

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICA
CÂMPUS DE ARARAQUARA**



Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia

**Efeito dos solutos urêmicos sobre espécies reativas de oxigênio em
sistemas-modelo *in vitro***

RENATA PIRES DE ASSIS

**Araraquara/SP
2012**

RENATA PIRES DE ASSIS

**Efeito dos solutos urêmicos sobre espécies reativas de oxigênio em sistemas-
modelo *in vitro***

Dissertação de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” campus de Araraquara como parte dos requisitos para o título de mestre em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia. Área de concentração: Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti

Araraquara/SP
2012

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

A848e Assis, Renata Pires de
 Efeito dos solutos urêmicos sobre espécies reativas de oxigênio em
 sistemas-modelo *in vitro* / Renata Pires de Assis. – Araraquara, 2012
 93 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de
Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós
Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia
Orientador: Iguatemy Lourenço Brunetti

1. Doença renal crônica. 2. Hemodiálise. 3. Estresse oxidativo.
4. Antioxidante. I. Brunetti, Iguatemy Lourenço, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

**Efeito dos solutos urêmicos sobre espécies reativas de oxigênio em sistemas-
modelo *in vitro***

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti
Orientador e Presidente da Comissão Examinadora

Profa. Dra. Mariza Pires de Mello
Membro Titular

Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli
Membro Titular

A apresentação

Dissertação de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicada à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Campus de Araraquara como parte dos requisitos para o título de mestre em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia. Área de concentração: Bioquímica.

Trabalho desenvolvido no laboratório de Bioquímica Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP/ Câmpus Araraquara.

Fomento: Bolsa CNPq – Mestrado.

"A pesar dos nossos defeitos, precisamos enxergar que somos pérolas únicas no teatro da vida e entender que não existem pessoas de sucesso e pessoas fracassadas. O que existem são pessoas que lutam pelos seus sonhos ou desistem deles."

Augusto Cury

A agradecimentos

À Deus, por conceder esta oportunidade, me abençoando em todos os momentos, com sabedoria e persistência, dando-me forças para prosseguir.

Aos meus pais, Osni e Ana Helena, pelo amor e dedicação que sempre demonstraram a mim, por acreditarem em meus objetivos e por serem os grandes incentivadores e auxiliares em todas as etapas dessa conquista! Amo vocês!

Às minhas irmãs, Fernanda e Rafaela, por todo carinho e preocupação, sempre encorajando e incentivando-me a lutar por meus objetivos. Amo vocês!

Ao Pedro, meu namorado, pelo amor e carinho dispensados a mim, pela compreensão nos momentos de ausência, pela paciência em sempre me ouvir e apoiar nas horas difíceis, e por compartilhar juntamente comigo minhas vitórias.

Ao orientador, Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti, por ter acreditado em mim, pela orientação presente e cuidadosa, bem como pelas constantes exigências, que hoje me fazem perceber o quanto se fizeram necessárias para a realização deste trabalho. Obrigada pelos ensinamentos e por, ao longo dessa trajetória ter sido além de um professor, um amigo e um apoio. Sua competência me servirá sempre de exemplo.

À Juliana Fernanda Almeida Castro, pela grande amizade e por toda a ajuda, sendo meu braço direito durante esta jornada. Você faz parte desta conquista! Muito obrigada por tudo!

Aos amigos de laboratório, Vânia, Juliana, Carlos, Aline, Bianca, Clara e Vanessa, pela convivência e companheirismo no decorrer deste trabalho.

Às amigas: Paula, Luana, Ozeni, Michelle, Grace, Vânia e Jaqueline, companheiras de república, estando sempre presentes tanto nos momentos de alegria, como nos momentos mais difíceis.

Obrigada a todos vocês. Nada teria acontecido sem a participação, ajuda e amizade de cada um!

RESUMO

Em pacientes com doença renal crônica é observado à presença de estresse oxidativo e a exacerbação desse estresse com o tratamento hemodialítico, bem como tem se postulado a ação antioxidante de alguns solutos urêmicos. Esse contexto instigou-nos explorar, a ação antioxidante dos solutos urêmicos: L-arginina, Ácido Úrico, Ácido Hipúrico, Creatinina, Fenol, Metilguanidina, *p*-Cresol, L-tirosina e Uréia, utilizando sistemas-modelo *in vitro*. Quatro desses solutos mostraram eficiência (expressa via o IC₅₀ em µmol/L) para os sistemas-modelo: Capacidade de captura sobre o ABTS^{•+}, *p*-Cresol (3,99 ± 0,01), L-tirosina (5,23 ± 0,02), Fenol (12,98 ± 0,09) e o Ácido Úrico (16,75 ± 0,14); Capacidade de captura sobre o HOCl / OCl⁻, L-tirosina (2,83 ± 0,04), Ácido Úrico (5,75 ± 0,13), Fenol (8,95 ± 0,10) e *p*-Cresol (15,75 ± 0,12), e o *bleaching* da crocina (lipoperoxidação), Ácido Úrico (6,90), Fenol (1125,81) e *p*-Cresol (1162,31). Em relação à capacidade de captura sobre o Ânion Radical Superóxido e o Peróxido de Hidrogênio nenhum dos solutos apresentou atividade significativa. Em todos os ensaios onde não foi observada atividade antioxidante, investigou-se desde concentrações fisiológicas, urêmicas e até 10 vezes maior que as concentrações urêmicas médias. Como os solutos urêmicos, Ácido Úrico, *p*-Cresol, Fenol e L-tirosina capturaram significativamente as espécies reativas, ABTS^{•+}, HOCl / OCl⁻ e ROO[•], estudou-se o comportamento da mistura desses solutos, tendo como referência o IC₅₀ de cada soluto. Obteve-se nos ensaios de captura do ABTS^{•+} e do HOCl / OCl⁻ os IC₅₀, como uma fração de concentração de 26 e 27%, respectivamente, para cada soluto na mistura, o que demonstrou um efeito aditivo, praticamente exato, na captura do ABTS^{•+} ou do HOCl / OCl⁻ pelos quatro solutos da mistura. Para o ensaio do ROO[•] esse efeito aditivo foi observado, mas não exatamente aditivo, portanto foi necessário uma fração de concentração maior para obtenção do IC₅₀. Embora alguns solutos mostraram eficiência na captura de determinadas espécies reativas de oxigênio (ERO), e assim contribuir para a prevenção do estresse oxidativo, tais fatos ainda não devem ser suficiente para proteger o organismo, uma vez que a produção de ERO é exacerbada com a hemodiálise e em especial pela ausência de atividade antioxidante dos solutos urêmicos frente ao ânion radical superóxido e ao peróxido de hidrogênio.

Palavras-chave: doença renal crônica, hemodiálise, estresse oxidativo, antioxidante.

ABSTRACT

Patients with chronic kidney disease suffer from oxidative stress and this stress is exacerbated by hemodialysis. It has been postulated that some uremic solutes have antioxidant effects. This context prompted us to explore the antioxidant action of the uremic solutes: L-arginine, uric acid, hippuric acid, creatinine, phenol, methylguanidine, *p*-cresol, L-tyrosine and urea, by means of 5 *in vitro* model systems. Only four of these solutes were effective antioxidants (assessed by their IC₅₀ in µmol/L) in 3 model systems: ABTS^{•+} scavenging: *p*-cresol (3.99±0.01), L-tyrosine (5.23±0.02), phenol (12.98±0.09) and uric acid (16.75±0.14); hypochlorous acid scavenging: L-tyrosine (2.83±0.04), uric acid (5.75±0.13), phenol (8.95±0.10) and *p*-cresol (15.75±0.12); and crocin bleaching (lipoperoxidation): uric acid (6.90), phenol (1,125.81) and *p*-cresol (1,162.31). In tests with the superoxide radical anion and hydrogen peroxide, none of the solutes showed antioxidant activity. In each of the assays in which no activity was detected, tests were carried out over a range of solute concentrations, from normal physiological levels, through typical uremic up to ten times higher than mean uremic concentrations. As the 4 uremic solutes, uric acid, *p*-cresol, phenol and L-tyrosine showed significant scavenging activity for 3 reactive species, ABTS^{•+}, HOCl / OCl⁻ and ROO[•], the behavior of mixture of these solutes was investigated, with reference to the IC₅₀ of each solute. In the ABTS^{•+} and HOCl / OCl⁻ scavenging assays, the IC₅₀ involved a concentration of 26% and 27%, respectively, of each solute in the mixture, demonstrating an almost exactly additive capacity of the 4 solutes in the mixture for scavenging these species. In the ROO[•] assay, this additive effect was found, but not exactly additive; in this test, higher concentrations of the solutes were needed to reach an IC₅₀. Even though some of the solutes proved effective in scavenging particular reactive oxygen species (ROS) and thus could help to lessen oxidative stress, these effects would not be sufficient to protect the body, since the production of ROS is exacerbated by hemodialysis, and in particular because of the absence of antioxidant activity in the uremic solutes against the superoxide anion and hydrogen peroxide.

Keywords: antioxidant, chronic kidney disease, hemodialysis, oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fontes e respostas celulares às espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.....	29
Figura 2	Representação da ação antioxidante do urato.....	34
Figura 3	Representação da formação do $ABTS^{\bullet+}$	41
Figura 4	Representação da geração do ânion superóxido em presença de um antioxidante.....	42
Figura 5	Representação da oxidação do TMB através do agente oxidante $HOCl / OCl^-$.	43
Figura 6	Representação da estrutura da Crocina.....	44
Figura 7	Curva padrão da Crocina.....	46
Figura 8	Representação da oxidação do TNB à DTNB pelo H_2O_2	47
Figura 9	Inibição (captura) do $ABTS^{\bullet+}$ pelo Trolox.....	50
Figura 10	Inibição (captura) do $ABTS^{\bullet+}$ pelo p-Cresol	50
Figura 11	Inibição (captura) do $ABTS^{\bullet+}$ pela L-tirosina	51
Figura 12	Inibição (captura) do $ABTS^{\bullet+}$ pelo Fenol	51
Figura 13	Inibição (captura) do $ABTS^{\bullet+}$ pelo Ácido Úrico	52
Figura 14	Inibição (captura) do $ABTS^{\bullet+}$ pela Creatinina	52
Figura 15	Inibição (captura) do $ABTS^{\bullet+}$ pela L-arginina	53
Figura 16	Inibição (captura) do $O_2^{\bullet-}$ pelo Trolox.....	56
Figura 17	Inibição (captura) do H_2O_2 (IC_{50}) pela Catalase.....	59
Figura 18	Inibição (captura) do $HOCl/OCl^-$ pelo Trolox.....	60
Figura 19	Inibição (captura) do $HOCl/OCl^-$ pela L-tirosina.....	60
Figura 20	Inibição (captura) do $HOCl/OCl^-$ pelo Ácido Úrico.....	61
Figura 21	Inibição (captura) do $HOCl/OCl^-$ pelo Fenol.....	61

Figura 22	Inibição (captura) do HOCl/OCl ⁻ pelo <i>p</i> -Cresol.....	62
Figura 23	Inibição (captura) do HOCl/OCl ⁻ pelo Ácido Hipúrico.....	62
Figura 24	Inibição (captura) do HOCl/OCl ⁻ pela Uréia.....	63
Figura 25	Inibição (captura) do HOCl/OCl ⁻ pela Creatinina.....	63
Figura 26	Inibição (captura) do HOCl/OCl ⁻ pela L-arginina.....	64
Figura 27	Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com Trolox.....	66
Figura 28	Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com Ácido Úrico.....	66
Figura 29	Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com <i>p</i> -Cresol.....	67
Figura 30	Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com Fenol.....	67
Figura 31	Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com L-tirosina.....	68
Figura 32	Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com Uréia.....	68
Figura 33	Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com Metilguanidina.....	69
Figura 34	Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com Creatinina.....	69
Figura 35	Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com L-arginina.....	70
Figura 36	Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com Ácido Hipúrico.....	70
Figura 37	Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com Trolox e Ácido Úrico.....	71
Figura 38	Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com Trolox e <i>p</i> -Cresol.....	71
Figura 39	Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com Trolox e Fenol.....	72

Figura 40	Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com Trolox e L-tirosina.....	72
Figura 41	Inibição (captura) do $\text{ABTS}^{\bullet+}$ pela mistura dos solutos.....	77
Figura 42	Inibição (captura) do HOCl/OCl^- pela mistura de solutos.....	78
Figura 43	Ensaio do Clareamento da Crocina (IC_{50}) pela mistura de solutos.....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Concentrações dos solutos urêmicos.....	40
Tabela 2	Capacidade de captura do ABTS ^{•+} , expressa em porcentagem de inibição (IC ₅₀)...	53
Tabela 3	Capacidade de captura do O ₂ ^{•-} pelos solutos urêmicos, expressa como a porcentagem de inibição da redução do NBT.....	56
Tabela 4	Capacidade de captura do H ₂ O ₂ pelos solutos urêmicos, expressa como a porcentagem de inibição da oxidação do TNB.....	58
Tabela 5	Capacidade de captura do HOCl/OCl ⁻ , expressa como a porcentagem de inibição (IC ₅₀) da oxidação do TMB.....	64
Tabela 6	Equação de competição cinética entre solutos urêmicos e trolox (padrão).....	73
Tabela 7	Comparação entre as capacidades de captura do radical peroxila em equivalentes ao Trolox.....	73
Tabela 8	Comparação entre valores de coeficiente angular e IC ₅₀ , para o ensaio de clareamento da crocina.....	74
Tabela 9	Capacidade de captura do ABTS ^{•+} pela mistura de solutos urêmicos, expressa como a porcentagem de inibição (IC ₅₀) e sua relação aos IC ₅₀ de cada soluto....	77
Tabela 10	Capacidade de captura do HOCl/OCl ⁻ pela mistura de solutos urêmicos, expressa como a porcentagem de inibição (IC ₅₀) da oxidação do TMB e sua relação aos IC ₅₀ de cada soluto.....	78
Tabela 11	Capacidade de captura do radical peroxila pela mistura de solutos urêmicos, expressa como a porcentagem de inibição (IC ₅₀) da velocidade de clareamento da crocina e sua relação ao IC ₅₀ de cada soluto.....	79

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1	Metabolismo das purinas.....	34
Esquema 2	Reações envolvidas no clareamento da crocina com a termólise do AAPH	44

LISTA DE ABREVIATURAS

DRC	Doença renal crônica
LDLox	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
ERO	Espécie reativa de oxigênio
ERN	Espécie reativa de nitrogênio
$O_2^{\bullet-}$	Ânion radical superóxido
$HO^{\bullet}$	Radical hidroxila
$ROO^{\bullet}$	Radical peroxila
$RO^{\bullet}$	Radical alcoxila
H_2O_2	Peróxido de Hidrogênio
HOCl	Ácido Hipocloroso
MPO	Mieloperoxidase
Cl^-	Íon cloreto
1O_2	Oxigênio singlete
LPO	Lipoperoxidação
HD	Hemodiálise
ABTS	2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfônico
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
AAPH	Dicloridrato de 2,2'-azobis- (2-metilpropanoamidina)
PMS	Metassulfato de fenazina
NBT	Azul de nitrotetrazólio

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ESQUEMAS

LISTA DE ABREVIATURAS

CAPÍTULO 1	20
1 INTRODUÇÃO.....	20
1.1 Justificativa.....	21
1.2 Revisão de literatura.....	23
1.2.1 Espécies Reativas de Oxigênio (ERO).....	23
1.2.2 Estresse Oxidativo.....	27
1.2.3 Antioxidantes.....	28
1.2.4 Doença Renal Crônica.....	29
1.2.5 Estresse Oxidativo e Doença Renal Crônica.....	31
1.2.6 Solutos Urêmicos.....	33
2 OBJETIVOS.....	36
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	38
3.1 Sais e reagentes.....	39
3.2 Equipamentos.....	39
3.3 Métodos.....	39
3.3.1 Capacidade de captura sobre o ABTS ^{•+}	40
3.3.2 Capacidade de captura sobre o O ₂ ^{•-}	41

3.3.3	Capacidade de captura sobre HOCl / OCl ⁻	42
3.3.4	Ensaio do Clareamento (<i>Bleaching</i>) da Crocina.....	43
3.3.5	Capacidade de captura sobre o H ₂ O ₂	46
3.3.6	Ensaio com Mistura de Solutos.....	47
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
4.1	Capacidade de captura sobre o ABTS ^{•+}	49
4.2	Capacidade de captura sobre o O ₂ ^{•-}	55
4.3	Capacidade de captura sobre o H ₂ O ₂	57
4.4	Capacidade de captura sobre o HOCl / OCl ⁻	59
4.5	Ensaio do Clareamento (<i>Bleaching</i>) da Crocina.....	65
5	CONCLUSÃO.....	81
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83

CAPÍTULO 1

1. Introdução

1.1 Justificativa

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (2008), a Doença Renal Crônica (DRC) é um problema de saúde pública. No Brasil, a quantidade de pacientes mantidos em diálise dobrou nos últimos anos e mesmo com os avanços nos métodos dialíticos e no transplante renal, a mortalidade na DRC permanece elevada, principalmente em sua fase terminal, estando associada a eventos cardiovasculares na maioria dos pacientes (PUGLIESE et al., 2011; BAUMGARTEM et al., 2012; SCHIFFRIN; LIPMAN; MANN, 2007; RICO et al, 2006; YAO et al., 2004; ROMÃO JÚNIOR, 2004; NGUYEN-KHOA et al, 2001; JOFRE; LÓPEZ-GÓMEZ; VALDERRÁBANO, 2000; DINIZ, 1993).

A DRC é de etiologia diversificada e caracteriza-se pela perda progressiva e irreversível das funções renais. Quando encontra-se em fase avançada, os rins não conseguem mais manter a constância do meio interno, ou seja, sua homeostase, e, portanto, é necessário adotar medidas para compensar as alterações causadas pela função renal reduzida, a hemodiálise apresenta-se como um dos procedimentos mais comuns (BAUMGARTEM et al., 2012; PUGLIESE et al., 2011; NISSENSON; FINE, 2002).

A hemodiálise é definida como um processo de transferência de massa baseado na difusão entre sangue e líquido de diálise, modulado por uma membrana seletivamente permeável, e capaz de corrigir alguns distúrbios metabólicos da DRC. Entretanto, em longo prazo, os pacientes em hemodiálise evoluem com complicações clínicas diversas (THOMÉ et al., 2005).

Pacientes em hemodiálise têm alta taxa de ocorrência de processos inflamatórios, associados a vários outros fatores, como a uremia, a presença de aterosclerose e níveis menores de antioxidantes. O processo de hemodiálise pode levar ao estresse oxidativo tanto pela geração de oxidantes (são exemplos as espécies reativas de oxigênio, ERO) como pela menor ação do sistema antioxidante. Em decorrência disto, ocorrem lesões oxidativas, como o aumento dos níveis de lipoproteínas de baixa densidade oxidadas (LDLox), as quais tem um papel importante na patogênese da aterosclerose (SÖDERHOLM; ALFTHAN; TIKKANEN, 2012; HUANG; LIANG; HAN, 2012; STEINBERG; WITZTUM, 2010; STEINBERG, 2009). A LDLox apresenta assim produtos derivados da peroxidação lipídica (triacilgliceróis) e a oxidação de fosfolipídios, colesterol e apolipoproteínas, essas últimas biomoléculas em seus resíduos de aminoácidos aromáticos como tirosina e triptofano, entre outras modificações (ABDALLA; SENA, 2008). A hemodiálise tem sido considerada um fator que acentua o estresse oxidativo, uma vez que esse procedimento aumenta a produção de ERO e

reduz os níveis de agentes antioxidantes (RICO et al, 2006; ZALBA; FORTUÑO; DÍEZ, 2006; GALLE, 2001).

Uma característica importante da DRC é a uremia, que é um estado clínico de “intoxicação” por metabólitos e catabólitos. Tem sido observado, por exemplo, o comprometimento das funções neutrofílicas em pacientes urêmicos correlacionado com o acúmulo dos solutos urêmicos; em indivíduos saudáveis não ocorre o acúmulo destes solutos, uma vez que estes são excretados pelos rins, com a urina. Assim, define-se “toxinas urêmicas” como substâncias que são acumuladas (solutos urêmicos) no plasma de pacientes com doença renal (VANHOLDER; VAN LAECKE; GLORIEUX, 2008; VANHOLDER et al., 2006; VANHOLDER et al., 2003).

Existem mais de 90 solutos urêmicos relatados na literatura, que são agrupados de acordo com as suas propriedades físico-químicas, uma vez que tais propriedades estão relacionadas com a remoção desses solutos do sangue, durante a hemodiálise (VANHOLDER; VAN LAECKE; GLORIEUX, 2008).

Em estudo realizado por Chen; Liou; Chang (2008), onde investigou a alteração da capacidade antioxidante do plasma de pacientes urêmicos submetidos à HD, com análises via sondas quimiluminescentes mensurou a capacidade *scavenging* do plasma sobre o peróxido de hidrogênio, oxigênio singlete e hipoclorito. Observou-se que após a HD, a capacidade antioxidante para essas ERO do plasma diminuiu. Assim, postulou-se que a perda dos solutos dialisáveis do plasma, como os solutos urêmicos e outras biomoléculas antioxidantes com baixo peso molecular, resultou na diminuição da capacidade antioxidante investigada.

Tais fatos instigaram-nos a explorar o efeito antioxidante dos solutos urêmicos, em sistemas-modelo *in vitro*, dado o envolvimento das ERO na DRC, e também, pelo fato das ERO serem essenciais no metabolismo via oxidações de ocorrência natural e que, quando com produção exacerbada e/ou deficiência de defesas antioxidantes, provocam estresse oxidativo.

1.2 Revisão da Literatura

1.2.1 Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)

São conhecidos como radicais livres quaisquer espécies químicas capazes de existir de forma independente e que contenham um ou mais elétrons desemparelhados no orbital molecular ligante, ou seja, ocupando um orbital molecular sozinho. Por isso, são muito reativos e capazes de interagir com muitas biomoléculas, como lipídeos, proteínas e DNA, etc (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Além das espécies radicalares, existem espécies não radicalares que também são altamente reativas. Entre estas espécies podem-se destacar dois grupos: as espécies reativas de oxigênio (ERO) e as espécies reativas de nitrogênio (ERN). As ERO radicalares mais importantes são o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxila ($HO^{\bullet}$), peroxila ($ROO^{\bullet}$), alcóxila ($RO^{\bullet}$); e as não radicalares são o peróxido de hidrogênio, ácido hipocloroso e o oxigênio singlete. O óxido nítrico e o peroxinitrito constituem as principais ERN. Tais espécies são geradas em sistemas biológicos por vários processos de oxidação (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2010; DURACKOVÁ, 2010; ARAÚJO, 2008; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990).

O conhecimento dos mecanismos de formação e regulação das ERO é de grande importância para a compreensão dos eventos celulares relacionados ao controle da sobrevivência, morte e proliferação celular. Tais espécies são dotadas de grande reatividade, as quais apresentam papéis adversos nos sistemas biológicos, podendo ser benéficas e mesmo essenciais ou deletérias para os organismos vivos (VALKO et al, 2006; NIKI, 2010).

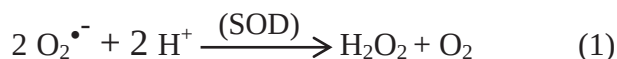
As ERO geradas *in vivo* apresentam diferenças principalmente quanto à natureza, geração, reatividade e destino (VASCONCELOS et al., 2007).

Ânion Radical Superóxido ($O_2^{\bullet-}$)

O $O_2^{\bullet-}$ é formado após a redução monoeletrônica do oxigênio à água, a partir do qual poderá ocorrer a formação das demais ERO. Em diversas etapas da via mitocondrial de redução do oxigênio à água, observa-se a produção de radicais livres altamente reativos, sendo que tais espécies podem danificar células e tecidos. O radical ânion superóxido é um exemplo representativo, pois é altamente reativo e sua formação também leva à produção do $HO^{\bullet}$, que é ainda mais reativo. Estas ERO podem provocar sérios danos, reagindo com proteínas, lipídeos de membranas e ácidos nucleicos (NELSON; COX, 2011).

Em mitocôndrias em atividade, de 0,1 até 4% do oxigênio utilizado na respiração geram $O_2^{\bullet-}$, mais do que suficiente para ter efeitos letais, a não ser que o $O_2^{\bullet-}$ seja rapidamente transformado (NELSON; COX, 2011). Assim, o $O_2^{\bullet-}$ é um “produto colateral” da cadeia transportadora de elétrons; todavia, por exemplo, é produzido e exerce uma função essencial na ação dos fagócitos na defesa contra microrganismos; os fagócitos produzem $O_2^{\bullet-}$ durante a fagocitose devido à ativação da NADPH oxidase presente na membrana dessas células (DIAZ et al., 1998).

O $O_2^{\bullet-}$ é removido dos tecidos por dismutação espontânea ou catalisada pela superóxido dismutase (SOD), gerando peróxido de hidrogênio e uma molécula de oxigênio (reação 1) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).



Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

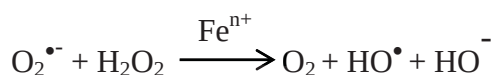
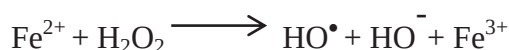
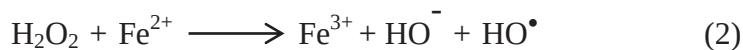
O H_2O_2 é o segundo intermediário do processo de redução monoeletrônica do O_2 ; não é um radical livre por definição, porém exerce um papel importante no estresse oxidativo por ser capaz de permear membranas celulares facilmente, gerando o radical hidroxila (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). O H_2O_2 possui atividade bactericida somente em altas concentrações, podendo ser substrato das peroxidases ou catalases intracelulares, produzindo H_2O e O_2 (HAMPTON; KETTLE; WINTERBOURN, 1998); na deficiência ou ausência dessas enzimas, o H_2O_2 apresenta citotoxicidade (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Radical Hidroxila ($HO^{\bullet}$)

O $HO^{\bullet}$ é um dos mais potentes oxidantes, é capaz de reagir com várias biomoléculas, sendo assim provável sua ação ocorrer próxima ao sítio de geração. É formado através de reações do H_2O_2 que necessitam da presença de metais de transição, como o ferro, sendo essa reação denominada Reação de Fenton (reação 2) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2010).

Esse radical também pode ser formado a partir da reação do $O_2^{\bullet-}$ com peróxido de hidrogênio, reação proposta por Haber-Weiss (reação 3), porém, em meio aquoso, a constante de velocidade dessa reação é próxima de zero. Contudo, na presença de um metal de transição

(Fe²⁺, Cu²⁺, Cr²⁺, Ni²⁺, Co²⁺, Ti³⁺), essa reação ocorre de maneira significativa, podendo causar danos oxidativos *in vivo* (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2010; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).



