resposta para o mesmo analito em solvente [136]. Este efeito ocorre quando substâncias inerentes à matriz biológica coeluem com os compostos de interesse [132], ou quando a composição da matriz não permite a extração eficiente dos analitos.

Analisando os resultados da Tabela 8 observamos que para todos biomarcadores, com exceção do UAc, existe efeito de matriz. Os valores obtidos variam de 60,11% (5-HMU) a 110,29% (UAc). Os valores obtidos fazem com que a quantificação dos biomarcadores na urina deva ser efetuada pelo método de adição de padrão de modo a minimizar os erros associados à matriz.

v) Exatidão

A exatidão pode ser caracterizada como a proximidade dos resultados obtidos pela metodologia analítica em estudo relativamente ao valor verdadeiro existente na amostra. Normalmente, a exatidão é determinada por intermédio da utilização de uma amostra certificada, na qual a concentração do analito de interesse é conhecida. No entanto, quando existe indisponibilidade de garantir uma amostra certificada, é possível determinar a exatidão através do cálculo das percentagens de recuperação. O ensaio de recuperação consiste na determinação da quantidade ou concentração de um analito de interesse numa amostra fortificada com esse mesmo analito, recuperado durante o processo analítico, sendo este comparado relativamente à quantidade real desse analito presente na amostra sem fortificação [132, 133, 137]. A fim de avaliar a exatidão do presente método, os ensaios de recuperação foram realizados fortificando a SU a três níveis de concentração, com uma quantidade conhecida dos biomarcadores.

Os valores médios obtidos para a percentagem de recuperação dos biomarcadores do *stress* oxidativo para cada nível de fortificação encontram-se listados na Tabela 8. No nível de fortificação mais alto, os resultados foram satisfatórios e variaram entre 102,05 % e 123,02 %, no entanto, foram decrescendo ligeiramente de acordo com o nível de fortificação atingindo o valor mais baixo de 91,04 %.

vi) Precisão

O desenvolvimento do método analítico está sujeito a variações aleatórias, que podem ser estimadas através da precisão. Normalmente, a precisão é expressa em termos de repetibilidade (intra-dias) e precisão intermediária (inter-dias), e o seu cálculo é realizado por meio da estimativa do desvio padrão relativo (RSD), também conhecido como coeficiente de variação (CV), não sendo recomendados valores acima de 15 % [132, 133].

A precisão intra-dia foi medida através da comparação do RSD da SU fortificada (LL, ML, HL) cuja análise foi realizada no mesmo dia ($n = 7$). A precisão inter-dia foi determinada através do cálculo do RSD da análise de amostras de SU fortificada, durante três dias alternados. Os resultados são satisfatórios com valores de RSD inferiores a 8,5 % para cada analito medido nos níveis de concentração (Tabela 8). A precisão intra-dias nos três diferentes níveis variou de 0,95 % (5-HMU na concentração de HL) a 8,34 % (8-OHdG na concentração de LL), enquanto a precisão inter-dia variou de 4,58 % (UAc na concentração de LL) a 7,69 % (5-HMU na concentração ML).

A combinação de eVol[®]MEPS juntamente com o sistema UHPLC-PDA prova ser uma estratégia adequada, com percentagens de recuperação excelentes, boa sensibilidade e precisão, que tornam possível a sua utilização como uma metodologia rápida para analisar os biomarcadores presentes na urina humana.

3.5. Quantificação dos biomarcadores do *stress* oxidativo

Após a validação do método analítico, um total de vinte e duas amostras de urina foram analisadas em triplicado. Todos os biomarcadores, foram identificados através do tempo de retenção correspondente e do espectro UV (correspondente ao máximo de absorção: λ_{\max} 215, 218, 245, 285, 295 nm). A Figura 24 apresenta o cromatograma da urina de um indivíduo do grupo controlo e de um indivíduo do grupo CVD obtida através do método eVol[®]MEPS/UHPLC-PDA. Como podemos verificar, os picos correspondentes aos biomarcadores apresentam boa resolução com mínimas interferências de outros componentes da urina. Além disso, os perfis das urinas são semelhantes, apesar da condição clínica diferenciada (concentrações de cada individuo encontra-se descrito na

tabela 10). No cálculo das concentrações, os resultados foram normalizados através da concentração de Creat.

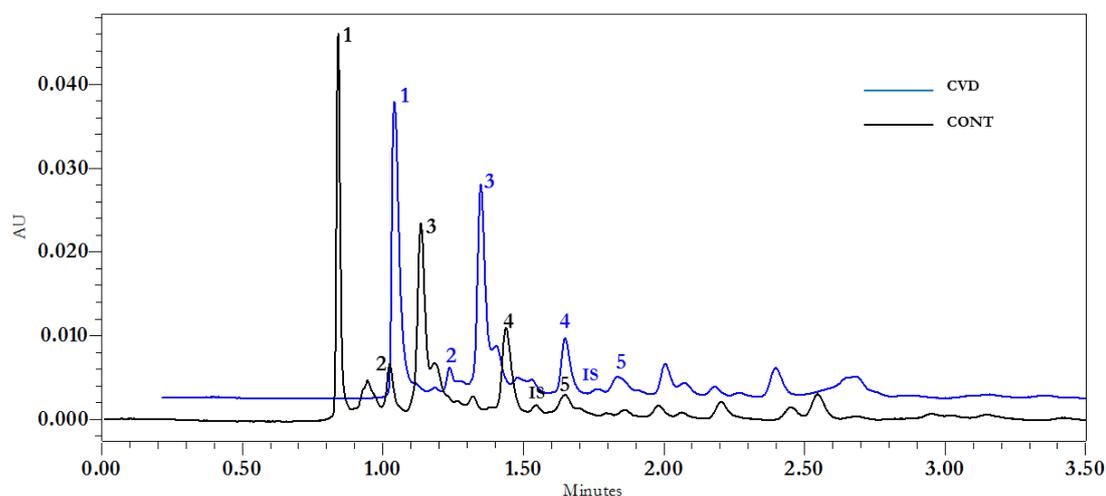


Figura 25- Cromatograma representativo de uma urina de um indivíduo do grupo CVD e de indivíduo do grupo Cont (aquisição 245nm) (1-Creat; 2-5HMU; 3-MDA; 4-UAc; 5- 8-OHdG; IS- padrão interno)

A tabela 10 apresenta as concentrações obtidas para cada um dos indivíduos dos dois grupos estudados e a figura 25 as concentrações médias dos biomarcadores do stress oxidativo para cada um dos grupos estudados. Ao analisarmos a tabela 10 e a figura 26 vemos que as concentrações referentes aos níveis de UAc/Creat variam entre $0,5 \times 10^{-1} \pm 1,9$ (RSD (%)) $\mu\text{g mL}^{-1}$ e $4,9 \times 10^{-1} \pm 4,5$ (RSD (%)) $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o grupo controlo e relativamente ao grupo CVD varia entre $2,5 \times 10^{-1} \pm 0,2$ (RSD (%)) $\mu\text{g mL}^{-1}$ e $4,8 \times 10^{-1} \pm 0,3$ (RSD (%)) $\mu\text{g mL}^{-1}$. Verifica-se que não existem diferenças significativas entre os grupos (comprovado através da análise one-way ANOVA seção 3.6.2). Na maioria dos estudos que relacionam o UAc com as CVDs [71, 73, 77] afirmam que o aumento da concentração de UAc é independente do aumento do risco de CVDs, no entanto são necessários mais estudos para que se possam comprovar essa relação.

A gama de concentrações obtidas para o MDA/Creat no grupo controlo variou entre $0,8 \times 10^{-1} \pm 1,0$ (RSD (%)) $\mu\text{g mL}^{-1}$ e $2,6 \times 10^{-1} \pm 0,9$ (RSD (%)) $\mu\text{g mL}^{-1}$ enquanto para o grupo CVD $0,9 \times 10^{-1} \pm 0,5$ (RSD (%)) $\mu\text{g mL}^{-1}$ e $2,2 \times 10^{-1} \pm 0,7$ (RSD (%)) $\mu\text{g mL}^{-1}$. Ao compararmos esta gama de concentrações para os dois grupos verificamos que não existe diferença significativas entre eles (comprovado através da análise one-way ANOVA seção 3.6.2), apesar da concentração no grupo CVD ser ligeiramente menor do que no grupo controlo, podemos inferir que visto estes serem pacientes de CVDs podem estar sobre medicação, diminuindo assim o *stress* oxidativo. Outra possível causa é o tipo de alimentação a que estão sujeitos, podendo esta ser rica em antioxidantes.

