

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE EDUCAÇÃO FÍSICA**

**MADLA ADAMI DOS PASSOS**

---

**MEDIDA DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE FLUIDOS  
BIOLÓGICOS POR VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL  
ASSOCIADA AO USO DE SURFACTANTE COMO RESPOSTA  
ÀS ADAPTAÇÕES GERADAS PELO EXERCÍCIO.**

---

Campinas  
2009

**MADLA ADAMI DOS PASSOS**

---

---

**MEDIDA DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE FLUIDOS  
BIOLÓGICOS POR VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL  
COMO RESPOSTA ÀS ADAPTAÇÕES GERADAS PELO  
EXERCÍCIO EM HUMANOS**

---

---

Dissertação apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Educação Física, Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre na área de Biodinâmica do Movimento Humano.

**Orientadora: Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo**

Campinas  
2009

## FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA FEF - UNICAMP

P268m      Passos, Madla Adami dos.  
Medida da capacidade antioxidante de fluidos biológicos por voltametria de pulso diferencial associada ao uso de surfactante como resposta às adaptações geradas pelo exercício / Madla Adami dos Passos. - Campinas, SP: [s.n], 2009.

Orientador: Denise Vaz de Macedo.  
Dissertação (mestrado) – Faculdade de Educação Física,  
Universidade Estadual de Campinas.

1. Estresse oxidativo. 2. Overtraining. 3. Voltametria. 4. Plasma. 5. Saliva. I. Macedo, Denise Vaz de. II. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Educação Física. III. Título.

(asm/fef)

**Título em inglês:** Antioxidant capacity measurement of biological fluids by differential pulse voltammetry associated to surfactant as response to generated adaptations by the exercise.

**Palavras-chaves em inglês (Keywords):** Oxidative stress; Antioxidant capacity; Overtraining; Differential pulse voltammetry; Serum; Saliva.

**Área de Concentração:** Biodinâmica do Movimento Humano.

**Titulação:** Mestrado em Educação Física.

**Banca Examinadora:** Denise Vaz de Macedo. Flavio Santos Damos. René Brenzikofer.

**Data da defesa:** 18/02/2009.

**MADLA ADAMI DOS PASSOS**

---

---

**MEDIDA DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE FLUIDOS  
BIOLÓGICOS POR VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL  
ASSOCIADA AO USO DE SURFACTANTE COMO RESPOSTA ÀS  
ADAPTAÇÕES GERADAS PELO EXERCÍCIO.**

---

---

Este exemplar corresponde a redação  
final da Dissertação de Mestrado defendida por  
Madla Adami dos Passos e aprovada pela  
comissão julgadora em 18/02/2009



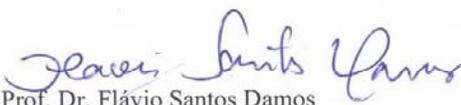
**Prof. Dra. Denise Vaz de Macedo**  
**Orientadora**

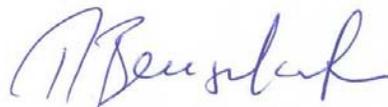
Campinas  
2009

Campinas, 18 de fevereiro de 2009.

**BANCA EXAMINADORA**

  
Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo  
Orientadora

  
Prof. Dr. Flávio Santos Damos

  
Prof. Dr. René Brenzikofer

### ***Dedicatória***

*Aos meus pais Roberto dos Passos e  
Izabel Adami dos Passos. Através do ensinamento e do  
amor de vocês aprendi as coisas realmente mais importantes.*

## *Agradecimentos*

A professora Denise, pela oportunidade de realização deste trabalho, pela orientação atenciosa e confiança depositada.

Ao Armindo, pela co-orientação deste trabalho, pela paciência em responder qualquer questionamento. Sua amizade e apoio em diversos momentos foram fundamentais.

À Rita, pelas ricas contribuições em eletroquímica e ajuda no planejamento dos experimentos.

Ao prof. Lauro Kubota pela oportunidade de realização deste trabalho através de seu laboratório e aos seus alunos por sempre me receberem tão bem.

Ao prof. Flávio, pela leitura crítica e pelas sugestões que muito contribuíram.

Ao prof. René, pela atenção e disponibilidade na observação dos dados.

À Ana Porto, por sempre atender prontamente todas as solicitações.

Ao Neto e a Patrícia, por disponibilizar equipamentos do seu laboratório.

Ao prof. Ademir de Marco pela oportunidade de realização do estágio docente que muito contribui no processo de formação.

Ao pessoal da secretaria, Marina, Mariângela, Simone, Márcia, Maria e César por sempre me atenderem de maneira atenciosa e prestativa.

A todos os amigos do Labex, pelo convívio alegre e harmonioso. À Mirtes e seu violão pela alegria garantida, e especialmente ao Lucas, Dalila e Lázaro, companheiros de muitas coletas.

As amigas, Jú, Déia, Ane, De, Márcia, Fer, Drica, Ana, Leslie, Carol, Michelle, por torcerem por mim e compreenderem a minha ausência em muitos momentos.

À amiga Dalila, por todos os momentos alegres compartilhados durante o mestrado.

Ao Bruno, obrigada por toda atenção, carinho e incentivo. Espero que ainda possamos compartilhar muitas conquistas juntos.

Aos meus pais, Roberto e Izabel, meus irmãos Adso e Érika, pelo incentivo, paciência e apoio incondicional em todos os momentos.

À Capes e CNPq pelo suporte financeiro.

**À Deus ... por me cercar de tantas coisas boas... por tudo.**

*“Agora, pois, que meu espírito se encontra livre de todas as precauções, e que obtive um descanso garantido por uma tranqüila solidão, irei me dedicar com máxima seriedade e plena liberdade a demolir em geral todas as minhas antigas opiniões”.*

*Meditações – René Descartes (1641)*

PASSOS, Madla Adami dos. **Medida da capacidade antioxidante de fluidos biológicos por voltametria de pulso diferencial associada ao uso de surfactante como resposta às adaptações geradas pelo exercício.** Dissertação (Mestrado em Biodinâmica do Movimento Humano)-Faculdade de Educação Física. Universidade Estadual de Campinas, 2009.

## **RESUMO**

---

---

Aumento na formação de espécies reativas de oxigênio como conseqüência do aumento na demanda energética pode aumentar o estado de oxidação celular, contribuindo para um estado redox celular ótimo e o desenvolvimento máximo de força. O poder redutor de amostras biológicas reflete sua capacidade antioxidante, mantida em grande parte pelos antioxidantes de baixo peso molecular (ABPM). Os ABPM agem como agentes redutores, doando elétrons para as espécies radicalares. Podem, dessa forma, ser quantificados por técnicas eletroquímicas. Os ABPM incluem compostos tais como ácido úrico, vitamina C, vitamina E e ácido lipóico. O objetivo do presente estudo foi investigar a aplicabilidade do surfactante catiônico cloreto de cetilpiridina (CPC) como sistema micelar no aperfeiçoamento da técnica de voltametria de pulso diferencial (VPD) para análise de amostras de soro e saliva de humanos. Analisamos ainda a correlação dos dados obtidos com outras metodologias de análise da capacidade antioxidante total. O presente trabalho está dividido em três capítulos. O primeiro capítulo apresenta uma introdução geral sobre o tema, incluindo dentre outros tópicos os mecanismos moleculares envolvidos na adaptação ao treinamento, sistema de defesa antioxidante, a técnica de voltametria de pulso diferencial e ação geral dos surfactantes. O capítulo 2 apresenta os dados das amostras de soro e saliva obtidos por VPD na presença e ausência do CPC. O capítulo 3 apresenta os dados de limite inferior e superior do voltamograma de saliva de 138 sujeitos fisicamente ativos. Os resultados obtidos mostraram que o surfactante CPC aumentou a sensibilidade e estabilidade do sinal voltamétrico, viabilizando a aplicação desse método em amostras de fluidos biológicos como soro e saliva de forma a substituir polimento e prevenindo a passivação gradual do eletrodo de trabalho e perda de sinal voltamétrico. Nossos dados sugerem ainda que o primeiro pico de corrente anódica de ambas as amostras parece ser influenciado principalmente pela concentração de ácido úrico. Os resultados apresentados nesse estudo validam a VPD como uma metodologia para avaliação do estado redox do soro e saliva em resposta ao exercício físico ou a outras situações fisiológicas ou patológicas. Os limites inferior e superior de análise da capacidade antioxidante de saliva determinada pela técnica de VPD associada ao uso de CPC pode contribuir para o monitoramento, adequação, bem como individualizar os programas de treinamento físico, garantindo que a sobrecarga do exercício seja adequada para manutenção da saúde e integridade física.

Palavras-Chaves: voltametria de pulso diferencial, surfactante, estresse oxidativo; capacidade antioxidante; overtraining; plasma; saliva.

PASSOS, Madla Adami dos. **Antioxidant capacity measurement of biological fluids by differential pulse voltammetry associated to surfactant as response to generated adaptations by the exercise.** Dissertação (Mestrado em Educação Física)-Faculdade de Educação Física. Universidade Estadual de Campinas, 2009.

## **ABSTRACT**

---

---

Increasing formation of oxygen reactive species, as a consequence of increasing in the energetic demand, can raise the cellular oxidation state, and it contributes to an optimum cellular redox state and for the development of maximum force. The biological samples reducing power reflects its antioxidant capacity, which is maintained mainly by the low molecular weight antioxidants (LMWA). LMWA act as reducing agents, they donate electrons to radicalar species. They can be, on this way, quantified by electrochemical techniques. LMWA include substances such as uric acid, vitamins C and E vitamin and lipoic acid. The aims of the present work were to investigate the applicability of the surfactant cetilpiridine chloride as a micellar system for the optimization of differential pulse voltammetry technique (DPV) for the analysis of human serum and saliva samples. It was analyzed the correlation of the obtained data with others methodologies. The work is divided in three chapters. Chapter 1 presents a general introduction about the theme, which includes, between other topics: involved molecular mechanisms on physical training adaptation, antioxidant defense system, differential pulse voltammetry and surfactants action. Chapter 2 presents results from serum and saliva samples obtained by DPV technique with and without CPC. Chapter 3 presents data of upper and lower limits from saliva voltamograms of 149 physically active individuals. Acquired data showed that the utilization of cetilpiridine chloride as surfactant increased sensitivity and stability of the voltammetric signal, making possible the use of this method in serum and saliva samples. The use of CCP can replace the polishing and prevent the gradual passivity of the work electrode and loss of voltammetric signal. Our data suggests that the first anodic current peak from both samples is influenced mainly by uric acid concentration. The presented results on this work validate DPV as a methodology to the evaluation of redox state from serum and saliva in response to exercise or pathologic, physiologic conditions. With the saliva antioxidant capacity limits established by DPV method, associated to the use of CPC, it is possible to track, to adequate and to individualize physical training programs, warranting, this way, a correct exercise intensity and maintenance of health and physical integrity.

**Keywords:** differential pulse voltammetry; surfactant, oxidative stress; antioxidant capacity, overtraining; serum, saliva

## **LISTA DE FIGURAS**

---

<b>Capítulo 1</b>		
<b>Figura 1 -</b>	O processo de supercompensação metabólica.	18
<b>Figura 2 -</b>	Mecanismo de defesa antioxidante.	22
<b>Figura 3 -</b>	Modelo de mecanismo de dois componentes redox que limitam a força.	25
<b>Figura 4 -</b>	Célula eletroquímica.	28
<b>Figura 5 -</b>	Voltamograma de Pulso Diferencial.	29
<b>Figura 6 -</b>	Formação de agregado micelar.	31
<b>Capítulo 2</b>		
<b>Figura 1A -</b>	Variações de $E_p$ em soro em diferentes concentrações de CPC.	50
<b>Figura 1B -</b>	Variações de $I_p$ em soro em diferentes concentrações de CPC.	50
<b>Figura 2A -</b>	VPD de soro na presença e na ausência de CPC.	51
<b>Figura 2B -</b>	VPD de saliva na presença e na ausência de CPC.	51
<b>Figura 3A -</b>	Boxplot dos valores de $E_p$ de sete amostras de soro na presença e ausência de CPC.	53
<b>Figura 3B -</b>	Boxplot dos valores de $E_p$ e $I_p$ de sete amostras de soro na presença e ausência de CPC.	53
<b>Figura 3C -</b>	Boxplot dos valores de $E_p$ de sete amostras de saliva na presença e ausência de CPC.	53
<b>Figura 3D -</b>	Boxplot dos valores de $I_p$ de sete amostras de saliva na presença e ausência de CPC.	53

<b>Figura 4A -</b>	Variação dos valores de $E_p$ em vinte voltamogramas subsequentes de soro na presença e ausência de CPC.	54
<b>Figura 4B -</b>	Variação dos valores de $I_p$ em vinte voltamogramas subsequentes de soro na presença e ausência de CPC.	54
<b>Figura 4C -</b>	Variação dos valores de $E_p$ em vinte voltamogramas subsequentes de saliva na presença e ausência de CPC.	54
<b>Figura 4D -</b>	Variação dos valores de $I_p$ em vinte voltamogramas subsequentes de saliva na presença e ausência de CPC.	54
<b>Figura 5 -</b>	Voltamograma representativo da variação entre a primeira e a vigésima medida subsequente em uma amostra de saliva.	55
<b>Figura 6A -</b>	Boxplot dos valores de $E_p$ obtidos de voltamograma de soro em quatro experimentos subsequentes sem o polimento do eletrodo.	56
<b>Figura 6B -</b>	Boxplot dos valores de $I_p$ obtidos de voltamograma de soro em quatro experimentos subsequentes sem o polimento do eletrodo.	56
<b>Figura 6C -</b>	Boxplot dos valores de Área obtidos de voltamograma de soro em quatro experimentos subsequentes sem o polimento do eletrodo.	56
<b>Figura 7A -</b>	Adições de ascorbato em soro na presença de CPC.	57
<b>Figura 7B -</b>	Adições de ascorbato em soro na ausência de CPC.	57
<b>Figura 7C -</b>	Adições de urato em soro na presença de CPC.	58
<b>Figura 7D -</b>	Adições de urato em soro na ausência de CPC.	58
<b>Figura 8 -</b>	Variação da Área do pico em função do aumento da concentração de urato.	59
<b>Figura 9A -</b>	Adições de urato em soro na presença de ascorbato com CPC.	59
<b>Figura 9B -</b>	Adições de urato em soro na presença de ascorbato sem CPC.	59
<b>Figura 10A -</b>	Correlação entre os valores de $I_p$ e ácido úrico em soro.	60
<b>Figura 10B -</b>	Correlação entre os valores de $I_p$ e ácido úrico em saliva.	60

**Capítulo 3**

<b>Figura 1 -</b>	Voltamograma de pulso diferencial de saliva	69
<b>Figura 2A -</b>	Boxplot dos valores de $E_p$ na saliva	70
<b>Figura 2B -</b>	Boxplot dos valores de $I_p$ na saliva	70
<b>Figura 3 -</b>	Frequência dos valores de $I_p$	71

## **LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

---

---

<b>ABPM</b>	Antioxidantes de baixo peso molecular
<b>AMP</b>	Adenosina monofosfato
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>CAT</b>	Catalase
<b>CPC</b>	Cloreto de cetilpiridina
<b>CK</b>	Creatina quinase
<b>Ep</b>	Potencial de pico
<b>EsPCE<sub>x</sub></b>	Escola Preparatória de Cadetes do Exército
<b>EROs</b>	Espécies Reativas e Oxigênio
<b>FOR</b>	<i>Overreaching</i> funcional
<b>NFOR</b>	<i>Overreaching</i> não funcional
<b>GPX</b>	Glutationa Peroxidase
<b>GR</b>	Glutationa redutase
<b>GSH</b>	Glutationa reduzida
<b>GSSG</b>	Glutationa oxidada
<b>HPLC-ED</b>	Cromatografia líquida de alta pressão com detector eletroquímico
<b>Ip</b>	Corrente de pico
<b>Labex</b>	Laboratório de Bioquímica do Exercício
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
<b>PBS</b>	Tampão fosfato em solução salina
<b>P450</b>	Enzima citocromo P450 oxidase
<b>SOD</b>	Enzima superóxido dismutase
<b>VC</b>	Voltametria cíclica
<b>VPD</b>	Voltametria de pulso diferencial

# SUMÁRIO

---

---

<b>RESUMO.....</b>	<b>09</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>10</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>14</b>
<b>CAPÍTULO 1.....</b>	<b>16</b>
<b>1. Introdução Geral.....</b>	<b>17</b>
<b>2. Objetivo Geral.....</b>	<b>34</b>
<b>3. Justificativa.....</b>	<b>35</b>
<b>4. Referências.....</b>	<b>36</b>
<b>CAPÍTULO 2.....</b>	<b>43</b>
<b>1. Introdução.....</b>	<b>45</b>
<b>2. Material e Métodos.....</b>	<b>47</b>
<b>3. Resultados e Discussão.....</b>	<b>50</b>
<b>4. Conclusões.....</b>	<b>61</b>
<b>5. Referências.....</b>	<b>62</b>
<b>CAPÍTULO 3.....</b>	<b>64</b>
<b>1. Introdução.....</b>	<b>65</b>
<b>2. Material e Métodos.....</b>	<b>66</b>
<b>3. Resultados e Discussão.....</b>	<b>68</b>
<b>4. Conclusão.....</b>	<b>72</b>
<b>5. Considerações e Perspectivas.....</b>	<b>72</b>
<b>6. Referências.....</b>	<b>74</b>

# Capítulo 1

---

---

# 1. INTRODUÇÃO GERAL

## 1.1. TREINAMENTO FÍSICO E SUAS CONSEQUÊNCIAS

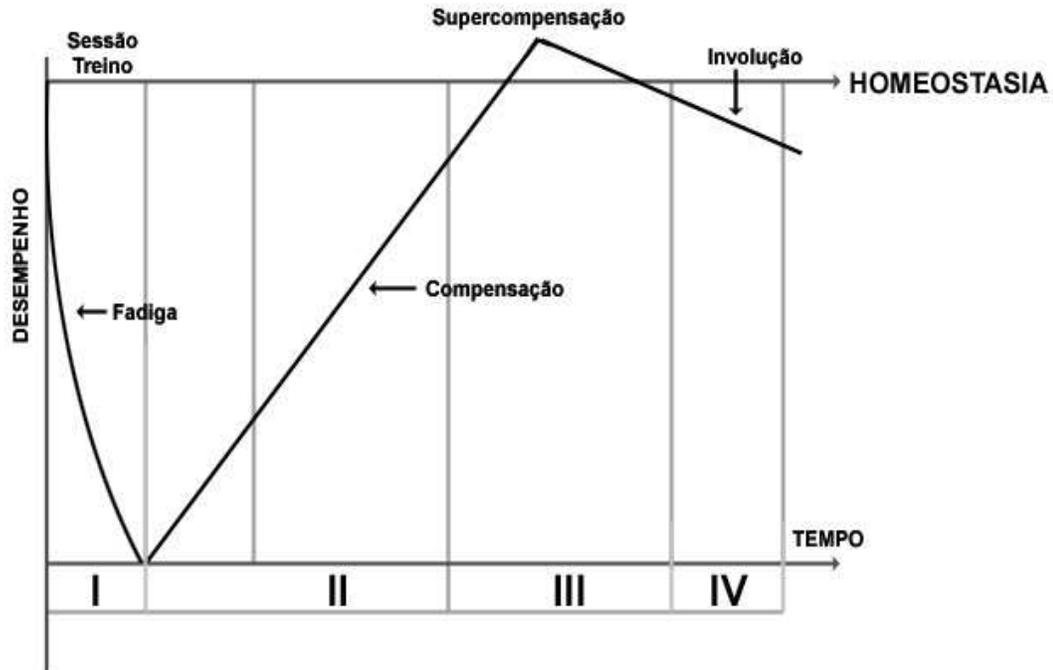
Estímulos físicos específicos, com diferentes frequências, durações e intensidades provocam adaptações orgânicas específicas. Tais adaptações acontecem nos sistemas de ação imediata, como o neuromuscular, vias metabólicas, e em sistemas auxiliares de participação indireta, como o sistema cardiovascular (Weineck, 1999; Bompa, 2001). O aumento no desempenho deve ser a consequência natural adaptativa em resposta as sobrecargas de esforço físico impostas durante uma sessão de treinos.