Ácido hipocloroso (HOCl)

O HOCl é formado pela ação da mieloperoxidase (MPO) sobre o H₂O₂ e Cl⁻. A MPO é uma enzima armazenada nos grânulos azurófilos de leucócitos polimorfonucleares, a qual utiliza o H₂O₂ para oxidar o íon cloreto (Cl⁻), e gerar o HOCl, um potente oxidante e agente bactericida (WINTERBOURN et al., 2000).

Radical Peroxila (ROO[•]) e Radical Alcoxila (RO[•])

Estes são formados durante a decomposição de peróxidos orgânicos e reações de carbono radicalar com oxigênio, sendo intermediários na peroxidação dos lipídeos de membrana; são as ERO de maior meia vida (7 segundos) (VASCONCELOS et al., 2007; VALKO et al., 2006).

Oxigênio singlete (¹O₂)

É o primeiro estado eletronicamente excitado do oxigênio molecular. Pode também ser gerado através da reação do H₂O₂ com HOCl, ou pela dismutação espontânea do O₂^{•-} (CADENAS, 1989; STEINBERG; KLAN; KARNOVSKY, 1992). Não é considerado um radical, visto não ter elétrons desemparelhados (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2010), mas

reage com uma grande variedade de compostos biológicos, como proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos de membrana, iniciando processos de lipoperoxidação (VASCONCELOS et al., 2007).

1.2.2 Estresse Oxidativo

O desequilíbrio entre a presença de níveis relativamente altos de espécies reativas, principalmente as ERO e/ou ERN, e a insuficiência de mecanismos de defesa detoxificantes, é uma condição bioquímica denominada de estresse oxidativo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2010). Também é considerado um evento intracelular importante em vários processos patológicos, com envolvimento nas complicações de várias doenças, como por exemplo, aterosclerose, doenças neurodegenerativas (doença de Alzheimer, esclerose múltipla, mal de Parkinson), câncer e síndrome de Down, entre outras (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2010; NIKI, 2010; DURACKOVÁ, 2010; VALKO et al., 2006).

As ERO, além de seu envolvimento com determinadas patologias, também têm sido apontadas como responsáveis pelo processo de envelhecimento em consequência do desacoplamento das reações de transporte de elétrons e da elevação dos níveis de metais, que causam seu aumento das oxidações de biomoléculas como as proteínas e consequente acúmulo destas, alterando a homeostase celular (RODRIGUES, 2007; FINKEL; HOLBROOK, 2000).

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das ERO. O processo pelo qual as ERO atacam as membranas biológicas é chamado de lipoperoxidação (LPO). A LPO é um processo contínuo que ocorre na membrana celular lipoproteica, gerando o radical peroxila ($\text{ROO}^\bullet$), o que acarreta alterações na sua estrutura e permeabilidade. Consequentemente, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomos, e formação de produtos citotóxicos (como o malonaldeído), culminando com a morte celular. A lipoperoxidação é postulada estar associada aos mecanismos de envelhecimento, de câncer e na exacerbação da toxicidade de xenobióticos (NIKI et al., 2005; SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004; MENECHINI, 1987).

1.2.3 Antioxidantes

De acordo com Halliwell e Gutteridge (2000), *“Antioxidante é qualquer composto que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo”*.

Existe um grande interesse no estudo dos antioxidantes, devido, principalmente, às descobertas sobre o efeito das ERO/ERN no organismo. As oxidações ocorrem como partes fundamentais da vida aeróbica e do nosso metabolismo; sendo assim, ocorre a produção das espécies reativas naturalmente e seus níveis podem ser exacerbados por alguma disfunção biológica (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

O efeito das espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio é equilibrado pela ação de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, os quais têm como função a remoção dessas espécies, podendo assim proteger o organismo. Dentre os antioxidantes enzimáticos, os mais eficientes são: SOD, a catalase e a glutathione peroxidase. Entre antioxidantes não enzimáticos, podemos destacar as vitaminas C e E, carotenóides, compostos tiólicos, flavonóides naturais, melatonina e outros. A atividade antioxidante contra o estresse oxidativo depende de qual espécie reativa, como foi e onde foi gerada, pois o local de atuação dos antioxidantes dentro da célula depende também de sua solubilidade (Figura 1) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2010; DURACKOVÁ, 2010; VASCONCELOS et al., 2007).

A atividade das defesas antioxidantes varia com o tipo celular, pois, quando compara-se os líquidos extracelulares com os intracelulares, observa-se diferentes mecanismos protetores (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2010).

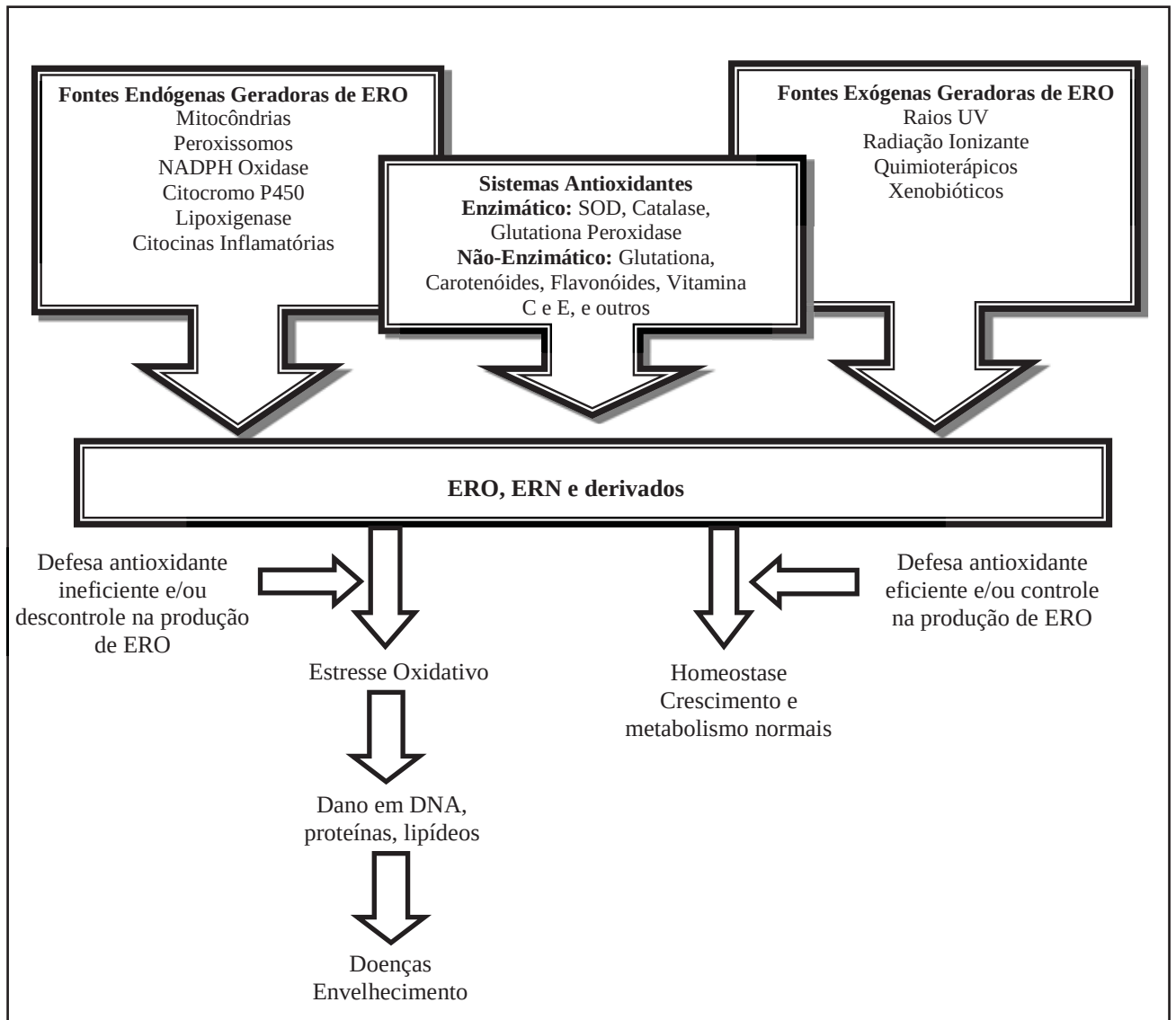


Figura 1: Fontes e respostas celulares às espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (adaptado de VASCONCELOS, 2007).

1.2.4 Doença Renal Crônica

Os rins situam-se na parte dorsal do abdômen, abaixo do diafragma, em um espaço denominado retroperitoneal. Cada rim é formado de tecido conjuntivo, que sustenta e dá forma ao órgão, e por inúmeras unidades filtradoras, os néfrons, os quais são formados pelo corpúsculo renal e a estrutura tubular; os néfrons podem ser classificados de acordo com sua localização renal. As principais funções dos rins incluem filtração, reabsorção e secreção. É atribuído aos rins funções homeostáticas essenciais, como a eliminação de catabólitos e toxinas do sangue; regulação da produção dos glóbulos vermelhos, regulação da pressão sanguínea; controle do equilíbrio hidroeletrólítico, equilíbrio ácido-básico e liberação de

hormônios. Os rins reúnem essas funções para manter a homeostasia e regular o meio interno (DELANEY et al., 2006).

A doença renal crônica (DRC) é caracterizada pela perda progressiva e irreversível das funções renais e tem etiologia diversificada, podendo envolver doenças primárias do rim, doenças sistêmicas e doenças hereditárias. As causas mais comuns são: diabetes mellitus, glomerulonefrites, nefroesclerose hipertensiva, doenças renovasculares, rins policísticos, uropatias obstrutivas e mal formações congênitas (NISSENSON; FINE, 2002). As duas situações mais importantes são o diabetes mellitus e a hipertensão arterial sistêmica, ambas com alta prevalência na população e cuja incidência aumenta a cada dia devido à epidemia mundial da obesidade (MONTESA et al., 2009).

Quando em fase mais avançada da DRC, os rins não conseguem mais manter a normalidade do meio interno do paciente, assim, o tratamento desses pacientes com disfunção renal tem como objetivo retardar a progressão da lesão e adotar medidas para compensar as alterações causadas pela função renal reduzida, necessitando de uma terapia de substituição renal, as quais devem ser iniciadas desde o começo do curso da disfunção renal, sendo a hemodiálise uma das mais comuns (BAUMGARTEM et al., 2012; VIANNA et al., 2011; DINIZ, 1993; JOFRE; LÓPEZ-GÓMEZ; VALDERRÁBANO, 2000; ROMÃO JÚNIOR, 2004).

A hemodiálise (HD) é definida como um processo de transferência de massa baseado na difusão entre sangue e líquido de diálise, modulado por uma membrana seletivamente permeável, ou seja, que permite a passagem de água e de solutos de baixo peso molecular (THOMÉ et al., 2005). Utilizando acessos vasculares, como a fístula arteriovenosa, o que permite a colocação de duas agulhas, uma por onde o sangue sairá para o dialisador e outra pela qual o sangue filtrado retornará ao paciente, o sangue obtido para a hemodiálise é impulsionado para um circuito extracorpóreo, passando por um sistema formado pelo líquido de diálise e um filtro com uma membrana seletivamente permeável, no qual sangue e líquido de diálise “se encontram”, permitindo trocas de água e solutos por difusão. O líquido de diálise é composto por uma solução aquosa concentrada de solutos importantes para a homeostase. O filtro dialisador compreende dois compartimentos: um por onde circula o sangue e o outro a solução de diálise. A comunicação pela membrana seletivamente permeável está disposta de modo a ampliar ao máximo a área de contato entre os dois líquidos. Cada compartimento tem um ponto de entrada e outro de saída, e a circulação ocorre num sentido de contracorrente. A membrana dialisadora é composta por placas ou tubos capilares dispostos em feixe. O sangue entra por uma ponta, distribuindo-se por dentro desses

inúmeros capilares, até sair na outra extremidade, e na porção externa circula a solução de diálise (RYSZ et al., 2006; BIANCHI, 2003).

Na hemodiálise, os fluxos de sangue e de líquido de diálise são relativamente altos, 300 mL/min e 500 mL/min, respectivamente, o que propicia depurações elevadas. Realizam-se, em média, sessões de quatro horas de tratamento, duas a três vezes por semana, conforme as necessidades do paciente (BIANCHI, 2003).

A prevalência de DRC está aumentando em todo o mundo, constituindo um importante problema de saúde pública. As informações obtidas em 2008, junto à Sociedade Brasileira de Nefrologia e ao Ministério da Saúde, relatam que no Brasil, a prevalência de pacientes mantidos em programa crônico de diálise mais que dobrou nos últimos oito anos.

Apesar dos avanços nos métodos dialíticos, a mortalidade na DRC permanece elevada, principalmente em sua fase terminal, estando associada a eventos cardiovasculares na maioria dos pacientes (VIANNA et al., 2011; RICO et al., 2006; YAO et al., 2004; NGUYEN-KHOA et al., 2001).

1.2.5 Estresse Oxidativo e Doença Renal Crônica

A doença renal crônica tem sido associada a inúmeras patologias, como aterosclerose, envelhecimento acelerado, catarata, disfunção plaquetária, podendo essas patologias estar associadas à hiperprodução de radicais livres (BIANCHI et al., 2009; LOCATELLI et al., 2003).

A perda progressiva da função renal está associada ao aumento da incidência de doenças cardiovasculares. O aumento do estresse oxidativo e inflamação têm surgido como contribuintes para progressão da disfunção renal e as consequências cardiovasculares (LEE et al., 2011).

Em pacientes urêmicos, as doenças ateroscleróticas cardiovasculares são responsáveis pela maior morbidade e mortalidade, podendo ainda os pacientes com terapia renal substitutiva estar envolvidos com um risco de 3,5 a 5,0 vezes maiores do que a população em geral (SULIMAN; STENVINKEL, 2008; RICO et al., 2006; ZALBA; FORTUÑO; DÍEZ, 2006; THOMÉ et al., 2005).

Os efeitos pró-aterogênicos do estresse oxidativo pela geração da oxidação de lipoproteínas de baixa densidade têm sido observados em pacientes em hemodiálise, os quais

combinam a geração de espécies reativas de oxigênio em cada sessão da diálise com a deficiência crônica dos principais sistemas antioxidantes (NGUYEN-KHOA et al, 2001).

A aterosclerose acelerada é importante na disfunção cardiovascular, onde o estresse oxidativo contribui para alta prevalência dessa doença, tais fatores têm sido citados para explicar a alta incidência das doenças cardiovasculares em pacientes com doença renal crônica (VIANNA et al., 2011; BIANCHI, 2003; NGUYEN-KHOA et al, 2001; CLERMONT et al., 2000).

A literatura relata que a uremia é um estado pró-oxidante, com aumento nos níveis de lipoperoxidação e diminuição da atividade antioxidante. A lipoperoxidação vem sendo associada com doenças comumente encontradas em pacientes hemodializados, pois tem sido postulado que é nesse momento de hemodiálise que as células inflamatórias são ativadas devido à bioincompatibilidade relativa das membranas utilizadas na HD, e nesses indivíduos tem-se encontrado níveis plasmáticos aumentados de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), o qual é um marcador da peroxidação lipídica. O estresse oxidativo pode ocorrer também em consequência do alto fluxo a que o sangue é submetido durante a HD (BIANCHI et al., 2009; WRATTEN et al., 2000).

Devido à possibilidade da HD gerar aumento da produção de ERO e redução de agentes antioxidantes, postula-se a presença de estresse oxidativo nesses pacientes (KADKHODAEI et al., 2008). Assim, existem dois mecanismos gerais que podem aumentar a produção de ERO: i) Interação entre a membrana de diálise e o sangue, geração de mediadores inflamatórios, ou ativação plaquetária e estimulação neutrofílica; ii) Os produtos bacterianos (endotoxinas) do dialisado podem atravessar a membrana de diálise e estimular a produção de ERO pelos neutrófilos (BERTONCELLO, 2007; RICO et al, 2006; WARD; McLEISH, 2003; GALLE, 2001). Portanto, o que influencia significativamente no estresse oxidativo é a pouca biocompatibilidade das membranas, além da pureza da água da diálise (RICO et al, 2006). Em estudo realizado com sistema-modelo não enzimático para verificar a capacidade antioxidante total do plasma frente às ERO, em pacientes renais crônicos, antes e após a sessão de HD, foi observada uma redução significativa desta capacidade após a sessão de HD (BIANCHI et al., 2009). Tais fatos tornam importante mais avaliações para se obter informações importantes a respeito da capacidade do organismo em resistir ao estresse oxidativo.

1.2.6 Solutos Urêmicos

O estágio final da DRC está frequentemente associado ao estado inflamatório crônico, o que é também descrito como “microinflamação”, caracterizado pelo aumento de citocinas, proteínas de fase aguda (PCR), estresse oxidativo e solutos urêmicos acumulados no sangue, os quais podem contribuir para progressão dessa síndrome (PIRODDI et al, 2007; RONCO; LEVIN, 2002).

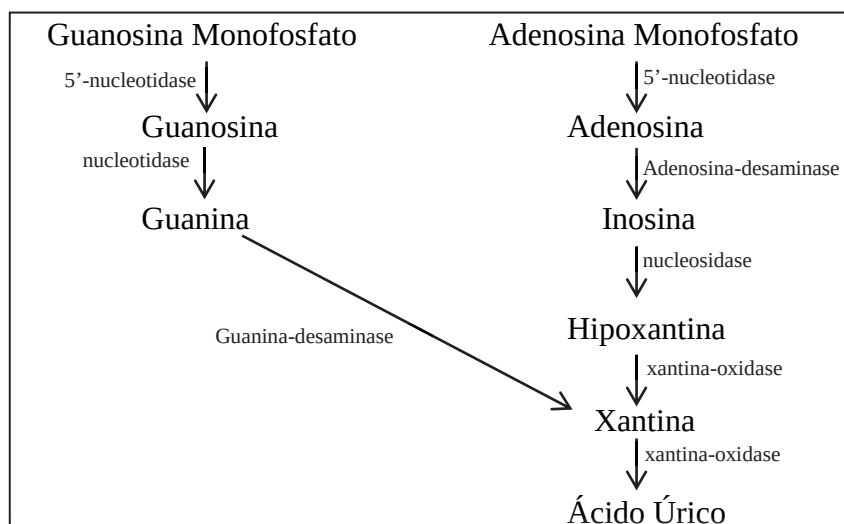
Entre os compostos urêmicos acumuladas no plasma de pacientes com doença renal, a uréia é a mais conhecida, por ser a mais estudada na abordagem clínico-patológica nefropática. O papel “tóxico” da uréia é ainda controverso, pois alguns autores acreditam que a uréia *per se* não seja tóxica; no entanto, quando na presença concomitante e em excesso de outros solutos, atribui-se efeito tóxico a mistura (VANHOLDER; VAN LAECKE; GLORIEUX, 2008). As guanidinas (HIRAYAMA; NORONHA-DUTRA; GORDGE, 2000), o *p*-cresol (SCHEPERS; MEERT; GLORIEUX, 2007), a leptina (OTTONELLO; PAOLA; BERTOLOTTO, 2004), o sulfato indoxil (MIYAMOTO et al., 2010) e a β 2-microglobulina representam alguns dentre os vários solutos urêmicos identificados em indivíduos com nefropatias graves, e que alteram a função neutrofílica (VANHOLDER; VAN LAECKE; GLORIEUX, 2008).

Aos compostos guanidínicos, solúveis em água, tem sido atribuído efeitos neurotóxicos. Existem muitos compostos guanidínicos, como guanidina e creatinina precursores da metilguanidina, cujos níveis estão aumentados nos tecidos e líquidos biológicos urêmicos (VANHOLDER et al., 2006).

Os indóis e fenóis como compostos individuais contém um conjunto heterogêneo de moléculas, por exemplo, o *p*-cresol, sulfato indoxil, ácido hipúrico e homocisteína, e, por serem solutos ligados às proteínas, com ligações de natureza covalente, são de difícil remoção durante a hemodiálise. Para a albumina, a proteína mais abundante no sangue, ocorre ligações do tipo covalente e não covalente; as ligações covalentes podem ocorrer através de pontes de dissulfeto com resíduos de cisteína livre. (MEIJERS et al., 2008). A esses compostos são atribuídos vários efeitos tóxicos, mas ainda não se encontram dados disponíveis sobre um potencial impacto vascular, com exceção da homocisteína (VANHOLDER et al., 2006; LESAFFER et al., 2000).

No metabolismo de purinas, o ácido úrico é o produto final, produzido a partir da hipoxantina e xantina pela xantina-oxidase (esquema 1) (NELSON; COX, 2011; ÁLVAREZ-LARIO; MACARRÓN-VICENTE, 2010).

Juntamente com o ácido úrico, compostos pequenos solúveis em água que são removidos pela hemodiálise, seus precursores hipoxantina e xantina são também importantes metabólitos das purinas retidos na uremia (SHAHBAZIAN et al., 2009).



Esquema 1: Metabolismo das purinas (adaptado Nelson; Cox, 2011; Álvarez-Lario; Macarrón-Vicente, 2010).

Desde os anos 80 tem sido relatado que o ácido úrico pode agir como um antioxidante efetivo nos sistemas biológicos, capaz de proteger o DNA e lipídeos de ERO e ERN. No mecanismo antioxidante do urato há formação do radical urato estabilizado (Figura 2). (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

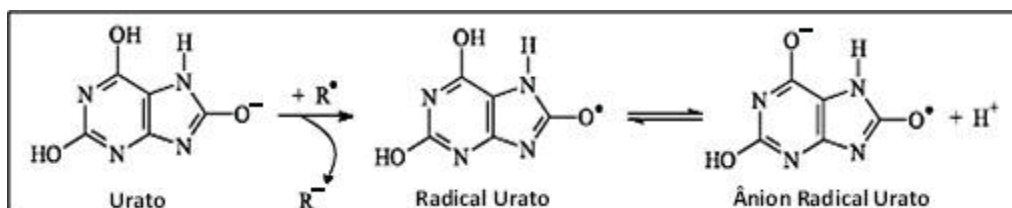


Figura 2: Representação da ação antioxidante do urato (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

O excesso e o acúmulo do ácido úrico estão fortemente associados com a insuficiência renal e doença cardiovascular, sendo ainda comum em indivíduos com hipertensão, síndrome metabólica e associados com anormalidades como dislipidemia e resistência à insulina (OBERMAYR et al., 2008).

Foi também relatado em estudos epidemiológicos que a hiperuricemia é um importante fator de risco independente, para o surgimento da doença renal em geral na

população, bem como para pacientes com hipertensão, diabetes e DRC (OBERMAYR et al., 2008). Segundo Kang et al., 2002, a hiperuricemia é associada com doença renal, mas é geralmente considerada um marcador de disfunção renal, em vez de um fator de risco para progressão da DRC.

Em estudo realizado por Shahbazian et al.(2009), analisou-se a concentração de ácido úrico e hipoxantina no plasma de pacientes mantidos na hemodiálise. Foi observado que após a hemodiálise, tanto a concentração do ácido úrico como da hipoxantina apresentaram redução significativa, embora essas concentrações tenham ficado ainda maiores que as concentrações do intervalo de referência para indivíduos normais. Isso foi explicado por ocorrência de eventos isquêmicos durante a hemodiálise, situação esta que aumenta a degradação de nucleotídeos de adenosina, que leva a hidrólise de adenosina trifosfato, glicólise anaeróbica, conversão proteolítica da xantina desidrogenase para xantina oxidase. Juntos, estes mecanismos podem causar degradação da adenosina trifosfato e aumentar a produção da hipoxantina e ácido úrico durante a isquemia.

Além desses solutos já mencionados, são conhecidos muitos outros. Em uma análise realizada, identificaram-se 90 solutos urêmicos, os quais foram subdivididos de acordo com suas características físico-químicas, em pequenos compostos solúveis em água; solutos ligados às proteínas; e moléculas maiores. Essas características físico-químicas são importantes para explicar o comportamento dos compostos durante a hemodiálise, uma vez que os pequenos compostos solúveis em água são facilmente removidos pela hemodiálise, enquanto que os compostos maiores encontram dificuldades na sua remoção. Os compostos ligados às proteínas, embora apresentem uma massa molecular pequena, também encontram dificuldades na remoção, justamente por estarem ligados às proteínas, pois essa ligação impõe resistência na transferência transmembrânica (VANHOLDER; VAN LAECKE; GLORIEUX, 2008; VANHOLDER et al., 2006; VANHOLDER et al., 2003).

2. Objetivos

Avaliar, em sistemas-modelo *in vitro*, a capacidade de captura de determinadas ERO pelos solutos urêmicos individuais: L-arginina, Ácido Úrico, Ácido Hipúrico, Creatinina, Fenol, Metilguanidina, *p*-Cresol, L-tirosina e Uréia; ou suas misturas.

3. Material e Métodos

3.1 Sais e reagentes

Os sais e reagentes foram obtidos dos seguintes laboratórios: Persulfato de potássio, 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfônico) (ABTS), 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), Crocina, Dicloridrato de 2,2'-azobis- (2-metilpropanoamidina) (AAPH), Metassulfato de fenazina (PMS), azul de nitrotetrazólio (NBT), Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH), L-arginina, L-tirosina, Metilguanidina, Creatinina, Ácido Hipúrico, Ácido Úrico, Ácido 2-carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano (Trolox), da Sigma-Aldrich; Ácido acético glacial, Peróxido de hidrogênio, Fenol, Uréia, da Merck, *p*-cresol, da Riedel de Haën. Os demais sais e reagentes utilizados foram todos de grau analítico.

3.2 Equipamentos

Utilizou-se balança analítica (Acculab), banho-maria, pHmetro (Marconi), Sonicador Ultra Sonic Cleaner (Unique), espectrofotômetros, de placas Biotek (Power Wave XS2) e com cubetas: OceanOptics USB 4000 com agitação magnética e termostatização com peltier e Femto 600 Plus.

3.3 Métodos

Foram utilizados sistemas-modelo *in vitro*, geradores de espécies reativas e/ou radicalares para o ABTS^{•+}; O₂^{•-}; H₂O₂; HOCl / OCl⁻, e o Ensaio do Clareamento (*Bleaching*) da Crocina. Os estudos nestes sistemas foram realizados com diferentes concentrações dos solutos urêmicos, utilizando-se valores encontrados normalmente no soro de pacientes com DRC (concentração urêmica média) e valores referentes aos limites superiores dos intervalos de referência de cada soluto urêmico para pessoas saudáveis (concentração fisiológica) (Tabela 1).