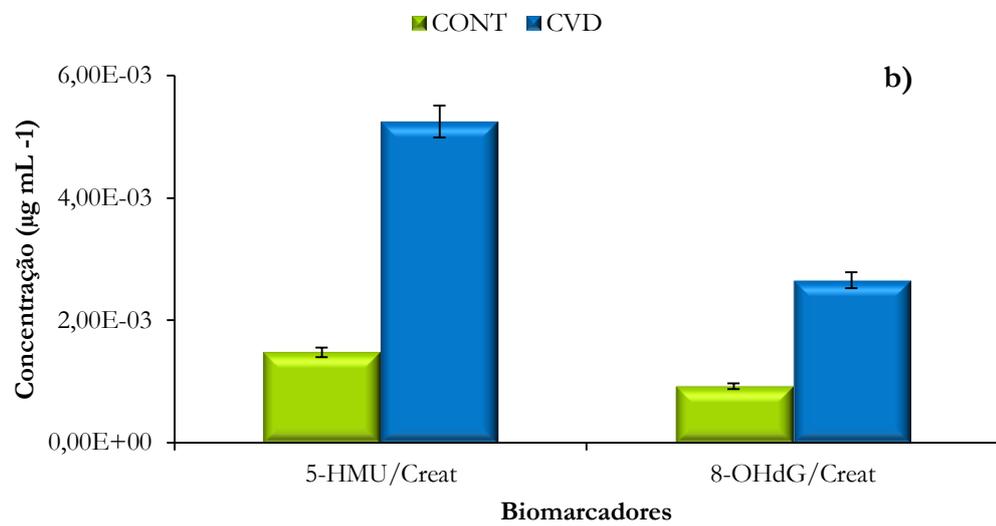
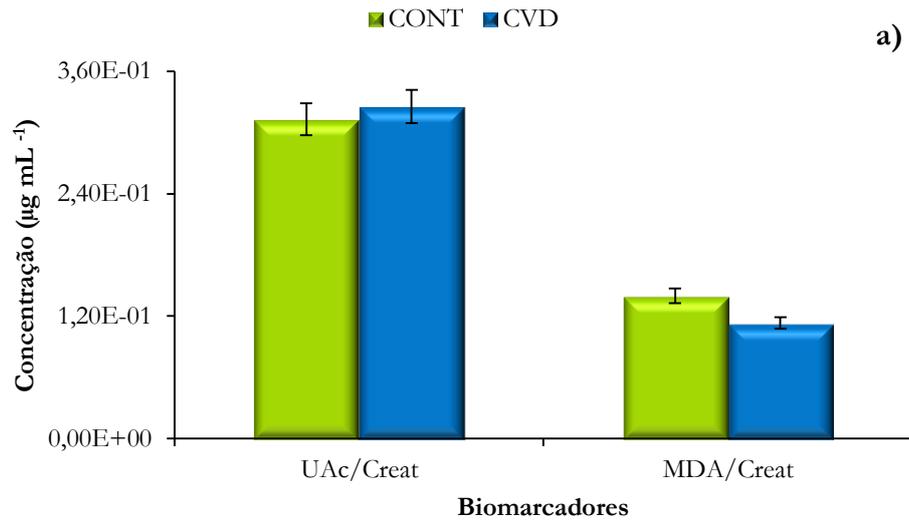


Figura 26- Perfil comparativo da concentração média dos biomarcadores do *stress* oxidativo no grupo CONT e no grupo de pacientes CVDs. (a) Concentração média do UAc/creat e MDA/creat (b) concentração média dos biomarcadores do dano oxidativo 5-HMU/creat e 8-OHdG.

Tabela 10- Concentração dos biomarcadores do *stress* oxidativo para os diferentes indivíduos dos diferentes grupos

Biomarcadores	UAc/Creat $\times 10^{-1}$ \pm RSD (%)	MDA/Creat $\times 10^{-1}$ \pm RSD (%)	5-HMU/Creat $\times 10^{-4}$ \pm RSD (%)	8-OdHG/Creat $\times 10^{-4}$ \pm RSD (%)	
Controlo	C1	3,7 \pm 0,1	1,3 \pm 1,1	0,0294 \pm 0,6	4,3 \pm 0,4
	C2	2,9 \pm 0,8	1,0 \pm 1,2	0,0238 \pm 2,0	4,3 \pm 3,4
	C3	4,0 \pm 0,8	1,2 \pm 2,3	0,0173 \pm 0,5	3,6 \pm 6,3
	C4	2,1 \pm 1,0	0,8 \pm 1,0	0,0276 \pm 3,3	5,8 \pm 5,1
	C5	3,4 \pm 1,6	1,3 \pm 0,5	0,0285 \pm 0,9	8,7 \pm 5,0
	C6	0,5 \pm 1,9	1,0 \pm 1,1	0,0265 \pm 6,5	5,6 \pm 7,2
	C7	3,0 \pm 2,2	2,6 \pm 0,9	0,0309 \pm 3,3	10,2 \pm 9,6
	C8	2,7 \pm 1,2	1,6 \pm 0,4	0,0294 \pm 1,9	14,7 \pm 2,4
	C9	4,1 \pm 1,3	1,7 \pm 1,9	0,0298 \pm 1,7	21,3 \pm 0,7
	C10	3,7 \pm 2,0	2,2 \pm 1,7	0,0286 \pm 2,3	7,1 \pm 0,9
	C11	3,4 \pm 2,0	2,5 \pm 2,1	0,0503 \pm 1,7	20,0 \pm 1,4
	C12	4,9 \pm 4,5	1,5 \pm 0,9	0,0265 \pm 6,3	6,1 \pm 0,3
CVD	CVD 1	2,6 \pm 6,2	0,9 \pm 2,1	0,0599 \pm 5,2	7,6 \pm 5,5
	CVD 2	3,5 \pm 0,6	0,9 \pm 1,0	0,0388 \pm 7,0	31,7 \pm 2,4
	CVD 3	2,8 \pm 0,2	0,8 \pm 1,3	0,0320 \pm 1,7	12,0 \pm 4,9
	CVD 4	2,7 \pm 0,3	0,9 \pm 1,2	0,0549 \pm 1,1	2,6 \pm 7,5
	CVD 5	3,8 \pm 1,1	1,0 \pm 0,6	0,0571 \pm 2,8	5,5 \pm 7,8
	CVD 6	3,7 \pm 1,0	1,6 \pm 1,2	0,0883 \pm 7,1	15,9 \pm 3,1
	CVD 7	2,5 \pm 0,2	1,3 \pm 0,3	0,0370 \pm 9,3	13,0 \pm 2,5
	CVD 8	4,8 \pm 0,3	1,2 \pm 1,7	0,0782 \pm 6,4	< LOQ
	CVD 9	3,2 \pm 0,3	0,9 \pm 0,5	0,0347 \pm 8,4	3,1 \pm 8,5
	CVD10	4,1 \pm 0,1	2,2 \pm 0,7	0,0433 \pm 6,8	41,6 \pm 5,4

Os resultados obtidos não estão de acordo com os resultados esperados, visto que o MDA é um produto da peroxidação lipídica que é um dos efeitos do *stress* oxidativo e estes aumentam a sua concentração quando há evidências de CVDs [11, 44]. Não foram encontrados trabalhos que comparassem as concentrações de MDA em pacientes saudáveis com pacientes de risco cardiovascular.