Conforme mostrado na Figura 1, o estresse induzido pelo exercício é responsável por um distúrbio agudo na homeostasia. Esse estresse aciona respostas integradas entre o sistema nervoso central, endócrino, imune, cardiorespiratório e musculatura esquelética a fim de adequar o fornecimento de  $O_2$  e energia, aumentar a força e resistência muscular, resistência à dor e acuidade mental. Essa fase (Fase I) se relaciona com um estado de fadiga ou incapacidade de manutenção da potência de trabalho esperada (Hultman e Sjöholm, 1986; Bompa, 2001). A Fase I dispara a Fase II, onde se inicia a resposta adaptativa ao estímulo do exercício. Dessa forma, é importante ressaltar que os efeitos benéficos do treinamento físico dependem da qualidade e quantidade de estímulos e também do tempo de descanso entre uma sessão e outra de exercícios.

A resposta adaptativa seguinte à aplicação de sobrecargas de esforço físico constitui-se em um mecanismo evolutivo conservado, através do qual as células defendem-se contra mudanças abruptas e adversas do meio ambiente, adaptando-se positivamente a elas (Welch, 1993). Este é um fato a ser observado na estruturação do treinamento seja de atletas, seja de sujeitos fisicamente ativos: a adaptação positiva acontece na fase de recuperação do esforço, também chamada de período regenerativo (Fases II e III). Quando o tempo de descanso é adequado, é restabelecida uma nova homeostasia celular, refletida em níveis de atividade enzimática e de substratos metabólicos maiores quando comparado aos detectados anteriormente. O ápice da Fase III é chamado de estado de supercompensação metabólica.

Na supercompensação ocorre um melhor suprimento energético, para exercícios que venham a requerer maior mobilização metabólica ou, ao contrário, uma economia de energia, em atividades físicas que já eram habituais no processo de treinamento. Esse é o momento para a

aplicação de novos estímulos de exercícios (Kuipers, 1998). Por outro lado, se não for aplicado um novo estímulo ocorrerá uma involução dos benefícios adquiridos (Fase IV).



**Figura 1.** O processo de supercompensação metabólica. Adaptado de Bompa (1990).

O processo adaptativo em geral induz alteração do *turnover* protéico. Essa alteração pode acontecer pelo aumento da síntese protéica, aumento da meia vida das proteínas intracelulares, ou através dos dois mecanismos simultaneamente (Booth *et al.*, 1991). Ativação gênica pode resultar em alterações da massa muscular, das propriedades contráteis, e de enzimas e efetores das vias metabólicas dependentes do estímulo empregado. De fato, em 2001 Nader e Esser mostraram que diferentes protocolos de exercício resultavam na ativação seletiva das vias sinalizadoras intracelulares. Esses autores propuseram que essa seletividade poderia determinar a adaptação específica induzida pelas diferentes formas de exercício.

Uma via de sinalização protéica muito discutida na literatura, é a alteração no estado redox intracelular induzido pelo aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Em função do aumento na demanda energética, o aumento na produção de EROs acompanha o aumento da atividade contrátil muscular (Finaud *et al.*, 2006, Niels *et al.*, 2005).

Pelo exposto, fica claro que o planejamento de um treino sistematizado deve levar em conta o estado de fadiga normal induzido pelos exercícios, que é reversível (fadiga aguda de treinamento), e o tempo necessário para a supercompensação, quando deveria ser aplicado um novo estímulo. Na teoria parece simples, mas na prática a relação estímulo/descanso ainda é determinada de forma empírica, favorecendo muitas vezes desequilíbrios em favor do estímulo.

Segundo a posição do Colégio Europeu de Ciências do Esporte, em 2006, esse processo contínuo de treinamento intensificado sem a recuperação adequada é denominado de *overtraining* (OT). O OT pode, por sua vez, induzir os estados de *overreaching* de curta duração (*overreaching* funcional - FOR), *overreaching* extremo (*overreaching* não-funcional – NFOR) e a síndrome do *overtraining* (OTS) (Urhausen e Kindermann, 2002). É importante notar que existem várias outras nomenclaturas para relatar, aparentemente o mesmo fenômeno (Halsen e Jeukendrup, 2004).

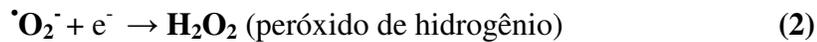
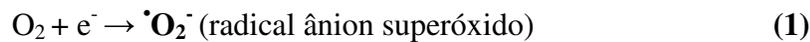
Ainda segundo esta Escola, o estado FOR é caracterizado por uma queda rápida, seguida de uma eventual melhora na *performance*, em um processo que se assemelha à teoria da supercompensação. No estado NFOR a queda na *performance* tem recuperação mais prolongada. Normalmente, é acompanhada de fadiga crônica, além de alterações bioquímicas, imunológicas, fisiológicas e até mesmo comportamentais (Urhausen e Kindermann, 2002). Já a OTS, como o próprio nome diz tem características ainda mais difusas, afetando negativamente vários sistemas. Sua diferenciação do estado NFOR é feita basicamente pelo tempo de recuperação, que é muito lento (Meeusen *et. al.*; 2006).

O principal problema na prática desportiva é que a transição entre fadiga aguda de treinamento e o estado FOR, ou entre o estado NFOR e OTS é bastante tênue (Meeusen *et. al.*; 2006). Ou seja, pequenos descuidos podem levar à instalação da OTS. Dessa forma, compreender melhor as relações entre quantidade ótima de treinamento e os fatores que influenciam na recuperação é um dos grandes desafios dos profissionais da área do esporte.

Os estudos sobre os mecanismos envolvidos nos estados FOR, NFOR e OTS aumentaram nos últimos anos, mas a literatura ainda não apontou dados conclusivos sobre quais marcadores são capazes de diagnosticar e prevenir a instalação dos estados NFOR e OTS (Urhausen e Kindermann, 2002).

## 1.2. EXERCÍCIO FÍSICO E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS)

O  $O_2$  é o aceptor final de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial. O  $O_2$  é uma molécula que tem a particularidade de apresentar dois elétrons desemparelhados e de spins iguais na última camada eletrônica. Essa característica da molécula do  $O_2$ , chamada de restrição de spin impõe que quatro elétrons sejam adicionados na molécula de  $O_2$  um de cada vez para ser totalmente reduzido, conforme mostrado abaixo (Halliwell & Gutteridge, 2007):



Nas mitocôndrias esta redução é feita normalmente no complexo IV. A citocromo oxidase ( $aa_3$ ) catalisa a transferência univalente dos quatro elétrons, produzindo  $H_2O$  como único produto final da reação (Halliwell e Gutteridge, 1989). De fato, este processo contribui com cerca de 95 a 98% do  $O_2$  total consumido pelas células. Uma pequena fração do  $O_2$ , no entanto, sempre é reduzida por apenas um elétron, produzindo radical ânion superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ). A dismutação do  $O_2^{\cdot -}$  é catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD), e produz peróxido de hidrogênio dando início à formação das outras espécies reativas de  $O_2$  (Jenkins e Goldfarb, 1993). As EROS incluem espécies radicalares como o  $\cdot O_2^-$ , e  $\cdot OH$  e não radicalares, como o  $H_2O_2$ .

O aumento na demanda energética e consumo de  $O_2$  em resposta ao exercício comparado à situação de repouso corresponde a cerca de 20 vezes no nível sistêmico e acima de 100 vezes na musculatura, aumentando a produção de  $\cdot O_2^-$  (Astrand e Rodahl, 1986; Meydani *et al.*, 1993). A produção de  $O_2^{\cdot -}$  pode aumentar das seguintes maneiras:

- ✓ Na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, principalmente quando esta se encontra reduzida (numa situação de anóxia muscular) e é "reperfundida" pelo  $O_2$ . Essa situação é freqüente em exercícios de alta intensidade intercalados por pausas;
- ✓ Pela enzima xantina oxidase, ativada na mesma situação descrita anteriormente, quando predominam uma baixa concentração de ATP e altas concentrações de AMP;

- ✓ Pela enzima citocromo P450 oxidase, que parece ter efeito compensatório com a perda de óxido nítrico (NO) na manutenção do fluxo sanguíneo para o trabalho muscular. Neste caso a P450 está ligada à liberação de bradicinina, um agente vasodilatador (Sjödin *et al.*, 1990; Hillig *et al.*, 2003);
- ✓ Pela enzima NAD(P)H oxidase, presente na superfície celular dos neutrófilos e macrófagos, responsáveis por um processo conhecido como *burst* respiratório.
- ✓ Pela auto-oxidação da hemoglobina;

A presença de  $Fe^{2+}$  (na forma livre ou ligado ao grupo heme) pode, através da reação de Fenton converter o  $H_2O_2$  em  $\cdot OH$ . Além disso,  $\cdot O_2^-$  e  $H_2O_2$  também podem produzir  $\cdot OH$ , através da reação de Haber-Weiss. O  $\cdot OH$  é uma das espécies mais reativas que se conhece (Halliwell e Gutteridge, 1999).

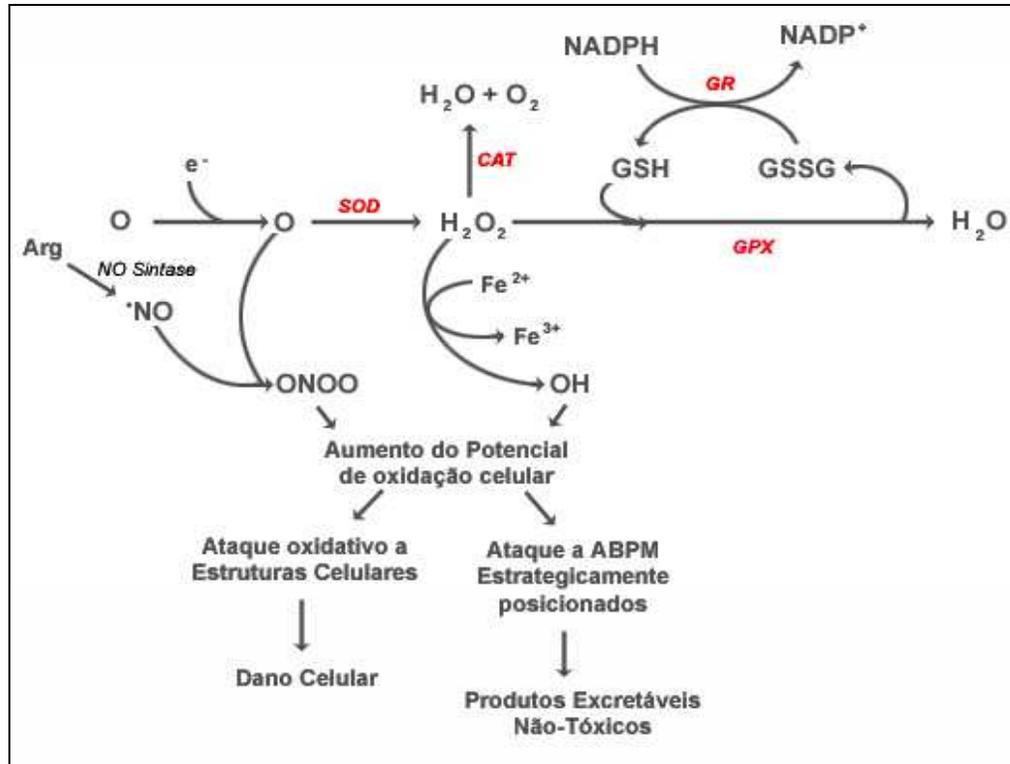
Os músculos esqueléticos também produzem óxido nítrico (NO), pela reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (Reid, 1996). O óxido nítrico pode reagir com  $\cdot O_2^-$  formando peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), um intermediário estável que pode se decompor em um poderoso oxidante, com reatividade similar ao  $\cdot OH$  (Beckman *et al.*, 1990).

As EROs são mais reativas que a molécula de  $O_2$ , ou seja, atuam como oxidantes, sendo capazes de influenciar positivamente ou negativamente processos intracelulares. Aumentos fisiológicos na produção de EROs parecem modular diferentes funções celulares tais como resposta do sistema imune, sinalização celular, transdução de sinal, modulação da atividade enzimática e função contrátil do músculo esquelético (Reid 2001, Vollaard *et al.*, 2005).

### 1.3. SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE

Antioxidantes são substâncias presentes em baixas concentrações no organismo, capazes de inibir ou reduzir o dano oxidativo gerado por EROs. O mecanismo de ação dos antioxidantes acontece de diferentes formas: minimizando a formação de EROs, removendo íons metálicos capazes de produzir EROs, através do reparo de moléculas lesadas, destruição de moléculas danificadas e substituição por novas.

A Figura 2 apresenta o mecanismo de ação do sistema de defesa antioxidante frente ao aumento na produção de EROs.



**Figura 2.** Mecanismo de ação do sistema antioxidante frente ao aumento da produção de EROs.

Três enzimas específicas para EROs degradam seletivamente espécies moleculares individuais, acelerando reações de conversão que ocorrem espontaneamente (Reid, 2001). A enzima superóxido dismutase (SOD) catalisa a dismutação do  $\cdot O_2^-$  a  $H_2O_2$ . A SOD citosólica contém um átomo de cobre e outro de zinco (CuZnSOD) no seu sítio ativo, enquanto a isoforma mitocondrial é dependente de manganês (MnSOD).

O  $H_2O_2$  é reduzido enzimaticamente a  $H_2O$  e  $O_2$  pela enzima catalase (CAT). A outra enzima responsável pela detoxificação do  $H_2O_2$ , glutathione peroxidase (GPX), tem menos especificidade para o substrato, reduzindo também hidroperóxidos a álcool. Os  $K_m$  (constante de Michaelis-Menten) que indicam a afinidade da CAT e GPX para  $H_2O_2$  são diferentes. Enquanto a GPX atinge sua  $V_{max}$  em baixas concentrações, a CAT só atinge sua velocidade máxima de catálise em altas concentrações de  $H_2O_2$ . (Powers *et al.*, 1999). Não existe sistema enzimático para eliminar  $\cdot OH$ .

Nas duas reações catalisadas pela GPX a glutathiona reduzida (GSH) funciona como doador de elétrons. A glutathiona oxidada (GSSG) formada nesta reação é reduzida a GSH à custa de NADPH, pela ação da enzima glutathiona redutase (GR). Todas essas quatro enzimas são expressas constitutivamente pelos músculos. Entretanto, sua distribuição tende a variar de acordo com as propriedades metabólicas, exibindo atividades maiores em fibras do tipo I, oxidativas (Powers *et al*, 1999). Não existe sistema enzimático para eliminar  $\cdot\text{OH}$ .

Além da atuação das enzimas, o sistema de defesa antioxidante conta com a participação de antioxidantes não enzimáticos, conhecidos como antioxidantes de baixo peso molecular (ABPM). Os ABPM também são muito importantes na proteção contra EROs, pois estão presentes nas células e fluidos em concentrações muito maiores do que as enzimas. Os ABPM podem ser sintetizados endogenamente, podem ser restos metabólicos, ou advir da alimentação. Como os ABPM podem ser hidrofílicos ou lipofílicos, estão presentes nos locais específicos em que os danos causados por estresse oxidativo podem ocorrer, exercendo um papel fundamental para a capacidade antioxidante total dos sistemas biológicos (Halliwell e Guttridge, 1999; Gandra, 2004).

As células musculares como a de outros tecidos e os fluidos corporais (plasma, saliva, sêmen) possuem antioxidantes não enzimáticos importantes tais como: glutathiona reduzida (GSH), cisteína, ácido úrico, bilirrubina, coenzima Q, ácido lipóico, vitamina C e vitamina E dentre outros.

A GSH, além de tamponar peróxidos pela reação catalisada pela GPX também exerce um papel de regenerar as formas radicalares das vitaminas C e E. Além disso, inativa uma variedade de espécies oxidantes diretamente, sendo um dos mais importantes antioxidantes celulares. (Blokina, 2003).

O ácido úrico é o produto final do metabolismo das purinas, e pode ser produzido em concentrações relativamente altas no organismo humano. O ácido úrico plasmático pode difundir-se no interior do tecido muscular, sendo que sua concentração no organismo também é influenciada pela dieta (Benzie, 2000; Cutler, 1991; Waring, 2003). Alguns estudos têm proposto que o ácido úrico representa a maior parte (>50%) da capacidade antioxidante (Wainer, 1987). No plasma e no músculo é um dos mais importantes antioxidantes com ação direta sobre o oxigênio singlete, radical hidroxila, e peroxinitrito. Auxilia também na proteção de eritrócitos,

membrana celular, ácido hialurônico e DNA, além de estabilizar complexos de íons ferro, impedindo a peroxidação lipídica, protegendo dessa forma as vitaminas C e E de oxidação.

A vitamina C ou ácido ascórbico é um antioxidante hidrossolúvel dos mais estudados. Está presente em condições fisiológicas na forma reduzida (ascorbato). A vitamina C distribui-se na fase aquosa, seqüestrando EROs diretamente e neutralizando a ação do oxigênio singlete e  $\cdot\text{OH}$ . Provavelmente é o mais importante antioxidante extracelular, embora também possua ação efetiva no citosol. Sua concentração é maior nos tecidos onde a produção de espécies reativas é acentuada. (Finaud *et al.*, 2006). Atua também facilitando o ciclo redox da vitamina E e GSH.

A vitamina E é um antioxidante lipossolúvel que possui várias isoformas, conhecidas como tocoferóis. O  $\alpha$ -tocoferol é a forma mais ativa e abundante. Por ser hidrofóbica protege as membranas contra oxidação. A vitamina E ou  $\alpha$ -tocoferol tem a propriedade de inibir a peroxidação lipídica (Coombers, 2001).

#### **1.4. EXERCÍCIO FÍSICO E ESTADO REDOX CELULAR**

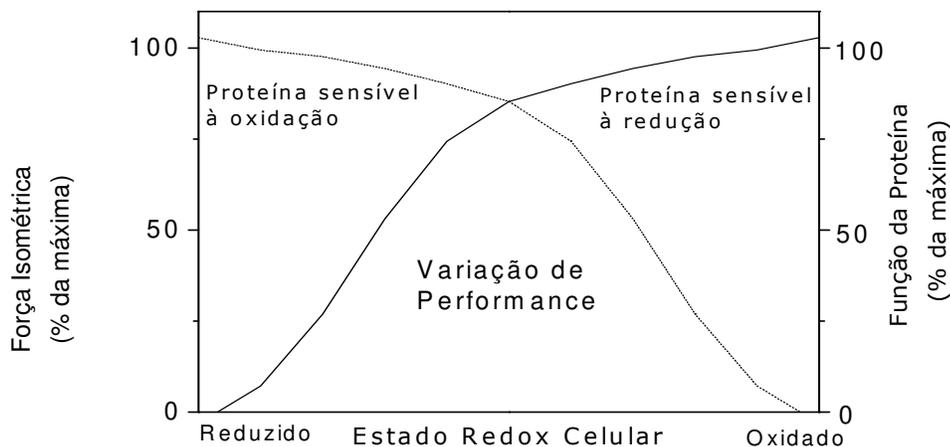
Como o aumento na produção de EROs é conseqüência do aumento nos níveis de atividade física, a sobrevivência celular frente ao ataque das espécies reativas dependerá de um equilíbrio entre os processos de produção e a ação do sistema de defesa antioxidante. Qualquer circunstância que desequilibre estes dois processos induzirá a instalação de uma condição chamada de estresse oxidativo, quando prevalece a formação de oxidantes aos antioxidantes (Alessio, 1993). Neste caso, o acúmulo de reações de oxidação pode induzir alterações severas em várias estruturas celulares, inclusive nas enzimas antioxidantes, contribuindo para o dano ou mesmo morte celular.