Tabela 1: Concentrações dos solutos urêmicos

	Concentração Fisiológica (CF) (mmol/L)	Concentração Urêmica (C _{Ur}) (mmol/L)
1- Ácido Hipúrico	0,028	1,700
2- Ácido Úrico	0,420	0,600
3- L-arginina	0,140	0,230
4- Creatinina	0,120	0,880
5- Fenol	0,015	0,110
6- Metilguanidina	0,006	0,091
7- <i>p</i> -Cresol	0,021	0,280
8- L-tirosina	0,027	0,110
9- Uréia	6,700	33,000

1 - C_{Ur}, VANHOLDER et al, 1992, CF, FARREL et al, 1978; 2 - C_{Ur}, VANHOLDER et al, 1992, CF, PAINTER; COPE; SMITH, 1998; 3- C_{Ur}, MacNAMARA; LALKA; GIBALDI, 1981, CF, SIMENHOFF et al., 1963; 4 - C_{Ur}, VANHOLDER et al, 1992, CF, PAINTER; COPE; SMITH, 1998; 5 - C_{Ur}, WENGLE ; HELLSTROM, 1972, CF, NIWA et al, 1981 6 - C_{Ur}, EKSBOG et al, 1978, CF, EKSBOG et al, 1978; 7- C_{Ur}, NIWA et al, 1981, CF, MATSUMOTO et al, 1976; 8 - C_{Ur}, SCHOOTS; PEETERS; GERLAG, 1989, CF, SALISBURY; DUNN; MURPHY, 1957; 9 - C_{Ur}, VANHOLDER; HOENICH; RINGOIR, 1987, CF, PAINTER; COPE; SMITH, 1998.

Além dos solutos urêmicos, utilizou-se também o Trolox (análogo da vitamina E), um composto reconhecidamente com ação antioxidante (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2010).

Os experimentos foram realizados em triplicata, e as porcentagens de inibição foram calculadas usando a fórmula:

$$\% \text{ Inibição} = (1 - A_a / A_t) \times 100 \quad (\text{equação 1})$$

Onde, A_a e A_t são as absorbâncias do radical ou cromóforo na presença ou na ausência de amostras (solutos urêmicos), respectivamente.

Desta forma, considerando que obtêm-se a porcentagem de inibição via equação de uma reta (equação 1), os resultados nesse trabalho estão apresentados conforme esta relação.

Para os solutos, investigados desde a concentração fisiológica até a urêmica e que não apresentaram efeito frente às espécies reativas e/ou radicalares, também foram utilizadas concentrações até 10x maior à urêmica ou até o limite de solubilidade.

3.3.1 Capacidade de captura sobre o ABTS^{•+}

Para a atividade antioxidante pelo método do ABTS foi utilizada a metodologia descrita por Re et al. (1999), com algumas modificações. O cátion radical ABTS^{•+} foi gerado

pela oxidação do ABTS (7 mmol/L) com persulfato de potássio (140 mmol/L) (Figura 3), na ausência de luz, e a temperatura ambiente, por ≈ 16 horas. Depois de formado, o radical foi diluído em tampão fosfato de sódio (pH 7,0) até obter-se a absorbância de $\approx 0,750 \pm 0,020$, em 734 nm. Utilizou-se espectrofotômetro de placa para realização das leituras das absorbâncias à 734 nm, após incubação de 15 minutos na ausência e na presença dos solutos e na ausência de luz. O volume total da reação foi de 300 μL , sendo 100 μL fixo para o ABTS^{•+}. Os volumes dos solutos urêmicos e do tampão variaram entre si, totalizando um volume de 200 μL . Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média (EPM) das porcentagens de inibição (IC_{50}).

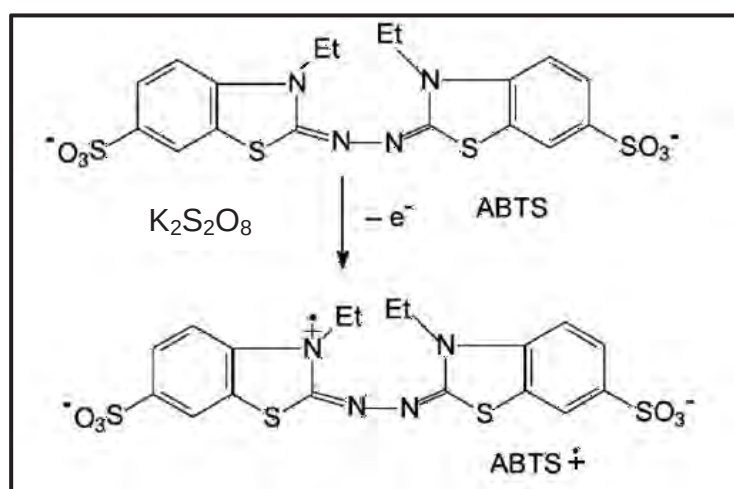


Figura 3: Representação da formação do ABTS^{•+}

3.3.2 Capacidade de captura sobre o Ânion Radical Superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$)

De acordo com Kakkar et al. (1984), neste ensaio o ânion superóxido gerado pela reação entre Metassulfato de fenazina (PMS) e a Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH), reage com o azul de nitrotetrazólio (NBT), reduzindo-o, para gerar uma formazana, onde a intensidade de cor é diretamente proporcional à concentração do radical (Figura 4).

O ensaio foi realizado em tampão pirofosfato de sódio (pH 8,3 – 25 mmol/L), contendo PMS (372 $\mu\text{mol/L}$), NBT (600 $\mu\text{mol/L}$), NADH (1560 $\mu\text{mol/L}$), diferentes concentrações dos solutos urêmicos, em um volume final de reação de 900 μL . Após incubação de 7 minutos a temperatura ambiente, foi monitorada a absorbância em 560 nm, a fim de determinar a quantidade de formazana gerada (HAZRA; BISWAS; MANDAL, 2008). O monitoramento da formazana é espectrofotométrico com a mudança da coloração amarelo

pálido do NBT para uma coloração púrpura da formazana; as moléculas que atuam como antioxidantes interagem com o $O_2^{\bullet-}$ inibindo a produção da formazana (ALVES et al., 2010). Os resultados foram expressos em média $\pm$ (EPM) das porcentagens de inibição (IC_{50}).

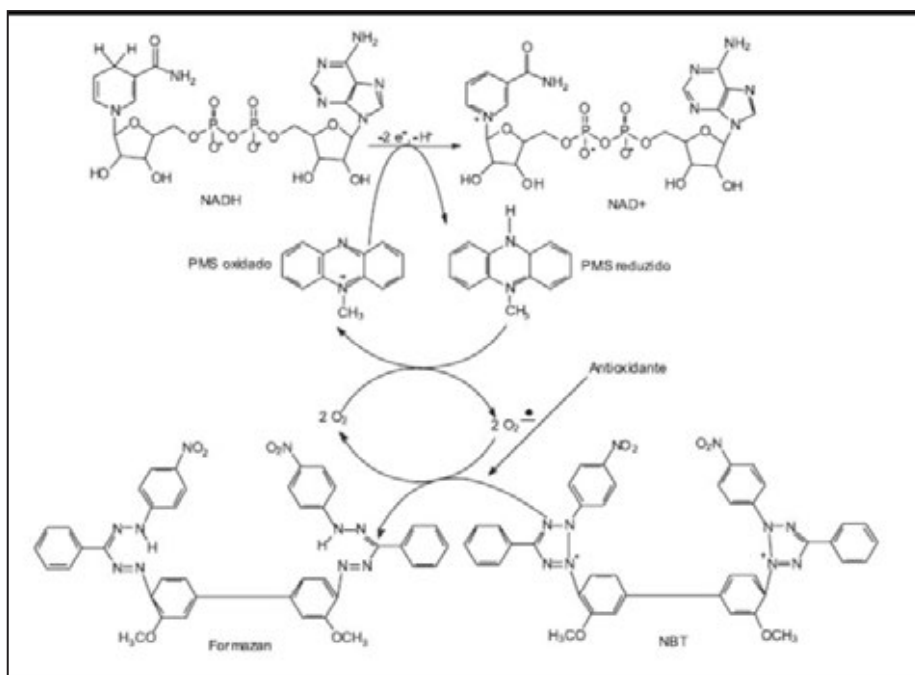


Figura 4: Representação da geração do ânion superóxido em presença de um antioxidante (OLIVEIRA et al., 2009).

3.3.3 Capacidade de captura sobre HOCl / OCl⁻

A mieloperoxidase (EC 1.11.1.7), uma hemoproteína presente nos neutrófilos e também encontrada em monócitos, é a única enzima da classe das peroxidases que possui a propriedade de catalisar a conversão do H_2O_2 a ácido hipocloroso (HOCl) (ZUURBIER et al., 1992). O HOCl, por sua vez, é um poderoso oxidante, com potente ação antimicrobiana; por ser extremamente reativo, também oxida outras biomoléculas, provocando muitos danos celulares (HAMPTON; KETTLE; WINTERBOURN, 1998; WINTERBOURN; KETTLE, 1994).

Este ensaio foi realizado segundo Ching et al. (1994), com algumas modificações, onde a capacidade antioxidante depende da habilidade da amostra em capturar o HOCl, impedindo-o de oxidar a 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) (Figura 5). Com a oxidação do TMB é gerado um cromóforo azul com máximo de absorvância em 655 nm e com grande sensibilidade para determinar-se a capacidade de captura do HOCl / OCl⁻ pela amostra.

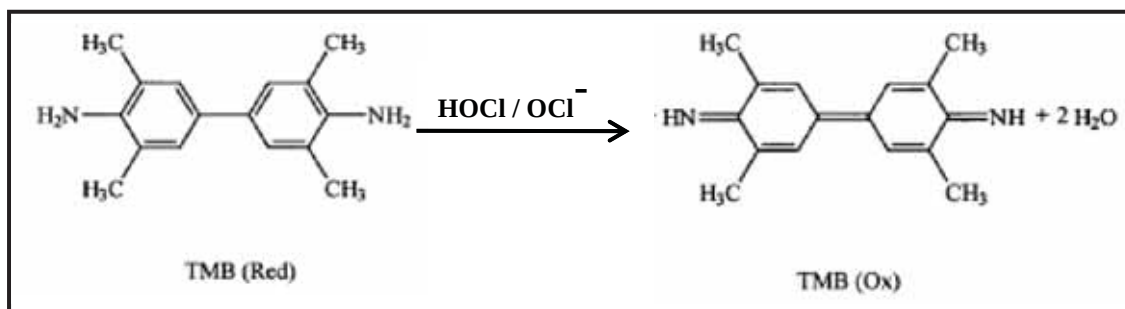


Figura 5: Representação da oxidação do TMB pelo HOCl / OCl⁻.

Para obter o agente oxidante padrão foi feita diluição do NaOCl 12% em NaOH 10 mmol/L. A concentração do HOCl foi determinada espectrofotometricamente através de seu coeficiente de extinção molar ($\epsilon = 350 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 292 nm, ZGLICZYNSKI et al.,1971).

O teste foi realizado em tubos de ensaio, com diferentes concentrações dos solutos urêmicos em meio com tampão fosfato de sódio pH 7,4 , 50 mmol/L, HOCl (30 $\mu\text{mol/L}$), incubação de 10 minutos e por último adicionou-se o TMB (2,8 mmol/L) (dissolvido em dimetilformamida 50%, ácido acético 0,8 mol/L com iodeto de potássio 0,01 mol/L) em um volume final de reação de 2 mL; as incubações foram realizadas em temperatura ambiente por 5 minutos e na ausência de luz, e a leitura da absorbância em 655 nm. Os resultados foram expressos em média $\pm$ EPM das porcentagens de inibição (IC₅₀).

3.3.4 Ensaio do Clareamento (*Bleaching*) da Crocina

Durante o processo de oxidação de lipídeos, é gerado o radical peroxila (ROO[•]), sendo este radical também encontrado normalmente em alimentos e amostras biológicas. Em função da importância da lipoperoxidação, vários sistemas-modelo simulam esta reação e são utilizados para avaliar a capacidade antioxidante frente a este tipo de atividade oxidativa.

Este ensaio foi inicialmente proposto por BORS et al.(1984) e mostra-se adequado para avaliar a atividade antioxidante frente ao processo de lipoperoxidação. A capacidade de inibição de antioxidantes é medida através da proteção do clareamento (*bleaching*) da crocina (Figura 6), frente a um composto gerador de radicais livres; a crocina é um carotenoide e pigmento natural derivado da planta *Crocus sativus* L.. Tubaro et al. (1998) aplicaram este método para análise da capacidade antioxidante de plasma sanguíneo humano, considerando-o adequado para amostras biológicas constituídas de misturas complexas.

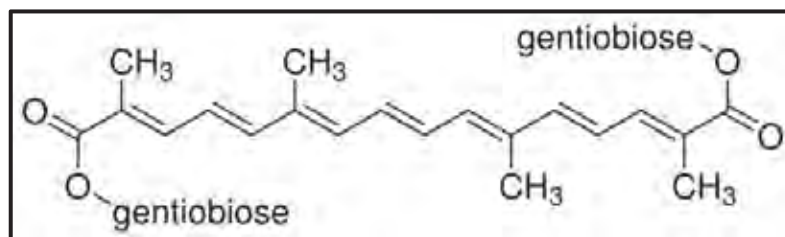
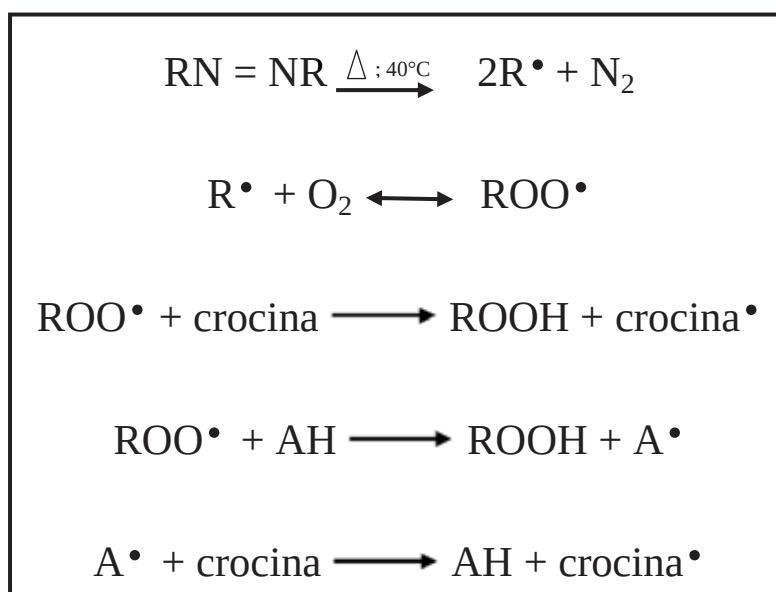


Figura 6: Representação da estrutura da Crocina

O ensaio do clareamento (*bleaching*) da crocina foi realizado de acordo com Tubaro et al. (1998) por meio do monitoramento do decréscimo da absorbância da crocina em função do tempo em 443 nm, durante 10 minutos em um procedimento de competição cinética, onde a reação é iniciada pela adição do azocomposto AAPH (Dicloridrato de 2,2'-azobis- (2-metilpropanoamidina)), que por termólise à 40°C e com velocidade constante, gera um radical livre, em meio aerado. Rapidamente, o O₂ dissolvido no meio ataca o radical e gera os radicais ROO•; o radical peroxila é capaz de abstrair um átomo de hidrogênio e assim gerar um radical na estrutura da crocina, levando ao rompimento do sistema de suas duplas ligações conjugadas, provocando seu clareamento, e redução de sua absorbância na região do visível. Na presença de uma molécula antioxidante, essa redução da absorbância se torna menor e por isso registra-se um novo valor na variação da absorbância em função do tempo, ou seja, na velocidade de clareamento (*bleaching*). Assim, os antioxidantes competem com a crocina pelos radicais ROO•; portanto, a inibição de sua oxidação depende da capacidade das amostras na captura das espécies radicalares (Esquema 2).



Esquema 2: Reações envolvidas no clareamento da crocina com a termólise do AAPH (adaptado de ORDOUDI; TSIMIDOU, 2006); A, representa um antioxidante (amostra).

Experimentalmente, a reação foi realizada em volume total de 2 mL, em tampão fosfato de sódio 0,12 mol/L, pH 7,0 com 25 µmol/L de crocina (a partir de uma solução estoque em DMSO 6 mmol/L) e diferentes concentrações de solutos urêmicos (antioxidantes). A reação tem início com adição de 50 µl (12,5 mmol/L, concentração final) de AAPH (em solução estoque fresca 0,5 mol/L em tampão fosfato de sódio 0,12 mol/L, pH 7,0), monitorada à 443 nm, sob agitação e temperatura de 40°C, constantes.

A velocidade do *bleaching* da crocina torna-se linear em aproximadamente 1 minuto após a adição do AAPH, tendo sido monitorada por 10 minutos em espectrofotômetro (OceanOptics USB 4000). Para eliminar possíveis interferências das amostras, foi realizado para cada soluto, um ensaio sem crocina, considerando-o como branco da reação.

Mediante a competição cinética, o *bleaching* da crocina pela geração do radical peroxila (v_0) diminui na presença de um antioxidante. O antioxidante compete com a crocina pelo radical peroxila e uma nova velocidade de bleaching (v) corresponde a:

$$v = v_0 \times \frac{k_c [C]}{k_c [C] + k_a [A]}$$

Onde: $v_0 = k_1 \times [ROO^\bullet] \times [C]$; $k_c = k_1 \times [ROO^\bullet]$; $k_a = k_2 \times [ROO^\bullet]$; $[ROO^\bullet]$ = concentração do radical peroxila; v_0 = velocidade da reação da crocina com $ROO^\bullet$; k_1 = constante de velocidade para a reação entre $ROO^\bullet$ e crocina; k_2 = constante de velocidade para a reação entre $ROO^\bullet$ e antioxidante; $[C]$ = concentração da crocina; $[A]$ = concentração do antioxidante (soluto urêmico).

A velocidade de *bleaching* da crocina (v_0) diminui na presença de um antioxidante e um novo valor (v) é avaliado através da seguinte relação:

$$\frac{v_0}{v} = \frac{k_c [C] + k_a [A]}{k_c [C]} = 1 + \frac{k_a}{k_c} \times \frac{[A]}{[C]}$$

O valor de K_a/K_c , calculado a partir da inclinação de regressão linear do gráfico v_0/v versus $[A]/[C]$, indica a capacidade relativa de um antioxidante interagir com o radical peroxila.

Pela divisão do k_a/k_c dos solutos urêmicos pelo k_a/k_c de um antioxidante padrão como o Trolox, obtém-se a razão entre as constantes e os valores para a capacidade antioxidante dos compostos analisados, podendo-se expressar os resultados em equivalentes ao Trolox.

Tubaro et al. (1998) fazem uso do coeficiente de extinção molar dado na literatura para ajustar a concentração de uma solução de crocina em metanol, isolada a partir do *saffron*

(*Crocus sativus* L.). Para a realização deste teste houve a necessidade de determinar o coeficiente de extinção molar da crocina em DMSO, uma vez que sua solubilidade é maior neste solvente.

Para determinação do coeficiente de extinção molar foram preparadas três soluções estoque de crocina a 0,6 mmol/L em DMSO, e a partir delas foram feitas as diluições necessárias. A partir das médias obtidas das leituras de absorbância, fez-se a regressão linear destas, obtendo assim o valor do coeficiente de extinção molar, $\epsilon=13.727 \text{ L M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, a 443 nm (Figura 7).

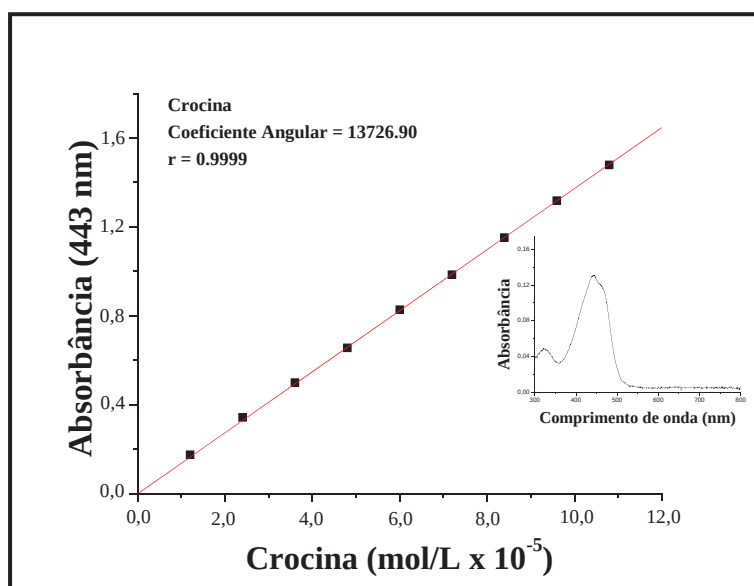


Figura 7: Curva padrão da crocina. O gráfico inserido representa o espectro de absorção da crocina em DMSO.

3.3.5 Capacidade de captura sobre o H₂O₂

A capacidade de captura do H₂O₂ foi determinada segundo Ching et al. (1994) pelo ensaio em que o H₂O₂ oxida o ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB) à ácido 5-5'-ditio-2-nitrobenzóico (DTNB), com diminuição da absorbância a 412 nm e o aumento a 325 nm (Figura 8). O TNB foi preparado segundo Ching et al. (1994) e sua concentração foi determinada com o coeficiente de extinção molar em 412 nm de 13600 M⁻¹cm⁻¹ (CHING et al., 1994), e a concentração do H₂O₂ foi determinada de acordo com Brestel (1985), ($\epsilon=80 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, a 230 nm).

Realizou-se o ensaio em tampão fosfato de potássio 50 mmol/L, pH 7,4, com diferentes concentrações dos solutos urêmicos, H₂O₂ (0,3 mmol/L) e incubação por 30 minutos a 37°C; adicionou-se TNB (53 µmol/L), e incubou-se por mais 1 hora a 37°C. A leitura de absorbância foi realizada a 412 nm.

4. Resultados e Discussão

Considerando a ampla variação quali-quantitativa de solutos em amostras biológicas, como o plasma sanguíneo e a urina, e a capacidade de captura de determinadas ERO por solutos urêmicos, optou-se por utilizar um conjunto de medidas da capacidade antioxidante, a fim de obter maior representatividade, do que apenas utilizar uma única medida. Portanto, utilizou-se tais técnicas de análise, a fim de refletir a capacidade antioxidante mais acurada dos solutos urêmicos (amostras).

Foram analisadas “*in vitro*” diferentes espécies reativas (radicais ou não) em sistemas-modelo como o ABTS^{•+} e o Ensaio do Clareamento da Crocina; ou biomoléculas, tais como: HOCl, O₂^{•-} e H₂O₂.

4.1 Capacidade de captura sobre o ABTS^{•+}

Nos estudos da interação de vários compostos com radicais livres, é comum utilizar radicais-modelos, não biológicos, para se avaliar o potencial desta interação. Destaca-se dentre esses radicais, o ABTS (PRABHU P. et al., 2011; RE et al., 1999).

Este método é um ensaio de descoloração, no qual depois da adição de um antioxidante, observa-se redução da absorbância em 734 nm, que por sua vez, é proporcional para concentração e atividade antioxidante (PELLEGRINI et al., 1999). É considerado um ensaio de triagem laboratorial com várias vantagens porque, além de ser um ensaio simples, colorimétrico, não requer equipamentos analíticos sofisticados, e pode fornecer uma boa estimativa de atividade antioxidante de compostos puros ou de misturas complexas (KHALIL; PEPATO; BRUNETTI, 2008; PELLEGRINI et al., 1999).

Para expressão dos resultados neste ensaio, foi calculado o IC₅₀, que é a quantidade do soluto urêmico capaz de sequestrar metade dos radicais livres ABTS^{•+} presentes na solução. Quanto menor o valor do IC₅₀ apresentado, menor a quantidade da amostra necessária para reduzir em 50% o ABTS^{•+}. As análises foram feitas em triplicata, e os resultados são médias das inibições.

A Vitamina E tem mostrado uma importante atividade antioxidante e efeitos benéficos contra danos oxidativos mediante os processos de lipoperoxidação. Dentre os análogos da vitamina E que são utilizados em estudos *in vitro*, o Trolox mostra vantagens como sua solubilidade em água (LUCIO et al., 2009). Dentro desse contexto, elegeu-se o Trolox como “padrão”, o qual apresentou IC₅₀ de 16,45 ± 0,30 µmol/L (Figura 9).

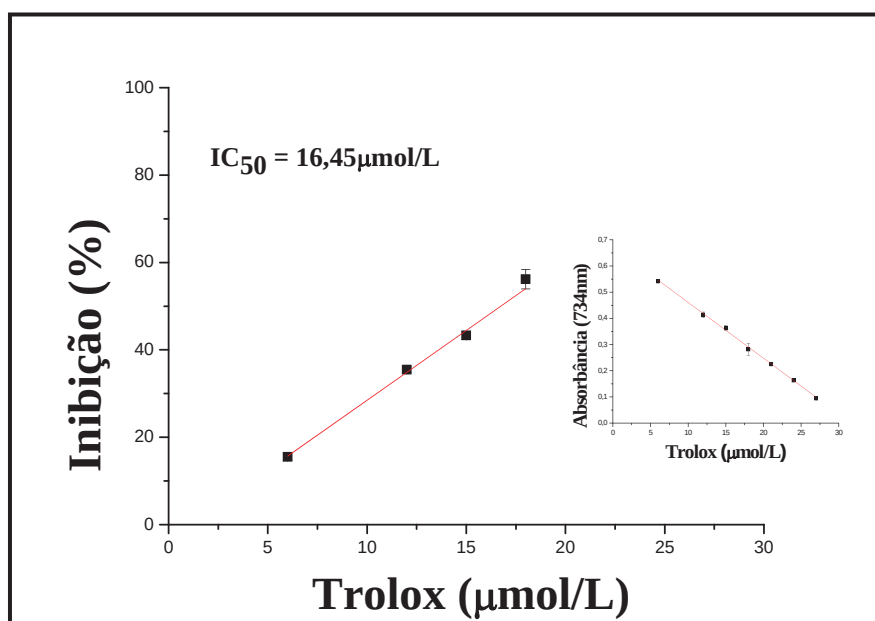


Figura 9: Inibição (captura) do ABTS^{•+} pelo Trolox, em tampão fosfato de sódio 10 mmol/L, pH 7,4. $\lambda = 734$ nm. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do ABTS^{•+} na presença de diferentes concentrações do Trolox.

Nas figuras 10 a 15 são apresentados os solutos urêmicos que atingiram o IC₅₀ para o ABTS^{•+}. Os solutos urêmicos apresentaram ordem crescente do IC₅₀ de aproximadamente 4 μmol/L até 61 mmol/L ou maior: *p*-Cresol < L-tirosina < Fenol < Ácido Úrico < Creatinina < L-arginina, e decrescente para o potencial de ação sobre o ABTS^{•+}.