Relativamente aos biomarcadores do dano oxidativo do DNA, 5-HMU e o 8-OHdG, apresentam concentrações mais elevadas no grupo CVD do que no controlo,. A gama de concentrações encontradas no grupo controlo varia entre 0,0173 $\times 10^{-4} \pm 0,5$ (RSD (%)) $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 0,0309 $\times 10^{-4} \pm 3,3$ (RSD (%)) $\mu\text{g mL}^{-1}$ enquanto para o grupo CVD 0,0320 $\times 10^{-4} \pm 1,7$ (RSD (%)) $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 0,0883 $\times 10^{-4} \pm 7,1$ (RSD (%)) $\mu\text{g mL}^{-1}$ para 5-

HMU/Creat. A concentração referente ao C11 ($0,0503 \times 10^{-4} \pm 1,7$ (RSD (%)) $\mu\text{g mL}^{-1}$) é considerado um *outlier* pois a sua concentração é muito superior ao valor médio $0,0291 \times 10^{-4} \pm 2,6$ (RSD (%)) $\mu\text{g mL}^{-1}$ no grupo controlo. Ao analisarmos a figura 25 verifica-se que existe diferenças entre os grupos estudados. Relativamente a gama de concentrações obtidas para o 8-OHdG/Creat no grupo controlo varia entre $3,6 \times 10^{-4} \pm 6,3$ (RSD (%)) $\mu\text{g mL}^{-1}$ e $21,3 \times 10^{-4} \pm 3,3$ (RSD (%)) $\mu\text{g mL}^{-1}$ enquanto para o grupo CVD $2,6 \times 10^{-4} \pm 7,5$ (RSD (%)) $\mu\text{g mL}^{-1}$ e $41,6 \times 10^{-4} \pm 5,4$ (RSD (%)) $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os indivíduos C8, C9 e C11 apresentam valores acima dos restantes. Existem diversos fatores que podem influenciar estes resultados, como por exemplo o tabagismo e o estilo de vida. Em relação ao grupo CVDs o paciente CVD8 apresentou concentração menor do LOQ. Segundo Wu *et. al* [31] o dano oxidativo do DNA e a sua reparação aumenta significativamente ao longo da formação da placa aterosclerótica. Andreassi *et. al* [138] observou um aumento significativo dos biomarcadores do dano oxidativo de DNA em pacientes com a doença coronária, bem como em pacientes com fatores de risco como a diabetes *metillus*, hipercolesteremia. Além disso também observaram um aumento do dano oxidativo do DNA, comparativamente a indivíduos saudáveis. Sendo assim a avaliação dos adutos DNA urinários determinados neste estudo sugere a sua potencial aplicabilidade para avaliação do dano oxidativo no DNA.

Visto que não foi encontrado nenhum trabalho comparativo dos biomarcadores de *stress* oxidativo entre grupo de indivíduos saudáveis e de risco cardiovascular, comparou-se as concentrações médias do grupo controlo com os resultados obtidos noutros trabalhos (tabela 11).

Tabela 11- Comparação das concentrações dos biomarcadores do *stress* oxidativo no grupo controlo do presente trabalho com as obtidas outros trabalhos desenvolvidos.

Biomarcadores		Método analítico	Conc. Média CONT (nmol/mmol)
5-HMU/Cr	Trabalho presente	UHPLC-PDA	2,18
	Chen <i>et. al</i> [104]	GC-NICI/MS	8,9
UAc/Cr	Trabalho presente	UHPLC-PDA	$2,1 \times 10^5$
	Jen <i>et. al</i> [72]	HPLC-PDA	$3,3 \times 10^5$
MDA/Cr	Trabalho presente	UHPLC-PDA	$2,2 \times 10^5$
	Agarwal <i>et. al</i> [139]	HPLC-FLR	21,94
8-OHdG/Cr ^a	Trabalho presente	UHPLC-PDA	171,42 – 589,20
	Harri <i>et. al</i> [106]	HPLC-MS/MS	0,19 – 5,69

a) De modo a podermos comparar estes trabalhos em vez de utilizarmos a concentração média utilizou-se a gama de concentrações.

As concentrações médias de 5-HMU/Cr determinadas por Chen *et. al* [104] são cerca de quatro vezes superior às determinadas neste trabalho. Contudo trata-se de uma aproximação ou abordagem grosseira dado que tanto o grupo estudado, como as técnicas extrativas e de análise são muito diferenciados. Em relação a concentração média de UAc/Cr obtida neste trabalho, não difere muito da obtida por Jen *et. al* [72], contrariamente a concentração do MDA/Cr muito superior aos determinados por Agarwal *et. al* [139] apesar deste recorrer ao processo de derivatização, o que muitas vezes induz a erro na quantificação do MDA, devido aos restantes aldeídos produzidos na peroxidação lipídica. Por fim para o 8-OHdG/Cr, verifica-se que a gama de concentrações obtida por Harri *et. al* [106] são cerca de cem vezes inferiores as obtidas neste trabalho. O grupo de indivíduos estudado e a metodologia analítica poderão estar na base desta discrepância.

3.6. Análise estatística

3.6.1. Teste de Kolmogorov-Smirnov Z

Para que possamos realizar uma análise de variância simples (One Way ANOVA) é necessário que os parâmetros utilizados apresentem uma distribuição normal. De modo a verificar se os biomarcadores do *stress* oxidativo apresentavam uma distribuição normal, recorreu-se ao teste não paramétrico de Kolmogorov-Smirnov Z, que é utilizado para verificar se uma dada amostra poderá ser considerada como sendo proveniente de uma determinada distribuição. As amostras são normalizadas e comparadas com uma distribuição normal. Os dados obtidos encontram-se no anexo III, onde podemos ver que todos os biomarcadores apresentam uma distribuição normal, podendo assim realizar análise de variância simples.

3.6.2. Teste One way ANOVA

O teste One Way ANOVA tem como objetivo comparar medidas de localização para mais do que dois grupos de observação. Neste trabalho, o teste foi aplicado com intuito de avaliar se existem diferenças significativas entre os grupos de cont e grupo CVD.

Tabela 12- Resultados da ANOVA para os biomarcadores alvo do *stress* oxidativo nas amostras de urina dos grupos controle e CVD.

Biomarcadores		Soma dos quadrados	df ^a	Media dos quadrados	F ^b	Sig. ^c
5-HMU	Entre os grupos	0,000	1	0,00	4,688	0,034
	Dentro dos grupos	0,000	67	0,00		
	Total	0,000	68			
UAc	Entre os grupos	0,046	1	0,046	7,578	0,068
	Dentro dos grupos	0,405	67	0,006		
	Total	0,451	68			
MDA	Entre os grupos	0,004	1	0,004	2,982	0,089
	Dentro dos grupos	0,089	67	0,001		
	Total	0,093	68			
8-OHdG	Entre os grupos	0,000	1	0,000	99,399	0,000
	Dentro dos grupos	0,000	67	0,000		
	Total	0,000	68			

^{a)} Graus de liberdade

^{b)} Teste de Fisher

^{c)} Valor de significância

Este teste possui como hipótese nula, a igualdade de médias entre os grupos em estudo, para cada biomarcador. Se *p*-value for inferior ou igual a 0,05, a hipótese referida é rejeitada, estando em condições de afirmar que existe pelo menos um grupo que difere significativamente dos restantes. Caso os valores de *p* seja superior a 0,05, a hipótese nula é verdadeira pelo que não existem diferenças significativas entre os grupos. Na tabela 12 encontram-se representados os resultados obtidos da análise de variância simples, onde se pode observar os que biomarcadores do *stress* oxidativo com exceção do MDA e UAc, todos os outros, apresentam diferenças estatisticamente significativas entre os 2 grupos analisados.

3.6.3. Análise Multivariável Aplicada as concentrações obtidas

A análise por PCA é indicada para conjuntos de medidas correlacionadas linearmente, o que permite reduzi-las a poucas variáveis sumárias, denominadas componentes principais.

Apesar de estudarmos quatro biomarcadores, a análise dos componentes principais, foi somente aplicada aos biomarcadores do dano oxidativo (5-HMU e ao 8-OHdG), pois somente para estes dois obteve-se boa separação. Os resultados obtidos pelo demonstram que estes dois biomarcadores apresentam diferenças significativas entre os grupos.