Uma das propostas discutidas atualmente na literatura em relação ao exercício físico, e que está aparentemente envolvida com esses dois estados antagônicos, FOR e NFOR envolve a alteração no estado redox intracelular (Sjödin *et al.*, 1990; Alessio, 1993; Smolka *et al.*, 2000; Reid, 2001; Reid e Durham, 2002).

Na metade da década de 90 começou a ser proposto com maior ênfase na literatura que as EROs seriam capazes de produzir um efeito bifásico sobre as funções contráteis de músculos esqueléticos não fadigados (Reid *et al.*, 1993; Reid, 2001). Mostrou-se que baixos níveis de

EROs, presentes em condições basais, eram essenciais para a produção normal de força. Contrariamente ao que se imaginava anteriormente, um aumento modesto na produção de EROs aumentava a força produzida. Este efeito positivo era revertido com concentrações mais elevadas de EROs, sendo que a diminuição na produção de força era tempo e dose-dependentes. Esses efeitos negativos, por sua vez, eram inibidos pelo pré-tratamento do músculo com antioxidantes e revertidos pela administração de agentes redutores (Reid *et al.*, 1996; Reid, 2001).

Todas essas observações levaram à proposição do modelo homeostático do estado redox celular representado na Figura 3. Este modelo assume que o estado redox citosólico é uma variável regulada fisiologicamente, balanceada pela produção de oxidantes e capacidade de tamponamento antioxidante, predizendo que existe um estado redox intracelular que é ótimo para a geração de força.



**Figura 3.** Modelo de mecanismo de dois componentes redox que limitam a força isométrica. As linhas representam a alteração funcional de duas proteínas hipotéticas reguladoras da contração muscular. Uma é limitada pela oxidação, outra pela redução. O modelo assume que ambas são essenciais para o desenvolvimento da força, embora tenham efeito independentes. Adaptado de Reid (2001).

Embora ainda não se conheça o mecanismo exato pelo qual a contração muscular é regulada pelo estado redox, a literatura apresenta algumas hipóteses. A primeira está relacionada ao metabolismo do cálcio. Estudos têm apontado que o aumento das EROS tem como consequência um aumento na liberação de  $\text{Ca}^{2+}$ , gerando um maior número de pontes cruzadas entre actina e miosina alterando o mecanismo de contração muscular. Sugere-se também que o estado redox poderia alterar a atividade da enzima  $\text{Ca}^{2+}/\text{ATPase}$ , regulando a retirada do cálcio citossólico (Sen *et al.*, 1995). Outra possibilidade apontada é que os miofilamentos,

principalmente de miosina e troponina podem ser sensíveis a modulação redox por apresentarem grande quantidade de grupamentos tiólicos. (Hamilton, 2000; Finaud *et al.* 2006). Além disso, parece que o potencial de ação para a contração muscular pode ser modificado pelas EROs (Sen *et al.*, 1995).

### **1.5. EFEITOS DO TREINAMENTO SOBRE O SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE**

A literatura apresenta estudos utilizando os mais diversos protocolos de treinamento em animais ou humanos mostrando tanto aumento quanto diminuição na atividade das enzimas da defesa antioxidante, principalmente em função do protocolo de exercício utilizado (Ji, 1992; Sen, 1995; Essig e Nosek, 1997; Smolka *et al.*, 2000; Ji, 2002). Esses efeitos antagônicos reforçam a proposta de modulação da atividade dessas enzimas pela concentração de EROs produzida (Reid, 2001; Ji, 2002).

O estudo da variação dos níveis de ABPM no exercício ainda é pouco descrito, principalmente em sujeitos submetidos a treinamento físico sistematizado, sendo normalmente sua variação relatada após sessões únicas de exercícios. Nesse sentido, foi mostrado que altas concentrações de ácido úrico parecem estar associadas com o aumento da capacidade antioxidante e redução dos níveis de estresse oxidativo durante o exercício agudo. (Waring, 2003). Dados obtidos no nosso laboratório, considerando os efeitos da suplementação com antioxidantes mostraram que ocorre melhora da capacidade antioxidante e redução dos níveis de estresse oxidativo, mas que essa melhora não se correlaciona com aumentos na performance (Zoppi *et al.*, 2006). Além disso, grandes quantidades de antioxidantes podem exercer efeitos negativos (Palazzetti *et al.*; 2003 ; Waring, 2003)

### **1.6. MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE ABPMs.**

O grande número de antioxidantes presentes nos fluidos e tecidos humanos torna praticamente inviável a medida de cada antioxidante separadamente. Portanto, muitos métodos têm sido desenvolvidos para medida da capacidade antioxidante total de plasma ou de outras

amostras biológicas (Cao e Prior, 1998; Janaszewska e Bartos, 2002). As vantagens desses métodos sobre a dosagem de cada antioxidante separadamente é que levam em conta o sinergismo entre todos os componentes do sistema, já que este mecanismo de interação é bastante complexo (Ghiselli *et al.*, 1995; Cao 1998), além disso, a interpretação de valores resultantes de um único marcador pode ser uma fonte de erro (Finaud *et al.*, 2006).

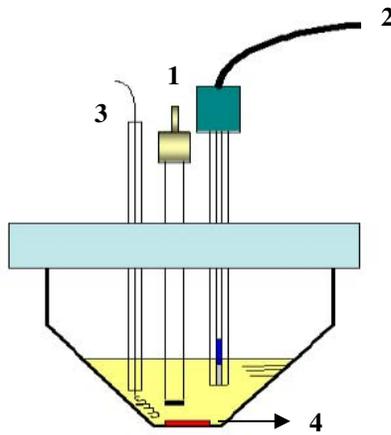
A literatura apresenta diferentes métodos para medir a capacidade antioxidante total, que podem ser divididos em métodos indiretos e diretos (Kohen e Nyska, 2002). Todos apresentam limitações, pois nenhum deles leva em consideração todas as reações paralelas (Prior e Cao, 1999; Brainina *et al.*, 2007). O artigo de revisão de Gandra e colaboradores (2004) apresenta as principais características de alguns desses métodos descritos para dosagem da capacidade antioxidante total.

A técnica eletroquímica voltametria constitui um método direto de análise do poder redutor de uma amostra, pois abrange todos os processos químicos que envolvem transferência de elétrons. Essas técnicas possuem como base a variação da corrente anódica ou catódica em função do potencial aplicado no eletrodo. De um modo geral são utilizados eletrodos de trabalho, no qual se varia o potencial elétrico em relação ao eletrodo de referência, de potencial constante. Para que seja possível determinar um analito por voltametria, é desejável que o mesmo seja eletroativo, ou seja, que oxide ou reduza em uma região de potencial aplicado, na qual a transferência de elétrons seja favorável termodinamicamente ou cineticamente, criando-se um fluxo de elétrons. A utilização das técnicas voltamétricas possibilita o registro da capacidade da amostra em doar elétrons, refletindo a atividade dos antioxidantes de baixo peso molecular presentes na amostra.

Existem diferentes tipos de técnicas voltamétricas descritas na literatura, utilizadas normalmente para estudar a transferência de elétrons entre moléculas e eletrodos, não necessariamente em fluidos biológicos. Recentemente Chevion e colaboradores desenvolveram uma metodologia utilizando voltametria cíclica (VC) para determinação da capacidade antioxidante de ABPM hidrofílicos e lipofílicos do plasma. Até então, a VC havia sido utilizada para determinar a capacidade antioxidante de saliva (Kohen *et al.*, 2000), homogenatos de tecidos e para quantificar danos causados por oxidação (Chevion, 1997). Contudo a voltametria cíclica (VC) apresenta menor sensibilidade quando comparada a outras técnicas eletroanalíticas como voltametria de pulso diferencial (VPD), voltametria de onda quadrada (VOQ) ou amperometria.

## 1.7. VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL

A voltametria de pulso diferencial (VPD) é uma técnica de maior sensibilidade por não sofrer influências da corrente capacitiva, apresentando vantagens em relação à VC. As medidas são realizadas em uma célula eletroquímica constituída por três eletrodos: um eletrodo de trabalho, um eletrodo de referência e um eletrodo auxiliar, que tem a função de minimizar os efeitos da corrente elétrica sobre o eletrodo de referência. O modelo representativo da célula eletroquímica está apresentado na Figura 4.



**Figura 4.** Célula eletroquímica composta por três eletrodos: Eletrodo de trabalho de carbono vítreo (1), eletrodo de referência de calomelano (2) e contra-eletrodo de platina (3) e barra magnética (4).

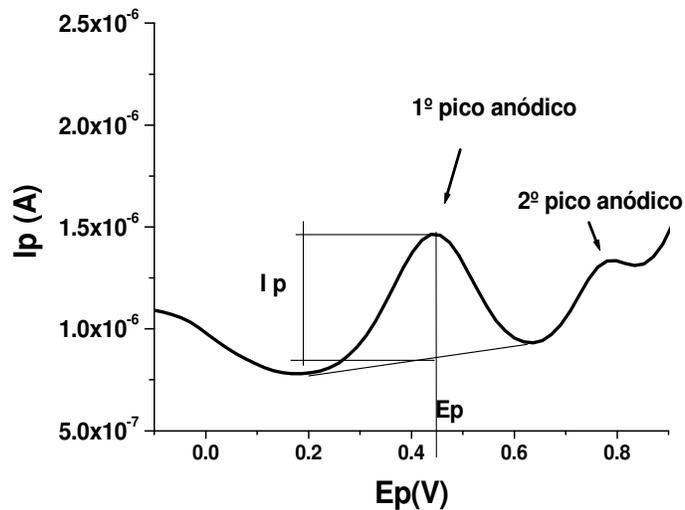
As reações eletródicas (processos de oxidação e redução) ocorrem na interface eletrodo-solução gerando corrente elétrica, que é medida em função da aplicação controlada de um potencial (Pacheco 2004). O potencial é aplicado entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência na forma de pulsos em varredura, ou seja, variando-o a uma velocidade constante em função do tempo. O potencial e a corrente resultantes são registrados simultaneamente.

Para o estudo de agentes redutores o potencial deve ser aplicado no sentido de maiores potências, sendo analisada a corrente anódica. A curva obtida pela variação da corrente (eixo y) versus a variação de potencial (eixo x) compõe o voltamograma (figura 5). Os antioxidantes perdem seus elétrons a um potencial específico para o eletrodo de trabalho, que se apresenta com carga positiva, registrando picos de corrente anódica no voltamograma. Quando a região próxima

da superfície do eletrodo de trabalho está escassa de elementos passíveis de se oxidarem, observa-se a diminuição da corrente (Mabbott, 1983; Kissinger e Heineman, 1983).

A escolha do tipo de eletrodo de trabalho depende da faixa de potencial que se pretende estudar. Eletrodos de carbono vítreo, que atuam no intervalo de  $-0,5$  V a  $+1,1$  V contra o eletrodo padrão de calomelano, são adequados para determinar a capacidade antioxidante de amostras biológicas.

A Figura 5 apresenta um voltamograma representativo de amostra de plasma obtido em nosso laboratório.



**Figura 5.** – Voltamograma de Pulso Diferencial obtido de plasma diluído em PBS (1:4).

Observa-se um pico de corrente anódica principal a uma voltagem de 440 mV e um segundo pico encontrado em um potencial aproximado de 780 mV.

O potencial de pico  $E_p$  é o potencial correspondente ao ponto máximo do pico, e serve para identificar a espécie eletroativa. No caso de amostras biológicas, diferentes compostos com  $E_p$  próximos podem causar a sobreposição de picos de corrente anódica, implicando na formação de um pico composto por diferentes antioxidantes, que apresentará um valor de  $E_p$  característico, dado em função da concentração de cada antioxidante que compõem o pico.

O valor da corrente de pico ( $I_p$ ) anódica é dependente da concentração de antioxidantes que compõem cada pico de corrente anódica, permitindo a sua determinação quantitativa. Para a determinação do valor de  $I_p$  pode ser usado como linha de base o voltamograma do tampão utilizado na amostra (Mabbott, 1983), ou uma reta unindo os valores de mínima do pico

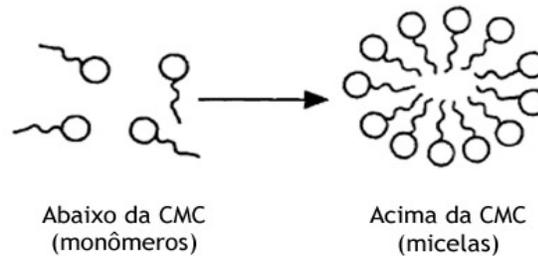
(Kissinger e Heineman, 1996). Mede-se a altura a partir da reta tangente à base até o ponto máximo do pico. Essa altura, medida em unidades de corrente corresponde ao valor de  $I_p$ , conforme está mostrado na Figura 5. Assim, o parâmetro ajustado é o potencial, e o parâmetro medido é a corrente resultante.

Na aplicação em fluidos biológicos e homogenatos de tecidos deve ser dada atenção especial no polimento do eletrodo de trabalho. Isso porque as grandes quantidades de proteínas presentes nas amostras se aderem com facilidade na superfície do eletrodo, interferindo diretamente no resultado. Assim, antes de cada análise deve ser feito o polimento do eletrodo para manter sua sensibilidade, o que aumenta o tempo necessário para as medidas (Chevion *et al.*, 1997, 2000). Variáveis como a temperatura, a concentração dos tampões utilizados, os reagentes utilizados na extração da amostra biológica, o tamanho do eletrodo de trabalho e o tipo do eletrodo de referência também podem influenciar nos resultados obtidos (Gandra *et al.*, 2004).

## 1.8. SURFACTANTES

Surfactantes são moléculas anfifílicas, também denominadas de tensoativos ou detergentes, que formam agregados em água. Atuam reduzindo a tensão superficial de uma interface e aumentando sua área de contato sob pressão e temperatura constantes (Attwood e Florence, 1983; le Maire *et al.*, 2000).

A propriedade fundamental dos surfactantes se caracteriza pela capacidade de formar micelas. Micelas podem ser definidas como agregados coloidais estáveis termodinamicamente formados espontaneamente na presença de água acima de uma estreita faixa de concentração (Helenius *et al.*, 1975), conforme mostrado na Figura 6. Por serem moléculas anfifílicas os surfactantes possuem duas regiões: a região polar ou hidrofílica da molécula, que pode ser carregada ou simplesmente formar ligações de hidrogênio com a água. A porção hidrofóbica é normalmente uma cadeia de hidrocarboneto flexível que se agrega na água devido a interações hidrofóbicas (Tanford, 1980). Essas propriedades permitem que os surfactantes sejam solúveis em água. A natureza dual dessas moléculas é responsável pelos fenômenos de surfatção, micelização e solubilização de proteínas e lipídios de membrana (Attwood e Florence, 1983; Bhairi, 2001; Privé, 2007).



**Figura 6.** – Mecanismo de formação do agregado micelar

A estreita faixa de concentração a partir da qual as primeiras micelas são formadas é chamada de concentração micelar crítica, ou CMC (Tanford, 1980). A CMC depende da estrutura do tensoativo (tamanho da cadeia do hidrocarboneto) e das condições experimentais (força iônica, contra-íons, temperatura, etc). Esta faixa de concentração é característica para cada surfactante.

Outras características importantes relativas à associação molecular dos surfactantes são o número de agregação (numero de monômeros por micela), o tamanho das micelas e o balanço hidrofílico-lipofílico (HLB), que varia entre 1 a 20 e reflete a fração ocupada pela cauda hidrofóbica em relação à cabeça polar da molécula. Quanto maior o número de HLB, mais lipofílico é o surfactante (Griffin, 1949).

Em função da natureza do grupo hidrofílico (cabeça polar) os surfactantes podem ser classificados em: não-iônicos e iônicos (catiônicos, aniônicos) e zwitteriônicos (Bhairi, 2001).

### 1.8.1. SURFACTANTE NÃO-IÔNICOS

Os surfactante não-iônicos não contém carga. No entanto, apresentam grupos altamente hidrofílicos na cabeça polar. Em geral a porção polar da molécula é formada por polioxietilenos ou grupos glicosídios (Ex: Brij, Triton X-100, Tween CxEy, dodecyl- $\beta$ -D-maltosídeo, digitonina) Esses surfactante apresentam melhores resultados para quebrar interações entre lipídios e entre lipídios e proteínas, do que interações entre proteínas. Por esse motivo são considerados como surfactantes moderados ou não-desnaturantes, sendo amplamente usados no isolamento de proteínas de membrana em suas formas biologicamente ativas (Mattsson *et al.*, 1994).

### 1.8.2. SURFACTANTES IÔNICOS

Os surfactantes iônicos contêm uma cabeça polar carregada positivamente (catiônicos) ou negativamente (aniônicos). Os exemplos mais clássicos são o SDS, que contém carga negativa no seu grupo sulfato, e o CTAB, que contém uma carga positiva no seu grupo trimetilamônio. Os surfactantes iônicos contêm uma cadeia de hidrocarboneto (SDS e o CTAB), ou uma estrutura esteroideal rígida como o colato de sódio (sal biliar) (Bhairi e Mohan, 2007).

Os sais biliares são surfactantes aniônicos que contêm um rígido grupo hidrofóbico esteroideal. A parte hidrofílica apresenta o grupo carboxila no final da pequena cadeia alquila, e grupos hidroxila na estrutura esteroideal, formando uma cabeça polar não bem definida. Sais biliares formam pequenos agregados. Como surfactantes iônicos, o tamanho das micelas é influenciado pela concentração do íon. Devido ao baixo pKa (5-6) e baixa solubilidade dos sais biliares não conjugados (colato, desoxicolato e ursodesoxicolato) sua utilidade é limitada ao pH alcalino. (Alba *et al.*, 1995, Bhairi e Mohan, 2007).

Os surfactantes zwitteriônicos apresentam propriedades combinadas de surfactante iônicos e não-iônicos, de acordo com o pH do meio. Como os não-iônicos não apresentam uma carga líquida; têm baixa condutividade e mobilidade eletroforética e não se ligam em resinas de troca iônica (Ex: CHAPS, SB 3-10, ASB) (Chevallet *et al.*, 1998).

### 1.9. APLICAÇÃO DE SURFACTANTES NO APRIMORAMENTO DE TÉCNICAS VOLTAMÉTRICAS

O uso de surfactantes em química analítica permite a melhoria da sensibilidade e/ou seletividade analítica devido, principalmente, à sua capacidade em modificar o meio reacional, permitindo solubilizar espécies de baixa solubilidade ou promover um novo meio, que pode modificar a velocidade reacional, a posição de equilíbrio das reações químicas dependendo da natureza da reação, do tipo de reativo (eletrofílico, nucleofílico) e do tipo e forma da micela (catiônica, aniônica) (Pelizzetti, 1985). Permite ainda a formação de ambientes organizados, também conhecidos como ambientes micelares (Pramauro, 1988).

A utilização de ambientes micelares pode ser destacada em função de dois fatores. O primeiro está relacionado à exploração das características do ambiente micelar formado no meio reacional, que pode resultar em melhoria da sensibilidade e/ou seletividade, com ênfase nas reações catalíticas, e o segundo se relaciona a etapas de concentração e/ou separação. A utilização de surfactantes pode substituir as metodologias tradicionais (extração líquido-líquido, troca iônica) pela separação em duas fases isotrópicas, fenômeno este denominado “*cloud point*”.

As micelas são termodinamicamente estáveis e facilmente reproduzíveis. São destruídas pela diluição com água quando a concentração do tensoativo ficar abaixo da CMC (Pramauro, 1988). O processo de formação dos agregados ocorre num intervalo pequeno de concentrações, resultando em uma variação brusca das propriedades físico-químicas da solução como tensão superficial, pressão osmótica e condutividade (no caso de surfactantes iônicos).

Os sistemas micelares podem modificar a velocidade das reações, porém, estas características ainda foram pouco exploradas na de métodos cinéticos de análises.