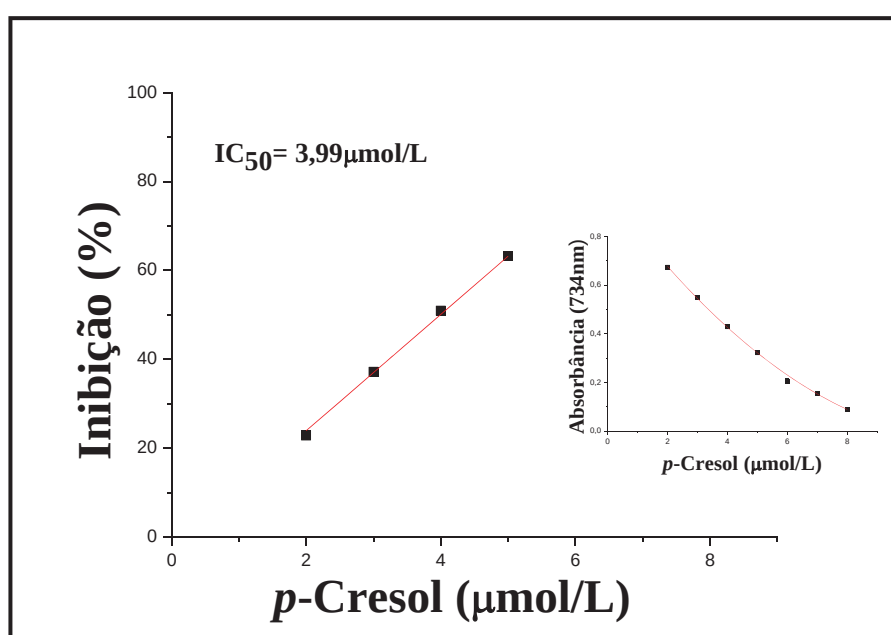


Figura 10: Inibição (captura) do ABTS^{•+} pelo *p*-Cresol, em tampão fosfato de sódio 10 mmol/L, pH 7,4. $\lambda = 734$ nm. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do ABTS^{•+} na presença de diferentes concentrações do *p*-Cresol.

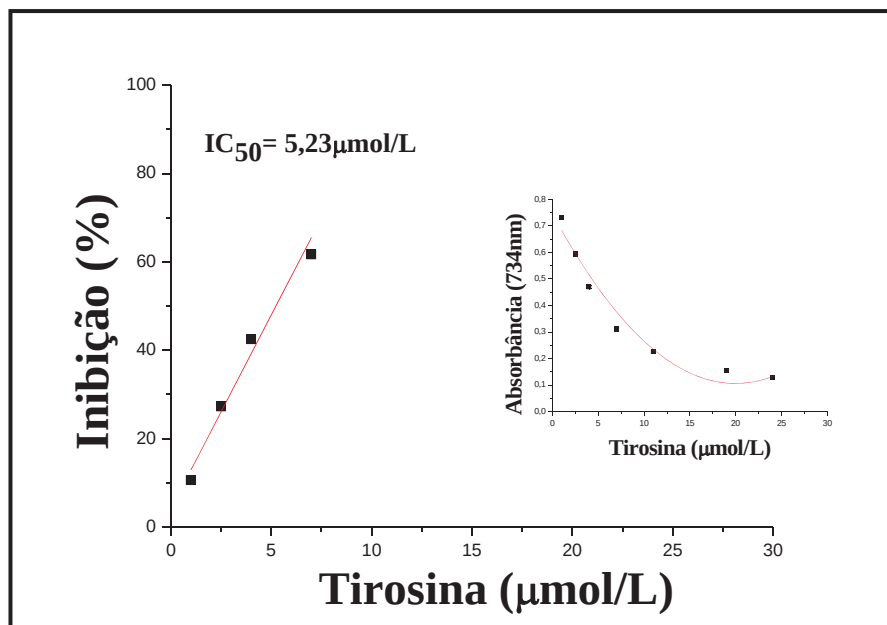


Figura 11: Inibição (captura) do ABTS^{•+} pela L-tirosina, em tampão fosfato de sódio 10 mmol/L, pH 7,4. $\lambda = 734$ nm. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do ABTS^{•+} na presença de diferentes concentrações da L-tirosina.

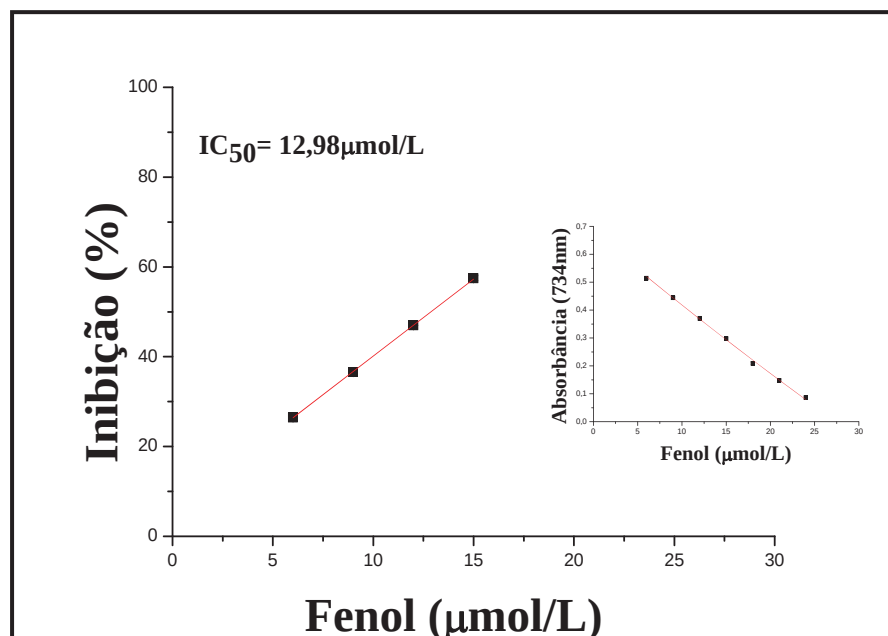


Figura 12: Inibição (captura) do ABTS^{•+} pelo Fenol, em tampão fosfato de sódio 10 mmol/L, pH 7,4. $\lambda = 734$ nm. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do ABTS^{•+} na presença de diferentes concentrações do Fenol.

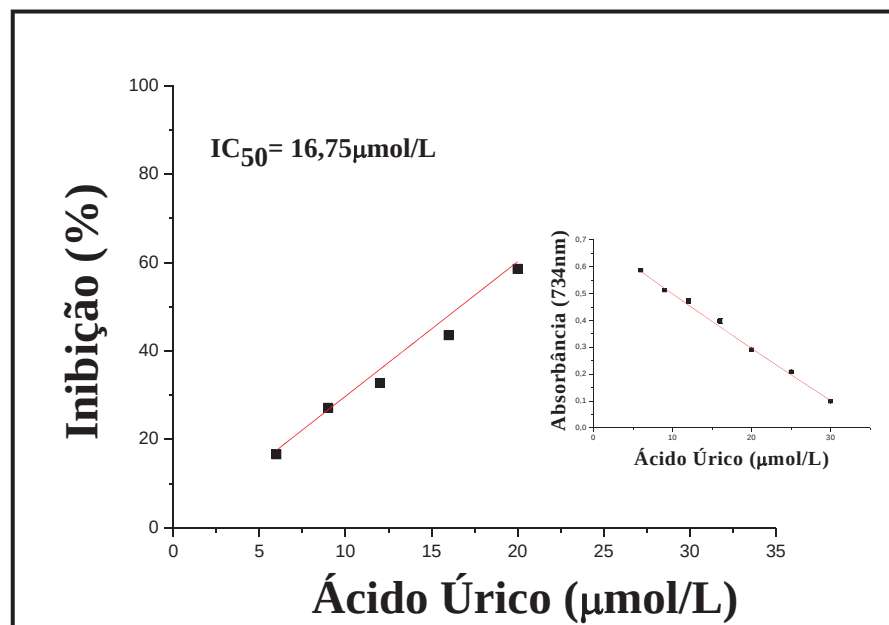


Figura 13: Inibição (captura) do $\text{ABTS}^{\bullet+}$ pelo Ácido Úrico, em tampão fosfato de sódio 10 mmol/L, pH 7,4. $\lambda = 734 \text{ nm}$. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do $\text{ABTS}^{\bullet+}$ na presença de diferentes concentrações do Ácido Úrico.

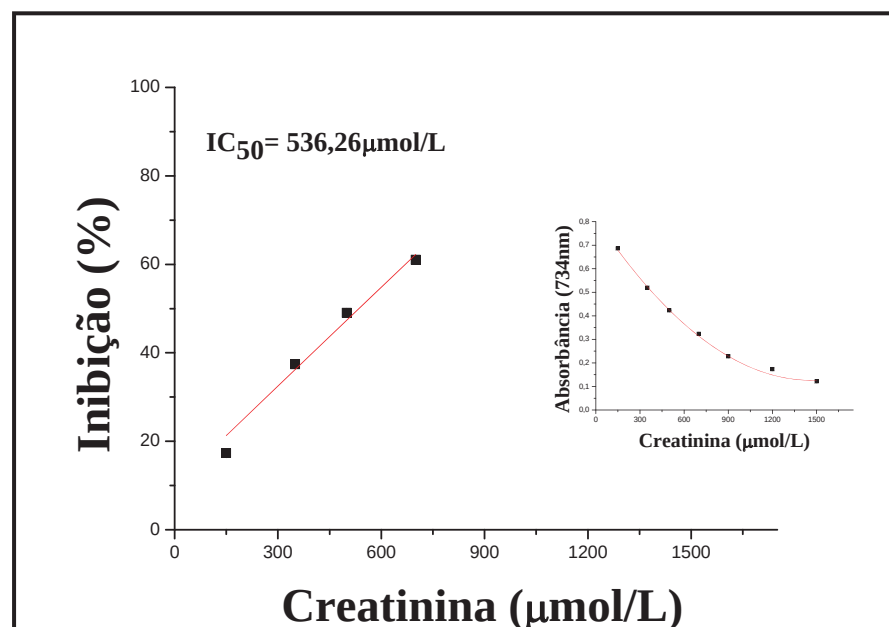


Figura 14: Inibição (captura) do $\text{ABTS}^{\bullet+}$ pela Creatinina, em tampão fosfato de sódio 10 mmol/L, pH 7,4. $\lambda = 734 \text{ nm}$. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do $\text{ABTS}^{\bullet+}$ na presença de diferentes concentrações da Creatinina.

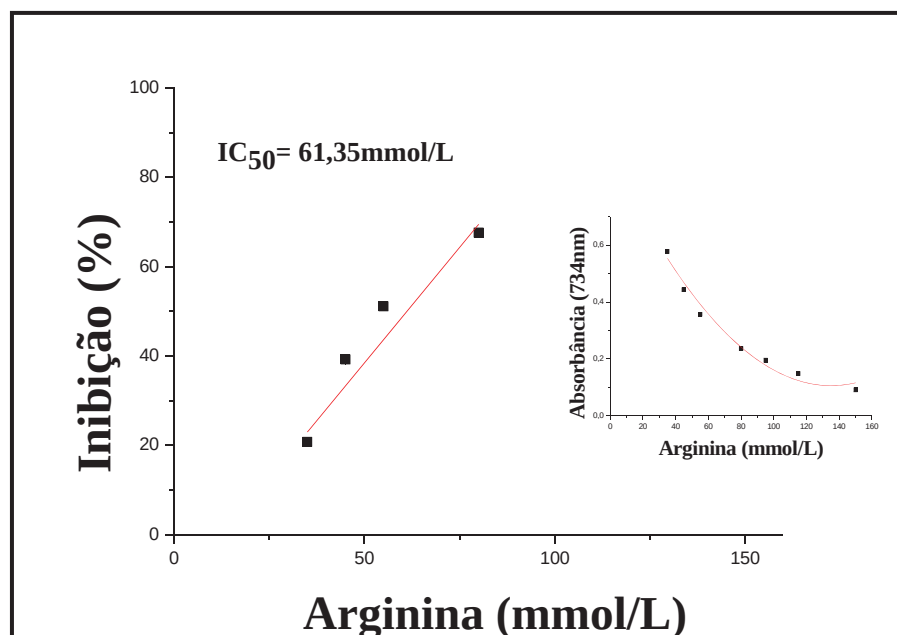


Figura 15: Inibição (captura) do ABTS^{•+} pela L-arginina, em tampão fosfato de sódio 10 mmol/L, pH 7,4. $\lambda = 734$ nm. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do ABTS^{•+} na presença de diferentes concentrações da L-arginina.

Nas concentrações ensaiadas, alguns solutos urêmicos como Ácido Hipúrico, Metilguanidina e Uréia, não apresentaram efeito frente ao ABTS^{•+}.

Na tabela 2 são apresentados os valores em $\mu\text{mol/L}$ do IC₅₀ das amostras em ordem crescente, o que representa uma ordem decrescente na eficiência da captura do radical ABTS^{•+}.

Tabela 2: Capacidade de captura do ABTS^{•+}, expressa em porcentagem de inibição (IC₅₀).

Solutos	IC ₅₀ $\pm$ EPM* ($\mu\text{mol/L}$)
p-Cresol	3,99 $\pm$ 0,01
L-tirosina	5,23 $\pm$ 0,02
Fenol	12,98 $\pm$ 0,09
Trolox	16,45 $\pm$ 0,30
Ácido Úrico	16,75 $\pm$ 0,14
Creatinina	536,26 $\pm$ 3,32
L-arginina	61350,00 $\pm$ 562,56
Ácido Hipúrico	<i>Nihil**</i>
Metilguanidina	<i>Nihil**</i>
Uréia	<i>Nihil**</i>

*EPM (Erro Padrão da Média)

***Nihil*, sem efeito (até as concentrações utilizadas)

O ácido úrico, com IC₅₀ de 16,75 µmol/L (Figura 13) para o ABTS^{•+}, mostrou ser um antioxidante tão efetivo quanto o trolox, conforme também citado por Mello e Kubota, 2007.

Em estudo desenvolvido por Velloso e colaboradores (2009), a fim de avaliar a atividade antioxidante do extrato etanólico da *S. campestris*, foi realizado o ensaio de captura sobre o ABTS^{•+} e utilizou como padrões Trolox e Ácido Úrico, os quais obtiveram IC₅₀ de 2,80 µmol/L e 6,31 µmol/L, respectivamente. Chung et al.(2011) também utilizaram o trolox como padrão (controle positivo para o ensaio com ABTS^{•+}), obtendo o IC₅₀ de 89,94 ± 2,12 µmol/L.

Gülçin (2007), utilizando 20 µg/mL para ambos, Trolox (79,90 µmol/L) e L-tirosina (110,37 µmol/L), observou 94,8% e 62,2%, respectivamente, para eficiência de captura do ABTS^{•+}.

A presença de grupos hidroxila e anéis aromáticos nos solutos urêmicos devem ser correlacionados com a atividade antioxidante, uma vez que os mais eficientes foram *p*-Cresol, L-tirosina, Fenol e Ácido Úrico, o que também tem sido descrito por outros autores (CHUNG et al., 2011; GÜLÇIN, 2007; SROKA; CISOWSKI, 2003).

Mayer et al. (2003), analisaram o efeito da hemodiálise no soro de 22 pacientes e o parâmetro utilizado para avaliar a capacidade antioxidante total do soro, foi o ensaio baseado na captura do ABTS^{•+}. Estes autores observaram uma diminuição da capacidade antioxidante total do soro com o tratamento hemodialítico, e isso foi explicado pela depuração de ácido úrico e ácido ascórbico durante o processo da hemodiálise, biomoléculas que sinergicamente atuam como antioxidantes (CLERMONT et al., 2000).

Em avaliação da capacidade antioxidante total do plasma humano, pelo método redução do ferro/capacidade antioxidante (FRAP) realizada por Endorgan et al.(2002), foi demonstrado a contribuição do ácido úrico de 35-65%; do ascorbato de 0-24%; da vitamina E de 5-10% e proteínas de 10-50%.

A fim de avaliar as consequências de uma sessão de HD sobre o estresse oxidativo sistêmico de pacientes renais crônicos, foi medido a “Total Reactive Antioxidant Potencial” (TRAP) por Bianchi et al. (2009) que utilizaram uma técnica baseada na formação de radical por termólise do AAPH e emissão de luz luminol-dependente. Na presença de soros pré e pós-hemodiálise de pacientes renais crônicos, foi observado capacidade antioxidante significativamente diminuída para a TRAP após uma sessão de HD. Estas avaliações procuram obter informações sobre capacidade do organismo em resistir aos desequilíbrios do estresse oxidativo.

Embora a maioria dos solutos urêmicos tenha apresentado eficiência frente ao $\text{ABTS}^{\bullet+}$, isso não pode ser observado quando se tratava das espécies reativas naturais, como as biomoléculas $\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 .

4.2 Capacidade de captura sobre o Ânion Radical Superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$)

O $\text{O}_2^{\bullet-}$ é uma ERO produzida constantemente no organismo humano em processos fisiológicos. Sua produção também é iniciada com a ativação de fagócitos, como neutrófilos, monócitos e eosinófilos, o que leva à produção de outras ERO, ultrapassando a capacidade antioxidante local, favorecendo o surto oxidativo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2010; CADENAS; DAVIES, 2000). Quando o sistema imune (fagócitos) é ativado, defesas antioxidantes (enzimáticas e não enzimáticas) atuam contra a “toxicidade” dessas espécies nesse momento e são responsáveis pela manutenção da homeostase entre a produção e eliminação das ERO. Quando há presença de inflamação, os neutrófilos respondem de maneira efetiva a estímulos quimiotáticos, estando presente com uma grande população na resposta inflamatória (BABIOR, 1984). Uma sequência de eventos ocorre (ativação, rolamento, adesão e transmigração) monitorada por moléculas de adesão presentes nas superfícies dos leucócitos e células endoteliais (SPERTINI et. al., 1991).

O endotélio vascular exerce um papel importante na regulação do tônus vascular e na manutenção da homeostase vascular (GLASSER; SELWYN; GANZ, 1996), podendo o comprometimento desse tecido estar associado a diversas patologias como hipertensão, aterosclerose e diabetes (JOHNSTONE et al., 1993; TADDEI et al., 1997).

O estresse oxidativo pode ser um dos principais fatores que alteram a integridade do sistema vascular. As ERO, principalmente o $\text{O}_2^{\bullet-}$ quando tem sua produção aumentada, estão entre os principais fatores contribuintes para a disfunção endotelial, e consequentemente, para o comprometimento da facilidade de distensão da parede vascular, sua atividade no tecido endotelial promove a oxidação de proteínas e lipídeos (WOLIN, 2000; KEANEY Jr.; LOSCALZO, 1999).

Neste ensaio, o ânion superóxido gerado pela reação entre PMS e NADH, reage com NBT para formar uma formazana. Os solutos urêmicos foram testados em concentrações crescentes, desde a concentração fisiológica, na urêmica, e mesmo até a 10 vezes maior que concentração urêmica média. Para este teste também foi utilizado o Trolox como padrão, cujo

IC₅₀ (Figura 16), apresentou um valor relativamente alto (≈ 2 mmol/L), e que também demonstra a validade do ensaio.

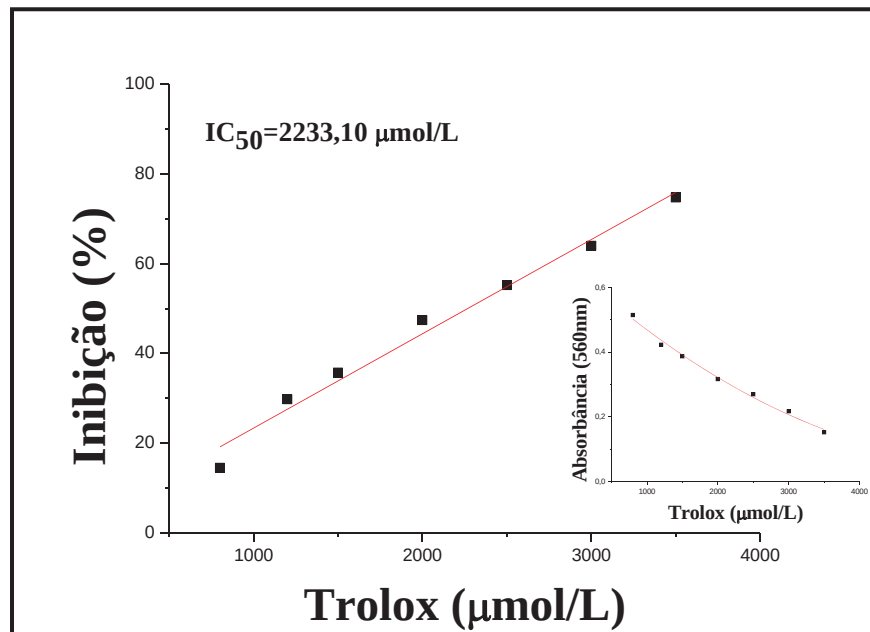


Figura 16: Inibição (captura) do $O_2^{\bullet-}$ pelo Trolox, em tampão pirofosfato de sódio 25 mmol/L, pH 8,3. $\lambda = 650$ nm. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do $O_2^{\bullet-}$ na presença de diferentes concentrações de Trolox.

Na tabela 3 pode ser observado que os solutos urêmicos não se mostraram eficientes na captura do $O_2^{\bullet-}$.

Tabela 3: Capacidade de captura do $O_2^{\bullet-}$ pelos solutos urêmicos, expressa como a porcentagem de inibição da redução do NBT.

Solutos Urêmicos	Concentração Fisiológica (CF) (mmol/L)	Concentração Urêmica (C _{Ur}) (mmol/L)	Concentração até 10x maior que a C _{Ur} (mmol/L)	% de Inibição para CF, C _{Ur} e até 10x maior
Ácido Hipúrico	0,028	1,700	2,000	*Nihil
Ácido Úrico	0,420	0,600	2,300	*Nihil
Creatinina	0,120	0,880	8,800	*Nihil
Fenol	0,015	0,110	1,100	*Nihil
L-Arginina	0,140	0,230	2,300	*Nihil
Metilguanidina	0,006	0,091	0,910	*Nihil
p-Cresol	0,021	0,280	2,800	*Nihil
L-tirosina	0,027	0,110	1,100	*Nihil
Uréia	6,700	33,000	330,000	*Nihil
Trolox **	—	—	—	—

*Nihil, sem efeito (nas concentrações utilizadas).

** Utilizado como padrão, com IC₅₀ de 2233,10 μmol/L.

O ácido úrico pode funcionar como um antioxidante e tem sido considerado um importante antioxidante do plasma. Conforme citado por Johnson et al.(2003), o urato (solúvel no sangue) mostra-se eficiente frente ao ânion radical superóxido, e também eficiente ao radical hidroxila e oxigênio singlete.

É relatado por Hink et al. (2002), que o ácido úrico pode também evitar a degradação da superóxido dismutase extracelular (SOD3), uma isoforma da enzima importante para manter a função vascular e endotelial, a qual catalisa a dismutação do $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 . A supressão do $O_2^{\bullet-}$ pela SOD3, evita a reação e inativação de um importante vasodilatador endotelial, o óxido nítrico (NO). Portanto, a SOD3 removendo o $O_2^{\bullet-}$ ajuda a manter os níveis de NO e a função endotelial.

A SOD3 é inativada na presença do H_2O_2 . O ácido úrico poderia também bloquear a inativação da SOD3 pelo H_2O_2 com produção do radical urato, e este radical, apesar de ser pró-oxidante, tem sido verificado ser significativamente menos reativo do que oxidantes clássicos, podendo ser regenerado novamente à urato quando na presença do ascorbato (HINK et al., 2002; JOHNSON et al., 2003).

Ak; Gülçin (2008) e Gülçin (2007) mostraram maior eficiência do Trolox frente ao $O_2^{\bullet-}$, com metodologia quimiluminescente, mais sensível e eficaz, com inibição de 78,2% da atividade *scavenging* para o $O_2^{\bullet-}$ em 39,95 $\mu\text{mol/L}$.

Portanto, os resultados deste estudo corroboram com os de Barreiros; David; David (2006), que relatam ser o ácido úrico inerte frente ao $O_2^{\bullet-}$ e ao H_2O_2 , porém com reatividade importante para o $ROO^{\bullet}$ e $NO_2^{\bullet}$. Devido à alta atividade contra o $ROO^{\bullet}$ é postulado ser protetor de lipídeos e DNA, interagindo com os $ROO^{\bullet}$ antes que ataquem a membrana e iniciem os danos tissulares.

4.3 Capacidade de captura sobre o H_2O_2

O H_2O_2 é produzido continuamente em muitos, senão em todos os tecidos *in vivo*, e estudos sobre fígados de ratos perfundidos sugerem concentrações estacionárias de 10^{-7} a 10^{-8} M. A mitocôndria pode ser um contribuinte para geração celular do H_2O_2 , tanto pela monoamina oxidase como pela dismutação do $O_2^{\bullet-}$ gerado a partir da cadeia de transporte de elétrons, embora a mitocôndria possa também consumir H_2O_2 (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2010). Assim, em sistemas *in vivo* o H_2O_2 é gerado através da dismutação do $O_2^{\bullet-}$, espontaneamente ou catalisada pela SOD, também via reações de oxidases ou pela β -

oxidação de ácidos graxos, ou diretamente por meio de oxidases, como as da: xantina, urato, glicose, coproporfirinogênio III, lisil, monoamina e D-aminoácidos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2010; FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Neste ensaio, também, nenhuma das amostras capturou o H_2O_2 , em concentrações fisiológicas, urêmicas ou em até 10 vezes maiores (Tabela 4).

Tabela 4: Capacidade de captura do H_2O_2 pelos solutos urêmicos, expressa como a porcentagem de inibição da oxidação do TNB.

Solutos Urêmicos	Concentração Fisiológica (CF) (mmol/L)	Concentração Urêmica (C _{Ur}) (mmol/L)	Concentração até 10x maior que a C _{Ur} (mmol/L)	% de Inibição para CF, C _{Ur} e até 10x maior
Ácido Hipúrico	0,028	1,700	2,000	*Nihil
Ácido Úrico	0,420	0,600	3,000	*Nihil
Creatinina	0,120	0,880	8,800	*Nihil
Fenol	0,015	0,110	1,100	*Nihil
L-Arginina	0,140	0,230	2,300	*Nihil
Metilguanidina	0,006	0,091	0,910	*Nihil
p-Cresol	0,021	0,280	2,800	*Nihil
L-tirosina	0,027	0,110	1,100	*Nihil
Uréia	6,700	33,000	330,000	*Nihil
**Trolox	—	—	—	—

*Nihil, sem efeito (nas concentrações utilizadas).

** Utilizado como padrão, para o qual também não foi observado nenhum efeito até 3mmol/L.

Como nenhum dos solutos urêmicos, e mesmo o Trolox (até 6 mmol/L), teve qualquer efeito neste ensaio, utilizou-se a catalase para valida-lo, pois é reconhecida sua eficiência e especificidade na catálise da conversão do H_2O_2 em água e oxigênio (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2010). Para avaliar a eficiência da enzima (atividade *scavenging*) e considerando-se que sua concentração (expressa em 2950 unidades/mg de sólidos), preparou-se uma solução de 20 unidades/mL para a realização do ensaio. Assumindo que a massa de sólido pesada esteve pura, ou seja, somente catalase e ainda considerando a sua massa molecular de 240.000 Da (BUDAVARI et al., 2006), pode-se converter o valor obtido do IC₅₀ de 0,55 unid/mL (Figura 17) para 18,6 µg/mL ou 77,5 nmol/L.