A análise de componentes principais aplicadas as 2 variáveis e aos 20 casos (matrix 2×20) permitiu extrair dois componentes principais que explicam 83,07 % da variância total do conjunto inicial de resultados (Tabela 13).

Tabela 13- Percentagem cumulativa da variância total explicada pelas duas componentes principais, para os grupos controlo e CVD com as 2 variáveis e 20 casos.

Componentes Principais	Total	Variância (%)	Percentagem Cumulativa
1	1,0	48,66	48,66
2	1,0	34,41	83,07

A análise por PCA permitiu uma boa separação dos grupos em estudo. Como podemos observar na figura 26, a presença de dois agrupamentos separados das amostras do grupo controlo e CVD separados ao longo do primeiro componente principal. De notar que no agrupamento referente ao grupo CVD, verificamos uma maior dispersão ao longo do segundo componente principal.

Na Figura 27 encontram-se dispostos graficamente os resultados obtidos das duas coordenadas principais (PC1 e PC2) para cada um dos biomarcadores. A separação ao longo do primeiro componente principal foi realizada através do 5-HMU e a do segundo componente principal é da responsabilidade do 8-OHdG.

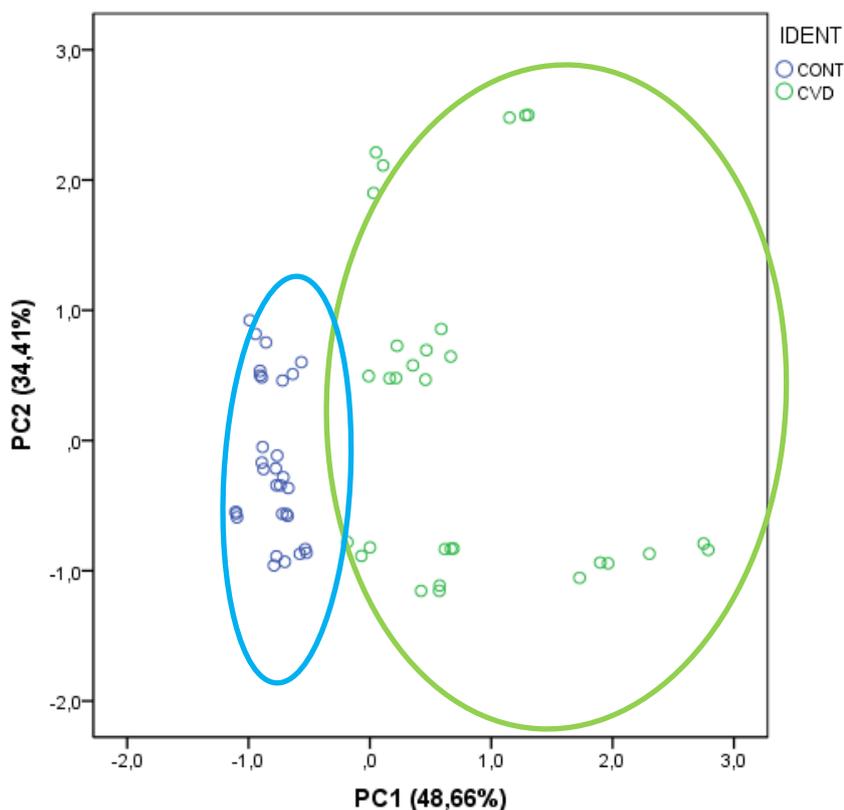


Figura 27- Análise por componentes principais (PCA) aplicadas aos dois grupos em estudo

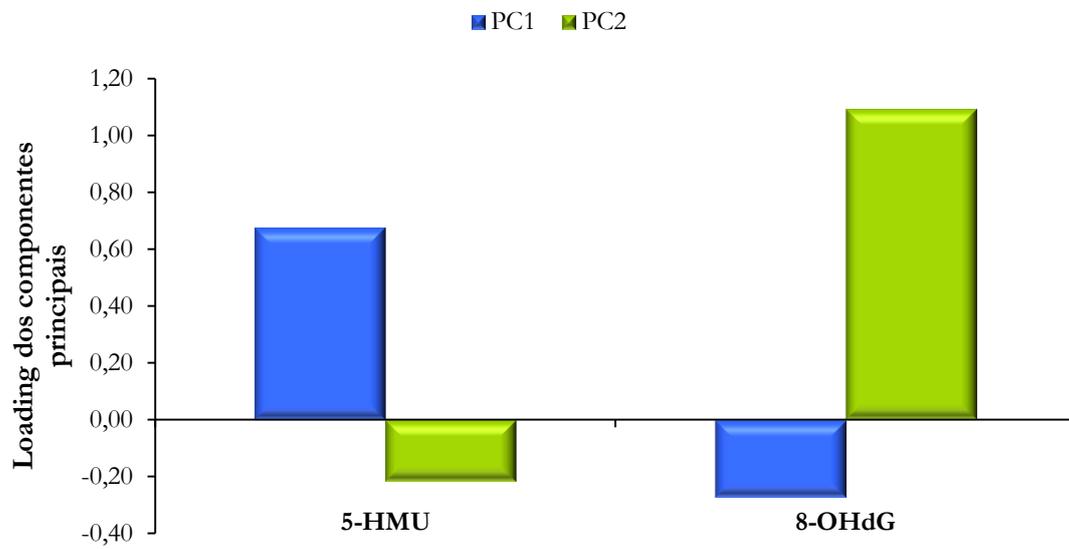


Figura 28- Representação gráfica dos *loadings* dos dois primeiros componentes (PC1 e PC2)

4. Conclusão

Este projeto teve como objetivo quantificar simultaneamente os biomarcadores do *stress* oxidativo em amostras de urina e plasma de indivíduos normais (grupo controlo) e pacientes de CVD recorrendo à extração por MEPS e quantificação por UHPLC-PDA.

Ao longo deste trabalho deparamos com diversas dificuldades, nomeadamente com a quantificação dos biomarcadores nas amostras de plasma.

Para a quantificação dos biomarcadores nas amostras de urina recorreu-se a uma nova metodologia analítica, ultra-rápida, sensível e reprodutível a eVol®MEPS/UHPLC-PDA, utilizando uma coluna analítica de 100 mm (ACQUITY HSS T3) com 1,8 µm do tamanho de partícula. O procedimento de extração é simples, eficiente e pouco moroso, e além disso pode ser usado para pequenos volumes de amostra (50 µL). Depois de uma seleção cuidadosa do sistema eluente, foi demonstrado que a separação cromatográfica dos biomarcadores poderia ser conseguida em menos de 3,5 min com uma resolução elevada. A combinação do curto tempo de corrida com um fluxo da ordem dos µL, permitiu reduzir drasticamente o consumo de solvente comparativamente ao HPLC convencional. O adsorvente empacotado pode também ser utilizada várias vezes (100 ou mais), dependendo da natureza da matriz.

A otimização da técnica extrativa eVol®MEPS na análise dos biomarcadores do *stress* oxidativo na urina foram avaliados vários parâmetros com influencia na eficiência de extração como o tipo de adsorvente, pH, volume de amostra, condições de lavagem e eluição. Os melhores resultados foram conseguidos por utilização de um “loading” de amostra em cinco vezes usando 50 µL de urina com pH ajustado a 6 no adsorvente C8. Para a eluição dos biomarcadores a melhor performance que foi obtida por eluição inicial de 50 µL de 0,01% de ácido fórmico seguida de uma eluição de 30 µL de uma solução de 20% de metanol acidificada com 0,01% ácido fórmico, repetindo o processo de eluição três vezes.

Após a otimização procedeu-se à validação da metodologia analítica. Obteve-se uma boa linearidade, pois os coeficientes de correlação obtidos foram superiores a 0,9906. Os limites de deteção e quantificação encontrados apresentam valores baixos variando entre 0,00005 - 0,72 µg mL⁻¹ e entre 0,00023 - 2,31 µg mL⁻¹ respetivamente. Obteve-se bons resultados para a percentagem de recuperação (91,06 - 123,02 %), precisão intra-dia (0,95 - 8,34 %), precisão inter-dia (4,58 -6,33 %) e para o efeito matriz (60,11% - 110,29 %). Estes resultados são aceitáveis, evidenciando que a metodologia empregue pode ser potencialmente útil para quantificar os biomarcadores e servir como alternativa promissora às metodologias existentes para a determinação destes.