Um surfactante catiônico como o cloreto de cetilpiridina (CPC) possui em geral a fórmula  $R_nX^+$ , onde R representa uma ou mais cadeias hidrofóbicas, X é um elemento capaz de formar uma estrutura catiônica. A micela catiônica pode catalisar a reação entre um ânion nucleofílico e um substrato neutro, por meio do deslocamento da carga negativa que se gera na etapa de transição, e como consequência, diminuir a energia de ativação da mesma. Pode também catalisar esta reação aumentando a concentração do ânion nucleófilo na interface micela-água, perto do centro reativo do substrato. (Maniasso 2001).

O efeito da concentração dos reativos na pseudofase micelar permitiu a aplicação de um método cinético para a determinação de aminas, fenóis, tióis, hidrazinas, mediante sua reação com 1-flúor-2,4-dinitrobenzeno (FDNB), utilizando eletrodo seletivo para quantificar os íons fluoretos liberados (Gerakis *et al.*, 2000). A presença do surfactante catiônico (CTAB) produziu um aumento de 16 vezes na velocidade de reação no caso mais favorável (triptofano). Este efeito acelerador proporcionado pelas micelas de CTAB foi utilizado também para a determinação cinética de compostos fenólicos e de vários aminoácidos (Gerakis *et al.*, 2000).

Resumindo, o uso de micelas oferece interessantes perspectivas na área dos métodos cinéticos de análises, podendo auxiliar no desenvolvimento de novos métodos ou na modificação e aprimoramento dos métodos já existentes (Maniasso 2001).

## **2. OBJETIVOS**

Os objetivos do presente estudo foram verificar o efeito do surfactante cloreto de cetilpiridina (CPC) na melhoria da técnica de voltametria de pulso diferencial (VPD) para a determinação da capacidade antioxidante em plasma e saliva. Verificamos ainda a correlação dos dados obtidos com essa técnica padronizada do sangue e saliva de jogadores de futebol com outras metodologias de análise da capacidade antioxidante total.

### **2.1. Objetivos Específicos:**

- ✓ Padronizar a aplicação da técnica voltametria de pulso diferencial para determinação de antioxidantes de baixo peso molecular em fluidos biológicos.
- ✓ Investigar a aplicabilidade do surfactante cloreto de cetilpiridina (CPC) no aperfeiçoamento da técnica de VPD para análise de amostras biológicas.
- ✓ Aplicar a técnica de voltametria de pulso diferencial para análise da capacidade antioxidante no soro e na saliva de atletas submetidos ao treinamento físico
- ✓ Verificar a possível correlação do método voltametria de pulso diferencial para determinação de antioxidantes de baixo peso molecular com outros métodos descritos na literatura.

### 3. JUSTIFICATIVA

A utilização de amostras de sangue e saliva apresenta uma enorme vantagem em relação a práticas como a biópsia para realizar um acompanhamento das capacidades antioxidantes em humanos relacionados com o treinamento. O estudo dos efeitos do treinamento físico sistematizado sobre ABPM através da técnica de voltametria de pulso diferencial é muito promissor. É uma técnica pouco invasiva, bastante sensível e precisa, permitindo o monitoramento e a adoção rápida das intervenções necessárias para maximizar o efeito do treinamento físico.

Nós desconhecemos estudos que relatem a variação da capacidade antioxidante da saliva em função do treinamento ou do exercício físico, a não ser o estudo de Atsumi *et al.*, (1999, 2008). Nestes trabalhos os autores relataram diminuição da capacidade antioxidante da saliva após a prática de exercício em crianças. Assim como para a saliva, a literatura ainda não apresenta estudos da capacidade antioxidante no exercício físico por análises voltamétricas, o que pode ser muito importante devido à praticidade e baixo custo das análises.

## 4. REFERÊNCIAS

Alba F.; Arenas JC.; Lopez MA. Properties of rat brain dipeptidyl aminopeptidases in the presence of detergents. **Peptides**. 1995; 16(2): 325-9.

Alessio HM.; Exercise-induced oxidative stress. **Med. Sci. Sports Exerc.** 1993; 25: 218-224.

Alves AA.; Pereira da Silva L.; Macedo DV.; Kubota LT. Amperometric sensor for glutathione reductase activity determination in erythrocyte hemolysate. **Anal Biochem.** 2003; 323(1): 33-40.

Astrand PO.; & Rodahl K.; (1986) Textbook of Work Physiology. Physiological Bases of Exercise, New York: McGraw-Hill inc.

Attwood D.; Florence AT.; (1983) **Surfactant Systems-Their Chemistry Pharmacy and Biology**, 2<sup>a</sup> Ed, N.Y. London. Chapman and Hall.

Atsumi T.; Iwakura I.; Kashiwagi Y.; Fujisawa S.; Ueha T. Free radical scavenging activity in the nonenzymatic fraction of human saliva: a simple DPPH assay showing the effect of physical exercise. **Antioxid Redox Signal.** 1999 Winter; 1 (4):537-46.

Atsumi T.; Tonosaki K.; Fujisawa S. Salivary free radical-scavenging activity is affected by physical and mental activities. **Oral Dis.** 2008 Sep; 14:490-6.

Bhairi SM.; Mohan, C. (2007) Detergents – **A guide to the properties and uses of detergents in Biological Systems**. Calbiochem-Novabiochem Corporation. La Jolla.

Brainina KhZ.; Ivanova AV.; Sharafutdinova EN.; Lozovskaya EL.; Shkarina EI. Potentiometry as a method of antioxidant activity investigation. **Talanta.** 2007; 71(1):13-8.

Bechman J.S., Bechman T.; Freeman, B. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 1990; 87:1620-1624.

Benzie IF. Evolution of antioxidant defense mechanisms. **Eur. J. Nutr.** 2000; 39 (2):53-61.

Blokhina O.; Virolainen E.; Fagerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Ann. Bot.** 2003; 91:179-194.

Bompa TO. (1990) Em: Theory and methodology of training the key to athletic performance. 2<sup>a</sup> ed., Kendall Hunt, Dubuque.

Bompa T. (2001) In: Periodização. Phorte Ed. São Paulo. 4<sup>a</sup> Edição.

Booth FW.; Thomason DB. Molecular and cellular adaptation of muscle in response to exercise: perspectives of various models. **Physiol. Rev.** 1991; 71(2):541-585.

Cao G.; Prior RL. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. **Clin. Chem.** 1998; 44: 1309-1315.

Chevallet M.; Santoni V.; Poinas A.; Rouquié D.; Fuchs A.; Kieffer S.; Rossignol M.; Lunardi J.; Garin J.; Rabilloud T. New zwitterionic detergents improve the analysis of membrane proteins by two-dimensional electrophoresis. **Electrophoresis.** 1998; 19(11):1901-9.

Chevion S.; Berry EM.; Kitrossky N.; Kohen R. Evaluation of plasma low molecular weight antioxidant capacity by cyclic voltammetry. **Free Radic. Biol. Med.** 1997; 22 (3):411-21.

Chevion S.; Hofmann M.; Ziegler R.; Chevion M.; Nawroth PP. The antioxidant properties of thioctic acid: characterization by cyclic voltammetry. **Biochem. Mol. Biol. Int.** 1997; 41 (2):317-27.

Chevion S.; Roberts MA.; Chevion M. The use of cyclic voltammetry for the evaluation of antioxidant capacity. **Free Radic. Biol. Med.** 2000; 28(6):860-70.

Coombes JS.; Powers SK.; Rowell B. Effects of vitamin E. Evaluation of the role of and lipoic acid on skeletal muscle contractile properties. **J. Biol. Appl. Physiol.** 2001; 90: 1424-30

Cutler RG.; Antioxidants and aging. **Am. J. Clin. Nutr.** 1991; 53: 373S-379S

Essig DA.; Nosek TM. Muscle fatigue and induction of stress proteon genes: a dual function of reactive oxygen species. **Can. J. Appl. Physiol.** 1997; 22 (5): 409-428.

Finaud J.; Lac G.; Filaire E. Oxidative stress : relationship with exercise and training. **Sports Med.** 2006;36(4):327-58. Review.

Gandra, PG.; Alves AA.; Macedo DV.; Kubota LT. Determinação eletroquímica da capacidade antioxidante para avaliação do exercício físico. **Química Nova.** 2004; 27:980-985.

Gerakis AM.; Koupparis MA.; Hadjiioannou TP. Kinetic study and analytical applications of micelar catalyzed reactions of 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene with inorganic thioanions using a fluoride-selective electrode. *Talanta*. 2000 Jul 31; 52(4):739-48.

Ghiselli A.; Serafini M.; Maiani G.; Azzini E.; Ferro-Luzzi A. A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capacity. **Free Radic. Biol. Med.** 1995; (1):29-36.

Griffin W.C. (1949).Classification of surface-active agents by HLB. **J. Soc. Cosmet. Chem.** 1: 311-319.

Halson SL.; Jeukendrup AE. Does overtraining exist? An analysis of overreaching and overtraining research. **Sports Med.** 2004; 34 (14):967-81.

Halliwell, B.; Gutteridge JMC. Tell me about free radicals, doctor: a review. **J. R. Soc. Med.** 1989; 82 (12): 747-752.

Halliwell, B.; Gutteridge JMC. In: **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3<sup>a</sup> ed. Oxford University Press, 1999.

Halliwell, B.; Gutteridge JMC. In: **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3<sup>a</sup> ed. Oxford University Press, 2007.

Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiol.** 2006;141(2):312-22.

Helenius A.; Simons K. Solubilization of membranes by detergents. **Biochim. Biophys Acta.** 1975;415(1):29-79.

Hillig T.; Krstrup P.; Fleming I.; Osada T.; Saltin B.; Hellsten Y. Cytochrome P450 2C9 plays an important role in the regulation of exercise-induced skeletal muscle blood flow and oxygen uptake in humans. **J. Physiol.** 203; 546:307-14.

Hultman E.; Sjöholm H. Substrate availability. Em: Knuttgen, H. G., Vogel, J. A., Poortmans, J. (eds). *Biochemistry of Exercise V*, Champaign: Human Kinetics, 1986.

Janaszewska A.; Bartosz G. Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. **Scand. J. Clin. Invest.** 2002; 62: 231-236.

Jenkins RR.; Goldfarb A. Introduction: oxidative stress, aging, and exercise. **Med. Sci. Sports Exerc.** 1993; 25 (2): 210-212.

Ji, LL.; Fu RG. Responses of glutathione system and antioxidant enzymes to exhaustive exercise and hydroperoxide. **J. Appl. Physiol.** 1992; 72: 549-554.

Ji, L. L. Increasing healthy life span: conventional measures and slowing the innate aging process. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 2002; 959: 82-92.

Kissinger PT.; Heineman WR. **J. Chem. Educ.** 1983, 60, 702.

Kissinger PT.; Heineman WR.; Em Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry; 2<sup>a</sup> ed. Marcel Dekker, Inc.: New York, **1996**.

Knez WL.; Coombes JS.; Jenkins DG. Ultra-endurance exercise and oxidative damage : implications for cardiovascular health. **Sports Med.** 2006;36(5):429-41.

Kohen R.; Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. **Toxicol. Pathol.** 2002; 30(6):620-50.

Kohen R.; Vellaichamy E.; Hrbac J.; Gati I.; Tirosh O. Quantification of the overall reactive oxygen species scavenging capacity of biological fluids and tissues. **Free Rad. Biol. Med.** 2000; 28, 6: 871-879.

Kohen R.; Yannai EB.; Berry E M.; Tirosh. Overall low molecular weight antioxidant activity of biological fluids and tissues by cyclic voltammetry. **Methods in Enzymology.** 1999; 300:285-296.

Kuipers H.; Keizer HA. Overtraining in elite athletes: review and directions for the future. **Sports Med.** 1988; 6: 79-92.

Lehmann M.; Foster C.; Dickhuth HH.; Gastmann U. Autonomic imbalance hypothesis and overtraining syndrome. **Med. Sci. Sports Exerc.** 1998; 30:1140-1145.

le Maire M. ; Champeil P. ; Moller JV. Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. **Biochim. Biophys. Acta.** 2000; 1508 (1-2):86-111.

Mabbott GA. **J. Chem. Educ.** 1983, 60, 697;

Maniasso N.; Ambientes Micelares em Química Analítica. **Quim. Nova**,2001.V24,N1, 87-93.

Meeusen R.; Duclos M.; Gleeson M.; Rietjens G.; Steinhacker J.; Urhausen A. Prevention, diagnosis and treatment of the Overtraining Syndrome. **European Journal of Sport Science**, March 2006; 6(1): 1-14

Meiydani M.; Evans W.,; Handelman G.; Biddle L.; Fielding RA.; Meydani SN.; Burrill J.; Fiatarone MA.; Blumberg JB.; Cannon JG. Protective effect of vitamin E on exercise-induced oxidative damage in young and older adults. **Am. J. Physiol.** 1993; 264:R992-R998.

Nader GA.; Esser KA. Intracellular signalling specificity in skeletal muscle in response to different modes of exercise. **J. Appl. Physiol.** 2001; 90: 1936-1942.

Palazzetti S, Rousseau AS, Richard MJ, et al. Antioxidant supplementation preserves antioxidant response in physical training and low antioxidant intake. **Br. J. Nutr.** 2004; 91: 91-100.

Pacheco W F. Desenvolvimento e comparação de métodos voltamétricos para determinação de ciclofenil e primaquina em medicamentos e em urina. Dissertação de Mestrado. Química. Pontifícia Universidade Católica. Rio de Janeiro. 2004

Pramauro E.; Pelizzetti E.; Micelles: A new dimension in Analytical Chemistry Trends. **Analytical Chemistry**, 1988; 7, (7): 260-265.

Powers SK.; Hamilton K. Antioxidants and exercise. **Clin. Sports Med.** 1999; 18 (3): 525-536.

Prior & Cao, In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. **Free Radic. Biol. Med.** 1999; 27: 1173-1181.

Privé GG. Detergents for the stabilization and crystallization of membrane proteins. **Methods.** 2007; 41(4):388-97.

Reid MB.; Khawli FA.; Moody MR. Reactive Oxygen in skeletal muscle III Contractility of unfatigued muscle. **J. Appl. Physiol.** 1993; 75:1081-1087.

Reid MB. Reactive oxygen and nitric oxide in skeletal muscle. **News Physiol. Science.** 1996; 11: 114-119.

Reid MB. Nitric oxide, reactive oxygen species, and skeletal muscle contraction. **Med. Sci. Sports Exerc.** 2001; 33 (3): 371-376.

Reid MB.; Durham WJ. Generation of reactive oxygen and nitrogen species in contracting skeletal muscle – potential impact on aging. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 2002; 959:108-116.

Sen CK.; Kolosova I.; Hänninen O.; Orlov SN. Inward potassium transport systems in skeletal muscle derived cells are highly sensitive to oxidant exposure. **Free Radic Biol. Med.** 1995; 18 (4): 795-800.

Sjödén B.; Wesling H.; Apple S. Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. **Sports Med.** 1990; 10: 236-254

Smolka MB.; Zoppi CC.; Alves AA.; Silveira LR.; Marangoni S.; Pereira-Da-Silva L.; Novello JC.; Macedo DV. HSP72 as a complementary protection against oxidative stress induced by exercise in the soleus muscle of rats. **Am. J. Physiol.** 2000; 279: R1539-R1545.

Talwar DK.; Azharuddin MK.; Williamson C.; Teoh YP.; McMillan DC.; St J O'Reilly D. Biological variation of vitamins in blood of healthy individuals. **Clin Chem.** 2005 Nov; 51 (11): 2145-50.

Tanford C. (1980) **The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes**, 2<sup>a</sup> ed., John Wiley & Sons, New York.

Urhausen A.; Kindermann W. Diagnosis of overtraining: what tools do we have? **Sports Med.** 2002; 32(2):95-102.

Vollaard NB.; Shearman JP.; Cooper CE. Exercise induced oxidative stress: myths, realities and physiological relevance. **Sports Med.** 2005; 35(12):1045-62.

Zoppi CC.; Hohl R.; Silva FC.; Lazarim FL.; Neto JM.; Stancanneli M.; Macedo DV. Vitamin C and e supplementation effects in professional soccer players under regular training. **J. Int. Soc. Sports Nutr.** 2006, 13 (3):37-44.

Wayner DDM.; Burton GW.; Ingold KU.; The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. **Biochim. Biophys. Acta.** 1987; 924: 408-19.

Waring WS.; Convery A.; Mishra V.; Shenkin A.; Webb DJ.; Maxwell SR. Uric acid reduce exercise-induced oxidative stress in healthy adults. **Clin Sci.** 2003; 105 (4):425-30.

Weineck J. (1999) Em: Treinamento Ideal. Manole, São Paulo

Welch WJ. How cells respond to stress. **Scientific American**. 268 (5): 34-41, 1993.

## **CAPÍTULO 2**

---

---

**EFEITOS DA UTILIZAÇÃO DE CLORETO DE CETILPIRIDINA PARA DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE POR VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL EM AMOSTRAS DE SORO E SALIVA.**

## **EFEITOS DA UTILIZAÇÃO DE CLORETO DE CETILPIRIDINA PARA DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE POR VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL EM AMOSTRAS DE SORO E SALIVA.**

### **RESUMO**

Aumento na formação de espécies reativas de oxigênio em função do aumento na demanda energética podem aumentar o estado de oxidação celular e sanguíneo. O poder redutor de amostras biológicas reflete sua capacidade antioxidante, mantida em grande parte pelos antioxidantes de baixo peso molecular (ABPM). Os ABPM agem como agentes redutores, doando elétrons para as espécies radicalares. Incluem antioxidantes tais como ácido úrico, vitamina C, vitamina E e ácido lipóico. A técnica eletroanalítica voltametria de pulso diferencial (VPD) é uma boa alternativa metodológica para acompanhar as modulações agudas e crônicas da capacidade antioxidante total conferidas pelos ABPM do plasma e saliva em resposta ao exercício físico. No entanto, as proteínas constituem um interferente pré-analítico importante quando consideramos amostras biológicas, pois podem ser adsorvidas na superfície do eletrodo durante a aplicação do potencial, resultando em perda significativa do sinal voltamétrico. O objetivo do presente estudo foi investigar a aplicabilidade do surfactante catiônico cloreto de cetilpiridina (CPC) como sistema micelar no aperfeiçoamento da técnica de VPD para análise de amostras de soro e saliva de humanos. Foram analisadas as amostras de soro e saliva de 40 indivíduos. Os dados obtidos mostraram que o uso do surfactante CPC viabilizou a aplicação do método VPD em amostras de soro e saliva, uma vez que aumentou a sensibilidade e estabilidade do sinal voltamétrico. A determinação da capacidade antioxidante da saliva e do soro por VPD pode ser influenciada principalmente pela concentração de ácido úrico.

## 1. INTRODUÇÃO

A quantificação de antioxidantes tem se tornado um tópico de crescente interesse em pesquisas interdisciplinares envolvendo patologias e o exercício físico [1, 2, 3, 4]. Antioxidantes podem ser definidos como moléculas presentes em pequenas concentrações e capazes de prevenir ou reduzir os danos oxidativos em biomoléculas [1, 5, 6]. Os antioxidantes podem ser classificados em dois grupos: enzimáticos e não enzimáticos ou de baixo peso molecular (ABPM). Enquanto o grupo de antioxidantes enzimáticos inclui um número relativamente pequeno de enzimas como a superóxido dismutase, catalase e sistema da glutathione peroxidase/glutathione redutase, os ABPM incluem compostos variados, que podem ser considerados os maiores contribuintes para a capacidade antioxidante total de tecidos e fluidos biológicos [7, 8]. Isso porque são capazes de penetrar e atingir locais específicos dentro das células onde pode estar ocorrendo dano oxidativo. Dentre os ABPM existem aqueles que reagem diretamente com as EROs (*scavengers* químicos) e aqueles que reagem indiretamente (agentes quelantes). Os ABPM podem ser sintetizados endogenamente, ser restos metabólicos ou advir da alimentação.