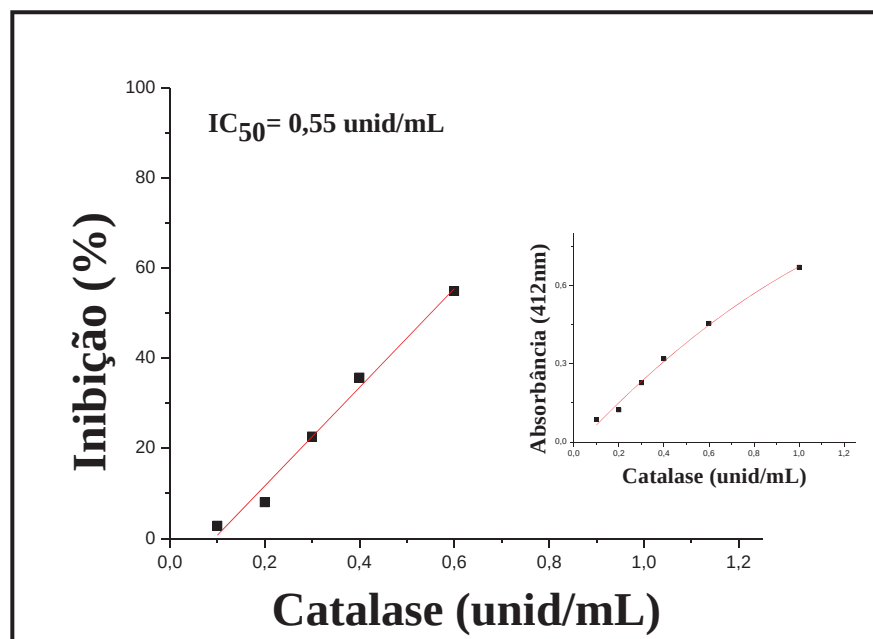


Figura 17: Inibição (captura) do H_2O_2 pela catalase; em tampão fosfato de potássio 50 mmol/L, H_2O_2 0,3 mM, pH 6,6, $\lambda = 412$ nm. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do TNB na presença de diferentes concentrações da catalase.

4.4 Capacidade de captura sobre HOCl / OCl⁻

Neste ensaio também utilizou-se como padrão o Trolox (Figura 18). Dos solutos urêmicos estudados, a maioria se mostrou efetivo como sequestradores do ácido hipocloroso e, portanto, pode-se calcular os respectivos IC_{50} (Figuras 19 a 26), exceto para Metilguanidina, pois esta, até a concentração 10 vezes maior que a urêmica média, não teve qualquer efeito sobre o HOCl/OCl⁻.

Os solutos, enumerados em ordem crescente para o IC_{50} , foram efetivos da ordem de aproximadamente 3 μ mol/L até 92 mmol/L ou maior: L-tirosina < Ácido Úrico < Fenol < p-Cresol < Ácido Hipúrico < Uréia < Creatinina < L-arginina ou em ordem decrescente para a eficiência na ação sobre HOCl/OCl⁻.

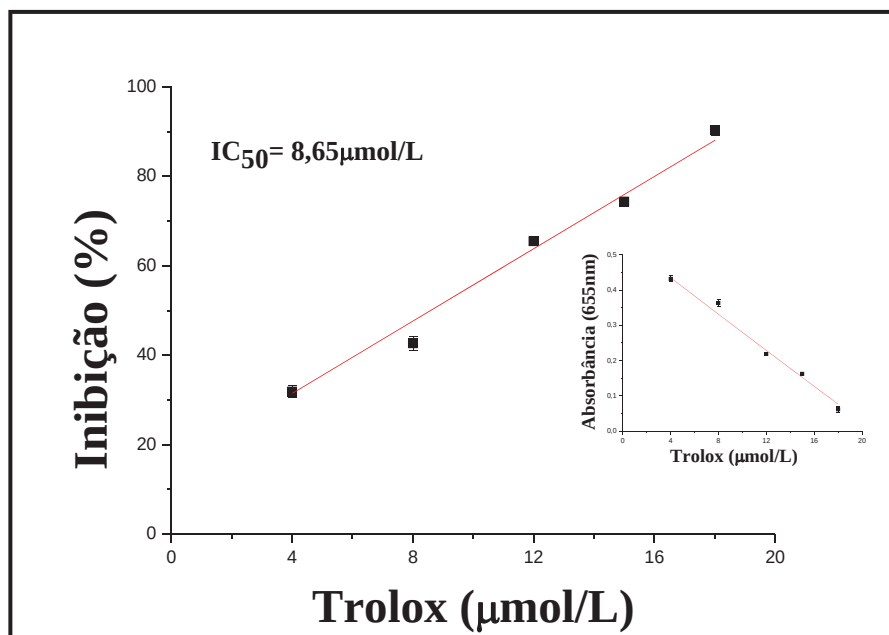


Figura 18: Inibição (captura) do HOCl/OCl⁻ pelo Trolox, em tampão fosfato de sódio 50 mmol/L, pH 7,4. $\lambda = 655$ nm. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do HOCl/OCl⁻ na presença de diferentes concentrações de Trolox.

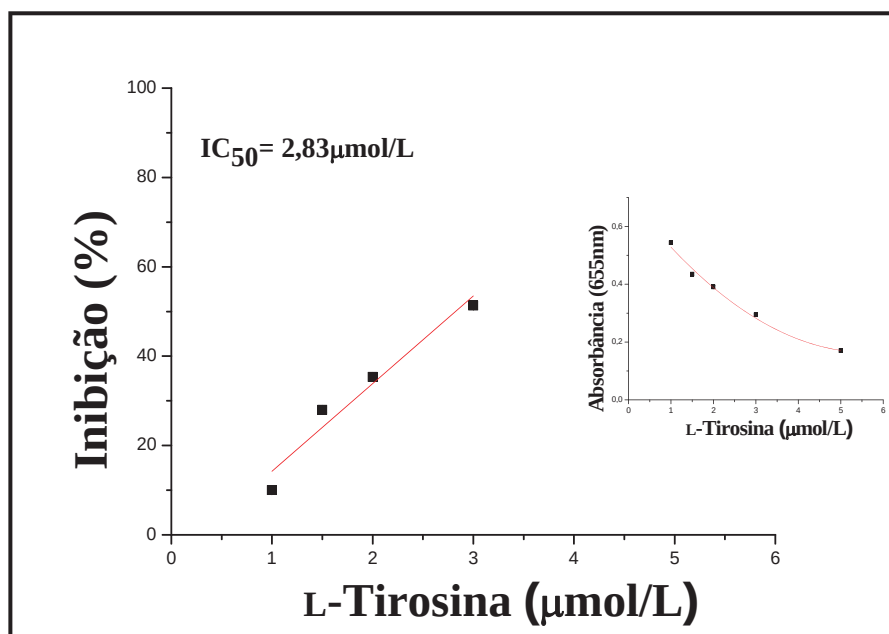


Figura 19: Inibição (captura) do HOCl/OCl⁻ pela L-tirosina, em tampão fosfato de sódio 50 mmol/L, pH 7,4. $\lambda = 655$ nm. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do HOCl/OCl⁻ na presença de diferentes concentrações de L-tirosina.

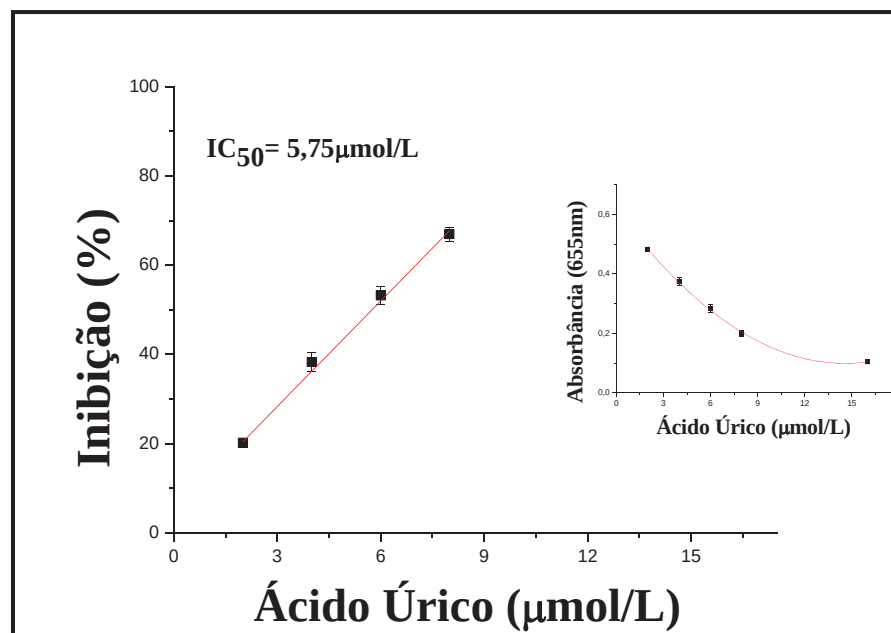


Figura 20: Inibição (captura) do HOCl/OCl⁻ pelo Ácido Úrico, em tampão fosfato de sódio 50 mmol/L, pH 7,4. λ = 655 nm. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do HOCl/OCl⁻ na presença de diferentes concentrações de Ácido Úrico.

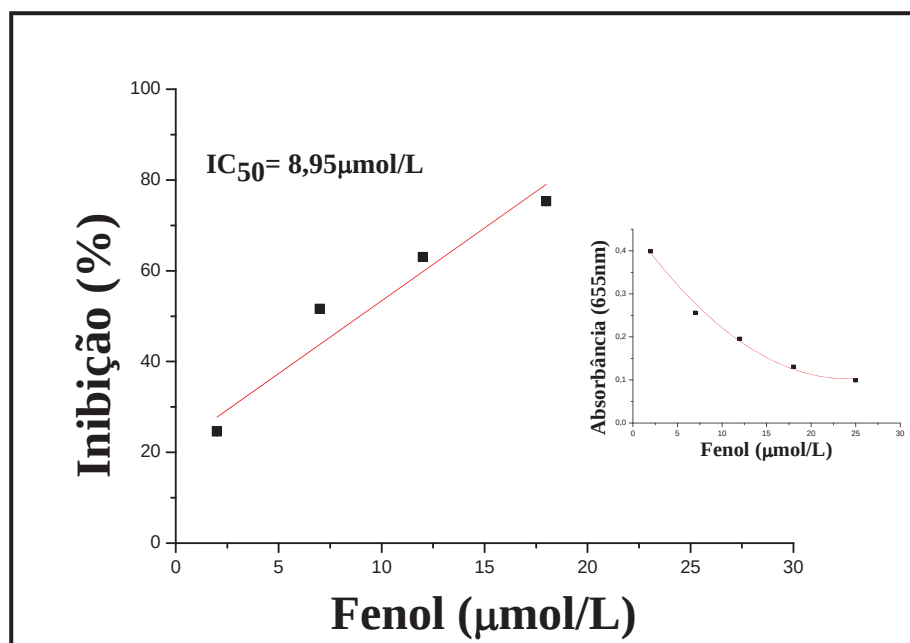


Figura 21: Inibição (captura) do HOCl/OCl⁻ pelo Fenol, em tampão fosfato de sódio 50 mmol/L, pH 7,4. λ = 655 nm. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do HOCl/OCl⁻ na presença de diferentes concentrações de Fenol.

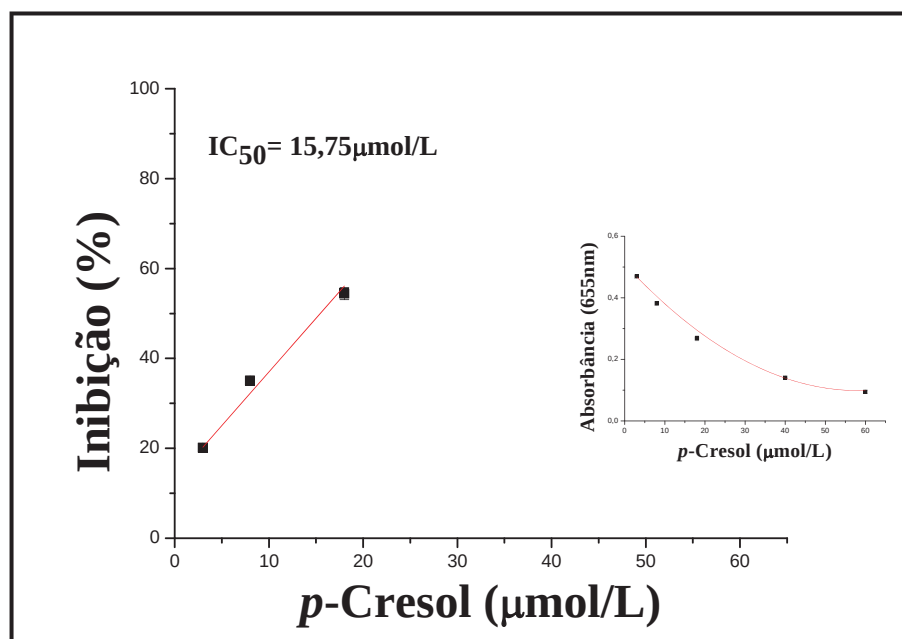


Figura 22: Inibição (captura) do HOCl/OCl⁻ pelo *p*-Cresol, em tampão fosfato de sódio 50 mmol/L, pH 7,4. $\lambda = 655 \text{ nm}$. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do HOCl/OCl⁻ na presença de diferentes concentrações de *p*-Cresol.

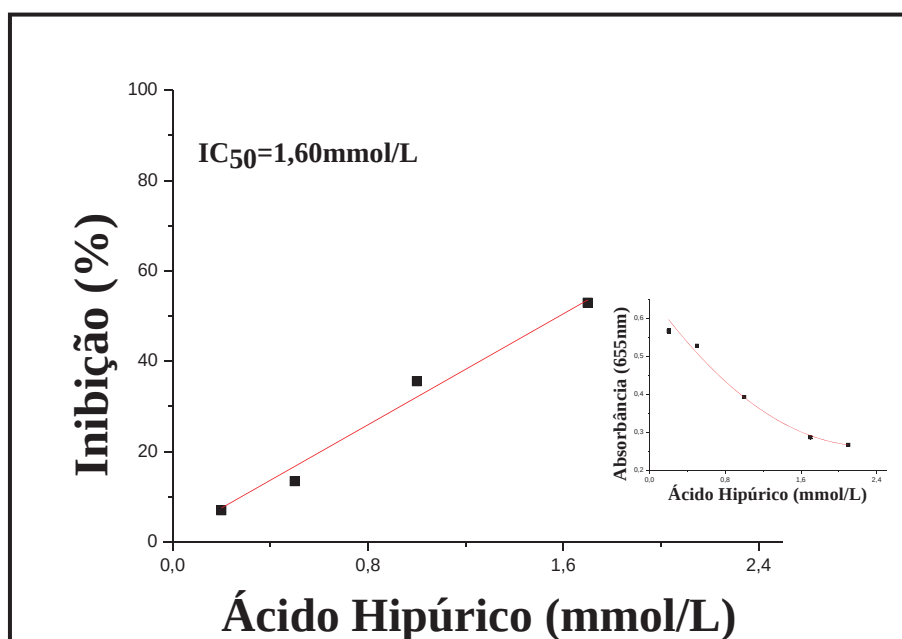


Figura 23: Inibição (captura) do HOCl/OCl⁻ pelo Ácido Hipúrico, em tampão fosfato de sódio 50 mmol/L, pH 7,4. $\lambda = 655 \text{ nm}$. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do HOCl/OCl⁻ na presença de diferentes concentrações de Ácido Hipúrico.

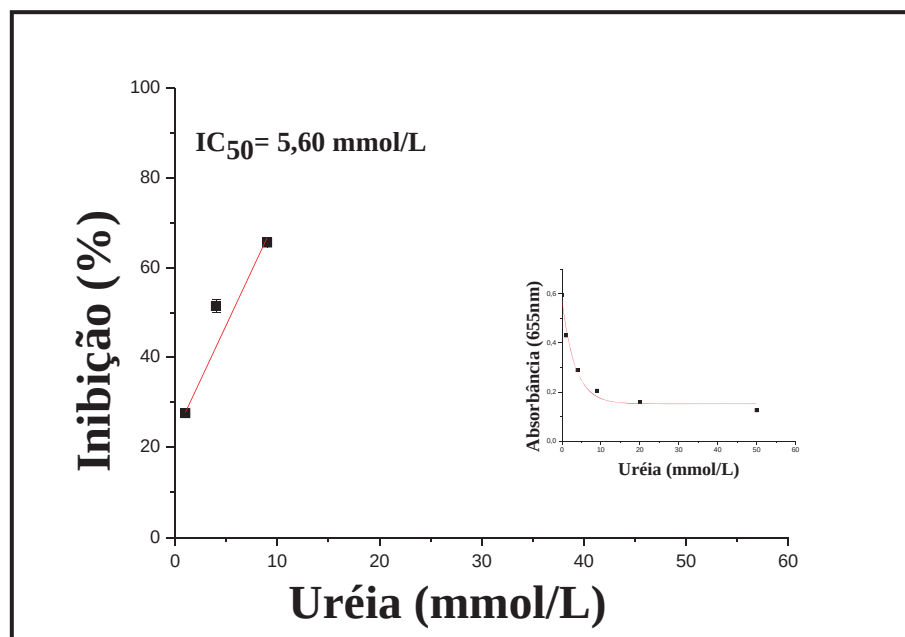


Figura 24: Inibição (captura) do HOCl/OCl⁻ pela Uréia, em tampão fosfato de sódio 50 mmol/L, pH 7,4. λ = 655 nm. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do HOCl/OCl⁻ na presença de diferentes concentrações de Uréia.

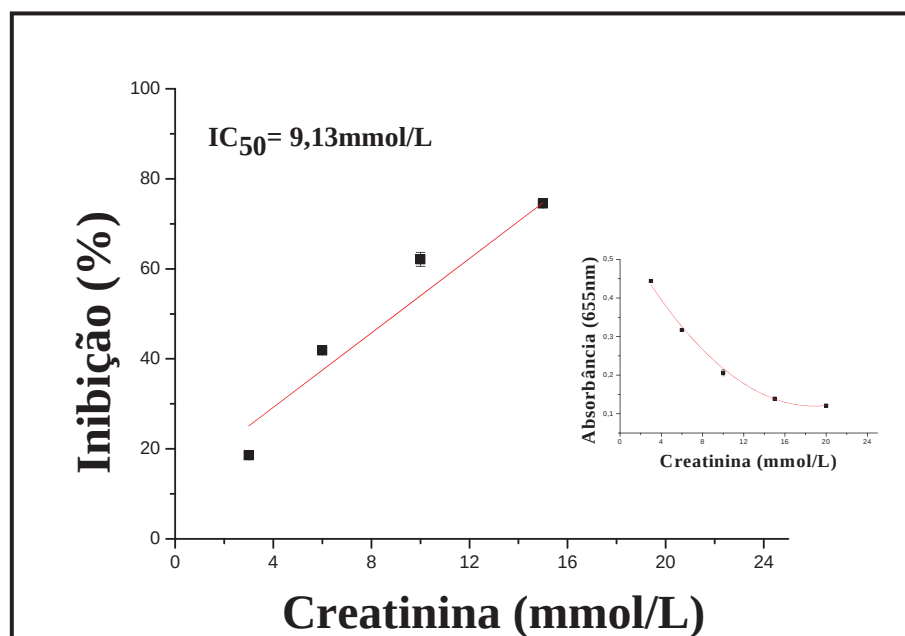


Figura 25: Inibição (captura) do HOCl/OCl⁻ pela Creatinina, em tampão fosfato de sódio 50 mmol/L, pH 7,4. λ = 655 nm. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do HOCl/OCl⁻ na presença de diferentes concentrações de Creatinina.

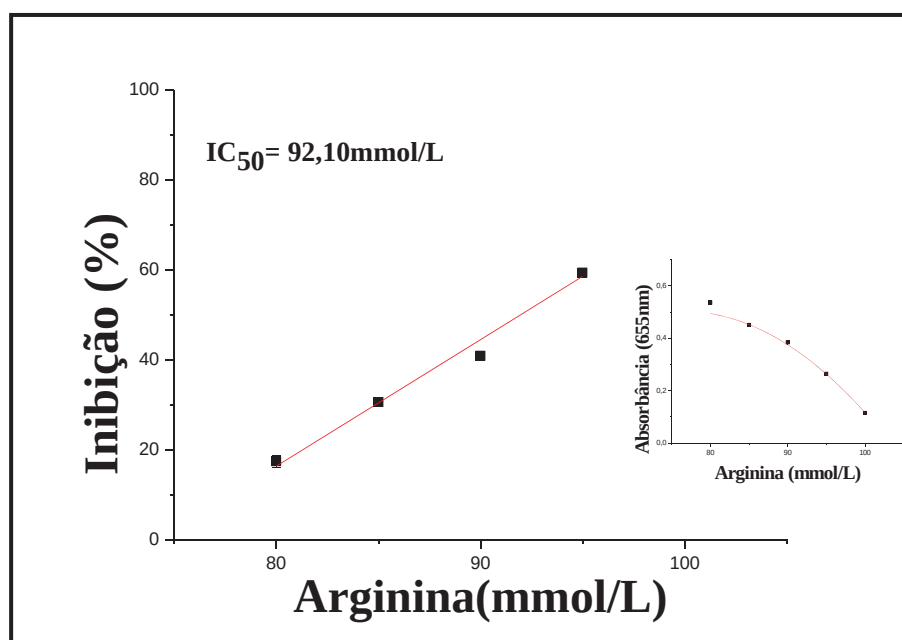


Figura 26: Inibição (captura) do HOCl/OCl⁻ pela L-arginina, em tampão fosfato de sódio 50 mmol/L, pH 7,4. $\lambda = 655$ nm. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do HOCl/OCl⁻ na presença de diferentes concentrações de L-arginina.

Na tabela 5, são apresentados os valores em $\mu\text{mol/L}$ do IC_{50} das amostras para o HOCl/OCl⁻.

Tabela 5: Capacidade de captura do HOCl/OCl⁻, expressa como a porcentagem de inibição (IC_{50}) da oxidação do TMB.

	$\text{IC}_{50} \pm \text{EPM}^* (\mu\text{mol/L})$
L-tirosina	$2,83 \pm 0,04$
Ácido Úrico	$5,75 \pm 0,13$
Trolox	$8,65 \pm 0,27$
Fenol	$8,95 \pm 0,10$
<i>p</i>-Cresol	$15,75 \pm 0,12$
Ácido Hipúrico	$1600,00 \pm 0,01$
Uréia	$5600,00 \pm 0,20$
Creatinina	$9130,00 \pm 0,10$
L-arginina	$92100,00 \pm 0,10$
Metilguanidina	<i>**Nihil</i>

*EPM (Erro Padrão da Média)

***Nihil*, sem efeito (nas concentrações utilizadas).

Dos solutos analisados, de acordo com os IC₅₀ apresentados na tabela 5, o Ácido Úrico, o Fenol, a L-tirosina e a Uréia mostraram um comportamento eficiente, parecendo ser bons antioxidantes, pois seus respectivos IC₅₀ foram abaixo da concentração fisiológica (Tabela 1). Os solutos, Ácido Hipúrico e *p*-Cresol obtiveram o IC₅₀ entre as concentrações, fisiológica e urêmica (Tabela 1), portanto podem ter algum efeito frente ao HOCl/OCl⁻. E os demais solutos, L-arginina e Creatinina, apresentaram o IC₅₀ acima da concentração urêmica.

4.5 Ensaio do Clareamento (*Bleaching*) da Crocina

As biomembranas, compostas de bicamadas de fosfolipídios, são os principais alvos de ataque dos radicais, sofrem lipoperoxidação (LPO), que uma vez ocorrendo de maneira descontrolada causa perda de sua estrutura e funcionalidade, implicando na participação da etiologia de muitas doenças. Devido às graves consequências da LPO, tem-se estimulado estudos que abordem a eficácia e mecanismos de ação dos antioxidantes de ocorrência biológica (LÚCIO et al., 2009), o que torna importante estudar os solutos urêmicos frente ao ROO[•].

A capacidade de inibir o clareamento da crocina pelo Trolox (Figura 27) e pelos solutos urêmicos está apresentada nas figuras 28 a 36. Ao compararmos os resultados, os valores de inclinação dos solutos urêmicos, considerando a ordem de eficiência, ou seja, as maiores capacidades antioxidante foram: Ácido Úrico > *p*-Cresol > Fenol > L-tirosina (Figuras 28 a 31), onde houve redução da velocidade do *bleaching* da crocina e, portanto atividade antioxidante (Tabela 6). Entretanto, com os demais solutos observaram-se inclinações com valores muito baixos (“negativas”), onde a velocidade do *bleaching* da crocina permaneceu inalterada na presença desses solutos, indicando ausência de interação com radical peroxila, e, portanto estes solutos não apresentaram efeitos antioxidantes (Figuras 32 a 36).

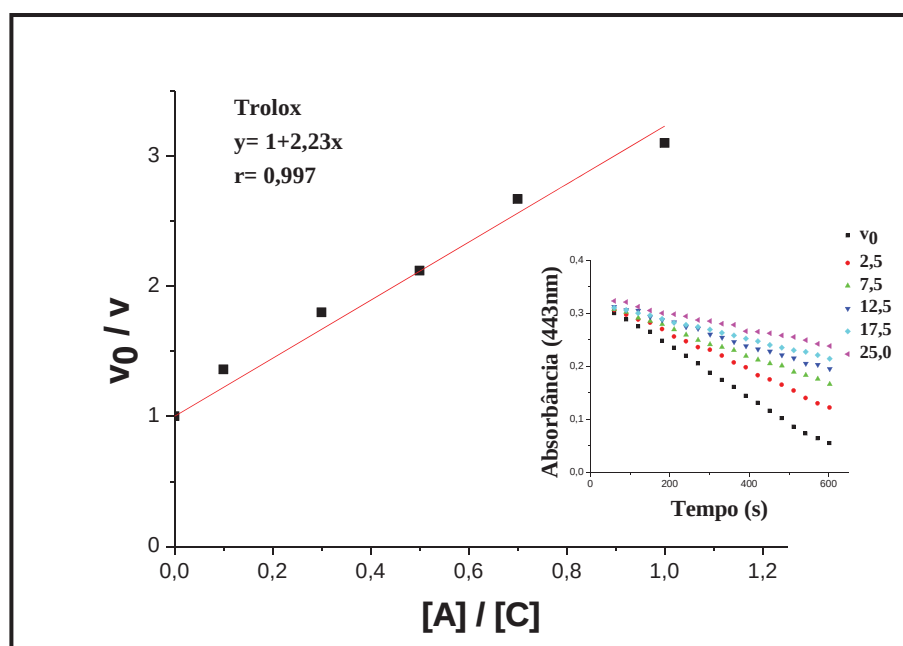


Figura 27: Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com Trolox. V_0 , velocidade na ausência de Trolox; v , velocidade na presença de Trolox; $[C]$, concentração de crocina constante ($25 \mu\text{mol/L}$) e $[A]$, concentração de Trolox. O gráfico inserido representa a queda de absorbância, a 443 nm, da crocina, na ausência (v_0) e presença (v) de Trolox ($\mu\text{mol/L}$), em função do tempo.