Além disso, o método pode ser aplicado para a análise dos biomarcadores noutras matrizes como o plasma.

A metodologia desenvolvida foi aplicada a cerca de 20 amostras de urina, sendo 10 do grupo controlo e 10 do grupo CVDs de modo a avaliar as diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos de biomarcadores alvo. Relativamente a quantificação dos biomarcadores do

stress oxidativo, os resultados apresentados encontravam-se normalizados com a creat. Ao compararmos os resultados obtidos entre os grupos, verificou-se que para o UAc e o MDA não apresentava diferenças significativas, no entanto em relação aos restantes biomarcadores (5-HMU e 8-OHdG), verifica-se a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. A concentração de 5-HMU/Creat é significativamente superior no grupo CVDs em relação ao grupo controlo, o mesmo se verifica em relação a concentração de 8-OHdG/Creat. Este aumento está de acordo com o que já se encontra descrito na literatura. As diferenças estatisticamente significativas foram avaliadas através do teste One-Way ANOVA, onde obtiveram-se valores de $p > 0.05$.

Por fim efetuou-se a análise multivariável às amostras de urina por PCA, que permitiu uma boa separação entre os agrupamentos das duas variáveis.

Com este trabalho podemos concluir que há uma tendência em relação ao aumento da concentração dos biomarcadores do *stress* oxidativo no grupo CVD quando comparado ao grupo controlo, mas para que possamos comprovar esta tendência é necessário analisarmos um maior número de amostras, assim como obtermos mais informações sobre os pacientes.

5. Referências

1. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39:44-84.
2. McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. *The American journal of medicine* 2000;108:652-659.
3. Rodrigo R, editor. *Oxidative stress and antioxidants - Their role in human disease*: Nova Science Publishers, Inc; 2009.
4. Aruoma OI. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *J Am Oil Chem Soc* 1998;75:199-212.
5. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med* 2010;49:1603-1616.
6. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1969;244:6049-6055.
7. Andreoli TE. Free radicals and oxidative stress. *The American journal of medicine* 2000;108:650.
8. Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF, Manfredini V, Benfato MS, Kubota LT. Espécies reativas de oxigênio e de Nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quim Nova* 2007;30:1323-1338.
9. de Zwart LL, Meerman JH, Commandeur JN, Vermeulen NP. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radic Biol Med* 1999;26:202-226.
10. Stiefel P, Arguelles S, Garcia S, Jimenez L, Aparicio R, Carneado J, et al. Effects of short-term supplementation with folic acid on different oxidative stress parameters in patients with hypertension. *Biochim Biophys Acta* 2005;1726:152-159.
11. Sugamura K, Keaney JF, Jr. Reactive oxygen species in cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med* 2011.
12. Cecconi C, Boraso A, Cargnoni A, Ferrari R. Oxidative stress in cardiovascular disease: myth or fact? *Arch Biochem Biophys* 2003;420:217-221.
13. Singh U, Jialal I. Oxidative stress and atherosclerosis. *Pathophysiology* 2006;13:129-142.
14. Bonomini F, Tengattini S, Fabiano A, Bianchi R, Rezzani R. Atherosclerosis and oxidative stress. *Histol Histopathol* 2008;23:381-390.
15. Jomova K, Vondrakova D, Lawson M, Valko M. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Mol Cell Biochem* 2010;345:91-104.
16. Tobon-Velasco JC, Carmona-Aparicio L, Ali SF, Santamaria A. Biomarkers of cell damage induced by oxidative stress in Parkinson's disease and related models. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* 2010;10:278-286.
17. Chinta SJ, Andersen JK. Redox imbalance in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* 2008;1780:1362-1367.
18. Mangialasche F, Polidori MC, Monastero R, Ercolani S, Camarda C, Cecchetti R, et al. Biomarkers of oxidative and nitrosative damage in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Ageing Res Rev* 2009;8:285-305.
19. Shi Q, Gibson GE. Oxidative stress and transcriptional regulation in Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 2007;21:276-291.
20. van Horssen J, Witte ME, Schreibelt G, de Vries HE. Radical changes in multiple sclerosis pathogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2011;1812:141-150.
21. Graber JJ, Dhib-Jalbut S. Biomarkers of disease activity in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2011.
22. Reznick AZ, Shehadeh N, Shafir Y, Nagler RM. Free radicals related effects and antioxidants in saliva and serum of adolescents with Type 1 diabetes mellitus. *Arch Oral Biol* 2006;51:640-648.
23. Urso C, Caimi G. [Oxidative stress and endothelial dysfunction.]. *Minerva Med* 2011;102:59-77.

24. Tabak O, Gelisgen R, Erman H, Erdenen F, Muderrisoglu C, Aral H, et al. Oxidative lipid, protein, and DNA damage as oxidative stress markers in vascular complications of diabetes mellitus. *Clin Invest Med* 2011;34:E163.
25. Surh Y-J, Lester P, editors. *Oxidative stress, inflammation, and health* 2005.
26. Niki E. Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects. *Free Radic Biol Med* 2009;47:469-484.
27. Niki E. Lipid peroxidation products as oxidative stress biomarkers. *Biofactors* 2008;34:171-180.
28. Cai Z. Lipid peroxidation. In: Wexler P, editor. *Encyclopedia of Toxicology*: Academic Press; 2005.
29. Mateos R, Bravo L. Chromatographic and electrophoretic methods for the analysis of biomarkers of oxidative damage to macromolecules (DNA, lipids, and proteins). *J Sep Sci* 2007;30:175-191.
30. Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem* 2006;52:601-623.
31. Wu LL, Chiou CC, Chang PY, Wu JT. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clin Chim Acta* 2004;339:1-9.
32. Klaunig JE, Kamendulis LM. The Role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004;44:239-267.
33. Beierl C, Forgione M, Loscalzo J. The antioxidant hypothesis. In: Bourassa MG, Tardif J-C, editors. *Antioxidant and Cardiovascular disease*. Montreal: Springer. p. 87-101.
34. Packer L, Cadenas E, editors. *Handbook of antioxidants*. Second ed: CRC Press; 2001.
35. Balsano C, Alisi A. Antioxidant effects of natural bioactive compounds. *Curr Pharm Des* 2009;15:3063-3073.
36. WHO. World Health Organisation W. Cardiovascular Diseases (CVDs) WHO Fact Sheet; 2011. 2011 [cited 2012 15-06-2012]; Available from: http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/.
37. Gradiz R. Fisiopatologia do Aparelho Cardiovascular. In: Pinto AM, editor. *Fisiopatologia-Fundamentos e Aplicação*: Lidel; 2009. p. 355-375.
38. Pešek K, Pešek T, Roginić S. The Importance of Risk Factors Analysis in the Prevention of Cardiovascular Disease (CVD). In: Pešek K, editor. *Atherosclerotic Cardiovascular Disease*. Croatia: InTech; 2011.
39. Fearon IM, Faux SP. Oxidative stress and cardiovascular disease: novel tools give (free) radical insight. *J Mol Cell Cardiol* 2009;47:372-381.
40. Keaney JF. Atherosclerosis: from lesion formation to plaque activation and endothelial dysfunction. *Mol Asp Med* 2000;21:99-166.
41. Sary H. *Evolution of Human Atherosclerosis* Merck & Co., Inc; 1993.
42. Sary H. Natural history of atherosclerosis: the sequence of changes in lesion composition. In: Jacotot B, Mathé D, Fruchart J-C, editors.: Elsevier Science; 1998. p. 393.
43. Viles-Gonzalez J, Badimon JJ, Fuster V. Pathogenesis of Atherosclerosis. In: Bourassa MG, Tardif J-C, editors. *Antioxidants and cardiovascular disease*. Montreal, Canada: Springer; 2006. p. 49-85.
44. Strobel NA, Fassett RG, Marsh SA, Coombes JS. Oxidative stress biomarkers as predictors of cardiovascular disease. *Int J Cardiol* 2011;147:191-201.
45. Siekmeier R, Steffen C, Marz W. Role of oxidants and antioxidants in atherosclerosis: results of in vitro and in vivo investigations. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2007;12:265-282.
46. Niki E. Antioxidants and atherosclerosis. *Biochem Soc Trans* 2004;32:156-159.
47. Carr AC, McCall MR, Frei B. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscler, Thromb, Vasc Biol* 2000;20:1716-1723.
48. Meydani M. Vitamin E modulation of cardiovascular disease. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1031:271-279.
49. Naidu KA. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. *Nutrition Journal* 2003;2:7.
50. Niki E, Noguchi N. Effects of antioxidants against atherosclerosis. *Mol Cell Biochem* 2002;234-235:19-25.