Os ABPM que reagem diretamente com as EROs são agentes redutores, doam elétrons para as espécies radicalares. Assim, a capacidade antioxidante pode ser definida pelo poder redutor das amostras biológicas. Como os ABPM possuem eletroatividade, eles podem ser mensurados por métodos eletroquímicos [1, 9]. A voltametria de pulso diferencial (VPD) assim como a voltametria cíclica (VC) são métodos amplamente usados em química analítica. Ambos foram desenvolvidos baseados na capacidade da amostra doar ou receber elétrons de um eletrodo de trabalho submetido a um intervalo definido de potencial. O sinal (voltamograma) é formado pelos picos de corrente em função da variação da voltagem. A posição do potencial de pico ( $E_p$ ) relaciona-se com a natureza do composto, e a magnitude da corrente ( $I_p$ ) com sua concentração [10, 11].

Chevion *et al.* desenvolveram um procedimento usando VC para determinar a capacidade antioxidante de amostras de plasma. Entre as vantagens do método da VPD em relação à VC estão a melhor definição da corrente de pico, boa sensibilidade e o baixo limite de detecção [11].

Na utilização de eletrodos sem modificação de superfície, frequentemente ocorre acúmulo de produtos oxidados na sua superfície, resultando em uma menor seletividade e sensibilidade [12]. Quando consideramos amostras biológicas, as proteínas constituem um interferente pré-

analítico importante, pois podem ser adsorvidas na superfície do eletrodo durante a aplicação do potencial. Para evitar essa adsorção e a conseqüente passivação do eletrodo sugere-se seu polimento antes de cada análise [9]. No entanto, nossos estudos preliminares mostraram que o polimento altera a superfície do eletrodo constituindo uma limitação na aplicação da técnica de VPD para analisar o poder redutor de amostras biológicas.

Algumas estratégias têm sido desenvolvidas para prevenir a interferência da adsorção, incluindo mineralização da amostra [13], deposição de membrana seletiva na superfície do eletrodo de trabalho [14] e ativação através de microondas e ultrassom [15]. Estas técnicas envolvem diferentes procedimentos analíticos e uma complexa instrumentalização [16]. Torna-se necessário, portanto, o desenvolvimento de novas técnicas que possibilitem a utilização de amostras biológicas em análises eletroquímicas.

Os surfactantes podem ser adsorvidos sobre superfícies sólidas formando agregados micelares sobre a superfície do eletrodo, e têm se mostrado atraentes como agentes capazes de melhorar a seletividade e a sensibilidade de análises eletroquímicas [17, 18]. Hoyer e Jensen (2006) mostraram que a diminuição do sinal de serotonina nos voltamogramas podia ser amenizada pela adição de surfactante na amostra. A capacidade de estabilização dos surfactantes pode ser atribuída à adsorção competitiva na superfície do eletrodo, que impede o acúmulo de produtos de oxidação.

Szymula e Nazkiewickz-Michalek [19] estudaram o comportamento da oxidação eletroquímica do ácido ascórbico em solução aquosa com diferentes surfactantes. Foi verificado que o surfactante catiônico desloca o potencial de pico e altera o valor de corrente, principalmente devido à camada de surfactante formada na interface eletrodo-solução. A carga negativa do ácido ascórbico interage com a carga positiva das micelas aumentando a taxa de oxidação e conseqüentemente a corrente de pico. O uso de surfactantes não-iônicos e aniônicos apresentou resultados opostos.

O uso de surfactantes para a estabilização de sinais eletroquímicos é simples, tendo em vista que as manipulações requerem somente a adição do surfactante e a termoregulação da célula eletroquímica.

Há pelo menos três fatores que precisam ser levados em consideração na escolha e definição de um método de análise. São eles: validade, sensibilidade e reprodutibilidade [20]. Entende-se por validade, a capacidade que uma determinada ferramenta de medida possui de

refletir aquilo que ela está designada a medir. Nesse caso, a capacidade antioxidante de soro e saliva conferida pelo poder redutor de ABPMs. A sensibilidade da medida é a capacidade da técnica em detectar pequenas alterações. Já a reprodutibilidade de um método de análise consiste na ausência de erros de medição sistemáticos (bias) e aleatórios em testes sucessivos [21; 22].

Um dos objetivos do presente estudo foi investigar a aplicabilidade do surfactante catiônico cloreto de cetilpiridina (CPC) como sistema micelar no aperfeiçoamento da técnica de VPD para análise de amostras de soro e saliva de humanos, empregando um eletrodo de carbono vítreo como eletrodo de trabalho. O outro objetivo foi validar a VPD em um sistema catiônico micelar CPC como uma metodologia útil para a medida direta da capacidade antioxidante conferida por ABPM de soro e saliva.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### *Reagentes e Soluções*

Todos os compostos e reagentes utilizados neste trabalho são de grau analítico e não sofreram etapas prévias de purificação. Cloreto de cetilpiridina monohidratado ( $C_{21}H_{38}NCl \cdot H_2O$ ), NaCl, ácido úrico e ácido ascórbico utilizados foram adquiridos da Sigma Aldrich. Fosfato de sódio monobásico e dibásico foram da Merck (KgaA Germany). As soluções de tampão fosfato ( $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ , 0,9% de NaCl, pH= 7,4), CPC monohidratado, ácido úrico e ácido ascórbico foram preparadas usando água deionizada (Millipore Milli-Q system –  $p > 18,2 \text{ M}\Omega$ ).

### *Amostras de soro e saliva*

Amostras de sangue e saliva foram coletadas de 30 voluntários saudáveis, sexo masculino com idade de  $17 \pm 1$  anos, atletas juvenis de futebol. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana (0200.0.146.000 - 08).

No período da manhã foram coletados 8,0 mL de sangue venoso em tubos Vacuette (Greiner Bio-One GmbH, Kremsmuenster, Austria) com gel separador para obtenção do soro, com os sujeitos em jejum de pelo menos 8 horas. O sangue coletado foi transportado em temperatura de 4°C para o laboratório, centrifugado sob refrigeração a  $2000 \times g$  por 15 minutos, 4°C. Alíquotas

de 500  $\mu\text{L}$  foram separadas e imediatamente protegidas da luz e estocadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para análises posteriores.

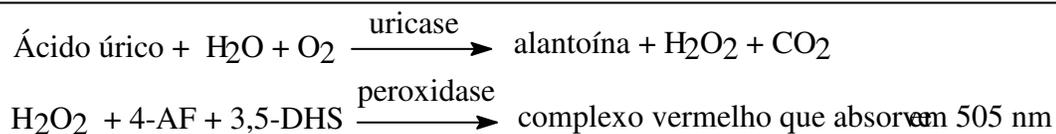
As amostras de saliva foram coletadas imediatamente após a coleta de sangue, através do *Saliva Collection System* (SCS) (Greiner Bio-One GmbH, Kremsmüenter, Austria) de acordo com as instruções do fabricante (<http://www.vacurette.com/en/company/3698.php>). Antes da coleta de saliva foi aplicada a solução de enxágüe bucal fornecida no próprio kit. Posteriormente, o sujeito permaneceu com a solução de extração de saliva em sua boca por dois minutos. A solução foi coletada em béquer plástico e depois transferida para dois tubos de centrifugação graduados com solução conservante. As amostras de saliva foram centrifugadas a 2200g por 15 minutos sob refrigeração ( $4^{\circ}\text{C}$ ). A amostra de saliva coletada através do SCS contém tartrazina como padrão interno, que é determinada fotometricamente a 450 nm. Os tubos graduados permitem conhecer o volume exato de saliva coletado [23]. O conteúdo de saliva na solução (vol.-%) é obtido pela comparação com os padrões internos fornecidos no kit de coleta de saliva SCS.

### *Quantificação de ácido úrico*

O método da quantificação sérica e salivar de ácido úrico foi realizado usando kit apropriado (Uricostat, Wiener lab., Argentina) em equipamento automatizado (Autolab 800). O kit foi utilizado segundo as instruções do fabricante. O reativo de trabalho, a amostra e o padrão foram adicionados em cubetas apropriadas do aparelho (100 mg/mL). O aparelho pipeta volumes adequados de reativo de trabalho e de amostra ou de padrão e mede a absorbância do padrão e da amostra em 505 nm. Os resultados estão apresentados em mg/dL de plasma.

O reativo de trabalho é composto de uma solução de tampão fosfato pH 7,4 (concentração não fornecida pelo fabricante), contendo  $1\text{ mmol.L}^{-1}$  de 3,5 ácido diclorohidroxibenzeno sulfônico mais 50 UI/L da enzima uricase, 300 UI/L da enzima peroxidase,  $0,05\text{ mmol.L}^{-1}$  de 4-aminofenazona (4-AF) e  $6\text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$  de ferrocianeto de potássio que serve para minimizar interferentes como o ascorbato.

A análise baseia-se nas seguintes reações (Burtis e Ashwood, 1999) [24]:



### ***Procedimento para as medidas voltamétricas***

As medidas voltamétricas foram realizadas com potenciostato PGSTAT-10 da Autolab Echo Chemie (Utrecht, Netherlands) interfaceado a um computador e controlado pelo software GPES 4.9. Foi utilizada uma célula eletroquímica com três eletrodos: um eletrodo de calomelano saturado como eletrodo de referência, um fio de platina como eletrodo auxiliar e um eletrodo de carbono vítreo de 3-mm de diâmetro utilizado como eletrodo de trabalho. O eletrodo de carbono vítreo foi cuidadosamente polido com alumina 0,3  $\mu\text{m}$  em uma superfície abrasiva e lavado com água deionizada antes de cada série de experimentos. A temperatura da célula eletroquímica foi regulada em  $20,0 \pm 0,5$  °C. Nesta temperatura não foi observada nenhuma precipitação do surfactante.

Para as medidas voltamétricas foram usados 120  $\mu\text{L}$  de soro ou saliva. As amostras foram diluídas em 480  $\mu\text{L}$  de solução de PBS na concentração de  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  em pH 7,4. A solução de PBS foi utilizada como eletrólito de suporte. A faixa de potencial aplicada para realização das medidas foi de 300 mV a 1000 mV.

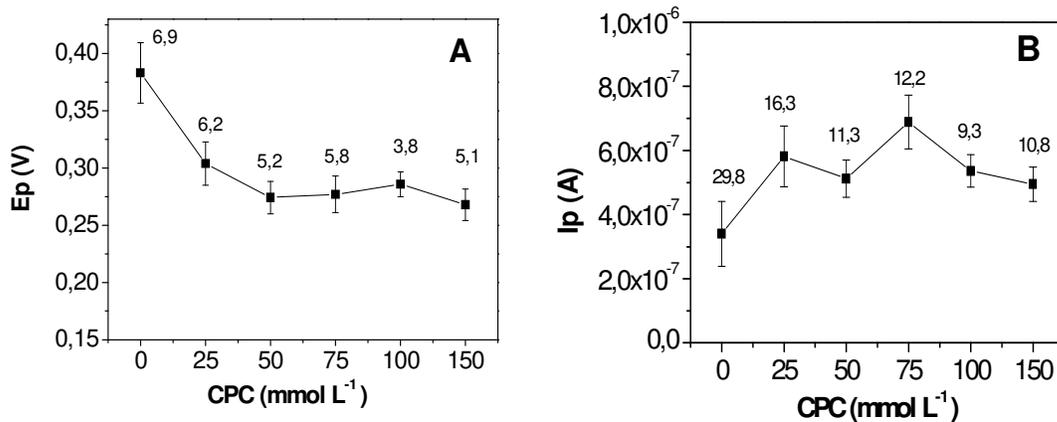
### ***Análise Estatística***

Foi utilizado o software Oringin 6.0 para a análise dos resultados e estatísticas. Foi utilizado o teste t para comparação entre as amostras com e sem CPC. Valores de  $p < 0,01$  foram considerados significativos. Os gráficos em boxplots foram utilizados para uma análise descritiva dos valores de concentração de antioxidantes ( $I_p$ ) e poder redutor das amostras ( $E_p$ ) na presença e na ausência de CPC. Os gráficos foram feitos através do programa Matlab® 7.0.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### *Efeito de diferentes concentrações de CPC em voltamogramas de fluidos biológicos.*

Para definir a melhor concentração de surfactante a ser utilizada foram comparadas diferentes concentrações de CPC para uma mesma amostra de soro. Para cada concentração foram feitos 20 voltamogramas subsequentes. A Figura 1 apresenta os dados da variação do potencial de pico - Ep (A) e corrente de pico - Ip (B) em soro diluído em tampão fosfato na presença de diferentes concentrações do surfactante. Os valores dos coeficientes de variação (%), também estão apresentados na Figura, acima dos pontos correspondentes aos valores médios.



**Figura 1.** Variação do potencial de pico – Ep (A) e corrente de pico – Ip (B) em soro (diluído em tampão fosfato 1:4) com diferentes concentrações de surfactante. Tampão fosfato (pH 7,4). Os resultados são representativos de 20 voltamogramas para cada concentração de CPC. Os números indicam os coeficientes de variação (%) entre as 20 medidas para cada concentração.

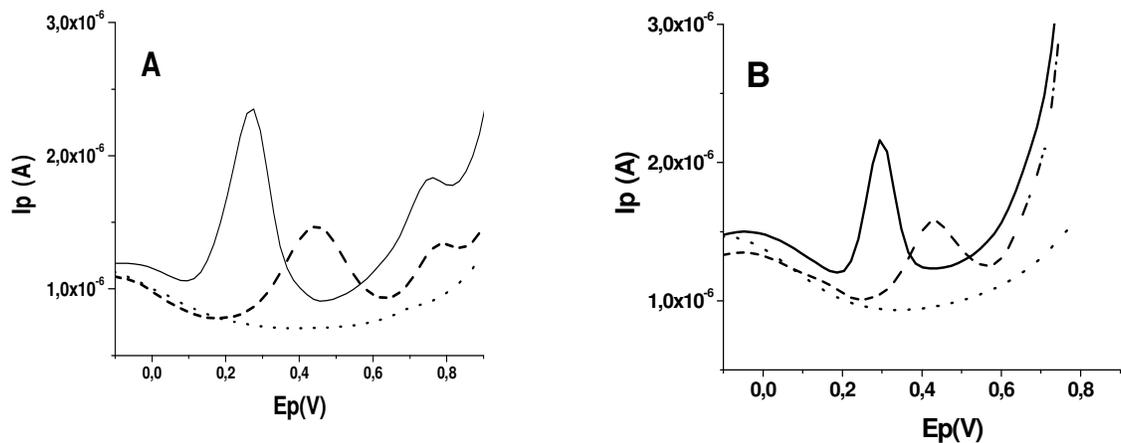
Os valores de Ep da amostra do soro diminuíram em todas as concentrações de CPC utilizadas quando comparados com a amostra sem CPC, enquanto que os valores de Ip aumentaram. Os coeficientes de variação de Ep e Ip na ausência de CPC foram de 6,9 e 29,8 respectivamente. Já os menores coeficientes de variação foram obtidos na presença de 100mmolL<sup>-1</sup> de CPC: 3,8 para Ep e 9,3 para Ip. Essa mesma concentração também proporcionou melhor estabilidade e definição dos picos. A concentração de 100mmolL<sup>-1</sup> de CPC pode ser aplicada em amostras de saliva devido a menor concentração de proteínas totais encontradas nestas amostras.

A saturação do processo de adsorção de surfactantes em superfícies sólidas geralmente coincide com a concentração micelar crítica (CMC) do surfactante [26]. Acima da CMC os surfactantes formam micelas, sendo que a interação soluto-micela é quem previne a adsorção de compostos na superfície do eletrodo. Valores de CMC são difíceis de serem mensurados com exatidão, portanto os valores encontrados na literatura algumas vezes apresentam variações [27]. A CMC do CPC é 1,24 mM que corresponde a 0,042% em água. As concentrações de CPC utilizadas nos experimentos apresentados na Figura 1 estão acima da CMC. Concentrações de CPC abaixo da CMC também foram testadas. Os resultados não foram efetivos (dados não mostrados), provavelmente devido à baixa concentração de surfactante, que não possibilitou a formação de micelas e a interação necessária com o soluto.

Dessa forma, para todos os resultados obtidos na presença de CPC foi utilizada a concentração de 100 mmol L<sup>-1</sup>.

### *Efeito do CPC em voltamogramas de fluidos biológicos.*

A Figura 2 apresenta a comparação dos voltamogramas de amostra de soro (A) e saliva (B) pertencentes a um mesmo indivíduo na presença e na ausência de CPC (100 mmolL<sup>-1</sup>).



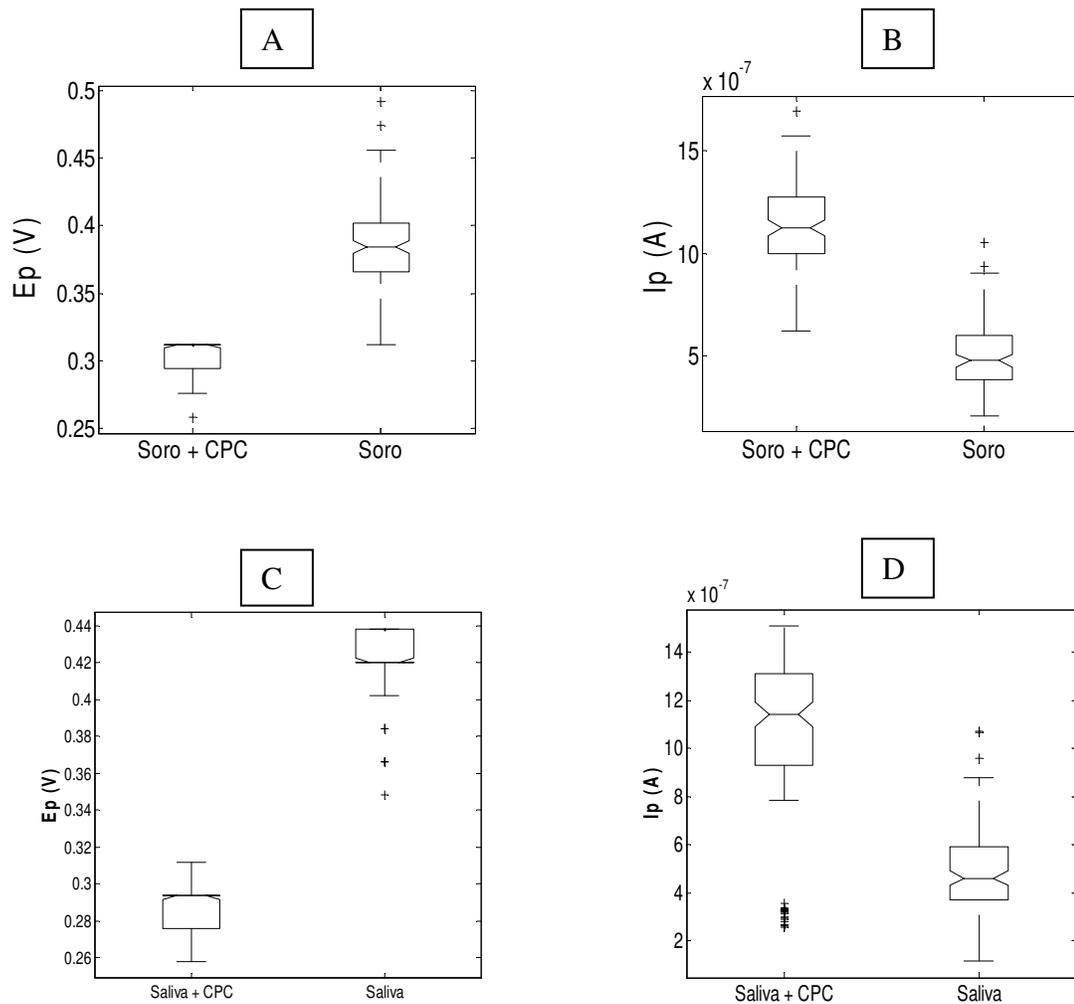
**Figura 2.** Voltametria de pulso diferencial de soro (A) e saliva (B) (diluídos em PBS relação 1:4) na presença de 100 mmolL<sup>-1</sup> CPC (linha contínua), ausência de CPC (linha tracejada), PBS + CPC (linha pontilhada).