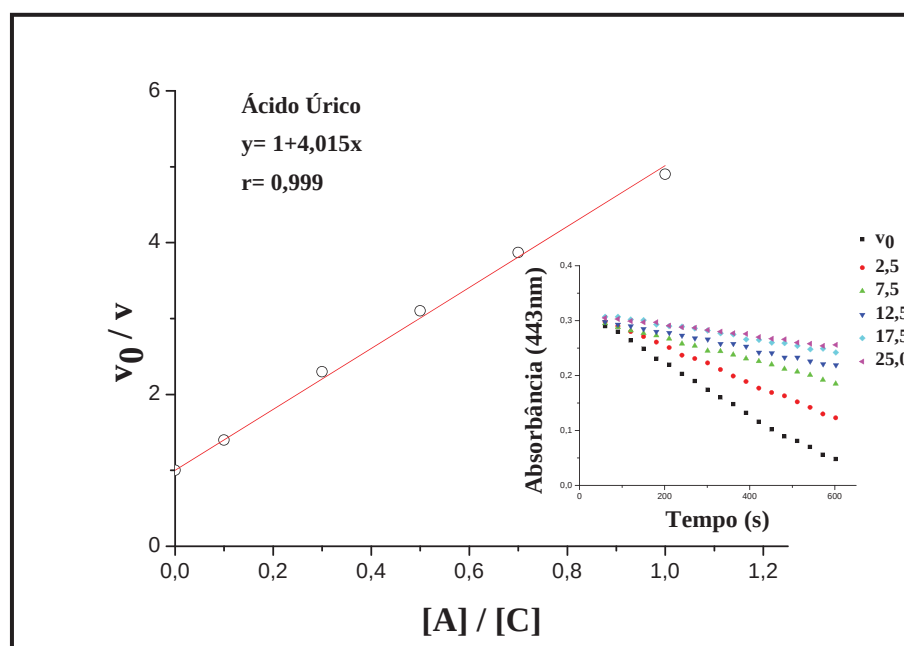


Figura 28: Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com Ácido Úrico. v_0 , velocidade na ausência de Ácido Úrico; v , velocidade na presença de Ácido Úrico; $[C]$, concentração de crocina constante ($25 \mu\text{mol/L}$) e $[A]$, concentração de Ácido Úrico. O gráfico inserido representa a queda de absorbância, a 443 nm, da crocina, na ausência (v_0) e presença (v) de Ácido Úrico ($\mu\text{mol/L}$), em função do tempo.

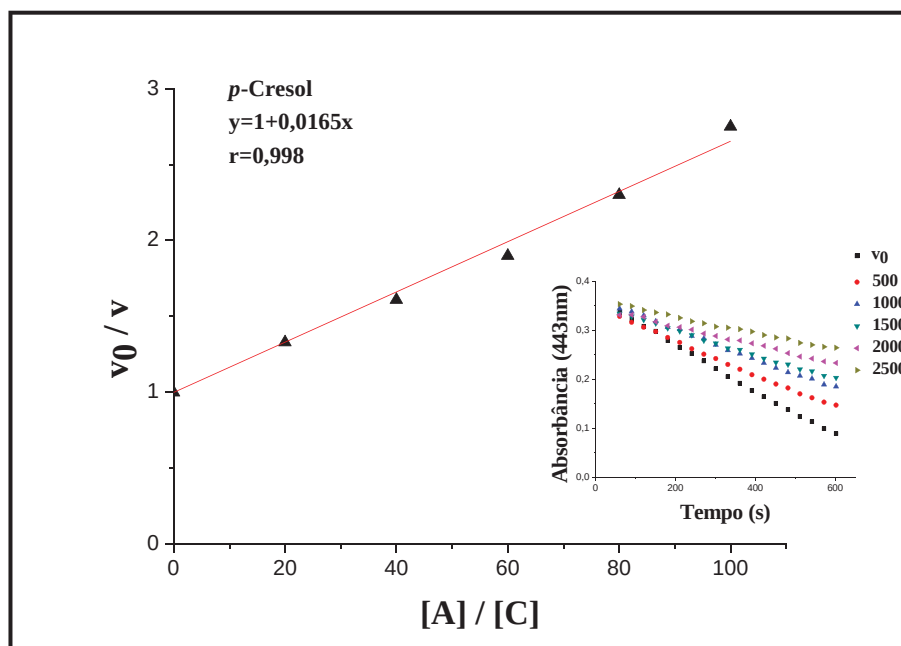


Figura 29: Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com *p*-Cresol. v_0 , velocidade na ausência de *p*-Cresol; v , velocidade na presença de *p*-Cresol; $[C]$, concentração de crocina constante (25 $\mu\text{mol/L}$) e $[A]$, concentração de *p*-Cresol. O gráfico inserido representa a queda de absorbância, a 443 nm, da crocina, na ausência (v_0) e presença (v) de *p*-Cresol ($\mu\text{mol/L}$), em função do tempo.

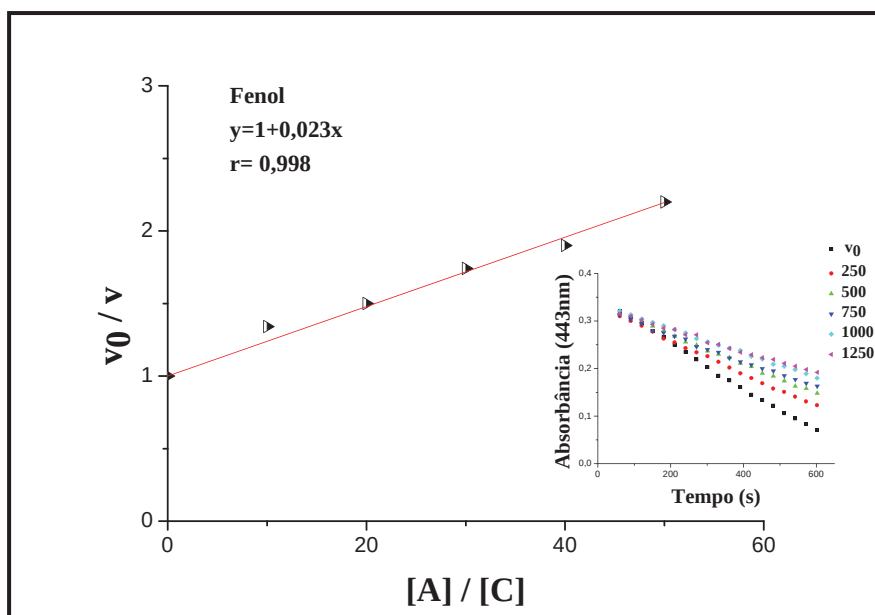


Figura 30: Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com Fenol. V_0 , velocidade na ausência de Fenol; v , velocidade na presença de Fenol; $[C]$, concentração de crocina constante (25 $\mu\text{mol/L}$) e $[A]$, concentração de Fenol. O gráfico inserido representa a queda de absorbância, a 443 nm, da crocina, na ausência (V_0) e presença (v) de Fenol ($\mu\text{mol/L}$), em função do tempo.

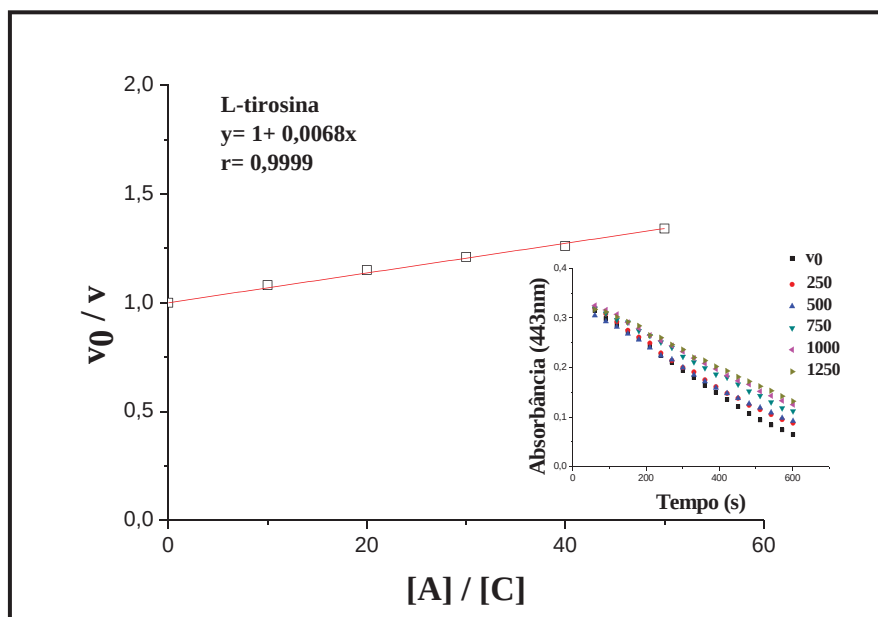


Figura 31: Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com L-tirosina. v_0 , velocidade na ausência de Tirosina; v , velocidade na presença de L-tirosina; $[C]$, concentração de crocina constante (25 $\mu\text{mol/L}$) e $[A]$, concentração de L-tirosina. O gráfico inserido representa a queda de absorbância, a 443 nm, da crocina, na ausência (v_0) e presença (v) de L-tirosina ($\mu\text{mol/L}$), em função do tempo.

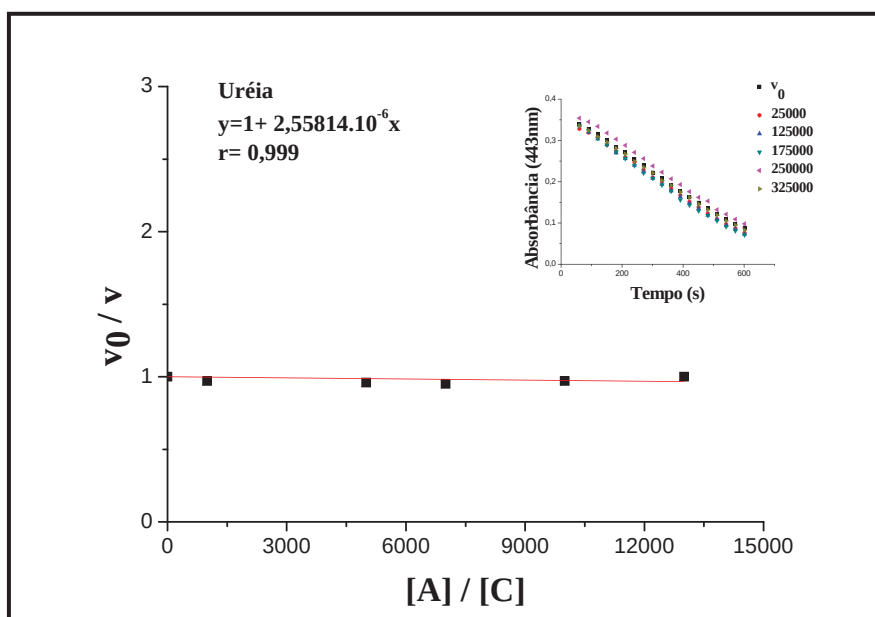


Figura 32: Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com Uréia. v_0 , velocidade na ausência de Uréia; v , velocidade na presença de Uréia; $[C]$, concentração de crocina constante (25 $\mu\text{mol/L}$) e $[A]$, concentração de Uréia. O gráfico inserido representa as absorbâncias a 443 nm, da crocina, na ausência (v_0) e presença (v) de Uréia ($\mu\text{mol/L}$), em função do tempo.

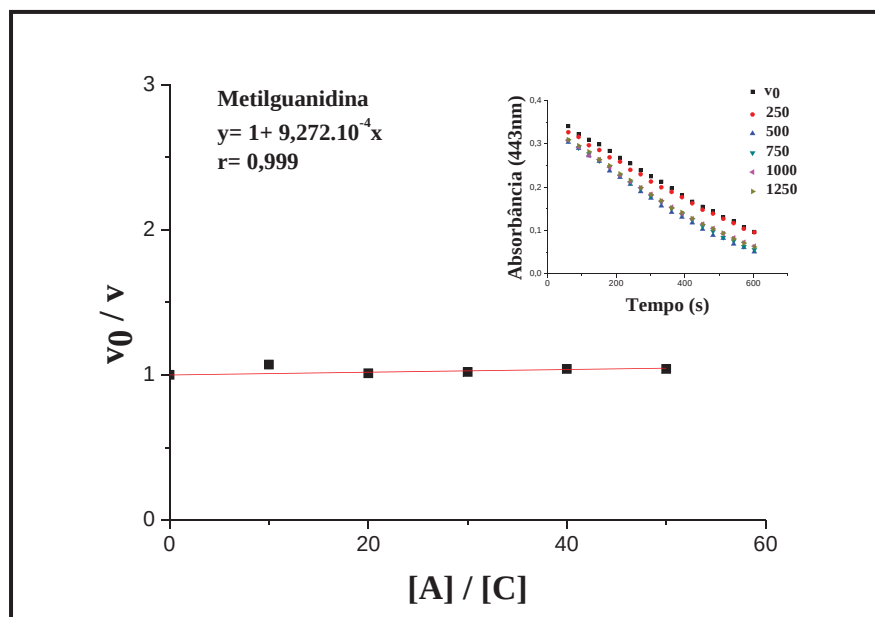


Figura 33: Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com Metilguanidina. v_0 , velocidade na ausência de Metilguanidina; v , velocidade na presença de Metilguanidina; $[C]$, concentração de crocina constante (25 $\mu\text{mol/L}$) e $[A]$, concentração de Metilguanidina. O gráfico inserido representa as absorbâncias a 443 nm, da crocina, na ausência (v_0) e presença (v) de Metilguanidina ($\mu\text{mol/L}$), em função

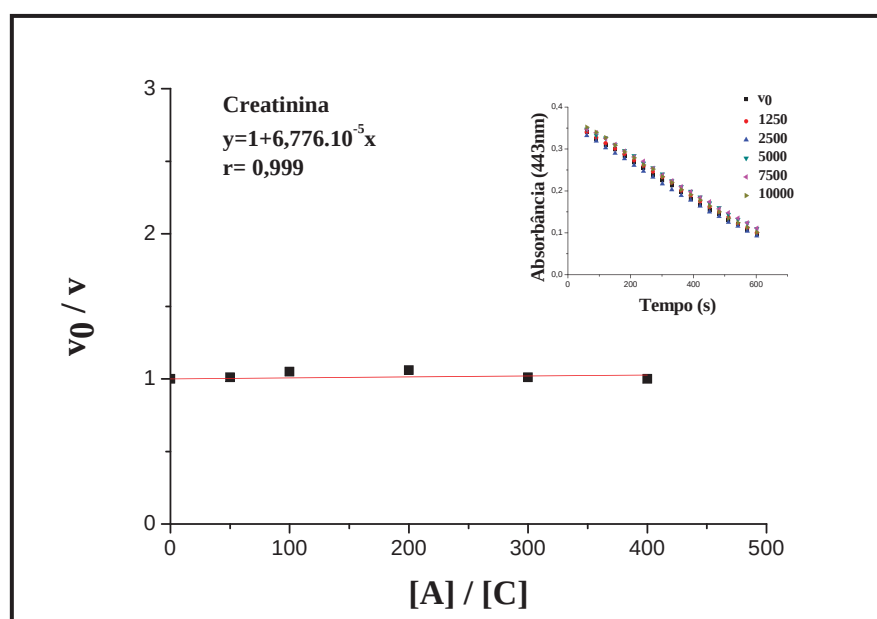


Figura 34: Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com Creatinina. V_0 , velocidade na ausência de Creatinina; v , velocidade na presença de Creatinina; $[C]$, concentração de crocina constante (25 $\mu\text{mol/L}$) e $[A]$, concentração de Creatinina. O gráfico inserido representa as absorbâncias a 443 nm, da crocina, na ausência (v_0) e presença (v) de Creatinina ($\mu\text{mol/L}$), em função do tempo.

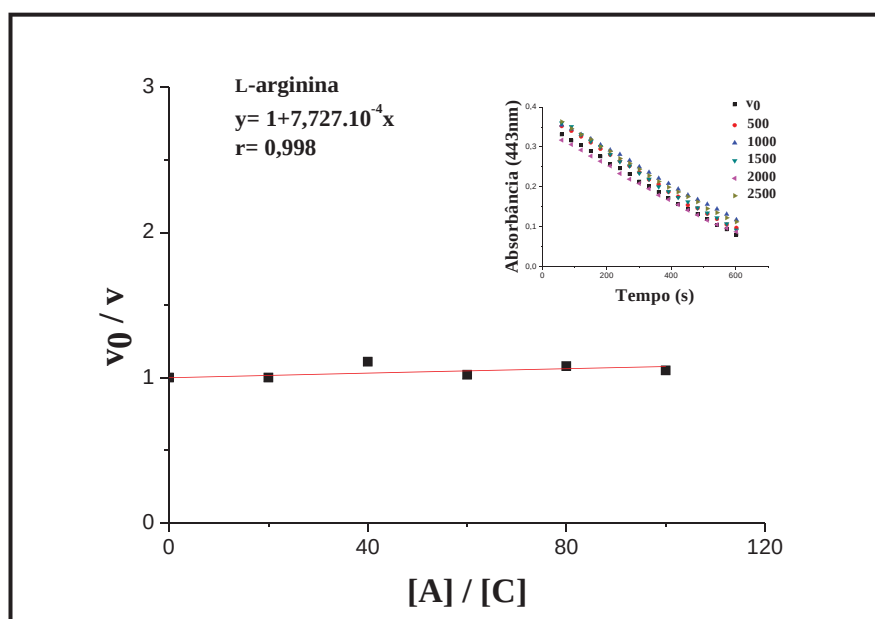


Figura 35: Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com L-arginina. v_0 , velocidade na ausência de Arginina; v , velocidade na presença de L-arginina; $[C]$, concentração de crocina constante (25 $\mu\text{mol/L}$) e $[A]$, concentração de L-arginina. O gráfico inserido representa as absorbâncias a 443 nm, da crocina, na ausência (v_0) e presença (v) de L-arginina ($\mu\text{mol/L}$), em função do tempo.

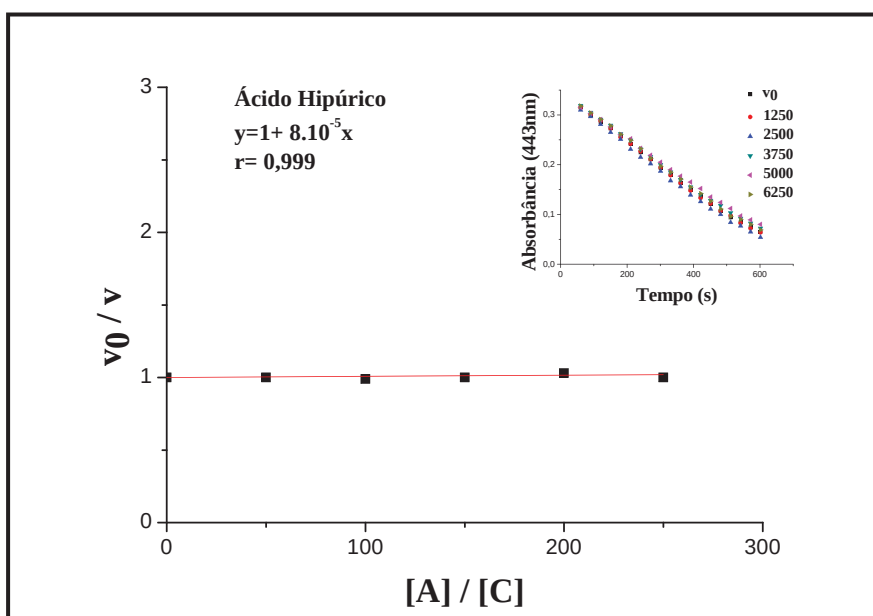


Figura 36: Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com Ácido Hipúrico. V_0 , velocidade na ausência de Ácido Hipúrico; V , velocidade na presença de Ácido Hipúrico; $[C]$, concentração de crocina constante (25 $\mu\text{mol/L}$) e $[A]$, concentração de Ácido Hipúrico. O gráfico inserido representa as absorbâncias a 443 nm, da crocina, na ausência (v_0) e presença (v) de Ácido Hipúrico ($\mu\text{mol/L}$), em função do tempo.

Pode-se observar nas figuras 37 a 40, a análise comparativa de inclinação entre os solutos urêmicos que apresentaram efeito antioxidante e o Trolox. Os solutos urêmicos, exceto Ácido Úrico (Figura 37) possuem inclinação inferior ao Trolox.

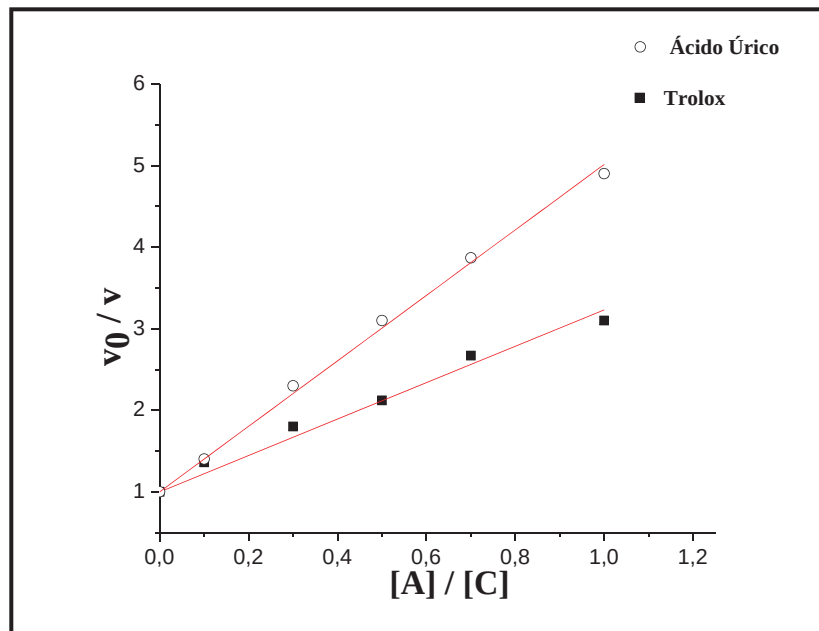


Figura 37: Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com Trolox e Ácido Úrico. v_0 , velocidade na ausência do Trolox ou Ácido Úrico; v , velocidade na presença do Trolox ou Ácido Úrico; $[C]$, concentração de crocina constante ($25 \mu\text{mol/L}$) e $[A]$, concentração do Trolox ou Ácido Úrico.

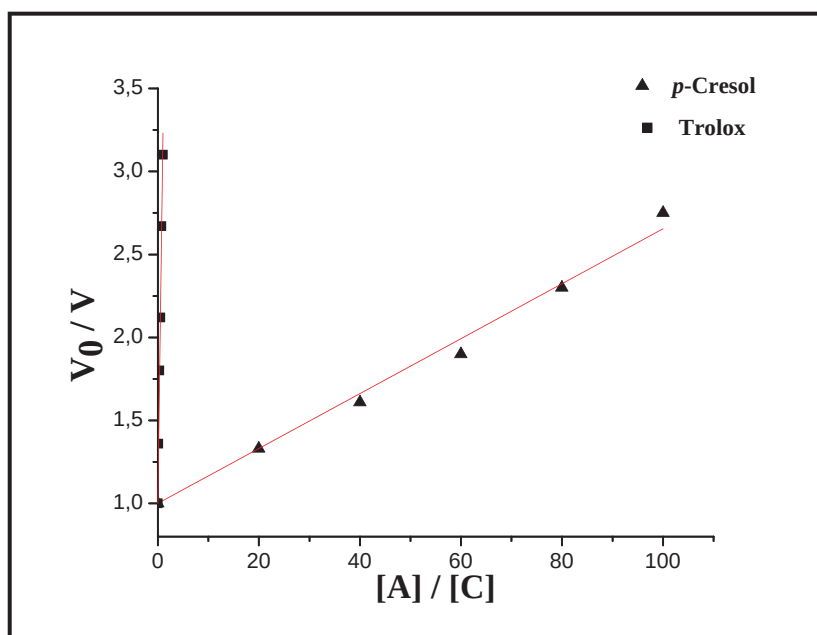


Figura 38: Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com Trolox e *p*-Cresol. v_0 , velocidade na ausência do Trolox ou *p*-Cresol; v , velocidade na presença do Trolox ou *p*-Cresol; $[C]$, concentração de crocina constante ($25 \mu\text{mol/L}$) e $[A]$, concentração do Trolox ou *p*-Cresol.

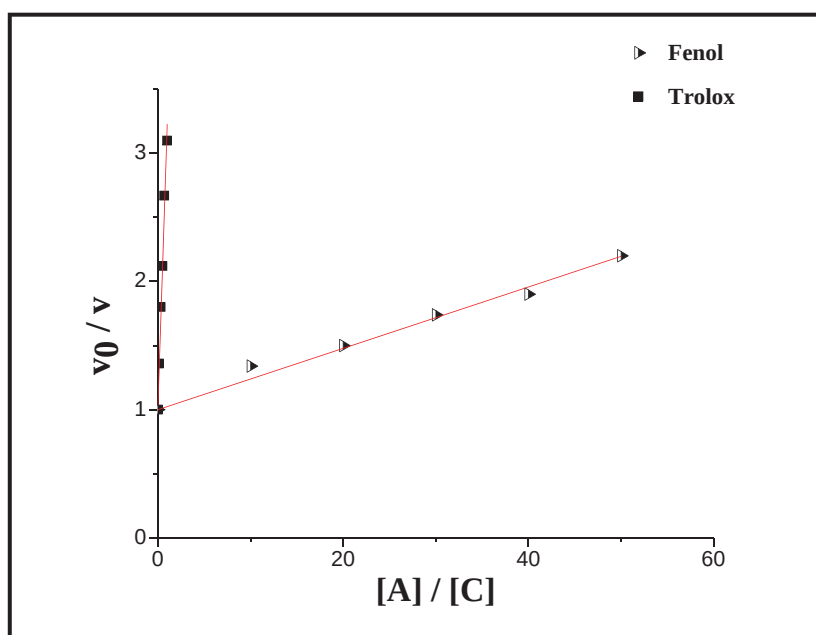


Figura 39: Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com Trolox e Fenol. v_0 , velocidade na ausência do Trolox ou Fenol; v , velocidade na presença do Trolox ou Fenol; $[C]$, concentração de crocina constante ($25 \mu\text{mol/L}$) e $[A]$, concentração do Trolox ou Fenol.