51. Jain KK. *The Handbook of Biomarkers*: Springer; 2010.
52. Griffiths HR, Moller L, Bartosz G, Bast A, Bertoni-Freddari C, Collins A, et al. Biomarkers. *Mol Aspects Med* 2002;23:101-208.
53. Phillips M, Cataneo RN, Cheema T, Greenberg J. Increased breath biomarkers of oxidative stress in diabetes mellitus. *Clin Chim Acta* 2004;344:189-194.
54. Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF, Manfredini V, Benfato MS, Kubota LT. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quim Nova* 2007;30:1323-1338.
55. Desai M, Stockbridge N, Temple R. Blood Pressure as an Example of a Biomarker That Functions as a Surrogate The AAPS Journal 2006;8:146-152.
56. LaBaer J. So, you want to look for biomarkers (introduction to the special biomarkers issue). *J Proteome Res* 2005;4:1053-1059.
57. Graber JJ, Dhib-Jalbut S. Biomarkers of disease activity in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2011;305:1-10.
58. Quintas A, Freire AP, Halpern MJ. *Bioquímica - Organização Molecular da Vida*: Lidel; 2008.
59. Wyss M, Kaddurah-Daouk R. Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev* 2000;80:1107-1213.
60. Gaw A, Murphy MJ, Cowan RA, O'Reilly DJ, Stewart MJ, Shepherd J. *Clinical Biochemistry*. 3rd ed: Churchill Livingstone; 2004.
61. Reis CH, Alçada N, Azevedo I. *Práticas de Bioquímica para as Ciências da Saúde*: Lidel; 2002.
62. Barr DB, Wilder LC, Caudill SP, Gonzalez AJ, Needham LL, Pirkle JL. Urinary Creatinine Concentrations in the U.S. Population: Implications for Urinary Biologic Monitoring Measurements. *Environ Health Perspect* 2004;113.
63. Fuller L, Rich A. An index of lean body mass from 24th urinary creatinine excretion. *Proc Nutr Soc* 1982;41:A104.
64. Turner W. Total body potassium and 24-hour creatinine excretion in healthy males. *Clinical pharmacology and therapeutics* 1975;18:405.
65. Rosner MH. Urinary biomarkers for the detection of renal injury. *Adv Clin Chem* 2009;49:73-97.
66. Devarajan P. Biomarkers for the early detection of acute kidney injury. *Curr Opin Pediatr* 2011;23:194.
67. Conti M, Moutereau S, Esmilaire L, Desbene C, Lallali K, Devanlay M, et al. Should kidney tubular markers be adjusted for urine creatinine? The example of urinary cystatin C. *Clin Chem Lab Med* 2009;47:1553-1556.
68. Cone EJ, Caplan YH, Moser F, Robert T, Shelby MK, Black DL. Normalization of urinary drug concentrations with specific gravity and creatinine. *J Anal Toxicol* 2009;33:1-7.
69. Irie F, Iso H, Sairenchi T, Fukasawa N, Yamagishi K, Ikehara S, et al. The relationships of proteinuria, serum creatinine, glomerular filtration rate with cardiovascular disease mortality in Japanese general population. *Kidney Int* 2006;69:1264-1271.
70. Oterdoom LH, Gansevoort RT, Schouten JP, de Jong PE, Gans RO, Bakker SJ. Urinary creatinine excretion, an indirect measure of muscle mass, is an independent predictor of cardiovascular disease and mortality in the general population. *Atherosclerosis* 2009;207:534-540.
71. Alderman MH. Uric acid and cardiovascular risk. *Curr Opin Pharmacol* 2002;2:126-130.
72. Jen J-F, Hsiao S-L, Liu K-H. Simultaneous determination of uric acid and creatinine in urine by an eco-friendly solvent-free high performance liquid chromatographic method. *Talanta* 2002;58:711-717.
73. Lippi G, Montagnana M, Franchini M, Favaloro EJ, Targher G. The paradoxical relationship between serum uric acid and cardiovascular disease. *Clin Chim Acta* 2008;392:1-7.
74. Strazzullo P, Puig JG. Uric acid and oxidative stress: Relative impact on cardiovascular risk. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 2007;17:409-414.
75. Ascherio A, LeWitt PA, Xu K, Eberly S, Watts A, Matson WR, et al. Urate as a Predictor of the Rate of Clinical Decline in Parkinson Disease. *Arch Neurol* 2009;66:1460-1468.

76. Zuo Y, Yang Y, Zhu Z, He W, Aydin Z. Determination of uric acid and creatinine in human urine using hydrophilic interaction chromatography. *Talanta* 2011;83:1707-1710.
77. Gagliardi AC, Miname MH, Santos RD. Uric acid: A marker of increased cardiovascular risk. *Atherosclerosis* 2009;202:11-17.
78. Chole RH, Patil RN, Basak A, Palandurkar K, Bhowate R. Estimation of serum malondialdehyde in oral cancer and precancer and its association with healthy individuals, gender, alcohol, and tobacco abuse. *J Cancer Res Ther* 2010;6:487-491.
79. Nakhjavani M, Esteghamati A, Nowroozi S, Asgarani F, Rashidi A, Khalilzadeh O. Type 2 diabetes mellitus duration: an independent predictor of serum malondialdehyde levels. *Singapore Med J* 2010;51:582-585.
80. Viigimaa M, Abina J, Zemtsovskaya G, Tikhaze A, Konovalova G, Kumskova E, et al. Malondialdehyde-modified low-density lipoproteins as biomarker for atherosclerosis. *Blood Press* 2010;19:164-168.
81. Aybek H, Ercan F, Aslan D, Sahiner T. Determination of malondialdehyde, reduced glutathione levels and APOE4 allele frequency in late-onset Alzheimer's disease in Denizli, Turkey. *Clin Biochem* 2007;40:172-176.
82. Pryor WA, Stanley J. Suggested mechanism for the production of malonaldehyde during the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. Nonenzymic production of prostaglandin endoperoxides during autoxidation. *The Journal of organic chemistry* 1975;40:3615-3617.
83. Frankel EN, Neff WE. Formation of malonaldehyde from lipid oxidation products. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism* 1983;754:264-270.
84. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine* 1991;11:81-128.
85. Jens L. Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. *Clin Chim Acta* 2007;380:50-58.
86. Seljeskog E, Hervig T, Mansoor MA. A novel HPLC method for the measurement of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). A comparison with a commercially available kit. *Clin Biochem* 2006;39:947-954.
87. Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 2005;15:316-328.
88. Larstad M, Ljungkvist G, Olin AC, Torén K. Determination of malondialdehyde in breath condensate by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2002;766:107-114.
89. Korchazhkina O, Yang Y. Methyl malondialdehyde is not suitable as an internal standard for malondialdehyde detection in urine after derivatisation with 2,4-dinitrophenylhydrazine. *J Chromatogr B* 2004;806:295-298.
90. Grotto D, Santa Maria LD, Boeira S, Valentini J, Charao MF, Moro AM, et al. Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography-visible detection. *J Pharm Biomed Anal* 2007;43:619-624.
91. Yagi K. Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. *METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY-CLIFTON THEN TOTOWA-* 1998;108:101-106.
92. Atasayar S, Orhan H, Özgünefi H. Malondialdehyde Quantification in Blood Plasma of Tobacco Smokers and Non-Smokers. *FABAD J Pharm Sci* 2004;29:15-19.
93. TÜKÖZKAN N, ERDAMAR H, SEVEN I, Anabilim G, Dal A. Measurement of total malondialdehyde in plasma and tissues by high-performance liquid chromatography and thiobarbituric acid assay. *Firat Tıp Dergisi* 2006;11:88-92.
94. Antunes MV, Lazzaretti C, Gamaro GD, Linden R. Estudo pré-analítico e de validação para determinação de malondialdeído em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência, após derivatização com 2, 4-dinitrofenilhidrazina. *Rev Bras Cienc Farm* 2008;44:279-287.
95. Karatas F, Karatepe M, Baysar A. Determination of free malondialdehyde in human serum by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 2002;311:76-79.
96. Palinski W, Rosenfeld ME, Ylä-Herttuala S, Gurtner GC, Socher SS, Butler SW, et al. Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1989;86:1372.