A presença de CPC provocou uma diminuição no valor de  $E_p$  do primeiro pico no soro e saliva, sem alterar os valores do segundo pico no soro. Na presença de CPC o soro apresentou 2 picos com  $E_p$  bem definidos em 0,272 V e 0,755 V e a saliva somente 1 pico em 0,295 V. Houve aumento significativo da corrente de pico em ambas as amostras na presença do surfactante.

Os voltamogramas obtidos por VPD na ausência de CPC mostraram os seguintes valores de potencial pico ( $E_p$ ) no soro: 1º pico em 0,444 V, e o 2º pico em 0,750 V. A saliva apresentou um pico em 0,413 V. Esses resultados estão próximos aos relatados pela técnica de VC em plasma descritas na literatura. [7, 9]. O ácido úrico e o ácido ascórbico foram identificados por HPLC-ED como dois componentes específicos da primeira corrente anódica no plasma [7, 29, 30]. Já o segundo pico observado em estudos de voltametria cíclica parece ser resultado da hemólise durante a separação do plasma, sendo composto principalmente por NADPH das hemáceas (9, 30). Alguns autores sugerem que o segundo pico seja decorrente da oxidação da forma mais reduzida do ácido lipóico, que possui dois grupamentos tiólicos (-SH) [31].

Os surfactantes alteram o potencial de pico e o valor de corrente de pico principalmente pela formação de um filme de surfactante na interface eletrodo/solução [32]. Como o CPC é um surfactante catiônico, estabelece uma forte interação eletrostática com dois componentes específicos da primeira corrente anódica, o ascorbato e urato, que apresentam carga negativa. A presença desses compostos no primeiro pico do voltamograma de amostras de soro e saliva explica a velocidade de oxidação acentuada e o conseqüente aumento na corrente de pico [32].

Para testar a repetibilidade do método foram analisadas sete amostras de soro e saliva na presença e na ausência de CPC. Para cada amostra foram realizados 20 voltamogramas. Os valores comparativos de  $E_p$ ,  $I_p$  do pico para soro (A e B) e saliva (C e D) estão apresentados na Figura 3.



**Figura 3.** Valores de Ep (A) e Ip (B) de sete amostras de soro e Ep (C) e Ip (D) de sete amostras de saliva (diluídas em PBS razão 1:4) na ausência e na presença de  $100 \text{ mmolL}^{-1}$  CPC. Foram realizados 20 voltamogramas subsequentes para cada uma das sete amostras. Diferença significativa ( $p < 0,01$ ) para as amostras analisadas na presença de CPC.

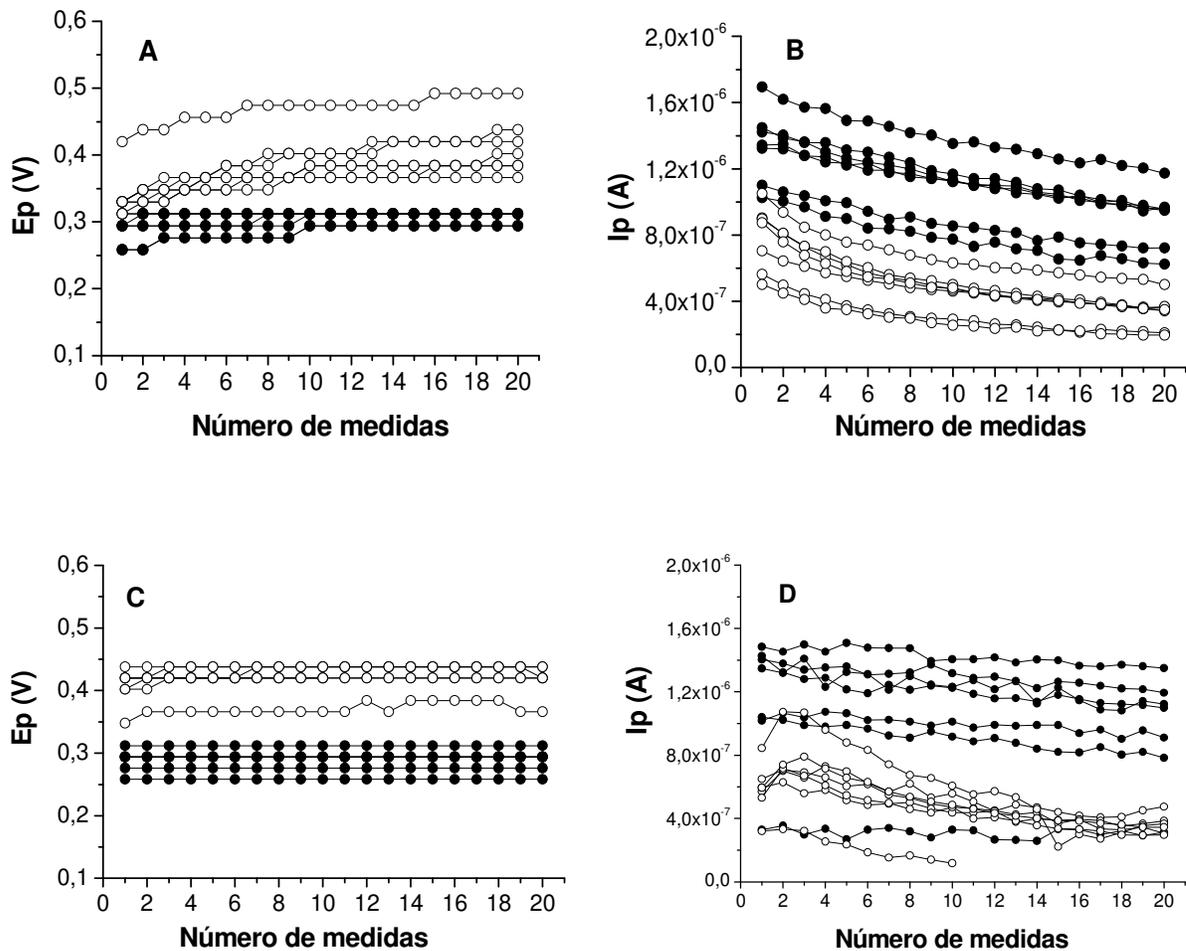
As amostras de soro e saliva apresentaram um menor valor de Ep e melhor repetibilidade entre o primeiro e o último voltamograma para todas as amostras analisadas na presença de CPC ( $p < 0,01$ ). Os valores de corrente de pico (Ip) apresentaram aumento significativo, com uma maior definição do pico na presença de CPC.

As amostras analisadas sem a presença de CPC apresentaram valores de corrente significativamente menores ( $p < 0,01$ ), além de uma menor repetibilidade do sinal. A perda de sinal foi maior nas amostras analisadas sem CPC.

Uma das amostras de saliva analisadas apresentou valores de Ip significativamente menores quando comparada com as demais amostras. Neste caso não foi possível realizar 20

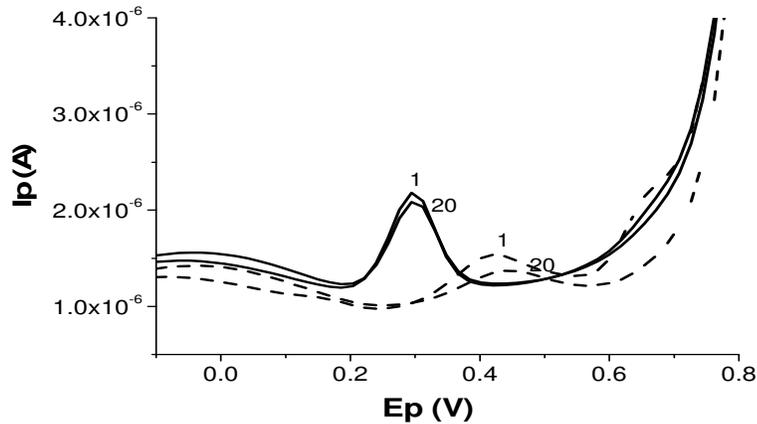
medidas subsequentes sem o uso do surfactante devido à baixa concentração dos compostos analisados e a diminuição significativa do sinal voltamétrico. Para esta amostra foram realizadas apenas 10 medidas na ausência do CPC (figura 4 D). As 20 medidas subsequentes só puderam ser realizadas na presença de CPC devido ao aumento no valor de corrente e maior estabilidade do sinal voltamétrico.

A Figura 4 apresenta os valores de  $E_p$  e  $I_p$  para cada medida analisada em soro (A-B) e saliva (C-D).



**Figura 4.** Valores de  $E_p$  (A) e  $I_p$  (B) de sete amostras de soro e  $E_p$  (C) e  $I_p$  (D) de sete amostras de saliva (diluídas em PBS razão 1:4) em função do tempo (número do medidas) na ausência (o) e na presença (•) de  $100\text{mmolL}^{-1}$  CPC. Foram realizados 20 voltamogramas subsequentes para cada uma das sete amostras. Diferença significativa ( $p < 0,01$ ).

A Figura 5 mostra o primeiro e vigésimo voltamograma de saliva na presença e na ausência de CPC.

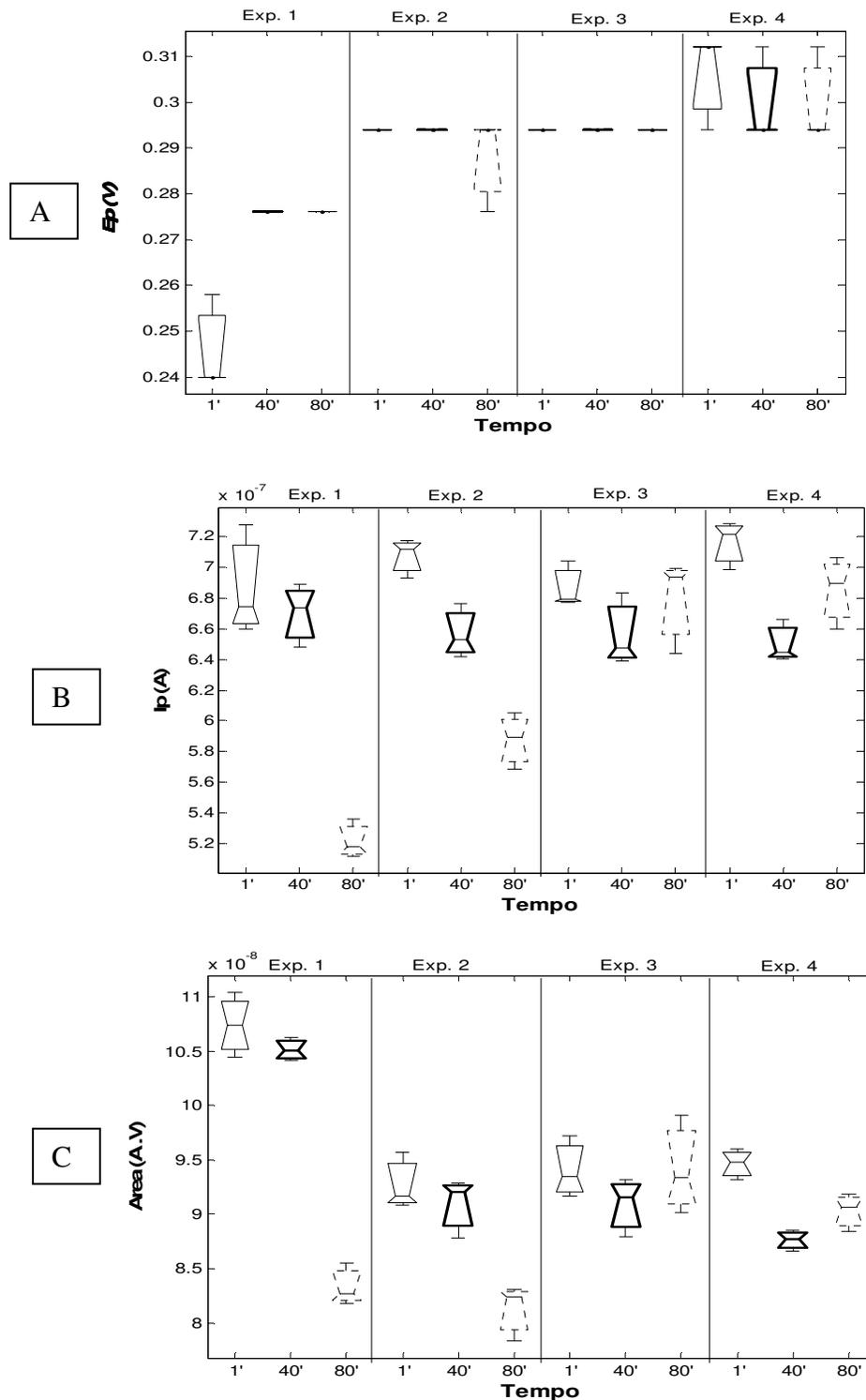


**Figura 5.** Primeiro e vigésimo voltamograma subsequente de uma mesma amostra de saliva na presença  $100\text{mmolL}^{-1}$  CPC (linha contínua), e na ausência de CPC (linha tracejada). Saliva diluída em PBS razão 1:4

Na presença de CPC foi encontrada uma pequena diminuição nos valores de  $I_p$  após 20 voltamogramas subsequentes sem o polimento do eletrodo (linha contínua). Também não foi encontrada alteração nos valores de  $E_p$ . Na ausência do surfactante houve uma diminuição no valor de  $I_p$  e um aumento no valor de  $E_p$  do primeiro para o vigésimo voltamograma (linha tracejada). O desvio padrão relativo obtido dos 20 voltamogramas subsequentes na presença de CPC foi de  $0,514 \times 10^{-7} \text{A}$  para  $I_p$ . Os valores de  $E_p$  não apresentaram desvio. Na ausência do surfactante o desvio padrão foi de  $1,172 \times 10^{-7} \text{A}$  para  $I_p$  e  $0,008 \text{V}$  para  $E_p$ .

Para verificar a estabilidade de uma amostra descongelada, foram descongeladas três alíquotas da mesma amostra. As amostras foram analisadas em três tempos: imediatamente após o descongelamento (1 min.), 40 minutos e 80 minutos após o descongelamento. Durante esse período as amostras permaneceram expostas à luz em temperatura ambiente ( $20^\circ\text{C}$ ) para avaliar uma possível oxidação após o descongelamento através da análise da variação do potencial.

Este mesmo experimento foi repetido quatro vezes sem que fosse feito qualquer polimento do eletrodo entre as medidas realizadas. O objetivo foi verificar a repetibilidade e identificar uma possível passivação do eletrodo como consequência do número de medidas realizadas sem o polimento. Um único polimento foi realizado antes do experimento 1. Os dados de  $E_p$ ,  $I_p$  e Área para os quatro experimentos estão apresentados na Figura 6 A, B e C, respectivamente.



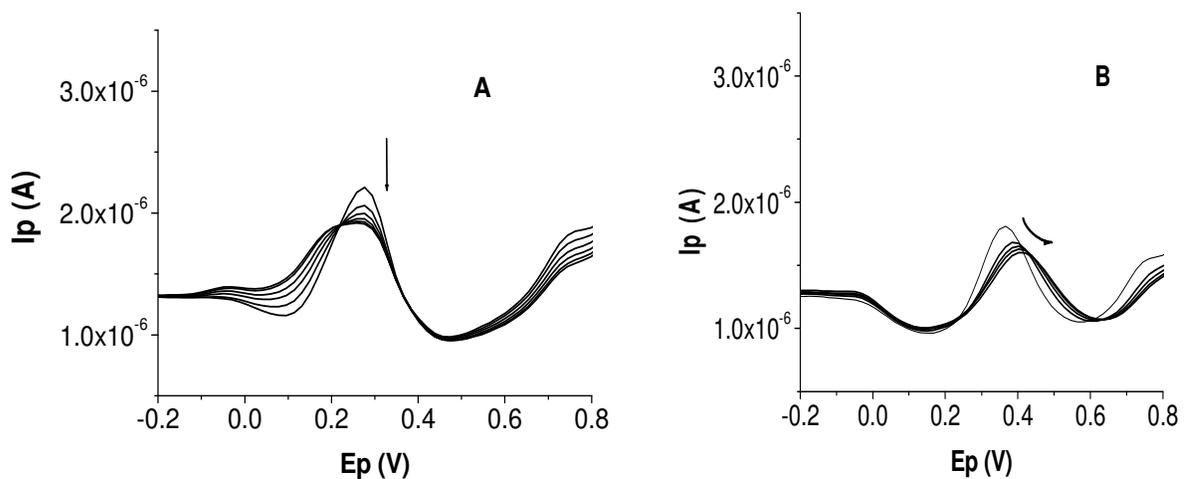
**Figura 6.** **A)** Valores de  $E_p$  uma mesma amostra de soro (diluídos em PBS na razão 1:4) em quatro experimentos subsequentes na presença de CPC ( $100\text{mmolL}^{-1}$ ) sem o polimento do eletrodo. **B)** Valores de  $I_p$  nas mesmas condições anteriores; **C)** Valores de Área nas mesmas condições anteriores. Em cada experimento as amostras foram analisadas nos tempos 1, 40 e 80 minutos após o descongelamento. Todas as medidas foram feitas em triplicata.

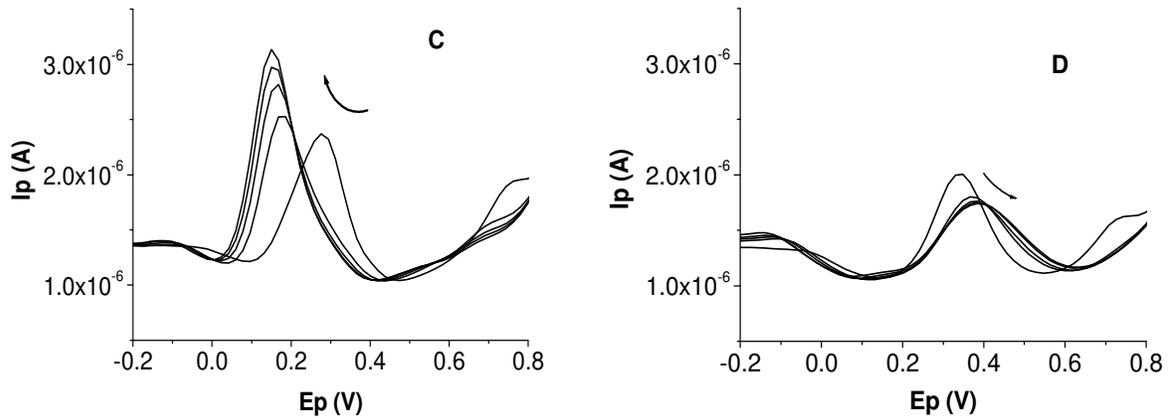
A análise dos resultados de cada experimento de maneira independente mostrou que não houve variação dos valores de  $E_p$  (Figura 6A) em função do tempo de descongelamento da amostra. Já os valores de  $I_p$  (Figura 6B) e Área (Figura 6C) foram influenciados pelo tempo de descongelamento, apresentando diminuição dos valores como resultado da oxidação de compostos.

Os dados apresentaram boa repetibilidade para as medidas realizadas imediatamente após o descongelamento e 40 minutos após. Esses resultados indicam que não houve passivação do eletrodo em função do número de medidas realizadas. A variabilidade maior na resposta encontrada no experimento 1 ocorreu possivelmente devido ao polimento inicial realizado antes do início dos experimentos. Esses dados reforçam a interferência do polimento sobre as medidas. Para minimizar esse efeito inicial sugerimos a realização de um maior número de medidas com a solução tampão para estabilizar o sistema antes de iniciar as análises.

#### *Efeitos de adições de ascorbato ou urato em soro na presença e ausência de CPC*

A sensibilidade da técnica foi analisada através das adições de ascorbato (A e B) e urato (C e D) gerando concentrações crescentes destes compostos em soro. As análises foram feitas na presença de CPC (A, C) e ausência (B, D) do surfactante. Os dados estão apresentados na Figura 7.