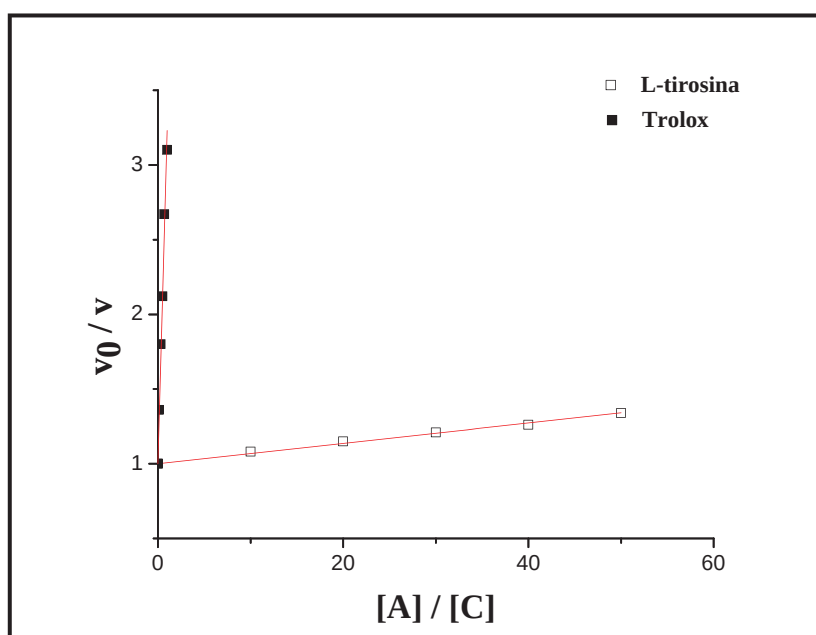


Figura 40: Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com Trolox e L-tirosina. v_0 , velocidade na ausência do Trolox ou L-tirosina; v , velocidade na presença do Trolox ou L-tirosina; $[C]$, concentração de crocina constante ($25 \mu\text{mol/L}$) e $[A]$, concentração do Trolox ou L-tirosina.

De acordo com os dados da Tabela 6, foi calculado o valor de equivalentes de Trolox para cada soluto urêmico (Tabela 7).

Tabela 6: Equação de competição cinética entre solutos urêmicos e trolox (padrão).

Solutos	Equação de Competição Cinética ($y=V_0/V$; $x=[A]/[C]$)	r
Trolox	$y= 1+2,230 x$	0,997
Ácido Úrico	$y= 1+4,015 x$	0,999
p-Cresol	$y= 1+0,016 x$	0,998
L-tirosina	$y= 1+0,007 x$	0,999
Fenol	$y= 1+0,023 x$	0,998
L-Arginina	$y=1+7,727.10^{-4} x$	0,998
Metilguanidina	$y=1+9,272.10^{-4} x$	0,999
Ácido Hipúrico	$y=1+8,000.10^{-5} x$	0,999
Creatinina	$y=1+6,776.10^{-5} x$	0,999
Uréia	$y=1+2,558.10^{-6} x$	0,999

*As análises foram realizadas conforme descrito em Materiais e Métodos, onde $y=v_0/v$; $x=[A]/[C]$. A inclinação da regressão linear indica a capacidade antioxidante relativa da amostra (k_a/k_c).

Tabela 7: Comparação entre as capacidades de captura do radical peroxila em equivalentes ao Trolox.

Solutos	Equivalentes de Trolox*
Trolox	1,000
Ácido Úrico	1,800
Fenol	0,010
p-Cresol	0,007
L-tirosina	0,003
Metilguanidina	$4,158.10^{-4}$
L-Arginina	$3,465.10^{-4}$
Ácido Hipúrico	$3,587.10^{-5}$
Creatinina	$3,038.10^{-5}$
Uréia	$1,147.10^{-6}$

*A equivalência ao Trolox foi obtida pelo quociente, das constantes de velocidade k_a/k_c (solute urêmico/trolox), apresentados na tabela 6.

Pode-se ainda avaliar o ensaio de clareamento da crocina de outra maneira, utilizando o valor de porcentagem de inibição do clareamento da crocina (%In) (LUSSIGNOLI et al., 1999), e assim determinar o valor de IC₅₀. Observa-se que os valores de IC₅₀ encontrados para o Trolox e solutos urêmicos seguem a mesma ordem de eficiência dos valores que foram encontrados para o coeficiente angular obtido na análise de competição para cada soluto, mostrados na tabela 7. Portanto, quanto menor o valor do IC₅₀, mais eficiente é a amostra, enquanto que para a inclinação da regressão linear, quanto maior o valor, mais eficiente é a ação antioxidante (Tabela 8).

Tabela 8: Comparação entre valores de coeficiente angular e IC₅₀, para o ensaio de clareamento da crocina.

Solutos	Inclinação da Regressão Linear *	IC ₅₀ (μmol/L)**
Ácido Úrico	4,015	6,90
Trolox	2,230	10,09
Fenol	0,023	1.125,81
<i>p</i> -Cresol	0,016	1.162,31
L-tirosina	0,007	***
Metilguanidina	9,272.10 ⁻⁴	*****
L-Arginina	7,727.10 ⁻⁴	*****
Ácido Hipúrico	8,000.10 ⁻⁵	*****
Creatinina	6,776.10 ⁻⁵	*****
Uréia	2,558.10 ⁻⁶	*****

*Valores da inclinação da regressão linear, em ordem decrescente de eficiência.

** Valores de IC₅₀, em ordem decrescente de eficiência, obtidos através da equação:

$$\%In = (1 - (\Delta v / \Delta v_0)) \times 100.$$

*** Foi observado até 25% de inibição do clareamento com 1.276,61 μmol/L do soluto.

***** *Nihil*, sem efeito (nas concentrações utilizadas).

Os solutos urêmicos cujos valores de IC₅₀ não constam na tabela 8, foram aqueles que até as concentrações utilizadas, não tiveram atividade antioxidante; portanto não sendo possível atingir 50% de inibição.

De acordo com o IC₅₀ dos solutos urêmicos Ácido Úrico, Fenol e *p*-Cresol (Tabela 8), observa-se que somente o Ácido Úrico apresentou o IC₅₀ em uma concentração menor do que a concentração fisiológica (Tabela 1).

Mediante os resultados do ensaio de clareamento da crocina, apenas o Ácido Úrico, Trolox, Fenol e *p*-Cresol apresentaram efeito antioxidante significativo, e os demais solutos não tiveram o mesmo comportamento. É importante ressaltar que nenhum dos solutos apresentou efeito pró-oxidante, ou seja, acelerou o clareamento da sonda (crocina).

Neste contexto, pode-se considerar que somente o Ácido Úrico apresentou efeito na mesma ordem de grandeza do Trolox, o que se torna importante para os processos de lipoperoxidação *in vivo*, uma vez que apresentou o IC₅₀ inferior à concentração fisiológica e, portanto também na urêmica, e ainda com atividade aproximadamente 2 vezes melhor que o Trolox.

Bianchi et al.(2009) avaliaram, o dano oxidativo dos lipídeos em eritrócitos de pacientes portadores de DRC, por quimiluminescência da LPO iniciada por terc-butil-hidroperóxido (t-BOOH), o qual reage com hemoproteínas oxidadas, gerando radical peroxila. O t-BOOH pode também reagir com Fe²⁺ produzindo radical alcóxila. Os ensaios quimiluminescentes iniciados com t-BOOH são sensíveis e usados para indicar indiretamente a presença de estresse oxidativo, ou seja, a diminuição dos níveis de antioxidantes endógenos (LLESUY et al., 1990; FLECHA; LLESUY; BOVERIS, 1991). Quando comparado os dados da quimiluminescência dos pacientes pré-HD (22,194 ± 1,734 cps/mg Hb) e pós-HD (20,080 ± 1,624 cps/mg Hb), não apresentaram diferenças significativas, mas quando compara-se pacientes renais crônicos pré-HD com indivíduos saudáveis (12,891 ± 398 cps/mg Hb), observa-se diferença significativa, postulando um estado de estresse oxidativo nesses pacientes, embora o mesmo não seja alterado com uma sessão de hemodiálise.

A HD e o estado urêmico descrito no percurso da DRC contribuem para o estresse oxidativo e amplificação da resposta inflamatória, pois a presença de estímulos provoca a produção de citocinas inflamatórias e aumento das ERO. Portanto, a ausência de defesas antioxidantes e sem minimizar as respostas inflamatórias, pode levar a um estado crônico de formação de radicais livres, o que pode ocasionar lesão de proteínas, lipídeos de membrana e DNA, mantendo o estresse oxidativo elevado (WRATTEN et al.,2000; BIANCHI et al., 2009).

Com o ensaio do bleaching da crocina foi possível analisar o efeito antioxidante dos solutos urêmicos individuais, ou seja, o quanto eles impedem que ocorra o processo de LPO, enquanto a quimiluminescência iniciada por t-BOOH mensura o nível de estresse oxidativo, por meio de oxidação de biomoléculas, já presentes.

Existem controvérsias quanto ao papel dos níveis do ácido úrico presentes no organismo, envolvendo doenças cardiovasculares, hipertensão, síndrome metabólica e DRC.

Em estudo realizado por Nieto et al. (2000), com o objetivo de avaliar a capacidade antioxidante total do soro e a presença de antioxidantes no soro de indivíduos que apresentavam carótidas espessas quando comparadas com indivíduos controles, foi possível observar que os indivíduos com presença de aterosclerose tinham níveis significativamente mais altos de capacidade antioxidante no soro, podendo essa diferença ser fortemente explicada pelo aumento da concentração sérica de ácido úrico, que é um indicativo da existência de um mecanismo compensatório encontrado pelo organismo para combater o estresse oxidativo relacionado a aterosclerose.

Estudos realizados com animais hiperuricêmicos mostraram o papel do ácido úrico na progressão da doença renal, associado ao aumento da pressão arterial sistêmica, proteinúria, disfunção renal e doença vascular (KANG; NAKAGAWA, 2005; NAKAGAWA et al., 2003). É sugerido também que a hiperuricemia pode ativar o sistema renina-angiotensina e da ciclo-oxigenase-2 (COX-2) na progressão da doença renal, e o ácido úrico ser considerado um fator de risco independente para a progressão da doença renal (KANG; NAKAGAWA, 2005; HEINIG; JOHNSON, 2006).

A hiperuricemia é também associada com a ativação de plaquetas circulantes, as quais também podem refletir com a disfunção endotelial. Porém, os mecanismos pelos quais o ácido úrico compromete a função endotelial, não são bem conhecidos (JOHNSON et al., 2003).

Um mecanismo proposto para explicar a associação entre o ácido úrico e a doença cardiovascular, é que o ácido úrico pode aumentar a adesividade plaquetária e os cristais de urato podem ser associados com aumento da lise plaquetária. Esse aumento de ácido úrico pode corresponder às consequências das doenças, podendo refletir o envolvimento renal precoce em doenças cardiovasculares, resultando em diminuição do fluxo renal, portanto diminuição da excreção do ácido úrico (EMMERSON, 1979).

Os solutos, Ácido Úrico, *p*-Cresol, Fenol e L-tirosina capturaram significativamente as espécies $ABTS^{\bullet+}$, $HOCl/OCl^-$ e $ROO^{\bullet}$, e, assim, foi de interesse estudar o comportamento da mistura desses solutos, tendo como referência o IC_{50} de cada um deles.

Nesse estudo, apresentado na figura 41 obteve-se os resultados para o IC_{50} (39,85 μ L) da mistura dos solutos frente ao $ABTS^{\bullet+}$ (projetado para 37,5 μ L, vide item 3.3.6).

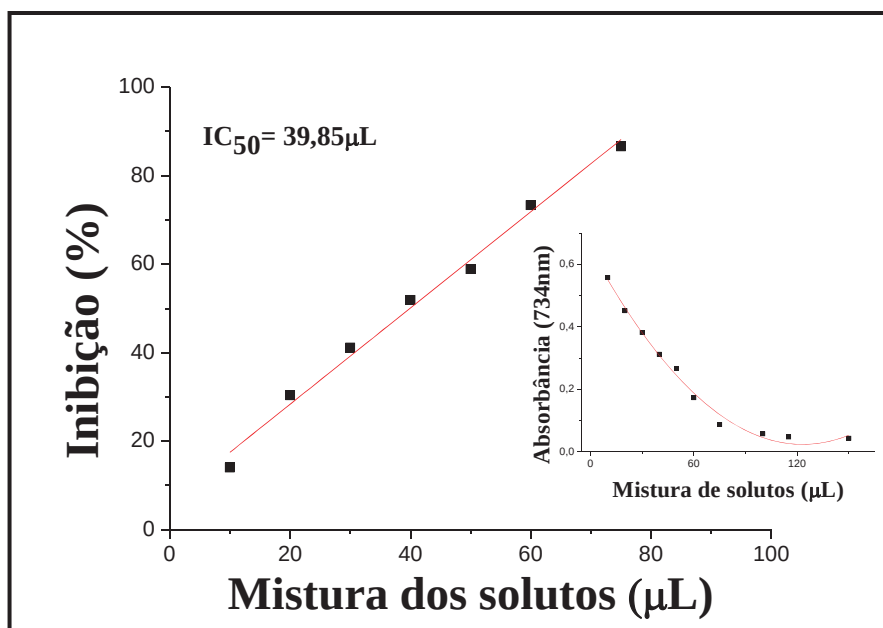


Figura 41: Inibição (captura) do ABTS^{•+} pela mistura dos solutos (Ácido Úrico, *p*- Cresol, Fenol e L-tirosina), em tampão fosfato de sódio 10 mmol/L, pH 7,4. $\lambda = 734$ nm. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do ABTS^{•+} na presença de diferentes concentrações da mistura dos solutos.

Na tabela 9, estão apresentados os quocientes entre as frações de concentração de cada soluto na mistura e seus respectivos IC₅₀ individuais. Observa-se que as concentrações para cada soluto na mistura são de aproximadamente um quarto ($\frac{1}{4}$) dos IC₅₀ individuais para cada soluto, ou seja, com contribuição de aproximadamente 12,5% ($\frac{1}{4}$) para captura de 50% do ABTS^{•+}.

Tabela 9: Capacidade de captura do ABTS^{•+} pela mistura de solutos urêmicos, expressa como a porcentagem de inibição (IC₅₀) e sua relação aos IC₅₀ de cada soluto.

Solutos Urêmicos presentes na mistura	Volume (µL) da mistura de solutos para obtenção do IC ₅₀	Concentração de cada soluto na mistura em µmol/L, para o IC ₅₀	IC ₅₀ dos solutos (individuais), µmol/L	Quociente entre as frações de concentração dos solutos na mistura e os respectivos IC ₅₀ (individuais)
<i>p</i> -Cresol	39,85	1,06	3,99	0,26
L-tirosina		1,39	5,23	0,26
Fenol		3,45	12,98	0,26
Ácido Úrico		4,45	16,75	0,26

Na figura 42, está apresentado o IC_{50} ($41,70\mu L$) da mistura dos solutos frente ao $HOCl/OCl^-$ (projetado para $37,5\mu L$, de forma similar do $ABTS^{\bullet+}$, vide item 3.3.6).

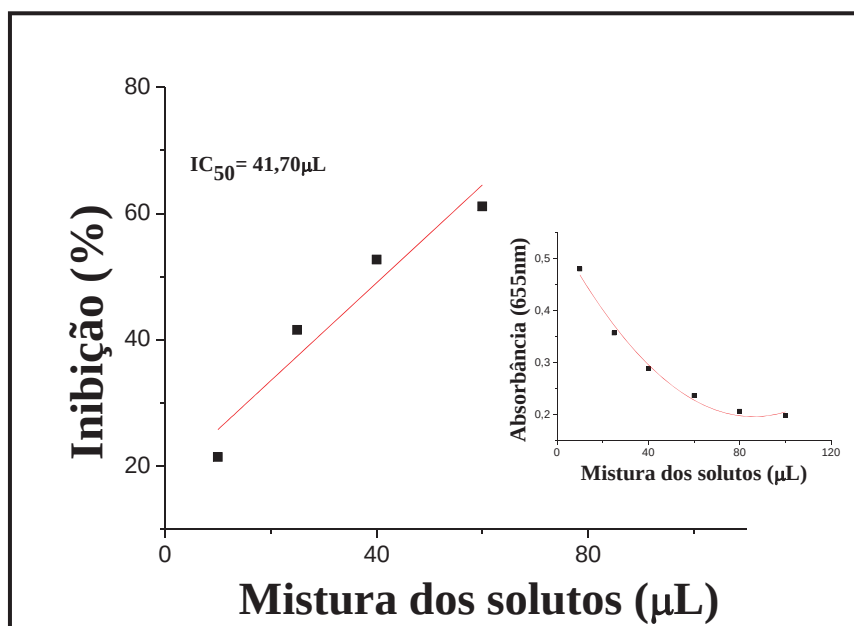


Figura 42: Inibição (captura) do $HOCl/OCl^-$ pela mistura de solutos (Ácido Úrico, *p*-Cresol, Fenol e L-tirosina), em tampão fosfato de sódio 50 mmol/L, pH 7,4. $\lambda = 655\text{ nm}$. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do $HOCl/OCl^-$ na presença de diferentes concentrações da mistura de solutos.

Em relação à captura do $HOCl/OCl^-$, os quocientes entre as frações de concentração de cada soluto na mistura e seus respectivos IC_{50} individuais são mostrados na tabela 10. Portanto, da mesma forma que para o $ABTS^{\bullet+}$ cada soluto contribuiu com aproximadamente 12,5% ($\frac{1}{4}$) para captura de 50% do $HOCl/OCl^-$.

Tabela 10: Capacidade de captura do $HOCl/OCl^-$ pela mistura de solutos urêmicos, expressa como a porcentagem de inibição (IC_{50}) da oxidação do TMB e sua relação aos IC_{50} de cada soluto.

Solutos Urêmicos presentes na mistura	Volume (μL) da mistura de solutos para obtenção do IC_{50}	Concentração de cada soluto na mistura em $\mu mol/L$, para o IC_{50}	IC_{50} dos solutos (individuais), $\mu mol/L$	Quociente entre as frações de concentração dos solutos na mistura e os respectivos IC_{50} (individuais)
L-tirosina	41,70	0,78	2,83	0,27
Ácido Úrico		1,60	5,75	0,27
Fenol		2,50	8,95	0,27
<i>p</i> -Cresol		4,38	15,75	0,27

Na figura 43, está apresentado o IC₅₀ (87,45 µL) da mistura dos solutos frente ao ROO[•], no ensaio do clareamento da crocina (projetado para 50 µL, conforme estratégia apresentada no item 3.3.6).

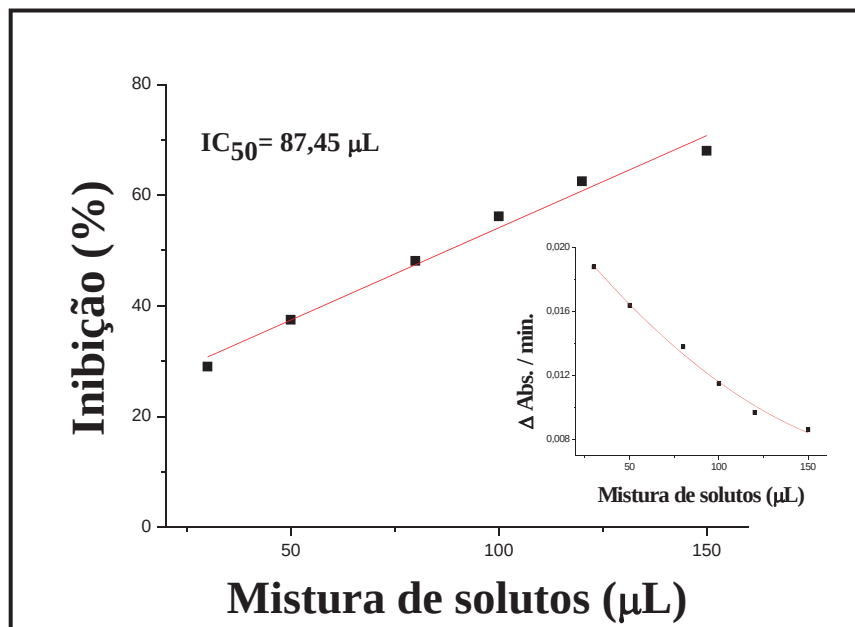


Figura 43: Ensaio do Clareamento da Crocina (IC₅₀) pela mistura de solutos (Ácido Úrico, *p*-Cresol, Fenol e L-tirosina) em tampão fosfato 0,12 mol/L, pH 7,0. $\lambda = 443$ nm.

São apresentados na tabela 11, os quocientes entre as frações de concentração de cada soluto na mistura e seus respectivos IC₅₀ individuais para captura do ROO[•] no ensaio de clareamento da crocina.

Tabela 11: Capacidade de captura do radical peroxila pela mistura de solutos urêmicos, expressa como a porcentagem de inibição (IC₅₀) da velocidade de clareamento da crocina e sua relação ao IC₅₀ de cada soluto.

Solutos Urêmicos presentes na mistura	Volume (µL) da mistura de solutos para obtenção do IC ₅₀	Concentração de cada soluto na mistura em µmol/L, para o IC ₅₀	IC ₅₀ dos solutos (individuais), µmol/L	Quociente entre as frações de concentração dos solutos na mistura e os respectivos IC ₅₀ (individuais)
Ácido Úrico	87,45	3,02	6,90	0,44
Fenol		492,26	1.125,81	0,44
<i>p</i> -Cresol		508,22	1.162,31	0,44
L-tirosina		558,20	1.276,61*	0,44

*Concentração onde foi observada a inibição de 25% do clareamento da crocina (Tabela 8).

Nestes ensaios com mistura de solutos projetou-se a concentração de cada soluto proporcional ao seu IC_{50} , ou seja, para um mesmo volume de mistura (amostra) obtém-se o IC_{50} de cada soluto ou volume menores para frações ou volume maiores para múltiplos, desta concentração (item 3.3.6).

Utilizando a mistura dos 4 solutos: Ácido Úrico, Fenol, *p*-Cresol e L-tirosina nas concentrações programadas, observamos que para o ensaio do $ABTS^{\bullet+}$ e $HOCl/OCl^-$ um efeito aditivo entre os solutos, ou seja, cada soluto na mistura foi responsável por aproximadamente 12,5% ($\frac{1}{4}$) da resposta observada, conforme o volume utilizado para obtenção do IC_{50} da mistura.

No caso do ensaio de clareamento da crocina, onde é monitorada a velocidade de clareamento, observa-se para o IC_{50} da mistura um volume maior do que o projetado para um efeito aditivo com o mesmo referencial, ou seja, o IC_{50} de cada soluto.

Contudo, é necessário considerar que no ensaio de clareamento da crocina não é possível à referência do IC_{50} para a L-tirosina, onde observa-se apenas 25% de inibição na concentração utilizada (Figura 31, Tabela 8), o que torna complexa a interpretação destes dados.

5. Conclusão

Os solutos urêmicos com maior eficiência antioxidante sobre as espécies $\text{ABTS}^{\bullet+}$, HOCl/OCl^- e $\text{ROO}^\bullet$ (*bleaching* da crocina) foram: Ácido Úrico, *p*-Cresol, Fenol e L-tirosina, embora com ordens de eficiência diferentes para cada espécie reativa.

Para esses solutos, pode-se ainda concluir que:

- i) para o HOCl/OCl^- e $\text{ROO}^\bullet$, os IC_{50} encontrados podem ser considerados de relevância biológica, pois se encontram abaixo das concentrações fisiológicas, e podem assim contribuir para prevenção do estresse oxidativo.
- ii) a eficiência antioxidante da mistura dos 4 solutos e para a captura do $\text{ABTS}^{\bullet+}$ e HOCl/OCl^- , observa-se efeito aditivo e praticamente exato. Para o ensaio do *bleaching* da crocina ($\text{ROO}^\bullet$), onde ocorre uma competição entre os solutos e a sonda pelo $\text{ROO}^\bullet$, observa-se sinergismo, mas não exatamente aditivo.

Para o $\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 , ERO de extrema relevância no estresse oxidativo, não houve captura pelos solutos analisados.

Esses resultados analisados em conjunto com os relatos da literatura sobre o estresse oxidativo em pacientes com DRC e sob tratamento hemodialítico, permitem inferir que a capacidade de captura das ERO não são o suficiente para impedir o estresse oxidativo, o que torna relevante a ausência de atividade frente ao $\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 .

6. Referências Bibliográficas

ABDALLA, D.S.P.; SENA, K.C.M. Biomarcadores de peroxidação lipídica na aterosclerose. **Rev Nutr**, v.21, p.749-756,2008.

AK,T.; GÜLÇİN, I. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. **Chem Biol Interact**, v.174, p. 27–37, 2008.

ÁLVAREZ-LARIO, B.; MACARRÓN-VICENTE, J. Uric acid and evolution. **Rheumatology**, v.49, p.2010-2015, 2010.

ALVES, C.Q.; DAVID, J.M.; BAHIA, M.V.; AGUIAR, R.V. Métodos para a determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Quím Nova**, v.33, n.10, p.2202-2210, 2010.

ARAÚJO, J.M.A. **Química dos alimentos: teoria e prática**. 4 ed. Ed. UFV. Viçosa, MG, 2008.

BABIOR, BM. The respiratory burst of phagocytes. **J Clin Invest**, v. 73, p.599- 601, 1984.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quím Nova**, v. 29, n. 1, p.113-123, 2006

BAUMGARTEM, M.C.; DIPP, T.; SILVA, V.G.; GIACOMAZZI, C.M.; SEGATTO, K.; PEREIRA, G. A.; GOLDANI, J.C.; PLENTZ, R.D.M. Percepção subjetiva e desempenho físico de pacientes com doença renal crônica em hemodiálise. **Rev Acta Brasileira do Movimento Humano**, v.2, n.1, p. 5-14, 2012.

BERTONCELLO, I. Influência do tipo de membrana de hemodiálise e da sua reutilização nos marcadores de estresse oxidativo. 2007. 68f. **Dissertação (Mestrado em Bioquímica Toxicológica)- Universidade Federal de Santa Maria (UFMS-RS)**, 2007.

BIANCHI, P. D. Avaliação da função pulmonar e estresse oxidativo em pacientes com insuficiência renal crônica em hemodiálise. 2003. 125f. **Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas-Fisiologia) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Departamento de Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, 2003.

BIANCHI, P.D.; BARP, J; THOMÉ, F.S.; BELLÓ-KLEIN, A. Efeito de uma sessão de hemodiálise sobre o estresse oxidativo sistêmico de pacientes renais crônicos terminais. **J Bras Nefrol**, v.31, n. 3, p. 175-182, 2009.