97. Haberland ME, Fong D, Cheng L. Malondialdehyde-altered protein occurs in atheroma of Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Science* 1988;241:215-218.
98. Boaz M, Matas Z, Biro A, Katzir Z, Green M, Fainaru M, et al. Serum malondialdehyde and prevalent cardiovascular disease in hemodialysis. *Kidney Int* 1999;56:1078-1083.
99. Duryee MJ, Klassen LW, Schaffert CS, Tuma DJ, Hunter CD, Garvin RP, et al. Malondialdehyde-acetaldehyde adduct is the dominant epitope after MDA modification of proteins in atherosclerosis. *Free Radical Biology and Medicine* 2010;49:1480-1486.
100. Viigimaa M, Abina J, Zemtsovskaya G, Tikhaze A, Konovalova G, Kumskova E, et al. Malondialdehyde-modified low-density lipoproteins as biomarker for atherosclerosis. *Blood Press* 2010;19:164-168.
101. Baker D, Liu P, Burdzy A, Sowers LC. Characterization of the substrate specificity of a human 5-hydroxymethyluracil glycosylase activity. *Chem Res Toxicol* 2002;15:33-39.
102. Chen HJ, Wu CF, Huang JL. Measurement of urinary excretion of 5-hydroxymethyluracil in human by GC/NICI/MS: correlation with cigarette smoking, urinary TBARS and etheno DNA adduct. *Toxicol Lett* 2005;155:403-410.
103. Rogstad DK, Darwanto A, Herring JL, Rogstad KN, Burdzy A, Hadley SR, et al. Measurement of the Incorporation and Repair of Exogenous 5-Hydroxymethyl-2'-deoxyuridine in Human Cells in Culture Using Gas Chromatography-Negative Chemical Ionization-Mass Spectrometry. *Chem Res Toxicol* 2007;20:1787-1796.
104. Chen H-JC, Wu C-F, Huang J-L. Measurement of urinary excretion of 5-hydroxymethyluracil in human by GC/NICI/MS: Correlation with cigarette smoking, urinary TBARS and etheno DNA adduct. *Toxicol Lett* 2005;155:403-410.
105. Wu LL, Chiou CC, Chang PY, Wu JT. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clin Chim Acta* 2004;339:1-9.
106. Harri M, Kasai H, Mori T, Tornaeus J, Savela K, Peltonen K. Analysis of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in urine using high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 2007;853:242-246.
107. Wang D, Kreutzer DA, Essigmann JM. Mutagenicity and repair of oxidative DNA damage: insights from studies using defined lesions. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 1998;400:99-115.
108. Wu LL, Chiou C-C, Chang P-Y, Wu JT. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clin Chim Acta* 2004;339:1-9.
109. Cooke MS, Lunec J, Evans MD. Progress in the analysis of urinary oxidative DNA damage. *Free Radical Biology and Medicine* 2002;33:1601-1614.
110. Mayne ST. Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. *The Journal of nutrition* 2003;133:933S-940S.
111. Morishita Y, Watanabe M, Hirahara I, Akimoto T, Muto S, Kusano E. Level of 8-OHdG in drained dialysate appears to be a marker of peritoneal damage in peritoneal dialysis. *International Journal of Nephrology and Renovascular Disease* 2012;5:9.
112. Saito S, Yamauchi H, Hasui Y, Kurashige J, Ochi H, Yoshida K. Quantitative determination of urinary 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OH-dg) by using ELISA. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 2000;107:39.
113. Hu J, Zhang W, Ma H, Cai Y, Sheng G, Fu J. Simultaneous determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and 5-methyl-2'-deoxycytidine in DNA sample by high performance liquid chromatography/positive electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 2010;878:2765-2769.
114. Malayappan B, Garrett TJ, Segal M, Leeuwenburgh C. Urinary analysis of 8-oxoguanine, 8-oxoguanosine, fapy-guanine and 8-oxo-2'-deoxyguanosine by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry as a measure of oxidative stress. *J Chromatogr A* 2007;1167:54-62.
115. Martinet W, Knaapen MWM, De Meyer GRY, Herman AG, Kockx MM. Elevated levels of oxidative DNA damage and DNA repair enzymes in human atherosclerotic plaques. *Circulation* 2002;106:927-932.
116. Abdel-Rehim M. Recent advances in microextraction by packed sorbent for bioanalysis. *J Chromatogr A* 2010;1217:2569-2580.

117. Shah V, Midha K, Findlay J, Hill H, Hulse J, McGilveray I, et al. Bioanalytical Method Validation—A Revisit with a Decade of Progress. *Pharm Res* 2000;17:1551-1557.
118. Nováková L, Vlčková H. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. *Anal Chim Acta* 2009;656:8-35.
119. Lord HL. Strategies for interfacing solid-phase microextraction with liquid chromatography. *J Chromatogr A* 2007;1152:2-13.
120. Perestrelo R, Nogueira JM, Camara JS. Potentialities of two solventless extraction approaches—stir bar sorptive extraction and headspace solid-phase microextraction for determination of higher alcohol acetates, isoamyl esters and ethyl esters in wines. *Talanta* 2009;80:622-630.
121. Abdel-Rehim M. Microextraction by packed sorbent (MEPS): A tutorial. *Anal Chim Acta* 2011;701:119-128.
122. Gonçalves J, Mendes B, Silva CL, Câmara JS. 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. *J Chromatogr A* 2012;1229:13-23.
123. Vlčková H, Rabatinová M, Mikšová A, Kolouchová G, Mičuda S, Solich P, et al. Determination of pravastatin and pravastatin lactone in rat plasma and urine using UHPLC–MS/MS and microextraction by packed sorbent. *Talanta* 2012;90:22-29.
124. Mendes B, Gonçalves J, Câmara JS. Effectiveness of high-throughput miniaturised sorbent-and solid phase microextraction techniques combined with gas chromatography-mass spectrometry analysis for a rapid screening of volatile and semi-volatile composition of wines—a comparative study. *Talanta* 2011.
125. Waters. BEH (Ethylene Bridged Hybrid) Technology. [cited 2012 25-06-2012]; Available from: http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=134618172&locale=en_PT.
126. Sim AS, Salonikas C, Naidoo D, Wilcken DE. Improved method for plasma malondialdehyde measurement by high-performance liquid chromatography using methyl malondialdehyde as an internal standard. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003;785:337-344.
127. Uppuluri P, Dinakaran H, Thomas DP, Chaturvedi AK, Lopez-Ribot JL. Characteristics of *Candida albicans* biofilms grown in a synthetic urine medium. *J Clin Microbiol* 2009;47:4078-4083.
128. Samanidou VF, Nika MK, Papadoyannis IN. Development of an HPLC method for the monitoring of tricyclic antidepressants in biofluids. *J Sep Sci* 2007;30:2391-2400.
129. Waters. HSS (High Strength Silica) Technology. [cited 2012 25-06-2012]; Available from: <http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=134618105>.
130. Zuo Y, Wang C, Zhou J, Sachdeva A, Ruelos VC. Simultaneous determination of creatinine and uric acid in human urine by high-performance liquid chromatography. *Anal Sci* 2008;24:1589-1592.
131. Botello I, Borrull F, Calull M, Aguilar C, Somsen G, de Jong G. In-line solid-phase extraction—capillary electrophoresis coupled with mass spectrometry for determination of drugs of abuse in human urine. *Anal Bioanal Chem* 2012;403:777-784.
132. Cassiano M, Barreiro J, Martins L, Oliveira R, Cass Q. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. *Quim Nova* 2009;32:1021-1030.
133. Araujo P. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *J Chromatogr B* 2009;877:2224-2234.
134. George SK, Dipu MT, Mehra UR, Singh P, Verma AK, Ramgaokar JS. Improved HPLC method for the simultaneous determination of allantoin, uric acid and creatinine in cattle urine. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2006;832:134-137.
135. da Costa JL, Chasin AAdM. Determination of MDMA, MDEA and MDA in urine by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B* 2004;811:41-45.
136. Zrostlíková J, Hajšlová J, Godula M, Maštovská K. Performance of programmed temperature vaporizer, pulsed splitless and on-column injection techniques in analysis of pesticide residues in plant matrices. *J Chromatogr A* 2001;937:73-86.
137. Peters FT, Drummer OH, Musshoff F. Validation of new methods. *Forensic Sci Int* 2007;165:216-224.