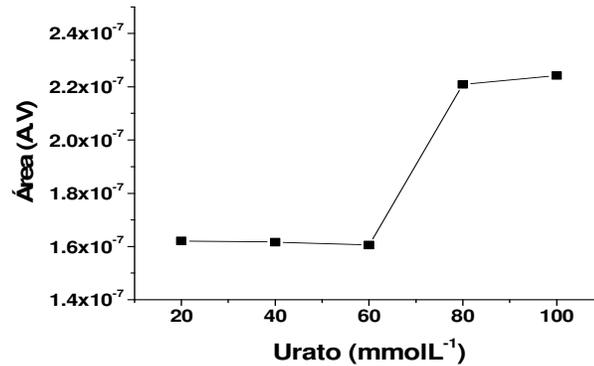




**Figura 7** - Adições de ascorbato (concentrações: 40, 60, 80 e 100  $\text{mmolL}^{-1}$ ) na presença de 100  $\text{mmolL}^{-1}$  CPC (A) e ausência de CPC (B) e adições de urato (concentrações 40, 60, 80 e 100  $\text{mmolL}^{-1}$ ) na presença de 100  $\text{mmolL}^{-1}$  CPC (C) e na ausência de CPC (D). Soro diluído em PBS na razão 1:4. p.H. 7,4. As setas indicam o sentido das tendências quando as concentrações aumentam.

O aumento nas concentrações de ascorbato na presença do surfactante manteve o valor de potencial estável em 0,276V, mas diminuiu os valores de  $I_p$  em  $0,28 \times 10^{-6} \text{A}$  (Figura 7A). Porém, houve um aumento da área do pico em  $0,052 \times 10^{-6} \text{AV}$ . Já as adições sucessivas e crescentes de urato induziram um efeito contrário ao do ascorbato (Figura 7C), tornaram os valores de potencial menos positivos e aumentaram os valores da corrente de pico de forma dose-dependente.

A diminuição nos valores de corrente na presença de ascorbato e CPC não indica necessariamente uma baixa sensibilidade da técnica, nem a perda do sinal em função da passivação do eletrodo. Esta interpretação é justificada pelas alterações ocorridas na área do pico (Figura 8). Em baixas concentrações de ascorbato a área não se altera possivelmente devido à formação de complexos iônicos entre o surfactante e o ascorbato (Vladmirova e Ramenskai, 2006). Estes autores mostram que o CPC interage com o ascorbato formando complexos iônicos. Isto pode mudar o mecanismo de oxidação do ascorbato. Quando a concentração de ascorbato ficou acima da capacidade de complexação do CPC o sinal se alargou, provavelmente devido à concorrência de dois mecanismos de oxidação do ascorbato simultaneamente.

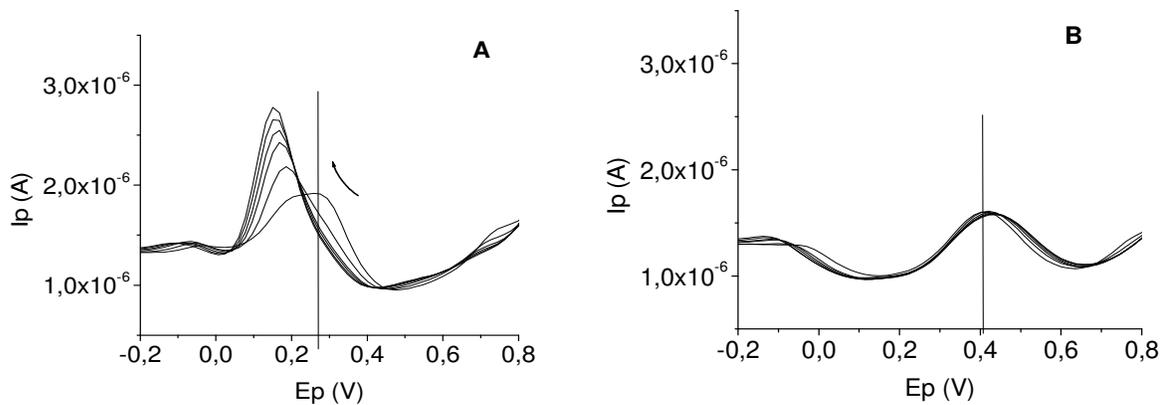


**Figura 8** – Valores de Área em função do aumento da concentração de urato (concentrações: 20, 40, 60, 80 e 100 mmolL<sup>-1</sup>) na presença de 100 mmolL<sup>-1</sup> CPC . Soro diluído em PBS na razão 1:4. p.H. 7,4.

As adições de ascorbato na ausência do surfactante (Figura 7B) resultaram em aumento do valor de potencial de 0,366V para 0,402V, diminuição dos valores de corrente em  $0,41 \times 10^{-6}$  A e diminuição da área do pico em  $0,031 \times 10^{-6}$  AV. Os resultados na presença do urato foram semelhantes, com diminuição do sinal voltamétrico (Figura 7D), indicando que na ausência de CPC o eletrodo não foi sensível ao aumento da concentração de ascorbato nem de urato.

#### *Adições de Urato em soro sangüíneo com ascorbato*

A interação entre o urato e ascorbato foi estudada através da adição de concentrações crescentes de urato em amostra de soro contendo 100 mmolL<sup>-1</sup> de ascorbato na presença e na ausência de CPC. Os dados obtidos estão apresentados na Figura 9.



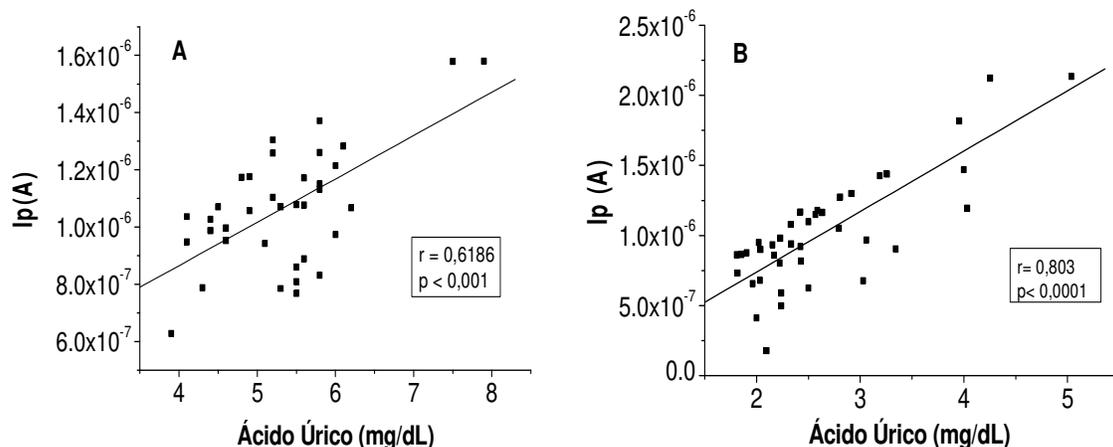
**Figura 9** - Adições de urato (concentrações: 20, 40, 60,80 e 100 mmolL<sup>-1</sup>) em soro (diluído em pbs na razão 1:4) na presença de 100mmolL<sup>-1</sup> CPC (A), ausência de CPC (B) p.H. 7,4. Ambas as amostras continham ascorbato na concentração de 100mmolL<sup>-1</sup> adicionado previamente. As medidas foram feitas em triplicata para cada concentração. As setas indicam o sentido das tendências quando as concentrações aumentam.

Na presença de CPC as adições subsequentes de urato gerando concentrações crescentes deste composto induziram deslocamento no Ep para valores menos positivos (de 0,276V para 0,150V), com aumento dose dependente na corrente de pico. Os valores de corrente e área aumentaram em resposta ao aumento da concentração de antioxidantes nesta condição. Na ausência de CPC esse efeito não foi observado. As adições de urato provocaram o deslocamento do potencial de pico de 0,40V para 0,42V. Houve uma tendência à diminuição nos valores de corrente e área. Na ausência de CPC não houve sensibilidade ao aumento da concentração de urato.

Esses dados reforçam a natureza dos antioxidantes do primeiro pico de potencial como sendo principalmente urato e o ascorbato [7]. Mostram ainda que na presença de CPC a técnica foi sensível para detectar concentrações crescentes de urato adicionadas a amostra de soro e ascorbato e que o urato anula o efeito do ascorbato no voltamograma.

#### *Correlações de VPD com Ácido Úrico no soro e na saliva.*

A Figura 10 apresenta os dados de correlação entre os valores de corrente de pico  $I_p$  e os valores de ácido úrico de 30 amostras de soro (A) e saliva (B) de atletas juvenis de futebol.



**Figura 10.** Correlação dos valores de  $I_p$  em soro (A) e saliva (B) com ácido úrico. Soro e saliva foram diluídos em PBS razão 1:4.

Os valores de corrente apresentaram boa correlação com ácido úrico em soro ( $r = 0,6186$   $p < 0,001$ ) e saliva ( $r = 0,803$   $p < 0,0001$ ), respectivamente (A e B). Os valores de corrente de pico

de soro e saliva não apresentaram correlação entre si (dados não apresentados). Os dados de correlação entre  $I_p$  e urato apontam o urato como um forte determinante da capacidade antioxidante, principalmente na saliva. A baixa correlação entre os valores de corrente de pico e os valores obtidos pela técnica do FRAP (dados não mostrados), de certa forma eram esperados, pois essa técnica mede a capacidade antioxidante total, composta por outros antioxidantes que não somente os encontrados na primeira corrente de pico.

## CONCLUSÕES

Os resultados apresentados nesse trabalho mostraram que a VPD combinada com o ambiente catiônico micelar de CPC pode ser considerada uma medida direta da capacidade antioxidante, tendo em vista que os resultados estão baseados apenas nas propriedades físico-químicas dos compostos antioxidantes, sem o uso de espécies reativas. O urato e o ascorbato são os principais componentes do primeiro pico de corrente.

Devido à complexidade de composição de uma amostra biológica, a separação de cada composto antioxidante e o estudo de sua ação individualmente pode ser ineficiente, principalmente porque os resultados não levariam em conta a ação integrada entre os compostos, fato muito relevante quando se analisa a capacidade antioxidante em um determinado sistema. Além disso, o processo de separação normalmente encarece o método.

O surfactante CPC mostrou-se altamente efetivo na estabilização, seletividade e sensibilidade de detecção de antioxidantes em soro e saliva. Pode substituir o polimento e prevenir a passivação gradual do eletrodo de trabalho e perda de sinal voltamétrico. Nessas condições, a VPD apresenta-se como um método de simples aplicação. O tempo de análise é curto e o custo torna-se baixo tendo em vista a reutilização do material. Os dados apresentados nesse estudo validam a VPD como uma metodologia para avaliação do estado redox do soro e saliva em diferentes situações fisiológicas ou patológicas.

A possibilidade de determinação da capacidade antioxidante através da saliva apresenta-se com uma alternativa prática e pouco invasiva. A literatura não apresenta estudos da determinação da capacidade antioxidante em saliva através da voltametria. Além disso, a determinação do poder redutor de fluidos biológicos como a saliva pode ser mais confiável, tendo em vista que não esta sujeita a influência da dieta e outras interferências.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] A. Escarpa, A. J. Blasco, A.G. Crevilén; M.C. Gonzáles. *Electroanalysis* 19, (2007), 22, 2275.
- [2] T. Atsumi.; I. Iwakura; Y; Y. Kashiwagi, O.A. Avramchik. *Anal Bioanal Chem* (2003) 375:465-468.
- [3] E.I. Korotkova, Y.A. Karbainov, O.A. Avramchik. *Anal Bioanal Chem* (2003) 375:465-468.
- [4] E.I. Korotkova, Y.A. Karbainov, O.A, A.V. Shevchuck. *Journal of Eletroanalytical Chemistry* (2002) 518: 56-60.
- [5] G. Cao, Prior, R.L.; *Clin. Chem*, (1998), 44,1309.
- [6] B. Halliwell, *Free Radical Res. Commun.* (1990), 9, 1.
- [7] S. Chevion, E.M. Berry, N. Kitrossky, R. Kohen. *Free Radical Biology & Med.*22, (1997) 411.
- [8] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge. *Free Radical Biology & Medicine* 3, (1998).
- [9] R.Kohen, E.Vellaichamy, J.Harbac, I.Gatti, O.Tirosh. *Free Radical Biology & Med.*28, (2000) 871.
- [10] Skoog, D. A., Holler, F.J., Niemen T. A. *Princípios de Análise Instrumental*, 5<sup>a</sup> Edição, Ed Bookman, (2006) Porto Alegre.
- [11] P.T.Kissinger, T.H.Ridgway. *Laboratory Techniques in Eletroanalytical Chemistry.* (1996) 141
- [12] C.R. Raj, K. Tokuda, T.Ohsaka, *Bioeletrochemistry* 53 (2001) 183-191.
- [13] J. Barek, A.G. Fogg, A. Muck, J. Zima (2001) *Crit. Rev. Anal. Chem.* 31 291.
- [14] B. Hoyer, N. Jensen (2001) *Eletroanalysis.* 13 843.
- [15] C.E. Banks, R.G. Compton, *Eletroanalysis* (2003) 15 329.
- [16] B. Hoyer, N. Jensen (2003) *Electrochemistry Communications* 5 257-261.
- [17] J. F. Rusling, *Acc. Chem. Res.* 24 (1991) 75.
- [18] J. F. Rusling, *Acc. Chem. Res.* 37(1998) 363.

- [19] B. Hoyer, N. Jensen (2006) *Electrochemistry Communications* 8 323-328.
- [20] Cureel K., Jeukendrup, A. E. *Sports Med.* 38 (2008) 4 297-316.
- [21] G. Atkinson, A.M. Nevill. *Sports Medicine*, 26 (1998) 4 216-238.
- [22] W.G.Hopkins. *Sports Medicine*, 30 (2000) 1 1-15.
- [23] R.B. Raggam, B.I. Santner, M. Kollroser, W. Gössler, Schmied B., Schmitt U. *Clin Chem Lab Med* 2008;46(92):287-291.
- [24] C. A.Burtis, E.R. Ashwood. *Clinical Chemistry*. WB Saunders Company; 1999.
- [25] I. F. F. Benzi, J. J. Strain. *Analytical Biochemistry*, 239 (1996) 1 70-76.
- [27] T.F. Connors, J.F. Rusling, A.Owlia, *Anal Chem*, 57 (1985) 170.
- [28] M. Le maire, C. Philippe, V. Moller. *Biochimica et Biophysica Acta* 1508 (2000) 86.
- [29] S. Chevion, M.A. Roberts, M. Chevion. *Free Radical Biology & Med.* 28 (2000) 860.
- [30] R.Kohen, E.Beit- Yannai, E.M. Berry, O.Tirosh. *Meth. Enzymol.* (1999) 300,285.
- [31] S. Chevion, M. Hofmann, R. Ziegler, M. Chevion, P. Nawroth. *Biochem. Molec. Biol. Int.* 41 (1997) 317.
- [32] A. P. Reis, C. R. T. Tarley, N. Maniasso, L.T. Kubota. *Talanta* 67 (2005) 829

## **CAPÍTULO 3**

---

---

**DETERMINAÇÃO DE INTERVALOS DE REFERÊNCIA PARA CONCENTRAÇÃO DE  
ANTIOXIDANTES EM AMOSTRAS DE SALIVA DE INDIVÍDUOS  
FISICAMENTE ATIVOS.**

## **DETERMINAÇÃO DE INTERVALOS DE REFERÊNCIA PARA CONCENTRAÇÃO DE ANTIOXIDANTES EM AMOSTRAS DE SALIVA DE INDIVÍDUOS FISICAMENTE ATIVOS.**

### **1. INTRODUÇÃO**

O estudo da variação dos níveis de antioxidantes não enzimáticos no exercício é pouco descrito em condições de treinamento, sendo normalmente relatada sua variação após sessões únicas de exercício (Ji, 1992; Sen, 1995; Essig e Nosek, 1997; Smolka *et al.*, 2000; Ji, 2002, Waring 2003). As variações do sistema de defesa antioxidante e sua correlação em diferentes fluidos poderiam indicar quais biomarcadores seriam mais eficientes, práticos e viáveis para um acompanhamento constante das adaptações do sistema de defesa antioxidante no exercício, e a possível identificação de um limiar de estresse oxidativo como resultado das constantes sobrecargas de esforço físico durante um treinamento sistematizado.

O primeiro passo para a aplicação de qualquer biomarcador no diagnóstico dos estados FOR (*overreaching* funcional) ou NFOR (*overreaching* não-funcional), é a determinação de valores de referência para este parâmetro de preferência em sujeitos expostos a um período de treinamento.

Intervalos de referência podem ser definidos a partir da faixa de valores para um determinado exame laboratorial observada em uma determinada população, sendo descrito normalmente pelos valores superiores e inferiores da faixa dos limites de referência. Nesta faixa estão contidos 95% dos resultados encontrados (Solberg, 2004).

A possibilidade de determinação da capacidade antioxidante da saliva através da VPD associada ao surfactante CPC se mostra como uma alternativa prática e não invasiva. Isso é importante uma vez que sujeitos em treinamento normalmente solicitam formas de coleta de amostras menos invasivas que a punção venosa.

O objetivo do presente estudo foi analisar a distribuição dos valores de capacidade antioxidante para ABPM em amostras de saliva analisadas pelo método de VPD associada ao CPC a fim de determinar os valores mínimos e máximos deste parâmetro em indivíduos submetidos a um treinamento físico diário.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 População

Fizeram parte da amostra 108 indivíduos integrantes da Escola Preparatória de Cadetes do Exército e 39 indivíduos da equipe juvenil de Futebol de Paulínia. A idade média dos indivíduos foi de  $17 \pm 2$  anos. Foram excluídos do estudo indivíduos que fizeram uso de medicação, suplementos, vitaminas ou que apresentaram algum tipo de lesão. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana (0200.0.146.000 - 08). Todos os indivíduos ou responsáveis forneceram por escrito um consentimento livre e esclarecido para a realização do estudo após serem devidamente informados sobre a finalidade e os procedimentos envolvidos.

É importante ressaltar que o grupo de cadetes pode ser considerado uma população de referência de jovens fisicamente ativos, pois possuem uma faixa etária bem definida originam-se de diferentes regiões do Brasil, possuem uma alimentação controlada e praticam atividades físicas diárias e regulares.

### 2.2 Amostras de saliva

As amostras de saliva foram coletadas através do *Saliva Collection System* (SCS) (Greiner Bio-One GmbH, Kremsmuenster, Austria) de acordo com as instruções do fabricante (<http://www.vacurette.com/en/company/3698.php>). Antes da coleta de saliva foi aplicada a solução de enxágüe bucal fornecida no próprio kit. Posteriormente, o sujeito permaneceu com a solução de extração de saliva em sua boca por dois minutos. A solução foi coletada em béquer plástico e depois transferida para dois tubos de centrifugação graduados com solução conservante. As amostras de saliva foram centrifugadas a 2200g por 15 minutos sob refrigeração (4°C). A amostra de saliva coletada através do SCS contém tartrazina como padrão interno, que é determinada fotometricamente a 450 nm. Os tubos graduados permitem conhecer o volume exato de saliva coletado [23]. O conteúdo de saliva na solução (vol. -%) é obtido pela comparação com os padrões internos fornecidos no kit de coleta de saliva SCS.

### 2.3 Procedimento para as medidas voltamétricas

As medidas voltamétricas foram realizadas com potenciostato PGSTAT-10 da Autolab Echo Chemie (Utrecht, Netherlands) interfaceado a um computador e controlado pelo software GPES 4.9. Foi utilizada uma célula eletroquímica com três eletrodos: um eletrodo de calomelano saturado como eletrodo de referência, um fio de platina como eletrodo auxiliar e um eletrodo de carbono vítreo de 3-mm de diâmetro utilizado como eletrodo de trabalho. O eletrodo de carbono vítreo foi cuidadosamente polido com alumina 0,3  $\mu\text{m}$  em uma superfície abrasiva e lavado com água deionizada antes de cada série de experimentos.