BORS, W.; MICHAEL, C.; SARAN, M. Inhibition of the bleaching of the carotenoid crocin a rapid test for quantifying antioxidant activity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 796, p.312-319, 1984.

BRESTEL, E. P. Co-oxidation of luminol and hydrogen peroxide. Implications for neutrophil chemiluminescence. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 126, p. 482-488, 1985.

BUDAVARI, S.; O'NEIL, M.J.; SMITH, A.; HECKELMAN, P.E. **THE MERCK INDEX (an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals)**.14^a ed. Whitehouse Station, NJ, USA: MERCK & CO.,INC, 2006.

- CADENAS, E. Biochemistry of oxygen toxicity. **Ann Rev Biochem**, v. 58, p. 79-110, 1989.
- CADENAS, E.; DAVIES, K.J. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. **Free Radic Biol Med**, v.29, p.222-230, 2000.
- CHEN, T.; LIOU, S.; CHANG, Y. Chemiluminescent Analysis of Plasma Antioxidant Capacity in Uremic Patients Undergoing Hemodialysis. **Ren Fail**, v.30, p. 843- 847, 2008.
- CHING, T.; JONG, J.; BAST, A. A method for screening hypochlorous acid scavengers by inhibition of the oxidation of 5-thio-2-nitrobenzoic acid: application to antiasthmatic drugs. **Anal Biochem**, v. 218, p. 377-381, 1994.
- CHUNG, Y.; WANG, H.; EL-SHAZLY, M.; LEU, Y.; CHENG, M.; LEE, C.; CHANG, F.; WU, Y. Antioxidant and Tyrosinase Inhibitory Constituents from a Desugared Sugar Cane Extract, a Byproduct of Sugar Production. **J Agric Food Chem**, v.59, p. 9219–9225, 2011.
- CLERMONT, G.; LECOUR, S.; LAHET, J.J.; SIOHAN, P.; VERGELY, C.; CHEVET, D.; RIFLE, G.; ROCHETTE, L. Alteration in plasma antioxidant capacities in chronic renal failure and hemodialysis patients: a possible explanation for the increased cardiovascular risk in these patients. **Cardiovasc Res**, v. 47, p. 618-623, 2000.
- DELANEY, M.P.; CHRISTOPHER, P.P.; NEWMAN, D.J.; LAMB, E. Kidney Disease. In: Burtis, C.A.; Ashwood, E.R.; Bruns, D.E. **Tietz textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics**. 4 ed., St. Louis: Elsevier Saunders. cap.45, p.1671-1745, 2006.
- DIAZ, J.; SERRANO, E.; ACOSTA, F.; CARBONELL, L.F. References intervals for four biochemistry analytes in plasma for evaluating oxidase stress and lipid peroxidation in human plasma. **Clin Chem**, v.44, p. 2215-2217, 1998.
- DINIZ, J.S.S. Insuficiência renal crônica na criança: Relato de uma experiência no HC/UFGM. **Revista Médica de Minas Gerais**, v.3, p. 127-133, 1993.
- DURACKOVÁ, Z. Some current insights into oxidative stress. **Physiol Res**, v. 59, p. 459-469, 2010.
- EKSBOG, S.; PERSSON, B. A.; ALLGEN, L. G.; BERGSTROM, J.; ZIMMERMAN, L.; FURST, P. A Seletive Method for Determination of Methyl-guanidine in Biological Fluids. Its Application in Normal Subjects and Uremic Patients. **Clin Chim Acta**, v. 82, p. 141-150, 1978.
- EMMERSON, B.T. Atherosclerosis and urate metabolism. **Aust N Z J Med**, v.9, p. 451–4, 1979.
- ENDORGAN, C.; ÜNLÜÇERÇİ, Y; TÜRKMEN, A. The evaluation of oxidative stress in patients with chronic renal failure. **Clin Chim Acta**, v. 322, p.157-61, 2002.
- FARREL, P. C.; GOTCH, F. A.; PETERS, J. H.; BERRIDGE, B. J. Binding of hippurate in normal plasma and in uremic plasma pre - and post – dialysis. **Nephron**, v. 20, p. 40, 1978.

FERREIRA, A.L.; MATSUBARA, L.S. Free radicals: concepts, diseases, defense system and oxidative stress. **Rev Assoc Méd Bras**, v.43, p.61-68, 1997.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, p. 239-247, 2000

FLECHA, B.G.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. **Free Radic Biol Med**, v.10, p. 93-100, 1991.

GALLE, J. Oxidative stress in chronic renal failure. **Nephrol Dial Transplant**, v.16, p.2135-2137, 2001.

GLASSER, S.P.; SELWYN, A.P.; GANZ, P. Atherosclerosis: risk factors and the vascular endothelium. **Am Heart J**, v.131(2), p. 379-84, 1996.

GÜLÇİN, I. Comparison of in vitro antioxidant and antiradical activities of L- tyrosine and L-Dopa. **Amino Acids**, v. 32, p. 431–438, 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol**, New York, v. 186 (part B), p. 1-85, 1990.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.C. **Free radical in biology and medicine**. 3rd ed. Oxford, New York, 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4thed; New York, Oxford, 2010.

HAMPTON, M. B.; KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. Inside the neutrophils phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. **Blood**, v. 92, p. 3007-3017, 1998.

HAZRA, B.; BISWAS, S.; MANDAL, N. Antioxidant and free radical scavenging activity of *Spondias pinnata*. **BMC Complement Altern Med**, v.8, n.63, p.1-10, 2008.

HEINING, M.; JOHNSON, R.J. Role of uric acid in hypertension, renal disease, and metabolic syndrome. **Cleve Clin J Med**, v.73, p. 1059-1064, 2006.

HINK, H.U.; SANTANAM, N. DIKALOV, S.; McCANN, L.; NGUYEN, A.D.; PARTHASARATHY, S. HARRISON, D.G.; FUKAI, T. Peroxidase Properties of Extracellular Superoxide Dismutase Role of Uric Acid in Modulating In Vivo Activity. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 22, p.1402-1408, 2002.

HIRAYAMA, A.; NORONHA-DUTRA, A.A.; GORDGE, M.P. Inhibition of neutrophil superoxide production by uremic concentrations of guanidine compounds. **J Am Soc Nephrol**, v.11, p.684-689, 2000.

HUANG, Z.; LIANG, C.; HAN, S. Vitamin E ameliorates ox-LDL-induced foam cells formation through modulating the activities of oxidative stress-induced NF- κ B pathway. **Mol Cell Biochem**, v. 363, p.11-19, 2012.

JOFRE, R.; LÓPEZ-GÓMEZ, J.M.; VALDERRÁBANO, F. Quality of life for patient groups. **Kidney Int**, v.57, p. 121-130, 2000.

JOHNSON, R.J.; KANG, D.; FEIG, D.; KIVLIGHN, S.; WATANABE, S.; TUTTLE, K.R.; RODRIGUEZ-ITURBE; HERRERA-ACOSTA, J.; MAZZALI, M. Is there a pathogenetic role for uric acid in hypertension and cardiovascular and renal disease? **Hypertension**, v.41, p. 1183-1190, 2003.

JOHNSTONE, M.T.; CREAGER, S.J.; SCALES, K.M.; CUSCO, J.A.; LEE, B.K.; CREAGER, M.A. Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. **Circulation**, v. 88(6), p. 2510-6, 1993.

KAKKAR, P.; DAS, B.; VISWANATHAN, P. N. A modified spectrophotometric assay of superoxide dismutase. **J Biochem and Biophys**, v. 21, p. 130-132, 1984.

KHALIL, N.M.; PEPATO, M.T.; BRUNETTI, I.L. Free Radical Scavenging Profile and Myeloperoxidase Inhibition of Extracts from Antidiabetic Plants: *Bauhinia forficata* and *Cissus sicyoides*. **Biol Res**, v.41, p.165-171, 2008.

KADKHODAEI, M.; HEMMATI, M.; ZAHMATKESH, M.; GHAZNAVI, R.; MIRERSHADI, F.; MAHDAVI-MAZDE, M.; SEIFI, B. Assessment of plasma antioxidant status in hemodialysis patients. **Therapeutic Apheresis and Dialysis**, v.12, p.147-151, 2008.

KANG, D.; NAKAGAWA, T.; FENG, L.; WATANABE, S.; HAN, L. MAZZALI, M.; TRUONG, L.; HARRIS, R.; JOHNSON, R.J. A Role for Uric Acid in the Progression of Renal Disease. **J Am Soc Nephrol**, v. 13, p. 2888-2897, 2002.

KANG, D.H.; NAKAGAWA, T. Uric acid and chronic renal disease: possible implication of hyperuricemia on progression of renal disease. **Semin Nephrol**, v.25, p.43-49, 2005.

KEANEY, J.F.Jr.; LOSCALZO, J. Diabetes, oxidative stress, and platelet activation. **Circulation**, v. 99(2), p.189-91, 1999.

LANDINO, L.M.; MALL, C.B.; NICKLAY, J.J.; DUTCHER, S.K.; MOYNIHAN, K.L. Oxidation of 5-thio-2-nitrobenzoic acid, by the biologically-relevant oxidants peroxynitrite anion, hydrogen peroxide and hypochlorous acid. **Nitric Oxide**, v.18, p.11-18, 2008.

LEE, D.M.; JACKSON, K.W.; KNOWLTON, N.; WAGES, J.; ALAUPOVIC, P.; SAMUELSSON, O.; SAEED, A.; CENTOLA, M.; ATTMAN, P. Oxidative Stress and Inflammation in Renal Patients and Healthy Subjects. **PLoS ONE**, v.6, p.1-10, 2011.

LESAFFER, G.; DE SMET, R.; LAMEIRE, N. DHONDT, A.; DUYM, P.; VANHOLDER, R.; Intradialytic removal of protein-bound uraemic toxins: role of solute characteristics and of dialyser membrane. **Nephrol Dial Transplant**, v. 15, p. 50-57, 2000.

LLESUY, S.F.; MILEI, J.; FLECHA, B.S.G.; BOVERIS, A. Myocardial damage induced by doxorubicins: hydroperoxide-initiated chemiluminescence and morphology. **Free Radic Biol Med**, v.8, p. 259-264, 1990.

LOCATELLI, F.; CANAUD, B.; ECKARDT, K.U.; STENVINKEL, P.; WANNER, C.; ZOCALLI, C. Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome. **Nephrol Dial Transplant**, v.18, p.1272-1280, 2003.

LÚCIO, M.; NUNES, C.; GASPAR, D.; FERREIRA, H.; LIMA, J.L.F.C.; REIS, S. Antioxidant Activity of Vitamin E and Trolox: Understanding of the Factors that Govern Lipid Peroxidation Studies In Vitro. **Food Biophys**, v. 4, p. 312–320, 2009.

LUSSIGNOLI, S.; FRACCAROLI, M.; ANDRIOLI, G.; BROCCO, G.; BELLAVITE, P. A microplate based colorimetric assay of the total peroxyl radical trapping capability of human plasma. **Anal Biochem**, v. 269, p. 38-44, 1999.

MACNAMARA, P.J.; LALKA, D.; GIBALDI, M. Endogenous Accumulation Products and Serum Protein Binding in Uremia. **J Lab Clin Med**, v. 98, p.730-740, 1981.

MATSUMOTO, M.; KISHIKAWA, H.; MORI, A. Guanidino compounds in the sera of uremic patients and in the sera and brain of experimental uremic rabbits. **Biochem Med**, v. 16, n.1, 1976.

MAYER, B.; ZITTA, S.; GREILBERGER, J.; HOLZER, H.; REIBNERGGER, G.; HERMETTER, A.; OETTL, K. Effect of hemodialysis on the antioxidative properties of serum. **Bioch Biophys Acta**, v.1638, p. 267– 272, 2003.

MEIJERS, B. K.I.; BAMMENS, B.; VERBEKE, K.; EVENEPOEL, P. A Review of Albumin Binding in CKD. **Am J Kidney Dis**, v. 51, p. 839-850, 2008.

MENEGHINI, R.A. A toxicidade do oxigênio. **Ciência Hoje**, v. 5, p.57-63, 1987.

MELLO, L.D.; KUBOTA, L.T. Biosensors as a tool for the antioxidant status evaluation, **Talanta**, v.72, p. 335–348, 2007.

MIYAMOTO, Y.; IWAO, Y.; TASAKI, Y.; SATO, K.; ISHIMA, Y.; WATANABE, H.; KADOWAKI, D.; MARUYAMA, T.; OTAGIRI, M. The uremic solute indoxyl sulfate acts as an antioxidant against superoxide anion radicals under normal-physiological conditions. **FEBS Letters**, v. 584, p.2816–2820, 2010.

MONTESA, M.J.P.; RICO, M.A.G.; SALGUERO, M.A.S.; MAICAS, I.T.; MUÑOZ, M.C.T.; TORMO, G.S.; GARCÍA, I.J.; CARRASCO, A.M. Estudio del estrés oxidativo en enfermedad renal avanzada. **Nefrología**, v. 29, p. 464-473, 2009.

NAKAGAWA, T.; MAZZALI, M.; KANG, D.H.; KANELIS, J.; WATANABE, S.; SANCHEZ-LOZADA, L.G.; RODRIGUEZ-ITURBE, B.; HERRERA-ACOSTA, J.; JOHNSON, R.J. Hyperuricemia causes glomerular hypertrophy in the rat. **Am J Nephrol**, v.23, p.2-7, 2003.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed, cap.19 e 22, 707-721, 2011.

NGUYEN-KHOA, T.; MASSY, Z.A.; BANDT, J.P.; KEBEDE, M.; SALAMA, L.; LAMBREY, G.; WITKO-SARSAT, V.; DRÜEKE, T.B.; LACOUR, B.; THÉVENIN, M.

Oxidative stress and haemodialysis: role of inflammation and duration of dialysis treatment. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.16, p.335-340, 2001.

NIETO, F. J.; IRIBARREN, C.; GROSS, M.D.; COMSTOCK, G.W.; CUTLER, R.G. Uric acid and serum antioxidant capacity: a reaction to atherosclerosis? **Atherosclerosis**, v. 148, p. 131–139, 2000.

NISSENSON, A.R.; FINE, R.N. Clinical Dialysis. 4 ed. Philadelphia: Hanley & Belfus, 2002.

NIWA, T.; MAEDA, K.; OHKI T.; SAITO, A.; KOBAYASHI, K. A Gas Chromatographic-mass Spectrometric Analysis for Phenolin Uremis Serum. **Clin Chim Acta**, v. 110, p. 51-57, 1981.

NIKI, E.; YOSHIDA, Y.; SAITO, Y.; NOGUCHI, N.; Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. **Biochem Biol Res Commun**, v. 338, p. 668-676, 2005.

NIKI, E. Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and vivo. **Free Radic Biol Med**, v.49, p. 503-515, 2010.

OBERMAYR, R.P.; TEMML, C.; GUTJAHR, G.; KNECHTELSDORFER, R.O.; KLAUSER-BRAUN, R. Elevated Uric Acid Increases the Risk for Kidney Disease. **J Am Soc Nephrol**, v.19, p.2407–2413, 2008.

ORDOUDI, S. A.; TSIMIDOU, M. Z.; Crocin Bleaching Assay (CBA) in Structure-Radical Scavenging Activity Studies of Selected Phenolic Compounds. **J Agric Food Chem**, v. 54, p. 9347-9356, 2006.

OTTONELLO, L.; PAOLA, G.; BERTOLOTTO, M. Leptin as uremic toxin interferes with neutrophil chemotaxis. **J Am Soc Nephrol**, v.15, p.2366-2372, 2004.

PAINTER, P.C.; COPE, J.Y.; SMITH, J.L. Apêndice, In: Burtis, C. A .; Ashwoode, E. R. **Tietz Fundamentos de Química Clínica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., p. 748-810, 1998.

PELLEGRINI, N.; RE, R.; YANG, M.; EVANS, C. R. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-azinobis(3-ethylenebenzothiazoline-6 sulfonic acid radical cation decolorization assay. **Methods Enzymol**, vol. 299, p. 379-389, 1999.

PIRODDI, M.; DEPUNZIO, I.; CALABRESE, V.; MANCUSO, C.; AISA, A.M.; BINAGLIA, L.; MINELLI, A.; BUTTERFIELD, A.D.; GALLI, F. Oxidatively-modified and glycated proteins as candidate pro-inflammatory toxins in uremia and dialysis patients. **Amino Acids**, v. 32, p. 573-592, 2007.

PRABHU P, R.; HEGDE, K.; SHABARAYA, A.R.; RAO, M. N. A. Scavenging potential of reactive oxygen species by Tetra-hydrocurcumin. **J Applied Pharmaceutical Science**, v.1, n.5, p.114-118, 2011.

PUGLIESE, G.; SOLINI, A.; BONORAC, E.; ORSID, E.; ZERBINIE, G.; GIORGINOF, F.; CAVALOTG, F.; PONTIROLI, A.E.; BARONII, M.G.; MORANOJ, S.; NICOLUCCIK, A.;

PENNOL, G. The Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) equation provides a better definition of cardiovascular burden associated with CKD than the Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) Study formula in subjects with type 2 diabetes. **Atherosclerosis**, v. 218, p.194-199, 2011.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radic Biol Med**, v. 26, n. 9/10, p. 1231–1237, 1999.

RICO, M.G. ; PUCHADES, M.J.; RAMÓM, R.G.; SÁEZ, G.; TORMOS, M. C.; MIGUEL, A. Efecto del tratamiento con hemodiálisis sobre el estrés oxidativo en pacientes com insuficiencia renal crônica. **Nefrología**, v. 26, n. 2, p. 218-225, 2006.

RODRIGUES, A.P. Oxidação de compostos β -dicarbonílicos por peroxidase. 2007. 141 f. **Tese (Doutorado em Análises Clínicas) – Universidade Estadual Paulista- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara**, 2007.

ROMÃO JÚNIOR, J.E. Doença renal crônica: definição, epidemiologia e classificação. **J Bras Nefrol**, v.26, Sl 1, p.1-3, 2004.

RONCO, C.; LEVIN, N.W. End-stage renal disease: a slowly progressive systemic inflammatory response syndrome. **Contrib Nephrol**, p. 379-385, 2002.

RYSZ, J.; BANACH, M.; CIALKOWSKA-RYSZ; STOLAREK, R.; BARYISKI, M.; DROZDZ, J.; OKONSKI, P. Blood Serum Levels of IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α and IL-1 β in Patients on Maintenance Hemodialysis. **Cell Mol Immunol**, v. 3, n.2, 2006.

SALISBURY, P. F.; DUNN, M. S.; MURPHY, E. A . Apparent free aminoacids in deproteinized plasma of normal and uremic persons. **J Clin Invest**, v. 36, p. 1227, 1957.

SCHEPERS,E.; MEERT, N.; GLORIEUX, G. P-cresylsulphate, the main *in vivo* of p-cresol, activates leucocyte free radical production. **Nephrol Dial Transplant**, v.22, p.592-596, 2007.

SCHIFFRIN, E.L.; LIPMAN, M.L.; MANN, J.F.E. Chronic Kidney Disease : Effects on the Cardiovascular System. **Circulation**, v.116, p.85-97, 2007.

SCHNEIDER, C.D.; OLIVEIRA, A.R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Rev Bras Med Esporte**, v.10, n. 4, 2004.

SCHOOTS, A.C.; PEETERS, J.A.G.; GERLAG, P.G.G. Effect of Hemodialysis on Serum Concentration of HPLC-analyzed Accumulating Solutes in Uremia. **Nephron**, v. 53, p. 208-217, 1989.

SHAHBAZIAN, H.; MOGHADAM, A.Z.; EHSANPOUR, A.; KHAZAALI, M. Changes in plasma concentrations of hypoxanthine and uric acid before and after hemodialysis. **Iranian J Kidney Dis**, v.3, p.151-155, 2009.

SIMENHOFF, M. L.; ASATOOR, A. M.; MILNE, M. D.; ZILVA, J. F. Retention of aliphatic amines in uraemia. **Clin Sci**, v. 25, p. 65, 1963.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. Disponível em: <http://www.sbn.org.br>. Acesso em: 15 de maio. 2010.

SÖDERHOLM, P.P.; ALFTHAN, G.; TIKKANEN, M.J. Rye bread intake improves oxidation resistance of LDL in healthy humans. **Atherosclerosis**, v. 221, p.583-586, 2012.

SPERTINI, O.; LUSCINSKAS, F.W.; KANSAS, G.S.; MUNRO, J.M.; GRIFFIN, J.D.; GIMBRONE JR, M.A.; TEDDER, T.F. Leukocyte adhesion molecule-1 (LAM-1, L-selectin) interacts with a inducible endothelial cell ligando to support leucocyte adhesion. **J Immunol**, v.147, p.2565, 1991.

SROKA, Z.; CISOWSKI, W. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radicalactivity of some phenolic acids. **Food Chem Toxicol**, v. 41, p. 753– 758, 2003.

STEINBERG, M.J.; KLAN, A.U.; KARNOVSKY, M.J. Intracellular singlete oxygen generation by phagocytosing neutrophils in response to particles coated with a chemical trap. **J Biol Chem**, v. 267, p. 13425-13432, 1992.

STEINBERG, D. The LDL modification hypothesis of atherogenesis: an update. **J Lipid Res**, v. 50, p. 376-381, 2009.

STEINBERG, D.; WITZTUM, J.L. History of Discovery Oxidized Low-Density Lipoprotein and Atherosclerosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.30, p 2311-2316, 2010.

SULIMAN, M.E.; STENVINKEL, P. Contribution of inflammation to vascular disease in chronic kidney disease patients. **Saudi J Kidney Dis Transpl**, v.19, p. 329-345, 2008.

TADDEI, S.; VIRDIS, A.; MATTEI, P. GHIADONI, L.; FASOLO, C.B.; SUDANO, I.; SALVETTI, A. Hypertension causes premature aging of endotelial function in humans. **Hypertension**, v.29(3), p.736-43, 1997.

THOMÉ, F.S.; SENGER, M.; GARCEZ, J.; CHEMELLO, C.; MANFRO, R.C. Dialysis water treated by reverse osmosis decreases the levels of C-reactive protein in uremic patients. **Braz J Med Biol Res**, v. 38(5), p. 789-794, 2005.

TUBARO, F. ;GHISELLI, A.; RAPUZZI, P.; MAIORINO, M.; URSINI, F. Analysis of plasma antioxidant capacity by competition kinetics. **Free Radic Biol Med**, v. 24, n. 7/8, p. 1228–1234, 1998.

VALKO, M.; RHODES, C.J.; MONCOL, J.; IZACOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem Biol Interact**, v. 160, p. 1-40, 2006.

VANHOLDER, R.; HOENICH, N.; RINGOIR, S. Adequacy Studies of Fistula Single-needle Dialysis. **Am J Kidney Dis**, v. 10, p. 417-426, 1987.

VANHOLDER, R.C.; DeSMET, R.V.; RINGOIR, S.M. Assesment of Urea and Other Uremic Markers for Quantification of Dialysis Efficacy. **Clin Chem**, v. 38, p. 1429-1436, 1992.

VANHOLDER, R.; DE SMET, R.; GLORIEUX, G.; ARGILES, A.; BAURMEISTER, U.; BRUNET, P.; CLARK, W.; COHEN, G.; DE DEYN, P.P.; DEPPISCH, R.; DESCAMPS-LATSCHA, B.; HENLE, T.; JORRES, A.; LEMKE, H.D.; MASSY, Z.A.; PASSLICK-DEETJEN, J.; RODRIGUES, M.; STEGMAYR, B.; STENVINKEL, P.; TETTA, C.; WANNER, C.; ZIDEK, W. Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability. **Kidney International**, v. 63, p. 1934–1943, 2003.

VANHOLDER, R.; SCHEPERS, E.; MEERT, N.; LAMEIRE, N. What Is Uremia? Retention versus Oxidation. **Blood Purification**, v.24, n.1, p.33-38, 2006.

VANHOLDER, R.; VAN LAECKE, S.; GLORIEUX, G. What is new in uremic toxicity? **Pediatr Nephrol**, v.23, n.8, p.1211-1221, 2008.

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M.S.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim Nova**, v.30, n.5, p.1323-1338, 2007.

VELLOSA, J.C.R.; KHALIL, N.M.; GUTIERRES, V.O.; SANTOS, V.A.F.F.M.; FURLAN, M.; BRUNETTI, I.L.B.; OLIVEIRA, O.M.M.F. *Salacia campestris* root bark extract: peroxidase inhibition, antioxidant and antiradical profile. **Braz J Pharma Sci**, v. 45, p. 99-107, 2009.

VIANNA, H.R.; SOARES, S.M.B.M.; TAVARES, M.S.; TEIXEIRA, M.M.; SILVA, A.C.S. Inflamação na doença renal crônica: papel de citocinas. **J Bras Nefrol**, v. 33, p. 351-364, 2011.

ZALBA, G.; FORTUÑO, A.; DÍEZ, J. Oxidative stress and atherosclerosis in early chronic kidney disease. **Nephrol Dial Transplant**, v. 21, p. 2686–2690, 2006.

ZGLICZYNSKI, T. J. M.; STELMASZYNSKA, T.; DOMANSKA, J.; OSTROWISKI, W. Chloramines as intermediates of oxidation reaction of amino acids by myeloperoxidase. **Biochim Biophys Acta**, vol. 235, p. 419-424, 1971.

ZUURBIER, K. W.; VAN DEN BERG, J. D.; VAN GELDER, B. F.; MUIJSERS, A. O. Human Hemi-myeloperoxidase. Initial chlorinating activity at neutral pH, compound II and III formation, and stability towards hypochlorous acid and high temperature. **European J Biochem**, v.205, p.737-742, 1992.

WARD, R. A.; McLEISH, K. R. Oxidative stress in Hemodialysis Patients: What are the Determining Factors? **Artif Organs**, v. 27, n.3, p. 230-236, 2003.

WENGLE, B.; HELLSTROM, K. Volatile Phenols in Serum of Uremic Patients. **Clin Sci**, v. 43, p. 493-498, 1972.

WINTERBOURN, C. C.; KETTLE, A. J.; Assays for the Chlorination activity of myeloperoxidase. **Methods Enzymol**, vol.233, p.502-512, 1994.

WINTERBOURN, C.C.; VISSERS, M.; KETTLE, A. Myeloperoxidase. **Current Opinion in Hematology**, v.7, p.53-58, 2000.

WOLIN, M.S. Interactions of oxidants with vascular signaling systems. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 20 (6), p. 1430-42, 2000.

WRATTEN, M.L.; TETTA, C.; URSINI, F.; SEVANIAN, A. Oxidation stress in hemodialysis: prevention and treatment strategies. **Kidney Int**, v. 58, s. 76, p. 126-132, 2000.

YAO, Q; PECOITS-FILHO, R.; LINDHOLM, B.; STENVINKEL, P. Traditional and non-traditional risk factors as contributors to atherosclerotic cardiovascular disease in end-stage renal disease. **Scand J Urol Nephrol**, v. 38, n.5, p. 405-416, 2004.