138. Andreassi MG, Botto N. DNA Damage as a New Emerging Risk Factor in Atherosclerosis. *Trends in Cardiovascular Medicine* 2003;13:270-275.
139. Agarwal R, Chase SD. Rapid, fluorimetric–liquid chromatographic determination of malondialdehyde in biological samples. *J Chromatogr B* 2002;775:121-126.

6. Anexos

Anexo I- Composição da SU

Tabela 14- Constituintes da urina sintética

Composição	g L ⁻¹	mg/100mL
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.65	65
MgCl ₂ .6H ₂ O	0.65	65
NaCl	4.6	460
Na ₂ SO ₄	2.3	230
Na ₃ C ₆ H ₈ O ₇ .2H ₂ O	0.65	65
Na ₂ C ₂ O ₄	0.02	2
KH ₂ PO ₄	4.2	420
KCl	1.6	160
NH ₄ Cl	1	100
NH ₂ CONH ₂	25	2500
YNB ^a	5% (v/v) ^b	-
Glucose	2% (m/v) ^c	4000

^a yeast nitrogened base

^b volume/volume

^c massa/volume

Anexo II- Curvas de calibração para os diferentes biomarcadores

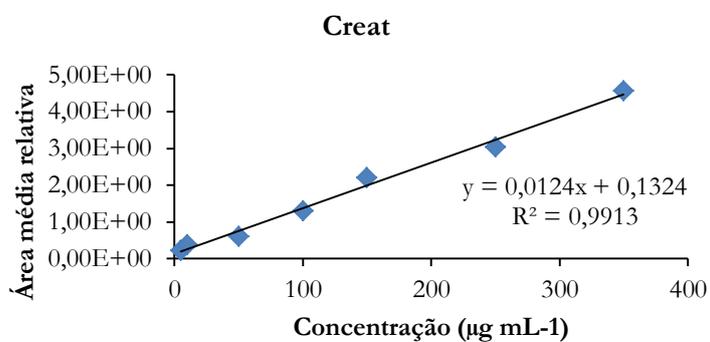


Figura 29- Curva de calibração referente a creatinina

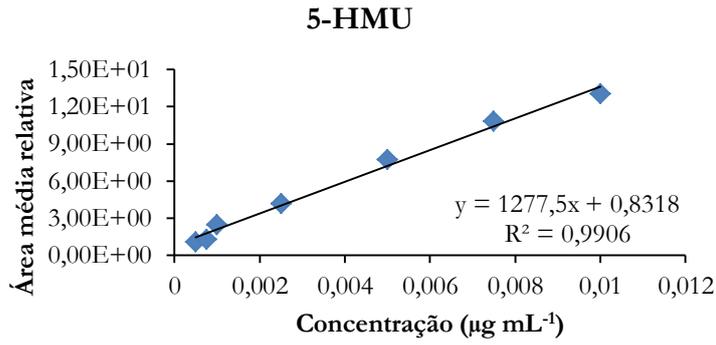


Figura 30-Curva de calibração referente ao 5-HMU

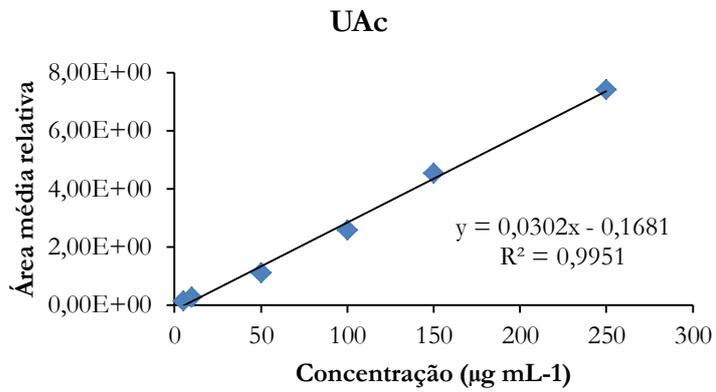


Figura 31-Curva de calibração referente ao UAc

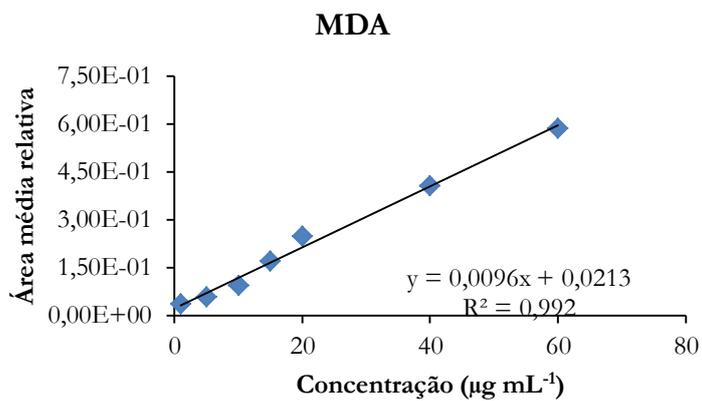


Figura 32- Curva de calibração referente ao MDA

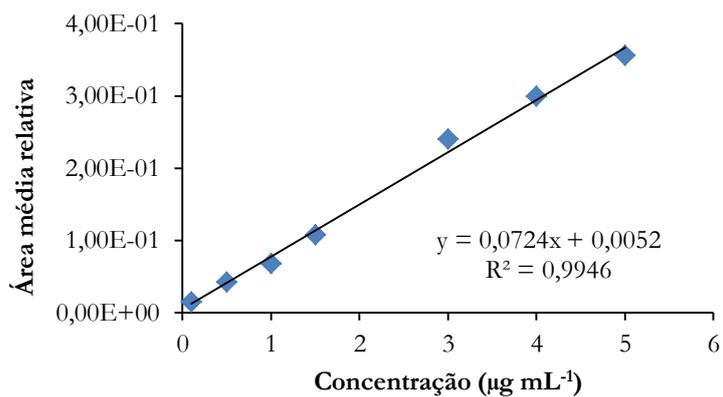


Figura 33-Curva de calibração referente ao 8-OHdG

Anexo III- Teste estatístico One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

Tabela 15-Resultados referente ao teste estatístico One Sample Kolmogorov –Smirnov

		5HMU	UAc	MDA	8-OHdG
N		69	69	69	69
Parametros Normais ^{a,b}	Média	0,000004	0,31	0,11	0,001
	Desvio padrão	0,000002	0,08	0,04	0,001
Diferenças mais extremas	Absoluto	0,17	0,07	0,19	0,15
	Positivo	0,17	0,06	0,19	0,15
	Negativo	-0,12	-0,07	-0,11	-0,11
Kolmogorov-Smirnov Z		1,38	0,59	1,56	1,27
Asymp. Sig. (2-tailed)		0,04	0,88	0,01	0,08

^a Testes com distribuição normal

^b construído apartir dos dados