Para as medidas voltamétricas foram usados 120  $\mu\text{L}$  de saliva. As amostras foram diluídas em 480  $\mu\text{L}$  de solução de PBS na concentração de 0,5 mol  $\text{L}^{-1}$  e cloreto de cetilpiridina (CPC) concentração de 100 mmol  $\text{L}^{-1}$  em pH 7,4. A solução de PBS foi utilizada como eletrólito de suporte. A faixa de potencial aplicada para realização das medidas foi de 300 mV a 1000 mV. A temperatura da célula eletroquímica foi regulada em  $20,0 \pm 0,5$  °C.

### 2.4 Análise Estatística

Para determinar o intervalo de referência para a capacidade antioxidante de amostras de saliva foi seguido o critério estabelecido pela Federação Internacional de Química Clínica. Conforme este critério, a determinação de intervalos de referência depende do método de avaliação e do tamanho do conjunto de dados disponíveis sendo necessárias no mínimo 120 amostras. (Horn, 2003). O programa RefVal (Solberg, 2004) que inclui os parâmetros de análise recomendados pela Federação Internacional de Química Clínica foi usado para calcular os limites de referência máximos e mínimos para dados paramétricos com percentis de 97.5 e 90, e intervalo de confiança (IC) de 90% pelo método Bootstrap. (Horn, 2003; Solberg, 2005)

A primeira recomendação é detectar *outliers* antes de qualquer análise de intervalo de referência (Horn, 2003). Os *outliers* foram detectados e removidos pelo teste de Horn (Solberg, 2005). A Tabela 1 mostra o número de análises, o número de *outliers* para os parâmetros de  $E_p$  e  $I_p$  com os seus respectivos valores, o número total de amostras analisadas após a remoção dos *outliers* e os valores de média e desvio das amostras analisadas.

**Tabela 1.** Número total de atletas analisados para determinação de Ip na saliva, número e valor dos *outliers* detectados, média e desvio das amostras utilizadas.

Número de análises EsPCEX	108
Número de análises Paulínia FC	39
<b>Total de análises</b>	<b>147</b>
Número de <i>outliers</i> detectados EsPCEX	8
Número de <i>outliers</i> detectados Paulínia	1
<b>Total de <i>outliers</i> detectados</b>	<b>9</b>
<b>Valores dos <i>outliers</i> EsPCEX</b>	0,2x10 <sup>-6</sup> A; 0,2x10 <sup>-6</sup> A; 0,3x10 <sup>-6</sup> A; 2,1x10 <sup>-6</sup> A; 2,4x10 <sup>-6</sup> A; 2,4x10 <sup>-6</sup> A; 2,4x10 <sup>-6</sup> A; 2,5x10 <sup>-6</sup> A
<b>Valores dos <i>outliers</i> Paulínia FC</b>	2,1x10 <sup>-6</sup> A
<b>Número de análises utilizadas</b>	<b>138</b>
<b>Ip (A) média ± desvio</b>	0,98x10 <sup>-6</sup> A ± 0,35x10 <sup>-7</sup> A

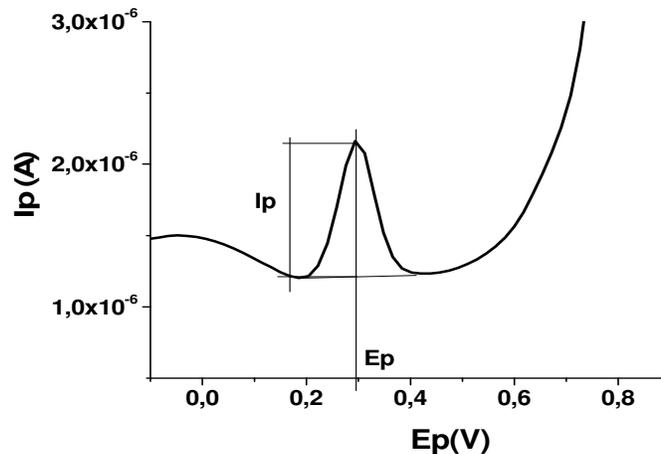
Os gráficos em boxplots foram utilizados para uma análise descritiva dos valores de concentração de antioxidantes (Ip) e poder redutor das amostras (Ep) dos dois grupos EsPCEX e Paulínia Futebol Clube, com intuito de verificar se os dois grupos poderiam compor uma mesma população. Os gráficos foram feitos através do programa Matlab® 7.0. A análise dos resultados e estatística foram feitas através do programa Origin 6.0 Foi utilizado o teste Kruskal- wallis para comparação entre os dois grupos. Valores de  $p < 0.05$  foram considerados significativos.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dois parâmetros podem ser analisados através da medida da capacidade antioxidante por VPD. O primeiro é o valor de Ep (potencial do pico) e o segundo é denominado Ip (corrente do pico). O valor de Ep indica o poder redutor da amostra e a natureza do composto analisado, (Kissinger e Heineman 1983, Mabbott 1983). Quanto menor o valor de Ep, maior é o poder de redução da amostra. Já o valor de Ip (corrente do pico) indica a concentração do composto

analisado (Kissinger e Heineman 1996, Mabbott 1983) quanto maior o valor de  $I_p$ , maior será a concentração de antioxidantes da amostra.

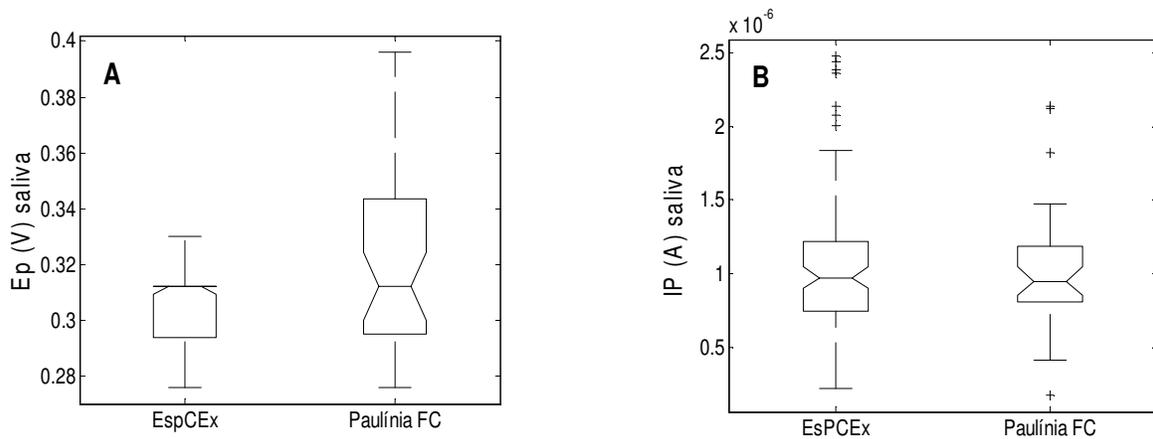
A Figura 1 apresenta um voltamograma representativo de uma amostra de saliva e a indicação dos parâmetros analisados.



**Figura 1.** – Voltamograma de Pulso Diferencial obtido de uma amostra de saliva diluído em PBS (1:4) e CPC  $100\text{mmolL}^{-1}$ .

As amostras de saliva apresentam um único pico. Os picos observados em amostras biológicas nesta faixa de potencial são compostos principalmente por ácido úrico e ácido ascórbico (Kohen *et al.*, 2000; Chevion *et al.*, 1997). Dados nossos apresentados no capítulo 2 dessa dissertação reforçam que o ácido úrico é principal antioxidante constituinte desse 1º pico de corrente anódica.

A literatura aponta que variáveis como nível e intensidade de treinamento, dieta e tempo de recuperação podem alterar a capacidade antioxidante (Waring *et al.*; 2003; Finaud *et al.*; 2006; Palazzetti *et al.*; 2004). Embora ambos os grupos apresente um rigoroso controle destas variáveis (principalmente o grupo dos cadetes), é necessário que os dois grupos não apresentem diferenças significativas para a variável a ser analisada em conjunto, compondo a mesma população. Para isso foram comparados os valores de  $E_p$  e  $I_p$  dos dois grupos. Os resultados estão apresentados na Figura 2.



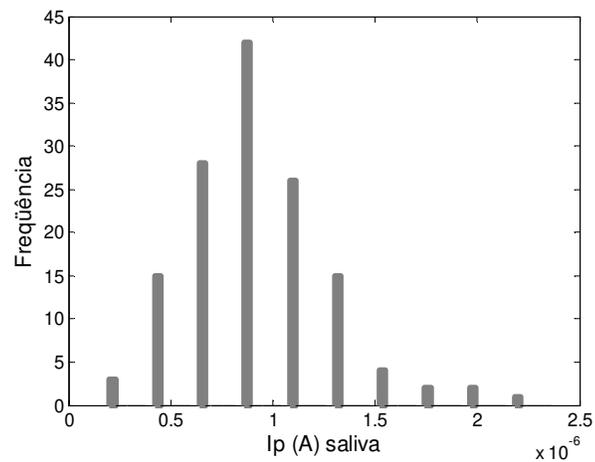
**Figura 2.** Comparação dos valores de Ep (figura 2-A) e Ip (figura 2-B) obtidas nas análises das amostras de saliva da EspCEx (n=108) e Paulínia FC (n=39). Os valores de Ep apresentaram diferença significativa entre os dois grupos ( $p < 0.05$ ).

Os valores de Ep apresentaram diferença significativa entre os dois grupos analisados. As amostras da EspCEx exibiram valores menores de Ep indicando um maior poder redutor das amostras. Valores menores de potencial podem estar relacionados à maior presença de urato em relação aos demais antioxidantes que compõem o pico. Apesar de urato e ascorbato se reduzirem na mesma faixa de potencial, nossos resultados prévios (capítulo 2) apontaram que o aumento na concentração de urato pode deslocar o potencial para um valor menos positivo. O mesmo não aconteceu com o aumento de ascorbato.

Não houve diferença significativa entre os dois grupos para a concentração de antioxidantes (Ip) das amostras analisadas ( $p < 0.05$ ). No entanto, um maior número de *outliers*, indicando concentrações elevadas de antioxidantes foi observado nas amostras da EspCEx .

### 3.1 Determinação dos intervalos limites de referência

A Figura 3 apresenta o histograma das diferentes concentrações de antioxidantes observadas nos 138 indivíduos analisados, indicando uma distribuição normal. A maioria dos dados se concentrou entre  $0,6 \times 10^{-6}$  e  $1,2 \times 10^{-6}$ .



**Figura 3.** Frequência dos valores de Ip (A) em 138 amostras de saliva de atletas analisados.

Os valores limite superiores e inferiores determinados para capacidade antioxidante na saliva estão apresentados na Tabela 2. O limite inferior de capacidade antioxidante, percentil 2,5% foi de  $0,4 \times 10^{-6}$  A (IC-intervalo de confiança =  $0,4 \times 10^{-6}$  A e  $0,5 \times 10^{-6}$  A). O limite superior de capacidade antioxidante, percentil 97,5% foi  $19 \times 10^{-6}$  A (IC=  $16 \times 10^{-6}$  A e  $21 \times 10^{-6}$  A).

**Tabela 2.** Valores de limite superior e limite inferior com intervalo de confiança de 90% para concentração da capacidade antioxidante na saliva (Ip)

Valores de Ip (A)	
<b>Percentil 97,5</b>	$19 \times 10^{-6}$ A
<b>IC *</b>	$16 \times 10^{-6}$ A e $21 \times 10^{-6}$ A
<b>Percentil 2,5</b>	$0,4 \times 10^{-6}$ A
<b>IC *</b>	$0,4 \times 10^{-6}$ A e $0,5 \times 10^{-6}$ A

**\* intervalo de confiança de 90% para os limites superiores e inferiores dos percentis indicados.**

Neste estudo foi utilizada a metodologia recomendada pela Federação Internacional de Química Clínica para analisar a concentração de antioxidantes de baixo peso molecular na saliva de indivíduos submetidos ao treinamento físico pertencentes a EsPCEX e ao Paulínia FC.

Dentre os *outliers* detectados, 6 *outliers* apresentaram concentrações de antioxidantes acima do limite superior de referência e 3 *outliers* apresentaram concentrações abaixo do limite inferior (tabela 1).

A literatura não apresenta estudos de intervalos de referência antioxidantes em amostras de saliva, muito menos através da técnica de VPD. Talwar (2005) determinou a variação

biológica de vitaminas em indivíduos saudáveis pelo método HPLC. Porém os resultados apresentam limitações devido ao número de indivíduos analisados (n=14). O autor aponta que as metodologias atuais são imprecisas para determinação da maioria das vitaminas e os intervalos de referências apresentam valores limitados para detectar deficiência ou excesso.

Poucos estudos são encontrados sobre a capacidade antioxidante na saliva relacionados ao exercício físico. As variações normalmente são relatadas em função de sessões únicas de exercício e os resultados são contraditórios (Tauler *et al.*, 2003; Vina *et al.*, 2000).

Atsumi *et al.*, (2008) apresentou um estudo mostrando diminuição na capacidade antioxidante da saliva como resposta ao exercício físico, sugerindo que este parâmetro pode refletir o estado de saúde do indivíduo. González *et al.*, (2008) sugeriram que o exercício aeróbico induz o aumento de ácido úrico e conseqüentemente da atividade antioxidante na saliva.

A discussão sobre a necessidade de maiores estudos que enfoquem os efeitos do treinamento nos níveis de ABPM é relativamente recente, devido ao papel que estes exercem e a possíveis alterações nas necessidades dietéticas durante o treinamento físico que estas variações possam implicar (Powers *et al.*, 1999).

#### **4. CONCLUSÃO**

Os valores obtidos nesse estudo permitem avaliar indivíduos em relação à capacidade antioxidante. Aqueles que apresentam capacidade antioxidante dentro dos parâmetros estabelecidos provavelmente apresentam uma adaptação positiva ao treinamento. Indivíduos com valores de capacidade antioxidante, principalmente abaixo do limite inferior provavelmente não estão apresentando resultados adaptativos positivos ao treinamento.

#### **5. CONSIDERAÇÕES E PERSPECTIVAS**

A utilização da saliva, por ser um método não invasivo, apresenta vantagens em relação a outras práticas como coleta de sangue ou biópsia muscular para se realizar um acompanhamento da capacidade antioxidante conferida por ABPM durante um período de treinamento.

A determinação dos limites de referência da capacidade antioxidante determinada pela técnica de VPD associada ao uso de CPC pode contribuir para monitorar, adequar, e

individualizar os programas de treinamento físico, garantindo que a sobrecarga do exercício seja adequada para manutenção da saúde e integridade física.

Nossos resultados sugerem que a concentração de antioxidantes na saliva pode ser usada como parâmetro para detectar uma possível instalação de altos níveis de estresse oxidativo como consequência da sobrecarga de treinamento.

## 6. REFERÊNCIAS

Atsumi T.; Tonosaki K.; Fujisawa S. Salivary free radical-scavenging activity is affected by physical and mental activities. **Oral Dis.** 2008 Sep; 14:490-6.

Chevion S.; Berry EM.; Kitrossky N.; Kohen R. Evaluation of plasma low molecular weight antioxidant capacity by cyclic voltammetry. **Free Radic. Biol. Med.** 1997; 22 (3):411-21.

Essig DA.; Nosek TM. Muscle fatigue and induction of stress proteon genes: a dual function of reactive oxygen species. **Can. J. Appl. Physiol.** 1997; 22 (5): 409-428.

Finaud J.; Lac G.; Filaire E. Oxidative stress: relationship with exercise and training. **Sports Med.** 2006; 36 (4):327-58. Review.

González D.; Marquina R.; Rondón N.; Rodriguez-Malaver AJ.; Reyes R. Effects of aerobic exercise on uric acid, total antioxidant activity, oxidative stress, and nitric oxide in human saliva. **Res. Sports Med.** 2008;16(2):128-37.

Horn SP.; Pesce AJ. Reference intervals: an update. **Clin Chim Acta** 2003; 334:5-23.

Ji, LL.; Fu RG. Responses of glutathione system and antioxidant enzymes to exhaustive exercise and hydroperoxide. **J. Appl. Physiol.** 1992; 72: 549-554.

Ji, L. L. Increasing healthy life span: conventional measures and slowing the innate aging process. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 2002; 959: 82-92.

Kissinger PT.; Heineman WR.; Em Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry; 2<sup>a</sup> ed. Marcel Dekker, Inc.: New York, **1996**.

Kohen R.; Vellaichamy E.; Hrbac J.; Gati I.; Tirosh O. Quantification of the overall reactive oxygen species scavenging capacity of biological fluids and tissues. **Free Rad. Biol. Med.** 2000; 28, 6: 871-879.

Mabbott GA. **J. Chem. Educ.** 1983, 60, 697;

Palazzetti S.; Rousseau AS.; Richard MJ. Antioxidant related to exercise intensity? supplementation preserves antioxidant response in physical training and low antioxidant intake. **Br. J. Nutr.** 2004; 91: 91-100

Powers SK.; Hamilton K. Antioxidants and exercise. **Clin. Sports Med.** 1999; 18 (3): 525-536.

Raggam RB.; Santner BI.; Kollroser M.; Gössler W.; Schmied B., Schmitt U. **Clin. Chem. Lab Med** 2008; 46(92):287-291.

Sen CK.; Kolosova I.; Hänninen O.; Orlov SN. Inward potassium transport systems in skeletal muscle derived cells are highly sensitive to oxidant exposure. **Free Radic Biol. Med.** 1995; 18 (4): 795-800.

Smolka MB.; Zoppi CC.; Alves AA.; Silveira LR.; Marangoni S.; Pereira-Da-Silva L.; Novello JC.; Macedo DV. HSP72 as a complementary protection against oxidative stress induced by exercise in the soleus muscle of rats. **Am. J. Physiol.** 2000; 279: R1539-R1545.

Solberg HE. The IFCC recommendation on estimation of reference intervals. The RefVal program. **Clin. Chem. Lab Med** 2004; **42**:710-4.

Solberg HE.; Lahti A. Detection of outliers in reference distributions: performance of Horn's Algorithm. **Clin. Chem.** 2005; **51** (12): 2326-32.

Tauler P.; Aguil A.; Gimeno I.; Fuentespina E.; Tur J.; Pons A. Influence of vitamin C diet supplementation on endogenous antioxidant defences during exhaustive exercise. **Eur J Physiol** (2003) 446:658–664.

Viña J.; Gomez-Cabrera MC.; Lloret A.; Marquez R.; Miñana JB.; Pallardó FV.; Sastre J. Free radicals in exhaustive physical exercise: mechanism of production, and protection by antioxidants. **IUBMB Life.** 2000 Oct-Nov; 50(4-5):271-7.

Waring WS.; Convery A.; Mishra V.; Shenkin A.; Webb DJ.; Maxwell SR. Uric acid reduce exercise-induced oxidative stress in healthy adults. **Clin Sci.** 2003; 105 (4):425-30.

## Declaração de aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana

Andamento do projeto - CAAE - 0200.0.146.000-08				
Título do Projeto de Pesquisa				
ESTUDO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS NA SALIVA E SANGUE DE JOGADORES DE FUTEBOL E PESSOAS FÍSICAMENTE ATIVAS				
Situação	Data Inicial no CEP	Data Final no CEP	Data Inicial na CONEP	Data Final na
Aprovado no CEP	17/04/2008 16:11:54	19/05/2008 16:17:38		
Descrição	Data	Documento	Nº do Doc	
1 - Envio da Folha de Rosto pela Internet	10/04/2008 11:20:30	Folha de Rosto	FR186685	
2 - Recebimento de Protocolo pelo CEP (Check-List)	17/04/2008 16:11:56	Folha de Rosto	0200.0.146.000-08	
3 - Protocolo Aprovado no CEP	19/05/2008 16:17:37	Folha de Rosto	260/2008	

⊙ Voltar